

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA VEGETAL**



Dissertação

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES DE ARROZ,
CV. BRS AG, EM RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO**

TATIANA ROSSATTO

PELOTAS, 2016

TATIANA ROSSATTO

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES DE ARROZ,
CV. BRS AG, EM RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO**

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

Orientador: Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto

Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Prof^a. Dr^a. Luciana Bicca Dode

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R823a Rossatto, Tatiana

Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares de arroz, cv. brs ag, em resposta ao estresse salino / Tatiana Rossatto ; Luciano da Silva Pinto, orientador ; Eugenia Jacira Bolacel Braga, Luciana Bicca Dode, coorientadores. — Pelotas, 2016.

116 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Salinidade. 2. Estresse oxidativo. 3. Germinação. 4. In vitro. I. Pinto, Luciano da Silva, orient. II. Braga, Eugenia Jacira Bolacel, coorient. III. Dode, Luciana Bicca, coorient. IV. Título.

CDD : 633.18

Banca Examinadora:

Dr. Luciano da Silva Pinto (orientador)

Dr^a. Letícia Carvalho Benitez

Dr. Ariano Martins de Magalhães Júnior

"Ter desafios é o que faz a vida interessante e superá-los é o que o faz a vida ter sentido" (Joshua J. Marine

Agradecimentos

A Deus, que me deu força e coragem para enfrentar as dificuldades surgidas durante a realização do curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal.

Ao meu orientador Luciano da Silva Pinto e as minhas co-orientadoras Eugenia Jacira Bolacel Braga e Luciana Bicca Dode, por acreditarem em mim e me darem a oportunidade de usufruir de seus conhecimentos.

Aos meus familiares, principalmente meus pais, pelo apoio, paciência e compreensão nos momentos de ausência.

Ao Geovandro Wolfart pela paciência e compreensão nos momentos de angústia, desespero, ausência e por ser um grande companheiro, amigo e cúmplice. Meu grande amor, obrigada por fazer parte da minha vida!

As minhas amigas e amigos de fora do programa que compreenderam minha ausência quando a mesma foi necessária.

As minhas amigas e parceiras Cristini Milech e Simone Ribeiro Lucho pelo apoio, paciência, companhia e por dividir momentos tristes e alegres durante esses dois anos.

A Leticia Carvalho Benitez, pela atenção, ensinamentos e paciência e, cujo auxílio, foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos colegas Marcelo Amaral e Isabel Lopes Vighi pela preciosa ajuda na execução dos experimentos, certamente contribuíram muito para a realização desse trabalho.

A Embrapa Clima Temperado por disponibilizar as sementes de arroz e em especial ao pesquisador Dr. Ariano Martins de Magalhães Júnior pela indispensável colaboração na execução deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Laboratório de Fisiologia Molecular e do Programa de Fisiologia Vegetal, pelos ótimos momentos de convivência, alegrias, aprendizado e descontração.

Aos demais professores do Programa que me auxiliaram na busca pelo conhecimento e, também, a todos àqueles com quem convivi durante este tempo e que contribuíram de alguma forma no meu aprendizado.

RESUMO

ROSSATTO, Tatiana. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares de arroz, cv. BRS AG, em resposta ao estresse salino.** 2016. 116f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A cultivar de arroz BRS AG, desenvolvida pela Embrapa Clima Temperado, é a primeira cultivar destinada a outros fins, que não o consumo humano, podendo ser utilizada na produção de etanol e ou alimentação animal. No entanto, são poucas as informações sobre esta nova cultivar e desta forma é importante conhecer o seu comportamento frente à salinização do solo e da água que afetam cerca de 20 % da terra cultivada e quase metade das terras irrigadas do planeta. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta da cultivar BRS AG, durante o desenvolvimento inicial, à diferentes concentrações salinas, através de análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares. As plantas foram cultivadas *in vitro* em meio de cultivo com cinco concentrações de NaCl (32, 68, 102, 136, 170 mM) e o controle (0 mM). Avaliações de germinação ocorreram aos 7 e aos 14 dias e as análises de massa seca e massa fresca da parte aérea e raiz; comprimento de raiz e parte aérea, número de folhas e número de raiz foram realizadas aos 21 dias. Para as análises enzimáticas da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR), expressão gênica, espécies reativas de oxigênio (EROs), peroxidação lipídica (MDA) e concentração de prolina foi utilizada a concentração de 136 mM de NaCl e o controle. As coletas foram realizadas aos 5, 10, 15 e 20 dias. Os resultados indicam que a germinação da cv. BRS AG começa a ser prejudicada a partir da concentração de 170 mM de NaCl e a partir da concentração de 136 mM de NaCl é possível observar danos causados pelo estresse salino no crescimento. O acúmulo de prolina nas plantas estressadas foi superior ao encontrado nas plantas que não receberam estresse, o que está diretamente relacionado ao aumento da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de prolina em cada um dos tempo de estresse. A atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GR parecem ser efetivas na proteção dessas plantas contra o estresse oxidativo. Embora tenha havido aumento de EROs, não houve aumento nos níveis de MDA. O aumento na transcrição de todos os genes avaliados, exceto *OsAPX6* que manteve-se estável, contribuíram para o aumento ou a manutenção da atividade das enzimas. De acordo com os resultados *in vitro* as plantas de arroz, cultivar BRS AG, suportam concentrações de até 136 mM de NaCl.

Palavras-chave: salinidade; estresse oxidativo; germinação; *in vitro*

ABSTRACT

ROSSATTO, Tatiana. **Physiological, biochemical and molecular changes of rice cv. AG BRS in response to salt stress**. 2016. 116f. Dissertation (Masters) – Graduation Program in Vegetal Physiology. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2016.

The rice cultivar BRS AG developed by Embrapa Clima Temperado, is the first cultivar intended for other purposes, that isn't human consumption, and can be utilized in ethanol production and/or animal feeding. However, there are few informations about this new cultivar and, thus, is important to know your behavior to salinization of soil and irrigation water affecting about 20% of cultivated land and almost half of the irrigated land in the world. Therefore, the objective of this study was to evaluate the BRS AG, cultivar answer during the initial development, subjected to different salt concentrations, through physiological, biochemical and molecular analyzes. The plants were grown *in vitro* through culture with five concentrations of NaCl (32, 68, 102, 136, 170 mM) and control (0 mM). Evaluations of germination occurred at 7 and 14 days and analysis the dry weight and fresh weight of shoot and root; length of root and shoot, number of leaves and number of root were performed at 21 days. To the enzymatic analysis catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) and expressions gene, reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (MDA) and concentration of proline it was used the concentration of 136 mM of NaCl and control. The collections were performed at 5, 10, 15 and 20 days. The results indicate that the germination of cv. BRS AG starts to be impaired at concentrations of 170 mM NaCl and from the concentration of 136 mM NaCl can be observed damage caused by salt stress on growth. Proline accumulation in stressed plants was higher found in plants the plants that didn't receive damage, which is directly related to increased expression of genes involved in proline biosynthesis in each of the times of stress. The activities of SOD, CAT, APX and GR they seem to be effective to protect these plants against oxidative stress, although there was an increase of EROs, there was no increase in MDA levels. The increase of in the transcription of all genes evaluated, except OsAPX6 that remained stable, contributed to the increase or maintenance of enzyme activity. According to the results *in vitro*, the BRS AG cultivar rice plants support concentrations up to 136 mM NaCl.

Key-words: salinity; oxidative stress; germination; *in vitro*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema mostrando os principais compartimentos de produção das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos envolvidos na eliminação dessas espécies..... 30
- Figura 2 Modelo proposto para o metabolismo de prolina em plantas superiores..... 34
- Figura 3 Regulação do metabolismo de prolina em plantas. Círculos indicam as enzimas e retângulos o contexto ambiental; caixas abertas e pretas correspondem às vias de sinalização demonstradas em *Arabidopsis thaliana* e *Thellungiella salsuginea*, respectivamente. Abreviaturas: P5CS - pirrolina-5-carboxilato sintetase; PRODH - prolina desidrogenase; PLC - fosfolipase C; PLD - fosfolipase D; EROs - Espécies Reativas de Oxigênio..... 35

CAPÍTULO I

- Figura 1 Altura (A) e Comprimento de raiz (B) de plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a diferentes concentrações de NaCl, por 21 dias. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP (n=5). Pm = ponto máximo..... 52
- Figura 2 Número de raízes de plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a diferentes concentrações de NaCl por 21 dias. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP (n=5) 53
- Figura 3 Massa fresca da parte aérea (A), massa fresca da raiz (B), massa seca da parte aérea (C) e massa seca da raiz (D) de plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a diferentes concentrações de NaCl por 21 dias. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP (n=5). Pm = ponto máximo..... 55
- Figura 4 Concentração de prolina livre presente em sementes e folhas de arroz, cultivar BRS AG, coletadas aos 5, 10, 15 e 20 dias em condições de ausência de sal (controle) e presença de sal (136 mM de NaCl). Letras maiúsculas indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre a concentração de NaCl e o controle em cada dia. Médias \pm desvio padrão (n=3) 57
- Figura 5 Quantificação Relativa (QR) da expressão de genes da biossíntese de prolina em plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a condições de salinidade (136 mM de NaCl) em diferentes tempo de estresse. Tempo zero representa as plantas controle que foram

	coletadas nos mesmos tempo das demais. Letras minúsculas indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os dias de estresse. Médias \pm desvio padrão (n=3)	60
Figura 6	Quantificação Relativa (QR) da expressão de genes do catabolismo de prolina em plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a condições de salinidade (136 mM de NaCl) em diferentes tempos de estresse. Tempo zero representa as plantas controle que foram coletadas nos mesmos tempos das demais. Letras minúsculas indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os dias de estresse. Médias \pm desvio padrão (n=3)	61
Figura 7	Comparação da expressão dos genes do metabolismo de prolina em cada um dos tempos (dias) avaliados em relação à concentração de prolina sintetizada em plantas de arroz, em condições de estresse salino (136 mM de NaCl). As letras diferentes indicam diferença estatística para a expressão dos genes do metabolismos de prolina. Médias \pm desvio padrão (n=3). Cinco dias de estresse salino (A), 10 dias de estresse salino (B), 15 dias de estresse salino (C) e 20 dias de estresse salino (D).....	64

CAPÍTULO II

Figura 1	Teor de superóxido em arroz, cultivar BRS AG, submetida ao estresse salino (136 mM). Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm desvio padrão (n=3). Letras maiúsculas indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre a concentração de NaCl e o controle em cada dia.....	78
Figura 2	Teor de peróxido de hidrogênio em arroz, cultivar BRS AG, submetida ao estresse salino (136 mM). Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm desvio padrão (n=3). Letras maiúsculas indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre a concentração de NaCl e o controle em cada dia.....	81
Figura 3	Teor de peroxidação lipídica em arroz, cultivar BRS AG, submetida ao estresse salino (136 mM). Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm desvio padrão (n=3). Letras maiúsculas indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre a concentração de NaCl e o controle em cada dia.....	82
Figura 4	Atividade da enzima superóxido dismutase em plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a condições de salinidade por diferentes tempos. Médias da atividade \pm desvio padrão (n=3), onde letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os dias de	

	estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre o controle e sal em cada dia.....	84
Figura 5	Atividade da enzima catalase em plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a condições de salinidade por diferentes tempos. Médias da atividade \pm desvio padrão (n=3), onde letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre o controle e sal em cada dia.....	86
Figura 6	Atividade da enzima ascorbato peroxidase em plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a condições de salinidade por diferentes tempos. Médias da atividade \pm desvio padrão (n=3), onde letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre o controle e sal em cada dia.....	87
Figura 7	Atividade da enzima glutathiona redutase em plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a condições de salinidade por diferentes tempos. Médias da atividade \pm desvio padrão (n=3), onde letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre o controle e sal em cada dia.....	89
Figura 8	Expressão de genes que codificam seis isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD) em plantas de arroz, BRS AG, cultivadas em condições de salinidade (136 mM de NaCl) por diferentes tempos.....	91
Figura 9	Expressão de genes que codificam oito isoformas da enzima ascorbato peroxidase (APX) em plantas de arroz, BRS AG, em cultivadas em condições de salinidade (136 mM de NaCl) por diferentes tempos.....	93
Figura10	Expressão de genes que codificam três isoformas da enzima catalase (CAT) em plantas de arroz, BRS AG, cultivadas em condições de salinidade (136 mM de NaCl) por diferentes tempos.....	96
Figura11	Expressão de genes que codificam três isoformas da glutathiona redutase (GR) em plantas de arroz, BRS AG, cultivadas em condições de salinidade (136 mM de NaCl) por diferentes tempos.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características das plantas da nova cultivar de arroz irrigado BRS AG em comparação com a cultivar de arroz convencional BRS Pampa.....	18
Tabela 2	Características do grão da nova cultivar de arroz irrigado BRS AG em comparação com a cultivar convencional BRS Pampa.....	19
Tabela 3	Potenciais perdas em rendimento do arroz irrigado em função da porcentagem de sódio trocável (PST) e da condutividade elétrica do solo.....	21

CAPÍTULO I

Tabela 1	Lista de <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-qPCR e tamanho do <i>amplicon</i> . Temperatura de anelamento 61°C.....	47
Tabela 2	Porcentagem de germinação de arroz, cultivar BRS AG, submetida a diferentes concentrações de NaCl, avaliadas aos sete e quatorze dias de idade.....	48

CAPÍTULO II

Tabela 1	Lista de <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-qPCR Temperatura de anelamento 61°.....	77
Tabela 2	Quantificação relativa (QR) da expressão de genes que codificam as enzimas do sistema antioxidante (superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutathiona redutase e catalase) em arroz, cultivar BRS AG, submetida a estresse salino (136 mM de NaCl) Nível de significância $p \leq 0,05$, teste de Tukey, representado pela média \pm desvio padrão (n=3). Diferença estatística entre os tempos de estresse (5, 10, 15 e 20 dias) são indicados por letras maiúsculas.	98

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERENCIAL TEÓRICO	16
CAPÍTULO 1 ANÁLISES MORFOFISIOLÓGICAS E CONCENTRAÇÃO DE PROLINA EM PLANTAS DE ARROZ, CV BRS AG, SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO	
1 INTRODUÇÃO.....	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4 CONCLUSÕES.....	67
CAPÍTULO 2 EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS DE ARROZ, CV. BRS AG, SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO	
1 INTRODUÇÃO.....	68
2 MATERIAL E MÉTODOS	70
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
4 CONCLUSÕES.....	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
REFERÊNCIAS.....	100

INTRODUÇÃO GERAL

A preocupação com a poluição ambiental e a emissão de gases que provocam o efeito estufa na atmosfera reforçam cada vez mais a importância da produção comercial dos biocombustíveis (OLIVEIRA; ZANIN, 2015). Nesse sentido, estudos estão sendo desenvolvidos com intuito de se obter um combustível menos poluente, a partir de matérias-primas renováveis. Diversas fontes vegetais são utilizadas como fonte de carboidrato para a produção de etanol. No Brasil, a cana-de-açúcar é a principal fonte de sacarose utilizada para a produção desse biocombustível. Entretanto, em outros países como Estados Unidos e França, além da sacarose, o amido está sendo utilizado para esse propósito. O amido é considerado uma das fontes mais abundantes de carboidratos na natureza. O grão do arroz é rico em amido, apresentando conteúdo significativamente maior que o grão do milho (MONTESINOS; NAVARRO, 2000).

O aumento populacional e a busca por energias renováveis tem despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores em desenvolver cultivares, entre elas de cereais, com características que incluem resistência/tolerância a condições de estresses bióticos e abióticos e com alto rendimento de determinados produtos finais do metabolismo, entre eles o amido (TUNCEL; OKITA, 2013). As plantas frequentemente enfrentam condições rigorosas de estresses ao longo de suas vidas tais como baixas e altas temperaturas, calor, salinidade, seca, inundação, ataques de patógenos, entre outros. Esses estresses, muitas vezes conduzem a uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares causando danos irreparáveis aos vegetais, reagindo com seu potencial genético e limitando seu crescimento, reprodução e produtividade (GILL; TUJETA, 2010). A salinidade da água e do solo é um dos principais problemas para o cultivo do arroz irrigado no sul do país e em outras partes do mundo (CARMONA; ANGHINONI; WEBER, 2011).

A salinidade é caracterizada pelo excesso de sais solúveis no solo, que podem prejudicar significativamente o rendimento das culturas. Aproximadamente 20 % das áreas irrigadas no mundo são afetadas pela salinidade (FAO, 2013). Na metade sul do Estado do Rio Grande do Sul, a salinidade do solo pode ocorrer nas lavouras de arroz irrigado das Planícies Costeiras do RS, devido à irrigação com água salina. Períodos de baixa precipitação na região permitem a entrada de maior quantidade de

água do mar na Lagoa, ocasionando a salinização da mesma. Consequentemente, a mesma água é utilizada na irrigação das lavouras dos arrozais. A condutividade elétrica do extrato saturado (CEes), a partir de $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ torna-se desvantajoso à cultura de arroz. Na região de Pelotas o valor máximo de CE encontrado para a região foi de $7,49 \text{ dS m}^{-1}$, valor este muito acima do teor crítico do arroz (CARMONA; ANGHINONI; WEBER, 2011).

O efeito da salinidade sobre as plantas é consequência de dois componentes distintos do estresse salino: (i) o componente osmótico, resultante da elevada concentração de solutos na solução do solo, provocando um déficit hídrico pela redução do potencial osmótico; (ii) o componente iônico, decorrente dos elevados teores de Na^+ e Cl^- , e da alterada relação K^+/Na^+ e outros nutrientes. Estas alterações acabam refletindo no balanço hídrico e nutricional, provocando mudanças no metabolismo, níveis hormonais, nas trocas gasosas e na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e irão comprometer a expansão e divisão celular, consequentemente, o crescimento da planta, levando a aceleração da senescência foliar, resultando na morte da planta (SINGH et al., 2015).

Consequentemente, os diversos estresses ambientais atingem rotas de sinalização e respostas similares na célula, tais como enzimas antioxidantes e a acumulação de solutos compatíveis. Entre os mecanismos fisiológicos desenvolvidos pelas plantas, a característica mais marcante para a conferência de tolerância sob estresse salino é o ajuste osmótico. Dentre as moléculas com função osmoprotetoras, a prolina é uma das mais importantes. Além do ajuste osmótico, ela está envolvida na estabilização de proteínas e de enzimas antioxidantes, eliminação direta de espécies reativas de oxigênio (EROs), equilíbrio da homeostase celular e sinalização (MUNNS; GILLIHAM, 2015).

Em condições de crescimento ideais, as plantas produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) em resposta as atividades metabólicas. Estresse oxidativo, em todos os organismos aeróbicos, surge do desbalanço entre a geração e a eliminação de EROs, que é um termo coletivo, frequentemente usado para incluir não apenas radicais livres, tais como: radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila (OH^{\cdot}), mas também alguns não radicais derivados do oxigênio capazes de gerar radicais livres, como por exemplo, oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As EROs são espécies químicas, altamente reativas, e, na ausência de mecanismos de proteção, podem produzir danos na estrutura e função celular (SILVEIRA et al., 2010).

Em resposta ao estresse oxidativo as plantas apresentam mecanismos para se proteger. As plantas possuem um sistema antioxidante enzimático e não enzimático. As principais defesas antioxidantes enzimáticas são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) glutationa redutase (GR), deidroascórbico redutase (DHAR), monodeidroascórbico redutase (MDHAR), glutationa peroxidase (GPX) e guaiacol peroxidase (GOPX), entre outras. Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se compostos como a glutationa (GSH) o α -tocoferol (vit. E), o ácido ascórbico (vit. C), os carotenoides e os flavonoides.

As enzimas CAT, APX, SOD e GR são codificadas a partir de diferentes famílias gênicas. Em arroz, as APX são codificadas por uma família de oito genes, localizados em diferentes compartimentos celulares: duas isoformas citosólicas (*OsAPx1* e *OsAPx2*), duas isoformas peroxissomais/glioxissomais (*OsAPx3* e *OsAPx4*), e (*OsAPx5*, *OsAPx6*, *OsAPx7* e *OsAPx8*) codificam isoformas cloroplásticas (TEIXEIRA et al., 2004).

Todas as isoformas de SOD são nucleares, codificadas e direcionadas aos seus respectivos compartimentos subcelulares, quando necessário, por meio de sequências de direcionamento amino-terminal (BOWLER et al., 1992; GILL; TUTEJA 2010). As SODs são classificadas de acordo com seu cofator metálico e/ou sua localização subcelular: Fe-SOD, presente nos cloroplastos; Mn-SOD, presente nas mitocôndrias e peroxissomos e as Cu/Zn-SODs, presentes nos cloroplastos, peroxissomos, citosol e, possivelmente, no espaço extracelular (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; CAVALCANTI et al., 2004; JALEEL et al., 2009).

Segundo Bowler et al. (1992) a enzima catalase é constituída por uma pequena família multigênica, as quais, em arroz, foram denominadas *CatA*, *CatB* e *CatC* (MENEZES-BENAVENTE; TEIXEIRA; KAMEI, 2004). Três genes que codificam GR também têm sido descritos em arroz, uma isoforma citosólica (*OsGR2*) (KAMINAKA et al., 1998) e duas isoformas cloroplastídicas (*OsGR1* e *OsGR3*) (BASHIR et al., 2007). Entretanto para a cultivar BRS AG, não há informações sobre a atividade das enzimas antioxidantes e a expressão de genes que codificam as isoformas.

Na metade Sul do Estado do Rio grande do Sul além da temperatura, dificuldades de cultivo em terras baixas (solos inundados, mal drenados) são desafiadores para algumas culturas, entre elas a cana-de-açúcar, e propício para o cultivo do arroz irrigado. O Rio Grande do Sul responde por 68,8 % da produção

brasileira, gerando uma produção total de 8,6 milhões de toneladas (CONAB, 2015). Safras com excedente de produção, falta de matéria prima e demanda energética contribuíram para o desenvolvimento de uma nova cultivar pela Embrapa Clima Temperado (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2015).

A cultivar BRS AG foi desenvolvida com o objetivo atender a demanda energética da metade sul do estado gaúcho, pois é mais eficiente em produtividade. É a primeira cultivar de arroz irrigado lançada para outros fins, que não o consumo humano, podendo ser utilizada como matéria prima para produção de etanol e ou para alimentação animal.

As plantas de porte intermediário desta cultivar BRS AG, possuem ciclo biológico ao redor de 126 dias, da emergência à maturação; grãos grandes, sem arista e alta capacidade produtiva. A estatura média das plantas é de 110 cm. A espessura do colmo é de 5,5 mm o que lhe confere colmos fortes tolerantes ao acamamento apesar da estatura de plantas (110) mais elevada. Apresenta folhas pilosas sendo a folha bandeira classificada como decumbente. Apresenta tolerância ao degrane, portanto não enquadra-se com risco de tornar-se uma planta infestante da lavoura rizícola. Aliado a este fato, as sementes da linhagem perdem o poder germinativo e vigor com grande facilidade, contribuindo para diminuir seu potencial de infestação, não podendo ser comparado à principal planta daninha da lavoura: arroz vermelho. Apresenta moderada tolerância à toxidez por ferro, bem como para a principal doença incidente sobre a cultura (brusone). Uma característica marcante desta cultivar, quando comparada com as demais, é o peso médio de mil grãos de aproximadamente de 52 g, enquanto a maioria das cultivares de arroz irrigado apresentam um peso médio de mil grãos de 25 g (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2015).

Devido ao interesse econômico e cujos estudos ainda são escassos para esta cultivar, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta da cultivar BRS AG durante o desenvolvimento inicial, à diferentes concentrações salinas, através de análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Importância do arroz e do desenvolvimento da nova cultivar

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo, sendo responsável pelo suprimento de 20 % das calorias consumidas na alimentação de pessoas no mundo. Em 2014, a área do planeta ocupada para o seu cultivo foi de aproximadamente 158 milhões de hectares tendo uma produtividade mundial de 746,7 milhões de toneladas de grãos em casca. O Brasil é o país com a maior produção de arroz fora do continente asiático (SOSBAI, 2014). Levantamento realizado pela CONAB, em junho de 2015, aponta que na safra 2014/15, mesmo com uma menor área plantada, a produção e a produtividade no país foram respectivamente 3,5 % e 6,2 % maiores do que a safra anterior 2013/14.

Os estados do Sul do Brasil, Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR), representam a principal região produtora de arroz, com cerca de 80 % do total produzido no país (IRGA, 2015). O Estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional, representando mais de 68,8 % do arroz colhido no país. A média de produtividade no Estado do RS, na safra 2014/15, foi de aproximadamente 7.700 kg ha^{-1} (CONAB, 2015). Diante disso, o Rio Grande do Sul chegou a uma produção de 8,6 milhões de toneladas, superada apenas pela safra 2010/11 que atingiu 8,9 milhões de toneladas (CONAB, 2015; IRGA, 2015). A região com maior produção de arroz irrigado é a metade Sul do Estado, em virtude do clima e do solo da região serem propícios para o cultivo dessa espécie. Segundo levantamento realizado pelo IRGA (2015) na safra 2014/15, no município de Pelotas, a produtividade foi de 8.200 kg ha^{-1} e a produção atingiu 66.182 mil toneladas.

No entanto, em casos como na safra 2010/11 e 2014/15 em que, a cadeia produtiva do arroz apresentou um excedente de produção, a oferta elevada de arroz no mercado, gera a redução do preço pago pelo produto, não cobrindo assim os custos de produção. Nessas circunstâncias, muitos orizicultores acabam destinando as suas lavouras para alimentação animal, utilizando o arroz na elaboração da silagem e ou misturando os grãos na ração. Uma vez que, além da produção de arroz, na metade Sul do RS, outras atividades contribuem como fonte de renda para os

agricultores, como a produção leiteira, de suínos, de ovos, de aves e a cultura da soja. Para essas atividades, exceto o cultivo da soja, o principal desafio é a falta de matéria prima para rações e demais complementos usados na criação animal (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2015).

A falta de matéria prima para a produção animal e a elevada produção de arroz nas últimas safras, bem como, a disponibilidade de terras baixas para o cultivo do arroz irrigado no Estado do RS, cooperaram para que uma nova cultivar de arroz fosse desenvolvida. Baseado nesse cenário de crise, na safra 2010/11, a Embrapa, através de seu Programa de Melhoramento Genético, foi demandada por um padrão de arroz diferenciado, com características próprias para produção de etanol, e para alimentação animal, retirando parte do grão longo fino de oferta ao mercado consumidor (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2015).

1.2 Cultivar BRS AG

A cultivar BRS AG é resultante de um cruzamento realizado na Embrapa Clima Temperado entre a cultivar americana Gulfmont (genitor feminino) de arroz irrigado e a linhagem SLG1, de origem japonesa. É a primeira cultivar de arroz irrigado desenvolvida para outros usos, que não para o consumo humano, pois, não apresenta padrões adequados para consumo segundo a preferência brasileira. Os grãos são grandes e extremamente farináceos, porém, com uma relação amilose/amilopectina que desqualifica o grão durante cozimento, oportunizando a utilização deste para alimentação animal e/ou produção de etanol (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2015).

As plantas da nova cultivar BRS AG (Tabela 1), possuem um ciclo biológico de cerca de 126 dias da emergência a maturação, grãos grandes com alto conteúdo de amido; altura média das plantas é de 110 cm; comprimento do colmo é de 88 cm e a espessura é de 5 mm, o que lhe confere colmos fortes resistentes ao acamamento apesar da elevada estatura de plantas. As folhas são pilosas sendo a folha bandeira classificada como descendente. As plantas dessa cultivar apresentam moderada tolerância à toxidez por ferro, bem como para a principal doença incidente sobre a cultura (brusone). A cultivar é resistente ao degrane e as sementes perdem facilmente o poder e vigor germinativo, desse modo, não apresenta risco de tornar-se uma planta invasora e infestante da lavoura de arroz, não podendo ser comparado à principal planta daninha da lavoura: arroz vermelho (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2012).

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

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

Fonte: Magalhães Júnior, 2015.

Uma característica marcante da nova cultivar, quando comparado com as demais, é o peso médio de mil grãos ser aproximadamente 52 g, enquanto a maioria das cultivares de arroz irrigado apresenta um peso médio de 25 g, dados mostrados na Tabela 2. Essa diferença significativa do peso de mil grãos pode ser explicada pelo formato da cariopse, diferindo do padrão longo-fino requerido pelo mercado consumidor (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2012).

Tabela 2 - Características do grão da nova cultivar de arroz irrigado BRS AG em comparação com a cultivar convencional BRS Pampa.

CARACTERÍSTICAS	CULTIVAR	CULTIVAR
Grãos	BRS AG	BRS PAMPA
Forma da cariopse	Meio alongada	Longo-fino
Arista	Ausente	Ausente
Cor das glumas	Palha	Palha
Cor do ápulo na floração	Branca	Branca
Cor do ápulo na maturação	Branca	Branca
Pilosidade dos grãos	Presente	Presente
Comprimento com casca (mm)	7,82	9,82
Largura com casca (mm)	3,64	2,2
Espessura com casca (mm)	2,60	2,0
Comprimento sem casca (mm)	6,30	7,19
Largura sem casca (mm)	2,60	1,96
Espessura sem casca (mm)	1,90	1,76
Relação comprimento/largura sem casca (mm)	2,15	3,59
Peso de mil grãos (g)	52	25,6
Renda total (%)	77,6	68
Inteiros (%)	71,6	62
Amilose	Alta	Alta
Temperatura de gelatinização	Baixa	Baixa
Produtividade potencial (t ha ⁻¹)	10	10

Fonte: Magalhães Júnior, 2015.

Testes de Distinguilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE) foram realizados a campo pela Embrapa Clima Temperado. A cultivar se mostrou uniforme, com ausência de plantas atípicas, demonstrando ser estável geneticamente (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2012).

1.3 Biocombustíveis

A busca por soluções alternativas para o consumo do petróleo, desde a década de 1970 até hoje, bem como, a preocupação com a poluição ambiental e a emissão de gases que provocam o efeito estufa na atmosfera reforçam cada vez mais a importância da produção comercial dos biocombustíveis. Devido à grande dependência de combustíveis fósseis e a possibilidade de diminuição das reservas mundiais, os biocombustíveis oferecem uma via potencial para evitar a instabilidade política global e problemas ambientais que surgem da utilização dos combustíveis fósseis (OLIVEIRA; ZANIN, 2015). O etanol combustível pode ser produzido a partir de diversas fontes vegetais. No Brasil a cana-de-açúcar é a que oferece mais vantagens energéticas, sendo a matéria-prima principal a suprir a demanda de todo o setor sucroalcooleiro brasileiro (KOHLHEPP, 2010).

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de etanol a partir da cana-de-açúcar, perdendo apenas para os Estados Unidos. Levantamento realizado pela CONAB (2016), na safra de 2014/15 e 2015/16, a produção brasileira de etanol total no país alcançou 28,7 e 30,5 bilhões de litros, respectivamente. A região Centro-Oeste, Sudeste e Norte são os responsáveis por esse aumento de 6,3 %. Entretanto, alguns estados do Nordeste também apresentam aumento na produção de etanol. Contudo, o cultivo da cana-de-açúcar é pouco expressivo na Região Sul do país, visto que, apesar da cultura se desenvolver em uma boa amplitude térmica (16 °C a 33 °C), estudos indicam que temperaturas inferiores a 21 °C reduzem a taxa de alongamento dos colmos. A região é responsável por cerca de 7 % da produção nacional, sendo que mais de 99,8 % desse total é produzido na região norte do Paraná, onde as temperaturas médias são mais altas do que no restante da região Sul (CONAB, 2014). Além da temperatura, as dificuldades de cultivo em terras baixas (solos encharcados, mal drenados) são desafiadores para algumas culturas, entre elas a cana-de-açúcar, e propício para o cultivo do arroz irrigado. Neste sentido, a nova cultivar BRS AG, tem por objetivo atender a demanda energética da metade sul do estado gaúcho, pois é mais eficiente em produtividade (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2012).

1.4 Salinidade

Nas condições naturais ou em ambientes controlados, as plantas sempre estão expostas a alterações ambientais que possam alterar o seu equilíbrio. Essas condições desfavoráveis afetam negativamente o metabolismo, crescimento e desenvolvimento da planta. Dentre os estresses aos quais as plantas encontram-se expostas temos os bióticos e abióticos (KAZEMI; ESKANDARI, 2011). Baixas e altas temperaturas, seca, inundação, salinidade, poluentes e radiação são alguns elementos de estresses mais conhecidos que levam à redução da produtividade da maioria das culturas. Dentre estes, a salinidade, além de limitar severamente o crescimento, desenvolvimento e a produtividade das culturas, contribui com a contínua perda de terras aráveis, o que resulta em desertificação nas regiões áridas e semiáridas do mundo (PONS; CORNEJO; SANZ, 2011).

A salinidade é caracterizada pelo excesso de sais solúveis no solo. Uma das formas que podem ser utilizadas para quantificar a quantidade de sais presente no

solo é a condutividade elétrica (CE). Munns; Tester (2008) classificam os solos como salinos quando a condutividade elétrica (CE) da solução do solo é igual ou maior que $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, o que equivale a aproximadamente 40 mM de NaCl. Para Carmona Anghinoni; Weber (2011) a condutividade elétrica do extrato saturado (CEes), a partir de $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ torna-se desvantajoso à cultura do arroz, conforme dados mostrados na Tabela 3. Entretanto, dados da SOSBAI (2014) indicam que o nível crítico da CE do solo, em pasta saturada, é de $2,0 \text{ dS m}^{-1}$, da mesma forma a CE da solução do solo, denominada condutividade elétrica efetiva (CEe), é de $2,0 \text{ dS m}^{-1}$, para o cultivo de arroz irrigado no RS. Outra forma de monitorar a salinidade do solo é através da porcentagem de sódio trocável (PST). Para o cultivo do arroz irrigado, a PST do solo entre 15 e 20 %, passam a ser prejudiciais à cultura (CARMONA; ANGHINONI; WEBER, 2011; SOSBAI, 2014).

De acordo com Fraga et al. (2010) em pontos de captação de água de irrigação ao redor da Lagoa dos Patos a condutividade variou de $0,3 \text{ dS m}^{-1}$ até $7,0 \text{ dS m}^{-1}$, ao longo dos anos. Segundo Carmona; Anghinoni; Weber (2011), o valor máximo de CE encontrado para a região de Pelotas foi de $7,49 \text{ dS m}^{-1}$, valor este muito acima do teor crítico do arroz.

Tabela 3 - Potenciais perdas em rendimento do arroz irrigado em função da porcentagem de sódio trocável (PST) e da condutividade elétrica do solo.

PST	CEes	Efeito sobre o rendimento
%	dS m^{-1}	%
< 15	< 2,0	Nulo
15 a 40	4,0 a 6,0	Perdas de 10 a 15
40 a 80	6,1 a 10	Perdas de 20 a 50
> 80	> 10	Perdas superiores a 50

Fonte: Adaptado de CARMONA; ANGHINONI; WEBER, 2011.

Inúmeras são as causas que podem levar a salinização de um solo, dentre elas à de origem natural e a induzida pela atividade humana. A salinidade do solo pode ser resultante da sua própria formação, devido ao acúmulo de íons oriundos do intemperismo das rochas, principalmente Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- , SO_4^{-2} , entre outros materiais geológicos e biológicos. De forma semelhante, a chuva e o vento podem contribuir com o acúmulo de sais ao longo do tempo, mesmo em pequenas quantidades. A elevação do nível do mar, pode fazer com que a água salgada alcance as terras costeiras depositando grandes quantidades de sais nesses locais. Por outro

lado, a salinização pode ser em resposta a atividade antrópica, através da utilização de água de má qualidade para irrigação das lavouras e/ou pela prática de irrigação em áreas de baixas precipitação anual e drenagem insuficiente, bem como pela aplicação excessiva de fertilizantes e corretivos de solo (RENGASAMY, 2010).

Em todo o mundo mais de 800 milhões de hectares de terra são afetados pelo excesso de sais (MUNNS; TESTER, 2008). Aproximadamente 20% das áreas irrigadas no mundo são afetadas pela salinidade (FAO, 2013) e, com a expectativa de aumento da população mundial, a perda do solo agrícola devido à salinidade representa um sério problema para a produção de alimentos.

A irrigação de lavouras de arroz com água salina proveniente de rios litorâneos, como o Tramandaí e o Mampituba, e da Lagoa dos Patos, Mangueira e Mirim é um fator que contribui para a salinidade dos solos da região sul do Brasil. No Rio Grande do Sul, o principal sistema de irrigação da cultura do arroz é por inundação, podendo conduzir à salinização dos solos com drenagem inadequada, especialmente as lavouras da região litorânea que utilizam a água da laguna dos patos, que está sujeita à salinização pela entrada de água do mar quando baixa o nível deste manancial, tornando-se uma das maiores limitações ambientais na produção de arroz. Períodos de menor precipitação, os meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro, são os que coincidem com a necessidade de maior volume de água pelos arrozais, coincidindo com a fase reprodutiva da cultura (CARMONA; ANGHINONI; WEBER, 2011).

1.4.1. Efeitos da salinidade sobre as plantas

Os efeitos do estresse salino sobre as plantas são dependes do genótipo, estágio de desenvolvimento, concentração e tempo de exposição ao estresse. A salinidade do solo pode comprometer a germinação das sementes pela diminuição do potencial osmótico externo, impedindo a absorção de água, retardando a embebição das sementes ou o alongamento da radícula (SOARES et al., 2015). Entretanto, além de impedir ou reduzir a germinação de sementes, o estresse salino pode aumentar o tempo de germinação, atrasando o início do processo. Havendo restrição hídrica para as sementes, a hidratação das mesmas é afetada, e com isso será necessário um tempo maior para que elas encontrem um mecanismo de ajuste osmótico (HOSSEINI; POWELL; BINGHAM, 2003; BEWLEY et al., 2013; THIAM et al., 2013).

A salinidade, quando em níveis elevados, pode afetar a germinação pelos efeitos tóxicos sobre a semente, ocasionados pela absorção dos íons Na^+ e Cl^- . A toxicidade altera a atividade de enzimas e o metabolismo dos ácidos nucleicos (GOMES-FILHO et al., 2008), causa alterações no metabolismo de proteínas (MENG et al., 2014; YACOUBI et al., 2013); desbalanço hormonal (OZHAN; HAJIBABAEI, 2014) e reduz a utilização de reservas de sementes (OTHMAN et al., 2006). O efeito do estresse salino sobre a germinação das sementes e o crescimento inicial das plântulas tem sido demasiadamente estudado em diversas espécies.

A salinidade reduz a germinação de sementes de arroz e afeta negativamente o crescimento inicial das plantas com o aumento da concentração de NaCl no meio (HATSCHBACH, 2009; KAZEMI; ESKANDARI, 2011; ANBUMALARMATHI; MEHTA, 2013). Além do arroz, outras espécies são afetadas durante a germinação pelo estresse salino, dentre elas, o repolho (*Brassica oleracea* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.), espinafre água (*Impomoea aquatica* Forsk.), mostarda (*Brassica juncea* L.), (SARKER; HOSSAIN; KASHEM, 2014), genótipos de feijão caupi, *Vigna unguiculata* L. (EL-SHAIENY, 2015), soja (*Glycine max* L.) cultivares M9144RR e M8527RR (SOARES et al., 2015), aveia branca (*Avena sativa* L.) (BRUNES et al., 2013), erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill), salsa (*Petroselinum crispum* Mill.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (SOLIMAN; EL-SHAIENY, 2014; BAFEEL, 2014), trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) (ASCI, 2011) e *Vicia faba* L. (ANAYA et al., 2015).

A resposta das plantas à salinidade acontece em duas fases distintas, uma delas de caráter osmótico e outra iônica. A primeira fase é rápida, pois ocorre imediatamente após o contato com a salinidade, conhecida como fase osmótica. Nessa fase a água é osmoticamente retida na solução salina, de forma que o aumento da concentração de sais, a torna cada vez menos disponível para as plantas. Assim, com o aumento da salinidade ocorre diminuição do potencial osmótico do solo, dificultando a absorção de água pelas raízes, com consequente redução do crescimento da parte aérea pela falta de água (MUNNS; TESTER, 2008).

A redução do crescimento, principalmente da área foliar, pode ser explicado pela diminuição na expansão da parede celular (redução na pressão de turgescência). Com a redução da área foliar, ocorre menor transpiração e maior resistência estomática, visto que, as plantas tendem a fechar os estômatos como uma maneira de evitar a perda de água, afetando a taxa fotossintética (SENGAR; SENGAR; SINGH,

2013). Nessa fase, as reações bioquímicas funcionam normalmente, porém com menor velocidade (PARIHAR et al., 2014).

O estresse salino rapidamente reduz a taxa de crescimento da folha devido à redução no número de células em alongamento (SZALAI; JANDA, 2009). Os sais em excesso, podem danificar a integridade da membrana plasmática e de certo modo afetar o bombeamento de prótons através da mesma, processo realizado pelas ATPases de membrana. Desta forma, o processo de acidificação do apoplasto é prejudicado, sendo este um dos maiores requisitos para aumentar a extensibilidade da parede celular, visto que, neste pH as expansinas atuam e realizam o afrouxamento da parede celular, logo o alongamento. O aumento do pH apoplástico em genótipos de milho sensíveis ao sal, sob estresse salino, acarretou em redução do crescimento devido à menor acidificação do apoplasto. Em milho está bem claro que a redução do crescimento da parte aérea deve-se, principalmente, a alterações no pH apoplástico, bem como a modificações na atividade de enzimas presentes nesse local (PITANN; KRANZ; MUHLING, 2009).

Amirjani (2010) observou redução de 3 %, 28,7 %, 40,7 % e 79 % da área foliar de plantas de arroz cultivadas nas concentrações de 0, 25, 50, 100 e 200 mM de NaCl em relação às plantas não tratadas, respectivamente. Isso pode ser parcialmente atribuído a redução no teor relativo de água foliar, conseqüentemente ocorre a perda de turgor, que por sua vez provoca fechamento dos estômatos e redução da assimilação de CO₂ e taxa fotossintética.

Ainda se tratando de estresse primário em resposta a salinidade, a segunda fase tem início quando os íons salinos são absorvidos no fluxo transpiratório, acarretando em problemas de toxicidade (fase tóxica ou iônica) nas plantas expostas à salinidade. Neste caso, se a velocidade da toxicidade e morte foliar for maior que a produção de novas folhas a fotossíntese é prejudicada e, conseqüentemente, a produção de carboidratos, o que ocasionará a redução do crescimento e produtividade (MUNNS; TESTER, 2008). Desta forma, a acumulação desses íons nos tecidos ocasiona efeitos como a senescência e a morte celular programada (SILVEIRA et al., 2010).

A causa desta injúria pode ser atribuída a elevada quantidade de sal que é absorvido, a qual ultrapassa a capacidade da planta de compartimentalizá-lo no vacúolo. Conseqüentemente, a concentração de sais aumentada no citoplasma, em especial o Na⁺, inibem e alteram a atividade de enzimas de várias rotas metabólicas,

bem como a função estrutural de proteínas. Alternativamente, esses sais podem acumular-se nas paredes celulares e desidratar a célula (PARIHAR et al., 2014).

De acordo com Tavakkoli et al. (2011) o Na^+ e o Cl^- são os principais íons que causam disfunções fisiológicas e danos às plantas. Em estudo realizado com quatro genótipos de cevada em diferentes concentrações de salinidade, puderam observar que ambos, Na^+ e o Cl^- , estão envolvidos na redução do crescimento. O íon Na^+ interfere na absorção de K^+ e redução dos níveis de Ca^{+2} , interferindo na regulação dos estômatos, fazendo com que a planta perca água. Em comparação, a elevada concentração de Cl^- promove degradação da clorofila, afetando a taxa fotossintética. As plantas em presença de salinidade na faixa baixa a moderada, conseguem crescer e se desenvolver normalmente, o que realmente é afetado é a produtividade dessas.

Um dos estresses secundários decorrentes da salinidade nessas condições é o estresse oxidativo, especialmente nas folhas, decorrente do descontrole metabólico envolvendo processos chaves tais como fotossíntese, respiração, fotorrespiração e o metabolismo celular em geral. Em consequência aos impactos ocasionados pela salinidade, a planta passa a produzir em excesso as espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez, causam peroxidação de lipídios, inativação de enzimas, danos ao DNA e afetam outros componentes vitais para as células vegetais. O estresse salino pode levar ao fechamento dos estômatos, o que reduz disponibilidade de dióxido de carbono nas folhas iniciado por um excesso de energia nos sistemas de captação de luz, transporte de elétrons e fotossistemas dos cloroplastos. Esse excesso de energia passa a não ser aproveitado eficientemente pelo processo de redução do CO_2 , levando a energia de excitação excessiva nos cloroplastos. O excesso de poder redutor na forma de elétrons nos fotossistemas, se não dissipado de maneira eficaz, poderá reduzir o O_2 e convertê-lo em diferentes tipos de EROs, principalmente o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), radicais superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) (APEL; HIRT, 2004).

A fim de manter a turgidez das células e amenizar os danos ocasionados pelo estresse salino, as plantas iniciam um mecanismo de ajuste osmótico, o que contribui para um crescimento lento dessas plantas nessas condições. Durante o ajustamento osmótico, ocorre redução do potencial osmótico celular pelo acúmulo de solutos compatíveis, devido ao incremento na síntese destes solutos orgânicos, mobilização de outros tecidos e pela migração ou absorção de solutos inorgânicos, principalmente o íon potássio (SILVEIRA et al., 2010). Esses solutos, na grande maioria, possuem

baixo peso molecular, o que facilita o desempenho da função osmótica e o acondicionamento no citosol, lúmem, matriz ou estroma de organelas (HASEGAWA et al., 2000). Esses compostos auxiliam na absorção de água, proteção das estruturas e moléculas (proteínas, membranas, cloroplastos e lisossomos), manutenção do turgor e ainda podem amenizar os danos oxidativos. Dentre estes compostos, estão os aminoácidos prolina, glicina betaína, dissacarídeo sacarose, o açúcar-alcool manitol e o açúcar trealose, entre outros (SILVEIRA et al., 2010).

1.4.2 Mecanismos de tolerância

Assim como a salinidade tem diversos efeitos negativos sobre uma planta, existem diferentes mecanismos para que as mesmas consigam tolerar esse estresse. A aclimatação de uma planta à salinidade, leva em consideração diferentes aspectos como: o genótipo, a espécie, intensidade e duração do estresse, composição salina do meio, as condições climáticas e manejo de irrigação. Munns; Tester (2008) classificam esses mecanismos de tolerância à salinidade em três categorias: tolerância ao estresse osmótico; exclusão de íons e tolerância do tecido. Na tolerância ao estresse osmótico, as plantas respondem com aumento da área foliar e condutância estomática normalizada. A tolerância por exclusão de íons ocorre quando a planta impede que íons em excesso alcancem a parte aérea, com um sistema de exclusão eficiente na raiz. Na tolerância ao nível de tecido, as plantas compartimentalizam Na^+ e/ou Cl^- no vacúolo, a fim de evitar concentrações tóxicas no citoplasma, aumentam a síntese de solutos compatíveis e ativam enzimas que realizam a desintoxicação de EROs (ROY; NEGRÃO; TESTER, 2014).

Em virtude da ausência de transportadores específicos de Na^+ , esse cátion é absorvido por competição através de carregadores de K^+ e Ca^+ , localizados na membrana celular. O influxo de sódio através das membranas vegetais ocorre por meio de transporte passivo. Uma das famílias proteicas envolvidas são os transportadores de potássio de alta afinidade (HKT), que representam um sistema de co-transporte do tipo simporte Na^+/K^+ . Essa função é exercida ainda pelos transportadores de cátions de baixa afinidade (LCT1), entre outras famílias proteicas. Em arroz, a expressão de alguns dos nove membros pertencentes a família HKT é consistente com um papel potencial no influxo de Na^+ pela raiz. Apesar da importância desses transportadores, estudos tem comprovado que o transporte por canais iônicos

é a principal via de influxo de Na^+ na célula sob salinidade elevada. Dentre eles, os canais de cátions não sensíveis à voltagem (NSCC), com duas famílias conhecidas: CNGCs - canais ativados por ciclonucleotídeos, e os GLRs – canais ativados por glutamato têm sido sugeridos como candidatos a canais do tipo (NSCC). Os estudos revelam que esses transportadores podem trabalhar em conjunto, na absorção de Na^+ pelas raízes (APSE; BLUMWALD, 2007).

Na planta, a exclusão e a compartimentalização do Na^+ necessita de energia metabólica para ocorrer. A exclusão de Na^+ a partir do citosol dentro do vacúolo ou para o meio externo celular (apoplasto), ocorre através de um transporte do tipo antiporte Na^+/H^+ . Esse transporte ativo secundário é movido por uma força eletroquímica fornecida por H^+ - ATPase ou ATPases dependentes do fluxo de prótons de membrana (transporte ativo primário), utilizando a energia química na forma de ATP. A atividade dessas bombas é necessária para o antiporte Na^+/H^+ visto que, transporta H^+ em uma direção e Na^+ na direção oposta. Duas classes de sistema antiporte Na^+/H^+ , que atuam na exclusão do Na^+ citosólico, estão presentes em plantas, os transportadores SOS1 na membrana plasmática e os NHX, localizados no tonoplasto (BLUMWALD; AHARON; APSE, 2000). As proteínas SOS1 estão presentes na membrana plasmática atuando na exclusão Na^+ quando em excesso. No sistema radicular, as proteínas SOS1 podem estar presentes na membrana de células epidérmicas, onde podem atuar na exclusão de Na^+ citosólico para o exterior. Quando localizados em torno do xilema da raiz, pode ocorrer a passagem de íon para o interior do xilema, conseqüentemente no fluxo transpiratório, favorecendo a transferência do Na^+ para a parte aérea. Desta forma, ao invés de excluir, contribui com a distribuição desse íon na planta. Ainda podem atuar como sensores de membrana percebendo o excesso de Na^+ extracelular. A super expressão de genes *NHX* tem sido enfatizada com a geração de plantas transgênicas tolerantes ao sal, uma vez que, o transporte para dentro dos vacúolos, reduz as concentrações no citosol, impedindo a toxidez e danos ao metabolismo.

O movimento de cloreto através da membrana pode ocorrer através de transporte passivo e ativo. Passivo quando o Cl^- está a favor de seu gradiente eletroquímico, nesse caso é mediado por canais ou por carregadores de membrana e ativo quando ele se move contra o gradiente eletroquímico. O transporte ativo é mediado por antiporte Cl^-/H^+ que necessitam de energia metabólica proveniente da hidrólise de ATP - ATPases. Nas condições salinas o transporte de Cl^- acontece de

forma passiva, sendo que a planta evita a toxidez por esse elemento quando evita o seu transporte para a parte aérea e/ou acumula nos vacúolos. Geralmente, tanto o Na^+ quanto o Cl^- estão presentes em quantidades maiores nas folhas, onde causam maiores danos do que nas raízes, uma vez que ambos são transportados pela corrente transpiratória no xilema e se depositam nas folhas em função da transpiração (MASS, 1993).

Em concentrações baixas no solo, o sódio não é prejudicial às plantas, porém, em concentrações elevadas, acarreta em desbalanço nutricional provocando danos às plantas. O K^+ é o cátion inorgânico mais abundante nas células vegetais, apesar desse nutriente não ser um constituinte das moléculas orgânicas, está relacionado com diversos processos, como manutenção do turgor celular, alongamento, osmorregulação, abertura e fechamento dos estômatos, tropismos, transporte de solutos no floema, balanço de íons, polarização da membrana e controle do pH, função e estrutura de cloroplastos, conservação de energia nas membranas entre outras funções. O equilíbrio desse nutriente é de extrema importância para os processos vitais da planta (BENITO et al., 2014). Em condições de desequilíbrio nutricional, as plantas podem usar os mecanismo de exclusão citados anteriormente, a fim de manter os níveis de NaCl abaixo do considerado tóxico, tolerando o estresse de certo modo.

Os efeitos tóxicos do NaCl , assim como o desbalanço nutricional, ocasionados pelos íons Na^+ e Cl^- sobre as plantas de arroz, podem ser responsáveis pela redução do crescimento da raiz e da parte aérea sob condições de estresse salino (ASCI, 2011).

1.5 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e mecanismos de defesa

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas durante o funcionamento normal da célula, como um subproduto do metabolismo. Uma vez produzida, a célula vegetal possui um sistema de defesa composto por antioxidantes enzimáticos e moléculas não enzimáticas capazes de manter os níveis de EROs em equilíbrio na célula (OZGUR et al., 2013; SILVEIRA et al., 2010; VALKO et al., 2006). No entanto, em plantas expostas a salinidade, pode ocorrer um desequilíbrio entre a produção de EROs e a desintoxicação pelo sistema antioxidante, devido a produção demasiada dessas espécies reativas, ou por uma falha no próprio sistema de defesa. Esse

desequilíbrio é chamado de estresse oxidativo, em que o excesso de EROs podem afetar diversas funções celulares, por oxidar e danificar lipídios, proteínas e DNA. (VALKO et al., 2006; OZGUR et al., 2013; FOYER; NOCTOR, 2003). É sabido que o oxigênio molecular (O_2) não é reativo e tóxico, porém, alterações na distribuição de elétrons podem provocar a sua ativação, formando diferentes tipos de EROs, que incluem o oxigênio singlete (1O_2), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) (OZGUR et al., 2013).

As EROs em plantas são produzidas em diferentes compartimentos celulares, como os cloroplastos, mitocôndria, membrana plasmática, peroxissomos, entre outros. Na Figura 1 estão representadas as principais vias de produção das EROs, bem como o sistema antioxidante envolvido na defesa. Em cloroplastos, o oxigênio singlete (1O_2) pode ser formado no fotossistema II (PSII), quando a energia armazenada na clorofila em seu estado tripleto não é dissipada, sendo então transferida para o oxigênio molecular (BHATTACHARJEE, 2010). No fotossistema I (PSI) ocorre a formação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a partir da redução do O_2 por um único elétron, desviados na ferredoxina. Essa reação é conhecida como “Reação de Mehler”, descoberta por Mehler (1951). Do mesmo modo, o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pode ser formado em virtude da baixa disponibilidade de CO_2 em função do fechamento dos estômatos, resultante de condições de estresse como a salinidade. Diante disso, ocorre um aumento na relação $NADPH/NADP^+$ no estroma em virtude da redução do funcionamento do Ciclo de Calvin, que consome o $NADPH$, acarretando diminuição no conteúdo de $NADP^+$, o principal acceptor de elétrons do PSI. O ânion superóxido formado é convertido à H_2O_2 pela ação de uma isoforma da enzima superóxido dismutase (Fe-SOD), localizada nos cloroplastos. O H_2O_2 produzido é reduzido a H_2O pela ascorbato peroxidase do tilacóide (tAPX) ou do estroma (sAPX). A baixa disponibilidade de CO_2 , faz com que a Rubisco (Ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase oxigenase) utilize o oxigênio como substrato em um processo conhecido como fotorrespiração. O glicolato formado nos cloroplastos é convertido em glioxilato nos peroxissomos, com geração H_2O_2 , o qual, pode ser removido pela catalase presente nessa organela ou pela ascorbato peroxidase (SILVEIRA et al., 2010).

Na mitocôndria, os elétrons também podem reduzir o oxigênio molecular e formar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), principalmente nos complexos I e III (NOCTOR et al., 2012). Outras EROs são formadas pela mesma via nas mitocôndrias, incluindo H_2O_2 e OH^{\cdot} . Da mesma maneira, o ânion superóxido pode ser reduzido pela SOD mitocondrial

(Mn-SOD) em peróxido de hidrogênio, sendo reduzido a H_2O e O_2 pela ação de uma catalase ou ascorbato peroxidase. As EROs geradas nas mitocôndrias e nos cloroplastos podem afetar outros compartimentos celulares como o citosol e o peroxissomo. A β -oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos também gera H_2O_2 . (SILVEIRA et al., 2010).

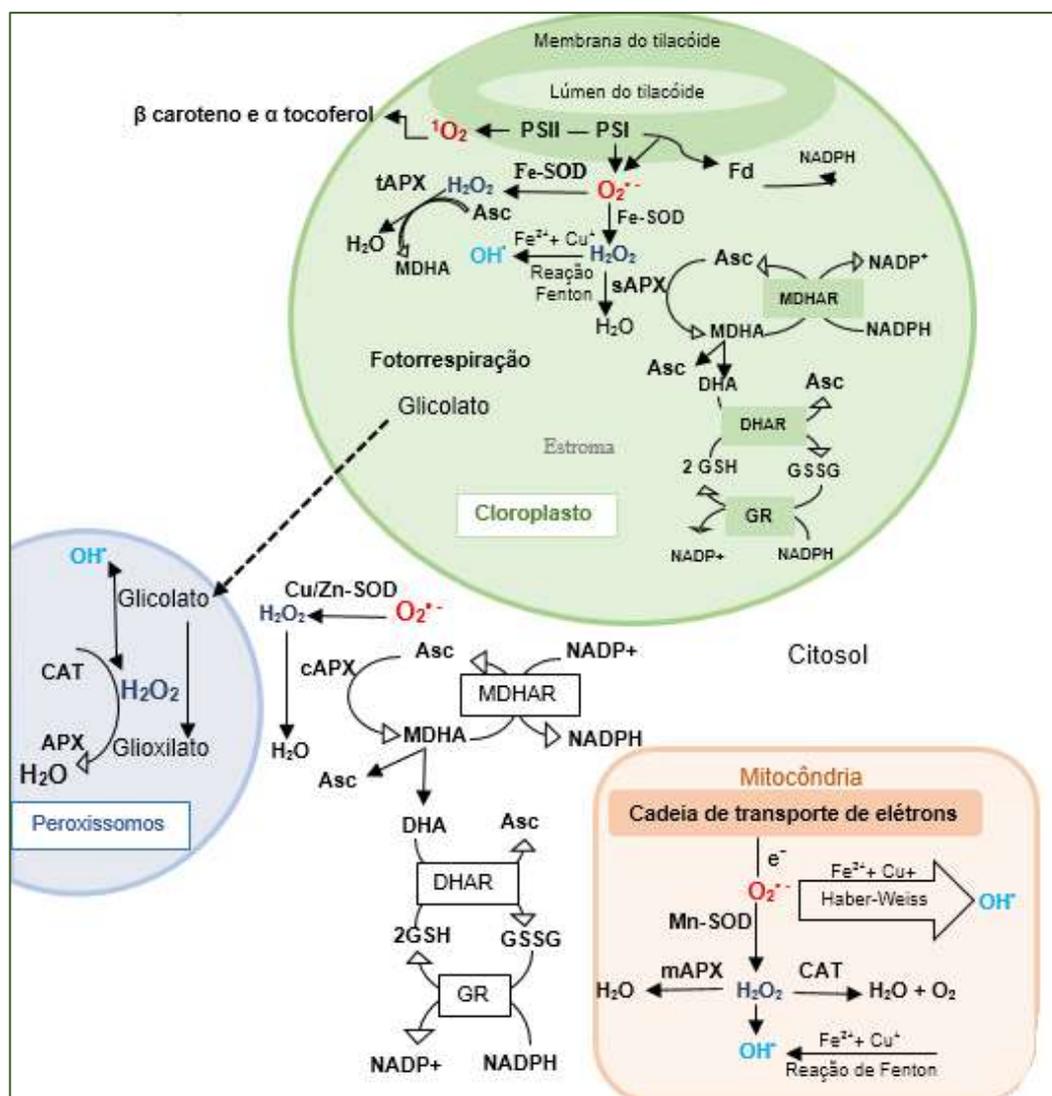


Figura 1 - Esquema mostrando os principais compartimentos de produção das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos envolvidos na eliminação dessas espécies.

Fonte: ROSSATTO, T

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pode doar elétrons ao Fe^{3+} formando Fe^{2+} que, por sua vez, reduz o H_2O_2 e forma o radical hidroxila (OH^{\cdot}). O conjunto de reações através das quais o $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e o Fe^{2+} rapidamente geram OH^{\cdot} é conhecido como “reação de Haber-Weiss”, enquanto que a reação final, a oxidação do H_2O_2 pelo Fe^{2+} , é

denominada reação de Fenton. Apesar de apresentar meia-vida curta ($<1\mu\text{s}$), os radicais hidroxilas são potencialmente tóxicos e reagem facilmente com as moléculas, sendo conhecido por ser o principal radical envolvido na peroxidação lipídica (GIL; TUTEJA, 2010).

As Superóxido Dismutases (SODs) são metaloenzimas que realizam a conversão de dois radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$ à H_2O_2 e O_2 , sendo primeira linha de defesa que atua na eliminação de EROs. Ao dismutar o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ essa enzima evita que o radical hidroxila (OH^{\cdot}) seja formado. São conhecidas três tipos de SODs, sendo classificadas de acordo com o cofator enzimático: Fe-SOD, Mn-SOD e Cu/Zn-SOD, localizadas em diferentes sítios celulares. As isoformas Fe-SOD estão localizadas nos cloroplastos, enquanto que, Mn-SOD podem ser encontradas em mitocôndria e peroxissomo. As isoformas Cu/Zn-SOD estão presentes em cloroplastos e citosol (BANNISTER; BANNISTER; ROTILIO, 1987; ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; MITTLER, 2002; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Entretanto, o peróxido de hidrogênio resultante da reação realizada pelas SODs é removido da célula pela ação de diferentes peroxidases. As mais conhecidas e importantes peroxidases no tecido vegetal são as APXs e CATs.

As catalases (CATs) são enzimas com um grupo heme, são encontradas principalmente em peroxissomos e glioxissomos, onde convertem o H_2O_2 em água e oxigênio molecular, protegendo a célula dos danos oxidativos (GARG; MANCHANDA, 2009). As catalases possuem baixa afinidade pelo substrato (H_2O_2), enquanto que, a ascorbato peroxidase (APX) apresenta alta afinidade. Logo, as CATs seriam as responsáveis pela remoção do excesso de EROs durante o estresse. São classificadas em CAT1, envolvidas principalmente remoção do H_2O_2 produzido na fotorrespiração, CAT2 produzidas em tecidos vasculares, podem exercer função na lignificação, porém sua exata função permanece desconhecida e a CAT3 presente em sementes e que remove o peróxido de hidrogênio produzido durante degradação dos ácidos graxos no glioxissoma (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

Ascorbato peroxidase (APX) é uma família de isoenzimas localizadas em diversos sítios celulares, como citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e glioxissomos. Em cloroplastos podem estar localizadas no estroma (sAPX) e nos tilacóides (tAPX). No citosol estão solúveis (cAPX) e as presentes nas mitocôndrias (mAPX) estão associadas a membrana. As APXs utilizam o ácido ascórbico como doador de elétrons, na conversão do H_2O_2 em H_2O (SILVEIRA et al., 2010).

Além dos antioxidantes enzimáticos, compostos não enzimáticos como o ascorbato e a glutathione são considerados de grande importância, pois são requeridos como doadores de elétrons e compõem o ciclo Ascorbato/Glutathione. Em plantas, o ascorbato (ácido ascórbico/vitamina C) é sintetizado nas mitocôndrias e ocorre em todos os tecidos das plantas. É considerado o principal detoxificador das EROs em solução aquosa, devido a sua capacidade de doar elétrons para um série de reações enzimáticas e não enzimáticas. Envolvido na regeneração de α -tocoferol a partir do radical tocoferoxil, em cloroplastos atua como um cofator epoxidase de violaxantina (SMIRNOFF, 2000).

A Glutathione (GSH) é sintetizada nos cloroplastos e ou no citosol e está localizada em todos os compartimentos celulares. Está presente na forma reduzida com um grupo tiol livre (GSH) ou oxidada (GSSG). Deste modo, o equilíbrio entre as duas é fundamental para a manutenção do estado redox nos compartimentos celulares. Além de proteger a célula quanto os danos oxidativos, a glutathione desempenha papel central em vários processos fisiológicos, dentre eles, a sinalização durante o metabolismo do sulfato, detoxificação de xenobióticos, regulação da expressão de genes responsivos ao estresse, entre outros (NOCTOR et al., 2012).

No ciclo do Ascorbato/Glutathione, o ascorbato (Asc) age na remoção direta do H_2O_2 , ou como substrato para ascorbato peroxidase (APX), que é uma das enzimas do ciclo. O ascorbato atua como doador de elétrons para as APXs, as quais reduzem o H_2O_2 em H_2O com a geração do ácido monodeidroascórbico (MDHA). O MDHA pode ser rapidamente desprotonado, de forma espontânea, para produzir ascorbato e ácido deidroascórbico (DHA). O MDHA também pode ser regenerado de volta à ascorbato pela atividade da enzima monodeidroascórbico redutase (MDHAR), que utiliza doadores de elétrons específicos como NADPH. Além disso, o DHA também pode ser convertido em ascorbato pela enzima desidroascórbico redutase (DHAR) que utiliza a glutathione (GSH) como doadora de elétrons, formando a GSSG. A GSH é regenerada pela enzima glutathione redutase (GR) (NADPH oxido-redutase dependente) como resultado da redução da GSSG (POTTERS; HOREMANS; JANSEN, 2010).

Além do ascorbato e da glutathione, são conhecidos outros antioxidantes não enzimáticos, tais como α -tocoferol, carotenoides, flavonoides, prolina, entre outros. O α -tocoferol (vitamina E) é lipossolúvel, presente nas membranas plasmáticas e tonoplasto, previne a peroxidação lipídica. Na membrana detoxifica radicais peroxila ($ROO\cdot$) e no tonoplasto evita danos foto-oxidativos. Os carotenoides são pigmentos

que protegem o aparato fotossintético, dissipando o excesso de energia na forma de calor, evitando formação de EROs e detoxificando as formadas e protegendo contra a peroxidação lipídica. Os flavonoides atuam como captadores das EROs, localizando e neutralizando os radicais antes que eles danifiquem a célula.

1.6 Prolina

A prolina (L-prolina) é um aminoácido essencial para o metabolismo primário, como componente de proteínas de todos os organismos (SZABADOS; SAVOURE, 2010). Na maioria das plantas, estudos têm mostrado que os níveis de prolina aumentam sob diferentes condições de estresse, atuando principalmente como osmorregulador, embora desempenhe outras funções (REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014). Os teores de prolina intracelular variam de uma espécie para outra, sendo regulada pela biossíntese, transporte e catabolismo (SZABADOS; SAVOURE, 2010).

Nas plantas, a prolina é sintetizada através de duas vias: a via do glutamato e da ornitina. A via do glutamato pode ser responsabilizada pelo aumento de prolina durante estresse osmótico (HAYAT et al., 2012). O glutamato é reduzido a glutamato semialdeído (GSA) através da enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), e espontaneamente convertido em pirrolina-5-carboxilato (P5C), conforme esquematizado na Figura 2. A P5C é reduzida à prolina pela enzima P5C redutase (P5CR) (REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014). Durante a síntese de prolina a partir da ornitina, primeiramente o GSA é formado pela enzima ornitina-delta-aminotransferase (OAT) e em seguida a P5C é convertida a prolina (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008). O catabolismo ocorre na mitocôndria, onde a enzima prolina desidrogenase ou prolina oxidase (PDH ou POX), converte a prolina em P5C, que através da P5C desidrogenase (P5CDH), forma o glutamato (REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014).

Em geral a enzima P5CS é codificada por dois genes (*P5CS1/2*) e a P5CR por apenas um (ARMENGAUD et al., 2004). Do mesmo modo, a enzima PDH é transcrita por dois genes, enquanto que, apenas um codifica a P5CDH, já observado em *Nicotiana tabacum* (RIBARITS et al., 2007). Em condições normais os genes *P5CS1* e *P5CS2* estão localizados no citosol, porém, sob condições adversas, como estresse salino, a biossíntese de prolina é aumentada nos cloroplastos, sendo controlada pelo

P5CS1, expresso nessa organela (SZEKELY et al., 2008). Conforme pode-se observar na Figura 2, as enzimas PDH e P5CDH mitocondriais utilizam do FAD^+ e NAD^+ como receptores de elétrons e geram FADH_2 e NADH , respectivamente, fornecendo elétrons para a respiração que acontece na mitocôndria. Recentemente foi descrito um ciclo a parte que contribui para a síntese de prolina, no qual a P5C, formada na mitocôndria, pode ser transportada novamente para o citosol, onde é reduzida a prolina pela enzima P5CR citosólica (MITTLER, 2002).

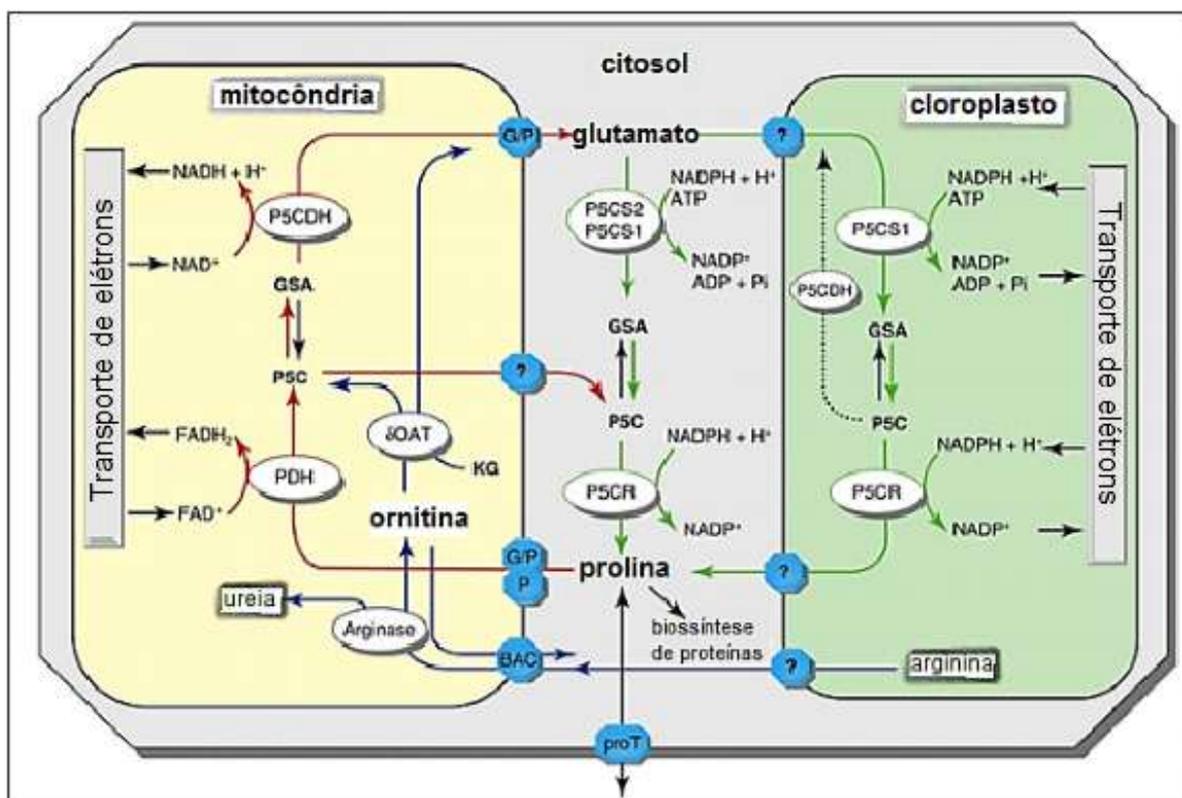


Figura 2- Modelo proposto para o metabolismo de prolina em plantas superiores.

Fonte: Adaptado de Szabados; Savoure, 2010, p. 02.

Os genes envolvidos na síntese e degradação de prolina são regulados por sinais diversos (exógenos e endógenos), como exemplificado na Figura 3. O gene *P5CS1* é induzido em situações de estresse como seca e salinidade (YOSHIBA et al., 1995; SAVOURÉ et al., 1995; CHOUDHARY; SAIRAM; TYAGI, 2005; BAGDI; SHAW, 2013). A sinalização de cálcio e da enzima fosfolipase C (PLC) ativam a transcrição de *P5CS1* e acúmulo de prolina durante estresse salino (200 mM de NaCl) (PARRE et al., 2007).

Em estudo realizado com *Arabidopsis*, a expressão de *P5CS1* foi estimulada pela luz (HAYASHI et al., 2000) e óxido nítrico (NO) (ZHAO et al., 2009). Hayashi et

al. (2000) concluíram que a luz ativa a expressão do gene *P5CS1*, pois nessas condições com a fotossíntese aumentada, diminui o potencial osmótico e a demanda pela prolina na célula. O gene *P5CS2* é ativado por patógenos e por espécies reativas de oxigênio (EROs) (FABRO et al., 2004). Já é conhecido que em condições normais o ABA regula positivamente a expressão de *P5CS1* e *P5CS2* em plantas de arroz com uma atuação maior sobre o *P5CS1* (HUR et al., 2004). Dados mostram que em condições de estresse salino um aumento endógeno de ABA é necessário para expressar o *P5CS1* em arroz (SRIPINYOWANICH et al., 2013). A expressão de *ProDH1* é regulada negativamente pelo estresse hídrico e pela própria prolina (KIYOSUE et al., 1996). Pesquisas recentes indicam que, sob condições de crescimento normais a fosfolipase D (PLD) funciona regulando negativamente a biossíntese de prolina em *Arabidopsis* (THIERY et al., 2004). Portanto, inúmeros são os fatores que regulam a expressão desses genes, muitos aqui não citados.

Consequentemente, tais sinais são estimulados de maneira diferente de um genótipo para outro, de acordo com as condições em que as plantas encontram-se e com o nível de sensibilidade a um determinado estresse.

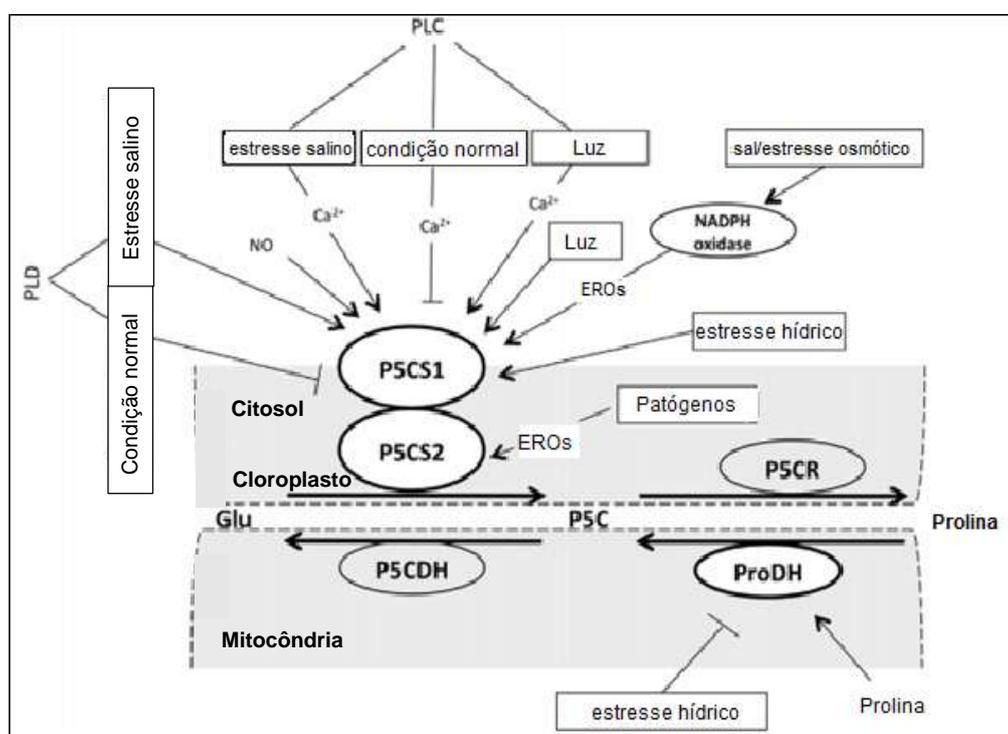


Figura 3 - Regulação do metabolismo de prolina em plantas. Círculos indicam as enzimas e retângulos o contexto ambiental; caixas abertas e pretas correspondem às vias de sinalização demonstradas em *Arabidopsis thaliana* e *Thellungiella salsuginea*, respectivamente. Abreviaturas: P5CS - pirrolina-5-carboxilato sintetase; PROD H - prolina desidrogenase; PLC - fosfolipase C; PLD - fosfolipase D; EROs - Espécies Reativas de Oxigênio.

Atualmente está claro que a prolina desempenha papéis multifuncionais. Conforme já citado anteriormente ela pode influenciar na tolerância das plantas ao estresse de várias formas. Estudos tem mostrado que a prolina protege proteínas e melhora a atividade de algumas enzimas (SZABADOS; SAVOURE, 2010). Em arroz a aplicação de prolina desempenhou ação protetora à enzima nitrato redutase durante estresse por metal pesado e hídrico (SHARMA; DUBEY, 2005). A prolina pode atuar como antioxidante não enzimático, inibindo a formação de EROs e amenizando os danos causados pelas espécies reativas, bem como no armazenamento e transferência de energia e poder redutor (SZABADOS; SAVOURE, 2010). O aumento da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase foi observado por Islam et al. (2009) em células de tabaco estressadas, quando realizado aplicação de prolina.

Durante condições de estresse, em especial por salinidade, um dos sintomas imediatos da planta é o fechamento dos estômatos e redução de absorção de CO₂ pela planta. Ao reduzir a fixação de CO₂, o ciclo de calvin ocorre de forma mais lenta, o que impede a oxidação de NADPH e restauração de NADP⁺. Logo a cadeia transportadora de elétrons é afetada pela ausência de receptor de elétrons NADP⁺ levando a formação de oxigênio atômico no centro de reação do PSI e formação e acúmulo de EROs (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). A biossíntese da prolina, requer NADPH para a redução de glutamato a P5C e esse à prolina, gerando NADP⁺ que pode ser utilizado adicionalmente como aceptor de elétrons. A fosforilação de glutamato consome ATP e produz ADP, que é um substrato para a biossíntese de ATP durante a fotossíntese. Uma taxa aumentada de biossíntese de prolina nos cloroplastos, durante o estresse pode, manter baixa a relação NADPH: NADP⁺, contribuindo para sustentação do fluxo de elétrons entre os centros de reações, estabilizando o equilíbrio redox e reduzindo a fotoinibição e danos ao aparelho fotossintético.

Valores crescentes de NaCl elevaram a concentração de prolina em folhas de arroz, cultivares BRS Agrisul, BRS Talento e híbrido Tiba avaliados por Neves; Spat (2013). Rajakumar (2013) também observou aumento de prolina em plantas de arroz expostas a altos níveis de NaCl. Por outro lado, a aplicação foliar de prolina resultou num aumento significativo no crescimento, entre outros parâmetros avaliados em arroz (SIDDIQUE et al., 2014). Outro estudo mostrou que a aplicação de prolina em planta de milho amenizou os danos causados pela salinidade do solo, tanto da fase

de plântula como na fase vegetativa. Em resposta a aplicação de prolina ocorre aumento na absorção de nutrientes nessas plantas (HASAN et al., 2015).

1.7 Expressão gênica

O avanço nas técnicas de biologia molecular, aliado à disponibilidade massiva de sequências genômicas estruturais e funcionais, têm proporcionado o surgimento de novas metodologias para geração e análise de dados em genotipagem e expressão gênica a uma velocidade, precisão e escala sem precedentes (CARNEIRO, 2011).

A expressão dos genes codificantes de APX, CAT, SOD e GR é modulado por diversos estímulos ambientais, tais como o estresse salino. A expressão transcricional dos genes é também dependente do tecido e da fase de desenvolvimento. Em plantas as enzimas CAT, APX, SOD e GR são codificadas a partir de diferentes famílias gênicas. Em arroz, as enzimas APXs são codificadas por uma família gênica composta de oito genes e estão localizados em diferentes compartimentos: duas isoformas citosólicas codificadas por *OsAPx1* e *OsAPx2*, duas isoformas peroxissomais/glioxissomais codificadas por *OsAPx3* e *OsAPx4* e as isoformas cloroplastídicas codificadas por *OsAPx5*, *OsAPx6*, *OsAPx7* e *OsAPx8*, sendo que *OsAPx6* foi localizada também na mitocôndria (TEIXEIRA et al., 2004).

Todas as isoformas de SOD são nucleares, codificadas e direcionadas aos seus respectivos compartimentos subcelulares, quando necessário, por meio de sequências de direcionamento amino-terminal (BOWLER; MONTAGU; INZE, 1992; GILL; TUTEJA 2010). As SODs são classificadas de acordo com seu cofator metálico e/ou sua localização subcelular: Fe-SOD, presente nos cloroplastos; Mn-SOD, presente nas mitocôndrias e peroxissomos e as Cu/Zn-SODs, presentes nos cloroplastos, peroxissomos, citosol e, possivelmente, no espaço extracelular (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; CAVALCANTI et al., 2004; JALEEL et al., 2009). Segundo Bowler; Montagu; Inze (1992) a enzima catalase é constituída por uma pequena família multigênica, as quais, em arroz, foram denominadas *CatA*, *CatB* e *CatC* (MENEZES-BENAVENTE et al., 2004). Três genes que codificam GR também têm sido descrito em arroz, uma isoforma citosólica codificada por *OsGR2* (KAMINAKA et al., 1998) e duas isoformas cloroplastídicas codificadas por *OsGR1* e *OsGR3* (BASHIR et al., 2007).

1.8 Cultivo *in vitro*

Experimentos realizados a campo estão sujeitos a interferências ambientais, tais como, as propriedades físicas e químicas do solo, a sazonalidade, temperatura, luminosidade, umidade do ar e pluviosidade, tornando os experimentos a campo mais dificultosos (BENDERRADJI et al., 2012). Usando a técnica de cultura de tecidos *in vitro*, esses fatores podem ser controlados e manipulados, favorecendo o estudo de processos fisiológicos e bioquímicos das plantas, evitando perturbações que podem contribuir para os resultados indesejáveis. A produção *in vitro* de plantas de arroz fornece um sistema eficiente e conveniente para se obter plantas de arroz de forma rápida. Frente a isso, a técnica de cultivo *in vitro* surge como uma possibilidade para o estudo dessa espécie (SOSBAI, 2014).

Além disso o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais é uma importante ferramenta para auxiliar do melhoramento genético podendo ser utilizado para a ampliação da variabilidade genética vegetal (WANI; SANGHERA; GOSAL, 2011).

Capítulo I

ANÁLISES MORFOFISIOLÓGICAS E CONCENTRAÇÃO DE PROLINA EM PLANTAS DE ARROZ, CV BRS AG, SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO

1 INTRODUÇÃO

Arroz é uma das culturas com maior destaque sobre o ponto de vista econômico e social no Brasil (SOSBAI, 2014) e o Estado do Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor nacional, representando mais de 68,8 % do arroz colhido no país (CONAB, 2015).

Entretanto, recentemente a produção de arroz tem assumido a possibilidade de ganhar novos mercados. Um exemplo disto é o desenvolvimento da cultivar BRS AG, primeira cultivar de arroz irrigado lançada, para ser utilizada como matéria prima para produção de etanol e ou para alimentação animal, por não se enquadrar nos padrões de arroz adequados para consumo humano segundo a preferência brasileira. As plantas desta variedade possuem ciclo biológico de cerca de 126 dias (da emergência à maturação), grãos grandes com alto conteúdo de amido, sem arista e alta capacidade produtiva. O peso médio de mil sementes é de 52 g, enquanto que a maioria das cultivares de arroz irrigado apresenta peso médio de 25 g. O desenvolvimento dessa cultivar tem por objetivo suprir a falta de matéria prima para alimentação animal e expandir a produção de etanol no Estado do RS. Além de contribuir para regular o mercado do arroz, retirando o excedente de produção do grão para consumo humano, sem afetar a oferta do alimento (MAGALHÃES JÚNIOR, 2012).

Na região da metade sul do RS, há abundância de recursos hídricos derivados da Laguna dos Patos e dos rios litorâneos, porém, em períodos de menor precipitação, a água do mar invade a Laguna, salinizando as águas destinadas a irrigação das lavouras, coincidindo com a fase reprodutiva dos arrozais. O arroz tem sido caracterizado ser mais sensível ao sal nas fases de plântula e reprodutivo do que

durante o crescimento vegetativo e perfilhamento. Quando os níveis de salinidade encontram-se acima do tolerável à cultura, a salinidade ocasiona diminuição do perfilhamento, clorose, morte de folhas e diminuição da estatura de plantas, além de aumentar a esterilidade das espiguetas e o número de perfilhos não produtivos (CARMONA; ANGHINONI; WEBER, 2011).

O estresse osmótico e a toxicidade iônica são efeitos promovidos por altos níveis de salinidade. O estresse osmótico é resultado da redução na taxa de absorção de água pelas plantas, enquanto que a toxicidade iônica é ocasionada pelo excesso de íons que são absorvidos no fluxo transpiratório. Nessas condições pode ocorrer redução e/ou atraso no processo de germinação (OZHAN; HAJIBABAEI, 2014; SOARES et al., 2015), redução do crescimento principalmente da parte aérea (MUNNS; TESTER, 2008), desbalanço nutricional (ASCI, 2011), senescência e a morte celular programada (SILVEIRA et al 2010). Um dos estresse secundários decorrentes da salinidade é o estresse oxidativo resultante do descontrole metabólico, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são produzidas nas células vegetais em condição metabólica normal, porém, quando em excesso provocam danos à célula.

Em resposta as perturbações ambientais as plantas acumulam grandes quantidades de solutos compatíveis, tais como prolina, glicina betaína, glicerol, manitol, sorbitol, entre outros, que protegem as células contra danos causados pelo estresse. A prolina é conhecida por ocorrer amplamente em plantas superiores, nas quais pode acumular-se em quantidades consideráveis, em resposta ao estresse salino e restrição hídrica (KAVI KISHOR et al., 2005). É altamente solúvel em água, o que lhes permite acumular-se em concentrações elevadas no citosol das células de plantas sem prejudicar as estruturas (SILVEIRA et al., 2010). O principal papel desempenhado pela prolina é como osmorregulador, atua protegendo as células contra o estresse osmótico, além de desempenhar outras funções (REJEB; ABDELLEY; SAVOURÉ, 2014). O acúmulo de prolina sob condições de estresse pode ajudar na manutenção dos processos respiratórios e fotossintéticos (KAVI KISHOR et al., 2005).

Nas plantas, a prolina pode ser sintetizada através de duas vias: a via do glutamato e da ornitina. O glutamato é reduzido a glutamato semialdeído (GSA) através da enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) e, espontaneamente convertido em pirrolina-5-carboxilato (P5C). A P5C é reduzida à prolina pela enzima pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) (REJEB; ABDELLEY; SAVOURÉ, 2014). Outra

alternativa para a síntese de prolina é via da ornitina, a qual é transaminada a P5C pela enzima ornitina-delta-aminotransferase (OAT) e esse, em seguida, é convertido a prolina (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008). O catabolismo ocorre na mitocôndria, onde a enzima prolina desidrogenase ou prolina oxidase (PDH ou POX), converte a prolina em P5C, que através da P5C desidrogenase (P5CDH) forma o glutamato (REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014).

Em geral, a enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) é codificada por dois genes (*P5CS1/2*), enquanto que a enzima pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) é codificada por um único gene (ARMENGAUD et al., 2004). Do mesmo modo, a enzima prolina desidrogenase (PDH) é transcrita por dois genes, enquanto que apenas um codifica a pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH) (RIBARITS et al., 2007). Em condições normais *P5CS1* e *P5CS2* estão localizados no citosol, porém, sob condições adversas, como estresse salino, a biossíntese de prolina é aumentada nos cloroplastos, sendo controlada por *P5CS1*, expresso nessa organela (SZEKELY et al., 2008).

A tolerância à salinidade varia de acordo com a espécie, fase de crescimento e com as características de aclimatação de cada planta (AKBARI; MOHAMMAD; YOUSEFZADEH, 2007). Uma melhor compreensão das variações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares induzidas pela salinidade em plantas facilitam a identificação dos mecanismos envolvidos na tolerância.

Baseado nos dados acima descritos, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a germinação, caracteres morfológicos, acúmulo de prolina e a expressão dos genes envolvidos no metabolismo desse aminoácido em plantas de arroz, cv. BRS AG, cultivadas *in vitro* sob estresse salino.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pertencente ao Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), localizado no município de Capão do Leão, RS. Foram utilizadas sementes de arroz da cultivar BRS AG da Estação Experimental Terras Baixas (Embrapa – Clima Temperado).

2.2 Condições de cultivo das plantas

Antes de serem colocadas para germinar, as sementes foram descascadas manualmente e desinfestadas, em álcool 70 %, durante 2 minutos e em solução de hipoclorito de sódio 3 %, durante 25 minutos, seguidas de três lavagens com água destilada autoclavada, sendo todas as etapas sob agitação leve e constante em câmara de fluxo laminar. Após enxague, as sementes foram secas em papel filtro estéril e colocadas para germinar em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS de Murashige; Skoog (1962) com metade da concentração das fontes de sais e suplementado com diferentes concentrações de NaCl, 10 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e solidificado com a adição de 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8. Os tubos de ensaio foram fechados com alumínio e autoclavados a 121 °C, durante 20 minutos. Os cultivos foram mantidos em estufa BOD a 28 °C, no escuro, durante cinco dias. Passado este período, as plântulas foram transferidas para sala de crescimento, com um fotoperíodo de 16 horas, onde se mantiveram até completar 21 dias. Para determinação da concentração de prolina as plantas foram coletadas aos 5, 10, 15 e 20 dias de estresse, sendo o material guardado em ultrafreezer -70 °C para análises posteriores.

2.3 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, sendo que os tratamentos constaram de um grupo controle, sem adição de NaCl e outros cinco tratamentos, cada um representando uma concentração de NaCl acrescida ao meio de cultura. As concentrações utilizadas foram 34 mM, 68 mM, 102 mM, 136 mM e 170 mM de NaCl.

Para a avaliação da germinação utilizou-se três repetições, sendo cada repetição representada por 15 plantas. Os valores referentes à porcentagem de germinação foram transformados para arco seno da raiz quadrada de X/100, onde X representa o valor percentual obtido para a variável porcentagem de plantas emergidas. Foi determinado ainda o ponto máximo (Pm) através da fórmula $-b/2c$. As avaliações dos caracteres morfológicos constaram de cinco repetições, sendo cada repetição representada por três tubos contendo uma plântula em cada, totalizando 15 plantas por tratamento. Para determinação de prolina utilizou-se uma concentração

de NaCl (136 mM) e o controle (sem NaCl) com três repetições, cada repetição representada por 15 plantas. Baseado nos resultados dos caracteres morfológicos, observou-se que a partir da concentração de 136 mM de NaCl as plantas apresentavam danos no crescimento. Neste sentido, para determinação de prolina e demais análises optou-se por essa concentração.

Em seguida, os dados foram submetidos à análise da variância para testar as fontes de variação (tecido x concentração de NaCl) e suas possíveis interações. Foram considerados significativos os resultados onde $P \leq 0,05$, sendo os valores médios comparados pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Foi realizada a análise de regressão usando o software estatístico WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

2.4 Avaliação da porcentagem de germinação e caracteres morfológicos

Para análise da germinação de sementes cultivadas *in vitro* foram realizadas duas contagens, sendo a primeira aos sete dias e a segunda aos 14 dias após a semeadura. O critério para classificação de sementes germinadas foi protusão da radícula. Já para avaliação dos caracteres morfológicos, as plantas foram coletadas aos 21 dias, e avaliados o comprimento da parte aérea (cm), comprimento de raiz (cm), número de folhas, número de raiz (cm), massa fresca da parte aérea e da parte radicular (g). A massa seca da parte aérea e do sistema radicular (g) foram registrados após secagem em estufa a 60 °C durante 72 horas.

2.5 Determinação da concentração de prolina

A extração e determinação de prolina seguiu a metodologia desenvolvida por Bates; Waldren; Teare (1973) com algumas adaptações. Aproximadamente 500 mg de massa fresca de folha e semente foi macerada em N₂ líquido e homogeneizada em 2 mL de solução aquosa de sulfossilíco 3 % (p/v) e centrifugada à 1000 g por 20 minutos, sendo coletado o sobrenadante. Os sobrenadantes obtidos foram passados para tubos de ensaio com rosca, onde se adicionou 2 mL de ácido glacial acético, 2 mL de nihidrina, os quais, permaneceram em banho maria a 100 °C por 60 minutos. Passado esse tempo as amostras foram mantidas em gelo, no escuro, por 10 min. Após o resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 4 mL de tolueno e as

amostras agitadas. Após a formação das duas fases, foi coletado 1 mL da fase superior (tom de rosa) e realizaram-se as leituras em espectrofotômetro a 520 nm. Ao controle (branco) não foi adicionado a amostra e os demais procedimentos foram os mesmos. As absorbâncias obtidas foram comparadas com a curva padrão de prolina e os resultados expressos em mM prolina g⁻¹ MF (massa fresca).

2.6 Análise de RT-qPCR

2.6.1 Extração de RNA total

Cada amostra vegetal (100 mg) macerada foi transferida para um microtubo de 1,5 mL livre de nucleases no qual foi imediatamente adicionado o tampão de extração PureLink® Kit (Invitrogen™). As amostras foram rapidamente homogeneizadas e mantidas em temperatura ambiente durante 5 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000 g durante 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante, contendo o RNA total, foi transferido para um microtubo livre de nucleases. Foram adicionados 100 µL de uma solução de NaCl 5 M ao extrato e a solução foi homogeneizada através de leves toques no fundo do tubo. Em seguida foram adicionados 300 µL de clorofórmio e a solução foi homogeneizada através da inversão do tubo. As amostras foram então submetidas à centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C para separar as fases. Após a centrifugação a fase aquosa superior foi transferida para um microtubo livre de nucleases. Foi adicionado à fase aquosa um volume igual de isopropanol e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. A solução foi centrifugada novamente a 4 °C por 10 minutos a 12.000 g descartando o sobrenadante, tomando cuidado para não perder o *pellet*, com a adição de 1 mL de etanol 75 % ao *pellet*. Os microtubos foram colocados para centrifugar novamente a temperatura ambiente por 3 minutos a 12.000 g e o sobrenadante foi descartado. Foi realizada uma breve centrifugação nas mesmas condições para coletar o líquido residual, e este foi coletado com auxílio de uma micropipeta. As amostras foram secadas por 5 minutos em câmara de fluxo. O RNA total isolado foi então dissolvido em 30 µL de água DEPC 0,01 % autoclavada. As amostras, já homogeneizadas, foram guardadas a -70 °C para análises posteriores.

2.6.2 Quantificação do RNA

A quantidade de RNA total foi mensurada em espectrofotômetro a 260 e 280 nm, cuja relação fornece uma estimativa da pureza do RNA. A integridade do ácido nucleico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %.

2.6.3 Síntese de cDNA

Primeiramente, as amostras foram tratadas com DNase I, utilizando-se do Kit Amplification Grade DNase I (Sigma-Aldrich®) para a remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de RNA total tratado com a DNase I foram submetidas a PCR de transcrição reversa para síntese de DNA complementar. A síntese de cDNA fita simples, para cada amostra, foi feita a partir do RNA (1 µg/µL), utilizando-se do *kit SuperScript FirstStrand System for RT-PCR* (Invitrogen).

2.6.4 Reação de RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas em equipamento Termociclador Bio-Rad CFX Real Time, utilizando o sistema de fluoróforo SYBR Green (Roche®). Foram utilizados *primers* com *amplicons* específicos (com um único pico de dissociação das fitas dos produtos da PCR) e com eficiência de amplificação próxima a 100 % ($E \cong 1,8 - 2,2$). Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 1. O volume total das reações foi de 12 µL, sendo 6,25 µL do fluoróforo, 0,25 µL (10 mM) de cada *primer* (senso e antisenso), 1 µL de cDNA (diluição 1:5, previamente definida) e 4,25 µL de água ultra pura. As condições de amplificação foram: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto com inserção da curva de *melting* de 65 a 95 °C, com incremento de 5 °C a cada medida de fluorescência. O gene *OsUBQ10* foi utilizado como controle interno quantitativo (gene de referência). A quantificação relativa da expressão diferencial foi feita utilizando o método de comparação de CT (*comparative threshold cycle method*) conforme descrito por Livak; Schmittgen (2001).

Tabela 1 - Lista de *primers* utilizados nas reações de RT-qPCR e tamanho do *amplicon*. Temperatura de anelamento 61°C

Gene	RAP-DB (Banco de dados)	Senso/Antisenso (Primers)	Amplicon (pb)
<i>P5CS1</i>	Os05t0455500-01 (AK101985)	5' AGAGATTGTTCAAGGCATCTACAG 3' 5'AACCAAAGGCTTCTCATATCCAG 3'	161
<i>P5CS2</i>	Os01t0848200-01 (AK101230)	5' GGTTGATTATCCAGCAGCGT3' 5'CCCGCCATAGATAACTACCC 3'	150
<i>P5CR</i>	Os01t0948400-01 (AK070184)	5' GTTGGTCTGGTCATCGAAGATT3' 5'CATTCTCAGTAGCCATCTCCC 3'	104
<i>P5CDH</i>	Os05t0536400-01 (AK121765)	5' AGCAGAGGATGTGGACTTCA 3' 5'GCCTTTCAAATCAGCAGCC 3'	132
<i>PDH</i>	Os10t0550900-01 (AK121010)	5' GGGTTCCAGGTGAGCAAG 3' 5'AAGGAGGAAGACGAGAGCA 3'	106
<i>OAT</i>	Os03t0643300-01 (AK108010)	5' TGCTGTGTATCAAACCAGGA 3' 5'CTTTCAACGAGACCTTCATCTG 3'	160
<i>UBQ10</i>	Os02t0161900-01 (AK101547)	5' TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG 3' 5'GCACCACAAATACTTGACGAACAG 3'	105

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Porcentagem de germinação

A análise de variância e o teste de média, para a porcentagem de germinação, demonstraram influência significativa ($p \leq 0,05$) dos níveis de salinidade sobre o vigor germinativo das sementes de arroz. Comparando-se os dados da germinação final e da primeira contagem, observou-se que, a média de sementes de arroz germinadas foi moderadamente afetada no estágio inicial da germinação com o incremento da concentração de NaCl, conforme dados mostrados na Tabela 2. Na primeira avaliação, a média da porcentagem de germinação apresentou o menor valor, de 62 %, na concentração com 170 mM de NaCl, a qual, diferiu estatisticamente das demais. Logo, o controle e as concentrações de 34 mM, 68 mM, 102 mM, 136 mM, apresentaram porcentagens de germinação de 93 %, 98 %, 89 %, 84 % e 87 %, respectivamente, indicando que concentrações de NaCl até 136 mM não prejudicam

a fase inicial de germinação, quando comparado a concentração de 170 mM que afetou de forma moderada.

Contudo, na segunda avaliação, realizada aos 14 dias, notou-se que a germinação progride à medida que avança o tempo, chegando a um percentual de 73 %, na concentração de 170 mM, contra 93 % das plantas controle. Conforme observou-se na Tabela 2, a média de sementes germinadas na concentração de 170 mM na segunda avaliação diferiu estatisticamente das demais concentrações. Assim, pode-se inferir que a germinação dessa cultivar começa a ser prejudicada a partir dessa concentração, apesar dos valores apresentados serem satisfatórios.

Tabela 2 - Porcentagem de germinação de arroz, cultivar BRS AG, submetida a diferentes concentrações de NaCl, avaliadas aos sete e quatorze dias de idade

NaCl (mM)	1ª avaliação (7 dias)	2ª avaliação (14 dias)
0 mM	93 ± 0.11 a	93 ± 0.11 a
34 mM	98 ± 0.04 a	100 a
68 mM	89 ± 0.10 a	99 ± 0.07 a
102 mM	84 ± 0.07 a	93 ± 0.06 a
136 mM	87 ± 0.13 a	93 ± 0.06 a
170mM	62 ± 0.17 b	73 ± 0.13 b

* Resultados apresentados em porcentagem ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade de erro.

A salinidade compromete a germinação das sementes pela diminuição do potencial osmótico externo, impedindo a absorção de água, retardando a embebição das mesmas e o alongamento da radícula (SOARES et al., 2015). Entretanto, além de impedir ou reduzir a germinação de sementes, conforme observado para a cultivar BRS AG, o estresse salino (170 mM de NaCl), aumentou o tempo de germinação, atrasando o início do processo. Havendo restrição hídrica para as sementes, a hidratação das mesmas é afetada, exigindo um tempo maior para que elas encontrem um mecanismo de ajuste osmótico (THIAM et al., 2013). Do mesmo modo, a germinação é prejudicada por níveis elevados de salinidade devido a efeitos tóxicos sobre a semente, ocasionados pela absorção dos íons Na⁺ e o Cl⁻ (PARIHAR et al.,

2014). A toxicidade leva a alterações na atividade enzimática (GOMES-FILHO et al., 2008), alterações no metabolismo de proteínas (MENG et al., 2014), desbalanço hormonal (OZHAN; HAJIBABAEI, 2014) e redução da utilização de reservas das sementes (OTHMAN et al., 2006).

Geralmente, concentrações baixas de sais induzem um estado de dormência nas sementes reduzindo a taxa de germinação, enquanto que altas concentrações de sais inibem e diminuem a porcentagem de germinação (KHAN; WEBER, 2008). Segundo Hadas (1976), a atividade enzimática é atrasada com a diminuição do potencial hídrico externo e provoca atraso no desenvolvimento meristemático e na emergência de radícula.

Resultados semelhantes foram observados para os genótipos de arroz: BRS Bojuru, BRS Talento e Cana Roxa, pertencentes ao grupo japônica e BRS Atalanta, BRS Firmeza, BRS Pelota, BRS Agrisul, BRS Querência, BRS 7 “Taim” e BRS Ligeirinho provenientes da Embrapa Clima Temperado, cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de NaCl. Na concentração de 136 mM as sementes apresentaram 26 % de germinação aos cinco dias e aos quatorze dias o percentual germinativo chegou a 74 %, sendo essa concentração prejudicial na fase inicial de germinação. (BENITEZ et al., 2008). Para os genótipos estudados concentrações acima de 136 mM inibiam a germinação, enquanto que a cultivar BRS AG germina até concentrações de 170 mM. Neste sentido, a cultivar BRS AG pode ser considerada tolerante a esse estresse nas condições avaliadas.

Ao estudar o arroz cultivar Kum Doi Saket, *in vitro*, sob diferentes concentrações de sais, Umnajkitikorn; Faiyue; Saengnil (2013) observaram atraso na germinação de sementes submetidas ao estresse salino, as quais, recuperaram a partir do quinto dia de germinação. Eles puderam concluir que nas concentrações de 25 mM e 75 mM a germinação não é afetada. Ao passo que, a porcentagem foi significativamente reduzida em 17 % para as sementes germinadas em 150 mM de NaCl e inibida completamente na concentração de 300 mM. O que está de acordo com os resultados mostrados nesse estudo, com BRS AG onde as concentrações até 136 mM de NaCl não afetaram o processo germinativo.

O efeito osmótico devido à salinidade reduziu a germinação das sementes de arroz cultivadas nas diferentes concentrações de NaCl (4, 8, 12, 16, 20 dS m⁻¹). A porcentagem de germinação atingiu apenas 65 % na concentração de 20 dS m⁻¹, quando comparada a 100 % do controle (ANBUMALARMATHI; MEHTA, 2013;

VIBHUTI et al., 2015). Esse comportamento foi observado também por Kazemi; Eskandari (2011) ao avaliar a germinação das variedades de arroz Anbar, LD e Hamar em condições de salinidade.

Em geral, os efeitos nocivos da salinidade à germinação de sementes da cultivar BRS AG, na concentração de 170 mM de NaCl, podem ser atribuídos a insuficiência do processo de absorção de água e ao efeito do acúmulo de íons tóxicos.

3.2 Respostas morfológicas da cultivar BRS AG ao estresse salino

A tolerância do arroz à salinidade varia conforme o estágio de desenvolvimento da cultura, sendo as fases de plântula e florescimento as mais críticas. Notoriamente, a sensibilidade difere entre as cultivares, e o tempo de exposição ao estresse (CARMONA; ANGHINONI; WEBER, 2011).

Baseado no fato do arroz ser uma espécie sensível durante o crescimento inicial avaliou-se alguns parâmetros morfológicos da cultivar BRS AG, a fim de, entender o seu comportamento em relação à condição de estresse. A partir de observações das plantas submetidas ao estresse salino percebeu-se através da análise de variância que somente para a variável número de folhas não foi observado diferença estatística.

Para o crescimento da parte aérea verificou-se que a concentração de 68 mM mostrou-se melhor em relação as demais concentrações, não diferindo apenas da concentração de 34 mM. Na concentração de 170 mM verificou-se a menor média para o crescimento da parte aérea (Figura 1A). Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos com outras cultivares de arroz expostas a vários níveis de estresse salino (ALAMGIR; ALI, 2006). Por outro lado, em concentrações inferiores de NaCl, entre 20 e 50 mM, plantas de arroz não sofreram alterações no crescimento, porém, as plantas tiveram a altura reduzida em concentrações superiores entre 100 e 200 mM, quando comparadas as plantas controle (AMIRJANI, 2010; WANKHADE et al., 2013).

De modo similar, Thiam et al. (2013) estudando duas cultivares de feijão, uma sensível e outra tolerante a salinidade *in vitro*, notou que concentrações acima de 50 mM de NaCl prejudicaram o crescimento da parte aérea da cultivar sensível e que o crescimento de ambas as cultivares foi afetado negativamente em 200 mM. Resultados semelhantes foram encontrados para os genótipos de pepino (*Cucumis*

sativus L.) 11439S, HH1-8-57, 11432S e 11411S, os quais apresentaram redução da altura na concentração de 80 mM, quando comparado ao controle (KERE; QINGWEI; CHEN, 2010).

O comprimento de raiz apresentou melhor resultado para 34 mM, o qual, diferiu estatisticamente somente das concentrações de 136 e 170 mM de NaCl (Figura 1B). Os resultados obtidos para esse parâmetro foram semelhantes aos encontrados por Piwowarczyk; Tokarz; Kaminska (2015), que observaram redução no crescimento de raízes com o aumento da concentração de NaCl em genótipos de ervilhas cultivadas *in vitro*. Thiam et al. (2013) observou comportamento semelhante para uma cultivar de feijão sensível ao NaCl.

O comprimento radicular de plantas de arroz cultivar MTU 1010 com 21 dias de idade foi afetado pelas concentrações de NaCl. Houve uma diminuição no comprimento de 8 %, 33 % e 51 % em 25, 50 e 100 mM de NaCl, respectivamente, comparado as plantas controle. Os autores afirmam que a redução no crescimento sob estresse salino ocorreu principalmente pela redução da turgescência celular (DAS; SEAL; BISWAS, 2016). Esses resultados estão de acordo com os encontrados no presente estudo, onde, as plantas com 21 dias apresentaram reduções acentuadas no crescimento da parte aérea e do sistema radicular para as concentrações iguais ou superiores a 100 mM de NaCl.

Segundo Orsini et al. (2012), a redução do comprimento da raiz exposta a altos níveis de salinidade, pode ser interpretada como uma forma de proteção que a planta utiliza, evitando que íons tóxicos sejam absorvidos para a parte aérea, mantendo a planta em desenvolvimento. Tal comportamento pode explicar o decréscimo no crescimento das raízes em relação à parte aérea. Ao contrário dos resultados obtidos, Benitez et al. (2010) evidenciaram que o crescimento da parte aérea de 10 genótipos de arroz, após 21 dias submetidos a diferentes concentrações de NaCl foi mais afetado pela salinidade do que o crescimento do sistema radicular.

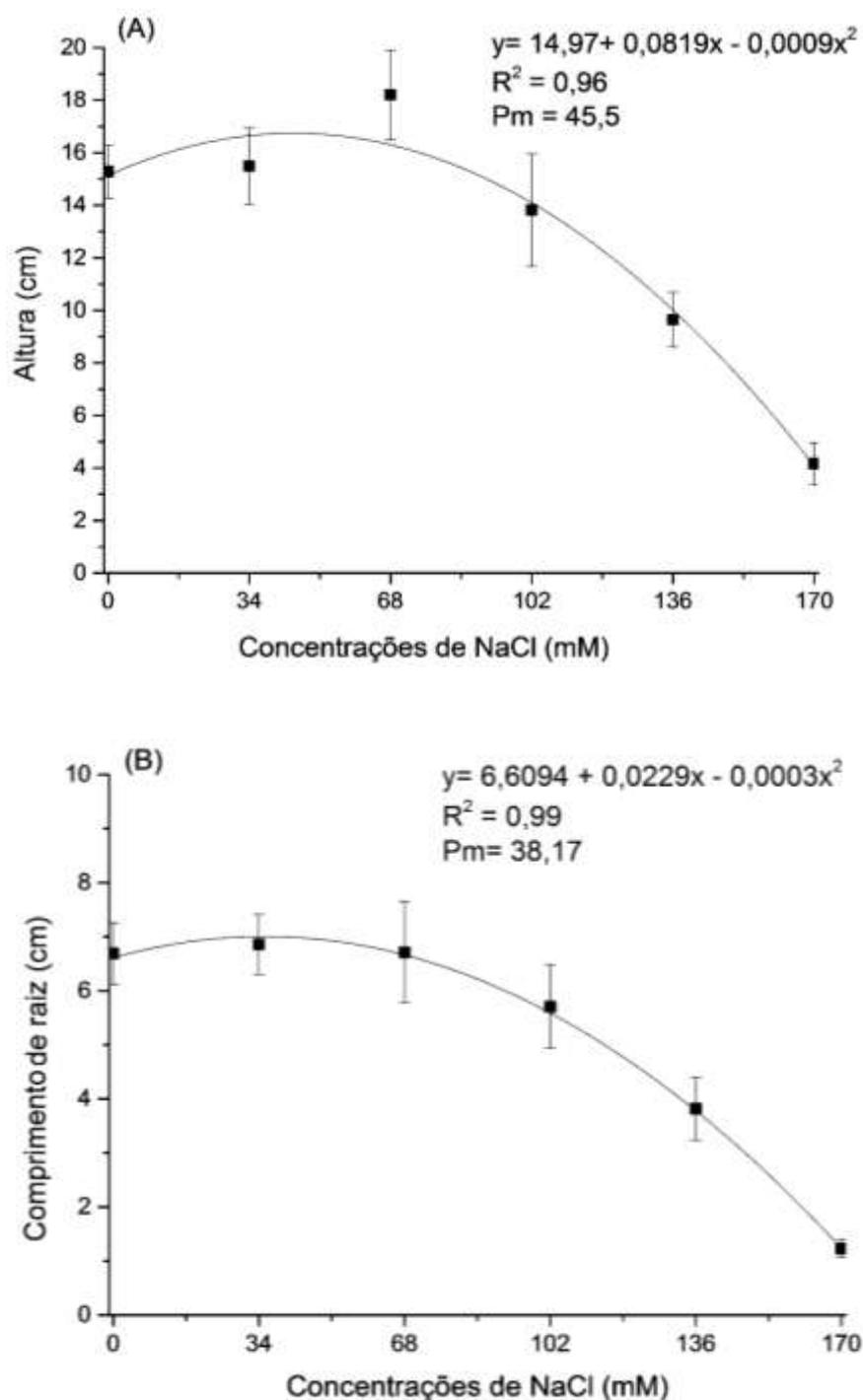


Figura 1 – Altura (A) e Comprimento de raiz (B) de plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a diferentes concentrações de NaCl, por 21 dias. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP (n=5). Pm = ponto máximo.

Quanto ao número de raízes percebeu-se uma redução das médias conforme aumentou a concentração de sal no meio, sendo esse resultado mais acentuado em 136 e 170 mM de NaCl. Os valores das concentrações de 34, 68 e 102 mM não diferiram estatisticamente do controle (Figura 2).

Resultados semelhantes foram observados por Balkan et al. (2015) ao avaliar a cultivar Osmancik-97 de arroz em condições salinas. O número de raízes aumentou significativamente até 8 dS m⁻¹ e reduziu a partir das demais concentrações. Plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* L.), cultivares J1 e Ram, apresentaram reduções no desenvolvimento de raízes laterais em todas as concentrações de NaCl (50, 100 e 150 mM) avaliadas (AL-TARDEH; IRAKI, 2013).

De acordo com Dalton; Maggio; Piccinni (2000) a formação reduzida ou de novas raízes em plantas submetidas a estresse por altos níveis de salinidade pode ser explicado como uma mudança de aclimatação da planta. Diminuindo o número de raízes, reduz a área de contato com o meio e conseqüentemente a absorção de íons tóxicos.

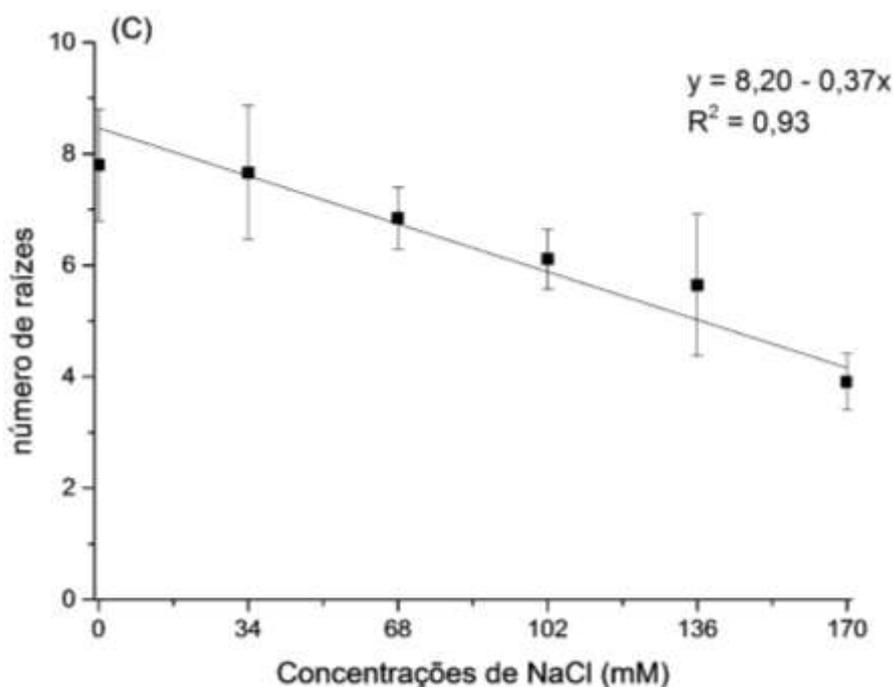


Figura 2 - Número de raízes de plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a diferentes concentrações de NaCl por 21 dias. Os valores são representados pela média de cada tratamento ± DP (n=5).

Na concentração de 68 mM observou-se a maior média para massa fresca da parte aérea, a qual, não diferiu de 34 e 102 mM (Figura 3A). Reduções acentuadas na massa fresca da parte aérea em arroz pode ser explicado pelo fato de que a folha de arroz é constituída de aproximadamente 80 % de água, sendo assim, essas alterações refletem, em parte, de uma diminuição no acúmulo de água ocasionada pelo estresse salino. Com relação a massa fresca da raiz observou-se na Figura 3B que o maior valor foi encontrado para a concentração de 102 mM. Os danos maiores

foram observados nas concentrações de 136 e 170 mM, cujo, valores diferiram estatisticamente do controle e das demais concentrações. Diferindo dos resultados obtidos para outra variedade de arroz, Três Rios, a qual na concentração de 100 mM apresentou diminuição significativa da massa fresca da parte aérea e da raiz (MORALES et al., 2012). De acordo com Khare; Kumar; Kisho (2014), a redução significativa de biomassa em arroz sob estresse salino, pode ser devido ao acúmulo e aos efeitos do Cl^- e Na^+ . O que indica a incapacidade da cultivar BRS AG restringir a entrada de íons em seus tecidos foliares e radiculares quando a concentração de NaCl presente no meio é alta.

Em relação à massa seca da parte aérea, em 34 e 102 mM observou-se as maiores médias, as quais não diferiram apenas de 68 mM (Figura 3C). Com relação à massa seca da raiz o controle foi o que apresentou maior média, a qual foi diferente estatisticamente das concentrações de 136 e 170 mM de NaCl (Figura 3D). Na concentração de 170 mM de NaCl era esperado redução do valor, isso pode ser apontado como um erro de pesagem. Os resultados obtidos concordam com os encontrados por Brunet et al. (2013), em estudo realizado com sementes de aveia branca em diferentes níveis de salinidade, ao concluírem que a massa seca de raiz e parte aérea foram afetadas negativamente nas cultivares testadas.

Esses resultados estão de acordo com os observados por Ahmad et al. (2015) ao avaliar a massa seca das cultivares de arroz Sakha 102 e Yasmine egípcia. A massa seca de ambas as cultivares foi afetada pelo tratamento com estresse salino (50 mM de NaCl), sendo ainda mais drástico para a cultivar Sakha 102. De acordo com os autores a diferença no mecanismo de tolerância a salinidade entre as duas cultivares de arroz pode ser explicado através da regulação da expressão de proteínas envolvidas no transporte de Na^+/K^+ na célula, que pode ter contribuído para o melhor desempenho para a cultivar Yasmine egípcia. Da mesma forma, o desequilíbrio nutricional pode ter acarretado uma diminuição significativa da massa seca nas concentrações elevadas de NaCl para a cultivar BRS AG, avaliada no presente estudo.

De acordo com nossos resultados, as plantas reduziram significativamente crescimento com aumento da concentração de NaCl no meio, sendo extremamente afetadas em 170 mM. Essa redução pode ser explicada pela diminuição do potencial osmótico, o qual reduz a absorção de água pela planta, ocasionando redução do crescimento pela falta de água, bem como, pelos efeitos tóxicos ocasionados pelos

íons Na^+ e Cl^- absorvidos pelas plantas, em especial as expostas à altas concentrações de sais (170 mM).

Segundo Parihar et al. (2014) a causa desta injúria é função da elevada quantidade de sal absorvida, a qual ultrapassa a capacidade da planta de compartimentalizá-lo no vacúolo. Conseqüentemente, a concentração de sais aumentada no citoplasma, em especial o Na^+ , inibe e altera a atividade de enzimas de várias rotas metabólicas, bem como a função estrutural de proteínas. Alternativamente, esses sais podem acumular-se nas paredes celulares e desidratar a célula, o que pode ser explicado pela redução da massa fresca da cv. BRS AG em concentrações elevadas de NaCl.

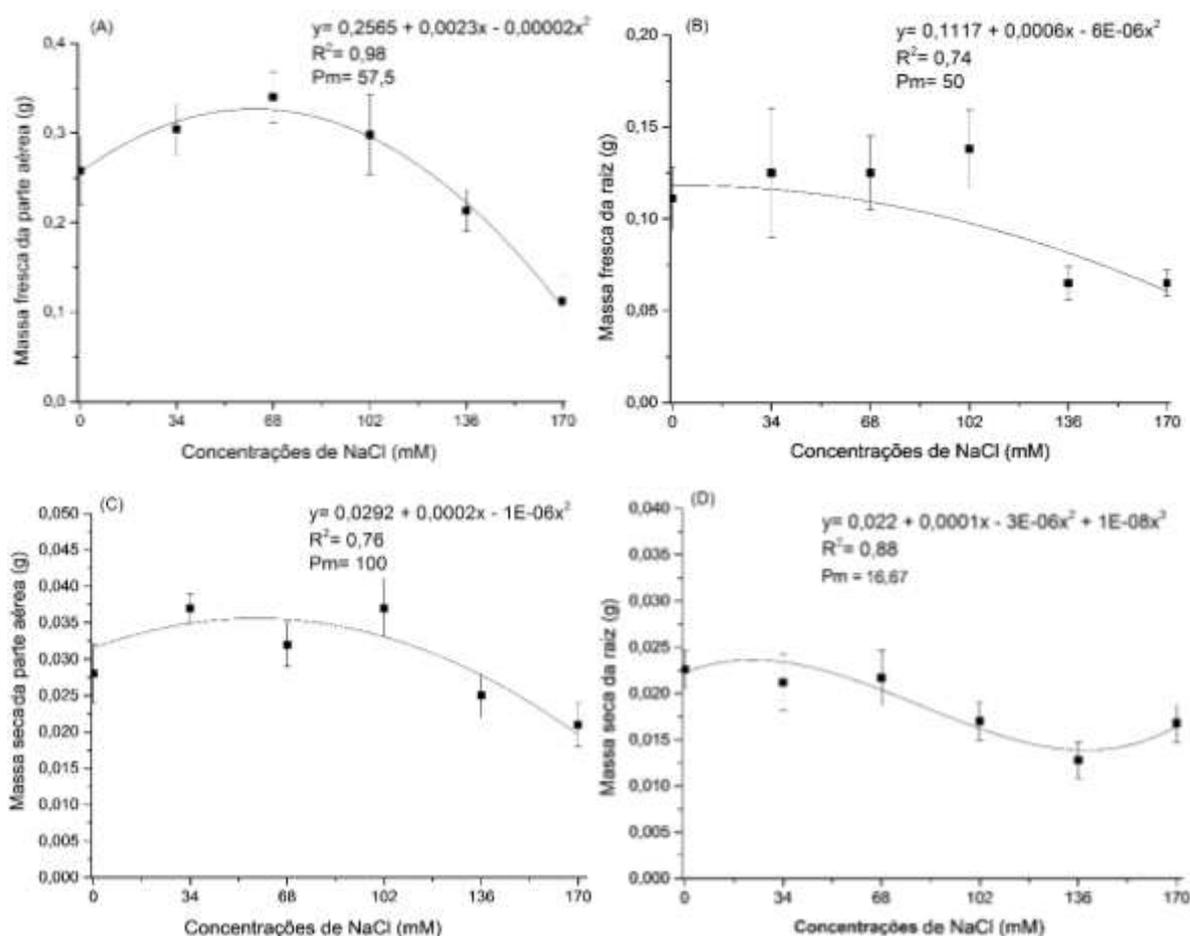


Figura 3 – Massa fresca da parte aérea (A), massa fresca da raiz (B), massa seca da parte aérea (C) e massa seca da raiz (D) de plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a diferentes concentrações de NaCl por 21 dias. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP (n=5). Pm = ponto máximo.

De acordo com Tavakkoli et al. (2011) o Na^+ e o Cl^- são os principais íons que causam disfunções fisiológicas e danos às plantas. Em estudo realizado com quatro

genótipos de cevada em diferentes concentrações de salinidade, puderam observar que ambos Na^+ e o Cl^- estão envolvidos na redução do crescimento. O íon Na^+ interfere na absorção de K^+ , redução dos níveis de Ca^{+2} , interferindo na regulação dos estômatos, fazendo com que a planta perca água. Em comparação, a elevada concentração de Cl^- promove degradação da clorofila, afetando a taxa fotossintética. As plantas, em presença de salinidade na faixa baixa a moderada, conseguem crescer e se desenvolver normalmente o que realmente é afetado é a produtividade dessas. Os efeitos tóxicos do NaCl, assim como o desbalanço nutricional e hormonal ocasionados pelos íons Na^+ e Cl^- sobre as plantas de arroz, podem ser responsáveis pela redução do crescimento da raiz e da parte aérea sob condições de estresse salino elevado.

3.4 Concentração de prolina livre

Os resultados da análise de variância revelaram efeito significativo da salinidade sobre a concentração de prolina livre. A concentração de 136 mM de NaCl ocasionou um aumento do conteúdo de prolina em todos os dias de estresse, em comparação com as plantas controle. Avaliando as concentrações de NaCl, durante os dias, observou-se que aos cinco dias após a germinação as plantas com (136 mM) e sem estresse (0 mM) não diferiram estatisticamente, enquanto que a partir de 10 até os 20 dias de crescimento, a concentração de 136 mM de NaCl foi sempre superior ao controle (Figura 4). Comparando os dias dentro da mesma concentração, verificou-se que as plantas, atingiram o maior valor (1,24 mM g⁻¹MF) em 20 dias após crescimento em meio salino. Essa concentração de prolina é significativamente alta quando comparada aos demais tempos (5, 10 e 15 dias), cujos valores foram de 0,379, 0,726 e 0,772 mM g⁻¹ MF, respectivamente. Em relação ao controle a menor concentração foi de 0,275 mM g⁻¹ MF em cinco dias, sendo que essa não diferiu do valor encontrado para os 10 dias foi 0,296 mM g⁻¹ MF. A concentração de 0,446 mM g⁻¹ MF em 15 dias não diferiu dos valores encontrados em 10 e 20 dias de estresse.

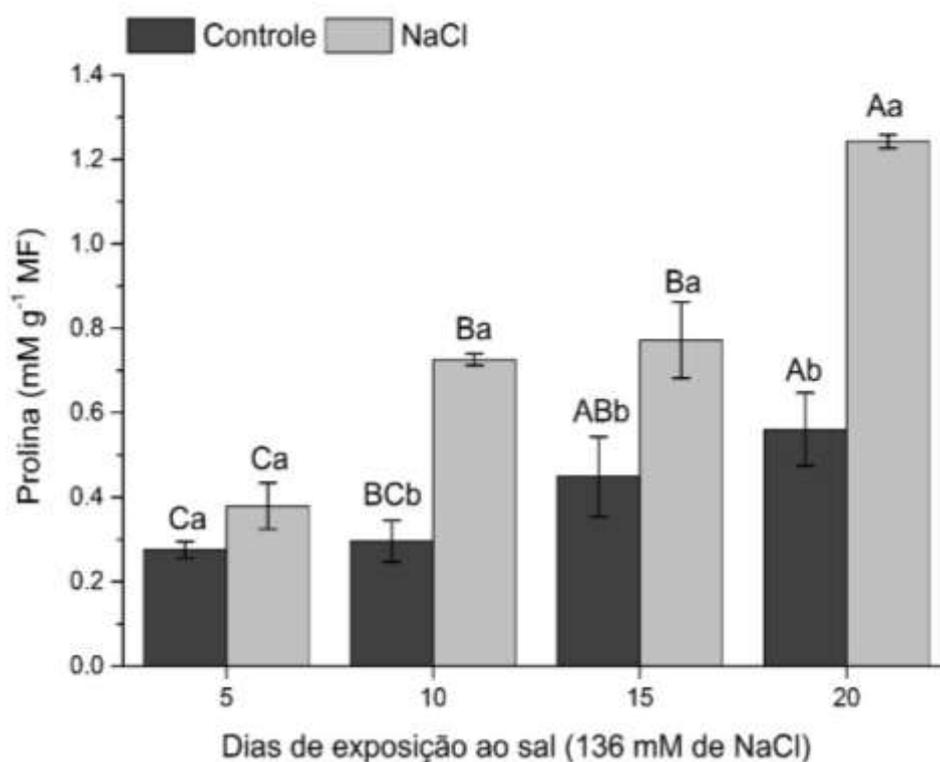


Figura 4 - Concentração de prolina livre presente em sementes e folhas de arroz, cultivar BRS AG, coletadas aos 5, 10, 15 e 20 dias em condições de ausência de sal (controle) e presença de sal (136 mM de NaCl). Letras maiúsculas indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre a concentração de NaCl e o controle em cada dia. Médias \pm desvio padrão ($n=3$).

O arroz é considerada uma espécie sensível à salinidade e de acordo com Carmona; Anghinoni; Weber (2011) a condutividade elétrica do extrato saturado (CEes), a partir de $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ passa a ser prejudicial ao rendimento das plantas.

Uma das repostas das plantas em nível celular ao estresse salino, a longo ou curto prazo, inclui a síntese e acúmulo de uma classe de compostos osmoprotetores, conhecidos como solutos compatíveis (LODEYRO; CARRILLO, 2015). A produção e acúmulo de alguns compostos em concentrações elevadas é um fenômeno geralmente associado à resposta ao estresse salino em plantas. A prolina é um aminoácido que aumenta em plantas sob estresse (JOSEPH, RADHAKRISHNAN, MOHANAN, 2015). Entretanto, além de agir como um osmoprotetor esse aminoácido desempenha outras funções na planta em condições normais e ou de estresse. Durante o ajustamento osmótico, a prolina evita a perda de água pela célula. Esse mecanismo permite que aconteça a redução no potencial osmótico e aumento no potencial de turgescência da célula, facilitando a absorção de água e a manutenção do crescimento celular. Segundo Silveira et al. (2010), ao iniciar um mecanismo de ajuste osmótico, as plantas demandam de energia para esse processo, resultando em

um crescimento lento dessas plantas, conforme o comportamento observado na cv. BRS AG, avaliada no presente estudo.

Para a cv. BRS AG, a concentração de prolina é sempre maior nas plantas estressadas em todos os tempos e aumenta com o tempo de exposição ao estresse. Como um agente protetor durante o estresse, a prolina pode desempenhar diversas funções, entre elas atuar na prevenção da desnaturação de proteínas, estabilização da estrutura quaternária e desestabilização de membrana, atuando como uma chaperona química (YANCEY et al., 1982), pode atuar como antioxidante não enzimático, inibindo a formação e ou amenizando os danos causados pelas EROs, no armazenamento e transferência de energia e poder redutor (SZABADOS; SAVOURE, 2010). O aumento da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, foram observadas por Islam et al. (2009) em células de tabaco estressadas, quando os níveis de prolina se encontravam elevados.

Resultados semelhantes foram observados por Das; Seal; Biswas (2016) em raízes e folhas de arroz, cultivar MTU 1010. As plantas que foram avaliadas com 21 dias de idade apresentaram aumento na concentração de prolina quando expostas aos tratamentos (25, 50 e 100 mM de NaCl). Os valores de prolina foram maiores na parte aérea em relação às raízes na concentração de 100 mM.

Em estudo com sete cultivares de arroz submetidas a diferentes níveis de estresse salino, variando de 0 a 200 mM de NaCl, foi observado que todas as cultivares apresentaram aumento da concentração de prolina com o aumento da concentração salina e aumento do tempo de estresse (JOSEPH, RADHAKRISHNAN, MOHANAN, 2015). Esses resultados estão de acordo com os encontrados no presente estudo com a cv. BRS AG.

Mittal et al. (2012) evidenciaram que o acúmulo de prolina contribuiu para o maior potencial de aclimatação de *Brassica juncea*, cultivar Bio 902, tolerante ao sal, quando comparada a cultivar sensível, Urvashi. O tempo de exposição ao estresse em relação à concentração de prolina, mostrou que as plantas estressadas apresentaram aumento no teor de prolina em todos os tempos. Em concentrações de NaCl 150 mM, genótipos de canola também apresentaram aumento do conteúdo de prolina, principalmente na área foliar (HEIDARI, 2010).

Por outro lado, a aplicação foliar de prolina resultou num aumento significativo no crescimento, entre outros parâmetros avaliados em arroz (SIDDIQUE et al., 2014). Outro estudo mostrou que a aplicação de prolina em planta de milho amenizou os

danos causados pela salinidade do solo, tanto da fase de plântula, como na fase vegetativa. Em resposta a aplicação de prolina houve aumento da absorção de nutrientes e defesa antioxidante nessas plantas (HASAN et al., 2015).

3.5 Expressão de genes relacionados ao metabolismo de prolina

De acordo com os resultados, as plantas de arroz crescidas *in vitro*, em meio salino, sempre apresentaram concentrações de prolina superiores e aumento gradual da concentração com o decorrer do tempo de exposição ao estresse. A fim de justificar esse incremento de prolina, avaliou-se os genes envolvidos no metabolismo desse aminoácido. Conforme dados mostrados na Figura 5, a expressão dos genes *P5CS1* e *P5CS2*, que codificam a enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), a qual realiza o primeiro passo na biossíntese de prolina, foram induzidos pelo estresse salino em todos os tempos de exposição ao estresse. Valores máximos de expressão para os genes *P5CS1* e *P5CS2* foram alcançados para tecidos avaliados aos 20 dias de estresse com valores QR = 1,37 e 5,50 respectivamente, sendo que somente o gene *P5CS1* não diferiu dos valores de expressão encontrados para as plantas controle e o tempo de 10 dias de estresse. A resposta do gene *P5CS2* nas plantas com 10 e 15 dias de estresse não foi diferente do controle.

Ao longo do tempo de exposição das plantas ao estresse salino, verificou-se que o nível de mRNA do gene *OAT* foi significativamente superior nos tecidos aos 20 dias, com (QR= 5,44) em comparação com os demais tempos, QR = 0,99, 1,41 e 1,23 aos 5, 10 e 15 dias, respectivamente. Do mesmo modo, o maior pico de expressão para o gene *P5CR*, que codifica a enzima que converte Pirrolina-5-Carboxilato (P5C) em prolina, ocorreu no tempo maior de exposição ao estresse com o valor de QR = 2,20.

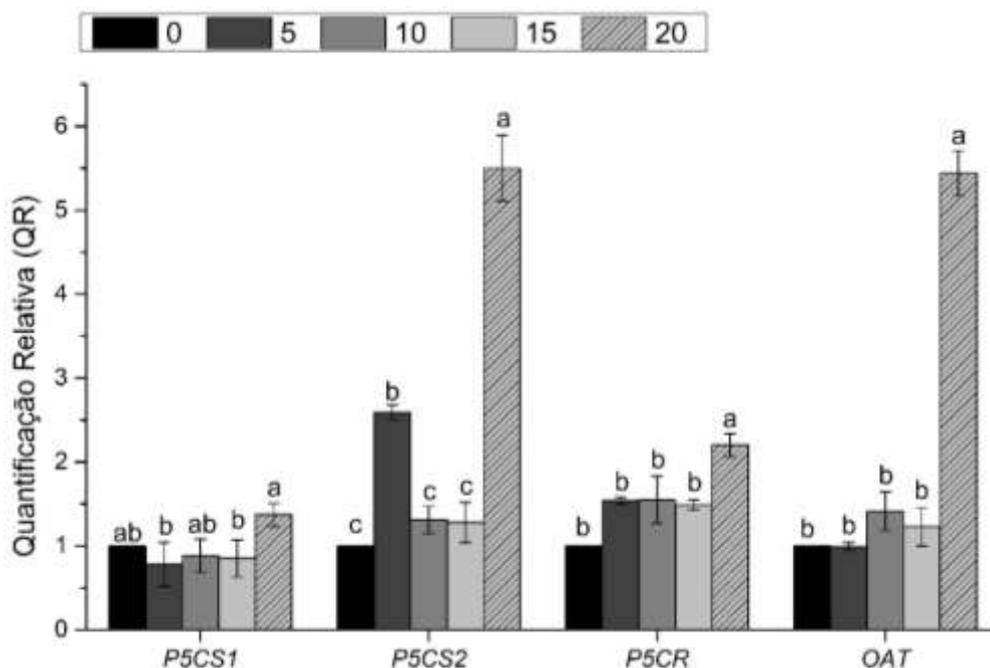


Figura 5 - Quantificação Relativa (QR) da expressão de genes da biossíntese de prolina em plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a condições de salinidade (136 mM de NaCl) em diferentes tempo de estresse. Tempo zero representa as plantas controle que foram coletadas nos mesmos tempo das demais. Letras minúsculas indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os dias de estresse. Médias \pm desvio padrão (n=3).

Em relação a expressão dos genes do catabolismo representados, na Figura 6, pode-se observar que, o gene *P5CDH*, que codifica a enzima cuja função é converter PC5 a glutamato, apresentou valor máximo de expressão para o tratamento com 20 dias de estresse, significativamente superior aos demais tempos avaliados, porém, diferiu do comportamento de expressão do gene *PDH*, que apresentou aumento da expressão aos 10 dias (QR= 1,40), diferindo do controle.

Com base nos resultados de expressão de genes ao longo do tempo de estresse salino, afere-se que, os níveis elevados de prolina nas plantas estressadas deve-se a maior expressão de genes envolvidos na biossíntese de prolina, quando comparados com os genes que codificam enzimas do catabolismo. Ao mesmo tempo, valores de expressão altos observados nos genes *P5CS2* e *OAT* para o tratamento com 20 dias de estresse, explica a elevada concentração de prolina nesse período.

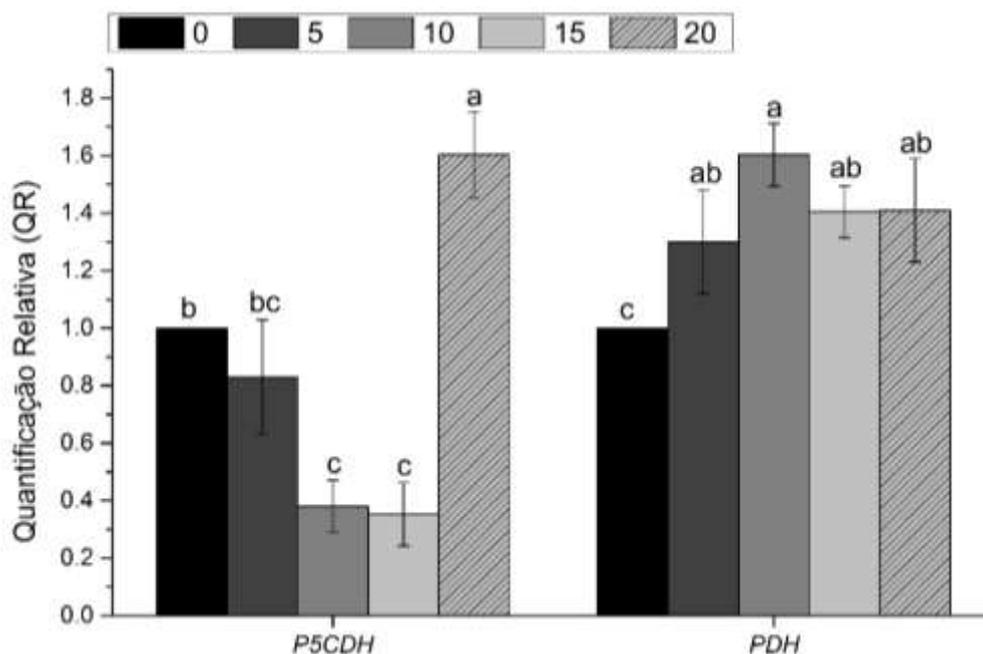


Figura 6 - Quantificação Relativa (QR) da expressão de genes do catabolismo de prolina em plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a condições de salinidade (136 mM de NaCl) em diferentes tempo de estresse. Tempo zero representa as plantas controle que foram coletadas nos mesmos tempos das demais. Letras minúsculas indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os dias de estresse. Médias \pm desvio padrão ($n=3$).

Os resultados do presente estudo mostram que os genes *P5CS2* e *OAT* responderam ao estresse salino em todos os tempos, porém, com um pico maior aos 20 dias. Em *Arabidopsis*, acredita-se que a biossíntese de prolina via glutamato é predominante em condições normais e estressantes. Contudo, foi relatado que a via da ornitina tem papel fundamental em plantas adultas sobre estresse osmótico, enquanto que em plantas jovens, ambas as vias parecem contribuir para o acúmulo de prolina. Alguns autores afirmam que a via da ornitina ocorre durante as condições ideais de nitrogênio e durante o desenvolvimento vegetativo (ARMENGAUD et al., 2004). Níveis elevados de prolina, via ornitina, foram observados nesse estudo, na cv. BRS AG de arroz.

Estudo realizado por Armengaud et al. (2004), com a espécie *Medicago truncatula*, relatou que as plantas expostas à salinidade apresentam um incremento de transcritos de *OAT* com aumento do tempo de exposição ao estresse. Os autores observaram valores significativos de expressão para esse gene em 72 horas de estresse na parte aérea das plantas. Para as raízes, eles notaram uma correlação positiva entre a concentração de prolina e o acúmulo de transcritos *OAT* em plantas estressadas. Os resultados encontrados no presente estudo indicam que ambas as

vias, ornitina e glutamato, contribuem para o acúmulo de prolina induzida por estresse salino, conforme observado para a cultivar BRS AG.

Vários estudos têm mostrado que a transcrição de *P5CS* em plantas, embora varie de acordo com a espécie, é promovido principalmente por condições ambientais adversas como seca, salinidade, altas e baixas temperaturas. Esses trabalhos trazem que a expressão do gene *P5CS1* predomina em situações de estresse salino (Sze'kely et al., 2008). A cultivar BRS AG também apresentou aumento de expressão para *P5CS1*, porém em níveis mais baixos, quando comparado a *P5CS2*. Resultados semelhantes foram encontrados por Hur et al. (2004) estudando arroz. Segundo esses autores, ambos *P5CS1/P5CS2* responderam nas plantas crescidas sob estresse. Os autores consideram que o gene *P5CS1* está envolvido na manutenção, fornecendo prolina à célula, enquanto que o *P5CS2* é o primeiro a responder em condição de estresse. Também observaram que o gene *P5CS1* respondeu com um pico máximo às 12 horas de estresse e reduziu drasticamente em 24 horas. Em contraste, os níveis de transcritos de *P5CS2* continuaram aumentando após 24 horas de estresse hídrico. Além disso, a salinidade e baixas temperaturas induzem o gene *P5CS2* preferencialmente em células na zona de divisão das raízes. Isto sugere que a região é mais sensível a essas condições e que a síntese de prolina pode ser estimulada por esses sinais. Tais comportamentos indicam que, perante situação estressante, o gene *P5CS2* tem papel importante na planta.

Plantas transgênicas de grão de bico (*Cicer arietinum* L.), em condições de salinidade, apresentaram aumento da expressão para os genes *P5CS*, elevando a produção da enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase (*P5CS*), bem como a concentração de prolina livre (GHANTI et al., 2011).

Durante a biossíntese de prolina, a pirrolina-5-carboxilato (*P5C*) pode causar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e indução de apoptose e, por conseguinte, morte celular, quando acumulado em excesso na célula (SZÉKELY et al., 2008). Portanto, as plantas precisam degradá-la rapidamente, logo que a tensão é aliviada. O catabolismo de prolina acontece nas mitocôndrias através da ação da prolina desidrogenase (*PDH*) ou prolina oxidase (*POX*) produzindo *P5C*, que em seguida é convertido em glutamato pela ação da enzima *P5C* desidrogenase (*P5CDH*) (SZABADOS; SAVOURE, 2010).

3.6 Relação entre a expressão dos genes do metabolismo da prolina e sua concentração nos tecidos avaliados

Diante desses resultados, comparou-se a expressão entre os genes envolvidos no metabolismo de prolina em cada um dos tempos (dias) de estresse com o objetivo de explicar o aumento da concentração de prolina em cada um dos tempos de estresse. Na Figura 7A observa-se que, a partir dos cinco dias após a germinação a concentração de prolina nas plantas estressadas foi maior devido ao aumento significativo da expressão dos genes *P5CS2* e *P5CR* que codificam enzimas da biossíntese e o nível baixo de expressão dos genes ligados às enzimas de degradação de prolina, embora a expressão dos genes *P5CDH* e *PDH* não tenham diferido do gene *P5CR*, o que, justifica o aumento no teor de prolina nas plantas estressada nesse dia.

Os dados mostrados na Figura 7B indicam que com 10 dias de estresse a expressão dos genes *P5CR* com valor de QR= 1,55, *OAT* com QR= 1,41 e o *PDH* com QR= 1,60 mostraram-se superiores aos demais, não diferindo apenas do gene *P5CS2*. Com base nesses dados, conclui-se que a expressão aumentada do gene *PDH* que codifica a enzima que faz parte da degradação de prolina não influenciou na redução da concentração desse aminoácido nas plantas estressadas aos 10 dias.

Esse fato pode ser explicado pela baixa expressão do gene que codifica a enzima Pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (*P5CDH*) envolvida no final da rota do catabolismo, não permitindo a degradação do aminoácido durante o estresse. O comportamento da expressão dos genes foi semelhante para os 15 dias, o que se atribui aos valores da concentração de prolina nos tecido vegetais aos 10 dias (0,726 mM prolina g⁻¹ MF) e 15 dias (0,772 mM prolina g⁻¹ MF) não possuem diferença significativa (Figura 7C).

Para os 20 dias de estresse, conforme a figura 7D, comparando a expressão dos genes, os dados indicam que o aumento da expressão dos genes *P5CS2* e *OAT* e em menor proporção o *P5CR*, que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de prolina e conseqüentemente a expressão baixa de genes que regulam enzimas da degradação, contribuíram com o aumento da concentração de prolina em plantas de arroz da cv. BRS AG.

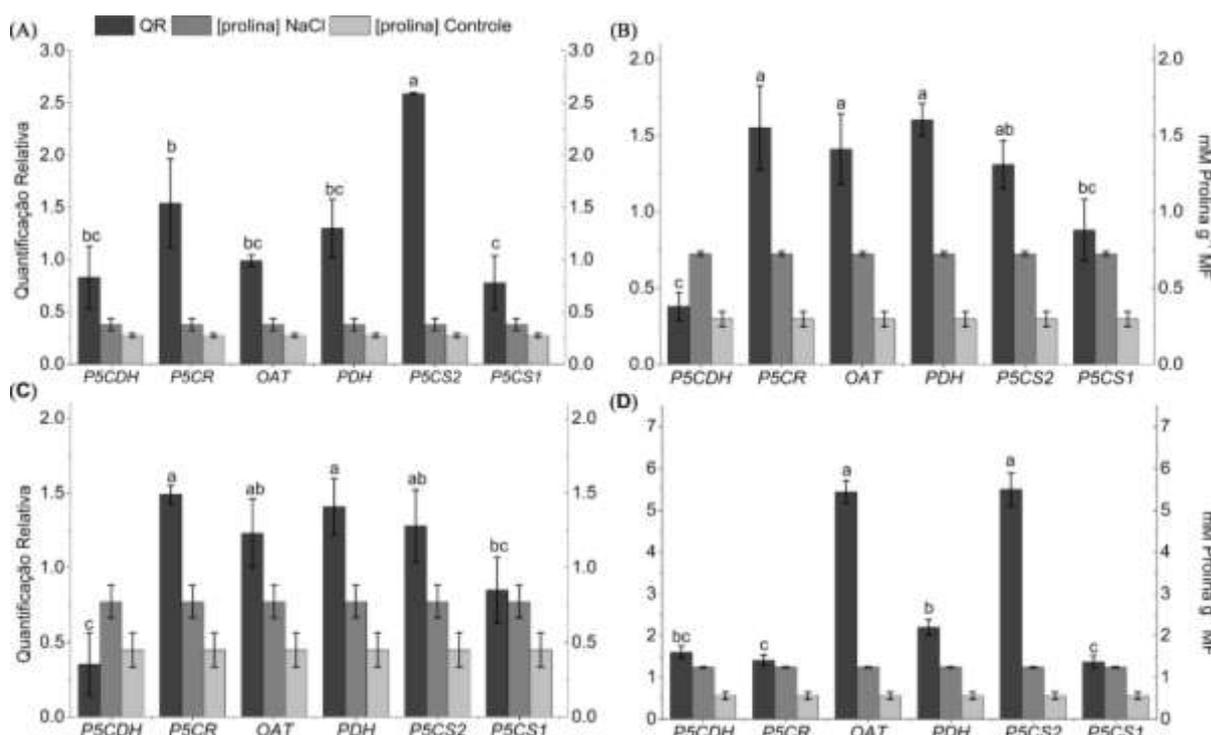


Figura 7– Comparação da expressão dos genes do metabolismo de prolina em cada um dos tempos (dias) avaliados em relação à concentração de prolina sintetizada em plantas de arroz, em condições de estresse salino (136 mM de NaCl). As letras diferentes indicam diferença estatística para a expressão dos genes do metabolismo de prolina. Médias \pm desvio padrão (n=3). Cinco dias de estresse salino (A), 10 dias de estresse salino (B), 15 dias de estresse salino (C) e 20 dias de estresse salino (D).

A biossíntese, degradação e o transporte de prolina são necessários para manter a homeostase celular e o desenvolvimento das plantas cultivadas em situação de estresse. Além disso, vários fatores endógenos ou exógenos podem estar envolvidos na regulação de prolina. Conforme dados apresentados na figura 7A, percebeu-se que aos cinco dias de estresse a expressão de *P5CS1* foi pouco responsiva. O fato de níveis de mRNA para *P5CS2* estarem presentes pode ter contribuído para pouca expressão de *P5CS1*. Expressão inferior de *P5CS1* também pode ser explicada pela regulação indireta da luz. A cultivar utilizada no presente estudo permaneceu no escuro durante os primeiros cinco dias de germinação, somente após esse período as mesmas foram transferidas para luz. Em estudo realizado com *Arabidopsis*, os autores propuseram que a luz pode ter efeito indireto na regulação da expressão de *P5CS1*, porém a luz tem efeito negativo sobre a expressão de *PDH*. A luz ativa a expressão de *P5CS1*, pois nessas condições, com a fotossíntese aumentada, diminuiu o potencial osmótico e a demanda pela prolina na célula é aumentada. Embora em situação de estresse a expressão de *P5CS1* foi

observada no escuro, enquanto que, o *PDH* não respondeu em ambas as condições (HAYASHI et al., 2000). Ábrahám et al. (2003) verificaram que a estimulação da síntese de prolina por ácido abscísico (ABA) (10 μ M) e estresse salino (200 mM) correlaciona-se com uma ativação da expressão de *P5CS1*. Por outro lado, *P5CS2* é fracamente induzido, enquanto *PDH* é inibido em diferentes proporções por ABA e estresse salino na parte aérea e raízes de plantas crescidas na luz. A expressão de *P5CS1*, sinalizado por ABA e estresse salino, é praticamente inibida nas plantas mantidas no escuro, reduzindo a concentração de prolina acumulada. Para as plantas cultivadas no escuro os níveis de mRNA de *P5CS2* predominam na raiz, enquanto que, o *PDH* é significativamente expresso na parte aérea.

Segundo HUR et al. (2004), o gene *P5CS2* é induzido por baixas temperaturas, salinidade e ABA, atuando preferencialmente em zonas de divisão celular, nesse caso em raízes. No presente estudo, com apenas cinco dias de idade as plântulas de arroz apresentavam apenas uma minúscula radícula e desenvolvimento inicial do hipocótilo. Perante isso, todo o material foi avaliado, inclusive a radícula, o que pode ter justificado o aumento na expressão de *P5CS2* e acúmulo de prolina nesse dia.

A prolina desidrogenase (*PDH*) é uma enzima localizada na membrana mitocondrial, a qual catalisa o primeiro passo de oxidação convertendo prolina em Pirrolina-5-carboxilato (*P5C*), que pode ser oxidado pela enzima Pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (*P5CDH*) e formar glutamato ou ser transportado para o citosol, onde é convertido à prolina através da enzima Pirrolina-5-carboxilato redutase (*P5CR*) (REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014). No presente estudo, percebeu-se que os níveis elevados de expressão para o gene *PDH* não causou reduções nas concentrações de prolina nas plantas avaliadas aos 10 e 15 dias de estresse, o que provavelmente pode ser atribuído à retomada de *P5C* ao citosol sendo transformado em prolina novamente. Por outro lado, a expressão de *P5CDH* foi baixa, em comparação aos demais genes, conseqüentemente a ativação da enzima que oxida *P5C* à glutamato, não se efetivou e a degradação de prolina não aconteceu por completo. Da mesma forma, o fato do gene *PDH* ter respondido ao estresse não significa que a enzima prolina desidrogenase também tenha sido ativada. Ortega et al. (2008) observaram em estudo com cactos, que apenas a transcrição dos genes era aumentada mas a atividade da enzima não. Do mesmo modo, os níveis aumentados de expressão *P5CS2* e *OAT* colaboraram com o acúmulo de prolina nas plantas estressadas da cultivar BRS AG.

Aos 20 dias de estresse os níveis aumentados de concentração de prolina são resultantes da expressão significativamente superior dos genes *P5CS2* e *OAT* em relação aos demais. Como já mencionado, é uma cascata de sinalização que regula o metabolismo de prolina. É sabido que em condições normais o ABA regula positivamente o *P5CS1* e *P5CS2*, em arroz com uma atuação maior sobre o *P5CS1* (HUR et al., 2004). Dados mostram que em condições de estresse salino um aumento endógeno de ABA é necessário para expressar o *P5CS1* em arroz (SRIPINYOWANICH et al., 2013), diferente do observado para o arroz cv. BRS AG, onde o *P5CS2* ganhou destaque. No entanto, a expressão do gene *P5CS2* tem sido atribuído por muitos autores na defesa de espécies reativas de oxigênio (EROs) (FABRO et al., 2004).

A biossíntese da prolina requer NADPH para a redução de glutamato a Pirrolina-5-carboxilato (P5C) e esse à prolina, gerando NADP⁺ que pode ser utilizado adicionalmente como aceptor de elétrons. A fosforilação de glutamato consome ATP e produz ADP, que é um substrato para a biossíntese de ATP durante a fotossíntese. Uma taxa aumentada de biossíntese de prolina durante o estresse pode manter baixa a relação NADPH: NADP⁺, contribuindo para sustentação do fluxo de elétrons entre os centros de reação fotossintéticos, estabilizando o equilíbrio redox, e reduzindo a fotoinibição e danos ao aparelho fotossintético.

Em mitocôndrias, a prolina protege o complexo II da cadeia de transporte de elétrons durante estresse por sal (HAMILTON; HECKATHORN, 2001). Após o estresse a prolina é degradada na mitocôndria pelas enzimas PDH e P5CDH, as quais, ao oxidar a prolina fornecem elétrons a cadeia transportadora, aumentando a energia e, conseqüentemente a planta retoma o crescimento. Dessa forma o catabolismo de prolina desempenha papel fundamental no equilíbrio das espécies reativas de oxigênio EROs na célula (HAYAT et al., 2012). Como uma alternativa para eliminar as EROs, a prolina pode atuar na proteção e estabilização de enzimas que realizam a detoxificação celular, (sistema antioxidante).

Inúmeros são os estudos que demonstram a relação entre a expressão dos genes do metabolismo com o conteúdo de prolina com diversos estresses. Estudo realizado por Ortega et al. (2008) com plantas de *Opuntia streptacantha* mostrou diferença de comportamento de expressão do gene *P5CS* em diferentes dias de estresse. Verificaram que, com 11 dias de estresse, a transcrição de *P5CS* atingia valores máximos em 250 mM de NaCl, sendo que aos nove dias de estresse houve

correlação entre o aumento da transcrição e acúmulo de prolina com o aumento da concentração de NaCl. Filippou et al. (2014) verificaram que a expressão de *P5CS* resultou no acúmulo de prolina em *Ailanthus altissima*, sob estresse salino (150 e 300 mM), comprovando o papel osmoprotetor desse aminoácido na tolerância dessa espécie ao estresse salino.

Em um estudo recente, os genes *P5CS1* e *P5CS2* foram super expressos em tabaco. As plantas transgênicas aumentaram a síntese de prolina em condições de estresse abiótico (Zhang et al., 2014). A fim de, aumentar a tolerância ao estresse salino o gene *P5CS* de *Arabidopsis* foi transferido em plantas de batata. O efeito foi observado no crescimento da planta, morfologia e rendimento do tubérculo. As plantas transgênicas acumularam alto teor de prolina em relação às plantas controle sob estresse elevado (100 mM de NaCl) e, por sua vez, mostraram tolerância ao sal e produção de tubérculos de boa qualidade (HMIDA-SAYARI et al., 2005).

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse estudo é possível concluir que: (i) a germinação da cv. BRS AG começa a ser prejudicada a partir da concentração de 170 mM de NaCl; (ii) a partir da concentração de 136 mM de NaCl é possível observar danos causados pelo estresse salino no crescimento; (iii) o aumento das concentrações de cloreto de sódio exerce redução nas variáveis altura, número de raiz, comprimento de raiz, massa fresca da parte aérea e da raiz, bem como, na produção de massa seca (MSPA e MSR), exceto para o número de folhas que manteve-se estável; (iv) essas reduções evidenciaram que o crescimento do sistema radicular foi mais afetado pela salinidade do que o crescimento da parte aérea; (v) o acúmulo de prolina nas plantas estressadas foi superior às plantas controle, o que está diretamente relacionado ao aumento da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de prolina em cada um dos tempos de estresse; (vi) valores de expressão altos observados nos genes *P5CS2* e *OAT* aos 20 dias de estresse, explica a elevada concentração de prolina nesse período; (vii) ambas as vias, ornitina e glutamato, contribuem para o acúmulo de prolina induzida pelo estresse salino na cv. BRS AG; (viii) a biossíntese de prolina ocorre preferencialmente, via citosol na cv. BRS AG, em condições de estresse salino; (ix) de acordo com os resultados *in vitro*, o arroz, cultivar BRS AG, é considerado tolerante ao estresse salino.

CAPÍTULO II

EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS DE ARROZ, CV. BRS AG, SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO

1 INTRODUÇÃO

O planeta terra é predominantemente salgado, com cerca de 20% da terra cultivada e quase metade das terras irrigadas afetadas por níveis de salinidade elevado (ZHU, 2003). A salinidade do solo pode ser decorrente de sua própria formação natural ou devido à intervenção humana. O estresse por altos teores de sais é comum em regiões áridas e semiáridas, nas quais, a temperatura e a evapotranspiração são elevadas coincidindo com a baixa precipitação (LODEYRO; CARRILLO, 2015).

Na metade Sul do Estado do Rio Grande do Sul, a salinidade do solo pode ocorrer nas lavouras de arroz irrigado das Planícies Costeiras do RS devido à irrigação com água salina. Períodos de baixa precipitação na região permitem a entrada de maior quantidade de água do mar na Lagoa, ocasionando a salinização da mesma. Conseqüentemente a mesma água é utilizada na irrigação das lavouras dos arrozais, coincidindo com a fase reprodutiva das plantas (CARMONA; ANGHINONI; WEBER, 2011).

A salinidade do solo afeta as plantas por meio de efeitos osmóticos, iônicos e estresse oxidativo (PITMAN; LAUCHLI, 2002). Com índice de sais elevados no solo a absorção de água e de nutrientes pelas plantas, assim como, a permeabilidade das membranas, são prejudicados. Estas alterações acabam refletindo no balanço hídrico e nutricional, provocando mudanças no metabolismo, hormonais, nas trocas gasosas e na produção de espécies reativas de oxigênio, que irão comprometer a expansão e divisão celular, conseqüentemente o crescimento da planta, levando a aceleração da senescência foliar e morte da planta (PRISCO; FILHO, 2010).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas pelos processos metabólicos normais da planta como fotossíntese e respiração. Entretanto, durante situação de estresse, o desequilíbrio metabólico leva a formação de EROs em excesso na planta, ocasionando estresse oxidativo. Entre os diversos tipos de EROs, principalmente o oxigênio singlete (1O_2), radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) podem ser formados (SILVEIRA et al., 2010). Quando a produção de EROs é muito maior do que pode ser metabolizado, elas podem reagir com diferentes componentes celulares. Em excesso podem ocasionar danos aos lipídios, proteínas e DNA, levando a mudança estrutural e ou inibindo a função (FERREIRA; ABREU, 2007). Em compensação, as plantas apresentam um complexo sistema antioxidante, cuja função é proteger as células dos danos ocasionados pelas EROs. Entre os antioxidantes não enzimáticos, o ascorbato (ASA) e a glutathiona (GSH) são os que se destacam. Os principais componentes enzimáticos do sistema de defesa são superóxido dismutase (SOD) catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathiona redutase (GR), monodeidroascórbico redutase (MDHAR) e deidroascórbico redutase (DHAR).

A SOD parece ser a primeira a atuar na linha de defesa na eliminação das EROs, realizando a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio. A conversão de peróxido de hidrogênio à água e oxigênio é realizada pela catalase e ascorbato peroxidase com a participação da glutathiona redutase envolvida no ciclo ASH/GSH.

As enzimas CAT, APX, SOD e GR são codificadas a partir de diferentes famílias gênicas. Em arroz, as enzimas APXs são codificadas por uma família gênica composta de oito genes e estão localizados em diferentes compartimentos: duas isoformas citosólicas codificadas por *OsAPx1* e *OsAPx2*, duas isoformas peroxissomais/glioxissomais codificadas por *OsAPx3* e *OsAPx4* e as isoformas cloroplastídicas codificadas por *OsAPx5*, *OsAPx6*, *OsAPx7* e *OsAPx8*, sendo que *OsAPx6* foi localizada também na mitocôndria (TEIXEIRA et al., 2004).

Todas as isoformas de SOD são nucleares, codificadas e direcionadas aos seus respectivos compartimentos subcelulares, quando necessário, por meio de sequências de direcionamento amino-terminal (GILL; TUTEJA 2010). As SODs são classificadas de acordo com seu cofator metálico e/ou sua localização subcelular: (Fe-SOD) presente nos cloroplastos, (Mn-SOD) presente nas mitocôndrias e peroxissomos e a Cu/Zn-SODs presentes nos cloroplastos, peroxissomos, citosol e,

possivelmente, no espaço extracelular (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Segundo Bowler; Montagu; Inze (1992) a enzima catalase é representada por uma pequena família, denominadas *CatA*, *CatB*, *CatC*. Três genes que codificam GR também têm sido descritos em arroz, uma isoforma citosólica, codificada por *OsGR2* (KAMINAKA et al., 1998) e duas isoformas presentes no cloroplasto, codificadas por *OsGR1* e *OsGR3* (BASHIR et al., 2007). A expressão dos genes codificantes de APX, CAT, SOD e GR são modulados por diversos estímulos ambientais, entre eles, o estresse salino.

O arroz é uma cultura de grande importância econômica e amplamente cultivada no mundo todo. A cultivar BRS AG, desenvolvida pela Embrapa Clima Temperado de Pelotas/RS, tem por finalidade a produção de etanol e/ou alimentação animal, atendendo a demanda da região Sul do RS. Desse modo, BRS AG é a primeira cultivar de arroz irrigado desenvolvida para outros fins, que não o consumo humano, pois não apresenta os padrões exigidos pelo consumidor (MAGALHÃES JÚNIOR, 2012).

Sabendo que, a salinidade é um dos fatores que mais influência na produção de arroz na metade sul do RS, e que o crescimento inicial é uma das etapas mais sensíveis ao estresse salino para essa espécie, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão gênica e atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX e GR) e identificar suas funções no controle dos níveis de EROs nas plantas de arroz, cultivar BRS AG, após submissão a estresse salino.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pertencente ao Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), localizado no município de Capão do Leão, RS. Foram utilizadas sementes de arroz da cultivar BRS AG da Estação Experimental Terras Baixas (Embrapa – Clima Temperado).

2.2 Condições de cultivo das plantas

Antes de serem colocadas para germinar, as sementes foram descascadas manualmente e desinfestadas, em álcool 70 %, durante 2 minutos e em solução de hipoclorito de sódio 3 %, durante 25 minutos, seguidas de três lavagens com água destilada autoclavada, sendo todas as etapas sob agitação leve e constante em câmara de fluxo laminar. Após enxague, as sementes foram secas em papel filtro estéril e colocadas para germinar em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS de Murashige; Skoog (1962) com metade da concentração das fontes de sais e suplementado com diferentes concentrações de NaCl, 10 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e solidificado com a adição de 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8. Os tubos de ensaio foram fechados com alumínio e autoclavados a 121 °C, durante 20 minutos. Os cultivos foram mantidos em estufa BOD a 28 °C, no escuro, durante cinco dias. Passado este período, as plântulas foram transferidas para sala de crescimento.

Para as análises da expressão gênica e atividade antioxidante enzimática, o material vegetal foi coletado aos 5, 10, 15 e 20 dias após inoculação das sementes ao meio de cultura. As coletas para ambos, controle (0 mM) e com sal (136 mM) de NaCl, foram realizadas em triplicata, com um total de 15 plântulas por repetição. As amostras permaneceram armazenadas em ultra freezer a -70 °C para análises posteriores.

2.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com duas concentrações de NaCl, sendo uma delas com sal (136 mM de NaCl) e o controle (sem NaCl) e três repetições, cada repetição representada por 15 plântulas. Os dados foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$) e os valores médios comparados pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade pelo software estatístico WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

2.4 Determinação de Superóxido, Peróxido de Hidrogênio e Peroxidação lipídica

2.4.1 Determinação de superóxido

O radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) foi determinado de acordo com LI et al. (2010). Tecidos de folhas e sementes (plântulas) (200 mg) foram macerados em tampão fosfato 65 mM (pH 7,8) e centrifugados a 5000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi misturado com 65 mM de tampão fosfato (pH 7,8) e 10 mM de cloridrato de hidroxilamina e incubado a 25 °C, durante 20 minutos. Em seguida, 17 mM de sulfanilamida e 7 mM de α -naftilamina foram adicionados à mistura. A absorvância da solução foi medida a 530 nm depois de repousar durante 20 minutos a 25 °C. Uma curva padrão com radical dióxido de nitrogênio (NO_2) foi utilizada para calcular a taxa de geração do $O_2^{\cdot -}$.

2.4.2 Determinação do peróxido de hidrogênio

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

2.4.3 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada conforme descrito por Heath; Packer (1968). Cerca de 200 mg de tecido vegetal (folhas e sementes) foram macerados em N_2 líquido e homogeneizados em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 % (p/v). As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,5% em TCA 10 %), preparado na hora do uso. A mistura foi incubada a 90°C durante 20 minutos. Posteriormente, a reação foi interrompida por resfriamento em gelo e as leituras determinadas em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm. O TBA

forma complexos com o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada e a peroxidação expressa em nmol MDA g⁻¹ MF.

2.5 Extração e ensaio das enzimas antioxidantes

Amostras de folhas e sementes (200 mg) foram maceradas em N₂ líquido e homogeneizadas em 2,0 mL do tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathiona redutase (GR). As proteínas totais foram determinadas com o mesmo tampão e sua quantificação determinada pelo método de Bradford (1976). Os valores referentes ao teor de proteínas totais foram expressos em mg proteína g⁻¹ MF.

2.5.1 Análise da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) em um meio de reação contendo: fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM, NBT 75 μM e riboflavina 2 μM (GIANNOPOLITIS; REIS 1977). Os tubos com o meio de reação e as amostras foram iluminados por 7 minutos com lâmpada fluorescente de 20 W. Como controle, o mesmo meio de reação, sem a amostra, foi iluminado nas mesmas condições, enquanto o branco foi mantido na ausência de luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm, onde uma unidade de SOD foi considerada a quantidade de enzima capaz de inibir em 50 % a fotorredução do NBT nas condições experimentais. A atividade da SOD foi expressa em U mg⁻¹ proteína.

2.5.2 Análise da atividade da enzima catalase (CAT)

Para determinação da atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi utilizada a metodologia descrita por Azevedo et al. (1998), com algumas modificações. Sua atividade foi monitorada, em espectrofotômetro, pela degradação do H₂O₂ a 240 nm

por 2 minutos, em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), 12,5 mM de H₂O₂ e 50 µL de extrato vegetal, incubado a 28°C. Como branco foi utilizado o mesmo meio de reação livre de extrato vegetal. A atividade da enzima CAT foi expressa em µmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.5.3 Análise da atividade da ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX (EC 1.11.1.1) foi determinada segundo Nakano; Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O meio de reação foi incubado a 28 °C, sendo composto de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM. O decréscimo na absorbância foi monitorado por 2 minutos, a partir do início da reação e a atividade da APX expressa em mmol ASA min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.5.4 Atividade da enzima glutaciona redutase (GR)

A atividade da GR (EC 1.6.4.2) foi determinada de acordo com Cakmak; Strbac; Marschiner (1993) pelo decréscimo da absorbância a 340 nm devido a oxidação do NADPH. A reação consistiu de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,8), 1 mM de glutaciona oxidada (GSSG), 75 µM de NADPH e a alíquota da enzima.

2.6 Análise de RT-qPCR

2.6.1 Extração de RNA total

Cada amostra vegetal (100 mg) macerada foi transferida para um microtubo de 1,5 mL livre de nucleases no qual foi imediatamente adicionado o tampão de extração PureLink® Kit (Invitrogen™). As amostras foram rapidamente homogeneizadas e mantidas em temperatura ambiente durante 5 minutos. Em seguida foram centrifugadas a 12.000g durante 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante, contendo o RNA total, foi transferido para um microtubo livre de nucleases. Foram adicionados 100 µL de uma solução de NaCl 5M ao extrato e a solução foi homogeneizada através de leves toques no fundo do tubo. Em seguida foram adicionados 300 µL de clorofórmio e a solução foi homogeneizada através da inversão

do tubo. As amostras foram então submetidas à centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C para separar as fases. Após a centrifugação, a fase aquosa superior foi transferida para um microtubo livre de nucleases. Foi adicionado à fase aquosa um volume igual de isopropanol e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. A solução foi centrifugada novamente a 4 °C por 10 minutos a 12.000 g descartando o sobrenadante, tomando cuidado para não perder o *pellet*, o qual foi adicionado 1 mL de etanol 75 %. Os microtubos foram colocados para centrifugar novamente a temperatura ambiente por 3 minutos a 12.000 g e o sobrenadante foi descartado. Foi realizada uma breve centrifugação nas mesmas condições para coletar o líquido residual, e este foi coletado com auxílio de uma micropipeta. As amostras foram secadas por 5 minutos em câmara de fluxo. O RNA total isolado foi dissolvido em 30 µL de água DEPC 0,01% autoclavada. As amostras já homogeneizadas foram guardadas a -70°C para análises posteriores.

2.6.2 Quantificação do RNA

A quantidade de RNA total foi mensurada em espectrofotômetro a 260 e 280 nm, cuja relação fornece uma estimativa da pureza do RNA. A integridade do ácido nucleico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %.

2.6.3 Síntese de cDNA

Primeiramente as amostras foram tratadas com DNase I, utilizando-se do Kit Amplification Grade DNase I (Sigma-Aldrich®) para a remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de RNA total tratado com a DNase I foram submetidas a RT-PCR (PCR de transcrição reversa) para síntese de DNA complementar. A síntese de cDNA fita simples, para cada amostra, foi feita a partir do RNA (1µg/µL), utilizando do *kit SuperScript FirstStrand System for RT-PCR* (Invitrogen).

2.6.4 Reação de RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas em equipamento Termociclador Bio-Rad CFX Real Time, utilizando o sistema de fluoróforo SYBR *Green* (Roche®). Foram

utilizados *primers* com *amplicons* específicos (com um único pico de dissociação das fitas dos produtos da PCR) e com eficiência de amplificação próxima a 100 % ($E \cong 1,8 - 2,2$). Os *primers* estão listados na Tabela 1. O volume total das reações foi de 12 μL , sendo 6,25 μL do fluoróforo, 0,25 μL (10 mM) de cada *primer* (senso e antisenso), 1 μL de cDNA (diluição 1:5, previamente definida) e 4,25 μL de água ultra pura. As condições de amplificação foram: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto com inserção da curva de *melting* de 65 a 95 °C, com incremento de 5 °C a cada medida de fluorescência. O gene do arroz *OsUBQ10* foi utilizado como controle interno quantitativo (gene de referência). A quantificação relativa da expressão diferencial foi feita utilizando o método de comparação de CT (*comparative threshold cycle method*) conforme descrito por Livak; Schmittgen (2001).

Tabela 1 - Lista de *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR. Temperatura de anelamento 61°C

Gene	Locus	Senso/Antisenso
<i>OsSOD4-Cu/Zn</i>	<i>OsSOD4-Cu/Zn</i> AK059841.1	5'GCACCAGAAGATGAAGTCCGT ³ 5'CGAATGCTCTCCCAACAACAG ³
<i>OsSOD3-Cu/Zn</i>	<i>Os07t0665200-01</i> AK243377.1	5'GGTGTGCTAATGTCAATGTCTC ³ 5'ATCATCAGGATCAGCATGGAC ⁵
<i>OsSOD2-Cu/Zn</i>	<i>Os03t0219200-01</i> AK073785.1	5'GCGACCTGGGAAACATAGTA ³ 5'GTCATCAGAATCAGCATGAACA ³
<i>OsSODCc1-Cu/Zn</i>	<i>Os03t0351500-01</i> AK061662.1	5'CTGATGATCTTGAAAGGGTGG ³ 5'GTGCTGGGAGATGGAAGGT ³
<i>OsSOD-Cu/Zn</i>	<i>Os04t0573200-01</i> AK120348.1	5'GCTCTATTGCGTTGTATGCCA ³ 5'GCTTGACTCCCAATGGTGAC ³
<i>OsSOD-Fe</i>	<i>Os06t0115400-01</i> AK111656.1	5'CAAGTCACAAACCCAGAGTCAT ³ 5'GGAATACAAGATGTCAGGCTCA ³
<i>OsCATA</i>	<i>Os02t0115700-01</i> AK065094.1	5'GTGAAGATTGCGAATAGGCTC ³ 5'TCTGGCCTTATTTGGTTGGT ³
<i>OsCATB</i>	<i>Os06t0727200-01</i> AK100019.1	5'GACAAGGAGAACAATTTCCAACAG ³ 5'AGTAGGAGATCCAGATGCCAC ³
<i>OsCATC</i>	<i>Os03t0131200-01</i> AK066378.1	5'GTGATTGCCAAGGAGAACAAC ³ 5'GAGTGCGTCGATCCATCTCT ³
<i>OsAPX1</i>	<i>Os03t0285700-01</i> AK061841.1	5'TCAGGACATTGTTGCCCTC ³ 5'GTCACCACTCAGAAGCTCC ³
<i>OsAPX2</i>	<i>Os07t0694700-01</i> AK061715.1	5'CTCTCCTACGCCGACTTCTAC ³ 5'AGGTGGTCAGAACCCTTGTG ³
<i>OsAPX3</i>	<i>Os04t0223300-00</i> AY382617.1	5'ATCCCAAGATTACCTATGCTGACC ³ 5'TGATAAGCCCATCCTGTAGAAGAC ⁵
<i>OsAPX4</i>	<i>Os08t0549100-01</i> AK070842.1	5'GGCACTTATGACGTGAACACA ³ 5'TGATCTTAGGGCTCTTGCTT ³
<i>OsAPX5</i>	<i>Os12t0178200-01</i> AK073910.1	5'GTGAAGAATGCCACCTGAG ³ 5'CCTGACAACGCAACAATTTCC ³
<i>OsAPX6</i>	<i>Os12t0178100-01</i> AK061107.1	5'GAAGCTGATCCAGCCCATCA ³ 5'CGGCTTCCTCAATGGCTGT ³
<i>OsAPX7</i>	<i>Os04t0434800-01</i> AK063934.1	5'ACGGATTGATGTCACAGGTC ³ 5'AAGTGATGTGCTCCAGACAG ³
<i>OsAPX8</i>	<i>Os02t0553200-01</i> AK100016.1	5'AAGGATGGGCATGTGAATGG ³ 5'TGAGCCATGACAACCTAGATAATGT ³
<i>OsGR1</i>	<i>Os03t0163300-01</i> AK103418	5'ATTGGTGGTTCTCACATGTTA ³ 5'ACCATTATTGCTCCGTTCTTGT ³
<i>OsGR2</i>	<i>Os02t0813500-01</i> AK100446	5'CACCTGTTGCACTGATGGAG ³ 5'GTTCACTCAAGCCCACTACTG ³
<i>OsGR3</i>	<i>Os10t0415300-01</i> AK108799	5'CCACAAGTCAGAAGTAGATACACC ³ 5'GTTGGATTTCTCTGGTACTGCTC ³
<i>UBQ10</i>	<i>Os02t0161900-01</i> AK101547	5'TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG ³ 5'GCACCACAAATACTTGACGAACAG ³

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do radical superóxido

Plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas ao estresse salino (136 mM de NaCl), apresentaram os níveis de superóxido aumentados em relação ao controle, conforme dados mostrados na Figura 1. As plantas cultivadas durante cinco dias em presença de NaCl mostraram valores de 0,321 significativamente superior ao controle com valor de 0,220. Para os demais dias não houve diferença entre as concentrações de NaCl. O conteúdo de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) foi influenciado pelo tempo de exposição ao estresse. Para as plantas sob estresse, o maior conteúdo de $O_2^{\cdot-}$ ocorreu no período de cinco dias (0,321) diferindo significativamente dos demais tempos de estresse (10 dias = 0,164, 15 dias = 0,120 e 20 dias = 0,124). Entretanto, para o controle, o maior conteúdo de $O_2^{\cdot-}$ ocorreu aos cinco e 10 dias (0,220 e 0,139) diferindo dos tempos finais de estresse (15 dias = 0,078 e 20 dias = 0,109).

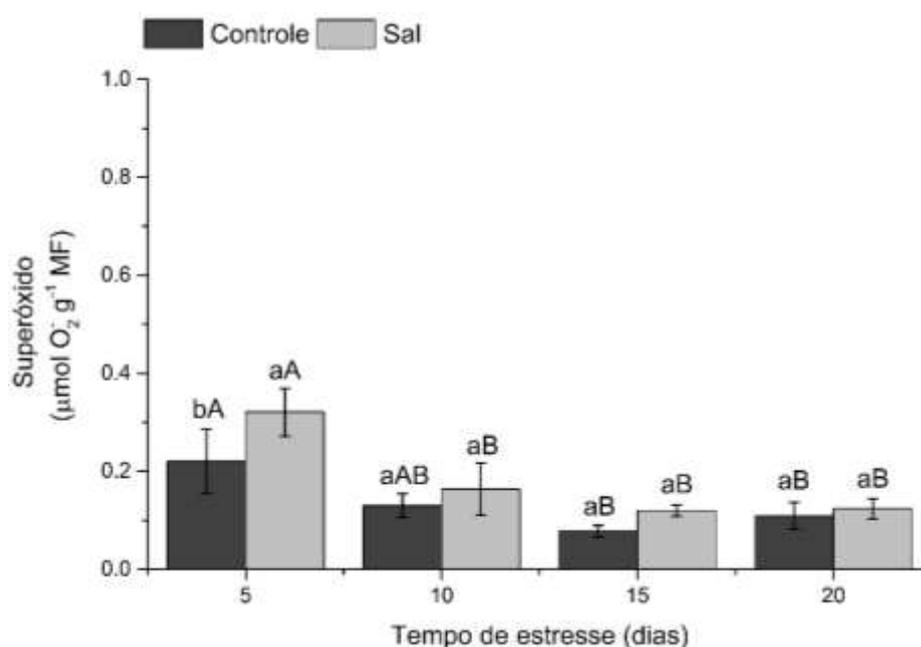


Figura 1 – Teor de superóxido em arroz, cultivar BRS AG, submetida ao estresse salino (136 mM). Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm desvio padrão ($n=3$). Letras maiúsculas indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre a concentração de NaCl e o controle em cada dia.

A aclimação da planta a condição de salinidade é frequentemente associada com aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como, radical

superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (HO^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto (1O_2), que podem vir a ser tóxico às células. As EROs são produzidas durante o metabolismo aeróbico da planta, porém, a produção aumenta durante condições de estresse através da interrupção do sistema de transporte de elétrons, e atividades metabólicas que ocorrem nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (AHMAD; BHARDWAJ; TUTEJA, 2012).

Durante condições normais as EROs são eficientemente eliminadas por um sistema antioxidante enzimático e não enzimático, enquanto que, durante o estresse salino, a produção excessiva de EROs pode causar um desequilíbrio no sistema de defesa (SOFO et al., 2015). No presente estudo, a concentração $O_2^{\cdot-}$ em plantas crescidas no meio salino, foi superior às plantas controle no quinto dia após a germinação. Este aumento pode estar estreitamente relacionado à baixa atividade da SOD neste dia. No entanto, verificou-se uma redução dos níveis de superóxido no decorrer do tempo de estresse. Ao mesmo tempo a atividade da SOD nos tempos de 10 e 15 dias é significativamente superior em plantas estressadas, cujo resultados serão detalhados mais adiante. Entende-se que, a atividade dessa enzima acompanhou os níveis de superóxido produzidos pelas plantas de arroz em condições desfavoráveis de crescimento, visto que, quando a sua atividade se encontra aumentada, os níveis de superóxido permaneceram reduzidos.

O radical superóxido é um radical livre, moderadamente reativo, com uma meia vida curta (2-4 μ s), porém, não consegue atravessar as membranas e deve ser imediatamente convertido a H_2O_2 . Caso não seja eliminado pode interagir com outras moléculas e formar radical hidroxila (HO^{\cdot}) extremamente nocivo a célula (SHARMA et al., 2012). O radical hidroxila tem um tempo de vida muito curto, porém, é muito reativo, podendo causar danos ao DNA (FERREIRA; ABREU, 2007). De acordo com os resultados desse estudo os níveis aumentados de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) no quinto dia após tratamento com salinidade não causou danos as estruturas celulares das plantas, visto que, não houve aumento dos níveis de MDA. Entende-se que a atividade da enzima SOD foi eficiente eliminando esta espécie reativa de oxigênio nas plantas estressadas, devido a redução dos níveis de superóxido ou baixa produção do mesmo ao longo do tempo de exposição ao estresse.

Mishra; Bhoomika; Dubey (2013), trabalhando com cultivares de arroz sensíveis (Malviya-36), constataram que na concentração de 140 mM de NaCl, folhas e raízes das plantas apresentaram aumento da concentração de superóxido com o

aumento do tempo de exposição (5-20 dias) ao estresse. Resultados contrários foram observados na cultivar BRS AG, onde a concentração de superóxido reduz ao longo do tempo de estresse. Entretanto o conteúdo de superóxido reduziu ao longo do tempo de estresse nas plantas tolerantes ao sal (CSR-27) avaliadas por estes autores, o que está de acordo com o resultado encontrado para cv. BRS AG neste trabalho. Desta forma, pode-se inferir que a cv. BRS AG, tolera concentrações altas de NaCl.

3.2 Determinação de peróxido de hidrogênio

Ao analisar a formação de peróxido de hidrogênio em plantas de arroz em condição de estresse salino, observou-se na Figura 2 maior conteúdo de H_2O_2 (0,304) em plantas tratadas com NaCl aos 20 dias. Do mesmo modo, comparando entre os dias de estresse, os maiores valores de conteúdo de H_2O_2 ocorreram aos 10 e 20 dias. Os maiores valores médios para essa espécie reativa de oxigênio no controle, ocorreu nas plantas com cinco e 10 dias de idade, apresentando valores de 0,534 e 0,559, respectivamente, sendo esses significativamente superior aos demais tempos.

As plantas que receberam o estresse salino (136 mM de NaCl) mostraram baixos valores de H_2O_2 , ficando este abaixo do controle aos cinco, 10 e 15 dias. Aos cinco dias com o conteúdo de superóxido aumentado e a baixa atividade da SOD nas plantas estressadas, explica o nível baixo de H_2O_2 neste dia. Uma vez que a SOD não estava realizando a dismutação do superóxido em H_2O_2 . Aos 15 e 20 dias o baixo conteúdo de H_2O_2 na concentração de 136 mM de NaCl, indica que a atividade aumentada para CAT e APX poderiam ser responsáveis por destoxificar o H_2O_2 produzido pela SOD. Há contrastantes dados na literatura no que refere-se a essa variável em condições de salinidade, onde o conteúdo de H_2O_2 foi aumentado (WANG et al., 2009) permaneceu inalterado e diminuiu (TURAN; TRIPATHY, 2013) sob estresse salino. Os dados do presente estudo estão de acordo com Turan; Tripathy (2013), que qual relataram diminuição no teor de H_2O_2 nessas condições.

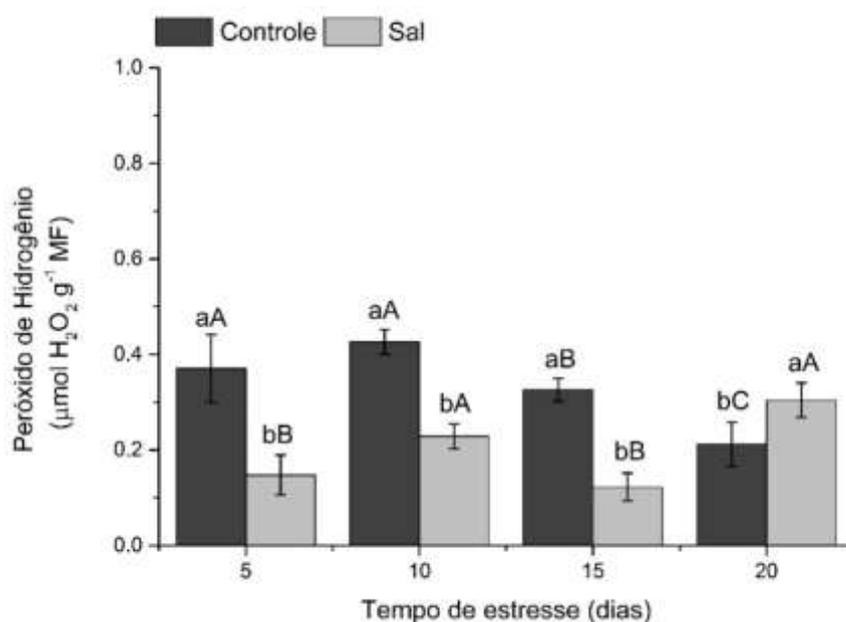


Figura 2 – Teor de peróxido de hidrogênio em arroz, cultivar BRS AG, submetida ao estresse salino (136 mM). Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm desvio padrão ($n=3$). Letras maiúsculas indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre a concentração de NaCl e o controle em cada dia.

No presente estudo os níveis de peróxido de hidrogênio apresentaram-se aumentados nas plantas crescidas durante o período de 20 dias em meio salino (136 mM de NaCl). Ao mesmo tempo, tal elevação a princípio não foi prejudicial às células, provavelmente não ocorreu a formação de radicais livres, como o radical hidroxila. Diferente dos resultados deste estudo, Das; Seal; Biswas (2016) trabalhando com arroz cv. MTU1010, sob estresse salino, relataram aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio e MDA nas plantas estressadas.

O peróxido de hidrogênio é moderadamente reativo e tem relativamente longa meia-vida (1ms). É sabido que o peróxido de hidrogênio, assim como outras EROs não são metabólitos unicamente tóxicos a célula, mas podem atuar como moléculas sinalizadoras, sendo benéficas em baixas concentrações e tóxicas quando em excesso (SHARMA et al., 2012). De certo modo, entende-se que os níveis encontrados para a cultivar BRS AG eram baixos não vindo a ocasionar danos.

Uma grande variedade de estímulos ambientais leva a um aumento temporário de H₂O₂, sendo este fenômeno visto como um sinal que transmite os estímulos iniciais para uma resposta final no metabolismo, o que pode justificar o aumento dessa ERO aos 20 dias de estresse. Devido a longa vida e alta permeabilidade através das membranas, o peróxido de hidrogênio está começando a ser aceito como um

mensageiro secundário em presença de EROs (GILL; TUTEJA, 2010), além de atuar como um regulador chave em uma ampla variedade de processos fisiológicos.

3.3 Determinação de peroxidação lipídica

Os resultados da peroxidação lipídica, em plantas de arroz cultivar BRS AG, determinados através do conteúdo de MDA são mostrados na Figura 3. Pode-se observar que os maiores níveis de MDA ocorreram no controle aos 5, 10 e 20 dias. Para os demais tempos não houve diferença dos níveis de MDA entre as concentrações de NaCl. Nas plantas cultivadas em meio salino, o maior nível de MDA ocorreu aos cinco dias (34) diferindo significativamente dos demais tempos de (10 dias = 5,51; 15 dias = 9,09 e 20 dias = 5,49). Para o controle os níveis de peroxidação lipídica apresentaram variações ao longo do tempo de estresse, sendo que, o menor valor de MDA foi observado no tempo de 15 dias (8,52).

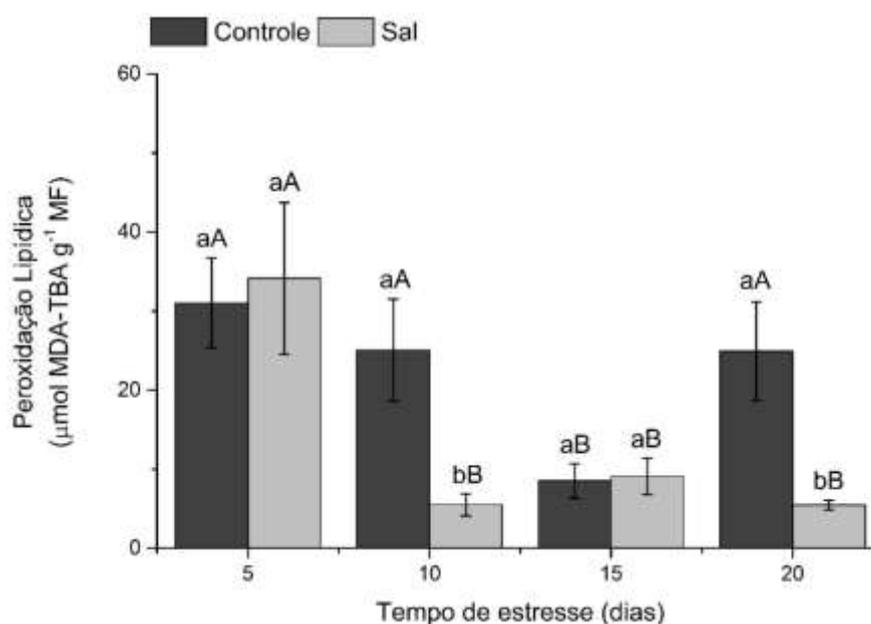


Figura 3 – Teor de peroxidação lipídica em arroz, cultivar BRS AG, submetida ao estresse salino (136 mM). Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm desvio padrão ($n=3$). Letras maiúsculas indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre a concentração de NaCl e o controle em cada dia.

A peroxidação lipídica ocorre quando os níveis de EROs encontram-se em excesso na célula, afetando o seu funcionamento normal, devido ao estresse oxidativo através da produção de radicais derivados de lipídios. Em membranas o processo

inicia pela retirada de um átomo de hidrogênio de uma cadeia poli-insaturada de um lipídio (ácido linolênico e linoleico são os mais suscetíveis). Esse processo ocorre por meio da ação de espécies reativas de oxigênio como H_2O_2 e superóxido, mais comumente pelo radical hidroxila $HO\cdot$, por ser uma molécula altamente reativa. Dessa primeira reação é formado o radical lipídico ($L\cdot$) e com adição de uma molécula de oxigênio tem-se a formação de um radical peróxido ($LOO\cdot$). Esse radical pode propagar-se ainda mais na reação em cadeia da peroxidação reagindo com outros lipídios adjacentes e formando lipídios hidroperóxidos ($LOOH$). O hidroperóxido de lipídio resultante pode facilmente decompor-se em espécies reativas como radicais alcóxido, aldeídos (malondialdeído), alcanos, álcoois, entre outros. Entre os efeitos da peroxidação lipídica, a redução da fluidez da membrana, facilitando a passagem de substâncias que antes atravessavam a membrana através de canais e ou transportadores. Os aldeídos formados podem formar conjugados com DNA e proteínas, causando prejuízos ainda maiores a planta (GILL; TUTEJA, 2010; FERREIRA, ABREU, 2007).

Segundo Hernandez et al. (2001) a evidência crescente de que existe uma lesão na membrana sob estresse salino está relacionada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio altamente tóxicos. A oxidação de ácidos graxos de membrana pelas espécies reativas de oxigênio pode resultar em produtos secundários que agravam os danos. Dentre eles o ácido malondialdeído (MDA) é o principal e mais estudado produto da peroxidação lipídica (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). No entanto, a cultivar BRS AG não apresentou os níveis de MDA aumentados, o que indica que as EROs não chegaram a causar danos celulares. Khan; Panda (2008) ao estudar a resposta de plantas de arroz em condições de estresse salino, evidenciaram um aumento da peroxidação lipídica para ambas as cultivares estudadas, mas o nível foi superior para a cultivar Begunbitchi (sensível) em relação a Lunishree (tolerante). Os autores apontam que o mecanismo de proteção foi mais eficiente sobre o estresse salino na cultivar Lunishree, conseqüentemente com menor nível de peroxidação lipídica. Foram observados aumento na peroxidação lipídica também em plantas de *Triticum aestivum* cultivadas sob estresse salino (MANDHANIA, MADAN, SAWHNEY, 2006).

3.4 Atividade das enzimas antioxidantes

3.4.1 Atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi influenciada pelo estresse salino em plantas de arroz, cultivar BRS AG, durante a fase inicial de seu desenvolvimento (Figura 4). Para essa enzima, foi observado aumento da sua atividade em plantas crescidas em condição de salinidade (136 mM de NaCl) durante o período de 10 e 15 dias de estresse, cujos valores médios, 24,85 e 21,18, da atividade da enzima foram significativamente superior, comparado às suas plantas controle, com valores de 11,52 e 9,50, respectivamente. Por outro lado, com cinco dias de estresse ocorreu redução na atividade de SOD nas plantas estressadas. Aos 20 dias a atividade também foi baixa, assemelhando-se ao controle. Observou-se o comportamento enzimático, ao longo do tempo de estresse, para o controle e a concentração salina, notando-se que para a concentração de 136 mM de NaCl não houve diferença significativa para a atividade de SOD. Porém, para as plantas controle percebeu-se maior atividade da enzima aos cinco dias, cujo valor foi 38,20, o qual não diferiu do tempo de 20 dias (36,46). Menor atividade da enzima em plantas controle ocorreu durante o período de 10 e 15 dias.

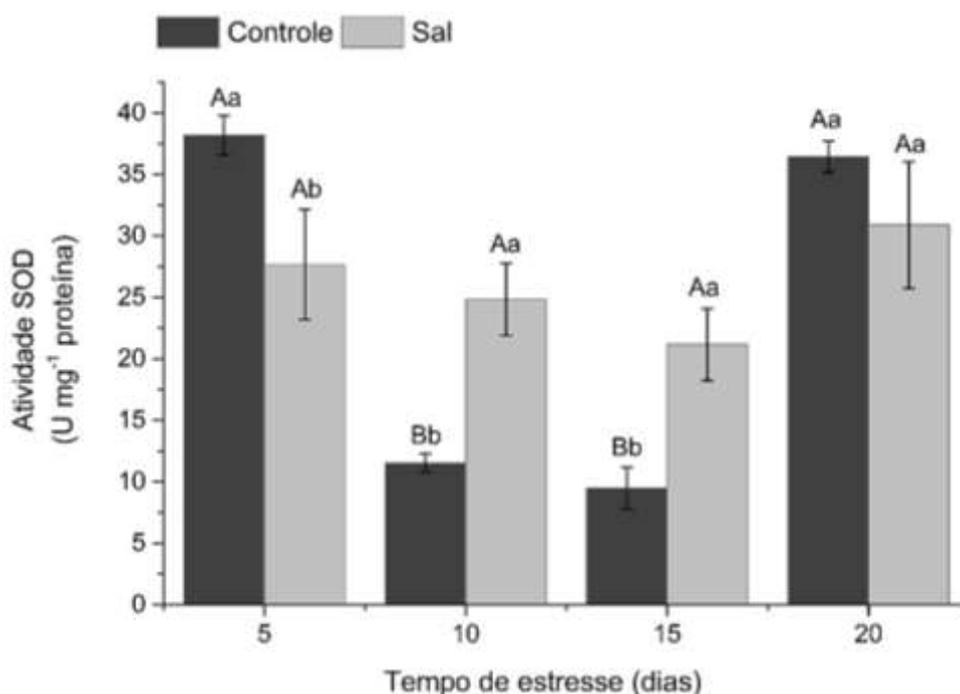


Figura 4 - Atividade da enzima superóxido dismutase em plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a condições de salinidade por diferentes tempos. Médias da atividade \pm desvio padrão ($n=3$), onde letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre o controle e sal em cada dia.

A enzima superóxido dismutase é a primeira linha de defesa contra EROs, realizando a dismutação do radical superóxido. A atividade da SOD é considerada de extrema importância na célula, visto que o radical superóxido é o primeiro intermediário formado pela adição de um elétron ao O₂. É uma metaloenzima, que atua em duas moléculas de superóxido, retirando um elétron extra desse radical e colocando-o em outro. Assim, forma-se uma molécula de oxigênio normal e outra molécula com um elétron extra, que irá reagir rapidamente com dois íons de hidrogênio para formar o peróxido de hidrogênio (GILL; TUTEJA, 2010).

Plantas de arroz tolerantes (CSR-1 e Pokkali) e sensíveis (MI-48, IR-28) e duas cultivares de *Triticum aestivum*, tolerante ao sal KRL-19 e sensível WH-542 submetidas às concentrações salinas de 50 e 100 mM, apresentaram atividade aumentada da enzima SOD somente nas plantas tolerantes ao sal. Esse comportamento foi observado em todos os tempos de estresse e com aumento da salinidade no meio. Com relação a cultivar BRS AG, a atividade da SOD foi superior no tempo de 10 e 15 dias nas plantas estressadas, conseqüentemente não apresentou comportamento similar as cultivares mencionadas anteriormente, nas quais a atividade da SOD aumentou em todos os tempos avaliados (CHAWLA; JAIN; JAIN, 2013; MANDHANIA, MADAN, SAWHNEY, 2006).

HU et al. (2012) em plantas de azevem cultivadas em 250 mM de NaCl, durante o período de 4, 8 e 12 dias, observaram que a atividade da SOD aumentou somente nas plantas que permaneceram durante quatro dias sob estresse salino. Semelhante aos resultados obtidos na cv. BRS AG no presente estudo. A partir desses resultados, fica claro a importância da atividade da SOD em plantas, de modo que falhas na sua atuação podem afetar o metabolismo das plantas devido ao estresse oxidativo.

3.4.2 Atividade da enzima Catalase (CAT)

Para a catalase (CAT) houve diferença significativa entre as concentrações de NaCl (0 e 136 mM) após cinco dias de exposição ao estresse. No quinto dia a CAT apresentou aumento da sua atividade para as plantas controle, apresentando valor médio de 0,31, comparado a 0,23 das plantas que receberam o estresse (Figura 5). Para os demais tempos a enzima apresentou maior atividade nas plantas crescidas em meio salino, porém, não diferindo das plantas controle. Em relação ao comportamento da atividade com o decorrer do tempo, observou-se que, as plantas

que receberam o estresse apresentaram aumento significativo da atividade da CAT com o aumento do tempo de exposição ao estresse, a partir do tempo de 15 dias, cujo valores foram 0,31 e 0,38 para os períodos de 15 e 20 dias de estresse, respectivamente. As plantas controle apresentaram maior atividade da CAT, aos 20 dias, o qual não diferiu do tempo de cinco dias. Já aos 15 e 10 dias a atividade reduziu para 0,28 e 0,17, respectivamente.

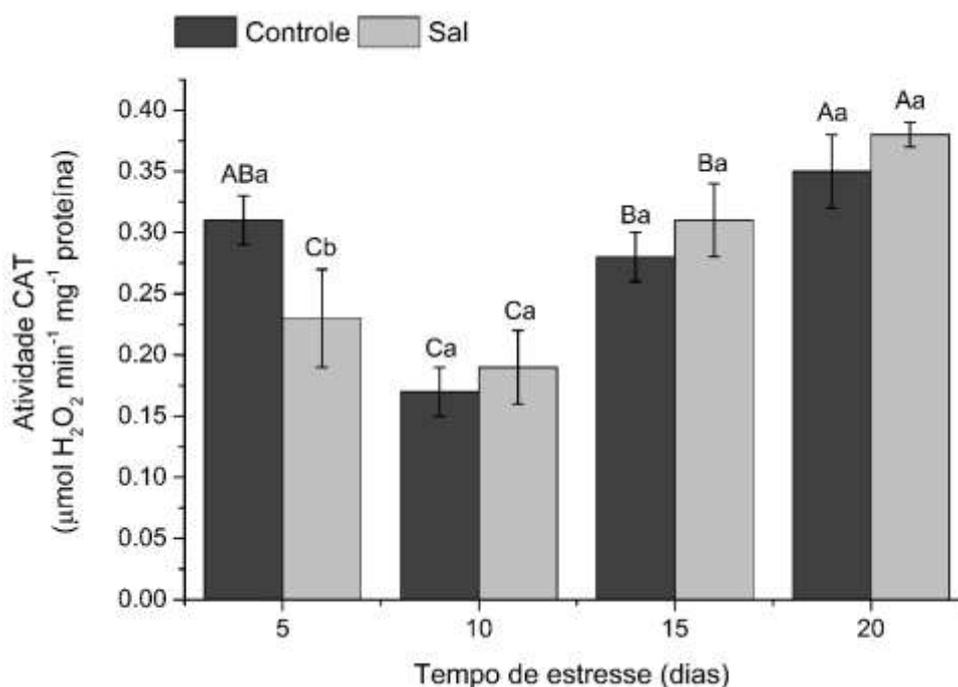


Figura 5 - Atividade da enzima catalase em plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a condições de salinidade por diferentes tempos. Médias da atividade \pm desvio padrão ($n=3$), onde letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre o controle e sal em cada dia.

3.4.3 Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase (APX)

Nas plantas de arroz tratadas com 136 mM de NaCl, a atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi superior somente no tempo de 10 dias de estresse, com um valor médio de 2,39 quando comparado ao valor 1,19 das plantas que não cresceram em meio salino, conforme pode-se observar na Figura 6. Aos 20 dias percebeu-se o contrário, maior atividade de APX nas plantas controle com 4,33 em relação à 2,63 de plantas que receberam o estresse salino. O aumento do tempo de estresse não teve

influência sobre a atividade da enzima APX em plantas de arroz. Já em relação ao controle, maior atividade ocorreu aos 20 dias, não diferindo estatisticamente dos valores encontrados no tempo de cinco e 15 dias. Há um decréscimo da atividade no tempo de 10 dias, porém não foi estatisticamente diferente ao observado para o tempo de cinco e 15 dias.

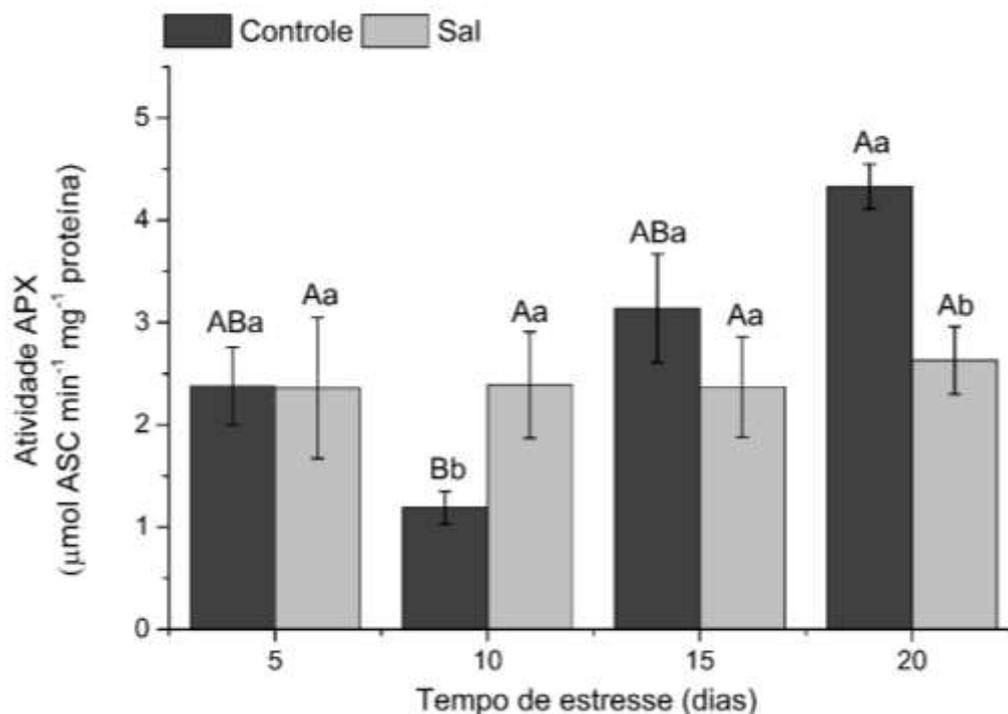


Figura 6 - Atividade da enzima ascorbato peroxidase em plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a condições de salinidade por diferentes tempos. Médias da atividade \pm desvio padrão ($n=3$), onde letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre o controle e sal em cada dia.

A catalase e o ciclo do ascorbato glutathiona são importantes na eliminação do H_2O_2 e, apesar de suas propriedades e requisitos serem diferentes, podem funcionar efetivamente em paralelo. Como a CAT opera sem agente redutor, ela fornece às plantas uma forma energeticamente eficiente para remoção do H_2O_2 (SHARMA et al., 2012). A atividade da CAT é efetiva, principalmente, em concentrações relativamente altas de H_2O_2 , por isso são consideradas indispensáveis para a desintoxicação de EROs, especialmente em condições de estresse severo (DUBEY, 2011). O ascorbato reduzido (ASA) é considerado o mais importante substrato para redução do H_2O_2 em água e oxigênio molecular na célula vegetal. Nos cloroplastos e mitocôndrias a APX atua no ciclo ascorbato-glutathiona, no qual, o H_2O_2 formado pela ação da SOD é reduzido pelo ascorbato (LOCATO et al., 2010). A APX utiliza duas moléculas de

ascorbato como doadoras de elétrons para reduzir uma molécula de H_2O_2 , possui alta afinidade pelo substrato, quando comparada a CAT, eliminando-o mesmo em baixas concentrações (GILL; TUTEJA, 2010).

No presente estudo a enzima catalase apresentou baixa atividade no quinto dia nas plantas que germinaram em meio salino. Tal comportamento pode ser explicado pela presença de concentrações baixas do substrato (H_2O_2) nesse dia, visto que, ao mesmo tempo, os níveis de radical superóxido encontravam-se elevados. Em contrapartida, a atividade da APX manteve-se estável ao longo do tempo, apresentando valores superiores nas plantas estressadas somente no tempo de 10 dias. Conseqüentemente, o aumento da atividade da catalase ao longo do tempo e a manutenção dos níveis de APX foram eficientes na proteção e manutenção do equilíbrio das EROs na célula. O aumento da concentração de peróxido de hidrogênio aos 20 dias nas plantas estressadas não foi elevado, de modo a causar danos à célula.

De acordo com Mishra; Broomika; Dubey (2013) a propriedade de tolerância ao sal em plantas de arroz deve-se a níveis elevados de antioxidantes não enzimáticos e a atividade das enzimas antioxidantes durante o estresse. Os resultados encontrados para a cultivar BRS AG estão de acordo com os que foram obtidos por esses autores e por Chawla; Jain; Jain, (2012). Eles relataram aumento da atividade da enzima catalase em plantas de arroz após submissão a estresse salino em concentrações de 50, 100 e 140 mM, com o aumento do tempo de exposição ao estresse.

Segundo Khan; Panda (2008) a queda da atividade enzimática da catalase em raízes de arroz promovem acumulação de H_2O_2 , e este presente na célula através da reação de Haber-Weiss pode formar radicais hidroxila. O radical hidroxila é conhecido por danificar as membranas biológicas e reagir com a maioria dos compostos presentes em sistemas biológicos, eles contribuem na peroxidação lipídica. A relação entre os níveis de H_2O_2 e a atividade da enzima catalase também foi observado por Chunthaburee et al. (2015) em genótipos de arroz. Plantas tolerantes com atividade elevada da catalase apresentavam níveis inferiores de H_2O_2 , quando foram cultivadas em 100 mM de NaCl.

Umnajkitikorn; Faiyue; Saengnil, (2013), estudando a cultivar Kum Doi Saket, de arroz pigmentado, sob condições de salinidade *in vitro*, obtiveram resultados semelhantes ao do presente estudo. Os autores observaram atividade da APX superior nas plantas estressadas, quando comparada aos seus respectivos controles,

apenas no quarto dia após adição de 150 mM de NaCl ao meio. Esses resultados estão de acordo aos encontrados no atual estudo onde a atividade de APX foi superior nas plantas tratadas com sal, comparado ao seu respectivo controle, apenas em um dos tempos de estresse (10 dias). Com relação a atividade da catalase resultados diferentes foram encontrados por esses autores, que verificaram redução da atividade da CAT durante a germinação das plantas em meio salino.

3.4.4 Atividade da enzima Glutaciona redutase (GR)

Conforme os resultados mostrados na Figura 7, foi observado que entre as plantas controle e as plantas que receberam o estresse salino, não houve diferença na atividade enzimática da glutaciona redutase. Nas plantas que germinaram em meio com a concentração de 136 mM de NaCl observou-se maior atividade de GR aos 10 dias (0,648), 15 (0,606) e 20 (0,532) dias, comparado com a baixa atividade aos cinco dias (0,220). O mesmo comportamento foi observado nas plantas controle.

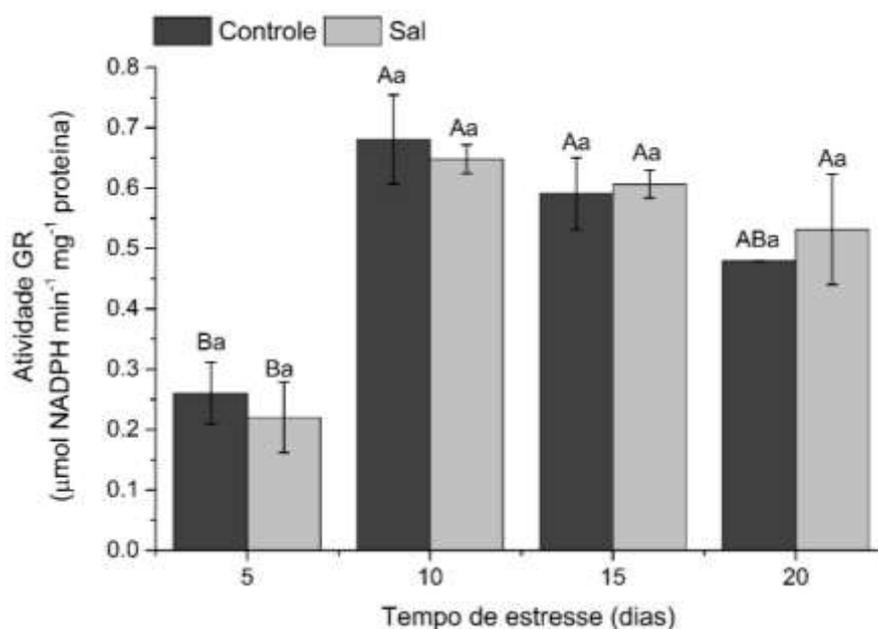


Figura 7 – Atividade da enzima glutaciona redutase em plantas de arroz, cultivar BRS AG, submetidas a condições de salinidade por diferentes tempos. Médias da atividade \pm desvio padrão ($n=3$), onde letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os dias de estresse para o mesmo tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre o controle e sal em cada dia.

A enzima glutaciona redutase (GR) é essencial na eliminação da EROs e na manutenção da glutaciona (GSH) reduzida através do ciclo ascorbato/glutaciona. Para a cultivar BRS AG, cultivadas em condições salinas, a atividade de GR não foi

significativa entre os tratamentos. Em plantas de arroz cv. CSR10 e Pusa Basmati1 (PB1), Turan; Tripathy (2013), verificaram que a atividade de GR aumentou em resposta ao estresse salino (200 mM) em ambas as cultivares. O aumento na atividade de GR em resposta ao estresse foi maior nas plantas sensíveis. Estes resultados não estão de acordo com os encontrados no presente estudo na cv. BRS AG.

3. Expressão de genes que codificam as isoformas das enzimas do sistema antioxidante

A partir de análise de variância foi possível verificar que os níveis de transcritos dos genes das enzimas CAT, SOD, APX e GR, em plantas de arroz submetidas a estresse salino (136 mM de NaCl), foram significativamente alterados em função dos tempos de estresse (Tabela 2).

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ à peróxido de hidrogênio. As SODs são classificadas de acordo com sua localização subcelular e seus cofatores (RACCHI et al., 2001). Com relação às isoformas da enzima SOD, em arroz são conhecidas oito, porém, no presente estudo foram avaliadas seis genes, pois foram testados mais de um par de *primers*, e não houve amplificação. Nas plantas de arroz germinadas em meio salino, os genes *OsSOD3-Cu/Zn*, *OsSOD2-Cu/Zn* e *OsSOD-Cu/Zn* apresentaram comportamento similar de expressão, conforme mostrado na Figura 8, sendo que os valores médios de expressão encontrados no tempo de cinco dias diferiram dos demais tempos de estresse, igualando-se apenas ao controle. Os valores de expressão em 10, 15 e 20 dias não diferiram entre eles. Os genes *OsSOD4-Cu/Zu* e *OsSODCc1-Cu/Zn* apresentaram aumento significativo de expressão aos 15 dias de estresse, havendo redução da expressão aos 20 dias. Para essa cultivar foi observado que somente o gene *OsSOD-Fe* apresentou maior valor de expressão nas plantas expostas durante o período de cinco dias em condição de salinidade (QR = 1,96) comparando aos outros dias.

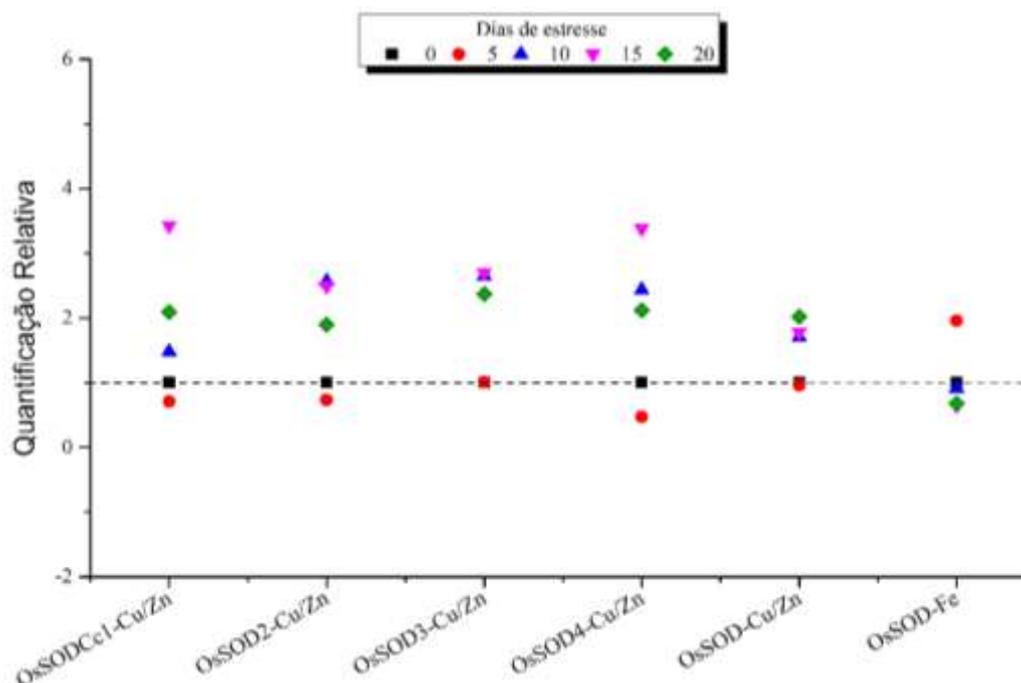


Figura 8 - Expressão de genes que codificam seis isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD) em plantas de arroz, BRS AG, cultivadas em condições de salinidade (136 mM de NaCl) por diferentes tempos.

A superóxido dismutase (SOD) desempenha papel central na defesa contra o estresse oxidativo em todos os organismos aeróbicos. Três isoenzimas de superóxido dismutase são conhecidas em plantas: SOD de cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), SOD de manganês (Mn-SOD), e SOD ferro (Fe-SOD) (FRIDOVICH, 1989).

As plantas de arroz, cultivar BRS AG, apresentaram valores médios de expressão dos genes *OsSOD3-Cu/Zn*, *OsSOD2-Cu/Zn* e *OsSOD-Cu/Zn* aumentados nos tempos 10, 15 e 20 dias e *OsSOD4-Cu/Zn* e *OsSODCc1-Cu/Zn* no tempo de 15 dias, sugerindo que a maior parte da atividade da SOD foi devido a estes genes. A baixa atividade enzimática da SOD no tempo de cinco dias nas plantas estressadas, deve-se, principalmente, a baixa expressão dos genes neste dia. Aos cinco dias valor de expressão superior ao controle foi observado somente para o gene *OsSOD-Fe*. A expressão dos genes Cu/Zn em todos os tempos de estresse, exceto aos cinco dias, indica que radicais superóxido estavam sendo produzidos em diferentes compartimentos celulares (cloroplastos, peroxissomos e citosol).

Similar aos nossos resultados, Mishra; Bhoomika; Dubey (2013) e Eyidogan; Oktem; Yiicel (2003) observaram que o aumento da atividade da SOD estava diretamente relacionado com o gene *Cu/Zn-SOD* nas cultivares Malviya (sensível) e

CSR-27 (tolerante) de arroz e em *Triticum aestivum* e *Triticum durum*, expostas a níveis de salinidade de 70 e 140 mM de NaCl e 70 mM, respectivamente.

Resultados contrários foram encontrados por Menezes-Benavente et al. (2004), que observaram que apenas o gene *sodCc2* era transcrito em plantas de arroz cultivadas *in vitro* após submissas em condição de salinidade (250 mM de NaCl). Em plantas cultivadas em casa de vegetação, ambos os genes *sodCc1* e *sodCc2* foram significativamente expressos. Morita et al. (2011) apontam que o estresse salino (100 mM de NaCl) não causou aumento da transcrição de *sodCc1* e *sodCc2* em plantas de arroz cultivar Nipponbare. Esses resultados diferem dos que foram encontrados para a cultivar BRS AG, onde todos os genes Cu/Zn dependentes foram expressas em algum dos tempos de estresse.

Para a maioria dos genes da enzima APX, na cultivar BRS AG, a expressão foi significativamente aumentada em plantas submetidas ao tratamento com NaCl, conforme mostrado na Tabela 2 e Figura 9. Dos oito genes avaliados, *OsAPX1*, *OsAPX2* e *OsAPX8* apresentaram expressão significativamente aumentada ($p \leq 0,05$) na presença de estresse salino nos tempos finais (15 e 20 dias), quando comparados aos seus respectivos tratamentos controle. *OsAPX3* e *OsAPX5* obtiveram maiores valores de expressão no tempo final de estresse (20 dias), quando comparados aos seus respectivos tratamentos controle e aos demais tempos de estresse. Em relação aos genes *OsAPX7* e *OsAPX4* observou-se aumento significativo na expressão no tempo de 10 e 15 dias de estresse, respectivamente, sendo que os valores de expressão para ambos os genes não diferiram entre os tempos 10, 15 e 20 dias. A expressão do gene *OsAPX6* manteve-se estável ao longo do tempo de estresse não apresentando diferença significativa. Entre os oito genes, *OsAPX1* apresentou valores de expressão superior em relação aos demais genes.

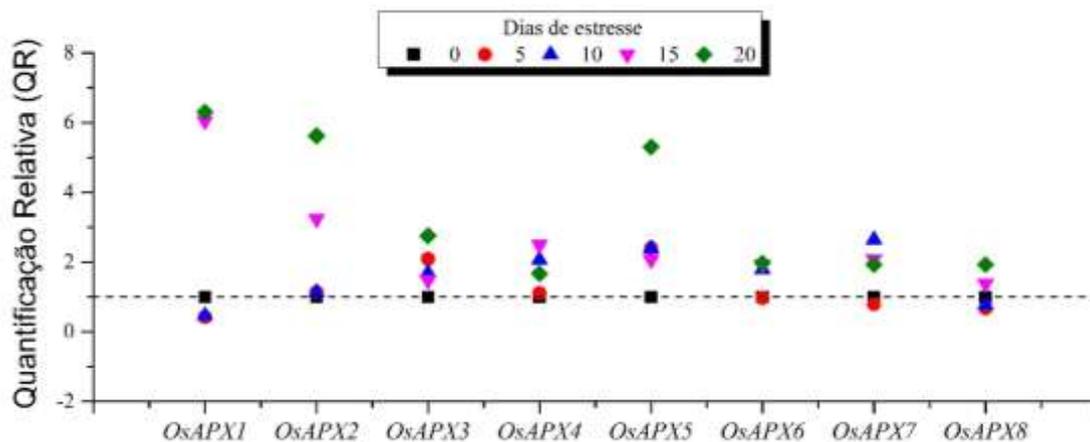


Figura 9 - Expressão de genes que codificam oito isoformas da enzima ascorbato peroxidase (APX) em plantas de arroz, BRS AG, cultivadas em condições de salinidade (136 mM de NaCl) por diferentes tempos.

O ciclo ascorbato/glutationa é uma importante via de defesa em plantas. Duas enzimas principais, APX e GR, utilizam ascorbato e glutatona como substratos respectivamente, participando de uma série de reações que resultam na desintoxicação de H_2O_2 . O arroz possui oito isoformas da ascorbato peroxidase localizadas em diversos compartimentos celulares (SILVEIRA et al., 2010). Analisando a cultivar BRS AG foi observado que, todos os genes da APX, com exceção da *OsAPX6*, apresentaram aumentos nos valores de expressão no decorrer do tempo de estresse. Tal comportamento explica que o aumento do nível de transcrito possa ter contribuído para a manutenção da atividade da enzima durante todo o período de estresse. O aumento na expressão do gene *OsAPX7* após 10 dias em resposta ao estresse salino, para a cultivar BRS AG, pode estar correlacionado com a atividade da enzima. *OsAPX7* presente nos cloroplastos, certamente contribuiu com a eliminação do H_2O_2 , uma vez que a catalase parece não atuar nessa organela, embora há alguns estudos apontando que sim (MHAMDI et al., 2010). No entanto, aos 20 dias de estresse o aumento significativo da expressão de *OsAPX1*, *OsAPX2*, *OsAPX8*, *OsAPX3* e *OsAPX5* não está relacionada com o aumento da atividade enzimática. Neste dia, maiores valores da atividade enzimática foram observados nas plantas que não receberam estresse. Isso pode ter ocorrido devido ao fato que esses aumentos de transcrito não estavam sendo traduzidos em proteína. Segundo Dale; Schantz (2002) o aumento da quantidade de mRNA presente não necessariamente correlaciona-se com a quantidade de proteína produzida.

Outro ponto a ser levado em consideração é que todas as APXs utilizam o ascorbato reduzido (AsA) como doador específico de elétrons para reduzir o H_2O_2 para H_2O e O_2 , logo, esse em baixa concentração pode inibir a atividade da APX. Além disso, a proteção realizada pela APX bem como a sua atividade, ocorre em conjunto com as enzimas GR, MDHAR e DHAR, que compõem a ciclo do ascorbato/glutathiona (SILVEIRA et al., 2010). Diante disso, nível elevado de AsA endógeno é essencial para a manter o sistema antioxidante, que é indispensável na proteção das plantas aos danos oxidativos. Em condições especiais, em que a concentração de ácido ascórbico é menor do que $20 \mu M$, a atividade APX é rapidamente perdida, sendo que, as que se encontram presentes em cloroplastos são menos estáveis. Logo, as APX do citosol e membrana, têm tempos de meia-inativação de cerca de uma hora ou mais, enquanto que para mitAPX e chlAPX menos do que 30 segundos (SHIGEOKA et al., 2002). O fato da atividade enzimática não corresponder de forma tão significativa com o aumento da expressão dos genes também pode ser explicado pela baixa disponibilidade do ascorbato reduzido, substrato necessário para atividade dessa enzima. De modo que o ascorbato também pode estar atuando diretamente sob as EROs.

Menezes-Benavente et al. (2004) avaliaram a expressão de genes do sistema antioxidantes em plantas de arroz expostas durante onze dias em estresse salino (250 mM de NaCl). Em plantas com até três dias de estresse constataram que a APX citosólica foi regulada positivamente. O mesmo ocorreu para este experimento, sendo que ambos os genes que codificam as isoformas citosólicas elevaram a expressão na presença do estresse, em destaque para *APX1*, que apresentou maiores valores de expressão, comparado aos demais genes.

Yamane et al. (2010) encontraram resultados, em partes, semelhantes aos do presente estudo. No que diz respeito as isoformas de APX, a indução foi observada para os genes *OsAPX1*, *OsAPX4*, *OsAPX6* e *OsAPx7*, enquanto que a expressão do gene *OsAPX2* citosólico não sofreu alterações pela salinidade e o nível de transcrição de *OsAPx8* foi ligeiramente diminuída pela salinidade na região basal de folhas de arroz em condição de estresse (200 mM de NaCl).

Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Teixeira et al. (2006) em plantas de arroz cultivar Taim, exceto, com relação ao comportamento observado para o gene *OsAPX8*. De modo similar, eles observaram que os genes *OsAPX2*, *OsAPx7* e *OsAPx8*, apresentaram níveis de transcrição alterados em

resposta a tratamento com NaCl. A expressão de *OsAPX2* e *OsAPx7* foi aumentada, enquanto que o acúmulo de transcritos de *OsAPx8* foi fortemente reprimida em plantas submetidas a estresse salino.

Guan, Xia, Liu (2010) relataram que a expressão do gene *OsAPX4*, nas plantas de arroz cv. Nipponbare foi induzido por estresses abióticos, entre eles, o estresse salino (100 mM de NaCl). A cultivar BRS AG apresentou valor médio de expressão de *OsAPX4* superior nas plantas estressadas em todos os tempos, exceto, aos 5 dias de estresse.

A relação entre a expressão gênica e atividade enzimática foram observados por Hu et al. (2012) estudando dois genótipos de azevem (*Lolium perene*) um tolerante e outro sensível ao NaCl (250 mM). Constataram aumento da atividade enzimática de APX aos 4 dias bem como o aumento da expressão de *OsAPX1* e *OsAPX2*, sendo esse aumento significativo para a cultivar tolerante ao sal. Em nosso estudo, o aumento da expressão de *OsAPX1* e *OsAPX2* podem estar correlacionadas com a atividade enzimática aos 15 dias, porém, aos 20 dias o aumento da expressão não foi relacionado com o aumento da atividade enzimática nas plantas que germinaram no meio com 136 mM de NaCl.

Lee; Kim; Lee (2001), Hong et al. (2007) e Morita et al. (2011), não observaram aumento na transcrição dos genes *OsAPX1* e *OsAPX2*, após submissão das plantas de arroz ao estresse salino, o que, não está de acordo com os resultados observados, no presente estudo.

Em arroz a enzima catalase é constituída de uma pequena família representada codificada pelos genes *OsCATA*, *OsCATB* e *OsCATC*. Para a cultivar BRS AG, observou-se na Figura 10 e Tabela 2, que os genes *OsCATA* e *OsCATB* obtiveram maiores valores de expressão no tempo final de estresse salino (20 dias), os quais foram significativamente superior comparado ao tempo de cinco, 10 e 15 dias e às plantas controle. Em relação ao gene *OsCATC*, o mesmo apresentou valor superior ao controle nas plantas em estresse salino após 10 dias, o qual destacou-se com valor de QR=3,77. Comparando os valores médios de expressão entre os genes da catalase, verificou-se que *OsCATB* apresenta maior valor de expressão (QR=5,83) aos 20 dias.

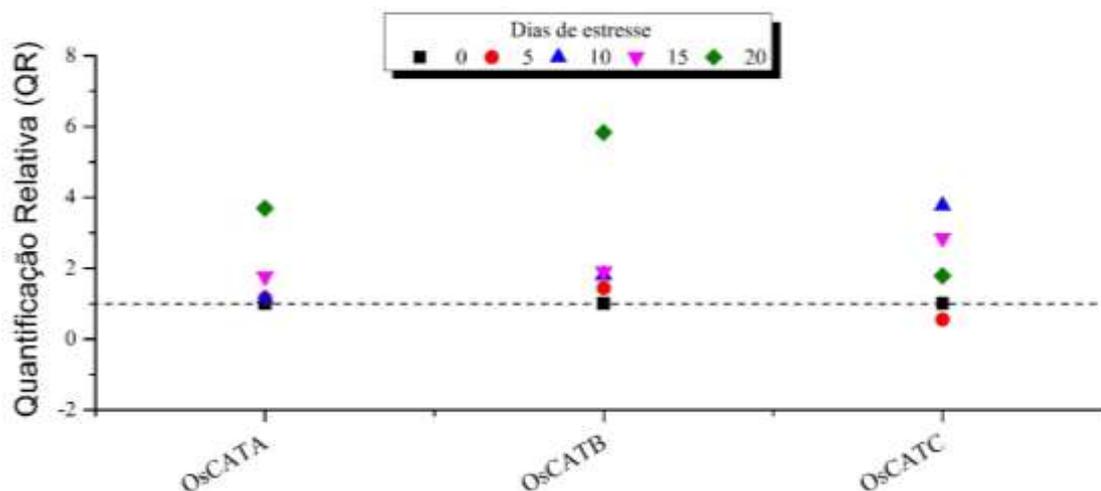


Figura 10 - Expressão de genes que codificam três isoformas da enzima catalase (CAT) em plantas de arroz, BRS AG, cultivadas em condições de salinidade (136 mM de NaCl) por diferentes tempos.

A partir dos resultados abordados nesse estudo notou-se que nenhum dos genes apresentou aumento da expressão no tempo de cinco dias com relação ao tratamento controle. Isso explica a baixa atividade da catalase aos cinco dias em plantas de arroz estressadas. O aumento da expressão nos demais tempos de estresse podem correlacionar-se com o aumento da atividade da enzima e com o aumento do tempo de estresse, embora esse aumento não diferencie das plantas controle. Os resultados deste estudo indicam que o aumento dos níveis de transcritos de *OsCATA*, *OsCATB* e *OsCATC* contribuíram para manter a atividade da enzima CAT, sendo *OsCATB* o mais responsivo ao estresse salino. Yamane et al. (2010) observaram que o aumento da atividade da enzima catalase em plantas de arroz cv. Nipponbare durante estresse salino (200 mM de NaCl), pode ser devido ao aumento na transcrição de *OsCATB* e *OsCATC*.

Em condição de salinidade semelhante ao nosso estudo, Kim et al. (2007) verificaram que as plantas de arroz tinham valores de expressão regulados positivamente para *OsCATB*, o qual, foi o que apresentou maior valor de expressão em nosso estudo com a cultivar BRS AG. Entretanto, diferentemente dos nossos resultados eles não observaram aumento de expressão para os genes *OsCATA* e *OsCATC* quando as plantas foram expostas a condições salinas. Para genótipos de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) tolerantes ao sal (SKUA-06 e SKUA-07) a atividade da catalase é correlacionada com a expressão dos genes (RASOOL et al., 2013).

Com relação a expressão gênica das isoformas da enzima glutathiona redutase (GR) para a cultivar BRS AG, observou-se que, o maior valor médio de expressão

ocorreu para *OsGR2* aos 10 dias de estresse com QR= 4,76. Para esse gene, o valor foi significativamente superior, quando comparado ao seu respectivo controle e aos demais tempos de exposição ao estresse (Tabela 2). O gene *OsGR1* apresentou aumento de expressão aos 10 e 15 dias, sendo esse superior aos valores encontrados em cinco e 20 dias de estresse. Para *OsGR3* as plantas crescidas aos 20 dias, em condição de salinidade apresentaram valores superiores de expressão em relação aos demais tempos. Os valores de expressão para *OsGR3* aos 15 dias não diferiram do controle e os valores dos tempos de cinco e 10 igualaram-se entre si (Tabela 2).

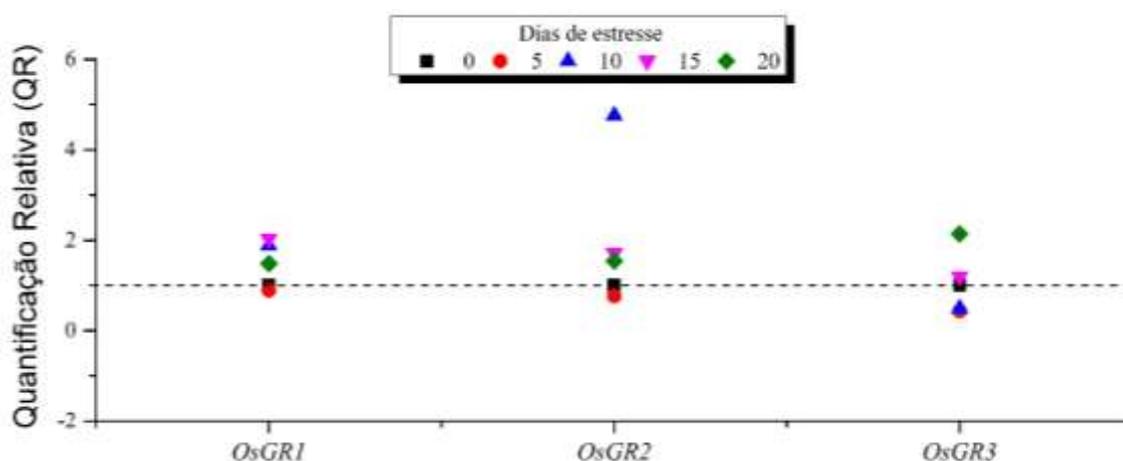


Figura 11 - Expressão de genes que codificam três isoformas da enzima glutathiona redutase (GR) em plantas de arroz, BRS AG, cultivadas em condições de salinidade (136 mM de NaCl) por diferentes tempos.

O comportamento de expressão apresentado pelos genes da glutathiona redutase assemelham-se aos resultados obtidos para a catalase, onde não observou-se aumento da expressão no tempo de cinco dias relacionando-se com a menor atividade enzimática. Com relação aos demais tempos, a atividade da enzima GR e os níveis de transcritos parecem estar relacionados. Em condições de estudo semelhante ao nosso, Kim et al. (2007), observaram aumento da expressão de dois genes *GR*, em plantas de arroz sob estresse salino (130 mM de NaCl), os quais, eram regulados positivamente em todos os tempos de estresse (3, 5 e 6 dias). Turan; Tripathy (2013), trabalhando com plantas de arroz sob estresse por sal relataram o aumento na expressão de *OsGR2*, tanto para o genótipo sensível quanto para o genótipo tolerante.

Tabela 2 - Quantificação relativa (QR) da expressão de genes que codificam as enzimas do sistema antioxidante (superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase e catalase) em arroz, cultivar BRS AG, submetida a estresse salino (136 mM de NaCl).

GENES	ZERO	5 DIAS	10 DIAS	15 DIAS	20 DIAS
<i>OsAPX1</i>	1,00 ^B	0,42 ± 0,10 ^B	0,46 ± 0,19 ^B	6,05 ± 0,46 ^A	6,31 ± 0,56 ^A
<i>OsAPX2</i>	1,00 ^C	1,14 ± 0,22 ^C	1,13 ± 0,31 ^C	3,24 ± 0,63 ^B	5,62 ± 0,21 ^A
<i>OsAPX3</i>	1,00 ^C	2,09 ± 0,17 ^{AB}	1,69 ± 0,42 ^{BC}	1,48 ± 0,33 ^{BC}	2,75 ± 0,44 ^A
<i>OsAPX4</i>	1,00 ^B	1,11 ± 0,42 ^B	2,07 ± 0,74 ^{AB}	2,49 ± 0,28 ^A	1,67 ± 0,17 ^{AB}
<i>OsAPX5</i>	1,00 ^C	2,40 ± 0,40 ^B	2,39 ± 0,35 ^B	2,07 ± 0,78 ^{BC}	5,30 ± 0,29 ^A
<i>OsAPX6</i>	1,00 ^A	0,97 ± 0,50 ^A	1,79 ± 0,08 ^A	1,93 ± 0,17 ^A	1,97 ± 0,88 ^A
<i>OsAPX7</i>	1,00 ^{BC}	0,79 ± 0,22 ^C	2,64 ± 0,16 ^A	2,08 ± 0,88 ^{AB}	1,93 ± 0,14 ^{AB}
<i>OsAPX8</i>	1,00 ^B	0,67 ± 0,18 ^B	0,77 ± 0,18 ^B	1,38 ± 0,41 ^{AB}	1,93 ± 0,61 ^A
<i>OsSOD4-Cu/Zn</i>	1,00 ^C	0,47 ± 0,04 ^D	2,44 ± 0,10 ^B	3,38 ± 0,37 ^A	2,12 ± 0,12 ^B
<i>OsSOD3-CU/Zn</i>	1,00 ^B	1,01 ± 0,16 ^B	2,65 ± 0,45 ^A	2,70 ± 0,44 ^A	2,37 ± 0,25 ^A
<i>OsSOD2-Cu/Zn</i>	1,00 ^B	0,73 ± 0,25 ^B	2,57 ± 0,49 ^A	2,49 ± 0,40 ^A	1,90 ± 0,30 ^A
<i>OsSODCc1-Cu/Zn</i>	1,00 ^D	0,71 ± 0,22 ^D	1,48 ± 0,04 ^C	3,43 ± 0,16 ^A	2,09 ± 0,06 ^B
<i>OsSOD-Cu/Zn</i>	1,00 ^B	0,96 ± 0,34 ^B	1,71 ± 0,41 ^A	1,78 ± 0,05 ^A	2,02 ± 0,22 ^A
<i>OsSOD-Fe</i>	1,00 ^B	1,96 ± 0,68 ^A	0,91 ± 0,11 ^B	0,65 ± 0,18 ^B	0,68 ± 0,17 ^B
<i>OsCATA</i>	1,00 ^C	1,15 ± 0,22 ^C	1,14 ± 0,11 ^C	1,76 ± 0,34 ^B	3,69 ± 0,27 ^A
<i>OsCATB</i>	1,00 ^B	1,44 ± 0,35 ^B	1,81 ± 0,54 ^B	1,90 ± 0,45 ^B	5,83 ± 0,52 ^A
<i>OsCATC</i>	1,00 ^D	0,55 ± 0,26 ^D	3,77 ± 0,18 ^A	2,85 ± 0,25 ^B	1,79 ± 0,39 ^C
<i>OsGR1</i>	1,00 ^C	0,89 ± 0,05 ^C	1,88 ± 0,36 ^{AB}	2,03 ± 0,15 ^A	1,48 ± 0,07 ^B
<i>OsGR2</i>	1,00 ^B	0,76 ± 0,25 ^B	4,76 ± 0,20 ^A	1,71 ± 0,55 ^B	1,54 ± 0,63 ^B
<i>OsGR3</i>	1,00 ^B	0,43 ± 0,05 ^C	0,49 ± 0,16 ^C	1,19 ± 0,12 ^B	2,14 ± 0,09 ^A

* Nível de significância $p \leq 0,05$, teste de Tukey, representado pela média \pm desvio padrão (n=3). Diferença estatística entre os tempos de estresse (5, 10, 15 e 20 dias) são indicados por letras maiúsculas.

4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que: (i) a manutenção na atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GR ao longo do tempo de estresse parece ser efetivas na proteção da cv. BRS AG contra o estresse oxidativo; (ii) a atividade da enzima SOD foi eficiente, reduzindo os níveis de superóxido nas plantas estressadas ao longo do tempo de exposição ao estresse; (iii) embora ocorria aumento de EROs, não há aumento nos níveis de MDA; (iv) sob estresse salino, os genes *OsSOD3-CU/Zn*, *OsSOD2-Cu/Zn*, *OsSOD-Cu/Zn*, *OsSOD4-Cu/Zn* e *OsSODCc1-Cu/Zn* apresentaram maiores níveis de transcritos nos tempos finais contribuindo para o

aumento da atividade da enzima superóxido dismutase; (v) o aumento na expressão do gene *OsAPX7* após 10 dias em resposta ao estresse salino, para a cv. BRS AG, pode estar correlacionado com a atividade da enzima ascorbato peroxidase neste dia; (vi) os genes *OsCATB* e *OsGR2* apresentaram maior valor de expressão em relação aos demais; (vii) o aumento na transcrição de todas as isoformas avaliadas, exceto *OsAPX6* que manteve-se estável, contribuíram para o aumento ou a manutenção da atividade das enzimas. Desta forma, pode-se inferir que a cv. BRS AG possui mecanismos de defesa contra o estresse salino, podendo ser considerada tolerante a esse estresse.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, avaliou-se pela primeira vez o comportamento da cultivar BRS AG, cultivada sob diferentes concentrações salinas. A partir dos resultados obtidos pode-se aferir que as plantas germinam até concentrações de 136 mM de NaCl e que nesta concentração as plantas apresentam o crescimento pouco afetado. Alterações metabólicas nas plantas de arroz cv, BRS AG submetidas ao tratamento com cloreto de sódio (NaCl) possivelmente contribuíram para a manutenção da integridade da membrana a níveis próximos daqueles encontrados nas plantas sem NaCl. Destaca-se neste contexto, o aumento da atividade das enzimas antioxidantes e o incremento nos teores de prolina. Nessas condições de estresse salino, em que as plantas foram submetidas, ocorreram fortes alterações na expressão dos genes avaliados, indicando uma diversificação funcional dos genes, indicando que essa cultivar tolera concentrações altas de NaCl. Entretanto, esses são resultados de estudo realizado *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ÁBRAHÁM, E.; RIGO, G.; SZE'KELY, G.; NAGY, R.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Light-Dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 363-372, 2003.
- AHMAD MOHAMMAD M.; MEKAWY, DEKOUM V.M.; ASSAHA, HIROYUKI YAHAGI, YUMA TADA, AKIHIRO UEDA, HIROFUMI SANEOKA. Growth, physiological adaptation, and gene expression analysis of two Egyptian rice cultivars under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 87, p. 17-25, 2015.
- AHMAD, P; BHARDWAJ, R; TUTEJA, N. Plant signaling under abiotic stress environment. In: Ahmad P, Prasad MNV (eds) Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change. **Springer, New York**, p. 297-323, 2012.
- AKBARI, G., S.; MOHAMMAD, A.; YOUSEFZADEH, S. Effect of auxin and salt stress (NaCl) on seed germination of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, n.15, p. 2557-2561, 2007.
- ALAMGIR, A. N. M.; ALI, M.Y. Effects of NaCl salinity on leaf characters and physiological growth attributes of different genotypes of rice (*oryza sativa* L.). **Bangladesh Journal of botany**, v. 35, n. 2, p. 99-107, 2006.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.
- AL-TARDEH, S.; IRAKI, N. Morphological and anatomical responses of two Palestinian tomato (*Solanum lycopersicon* L.) cultivars to salinity during seed germination and early growth stages. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 30, p. 4788-4797, 2013.
- AMIRJANI, M. R. Effect of NaCl on Some Physiological Parameters of Rice. **European Journal of Biological Sciences**, v.3, n.1, p. 06-16, 2010.
- ANAYA, F.; FGHIRE, R.; WAHBI, S.; LOUTFI, K. Influence of salicylic acid on seed germination of *Vicia faba* L. under salt stress. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 30, p. 30-30, 2015.
- ANBUMALARMATHI, J.; MEHTA, P. Effect of Salt Stress on Germination of *indica* rice varieties. **European Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 1, Janeiro, 2013.
- APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–99, 2004.

APSE, M. P.; BLUMWALD, E. Na⁺ transport in plants. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2247-2254, 2007.

ARMENGAUD, P.; THIERY, L.; BUHOT, N.; GRENIER-DE MARCH, G.; SAVOURÉ, A. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. **Plant Physiology**, v. 120, p. 442-450, 2004.

ASCI, O. Salt tolerance in red clover (*Trifolium pratense* L.) Seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 44, p. 8774-8781, 2011.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R.J.; LEA, P. J. Responses of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. **Plant Physiology**, v. 104, p. 280-292, 1998.

BAFEEL, S. O. Physiological parameters of salt tolerance during germination and seedling growth of *Sorghum bicolor* cultivars of the same subtropical origin. **Saudi journal of biological sciences**, v. 21, n. 4, p. 300-365, 2014.

BAGDI, D.L.; SHAW, B.P. Analysis of proline metabolic enzymes in *Oryza sativa* under NaCl stress. **Journal of environmental biology/Academy of Environmental**, v. 34, p. 677-681, 2013.

BALKAN, A.; GENÇTAN, T.; BILGIN, O.; ULUKAN, H. Response of rice (*Oryza sativa* L.) to salinity stress at germination and early seedling stages. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 52, n. 2, p. 455-461, 2015.

BANNISTER, J.V.; BANNISTER, W.H.; ROTILIO, G. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 22, p. 111-180, 1987.

BASHIR, K.; NAGASAKA, S.; ITAI, R.N.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H. Expression and enzyme activity of glutathione reductase is upregulated by Fe-deficiency in graminaceous plants. **Plant Molecular Biology**, v. 64, p. 277-84, 2007.

BATES, L.S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BENDERRADJI, L.; BRINI, F.; KELLOU, K.; YKHELF, N.; DJEKOUN, A.; MASMOUDI, K.; BOUZEROUR, H. Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and heat stress conditions. **International Scholarly Research Network**, v. 2012, p. 8, 2012.

BENITEZ, L. C., PETERS, J.A; BACARIN, M.A; KOPP, M.M; OLIVEIRA, A.C; MAGALHÃES JUNIOR, A.M; BRAGA, E.B. Tolerância à salinidade avaliada em genótipos de arroz cultivados in vitro. **Revista Ceres**, v. 57, n. 03, p. 330-337, 2010.

- BENITEZ, L.C. **Tolerância à salinidade avaliada em genótipos de arroz, cultivados ex vitro e in vitro.** Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de mestre em ciências. Pelotas, julho de 2008.
- BENITO, B.; HARO, R.; AMTAMANN, T. A. C.; DREYER, I. The twins K⁺ and Na⁺ in plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 723-731, 2014.
- BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. 3. ed. **New York: Springer**, 2013.
- BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Enfield: Science Publishers**, p.1-30, 2010.
- BLUMWALD, E.; AHARON, G. S.; APSE, M. P. Sodium transport in plant cells. **Biochimica e Biophysica Acta**, v.1465, p.140-151, 2000.
- BOWLER, C.; MONTAGU, M.V.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Reviews**, v. 43, p. 83-116, 1992.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRUNES, A. P.; FONSECA, D.A.R.; RUFINO, C.A.; TAVARES, L.C.; LILIAN, M.T.; M.; VILLELA, F.A. Seedling growth of white oats submitted to salt stress. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 3455-3462, 2013.
- CAKMAK, I.; STRBAC D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Jornaul of experimental botany**, v. 44, p.127-132. 1993.
- CARMONA, F.C; ANGHINONI, I; WEBER E.J. Salinidade da água e do solo e seus efeitos sobre o arroz irrigado no Rio Grande do Sul. IRGA Instituto Rio Grandense do Arroz Estação Experimental do Arroz divisão de pesquisa. Boletim Técnico nº 10 Cachoeirinha, 2011.
- CARNEIRO, N.P. Abordagens genômicas para tolerância a seca em cereais. In: SIMPÓSIO SOBRE TOLERÂNCIA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA EM PLANTAS: ADAPTANDO AS CULTURAS AO CLIMA DO FUTURO, 2010, Goiânia. Trabalhos apresentados, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2011. p. 89-99. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 265).
- CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, GOMES, J. A. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in saltstressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v. 163, p. 563-571, 2004.

- CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v.103, p. 551-560, 2009.
- CHAWLA, S.; JAIN, S.; JAIN, V. Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 27-34, 2013.
- CHICONATO, D. A. **Estresse salino em plantas jovens de cana-de-açúcar: respostas bioquímicas e fisiológicas**. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia, 2016.
- CHOUDHARY, N.L.; SAIRAM, R.K.; TYAGI, A. Expression of D1-pyrroline- 5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 42, p. 366-370, 2005.
- CHUNTHABUREE, S; DONGSANSUK, S; SANITCHON, J; PATTANAGUL, W; THEERAKULPISUT, P. Physiological and biochemical parameters for evaluation and clustering of rice cultivars differing in salt tolerance at seedling stage. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2015.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Brasília, v. 1 – Safra 2014/15, n. 3 - Terceiro Levantamento, Brasília, dez. 2014 Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 29 de mar 2016.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Monitoramento Agrícola - Cultivos de verão, v. 2, n. 4 - SAFRA 2015/16 - Quarto levantamento/ABRIL 2016. Acessado em: abril/2016.<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>.
- DALE, J.W; SCHANTZ, M.V. From Genes to genomes. Concepts and applications of DNA technology. ISBN: 0-47149782-7, p. 143-154, 2002.
- DALTON, F.N.; MAGGIO, A.; PICCINNI, G. Simulation of shoot chloride accumulation: separation of physical and biochemical processes governing plant salt tolerance. **Plant Soil**, v. 219, p. 1-11, 2000.
- DAS, P.; SEAL, P.; BISWAS, A.K. Regulation of Growth, Antioxidants and Sugar Metabolism in Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings by NaCl and Its Reversal by Silicon. **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, p. 623 - 638, 2016.
- DEL RIO, D., STEWART, A. J., PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, Amsterdam, v.15, p. 316-328, 2005.
- DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: **Science Publishers**, capítulo 9, p.178-203, 2011.

EL-SHAIENY, A.A.H. Seed germination percentage and early seedling establishment of five (*Vigna unguiculata* L. (Walp) genotypes under salt stress. **European Journal of Experimental Biology**, v. 5, p. 22-32, 2015.

EYIDOGAN, F; OKTEM, H.A; YIICEL, M. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. **Acta Physiologia e Plantarum**, v. 25, n. 3, p. 263-269, 2003.

FABRO, G.; KOVÁCS, I.; PAVET, V.; SZABADOS, L.; ALVAREZ, M.E. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 17, p. 343-350, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>, 2013. Acesso em 9 de janeiro de 2016.

FERREIRA, I. C. F. R; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e **Fitoquímicos Bioanálise**, v. 2, p. 32-39, 2007.

FILIPPOUA, P.; BOUCHAGIERB, P.; SKOTTIB, E.; FOTOPOULOS, V.; Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 1– 10, 2014.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v.119, p.355-364, 2003.

FRAGA, T. I. et al. Atributos de solução de arroz e solo irrigado como afetados pelos níveis de salinidade da camada de água. **Revista Brasileira Ciências do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1049-1057, 2010.

FRIDOVICH, I. "Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas," **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 14, p. 7761-7764, 1989.

GARG, N; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, v.143, p. 8-96, 2009.

GHANTI, S. K.K.; SUJATA, B.M. VIJAY KUMAR, N. NATARAJA KARBA, K.; JANARDHAN REDDY, M.; SRINATH RAO, P.B.; KAVI KISHOR. Heterologous expression of *P5CS* gene in chickpea enhances salt tolerance without affecting yield. **Biologia Plantarum**, v. 55, n. 4, p. 634-640, 2011.

GIANNOPOLITIS, C.N; REIS, S. K. Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedlings. **Plant Physiology**, v.59, p. 315-318, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidante machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GOMES-FILHO, E.; MACHADO LIMA, C.R.F.; COSTA, J.H.; SILVA, A.C.; GUIA SILVA LIMA, M.; LACERDA, C.F.; PRISCO, J.T. Cowpea ribonuclease: properties and effect of NaCl-salinity on its activation during seed germination and seedling establishment. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 147–157, 2008.

GUAN, G; XIA, D; LIU, S. OsAPX4 gene response to several environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 36, p. 5908-5913, 2010.

HADAS, A. Water uptake and germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solutions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 27, n. 98, p. 480-489, 1976.

HAMILTON, E.W.; HECKATHORN, S. A. Mitochondrial adaptations to NaCl, complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. **Plant Physiology**, v. 126, p.1266-1274, 2001.

HASAN, M. I.; KIBRIA, M. G.; JAHIRUDDIN, M.; MURATA, T.; HOQUE. M. A. A. Improvement of Salt Tolerance in Maize by Exogenous Application of Proline. **Journal of Environmental Science and Natural Resources**, v.8, n.1, p.13-18, 2015.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K.; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.

HATSCHBACH, C. **Efeito da salinidade na germinação de sementes de arroz híbrido Avaxi sob concentrações crescentes de NaCl**. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de engenheiro agrônomo. Santa Maria, RS, 2009.

HAYASHI, F.; ICHINO, T.; OSANAI, R.; WADA, K. Oscillation and Regulation of Proline Content by P5CS and ProDH Gene Expressions in the Light/Dark Cycles in *Arabidopsis thaliana* L. **Plant Cell Physiology**, v. 41, n. 10, p. 1096-1101, 2000.

HAYAT, S.; HAYAT,Q.; ALYEMENI, M.N.; WANI,A.S.; PICHTEL, J.; AHMAD, A. Role of proline under changing environments: a review. **Plant Signaling and Behavior**, v.7, p. 1456 –1466, 2012.

HEATH R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p.189-198, 1968.

HEIDARI, M. Nucleic Acid Metabolism, Proline Concentration and Antioxidants Enzyme Activity in Canola (*Brassica nupus* L.) Under Salinity Stress. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 4, p. 504-511, 2010.

HERNÁNDEZ, J. A., FERRER, M. A., JIMÉNEZ, A., BARCELÓ, A. R., SEVILLA, F. Antioxidant system and O₂/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves: its relation with salt-induced necrotic lesion in minor veins. **Plant Physiology**, v. 127, p. 817-831, 2001.

HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDANI, A.; JAOUA, L.; SAVOURÉ, A.; JAOUA, S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v. 169, p. 746-52, 2005.

HONG, C.Y.; HSU, Y.T.; TSAI, Y.C.; KAO, C.H. Expression of ASCORBATE PEROXIDASE 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl, **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 3273-3283, 2007.

HU, L.; LI, H.; PANG, H.; FU, J. Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) differing in salt tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v.169, p.146-156, 2012.

HUR, J.; JUNG, K. H.; LEE, C. H.; AN, G. Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. **Plant Science**, v. 167, p. 417-426, 2004.

IRGA - INTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ. Dados de safra 2014/15. Porto Alegre, 2015. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br/conteudo/4215/safras>. Produção por município. Acesso em 04 de abril de 2016.

ISLAM, M. M.; HOQUE, M. A.; OKUMA, E.; BANU, M. N. A.; SHIMOISHI, Y.; NAKAMURA, Y.; MURATA, Y. Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. **Journal of plant physiology**, v. 166, n. 15, p. 1587-97, 15, 2009.

JALEEL, C. A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; INÈS, J.; AL-JUBURI, H. J.; CHANG-XING, Z.; HONG-BO, S.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 427-436, 2009.

JOSEPH, E. A.; RADHAKRISHNAN, V.V.; MOHANAN, K.V. A Study on the Accumulation of Proline- An Osmoprotectant Amino Acid under Salt Stress in Some Native Rice Cultivars of North Kerala, India. **Universal Journal of Agricultural Research**, v. 3, n. 1, p. 15-22, 2015.

KAMINAKA, H.; MORITA, S.; NAKAJIMA, M.; MASUMURA, T.; TANAKA, K. Gene cloning and expression of cytosolic glutathione reductase in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Physiology**, v.39, p. 1269-1280, 1998.

KAVI KISHOR, P.B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R.N, et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, p. 424–438, 2005.

KAZEMI, K; ESKANDARI, H. Effects of salt stress on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa*) cultivars in Iran. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 77, p. 17789-17792, 2011.

KERE, G.M.; GUO, Q.; CHEN, J. Growth and physiological responses of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to sodium chloride stress under solid hydroponics. **Journal of Environmental and Agricultural Sciences**, v. 6, p. 47-57, 2010.

KHAN, M.H.; PANDA, S.K. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.30, n.1, p.81-89, 2008.

KHARE, T; KUMAR, V; KISHOR, P.B.K. Na⁺ and Cl⁻ ions show additive effects under NaCl stress on induction of oxidative stress and the responsive antioxidative defense in rice. **Original article**. DOI 10.1007/s00709-014-0749-2.

KIM, D; SHIBATO, J; AGRAWAL, J.K; FUJIHARA, S; IWAHASHI, H; KIM, D.H; SHIM, L.S.; AND RAKWAL, R. Gene Transcription in the Leaves of Rice Undergoing Salt-induced Morphological Changes (*Oryza sativa* L.). **Molecules and Cells**, v. 24, n. 1, p. 45-59, 2007.

KIYOSUE, T.; YOSHIBA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 8, p. 1323-1335, 1996.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados**, v. 24, n. 68, 2010.

LEE, D.H; KIM, Y.S; LEE, C.B. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.158, p. 737-745, 2001.

LI, C.; BAI, T.; MAA, F.; HANA, M. Hypoxia tolerance and adaptation of anaerobic respiration to hypoxia stress in two *Malus* species. **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 274–279, 2010.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbate-glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Enfield: Science Publishers**, p.45-64, 2010.

LODEYRO, A.F.; CARRILLO, N. Salt Stress in Higher Plants: Mechanisms of Toxicity and Defensive Responses Springer International Publishing Switzerland. B.N. Tripathi, M. Müller (eds.), Stress Responses in Plants, DOI 10.1007/978-3-319-13368-3-11, 2015.

MACHADO, A. DE A; CONCEIÇÃO, A.R. **Sistema de análise estatística para Windows. WinStat. Versão 2.0.** Pelotas: UFPel/NIA, 2002.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M; FAGUNDES, P; FRANCO, D. F, ANDRES, A; NUNES, C.D; PETRINI, J.A; MARTINS, J.F; SEVERO, A; MORAES, O. P; MOURA, F; STRECK, E. A; AGUIAR, G; FACCHINELLO, P. H; HUBER, M. P; KRÜGER, T. K. BRS AG: cultivar de arroz irrigado desenvolvida para produção de álcool de cereais e/ou alimentação animal. **Comunicado Técnico.** Embrapa Clima Temperado, 2012.

MAGALHÃES JÚNIOR, A.M; FAGUNDES, P. R. R; FRANCO, D; ANDRES, A; NUNES, C. D; PETRINI, J. A; MARTINS, J. F; MORAES, O. P; NETO, F. M. BRS AG: Cultivar de Arroz Irrigado Desenvolvida como Matéria-Prima para Produção de Álcool de Cereais e/ou Alimentação Animal. **Comunicado técnico.** Embrapa Clima Temperado, 2015.

MANDHANIA, S; MADAN, S; SAWHNEY, V. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 2, p. 227-231, 2006.

MASS, E.V. Salinity and citriculture. **Tree physiology**, Victoria, v.12, p. 195-216, 1993.

MEHLER, A.H. Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 33, p. 65-77, 1951.

MENEZES-BENAVENTE, L.; TEIXEIRA, F.K.; KAMEI C.L.A.; Margis-Pinheiro, M. Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, v. 166, p. 323–331, 2004.

MENG, L.B.; CHEN, Y.B.; LU, T.C.; WANG, Y.F.; QIAN, C.R.; YU, Y.; GE, X.L.; LI, X.H.; WANG, B.C. A systematic proteomic analysis of NaCl-stressed germinating maize seeds. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p.3431-3443, 2014.

MHAMDI, A; QUEVAL, G; CHAOUCH, S; VANDERAUWERA, S; VAN BREUSEGEM, F; NOCTOR, G. "Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models," **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197-4220, 2010.

MISHRA, P; BHOOMIKA, K; DUBEY, R.S. Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Protoplasma**, v. 250, p. 3–19, 2013.

MITTAL, S.; KUMARI, N.; SHARMA, V. Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: Photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 17-26, 2012.

MITTLER, R. oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

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

MORALES, S.G.; TREJO-TÉLLEZ, L.I.; MERINO, F.C.G.; CALDANA, C.; ESPINOSA-VICTORIA, D.; CABRERA, B.E.H. Growth, photosynthetic activity, and potassium and sodium concentration in rice plants under salt stress. **Acta Scientiarum Agronomy Maringá**, v. 34, n. 3, p. 317-324, 2012.

MORITA, S; NAKATANI, S; KOSHIB, T; MASUMURA, T; OGIHARA, Y; TANAKA, K. Differential Expression of Two Cytosolic Ascorbate Peroxidases and Two Superoxide Dismutase Genes in Response to Abiotic Stress in Rice. **Rice Science**, v. 18, n. 3, 2011.

MUNNS, R.; GILLIHAM, M. Salinity tolerance of crops – what is the cost? **New Phytologist**, Cambridge, v. 208, p. 668-673, 2015.

MUNNS, R.; TESTE, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 65-81, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.5, p.473-497, 1962.

NEVES, L.A.S.; SPAT, C. Concentração de clorofila e de prolina em genótipos de arroz submetidos à salinidade. **Revista unimontes científica**, v. 15, n. 1, 2013.

NILSEN, E.T.; ORCUTT, D.M. The Physiology of Plants under Stress – Abiotic factors. **New York, John Wiley and Sons, Inc**, 1996.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; CHAOUCH, S.; HAN, Y.; NEUKERMANS, J.; MARQUEZ-GARCIA, B.; QUEVAL, G.; FOYER, H. Glutathione in plants: an integrated overview, **Plant, cell and environment**, v. 35, p. 454-484, 2012.

OLIVEIRA, K.C.; ZANIN, V. A Bioeconomia e os Biocombustíveis no cenário. **Revista iPecege**, v. 2, p. 23-43, 2015.

ORSINI, F.; ALNAYEF, M.; BONA, S.; MAGGIO, A.; GIANQUINTO, G. Low stomatal density and reduced transpiration facilitate strawberry adaptation to salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 81, p. 1-10, 2012.

ORT, D.R.; BAKER, N.R. A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 193-198, 2002.

ORTEGA, S. C.O.; OCHOA-ALFARO, A.E.; REYES-AGÜERO, J.A.; AGUADO-SANTACRUZ, G.A.; JIMÉNEZ-BREMONT, J.F. Salt stress increases the expression of P5CS gene and induces proline accumulation in cactus pear. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p.82-92, 2008.

OTHMAN, Y.; AL-KARAKI, G.; AL-TAWAHA, A.R.; AL-HORANIA. Variation in germination and ion uptake in barley genotypes under salinity conditions. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 11–15, 2006.

OZGUR, R.; UZILDAYA, B.; SEKMENA, A. H.; TURKANA, I. Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. **Functional Plant Biology**, 2013.

OZHAN, N.; HAJIBABAEI, M. Studies on Effectiveness of Plant Phytohormones in Reduction of Salinity Effects on Germination of Some Cultivar of Spring Wheat. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 2, n. 2, p. 2860-2866, 2014.

PARIHAR, P.; SINGH, S.; SINGH, R.; SINGH, V.P.; PRASAD, S.M. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4056-4075, 2014.

PARRE, E.; GHARS, M.A.; LEPRINCE, A.-S.; THIERY, L.; LEFEBVRE, D.; BORDENAVE, M.; LUC, R.; MAZARS, C.; ABDELLELY, C.; SAVOURÉ, A. Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 144, p. 503-512, 2007.

PITANN, B.; KRANZ, T.; MÜHLING, K.H. The apoplastic pH and its significance in adaptation to salinity in corn (*Zea mays* L.): comparison of fluorescence microscopy and pH-sensitive microelectrodes. **Plant Science**, v. 176, p. 497-504, 2009.

PITMAN, M.G.; LAUCHLI, A. Global Impact of Salinity and Agricultural Ecosystems. In: Lauchli, A. and Luttge, V., Eds., **Salinity: Environment-Plants Molecules**, p. 3-20, 2002.

PIWOWARCZYK, B.; TOKARZ, K.; KAMIN'SKA, I. Responses of grass pea seedlings to salinity stress in in vitro culture conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)** Cult DOI 10.1007/s11240-015-0887, 2015.

PONS, R.; CORNEJO, M.J.; SANZ, A. Differential salinity-induced variations in the activity of H⁺-pumps and Na⁺/H⁺ antiporters that are involved in cytoplasm ion homeostasis as a function of genotype and tolerance level in rice cell lines. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 1399-1409, 2011.

POTTERS, G; HOREMANS, N; JANSEN, M.S.K. The cellular redox state in plant stress biology – a charging concept. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p. 292-300, 2010.

PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEY, H.R.; DIAS, N.S da; LACERDA, C.F. de. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza-CE, INCSal, 472 p. 2010.

RACCHI, M.L.; BAGNOLI, F.; BALLA, I.; DANTI, S. "Differential activity of catalase and superoxide dismutase in seedlings and in vitro micropropagated oak (*Quercus robur* L.)," **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 2, p. 169-174, 2001.

RAJAKUMAR, R. A study on effect of salt stress in the seed germination and biochemical parameters of rice (*Oryza sativa* L.) under *in vitro* condition. **Asian Journal of Plant Science and Research**, India, v. 3, n. 6, p. 20-25, 2013.

RASOOL, S; AHMAD, A; SIDDIQI, T.O; Ahmad, P. Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress. **Acta Physiology Plant**, India, v. 35, p.1039-1050, 2013.

REJEB, K.B.; ABDELLEY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 1-7, 2014.

RENGASAMY, P. Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. **Functional Plant Biology**, v. 37, p. 613-620, 2010.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

RIBARITS, A.; ABDULLAEV, A.; TASHPULATOV, A.; RICHTER, A.; HEBERLE-BORS, E.; TOURAEV, A. Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development. **Planta**, v. 225, p. 1313-24, 2007.

ROY, S.J.; NEGRÃO, S.; TESTER, M. Salt resistant crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 115-124, 2014.

SANOUBAR, R.; CELLINI, A.; VERONI, A.M.; SPINELLI, F.; MASIA, A.; ANTISARI, L.V.; ORSINI, F.; GIANQUINTO, G. Salinity thresholds and genotypic variability of cabbage (*Brassica oleracea* L.) grown under saline stress. **Society of Chemical Industry**, v. 96, p. 319-330, 2015.

SARKER, A.; HOSSAIN, M.D.I.; ABUL KASHEM, M.D. Salinity (NaCl) tolerance of four vegetable crops during germination and early seedling growth. **International journal of latest research in science and technology**, v. 3, p. 91-95, 2014.

SAVOURÉ, A.; JAOUA, S.; HUA, X.J.; ARDILES, W.; VAN, MONTAGU M.; VERBRUGGEN, N. Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. **Federation of European Biochemical Societies letters**, v. 372, p. 13-19, 1995.

SENGAR, K.; SENGAR, R.S.; SINGH, A. Biotechnological and Genomic Analysis for Salinity Tolerance in Sugarcane. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research**, v. 4, n. 5, p. 407-414, 2013.

- SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 8, p. 854–64, 2005.
- SHIGEOKA S, ISHIKAWA T, TAMOI M, MIYAGAWA Y, TAKEDA T, YABUTA Y. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany: Oxford Journals**, v. 53, 2002.
- SIDDIQUE, A. B.; ARA, I.; ISLAM, S. M. S.; TUTEJA, N. Effect of air desiccation and salt stress factors on in vitro regeneration of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant signaling & behavior**, v. 9, n. 12, 2014.
- SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: **INCTsal, Simpósio Brasileiro de Salinidade**. (Org). Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados, p.161-180, 2010.
- SINGH, M.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V.P.; PRASAD, S.M. Roles of osmoprotectants in improving salinity and droughttolerance in plants: a review. **Rev Environ Sci Biotechnol**, 2015.
- SMIRNOFF, N. Ascorbic acid metabolism and functions of a multifacet molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 229-235, 2000.
- SOARES, M. M.; JUNIOR, H. C. S.; SIMÕES, M. G.; PAZZIN, D.; SILVA, L. J. da. Estresse hídrico e salino em sementes de soja classificadas em diferentes tamanhos. **Pesquisa Agropecuária Tropical Goiânia**, v. 45, n. 4, p. 370-378, out/dez. 2015.
- SOFO, A; SCOPA, A; NUZZACI, M; VITTI, A. Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, 2015.
- SOLIMAN. W.S.; EL-SHAHENY. A. A. H. Effect of saline water on germination and early growth stage of five *Apiaceae* species. **African Journal of Agricultural**, v. 9, n.7, p. 713-719, 2014.
- SOSBAI. **Arroz Irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil**. / 30 Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado, 06 a 08 de agosto de 2014, Bento Gonçalves, RS. Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Santa Maria/RS, p.192, 2014.
- SRIPINYOWANICHA, S.; KLOMSAKULA, P.; BOONBURAPONGB, B.; BANGYEEKHUNA, T.; ASAMIC, T.; GUD, H.; BUABOCHAA, B.T.; CHADCHAWAN, S. Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of OsP5CS1 and OsP5CR gene expression during salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 86, p. 94-105, 2013.
- SZABADOS, L.; SAVOURE, S. PROLINE: a multifunctional amino acid. Review. **Trends in Plant Science**, v.15, n. 2, 2010.

SZALAI, G.; JANDA, T. Effect of salt stress on the salicylic acid synthesis in young maize (*Zea mays* L.) plants. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 195, p. 165-171, 2009.

SZE'KELY, G. ET AL. Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. **Plant Journal**, v.53, p. 11-28, 2008.

TAVAKKOLI, E.; FATEHI, F.; COVENTRY, S.; RENGASAMY, P.; MCDONALD, G.K. Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 6, p. 2189-2203, 2011.

TEIXEIRA, F. K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; GALVÃO, V. C.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. **Planta**, v. 224, p. 300-314, 2006.

TEIXEIRA, F.K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. **Journal of Molecular Evolution**, v.59, p.761–770, 2004.

THIAM, M.; CHAMPION, A.; DIOUF, D.; OURÈYE SY, M. NaCl Effects on *In Vitro* Germination and Growth of Some Senegalese Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Cultivars. **Research Article ISRN Biotechnology**, p.11, 2013.

THIERY, L.; LEPRINCE, A.-S.; LEFEBVRE, D.; GHARS, M.A.; DEBARBIEUX, E.; SAVOURÉ, A. Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in Arabidopsis thaliana. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 14812-14818, 2004.

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

TURAN, S.; TRIPATHY, B. C. Salt and genotype impact on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in two rice cultivars during de-etiolation. **Protoplasma**, v. 250, p. 209-222, 2013.

UMNAJKITIKORN, K.; FAIYUE, B.; SAENGNIL, K. Enhancing Antioxidant Properties of Germinated Thai rice (*Oryza sativa* L.) cv. Kum Doi Saket with Salinity. **Rice Research: Open Access**.v 1, Issue 1 1000103, 2013.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Science**, v.151, p. 59-66, 2000.

- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, p. 753 - 759, 2008.
- VIBHUTI, V.; SHAHI, C.; BARGALI, K.; BARGALI, S.S. Seed germination and seedling growth parameters of rice (*Oryza sativa*) varieties as affected by salt and water stress. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.85, n. 1, p. 102-8, 2015.
- WANG, Y.; WISNIEWSKI, M.; MEILAN, R.; CUI, M.; WEBB, R.; FUCHIGAMI, L. "Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress," **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 130, n. 2, p. 167-173, 2005.
- WANG, W. B.; KIM, Y. H.; LEE, H. S.; KIM, K. Y.; DENG, X. P. KWAK, S. S.; Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. **Plant Physiol Biochem**, v. 47, p. 570–577, 2009.
- WANI, S. H.; SANGHERA, G. S.; GOSAL, S.S. An efficient and reproducible method for regeneration of whole plants from mature seeds of a high yielding Indica Rice (*Oryza sativa* L.) variety PAU 2011. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 418-422, Jul. 2011.
- WANKHADE, S.D.; CORNEJO, M.J.; MATEU-ANDRE. I.; SANZ, A. Morpho-physiological variations in response to NaCl stress during vegetative and reproductive development of rice. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 323–333, 2013.
- YACOUBI, R.; JOB, C.; BELGHAZI, M.; CHAIBI, W.; JOB, D. Proteomic analysis of the enhancement of seed vigour in osmoprimed alfalfa seeds germinated under salinity stress. **Seed Science Research**, v. 23, p. 99-110, 2013.
- YAMANE, K.; MITSUYA, S.; TANIGUCHI, M.; MIYAKE, H. Transcription Profiles of Genes Encoding Catalase and Ascorbate Peroxidase in the Rice Leaf Tissues under Salinity. **Plant Production Science**, V.13, p.164-168, 2010.
- YANCY, P.H.; CLARK, M.E.; HAND, S.C.; BOWLUS, R.D.; SOMERO. G.N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v. 217, p. 1214–1223, 1982.
- YOSHIBA Y.; KIYOSUE, T.; KATAGIRI, T.; UEDA, H.; MIZOGUCHI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HARADA, Y.; SHINOZAKI, K. Correlation between the induction of a gene for D1- pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. **Plant Journal**, v. 7, p. 751-776, 1995.
- ZHANG, X.; TANG, W.; LIU, J.; LIU, Y. Co-expression of rice OsP5CS1 and OsP5CS2 genes in transgenic tobacco resulted in elevated proline biosynthesis and enhanced abiotic stress tolerance. **Chinese Journal of Applied & Environmental Biology**, p. 717–22, 2014.

ZHAO, M.G.; CHEN, L.; ZHANG, L.L.; ZHANG, W.H. Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 151, p. 755-767, 2009.

ZHU, J.K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 441-445, 2003.