

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



Tese

**ESTRESSES ABIÓTICOS EM ARROZ: RESPOSTAS MOLECULARES,
BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS**

ISABEL LOPES VIGHI

PELOTAS, 2016

ISABEL LOPES VIGHI

**ESTRESSES ABIÓTICOS EM ARROZ: RESPOSTAS MOLECULARES,
BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS**

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

Orientador: Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Co-orientador: Dr^a. Letícia Carvalho Benitez

Dr. Luciano da Silva Pinto

Dr. Sidnei Deuner

Pelotas, 2016

Banca Examinadora:

Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga (Orientadora)

Dr^a. Camila Pegoraro

Dr. César Valmor Rombaldi

Dr. Luciano Carlos da Maia

“... QUE A GENTE SAIBA **FLORIR**, ONDE A VIDA NOS PLANTAR”.

ROSI COELHO

Agradecimentos

A Deus por mostrar que enquanto existe luta e vontade de vencer também existem grandes vitórias.

À Minha família, em especial ao meu grande amor, Michelângelo e minhas filhas, Luiza e Manuela, pelo apoio incondicional, por sempre me incentivarem, mesmo nos momentos mais difíceis. Sem vocês eu nunca teria conseguido. Muito obrigada!

Agradeço à Professora Dr^a Eugenia Jacira Bolacel Braga pela amizade e orientação, por sempre estar disposta a me ajudar e pelos ensinamentos. E principalmente pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho.

Aos meus co-orientadores, Dr^a Letícia Carvalho Benitez, Dr. Sidnei Deuner e Dr. Luciano da Silva Pinto, pelos ensinamentos, dedicação, conselhos e conversas. Por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Ao grupo Oryza, Gabriela Peres Moraes, Gabriela Rodrigues, Letícia Carvalho Benitez, Marcelo Nogueira do Amaral e Priscila Arianne Auler, pela grande amizade, ensinamento, ajuda e apoio que me deram ao longo do doutorado.

Ao Professor Dr. Luciano Carlos da Maia, pela amizade, pelas conversas no almoço, ensinamentos e por sempre estar disposto a ajudar o nosso grupo de trabalho.

Agradeço, em especial, à amiga Letícia Carvalho Benitez, pela atenção, ensinamentos e paciência e cujo auxílio foi imprescindível para a realização deste trabalho.

À Cristina Weiser Ritterbusch e Natália Dias Gomes, amigas queridas que ficarão pra sempre no meu coração.

Ao pessoal do LCTP, obrigada pela agradável convivência diária, bate papos, risadas. Adorei fazer parte desta equipe!

A todos os colegas da Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pelos estudos, companheirismo e amizade.

À agência CAPES pela bolsa concedida.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao PPG em Fisiologia Vegetal.

Resumo

VIGHI, Isabel Lopes. **Estresses abióticos em arroz: respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas**. 111F. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo, sendo o Brasil o 9º maior produtor. No entanto sua produção é severamente influenciada por condições ambientais adversas, dentre as quais se destaca a salinidade e baixas temperaturas. O objetivo deste estudo foi avaliar respostas, bioquímicas e moleculares desencadeadas pela salinidade e por baixas temperaturas em plantas de arroz, com respostas contrastantes. Para atingir este objetivo foram realizados três estudos: No primeiro, foram quantificados os teores do ânion Superóxido ($O_2^{\cdot-}$), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Peroxidação lipídica (MDA), atividade enzimática e expressão gênica diferencial das isoformas das enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Ascorbato peroxidase APX e Glutathione reduzida (GR) em genótipos com tolerância contrastante ao sal. Para o genótipo sensível (BRS Pampa), ocorreu aumento na atividade enzimática da SOD, CAT, APX e diminuição nos níveis de MDA. No genótipo tolerante (BRS Bojuru), também foi observado aumento da atividade das enzimas SOD e CAT, porém diminuição nos níveis de MDA. A regulação positiva das diferentes isoformas da SOD, CAT e APX demonstrou a sua contribuição para o aumento na atividade da enzima. No segundo estudo, foram quantificados os teores de H_2O_2 , MDA, atividade enzimática e expressão gênica da CAT, bem como análise do promotor e *cis* elementos, nos mesmos dois genótipos contrastantes frente ao estresse por salinidade e baixa temperatura. O genótipo BRS Pampa (sensível) foi o que mostrou maior proteção contra danos oxidativos frente ao estresse por frio, bem como aumento na atividade da CAT e do número de transcritos das isoformas *OSCAT A* e *OSCAT B*. No terceiro estudo, avaliou-se o metabolismo da prolina em plantas de arroz, através do padrão de expressão dos genes envolvidos na biossíntese e catabolismo desse aminoácido e verificou-se a correlação com o conteúdo de prolina produzido em condições de estresse por salinidade e baixa temperatura. O conteúdo de prolina foi maior no genótipo BRS Bojuru (tolerante) frente às duas condições de estresse testadas. Sob estresse salino, os níveis de transcritos dos genes de biossíntese estão mais correlacionados com o conteúdo de prolina no genótipo tolerante, enquanto que em condições de baixa temperatura a correlação é maior no genótipo sensível. Os resultados obtidos permitem concluir que, sob estresse salino e por baixa temperatura, as plantas de arroz apresentam respostas diferenciais a nível bioquímico e molecular, sendo estas respostas dependentes do tempo, intensidade do estresse e composição genética dos genótipos.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L; Salinidade; Frio; Baixa temperatura; Enzimas antioxidantes; EROs; Expressão diferencial; Prolina

Abstract

VIGHI, Isabel Lopes. **Estresses abióticos em arroz: respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas**. 111F. Thesis (doctoral) - Graduate Program in Plant Physiology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2016.

Rice (*Oryza sativa* L.) is the second most cultivated cereal in the world, and Brazil is the 9th largest producer. However production is severely affected by adverse environmental conditions, among which the main ones are the salinity and low temperatures. The aim of this study was to evaluate responses, biochemical and molecular triggered by salinity and low temperatures in rice plants with contrasting response. To achieve this goal there were three studies: In the first one, the anion content superoxide ($O_2^{\cdot-}$) were quantified, hydrogen peroxide (H_2O_2), lipid peroxidation (MDA), enzyme activity and differential gene expression of isoforms of the enzyme superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase APX and reduced glutathione (GR) in genotypes with contrasting tolerance to salt. For the sensitive genotype (BRS Pampa), there was an increase in the enzymatic activity of SOD, CAT, APX and a decrease in MDA levels. In tolerant genotype (BRS Bojuru) was also observed an increased activity of enzymes SOD and CAT, but a decrease in MDA levels. The upregulation of the different isoforms of SOD, CAT and APX has demonstrated its contribution to the increase in the enzyme activity. In the second study, H_2O_2 levels were quantified, MDA, enzyme activity and gene expression of CAT, and promoter analysis and *cis*-elements, the same two contrasting genotypes against salinity stress and low temperature. The BRS Pampa genotype (sensitive) was the one that showed greater protection against oxidative damage compared to the stress by cold, as well as an increase in CAT activity and the number of transcripts *OSCAT A* and *OSCAT B* isoforms. In the third study evaluated the metabolism of proline in rice plants through the expression pattern of genes involved in biosynthesis and catabolism of amino-acid and was found to correlate with the proline content produced under stress by salinity and low temperature. The proline content was higher in BRS Bojuru genotype (tolerant) against the two tested stress conditions. Under salt stress, the biosynthesis gene transcript levels are more correlated with the proline content in tolerant genotype, whereas in low temperature conditions the correlation is highest in sensitive genotype. The results showed that under salt stress and low temperature, the rice plants have differential responses to biochemical and molecular level, which are dependent responses of time, stress intensity and genetic makeup of the genotypes.

Keywords: *Oryza sativa* L; Salinity; Cold; Low temperature; Antioxidant enzymes; Eros; Differential expression; Proline

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1	Modelo esquemático mostrando o mecanismo geral de resposta biomolecular das plantas ao estresse (Adaptado de Bray et al., 2000).....	15
Figura 2	Esquema representativo do sistema antioxidante e sua atuação na detoxificação de espécies reativas de oxigênio [Adaptado de Trivedi et al., 2013]. Abreviações: SOD – superóxido dismutase; APX – ascorbato peroxidase; MDHAR – monodehidroascorbato redutase; DHAR – dehidroascorbato redutase; GR – glutathione redutase; MDHA – monodehidroascorbato; DHA – dehidroascorbato; GSH - glutathione reduzida; GSSG – glutathione oxidada; O_2^- - superóxido; H_2O_2 – peróxido de hidrogênio.....	16

CAPÍTULO 1

Figura 1	Teor de superóxido (A), peróxido de hidrogênio(B) e peroxidação lipídica (C) em folhas de arroz (BRS Bojuru e BRS Pampa), após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes horas. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os genótipos dentre de cada tempo de estresse.....	29
Figura 2	Atividade das enzimas SOD (A), CAT (B), APX (C) e GR (D), em folhas de arroz (BRS Bojuru e BRS Pampa), após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes dias. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e	

	letras minúsculas iguais não diferem os genótipos dentre de cada tempo de estresse.....	30
Figura 3	Expressão dos genes codificadores das oito isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas de arroz, após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes tempos. BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B).....	32
Figura 4	Expressão dos genes codificadores das três isoformas da catalase (CAT) em folhas de arroz, após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes tempos. BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B)	33
Figura 5	Expressão dos genes codificadores das oito isoformas da enzima ascorbato peroxidase (APX) em folhas de arroz, após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes tempos. BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B).....	34
Figura 6	Expressão dos genes codificadores das três isoformas da glutathione redutase (GR) em folhas de arroz, após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes tempos. BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B)	35
Figura 7	Componentes principais em folhas de arroz, após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes tempos. BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B)	37

CAPÍTULO 2

Figura 1	Teor de peróxido de hidrogênio em dois genótipos de arroz (BRS Bojuru e BRS Pampa) submetidos a condições de salinidade (150 mM de NaCl) (A) e baixa temperatura (13°C) (B) em diferentes tempos de estresse. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os genótipos dentre de cada tempo de estresse.....	53
Figura 2	Teor da peroxidação lipídica (MDA) em dois genótipos de arroz	

	(BRS Bojuru e BRS Pampa) submetidos a condições de salinidade (150 mM de NaCl) (A) e baixa temperatura (13°C) (B) em diferentes tempos de estresse. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os genótipos dentre de cada tempo de estresse	54
Figura 3	Atividade da enzima Catalase em dois genótipos de arroz (BRS Bojuru e BRS Pampa) submetido a condições de salinidade (150 mM de NaCl) (A) e baixa temperatura (13°C) (B) em diferentes tempos de estresse. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os genótipos dentro de cada tempo de estresse	56
Figura 4	Expressão dos genes codificadores das três isoformas da catalase (CAT) em dois genótipos de arroz, BRS Bojuru (A e C) e BRS Pampa (B e D), submetido a condições de salinidade (150 mM de NaCl) (A e B) e baixa temperatura (13°C) (C e D) em diferentes tempos de estresse.....	58
Figura 5	Diagrama de Venn ilustrando a distribuição de <i>cis</i> -elementos na região promotora (1200 pb) dos genes <i>OsCATA</i> , <i>OsCATB</i> e <i>OsCATC</i> para o genótipo BRS Bojuru (A) e para o genótipo BRS Pampa (B)	59
Figura 6	Diagrama de Venn ilustrando a distribuição de <i>cis</i> -elementos na região promotora (1200 pb) dos genes <i>OsCATA</i> (A), <i>OsCATB</i> (B) e <i>OsCATC</i> (C) para o genótipo BRS Bojuru e para o genótipo BRS Pampa.....	60

CAPÍTULO 3

Figura 1	Concentração de prolina livre em dois genótipos de arroz em condições de salinidade (150 mM de NaCl) e baixa temperatura
----------	--

	(13°C). Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os genótipos dentre de cada tempo de estresse	73
Figura 2	Quantificação Relativa (QR) da expressão de genes codificadores da biossíntese (<i>P5CS1</i> e <i>P5CR</i>) e catabolismo (<i>P5CDH</i> e <i>PDH</i>) de prolina e quantificação do conteúdo de prolina livre nos genótipos de arroz BRS Bojuru (A e B) e BRS Pampa (C e D) em condições de salinidade (150 mM de NaCl)	74
Figura 3	Quantificação Relativa (QR) da expressão de genes codificadores da biossíntese (<i>P5CS1</i> e <i>P5CR</i>) e catabolismo (<i>P5CDH</i> e <i>PDH</i>) de prolina e quantificação do conteúdo de prolina livre nos genótipos de arroz BRS Bojuru (A e B) e BRS Pampa (C e D) em condições de baixa temperatura (13°C).....	75
Figura 4	Esquema do metabolismo de prolina com os respectivos valores de expressão relativa dos genes envolvidos e conteúdo de prolina em plantas de arroz dos genótipos BRS Bojuru (A e C) e BRS Pampa (B e D) em condições de salinidade e baixa temperatura	77
Figura 5	Correlação de Pearson entre o conteúdo de prolina livre e a expressão de genes codificadores do metabolismo de prolina nos genótipos de arroz BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B) em condições de salinidade (150 mM de NaCl).....	79
Figura 6	Correlação de Pearson entre o conteúdo de prolina livre e expressão de genes codificadores do metabolismo de prolina nos genótipos de arroz BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B) em condições de baixa temperatura (13°C)	80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados para RT-qPCR. Temperatura de anelamento 61°C.....	26
Tabela 2	Variância (autovalores) de cada componente principal e sua importância em relação à variância total de 29 variáveis avaliadas em dois genótipos de arroz submetidos à salinidade	36

CAPÍTULO 2

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados para RT-qPCR. Temperatura de anelamento 61°C	50
----------	--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Sequência dos <i>primers</i> da biossíntese e catabolismo de prolina utilizados para análise de expressão gênica através de RT-qPCR. Temperatura de anelamento 60°C	71
----------	---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1 RESPOSTA FISIOLÓGICA E MOLECULAR DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES E SUAS ISOFORMAS INDUZIDAS POR ESTRESSE SALINO EM ARROZ	
1 INTRODUÇÃO	19
2 MATERIAL E MÉTODOS	21
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4 CONCLUSÕES	43
CAPÍTULO 2 EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ENZIMA CATALASE EM ARROZ SOB CONDIÇÕES DE SALINIDADE E BAIXA TEMPERATURA	
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4 CONCLUSÕES	65
CAPÍTULO 3 METABOLISMO DE PROLINA: REGULAÇÃO EM CONDIÇÕES DE SALINIDADE E BAIXA TEMPERATURA	
1 INTRODUÇÃO	66
2 MATERIAL E MÉTODOS	68
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4 CONCLUSÕES	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS	103

INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20 % da energia e 15 % da proteína *per capita* necessária ao homem, e, sendo uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima, é considerado a espécie que apresenta maior potencial para o combate a fome no mundo (Embrapa, 2005).

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz destaca-se pela produção e área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social. Atualmente, aproximadamente, 165 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente em todo mundo, chegando a uma produção de cerca de 720 milhões de toneladas com adaptação a diferentes condições de solo e clima. O Brasil figura entre os dez principais produtores mundiais desse cereal, com mais de dois milhões de hectares de arroz cultivados e mais de 11 milhões de toneladas ao ano (CONAB, 2016).

O estado do Rio Grande do Sul, maior produtor nacional, é responsável por 78,2 % da área total cultivada para a safra de arroz 2015/2016, o equivalente a 846,47 mil hectares de área plantada, com uma estimativa de produção, para esta região, de 8,1 milhões de toneladas (IRGA, 2016).

A produtividade é o objetivo principal dos programas de melhoramento de plantas, entretanto, caracteres como qualidade industrial e tolerância/resistência a estresses bióticos e abióticos são fundamentais para o ganho genético na espécie. Dentre os fatores abióticos, os estresses por frio e por salinidade constituem alguns dos principais problemas para a cultura do arroz irrigado no Sul do Brasil (XIONG et al., 2002; ZHU et al., 2007).

O estresse salino, causado principalmente pelo acúmulo de NaCl, é um dos principais estresses abióticos que limita o crescimento e produtividade das culturas, tanto em regiões irrigadas como em regiões de terras secas (HUSSAIN et al., 2010). Mais de 800 milhões de hectares de terra em todo o mundo são afetadas pela salinidade, o que corresponde a um valor de mais de 6 % da área total de terras (RENGASAMY, 2002; FAO, 2008).

Altas concentrações de NaCl no solo e na água de irrigação, podem ser um fator limitante para o cultivo na região da Planície costeira do Rio Grande do Sul,

onde a principal fonte de irrigação é a Laguna dos Patos que, por ter ligação com o Oceano Atlântico, sofre a sua influência, principalmente em épocas de baixa precipitação pluvial e elevada demanda, tanto atmosférica quanto das próprias lavouras de arroz do seu entorno. Os meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro são os mais quentes do ano e coincidem com o ciclo de irrigação dos arrozais (CARMONA, 2011).

A salinidade causa grandes distúrbios no metabolismo das plantas, acarretando restrição de crescimento e perda de produtividade. Os primeiros efeitos causados pelo excesso de sais destacam-se pelos efeitos osmóticos, restringindo o transporte de água o que reduz o crescimento da planta. Em seguida, ocorre o acúmulo de íons em excesso nos tecidos vegetais podendo ocasionar toxicidade iônica, desequilíbrio nutricional, ou ambos, causando danos moleculares, interrupção do crescimento e morte celular (ZHU, 2001; KUMAR et al., 2009).

Além disso, rapidamente é desencadeada uma sequência de reações, moduladas por hormônios, que levam a restrição à abertura estomática e assimilação fotossintética do CO₂ (SILVEIRA et al., 2010), aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (PANDA; KHAN, 2009), mudanças nas concentrações de carboidratos solúveis totais, fenóis totais, glicina betaína, prolina (LACERDA et al., 2001; ASHRAF; FOOLAD, 2007), clorofila (NETONO et al., 2004) e proteínas (LUNDE et al., 2007).

Assim como a salinidade, a ocorrência de baixas temperaturas, inferiores a 18 °C são prejudiciais na fase de estabelecimento da cultura do arroz e, principalmente, na fase reprodutiva. O problema abrange todo o Estado do Rio Grande do Sul, mas é particularmente importante nas regiões do Litoral Sul e da Campanha onde é maior a probabilidade de ocorrência de temperaturas inferiores a 15 °C durante a noite (FAGUNDES et al., 2010).

A ocorrência de baixas temperaturas durante as fases críticas afetam a produtividade final. Na germinação, pode causar atraso e diminuição no percentual de germinação. Ocorrendo nas fases iniciais, pode causar atraso no desenvolvimento, redução de estatura, amarelecimento de folhas e falha de estande. Na fase reprodutiva afetam a produtividade através da esterilidade de espiguetas (TORO, 2006). No entanto, a semeadura antecipada, é um método de escape para

que a floração do arroz não ocorra em condições de temperatura inferior a 15 °C, não ocasionando decréscimo na produtividade final de grãos (MERTZ et al., 2009).

Do ponto de vista bioquímico, o estresse por frio pode causar mudanças na estrutura da membrana plasmática, acúmulo de carboidratos, ácido abscísico (ABA), aminoácidos (ex: prolina), poliaminas e proteínas na região apoplástica (JANDA et al., 2003).

Ao longo da evolução as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos que as permitem perceber as condições adversas, ativando cascatas de transdução de sinais, que, conseqüentemente, acionam mecanismos de resposta ao estresse, levando a mudanças fisiológicas e bioquímicas (Figura 1). A expressão de diferentes genes é induzida por fatores ambientais diversos e os produtos destes genes não somente agem na tolerância ao estresse como também regulam a expressão gênica e transdução de sinais (XIONG et al., 2002; BARTELS; SUNKAR, 2005).

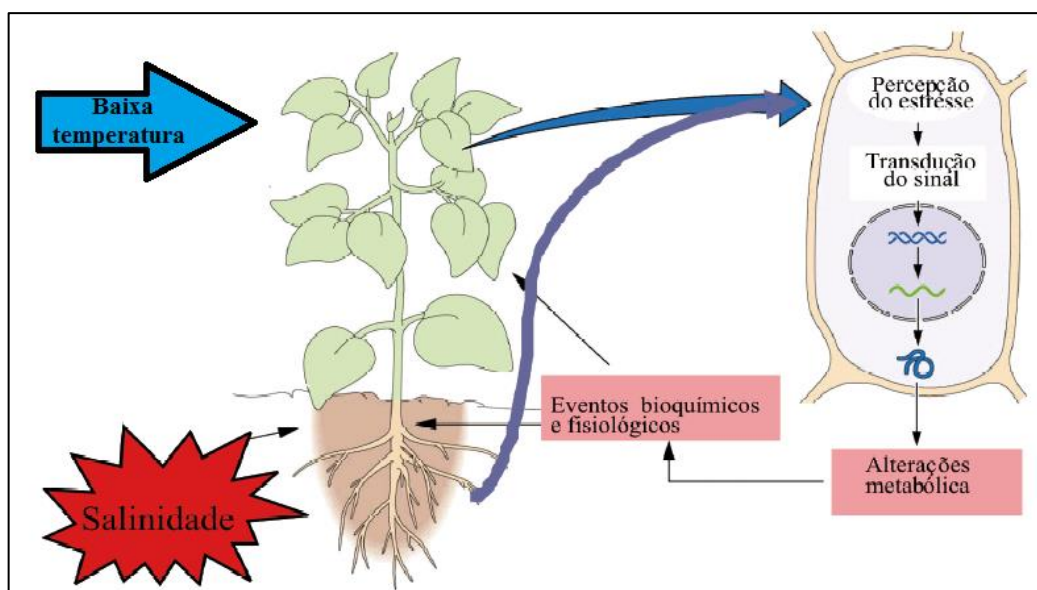


Figura 1- Modelo esquemático mostrando o mecanismo geral de resposta biomolecular das plantas ao estresse (Adaptado de Bray et al., 2000).

A prolina desempenha importante papel em plantas submetidas a estresses, como a salinidade e baixas temperaturas. Sob estas condições, a prolina atua como mediador do ajuste osmótico além de atuar na estabilização de estruturas celulares e na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GÓMEZ et al., 1999; HERNÁNDEZ et al., 2001). Na ausência de qualquer mecanismo de proteção,

quantidades excessivas de EROs podem alterar o metabolismo normal da célula e causar danos nos cloroplastos, inibir as reações fotoquímicas, diminuir a fotossíntese e causar a perda da integridade da membrana celular. Entre as principais EROs, que causam danos celulares pela oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxílico (HO^{\bullet}) e oxigênio singlete (1O_2) (APEL; HIRT, 2004; CHEN et al., 2011).

Para amenizar o estresse oxidativo, as plantas desenvolveram uma complexa rede de sistemas antioxidativos constituída por componentes de natureza enzimática e não enzimática que atua continuamente na proteção oxidativa. Os mecanismos não enzimáticos são representados pelo ascorbato, glutathiona, carotenoides e tocoferóis (ASHRAF, 2009). Dentre as principais enzimas removedoras de EROs (*scavenging*) incluem-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPX) e guaiacol peroxidase (GOPX) (GOMES-JUNIOR et al., 2006). Estas enzimas atuam na cascata de oxidação e neutralizam o poder destrutivo das EROs, preservando a integridade da célula (Figura 2).

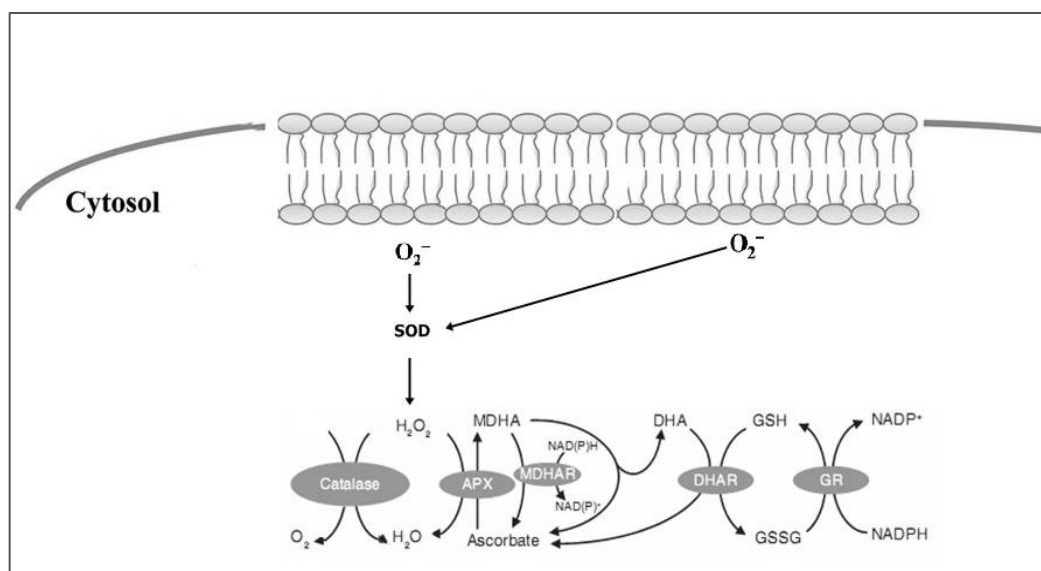


Figura 2- Esquema representativo do sistema antioxidante e sua atuação na detoxificação de espécies reativas de oxigênio [Adaptado de TRIVEDI et al., 2013]. Abreviações: SOD – superóxido dismutase; APX – ascorbato peroxidase; MDHAR – monodehidroascorbato redutase; DHAR – dehidroascorbato redutase; GR – glutathiona redutase; MDHA – monodehidroascorbato; DHA – dehidroascorbato; GSH - glutathiona reduzida; GSSG – glutathiona oxidada; $O_2^{\bullet-}$ - superóxido; H_2O_2 – peróxido de hidrogênio.

Ao contrário de muitos organismos, as plantas possuem múltiplos genes codificando SOD, CAT, APX e GR, descritos como famílias gênicas. Para a enzima SOD foram identificadas no genoma do arroz, até o momento, oito isoformas. As SODs são classificadas de acordo com seu cofator metálico em três tipos: cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD), que estão localizados em diferentes compartimentos celulares (GILL;TUTEJA, 2010). Assim como no caso das SODs, as plantas possuem uma pequena família multigênica que codifica diferentes formas da enzima catalase (CATs), as quais, em arroz, foram denominadas *CatA*, *CatB*, *CatC* (MENEZES-BENAVENTE et al., 2004).

Segundo Teixeira et al. (2004), análises *in silico*, indicaram que as APXs de arroz são codificadas por uma família gênica de oito membros e que os produtos desses genes estão localizados em diferentes compartimentos celulares, havendo duas isoformas citosólicas (*OsAPx1* e *OsAPx2*); duas isoformas peroxissomais (*OsAPx3* e *OsAPx4*) e quatro isoformas cloroplastídicas (*OsAPx5*, *OsAPx6*, *OsAPx7* e *OsAPx8*), sendo que *OsAPx6* também foi localizada na mitocôndria (TEIXEIRA et al., 2006). Da mesma forma que comentado para APX, inúmeras sequências de cDNAs já foram clonadas e estão disponíveis no GenBank para a enzima glutathione redutase (GR) (HONG et al., 2009). No arroz, três genes que codificam diferentes isoformas de GR foram descritos: *OsGR2* (isoforma citosólica), *OsGR1* e *OsGR3* (isoformas cloroplastídicas) (WU et al., 2013).

Atenção especial tem sido dada para a associação entre a quantificação do nível de expressão transcricional dos genes das diferentes isoformas e a atividade enzimática de SOD, CAT, APX e GR, uma vez que, segundo Fryer et al. (2003), a atividade enzimática e a expressão dos genes das enzimas antioxidantes estão moduladas por diversos estímulos ambientais.

A regulação da expressão gênica é exercida por uma complexa rede molecular. Componentes importantes desta rede são os fatores de transcrição (FTs), moléculas capazes de se ligar a sequências específicas do DNA, chamadas *cis*-elementos. Os *cis*-elementos podem estar localizados na região promotora dos genes, levando à ativação ou repressão da transcrição dos mesmos. Cada gene possui uma combinação de *cis*-elementos única, fazendo com que o controle da transcrição temporal e espacial seja específico (QIU, 2003).

Diante da importância social e econômica da cultura do arroz a nível mundial e para o Brasil, e sabendo-se que, muitas vezes as safras da cultura são prejudicadas pelo excesso de sal e por baixas temperaturas, bem como, pela falta de genótipos tolerantes a estas condições ambientais, o objetivo deste trabalho foi estudar respostas bioquímicas e moleculares desencadeadas pelo estresse por frio e sal, buscando informações que possam ser utilizadas no auxílio aos programas de melhoramento genético para ambas as tolerâncias.

CAPÍTULO 1

RESPOSTA FISIOLÓGICA E MOLECULAR DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES E SUAS ISOFORMAS INDUZIDAS POR ESTRESSE SALINO EM ARROZ

1 INTRODUÇÃO

As plantas são frequentemente expostas a diversas condições ambientais desfavoráveis, sendo estas denominadas de estresses abióticos. Dentre esses estresses, pode-se citar a salinidade que representa ameaças graves na produtividade das culturas (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2008).

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura bastante vulnerável às condições adversas como salinidade, temperaturas extremas, seca, deficiência de nutrientes, que, em conjunto, ou isoladamente, exercem um grande impacto sobre o seu rendimento (GAO et al., 2007; MUNNS; TESTER, 2007; MORISON et al., 2008; WITCOMBE et al., 2008). Quando a planta é submetida a algum desses tipos de estresse, uma cascata de sinalização é ativada resultando em um aumento de metabólitos e proteínas, algumas das quais podem ser responsáveis pela proteção contra esses estresses (AHMAD et al., 2008; BHATNAGAR-MATHUR et al., 2008; JALEEL et al., 2009).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um dos sistemas de proteção que ocorre naturalmente e está associado ao metabolismo respiratório e fotossintético, representando uma condição metabólica normal das células vegetais. Em função dessa condição, a célula vegetal possui uma complexa rede de sistemas antioxidantes constituída por componentes de natureza enzimática e não enzimática que atua continuamente na proteção oxidativa. No entanto, em plantas sob salinidade pode ocorrer a geração excessiva de EROs, tais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH) (ZHU et al., 1997; MITTLER 2002; SHARMA et al., 2012). Estas EROs são altamente

reativas, danificando os componentes celulares da planta, através do dano oxidativo dos lipídeos da membrana, proteínas e ácidos nucleicos (AHMAD et al., 2010).

O nível e o tipo das EROs são fatores determinantes para o tipo de resposta. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido ($O_2^{\bullet-}$) podem induzir genes diferentes, em conjunto ou separadamente, dando mais flexibilidade à sinalização das EROs. Níveis subletais de EROs podem levar as plantas em condições de estresses bióticos e abióticos a reduzir seu crescimento, provavelmente como parte de uma resposta adaptativa (SOARES et al., 2007).

Nestas condições, a maior proteção oxidativa frente ao estresse salino é dependente das principais enzimas oxidativas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX), a glutathione redutase (GR), o monodeidroascórbico redutase (MDHAR) e o deidroascórbico redutase (DHAR) (ASHRAF, 2009). Dentre as enzimas removedoras de EROs (*scavenging*) incluem-se a SOD, que é considerada a primeira linha de defesa do sistema antioxidante, pois converte $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . O radical superóxido é o primeiro a ser produzido pela adição de um elétron ao oxigênio molecular (O_2), caracterizando o *burst* oxidativo (MITTLER, 2002; FERREIRA; ABREU, 2007; AYDIN et al., 2013). Posteriormente, o H_2O_2 formado vai ser eliminado pela catalase nos peroxissomos e pela ascorbato peroxidase, através do ciclo ascorbato-glutathione, em diferentes componentes celulares (CHAPARZADEH et al., 2004).

Ao contrário de muitos organismos, as plantas possuem múltiplos genes codificando SOD, CAT, APX e GR, descritos como famílias gênicas. Para a enzima SOD foram identificadas no genoma do arroz, até o momento, oito genes homólogos. As SODs são classificadas de acordo com seu cofator metálico em três tipos: cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD), que estão localizados em diferentes compartimentos celulares (GILL; TUTEJA, 2010). A enzima catalase possui uma pequena família multigênica, as quais, em arroz, foram denominadas *CatA*, *CatB*, *CatC* (MENEZES-BENAVENTE et al., 2004). As APXs de arroz são codificadas por uma família gênica de oito membros e seus produtos gênicos estão localizados em diferentes compartimentos celulares, havendo duas isoformas citosólicas (codificadas por *OsAPx1* e *OsAPx2*); duas isoformas peroxissomais (codificadas por *OsAPx3* e *OsAPx4*) e quatro isoformas cloroplastídicas (codificadas por *OsAPx5*, *OsAPx6*, *OsAPx7* e *OsAPx8*), sendo que

OsAPx6 também foi localizada na mitocôndria (TEIXEIRA et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2006). Já a enzima glutathione reductase (GR) apresenta três genes que codificam diferentes isoformas descritas como: *OsGR2* (isoforma citosólica), *OsGR1* e *OsGR3* (isoformas cloroplastídicas) (WU et al., 2013). De acordo com Gill; Tuteja (2010) a super expressão das isoformas SOD, CAT, APX e GR resulta na tolerância ao estresse abiótico em várias plantas devido a eficiente capacidade de eliminação de EROs.

Desta forma, a obtenção de informações que sejam mais esclarecedoras sobre os mecanismos de tolerância são de extrema importância para auxiliar os programas de melhoramento genético na busca de genótipos tolerantes. Para isso, acredita-se que, alguns desses mecanismos possam ser identificados, via alterações na expressão gênica e/ou regulação pós-transcricional das diferentes isoformas das enzimas antioxidantes, relacionando estes resultados com a atividade enzimática. O objetivo desse trabalho foi relacionar a produção de EROs com a atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GR, além de avaliar a expressão dos genes que codificam cada isoforma, em dois genótipos de arroz com tolerância diferencial ao estresse salino no estágio vegetativo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de estresse

O experimento foi conduzido utilizando-se dois genótipos de arroz que apresentam resposta contrastante em relação à tolerância à salinidade: BRS Pampa (subespécie *indica* – sensível) e BRS Bojuru (subespécie *japonica* - tolerante).

As sementes foram germinadas em rolo de papel a uma temperatura de 25 ± 2 °C por 10 dias em câmara de germinação tipo BOD. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação com temperatura de 28 ± 2 °C em sistema de cultivo hidropônico do tipo *floating* com bandejas contendo 20 litros de solução de Yoshida et al. (1976). Foram utilizadas três bandejas/genótipo com 75 plântulas, permanecendo nestas condições até apresentarem quatro folhas (estádio V4). Após este período foi adicionado 150 mM de NaCl à solução nutritiva (SINGH et

al., 2010), onde as plantas permaneceram expostas pelos tempos de 0, 6, 24, 48 e 72 h.

A coleta do material para as análises (folhas) foi realizada da seguinte maneira: C1 (coleta 1) = plantas não expostas ao estresse por sal; C2 (coleta 2) = 6 horas de estresse; C3 (coleta 3) = 24 horas de estresse; C4 (coleta 4) = 48 horas de estresse e C5 (coleta 5) = 72 horas de estresse. O delineamento experimental foi completamente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 5 (2 genótipos x 5 tempos de exposição ao estresse), com três repetições por tratamento.

2.2 Determinação das EROs

O radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) foi determinado de acordo com Li et al. (2010). Tecidos de folhas (200 mg) foram maceradas em 1,8 mL tampão fosfato 65 mM (pH 7,8) e centrifugada a 5000 g por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 1,5 mL de tampão fosfato 130 mM (pH 7,8), 50 μ L de cloridrato de hidroxilamina 10 mM para posteriormente ser incubado a 25 °C, durante 20 minutos. Em seguida, 100 μ L de sulfanilamida 17 mM e 100 μ L de α -naftilamina 7mM foram acrescentados à mistura. A absorbância 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 $O_2^{\bullet -}$.

A concentração do H_2O_2 foi determinada de acordo com Velikova (2000). Amostras de folhas (200 mg) foram maceradas e homogeneizadas em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) (0,1 % m/v) e centrifugados a 12000 g por 15 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 0,8 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1,0 mL de iodeto de potássio 1 M. As leituras em espectrofotômetro foram realizadas a 390 nm sendo a concentração do H_2O_2 calculada através da comparação das leituras com curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de H_2O_2 e expressa em μ M de H_2O_2 g⁻¹ de massa fresca. A peroxidação lipídica foi determinada pela estimativa do teor de malondialdeído (MDA) de acordo com o método de Heath; Packer (1968). Aproximadamente 200 mg de folhas frescas foram maceradas em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) (0,1% m/v) e centrifugados a 12000 g por 15 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado TBA (0,5% m/v) e TCA (10% m/v) e aquecidos em banho-maria a 95 °C por 30 minutos mantendo os tubos

fechados, paralisando a reação por resfriamento rápido em banho de gelo durante 10 minutos. A absorbância do ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm. A concentração do complexo MDA-TBA foi calculada pela equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600})/(\xi \cdot b)$. $[MDA] = (A_{535} - A_{600})/(\xi \cdot b)$, onde: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$) e b : (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em nmol de MDA g^{-1} de massa fresca.

2.3 Quantificação do teor de SOD, CAT, APX e GR

2.3.1 Preparo do extrato enzimático

Para o preparo do extrato enzimático, 200 mg de tecido foliar foram macerados com N_2 líquido e homogeneizado em 2,0 mL do tampão de extração composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante utilizado na determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX) (EC 1.11.1.1) e glutathione redutase (GR) (EC 1.6.4.2).

2.3.2 Determinação das atividades enzimáticas

A avaliação da atividade da SOD foi baseada na capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) em um meio de reação contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM , NBT 75 μM e riboflavina 2 μM . As leituras foram realizadas a 560 nm. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50 % a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

A determinação da CAT foi realizada como descrito por Azevedo et al. (1998), com base no consumo de H_2O_2 (coeficiente de extinção $39,4 \text{ mM cm}^{-1}$). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), H_2O_2 12,5 mM, água e o extrato enzimático, sendo a atividade monitorada pelo decréscimo na

absorbância a 240 nm durante 2 minutos e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Determinou-se a atividade da APX utilizando-se o método descrito por Nakano; Asada (1981), por meio da avaliação da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm (coeficiente de extinção $2,8 \text{ mM cm}^{-1}$). O meio de reação incubado a 28°C foi composto de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e H_2O_2 0,1 mM, água e o extrato enzimático, sendo a atividade monitorada pelo decréscimo na absorbância a 290 nm durante 2 minutos e expressa em $\mu\text{mol ASA min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da GR foi determinada de acordo com Cakmak et al. (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 glutathiona oxidada (GSSG), 75 μM de NADPH e a alíquota da enzima.

Todas as atividades enzimáticas foram expressas numa base de proteína solúvel. Teor solúvel foi estimado de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.4 Extração de RNA, síntese de cDNA e desenho de *primer*

O RNA total foi extraído a partir de 0,1 g de folhas utilizando-se o reagente *PureLink® Kit* (Invitrogen™). Para degradação de DNAs contaminantes, as amostras foram tratadas com *DNAse I* (Invitrogen™). A qualidade, quantidade e pureza do RNA total foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% e NanoDrop ND-1000. Cada amostra foi reversamente transcrita em cDNA usando o kit comercial *SuperScript First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen™).

Foram desenhados *primers* na região transcrita dos genes de arroz para as isoformas das enzimas SOD (*OsSOD1*, *OsSOD2*, *OsSOD3*, *OsSOD4*, *OsSOD5*, *OsSOD6*, *OsSOD7* e *OsSOD8*), CAT (*OsCATA*, *OsCATB* e *OsCATC*), APX (*OsAPX1*, *OsAPX2*, *OsAPX3*, *OsAPX4*, *OsAPX5*, *OsAPX6*, *OsAPX7* e *OsAPX8*) e GR (*OsGR1*, *OsGR2* e *OsGR3*), utilizando as sequências depositadas no banco de dados *RAP-DB* e o programa *PerlPrimer* v.1.1.21. Como normalizador interno das reações de RT-qPCR utilizou-se o gene *UBQ10*, previamente testado para as condições experimentais (MORAES et al., 2015). Somente iniciadores que

apresentaram curva de dissociação com pico único e eficiência de amplificação próxima a 100% foram utilizados neste estudo (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* utilizados para RT-qPCR. 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'CGAATGCTCTCCAACAACAG ^{3'}
<i>OsSOD3-Cu/Zn</i>	<i>Os07t0665200-01</i> AK243377.1	5'GGTGTGCTAATGTCAATGTCTC ^{3'} 5'ATCATCAGGATCAGCATGGAC ^{3'}
<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'CTGATGATCTTGGAAGGGTGG ^{3'} 5'GTGCTGGGAGATGGAAGGT ^{3'}
<i>OsSOD-Cu/Zn</i>	<i>Os04t0573200-01</i> AK120348.1	5'GCTCTATTGCGTTGTATGCCA ^{3'} 5'GCTTGACTCCCAATGGTGAC ^{3'}
<i>OsSODB-Fe</i>	<i>Os06t0143000-01</i> AK062073.1	5'TGCAGCAGATAGAGAAGGATT ^{3'} 5'TTCTCTCAAGACAAGCCAAAC ^{3'}
<i>OsSOD-Fe</i>	<i>Os06t0115400-01</i> AK111656.1	5'CAAGTCACAAACCCAGAGTCAT ^{3'} 5'GGAATACAAGATGTCAGGCTCA ^{3'}
<i>OsSODA1-Mn</i>	<i>Os05t0323900-01</i> AK070528.1	5'CTACGTCGCCAACTACAACAAG ^{3'} 5'CTGATAGGCTTGAGGTTATTCCAG ^{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'AGGTGGTCAGAACCTTGTGT ^{3'}
<i>OsAPX3</i>	<i>Os04t0223300-00</i> AY382617.1	5'ATCCCAAGATTACCTATGCTGACC ^{3'} 5'TGATAAGCCCATCCTGTAGAAGAC ^{3'}
<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'AAGTGTATGTGCTCCAGACAG ^{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'ATTGGTGGGTTCTCACATGTTA ^{3'} 5'ACCATTATTGCTCCGTTCTTGT ^{5'}
<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'}

2.5 Reações de RT-qPCR

O volume total das reações foi de 12 μ L, sendo 6,25 μ L do fluoróforo *SYBR Green* (Roche®), 0,25 μ L (10 mM) de cada *primer* (senso e antisenso), 1 μ L de cDNA (diluição 1:5, previamente definida) e 4,25 μ L de água ultra pura. As reações foram realizadas em Termociclador Bio-Rad CFX Real Time, utilizando-se os seguintes parâmetros de amplificação: 95 °C por 10 minutos, 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. A quantificação relativa da expressão de cada gene foi obtida conforme descrito por Pfaffl (2001).

2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$) visando testar as fontes de variação e suas possíveis interações. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o software estatístico WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

A análise de componentes principais foi realizada a partir dos dados das médias das 29 variáveis, incluindo expressão dos genes codificadores das isoformas e atividade das enzimas antioxidantes, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica. Com base nos componentes principais, construiu-se um gráfico *biplot* com o primeiro e segundo componente principal para cada um dos genótipos. Em paralelo, para a seleção dos componentes principais que mais contribuíram para a variabilidade dos genótipos, foram utilizados os dados de autovalores e autovetores obtidos para ambos os genótipos em conjunto. As análises foram realizadas no software SAS.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RESULTADOS

3.1.1 Determinação das EROs e Peroxidação Lipídica

O conteúdo de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram influenciados significativamente ($P \leq 0,05$) pelo tempo de exposição ao estresse e pela interação desse fator com os genótipos, de acordo com a análise de variância. Para o genótipo BRS Bojuru, o maior conteúdo de $O_2^{\cdot-}$ ocorreu nos períodos de 48 h (1,49) e 72 h (1,80) de estresse, diferindo significativamente dos tempos iniciais de estresse (0 h = 0,55 e 6 h = 0,70). Entretanto, para o genótipo BRS Pampa, o conteúdo de $O_2^{\cdot-}$ não diferiu significativamente entre os tempos de estresse (Figura 1A).

Com relação ao H_2O_2 , o genótipo BRS Bojuru apresentou maior conteúdo quando submetida a 48 h (0,56) e 72 h (0,60) de estresse, diferindo significativamente dos tempos de 0 h, 6 h e 24 h (0,30; 0,37 e 0,38 respectivamente) de estresse. O genótipo BRS Pampa, apresentou menor nível de H_2O_2 no tempo de 24h (0,37) de estresse, diferindo somente do controle (0,57) (Figura 1B).

Observou-se interação significativa entre os fatores para a variável peroxidação lipídica. No genótipo Bojuru, considerado tolerante, os níveis de peroxidação lipídica diminuíram ao longo dos dias de estresse salino, quando comparado com as plantas controle. Já no genótipo sensível observou-se um comportamento distinto, ocorrendo aumento significativo nos últimos tempos de estresse (48 h = 72,33 e 72 h = 80,60). Pode-se observar em relação aos genótipos, que houve diferença significativa entre todos os tempos de estresse, sendo que no genótipo tolerante o maior nível de MDA ocorreu no tratamento controle, enquanto que para os tempos restantes os maiores valores ocorreram no genótipo sensível (Figura 1C).

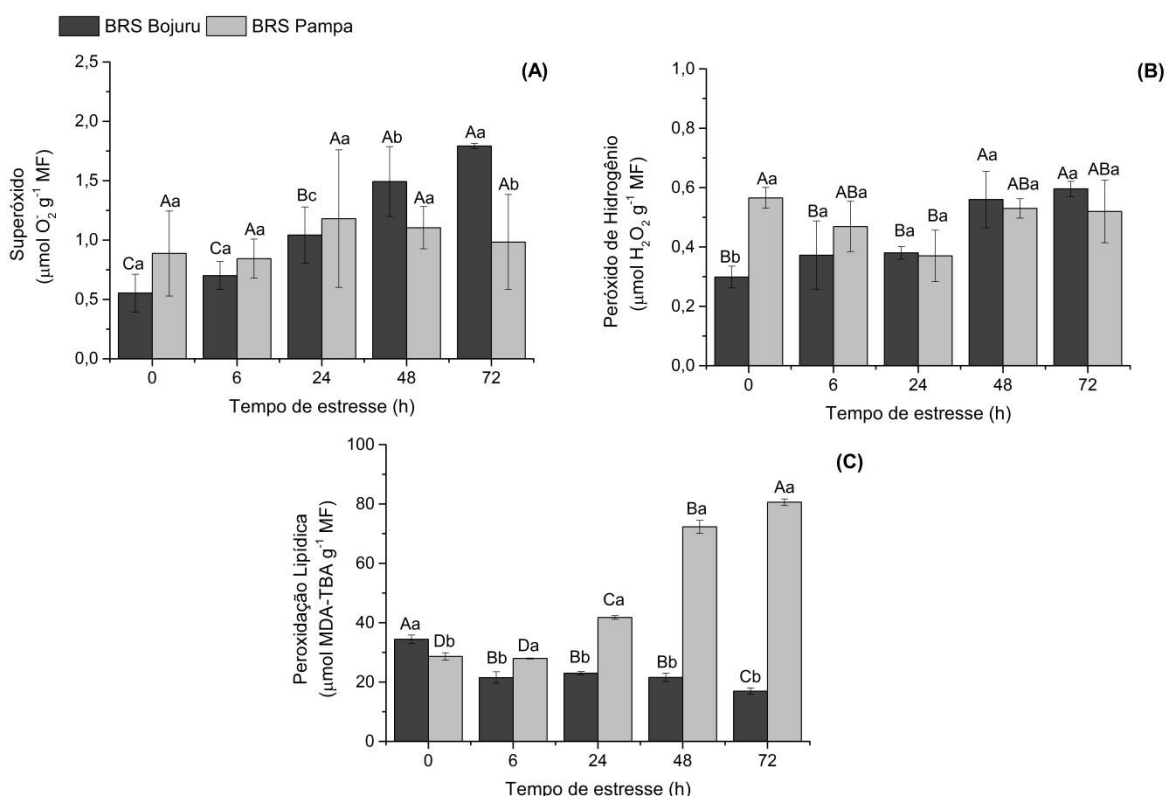


Figura 1- Teor de superóxido (A), peróxido de hidrogênio(B) e peroxidação lipídica (C) em folhas de arroz (BRS Bojuru e BRS Pampa), após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes horas. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os genótipos dentre de cada tempo de estresse.

3.1.2 Atividade das enzimas antioxidante

Conforme a análise de variância pode-se perceber que para as enzimas SOD, CAT e APX houve interação entre os fatores genótipo e tempo de exposição ao sal. Foi observado que no genótipo BRS Bojuru, ocorreu aumento na atividade da enzima SOD em todos os tempos de exposição ao estresse, sendo os maiores valores nos tempos de 6 h (67,88), 24 h (71,81) e 48 h (68,93). Para o genótipo BRS Pampa, foi observado maior valor de atividade no tempo de 24 h (73,15), o qual diferiu do controle (63,40) e dos dois últimos tempos de estresse (Figura 2A).

Para a atividade da enzima catalase (CAT) observou-se diferença significativa entre os genótipos somente após 6 h e 48 h de exposição ao sal, porém maiores valores de atividade (0,19) foram observados para o genótipo BRS Pampa (Figura 2B).

No genótipo BRS Bojuru, a atividade da APX não alterou significativamente com a exposição ao sal, nos diversos tempos, por outro lado, no genótipo BRS Pampa observou-se maior atividade após 48 h (0,24) de estresse. Ao comparar os genótipos nos diferentes tempos, percebeu-se que o genótipo sensível apresentou maior atividade da APX à medida que o estresse é percebido nos tempos de 6 h (0,17), 24 h (0,17) e 48 h (0,24) (Figura 2C).

Diferentemente das outras enzimas analisadas, não houve diferença significativa para a atividade da enzima GR em todos os fatores (Figura 2D).

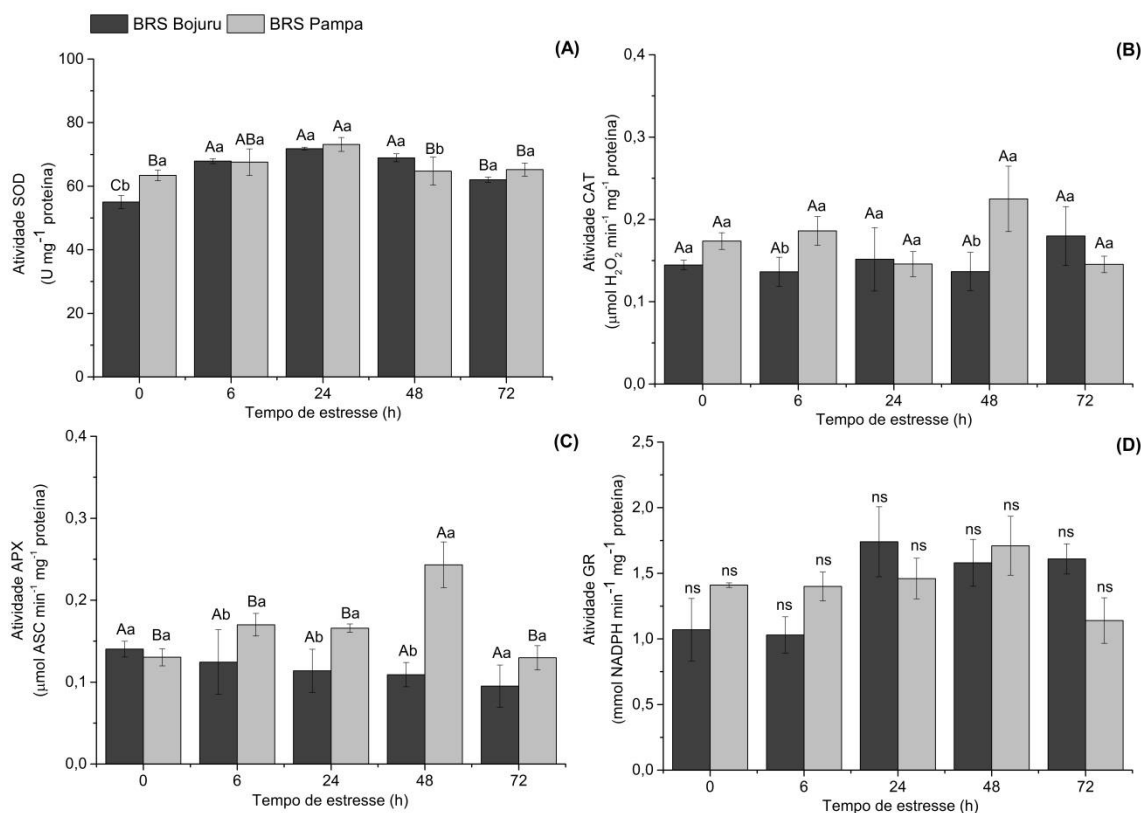


Figura 2- Atividade das enzimas SOD (A), CAT (B), APX (C) e GR (D), em folhas de arroz (BRS Bojuru e BRS Pampa), após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes dias. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os genótipos dentro de cada tempo de estresse.

3.1.3 Expressão gênica dos genes codificadores das isoformas da SOD, CAT, APX e GR

Considerando os dois genótipos submetidos ao estresse salino nos diferentes tempos (0, 6 h, 24 h, 48 h e 72 h), observou-se que os níveis de transcritos dos genes codificadores das várias isoformas SOD, CAT, APX e GR foram diferenciados dentro do próprio genótipo.

Com relação ao genótipo tolerante (BRS Bojuru), os maiores valores de expressão foi observado no tempo de 72 h de estresse, para os oito genes da SOD testados, sendo os genes homólogos *OsSOD₃Cu/Zn* (QR = 27,16) e *OsSODA1-Mn* (QR = 9,51) as mais responsivas ao estresse salino. Para o genótipo sensível (BRS Pampa), aumentos na expressão foram observadas para os genes homólogos *OsSOD4-Cu/Zn*, *OsSOD3-Cu/Zn*, *OsSOD-Fe* em todos os tempos de estresse, enquanto que para o gene homólogo *OsSOD2-Cu/Zn* ocorreu decréscimo. O gene homólogo *OsSODCc1-Cu/Zn* apresentou maior expressão após 24 h (QR = 7,33) e 48 h (QR = 7,19) de estresse e o gene *OsSODA1-Mn* maior expressão nos tempos iniciais (6 h = 8,67 e 24 h = 6,70) com posterior decréscimo, já o *OsSOD-Cu/Zn* e *OsSODB-Fe* mantiveram-se estáveis ao longo do estresse (Figura 3).

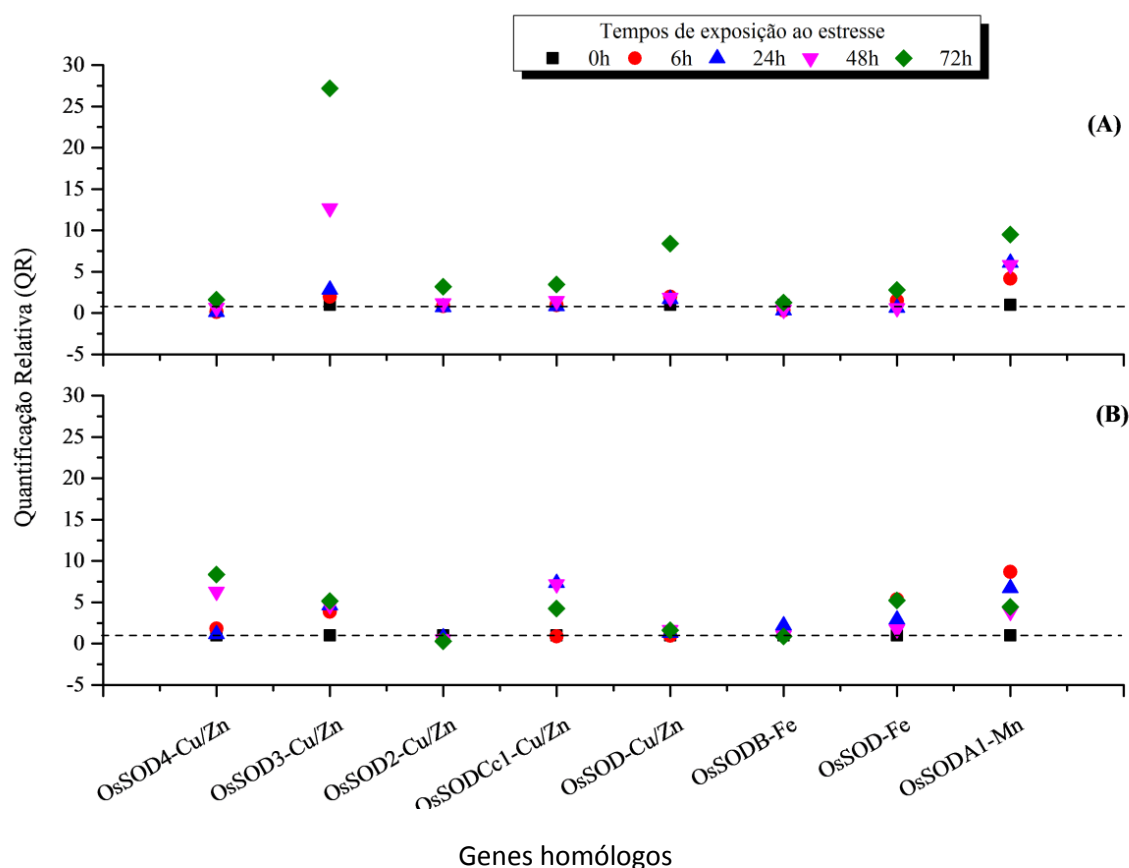


Figura 3 - Expressão dos genes codificadores das oito isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas de arroz, após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes tempos. BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B).

Nos diferentes tempos de estresse por sal para o genótipo tolerante, observou-se maior valor de expressão nos genes homólogos *OsCATA* (QR=6,65) e *OsCATB* (QR=2,82) em plantas submetidas ao tratamento de 6 h com subsequente redução, enquanto que para o gene homólogo *OsCATC* somente o tempo de 48 h apresentou valor acima do controle. Para o genótipo sensível, maiores valores de QR foram observados para o gene homólogo *OsCATC* as 24 h e 48 h (QR = 10,12 e QR = 12,12, respectivamente) e *OsCATA* as 6 h e 24 h (QR = 15,7 e QR = 17,23; respectivamente) de estresse, enquanto que para o gene homólogo *OsCATB* o maior valor de expressão ocorreu no tempo inicial de estresse (QR = 2,16) com subsequente redução nos demais tempos (Figura 4).

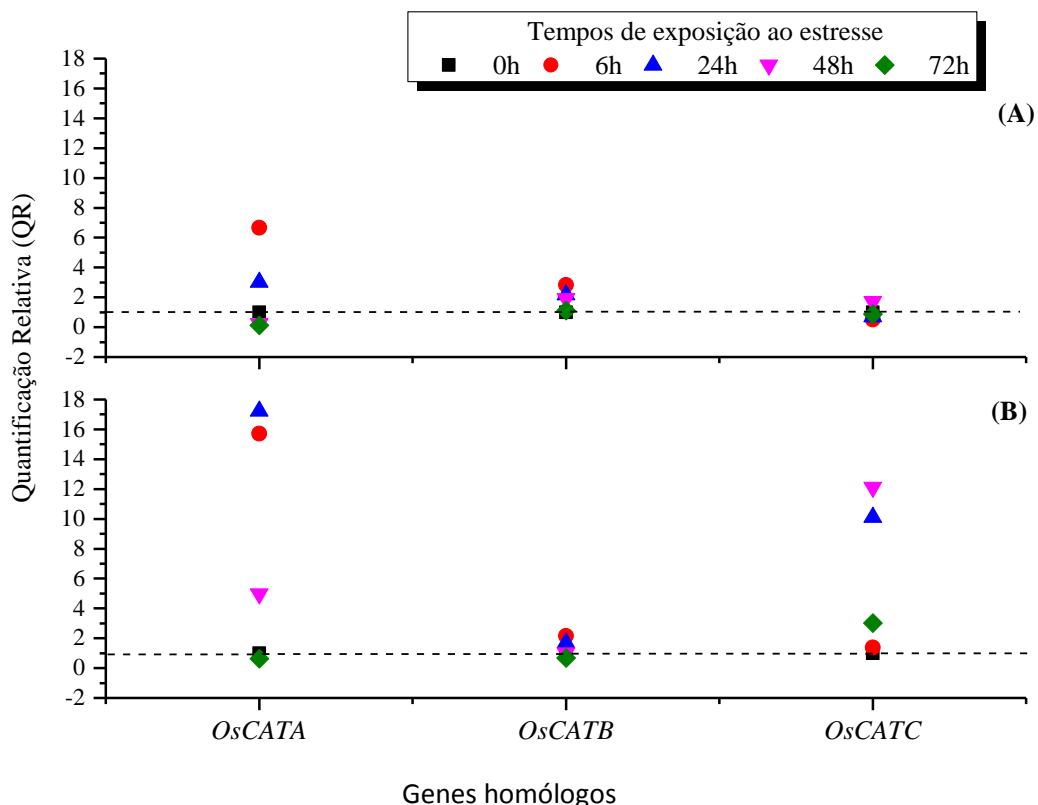


Figura 4 - Expressão dos genes codificadores das três isoformas da catalase (CAT) em folhas de arroz, após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes tempos. BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B).

Para o genótipo BRS Bojuru, a expressão dos genes codificadores das isoformas *OsAPX1*, *OsAPX3* e *OsAPX8* mantiveram-se estáveis ao longo dos tempos de estresse, enquanto que *OsAPX4*, *OsAPX5*, *OsAPX6* e *OsAPX7* obtiveram maiores valores de expressão nos tempos finais (48 h e 72 h). Dentre os oito genes codificadores das isoformas da APX, o gene homólogo *OsAPX2* foi o que obteve maior expressão (24 h = 22,44; 48 h = 15,53; 72 h = 10,52) quando comparado aos outros genes homólogos. Para o genótipo BRS Pampa, foi observado que somente o gene homólogo *OsAPX1* apresentou redução da expressão gênica em todos os tempos de estresse e que a *OsAPX8* apresentou redução em seus valores após 6 h de estresse. Os genes homólogos *OsAPX5* e *OsAPX6* apresentaram maiores valores de expressão quando submetidos à 6 h (QR = 16,14 e QR = 5,69 respectivamente) de estresse, enquanto o *OsAPX7* demonstrou aumento da expressão no decorrer dos tempos de estresse. Quanto ao gene homólogo *OsAPX2* observou-se uma resposta similar ao padrão de expressão do

genótipo tolerante que, acompanhado do *OsAPX3*, apresentou valores de expressão superiores em relação aos outros genes homólogos da APX (Figura 5).

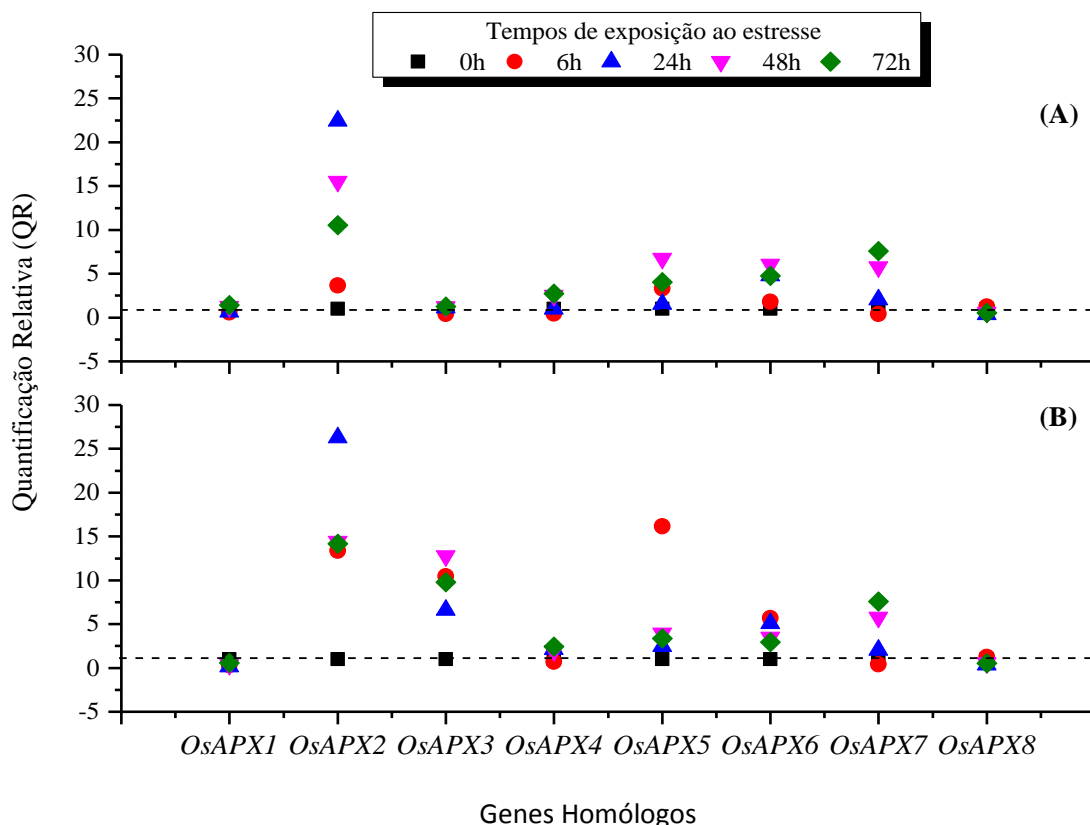


Figura 5 - Expressão dos genes codificadores das oito isoformas da enzima ascorbato peroxidase (APX) em folhas de arroz, após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes tempos. BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B).

Com relação aos diferentes genes codificadores das isoformas da glutathione redutase, para o genótipo tolerante a expressão do gene homólogo *OsGR1* foi aumentada após 24 h (QR = 15,11) de estresse, mantendo este padrão para os tempos seguintes. Em relação aos genes homólogos *OsGR2* e *OsGR3* observou-se padrão similar de expressão, atingindo maiores valores às 48 h (QR = 87,58 e QR = 66,22 respectivamente) de estresse com subsequente redução. No genótipo sensível, houve aumento na expressão do gene homólogo *OsGR1* em todos os tempos, com maior valor as 24h (QR = 2,97) de exposição ao sal, enquanto para os genes homólogos *OsGR2* e *OsGR3* houve redução da expressão gênica na presença do estresse por salinidade. Comparando os genótipos estudados, observou-se que o genótipo tolerante apresentou valores de expressão muito superiores o genótipo sensível (Figura 6).

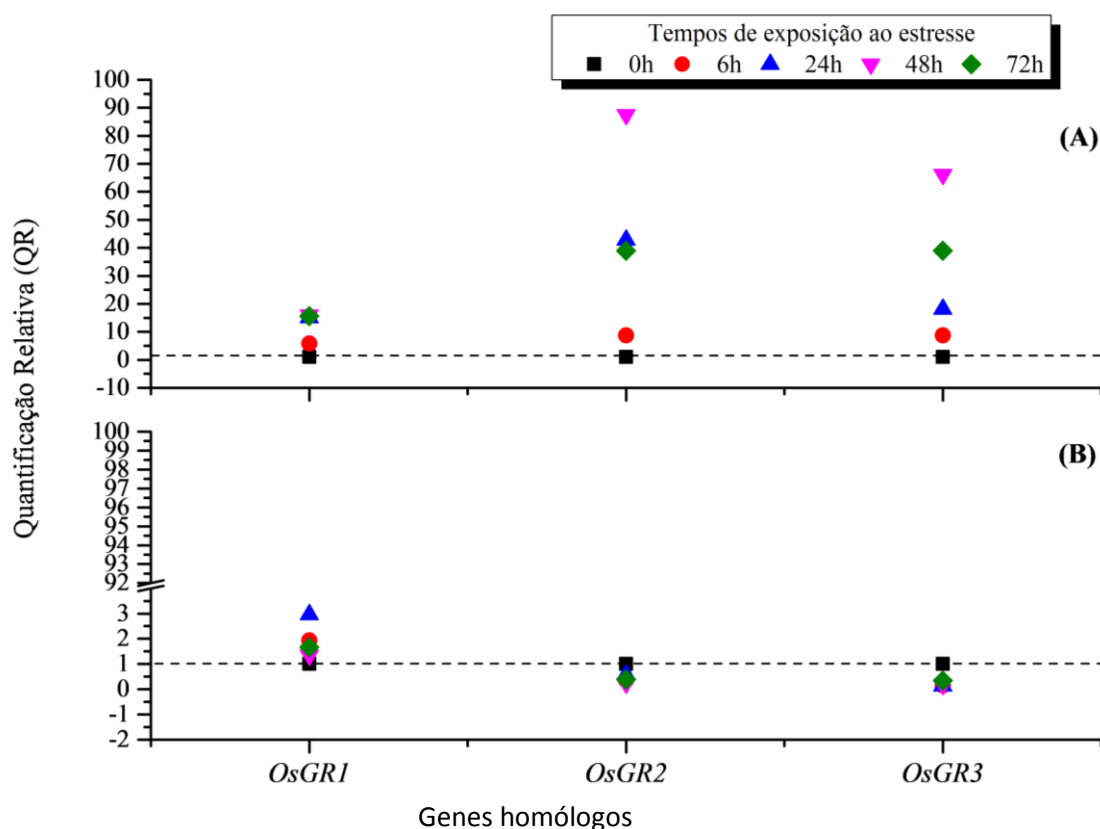


Figura 6 - Expressão dos genes codificadores das três isoformas da glutathiona redutase (GR) em folhas de arroz, após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes tempos. BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B).

3.1.4 Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais, realizada a partir de dados de médias das 29 variáveis avaliadas, fornece os dados dos autovalores (variância) de cada componente principal, a porcentagem da variância e os valores cumulativos. Para os dois genótipos foram selecionados os dois primeiros componentes principais que explicaram 0,89 % e 0,80 % da variação para BRS Bojuru e BRS Pampa, respectivamente, quando submetidos a salinidade (Tabela 2).

Tabela 2- Variância (autovalores) de cada componente principal e sua importância em relação à variância total de 29 variáveis avaliadas em dois genótipos de arroz submetidos à salinidade

	Variância Proporcional		Variância Cumulativa	
	BRS Bojuru	BRS Pampa	BRS Bojuru	BRS Pampa
PCA1	0,64	0,46	0,64	0,46
PCA2	0,25	0,34	0,89	0,80

Os caracteres que mais contribuíram para a variabilidade no componente principal 1 no genótipo BRS Bojuru foram *OsCATA* (- 0,21), *OsCATB* (- 0,23), *OsSOD3-Cu/Zn* (0,22) e o teor do ânion superóxido (0,23), enquanto que para BRS Pampa destacam-se as variáveis *OsCATA* (0,27), *OsGR1* (0,20), *OsSODA1-Mn* (0,24) e os níveis de peróxido de hidrogênio (- 0,23).

No componente principal 2 no genótipo BRS Bojuru a expressão dos genes *OsAPX2* (0,23), *OsGR2* (0,30) e atividade da enzima GR (0,24) foram as variáveis com maior peso para a resposta ao estresse, já para BRS Pampa essas variáveis foram expressão dos genes: *OsAPX2* (0,26), *OsCATC* (0,21), *OsAPX5* (- 0,28), *OsSODCc1-Cu/Zn* (0,27) e os níveis de peróxido de hidrogênio (0,24).

No gráfico *biplot* no qual foram plotados os componentes principais 1 e 2, verificou-se que no quadrante 1 para o genótipo BRS Bojuru, encontram-se, dentre outras, as variáveis $O_2^{\cdot-}$, expressão dos genes *OsCATC*, *OsAPX2*, *OsGR2* e atividade da enzima glutatona redutase, cujo os autovetores variaram entre 0,23-0,30. No quadrante 4, observou-se a expressão dos genes codificadores de todas as isoformas da enzima superóxido dismutase e a atividade enzimática da catalase (Figura 7A). Por outro lado, no genótipo BRS Pampa as isoformas da SOD e APX encontram-se distribuídas em todos os quadrantes, ressaltando a diferença de resposta entre os genótipos (Figura 7B).

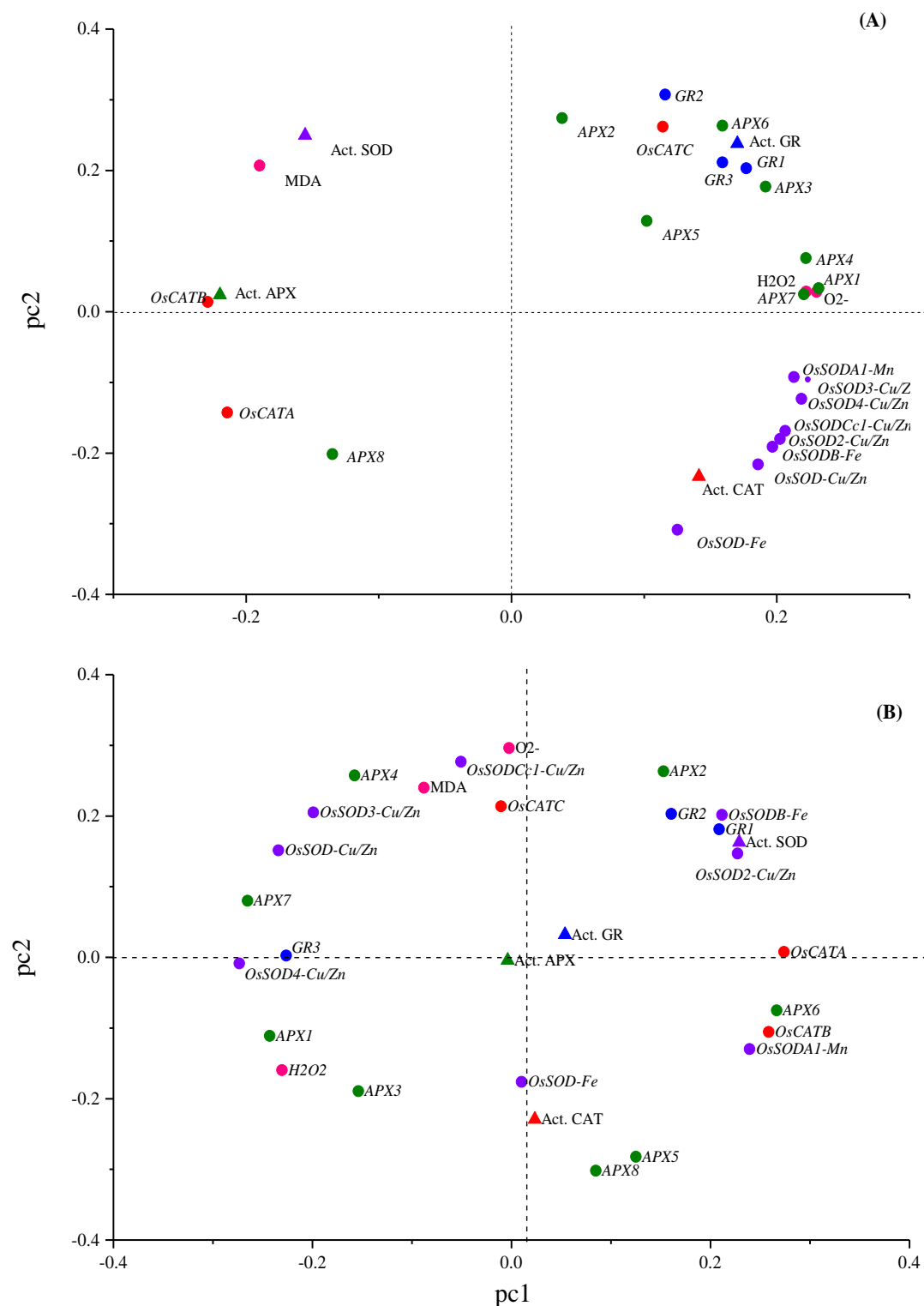


Figura 7 - Componentes principais em folhas de arroz, após submissão das plantas a 150 mM de NaCl por diferentes tempos. BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B).

Em paralelo, para a seleção dos componentes principais utilizando os dados de autovalores e autovetores obtidos para ambos os genótipos em conjunto, destacam-se a expressão dos genes *OsAPX3* (0,24), *OsGR2* (0,25), *OsGR3* (0,23) e

OSCATB (0,38) que são algumas das variáveis que mais contribuíram para a variabilidade entre os genótipos, no entanto, as variáveis de menor peso foram: *OsAPX1* (0,04), *MDA* (0,03), *OsSODB-Fe* (0,09) e *OsAPX8* (- 0,05), sendo portanto as variáveis menos indicadas para diferenciar genótipos tolerantes e sensíveis nas condições experimentais testadas.

3.2 DISCUSSÃO

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são considerados como a principal fonte de danos nas células sob estresses abióticos, incluindo o estresse salino. O MDA é um produto final da peroxidação lipídica, que pode inibir a atividade das enzimas antioxidantes aumentando a peroxidação lipídica da membrana (HERNANDES et al., 2000; GARG; MANCHANDA, 2009).

Neste estudo, o estresse por salinidade causou aumento significativo de moléculas tóxicas, tais como $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 em folhas do genótipo tolerante, sugerindo que o estresse salino causa danos oxidativos, embora tenha ocorrido decréscimo nos níveis de MDA. Já para o genótipo sensível ocorreu redução nos níveis de H_2O_2 e aumento nos níveis de MDA ao longo do estresse, o que pode ser efeito do estresse por salinidade ou uma característica do próprio genótipo.

O decréscimo nos níveis da peroxidação lipídica, no genótipo tolerante, sugere que ele possa ter uma melhor proteção contra os danos oxidativos sob estresse salino. Esta proteção pode estar relacionada com o eficiente sistema antioxidante, evidenciado pelo aumento da atividade das enzimas SOD e CAT (Figura 2A e 2B). Foi observado de forma semelhante, em plantas de milho, que cultivares tolerantes ao alagamento mostraram maior tolerância aos danos oxidativos (TANG^a et al., 2010).

Por outro lado, neste estudo os níveis de MDA aumentaram, para o genótipo sensível, dependendo do tempo de estresse, evidenciando que embora tenha ocorrido aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e APX (Figura 2A, 2B e 2C) nos diferentes tempos de estresse a defesa dessas enzimas antioxidantes foram insuficientes sob condições de estresse para suprimir o aumento na produção de EROs. Resultados semelhantes foram relatados em raízes de arroz submetidos ao estresse salino (DEMIRAL; TÜRKAN, 2005), em plantas de arroz expostos ao

estresse por ozônio (WANG et al., 2013) e em mudas de soja sob estresse salino (HAKEEM et al., 2012).

As SODs são metalo-enzimas consideradas a primeira linha de defesa contra as EROs e catalisam a dismutação de dois radicais $O_2^{\cdot-}$, gerando H_2O_2 e O_2 (MITTLER, 2002). A indução desta enzima reflete o seu importante papel no mecanismo de defesa da planta (ASHRAF; ALI, 2008). No presente estudo os dois genótipos (tolerante e sensível) apresentaram aumento na atividade da enzima SOD (Figura 2A), o que também foi evidenciado por Turan et al. (2013) e Khare et al. (2014) em plantas de arroz sob estresse salino. Foram identificados genes codificadores das isoformas da SOD em ambos os genótipos estudados. Aumentos mais expressivos foram observados nos genes homólogos *OsSOD₃Cu/Zn* e *OsSODA1-Mn* (Figura 3A) em resposta ao estresse salino para o genótipo tolerante, sugerindo que a maior parte da atividade da SOD foi devido a estes genes. Para o genótipo sensível, observou-se aumentos na expressão dos genes homólogos *OsSOD₄-Cu/Zn*, *OsSOD₃-Cu/Zn*, *OsSOD-Fe*, *OsSODCc1-Cu/Zn* e em todos os tempos de estresse (Figura 3B), indicando que os cloroplastos e o citosol podem ser importantes compartimentos de limpeza do superóxido, já que os produtos desses genes atuam nessas organelas.

Hernandez et al. (2010), trabalhando com estresse salino em raízes de *Brassica oleracea*, relataram que o aumento da atividade da enzima SOD foi devido principalmente a uma maior expressão dos genes *SOD-Fe* e *SODI-Cu/Zn*. Já Uzilday et al. (2012) observaram aumentos na expressão do gene *SOD-Mn*, em *Cleome spinosa* sob condições de seca, indicando compartimentalização mitocondrial do $O_2^{\cdot-}$. Esses resultados sugerem que um aumento na NADH fotorrespiratória pode causar uma redução maior que a normal da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e a produção de radicais $O_2^{\cdot-}$ devido à transferência de elétrons ao oxigênio molecular.

O peróxido de hidrogênio é uma importante molécula sinalizadora envolvida nas respostas de desenvolvimento das plantas e do meio ambiente. Alterações na disponibilidade de H_2O_2 podem ser resultados de um aumento ou diminuição na produção do metabolismo. Enquanto as plantas contêm vários tipos de proteínas que metabolizam H_2O_2 , as catalases são enzimas altamente ativas que não requerem redutores celulares, pois catalisam principalmente a reação do superóxido

(MHAMDI et al., 2010). Stoilova et al. (2010), trabalhando com estresse por seca, relataram aumento da atividade da CAT, especialmente em variedades sensíveis em plantas de trigo. O aumento da atividade da catalase, no genótipo BRS Pampa, sugere que ocorreu um aumento na concentração de H_2O_2 , que pode ser resultante do estresse, do aumento da fotorrespiração ou difusão de outros compartimentos celulares. Evidências indicam que o H_2O_2 serve como uma importante molécula sinalizadora em vários aspectos da função celular em plantas e que sua produção e sinalização sob estresses abióticos também poderia ativar a expressão e atividade da catalase (XING et al., 2007; DU et al., 2008; MILLER et al., 2010). Um aumento na atividade da enzima CAT foi acompanhado por um aumento na expressão dos genes, em resposta à salinidade para o genótipo BRS Pampa. Os resultados deste estudo, indicam que o aumento dos níveis de transcritos da *OsCATC* e *OsCATA* contribuíram para manter a atividade da enzima catalase, sendo o gene homólogo *OsCATA* o mais responsivo ao estresse salino. Menezes-Benavente et al. (2004) relataram que em seus estudos, o estresse por sal em plantas de arroz não alterou a expressão dos genes homólogos *OsCATA* e *OsCATC* porém, houve aumento na expressão do gene homólogo *OsCATB*, contrariando o resultado do presente trabalho. Estudo realizado por Queval et al. (2007) em *Arabidopsis*, demonstrou que o aumento da taxa fotorrespiratória está relacionada com o aumento na expressão da *CAT2* (ortólogo ao gene *OsCATC* do arroz) acompanhado de um significativo aumento da atividade da catalase. Para o genótipo tolerante, também se observou que o gene homólogo *OsCATA* foi o mais responsivo ao estresse (Figura 4A). Khare et al. (2014), relataram um aumento na expressão do *OsCATA* em plantas de arroz tolerantes a salinidade e diminuição nos níveis de transcritos para o genótipo sensível. Os resultados obtidos por Yamane et al. (2010), sugerem que o aumento na atividade da enzima CAT está relacionada com a expressão dos níveis de transcritos dos genes homólogos *OsCATB* e *OsCATC* em folhas de arroz tolerantes ao estresse salino. Os resultados do nosso estudo podem indicar que o gene homólogo *OsCATA* seja a principal enzima na eliminação de H_2O_2 em plantas de arroz sensíveis e tolerantes a salinidade.

A APX é a primeira enzima do ciclo ascorbato-glutationa, desempenhando papel vital na eliminação do H_2O_2 . Possui alta afinidade ao peróxido de hidrogênio, quando comparada a CAT, eliminando-o mesmo em baixas concentrações (GILL;

TUTEJA, 2010). Pesquisas relataram maior atividade na enzima APX em genótipos tolerantes ao sal, em soja e arroz, quando comparados com genótipos sensíveis (MORADI; ISMAIL, 2007; HAKEEM et al. 2012; MISHRA et al. 2013). Porém neste estudo, observou-se que foi o genótipo sensível que apresentou maior atividade da enzima APX (Figura 2C). Os resultados deste estudo estão de acordo com Turan; Tripathy (2013) e Khare et al. (2014) que relataram aumento na atividade da APX em plantas de arroz sensíveis a salinidade. O arroz possui oito genes codificadores de isoformas de ascorbato peroxidase localizadas em diversos compartimentos celulares. Em nosso estudo foi observado, para o genótipo BRS Bojuru, que a expressão do gene homólogo *OsAPX2*, foi o mais responsiva ao estresse salino (Figura 5A). No entanto, o aumento no nível de transcritos não foi diretamente correlacionado com a atividade da enzima. Sugerindo que possa ter ocorrido inativação da proteína APX, durante o estresse, pois a APX é irreversivelmente inativada em ausência de ascorbato reduzido (AsA) sendo sua atividade reduzida sob condições de estresse grave, devido à oxidação de ascorbato (SHIKANAI et al., 1998; ASADA, 1999). Morita et al. (2011), relataram relação no aumento na expressão dos genes homólogos *OsAPX1* e *OsAPX2* com o aumento da atividade da APX em plantas de arroz submetidas ao estresse por seca. Turan; Tripathy (2013), verificaram que aumento na expressão do gene homólogo *OsAPX2* em resposta ao estresse salino, em genótipos contrastantes de arroz, está correlacionado com a atividade da enzima. Para o genótipo BRS Pampa, foi observado que todas os genes homólogos da APX, com exceção das *OsAPX1* e *OsAPX8*, apresentaram aumentos nos valores de expressão no decorrer dos tempos de estresse (Figura 5B). Porém quanto ao gene homólogo *OsAPX2* observou-se uma resposta similar ao padrão de expressão do genótipo tolerante que, acompanhado do *OsAPX3*, apresentou valores de expressão superiores em relação aos outros genes codificadores das isoformas da APX, sugerindo que esses genes desempenham um papel no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo causada pela salinidade, neste genótipos. Vários trabalhos relataram que as isoformas peroxissomais (APX3 e APX4) estão relacionadas com a desintoxicação das EROs na parte aérea das plantas, atuando principalmente nos peroxissomos e glioxissomos da folha e caule (TEIXEIRA et al., 2006). Rosa et al. (2010), observaram que em plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico, o gene

homólogo *OsAPX3* não foi afetado, enquanto *OsAPX4* foi pouco expresso, já as genes homólogos *OsAPX1*, *OsAPX2*, *OsAPX5*, *OsAPX6* e *OsAPX7* foram reguladas positivamente e o gene homólogo *OsAPX8* não apresentou aumentos na expressão. Hong et al. (2007), trabalhando com raízes de arroz sob estresse salino, relataram o aumento na expressão do gene homólogo *OsAPX8* e na atividade da enzima APX, não havendo correlação da expressão dos outros genes com o aumento da atividade. No entanto, a participação de praticamente todos os genes homólogos pode estar atuando na proteção de estruturas na formação do peróxido de hidrogênio, ou ainda controlando a sinalização deste mensageiro nos processos de sinalização.

A GR é uma importante enzima do ciclo ascorbato-glutationa desempenhando papel essencial na defesa da planta contra EROs através da manutenção do nível GSH (PASTORI et al., 2000; CONTOUR-ANSEL et al., 2006). O aumento da atividade GR sob diferentes condições de estresse tem sido observado em muitas espécies de plantas, como arroz, trigo, amendoim, milho e tabaco (GUO et al., 2006; TANG^a et al., 2010; TANG^b et al., 2010; TAN et al., 2011). No entanto, neste estudo não houve diferença significativa para a atividade da enzima GR em todos os fatores testados (Figura 2D). Os três genes codificadores das isoformas da glutathione redutase estudados neste trabalho mostraram padrões de expressão distintos para os genótipos contrastantes, sendo o genótipo BRS Bojuru que apresentou maiores valores de expressão (Figura 6A). Hong et al. (2009), trabalhando com raízes de arroz, relataram que o aumento na expressão dos genes homólogos *OsGR2* e *OsGR3* está associada ao aumento da atividade da GR e que este aumento foi significativamente induzido pela salinidade e mediada pelo H_2O_2 . No presente estudo, o conteúdo do H_2O_2 aumentou no genótipo tolerante, indicando que ele possa ser um indutor na expressão das três genes homólogos da GR. No genótipo BRS Pampa, foi observado aumento somente na expressão do gene homólogo *OsGR1* enquanto para os genes homólogos *OsGR2* e *OsGR3* houve redução da expressão gênica na presença do estresse por sal (Figura 6B). Turan et al. (2013), trabalhando com plantas de arroz sob estresse por sal relataram o aumento na expressão do gene homólogo *OsGR2*, tanto para o genótipo sensível como para a tolerante. A enzima glutathione redutase localizada em diferentes compartimentos celulares pode ter papéis distintos na manutenção do estado redox sob condições

normais ou de estresse. O gene homólogo localizada no cloroplasto contribui com 78% da atividade da GR em plantas (EDWARDS et al., 1990; WU et al., 2015). Nossos resultados indicam que o gene homólogo *OsGR1* desempenha um importante papel na tolerância ao estresse e desenvolvimento da planta.

A técnica de APC permite a identificação dos compostos que exibem a maior variação dentro de uma população e determina a estreita colaboração dos compostos relacionados (KIM et al., 2010). Além disso, de posse dos resultados da ACP, podem-se eliminar aquelas características redundantes e de difícil mensuração, o que reduziria o tempo e os custos de experimentos (PAIVA et al., 2010). De acordo com Lira et al. (2010), esta análise encontra-se certamente entre as mais importantes ferramentas da análise multivariada, inclusive por constituir a base na qual se fundamentam a maioria dos outros métodos multivariados de análise de dados. Através deste estudo foi possível indicar as variáveis que mais contribuíram para a variabilidade entre os genótipos (*OsAPX3*, *OsGR2*, *OsGR3* e *OsCATB*), sendo estas indicadas para diferenciar genótipos tolerantes e sensíveis sob estresse salino (Figura 7).

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se que: (i) aumentos na atividade enzimática da SOD, CAT e APX, no genótipo sensível, não foram suficientes para a proteção aos danos oxidativos, visto que, houve aumento nos níveis de MDA; (ii) o sistema antioxidante, no genótipo tolerante, evidenciado pelo aumento da atividade das enzimas SOD e CAT foi suficiente para que não houvesse aumentos nos níveis de peroxidação lipídica; (iii) a regulação positiva dos genes homólogos *OsSOD₃Cu/Zn*, *OsSODA1-Mn*, *OsCATA*, *OsCATB* e *OsAPX2*, no genótipo tolerante; e *OsSOD₄-Cu/Zn*, *OsSOD₃-Cu/Zn*, *OsSOD-Fe*, *OsSODCc1-Cu/Zn*, *OsCATA*, *OsCATC*, *OsAPX2* e *OsAPX3*, no genótipo sensível sob condições de estresse salino demonstraram a sua contribuição para o aumento na atividade da enzima e, portanto, estão relacionadas com a proteção desses genótipos; (iv) aumentos na expressão dos genes homólogos da GR não pode ser relacionadas com a atividade

da enzima; (v) os genes homólogos *OsAPX3*, *OsGR2*, *OsGR3* e *OsCATB*, são indicadas para diferenciar genótipos tolerantes e sensíveis sob estresse salino.

CAPÍTULO 2

EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ENZIMA CATALASE EM ARROZ EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE ABIÓTICO

1 INTRODUÇÃO

O crescimento das plantas é afetado por vários estresses ambientais incluindo a salinidade, seca e temperaturas extremas. Esses estresses abióticos são importantes fatores ambientais que limitam a produtividade das culturas em todo o mundo (MORISON et al., 2007; ROY et al., 2011). O Arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos mais importantes cereais em regiões tropicais e subtropicais, porém seu rendimento é muito sensível à salinidade e a baixas temperaturas (ZENG, 2005). O estresse salino reduz a disponibilidade de água para as plantas e interfere no equilíbrio iônico dentro da célula, causando danos moleculares, diminuição do crescimento e morte celular (ZHU, 2001). Baixas temperaturas causam danos irreversíveis no metabolismo e nos componentes celulares da planta, afetando todas as funções celulares e alterando a integridade da membrana (KRATSCH; WISE, 2000; CHINNUSAMY et al., 2007).

A exposição das plantas a estes estresses abióticos resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) danificando os componentes celulares da planta, através do dano oxidativo dos lipídeos da membrana, proteínas e ácidos nucleicos (AHMAD et al., 2010). As EROs são formas reduzidas do oxigênio molecular extremamente reativas, que incluem o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxílico ($\cdot OH$) e oxigênio singlete (1O_2), e estão presentes na célula vegetal como subprodutos normais do metabolismo aeróbico e de processos fotooxidativos (ARORA et al., 2002; MITTLE, 2002; WANG et al., 2010). Porém quando sob estresse ambiental o equilíbrio entre a produção de EROs e a atividade antioxidante é rompido a favor dos compostos oxidantes, ocorrendo um

aumento nos níveis intracelulares de EROs, que podem causar danos significativos nas estruturas celulares (KIM; KWAK, 2010). No entanto, as plantas desenvolveram a capacidade de acionar mecanismos de defesa antioxidantes que podem prevenir o acúmulo de EROs e o estresse oxidativo extremo (EL-SHABRAWI et al., 2010). Os principais antioxidantes enzimáticos incluem as superóxido dismutases (SODs), as peroxidases, como a catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e a glutathione peroxidase (GPX), que em conjunto com outras enzimas envolvidas no ciclo ascorbato-glutathione promovem a remoção de EROs (HERNÁNDEZ et al., 2001; CAVALCANTI et al., 2004; MILLER, et al., 2010).

Entre as enzimas antioxidantes, a catalase ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ oxidoreductase, EC 1.11.1.6), foi a primeira enzima a ser descoberta e caracterizada. É um antioxidante potente cuja expressão varia com a severidade do estresse, desempenhando um papel central na proteção de plantas cultivadas em diferentes estresses ambientais. A CAT é encontrada em todos os organismos aeróbios e catalisa a conversão de duas moléculas de H_2O_2 em água e O_2 pela transferência de dois elétrons (ZAMOCKY et al., 2008; ZENG et al., 2010). Entretanto, as catalases são essenciais não somente para a proteção contra o estresse oxidativo, mas também são importantes por participarem de alterações metabólicas sobre substâncias tóxicas por meio das suas reações peroxidativas (BUCKOVA et al., 2010).

Na célula vegetal, a catalase é a principal enzima responsável pela dismutação direta do H_2O_2 à água e oxigênio exclusivamente nos peroxissomos e glioxissomos. O H_2O_2 formado nestas organelas pode ser originado a partir de eventos de β -oxidação de ácidos graxos, fotorrespiração, catabolismo de purinas, assim como sob condição de estresse oxidativo (MITTLE, 2002; GARG; MANCHANDA, 2009; GILL; TUTEJA, 2010).

De maneira geral, as CATs apresentam um grupamento heme em sua estrutura, sendo classificadas de acordo com suas principais isoformas (JALEEL et al., 2009). Estas são codificadas por uma pequena família gênica, geralmente composta de três genes, já descritas no arroz como *CATA*, *CATB*, *CATC*, sendo esses genes expressos de forma diferente durante o crescimento. Em plântulas, a forte expressão das *CATA*, *CATB*, e *CATC* é detectada na bainha da folha, da raiz, e do limbo foliar, respectivamente (MASSAO et al., 2000; MASSAO et al., 2004). Vários estudos têm se dedicado ao padrão de expressão, clonagem e

caracterização desses genes quando submetidos a estresse por frio e sal em arroz (WUTIPRADITKUL et al., 2011; KHARE et al., 2014; CHAKRABORTY; BHATTACHARJEE, 2015) e em outras plantas incluindo *Avicennia marina* (JITHESH et al., 2006) e cevada (KIM et al., 2005).

A expressão de uma variedade de genes é induzida por estresses em diversas plantas e os produtos desses genes funcionam não somente na tolerância ao estresse, mas também na regulação da expressão do gene e na transdução de sinais nas respostas aos estresses (BARTELS; SUNKAR, 1995). Componentes importantes desta rede são os fatores de transcrição (FTs) e os elementos de ação *cis*. Os *cis* elementos podem estar localizados na região promotora dos genes, contribuindo para a adaptação da planta a esses estresses ambientais. Desta forma, a presença destes elementos pode determinar a resposta das plantas frente a condições de estresses, uma vez que atuam como reguladores de resposta. A identificação de *cis* elementos na região promotora das isoformas da catalase pode auxiliar no entendimento da regulação da transcrição destes genes sob condições de estresse por sal e por baixa temperatura.

O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas da enzima catalase em dois genótipos contrastantes de arroz, sob condições de estresse por salinidade e baixa temperatura, através do nível enzimático e do padrão de expressão dos genes homólogos da CAT, a fim de verificar se a quantidade de transcritos está diretamente relacionada com o conteúdo enzimático além de, identificar *cis*-elementos na região promotora dos genes codificadores das isoformas da catalase que possam influenciar nas respostas transcricionais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de estresse

Os experimentos foram conduzidos com dois genótipos de arroz que apresentam resposta contrastante aos estresses por salinidade e baixa temperatura: BRS Pampa (subespécie *indica* – sensível) e BRS Bojuru (subespécie *japonica* - tolerante).

As sementes foram germinadas em rolo de papel *germitest* a uma temperatura de 25 ± 2 °C por 10 dias em câmara de germinação climatizada. Para o estresse salino, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação com temperatura de 28 ± 2 °C em sistema de cultivo hidropônico do tipo *floating* com bandejas contendo 20 litros de solução nutritiva de Yoshida et al. (1976). Foram utilizadas três bandejas/genótipo com 50 plântulas, permanecendo nestas condições até apresentarem quatro folhas (estádio V4). Após este período, foi adicionado 150 mM de NaCl à solução nutritiva, conforme Singh et al. (2010), permanecendo nestas condições durante 72 horas para a realização das coletas.

Para simular o estresse por baixa temperatura, as plântulas foram transferidas para bandejas plásticas (3L) contendo solo comercial adubado conforme as recomendações para a cultura do arroz irrigado. Foram utilizadas três bandejas/genótipo com 50 plântulas, as quais foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de 28 ± 2 °C e irrigadas com solução nutritiva de Yoshida (1976) até as plantas apresentarem quatro folhas (estádio V4). Após este período, as plantas do tratamento controle foram coletadas e as bandejas restantes foram transferidas para câmara de crescimento com temperatura de 13°C onde permaneceram durante 72 horas para as coletas.

A coleta do material para as análises (folhas) foi realizada da seguinte forma para os dois estresses: 0 hora: C1 (coleta 1) = plantas não expostas ao estresse por frio ou sal; C2 = 6 horas de estresse; C3 = 24 horas de estresse; C4 = 48 horas de estresse e C5 = 72 horas de estresse. O delineamento experimental foi completamente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 5 (2 genótipos x 5 tempos de exposição ao estresse), com três repetições por tratamento.

2.2 Determinação do Peróxido de Hidrogênio

A concentração do H_2O_2 foi determinada de acordo com VELIKOVA (2000). Amostras de folhas (200 mg) foram maceradas e homogeneizadas em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) (0,1% m/v) e centrifugados a 12.000g por 15 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 0,8 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1,0 mL de iodeto de potássio 1 M. As leituras em espectrofotômetro foram realizadas a 390 nm sendo a concentração do H_2O_2 calculada através da comparação das

leituras com curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de H_2O_2 e expressa em μM de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ de massa fresca.

2.3 Determinação da Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pela estimativa do teor de malondialdeído (MDA) de acordo com o método de Heath; Packer (1968). Aproximadamente 200 mg de folhas frescas foram maceradas em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) (0,1% m/v) e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado TBA (0,5% m/v) e TCA (10% m/v) e aquecidos em banho-maria a 95 °C por 30 minutos mantendo os tubos fechados, paralisando a reação por resfriamento rápido em banho de gelo durante 10 minutos. A absorbância do ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm. A concentração do complexo MDA-TBA foi calculada pela equação: $[\text{MDA}] = (A_{535} - A_{600})/(\xi \cdot b)$. $[\text{MDA}] = (A_{535} - A_{600})/(\xi \cdot b)$, onde: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$) e b : (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em nmol de MDA g^{-1} de massa fresca.

2.4 Preparo do extrato enzimático e determinação da atividade enzimática da Catalase

Para o preparo do extrato enzimático, 200 mg de tecido foliar foram macerados com N_2 líquido e homogeneizado em 2,0 mL do tampão de extração composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), 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 utilizado na determinação da atividade das enzimas Catalase (CAT).

A determinação da CAT (EC 1.11.1.6) foi realizada como descrito por Azevedo et al. (1998), com base no consumo de H_2O_2 (coeficiente de extinção $39,4 \text{ mM cm}^{-1}$). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), H_2O_2 12,5mM, água e o extrato enzimático, sendo a atividade monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 2 minutos e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

2.5 Determinação de proteínas totais

A quantificação de proteínas nos extratos foi determinada conforme metodologia escrita por Bradford (1976). As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 595 nm e comparadas com a curva-padrão de albumina de soro bovina (BSA) 0,1 g L⁻¹, sendo o teor proteico da amostra expresso em µg proteína mg⁻¹ MF.

2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$) visando testar as fontes de variação e suas possíveis interações. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o software estatístico WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

2.7 Extração de RNA, síntese de cDNA e desenho de *primers*

O RNA total foi extraído a partir de 0,1 g de folhas utilizando-se o reagente *PureLink® Kit* (Invitrogen™). Para degradação de DNAs contaminantes, as amostras foram tratadas com *DNase I* (Invitrogen™). A qualidade, quantidade e pureza do RNA total foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% e NanoDrop ND-1000. Cada amostra foi reversamente transcrita em cDNA usando o kit comercial *SuperScript First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen™).

Foram desenhados *primers* na região transcrita dos genes de arroz para a enzima CAT: *OsCATA*; *OsCATB* e *OsCATC*, utilizando as sequências depositadas no banco de dados *RAP-DB* e o programa PerlPrimer v.1.1.21. Como normalizador interno das reações de RT-qPCR utilizou-se o gene *UBQ10*, previamente testado para as condições experimentais (MORAES et al., 2015). Somente iniciadores que apresentaram curva de dissociação com pico único e eficiência de amplificação próxima a 100 % foram utilizados neste estudo (Tabela 1).

Tabela 1- *Primers* utilizados para RT-qPCR. Temperatura de anelamento 61°C

Gene	Locus	Senso/antisenso
OsCATA	Os02t0115700-01	5'GTGAAGATTGCGAATAGGCTC ^{3'}
	AK065094.1	5'TCTGGCCTTATTTGGTTGGT ^{3'}
OsCATB	Os06t0727200-01	5'GACAAGGAGAACAATTTCCAACAG ^{3'}
	AK100019.1	5'AGTAGGAGATCCAGATGCCAC ^{3'}
OsCATC	Os03t0131200-01	5'GTGATTGCCAAGGAGAACAAC ^{3'}
	AK066378.1	5'GAGTGCGTCGATCCATCTCT ^{3'}
UBQ10	Os02t0161900-01	5'TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG ^{3'}
	AK101547	5'GCACCACAAATACTTGACGAACAG ^{3'}

2.8 Reações de RT-qPCR

O volume total das reações foi de 12 µL, sendo 6,25 µL do fluoróforo FastSatr SYBR Green (Roche®), 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 reações foram realizadas em Termociclador Bio-Rad CFX Real Time, utilizando-se os seguintes parâmetros de amplificação: 95°C por 10 minutos, 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. A quantificação relativa da expressão de cada gene foi obtida conforme descrito por Pfaffl (2001).

2.9 Sequenciamento e análise da região promotora

Foram selecionados 1200 pb da região promotora de cada uma dos genes homólogos da catalase (*OsCATA*; *OsCATB* e *OsCATC*), a partir de sequências da cultivar Nipponbare depositadas no banco de dados NCBI, sendo que 200 pb encontravam-se dentro do gene. Posteriormente, desenhou-se três *primers* para cada região promotora com *amplicom* de 400 pb, usando-se o sistema de amplificação *Primer Walking*.

A extração do DNA foi realizada com amostras controle, de acordo com Doyle; Doyle (1987). Foram macerados 100 mg de folhas frescas e adicionado, 900 µL de tampão de CTAB 2% na amostra e incubação em banho-maria a 60 °C, por 45-60 minutos. Após esse período, foi adicionado 900 µL de clorofórmio:álcool

isoamílico (24:1) e centrifugada a 12.000 g por 10 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para novos tubos e adicionado igual volume de etanol gelado. Após mistura por inversão 50 vezes, deixou-se overnight a -20 °C. A seguir as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min. O precipitado formado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e após descarte do sobrenadante nova lavagem com 300 µL de etanol 100 %. Verteu-se novamente o sobrenadante e deixou-se secar o pellet a temperatura ambiente e posteriormente adicionou-se 30 µL de TE + RNase. A qualidade e quantidade do DNA extraído das amostras foi verificado em gel de agarose 0,8 %, utilizando o marcador de peso molecular *Lambda DNA/HindIII*.

As reações de PCR foram realizadas em triplicata nas amostras controle de cada um dos genótipos, a partir da cada isoforma e *primer*, contendo, cada uma delas, um volume total de 20 µL. As condições de ciclagem foram: renaturação das amostras por 2 min a 50 °C e ativação da enzima *Taq Polymerase* por 10 min a 95 °C. Posteriormente, foram feitos 40 ciclos contendo três etapas (95 °C por 30s, 60 °C por 1 min e 72 °C por 1 min) e finalmente uma última etapa a 72 °C por 5 minutos. Após, usou-se o kit de purificação Wizard® Genomic DNA (em triplicata) e procedeu-se o sequenciamento pela empresa ACTGene Análises Moleculares.

2.10 Análise das sequencias da região promotora

Para a análise das sequências, utilizou-se o programa CodonCade Aligner, onde foi realizada a limpeza das mesmas e montagem dos *contigs*. Após, alinhou-se os *contings* no programa BLASTN do NCBI e o alinhamento do promotor da cultivar Nipponbare (molde) com o promotor dos genótipos estudados, a fim de identificar *cis*-elementos.

A identificação dos *cis*-elementos foi feita utilizando-se um programa PLANTCIS (Maia et al., unpublished data, actually available at http://microsatellite.org/cis_input.html), sendo considerados significativos os *cis*-elementos com valor de $Z \leq 5$, pelo teste de Zscore.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS

De acordo com os resultados da análise de variância, houve efeito significativo de interação entre os fatores para o conteúdo de peróxido de hidrogênio tanto no estresse salino quanto por baixa temperatura. Em relação aos níveis de H_2O_2 , o genótipo BRS Bojuru apresentou maior conteúdo quando submetida a 48 h e 72 h de estresse por sal, com um acréscimo de 1,8 e 2,0 vezes, respectivamente, quando comparado ao controle, diferindo significativamente dos tempos de 0 h, 6 h e 24 h (0,30; 0,37 e 0,38, respectivamente) de estresse. O genótipo BRS Pampa, apresentou menor nível de H_2O_2 no tempo de 24h (0,37) de estresse, diferindo somente do controle (0,57) (Figura 1A).

Em condições de baixa temperatura, foi observado decréscimo no conteúdo de peróxido de hidrogênio para os dois genótipos em todos os tempos de estresse, quando comparado ao controle, porém houve diferença significativa somente para o tempo de 24 horas de estresse, com um decréscimo de 4,7 vezes para o genótipo BRS Bojuru e 5,4 vezes para o genótipo BRS Pampa (Figura 1B).

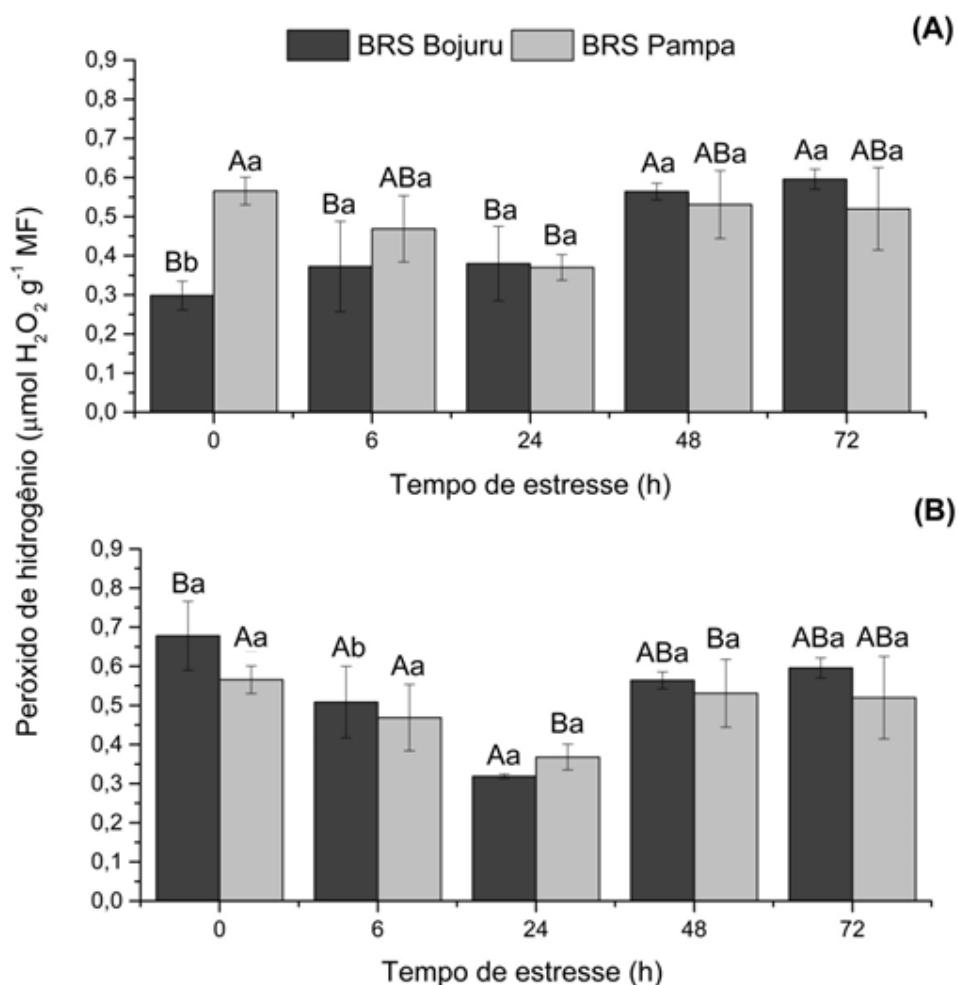


Figura 1- Teor de peróxido de hidrogênio em dois genótipos de arroz (BRS Bojuru e BRS Pampa) submetidos a condições de salinidade (150 mM de NaCl) (A) e baixa temperatura (13°C) (B) em diferentes tempos de estresse. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os diferentes genótipos dentre de cada tempo de estresse.

Observou-se interação significativa entre os fatores para a variável Peroxidação lipídica, para os dois estresses estudados. No genótipo Bojuru, considerado tolerante, os níveis de peroxidação lipídica diminuíram ao longo dos dias de estresse salino, quando comparado com as plantas controle. Já no genótipo sensível observou-se um comportamento distinto, ocorrendo aumento de 1,4 e 2,0 vezes nos tempos de 48 h e 72 h de estresse. Pode-se observar em relação aos genótipos, que houve diferença significativa entre todos os tempos de estresse, sendo que para o genótipo tolerante o maior nível de MDA ocorreu no tratamento

controle, enquanto que para os tempos restantes os maiores valores ocorreram na sensível (Figura 2A).

Para o estresse por baixa temperatura, observou-se aumento nos níveis de MDA para o genótipo BRS Bojuru, ocorrendo um aumento de 2,6 vezes no tempo de 24 h de estresse, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos. No genótipo BRS Pampa os níveis de MDA mantiveram-se constante no decorrer do estresse, com exceção do tempo de 48 h que apresentou um decréscimo de 7,5 vezes no conteúdo de MDA, quando comparado ao controle (Figura 2B).

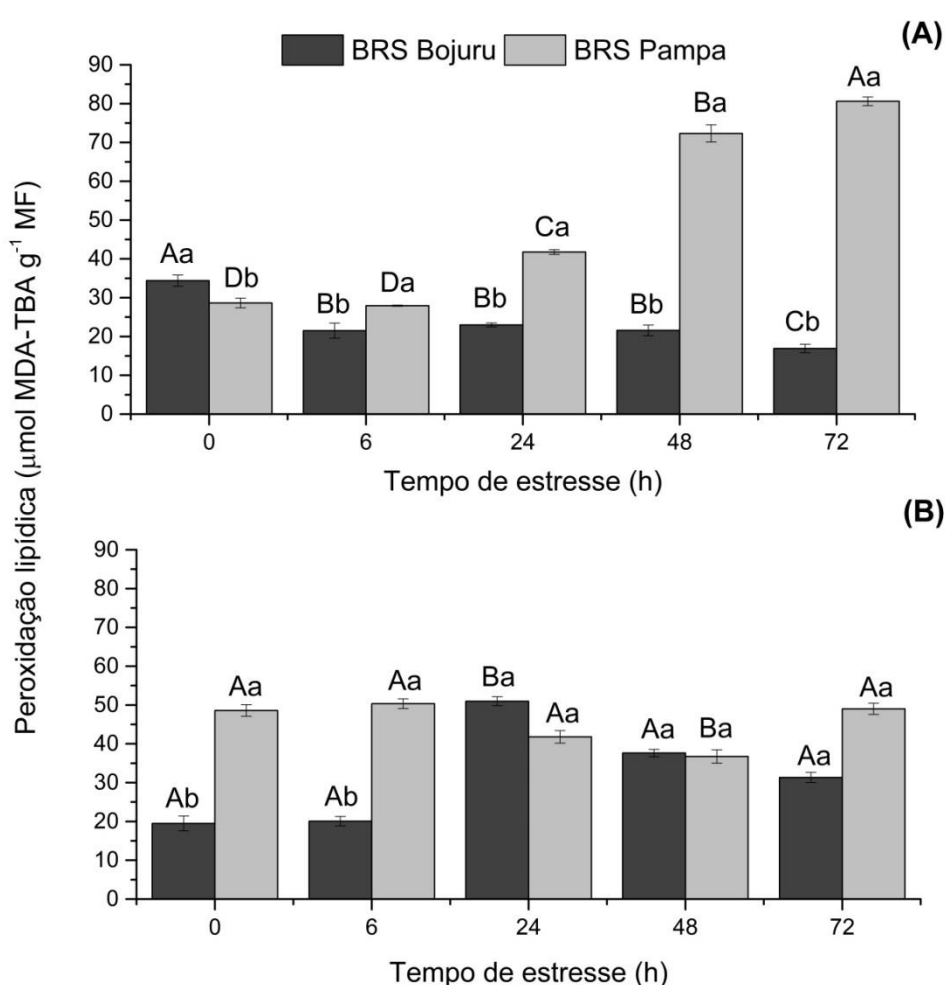


Figura 2- Teor da peroxidação lipídica (MDA) em dois genótipos de arroz (BRS Bojuru e BRS Pampa) submetidos a condições de salinidade (150 mM de NaCl) (A) e baixa temperatura (13°C) (B) em diferentes tempos de estresse. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os diferentes genótipos dentro de cada tempo de estresse.

4.1.1 Atividade da enzima catalase

Foi observado efeito significativo de interação entre os fatores para a atividade da CAT tanto para o estresse salino quanto por baixa temperatura. Para as plantas submetidas ao estresse por sal, foi observado aumento na atividade da CAT de 1.1 vezes no tempo de 72 h em relação ao controle para o genótipo BRS Bojuru (tolerante), e nos tempos de 6 h e 48 h para o genótipo BRS Pampa (sensível), porém este aumento não foi estatisticamente significativo em comparação com plantas do tratamento controle. Com relação aos genótipos houve diferença significativa somente nos tempos de 6 h e 48 h, sendo que o genótipo BRS Pampa apresentou maior atividade nesses tempos (Figura 3A).

Em condições de estresse por baixa temperatura, a atividade da enzima CAT aumentou a partir das 6 h de estresse para os dois genótipos em todos os tempos de tratamento. O genótipo BRS Bojuru, alcançou o mais alto nível de atividade no tempo de 24 h de estresse, ocorrendo um aumento de 1,4 vezes quando comparado ao controle. No genótipo BRS Pampa, os maiores valores de atividade foram observados nos tempos de 6 h e 72 h, havendo um aumento de 1,4 e 1,2 vezes, respectivamente, em relação ao controle. Comparando-se os genótipos, verificou-se diferença estatística entre ambos nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h (Figura 3B).

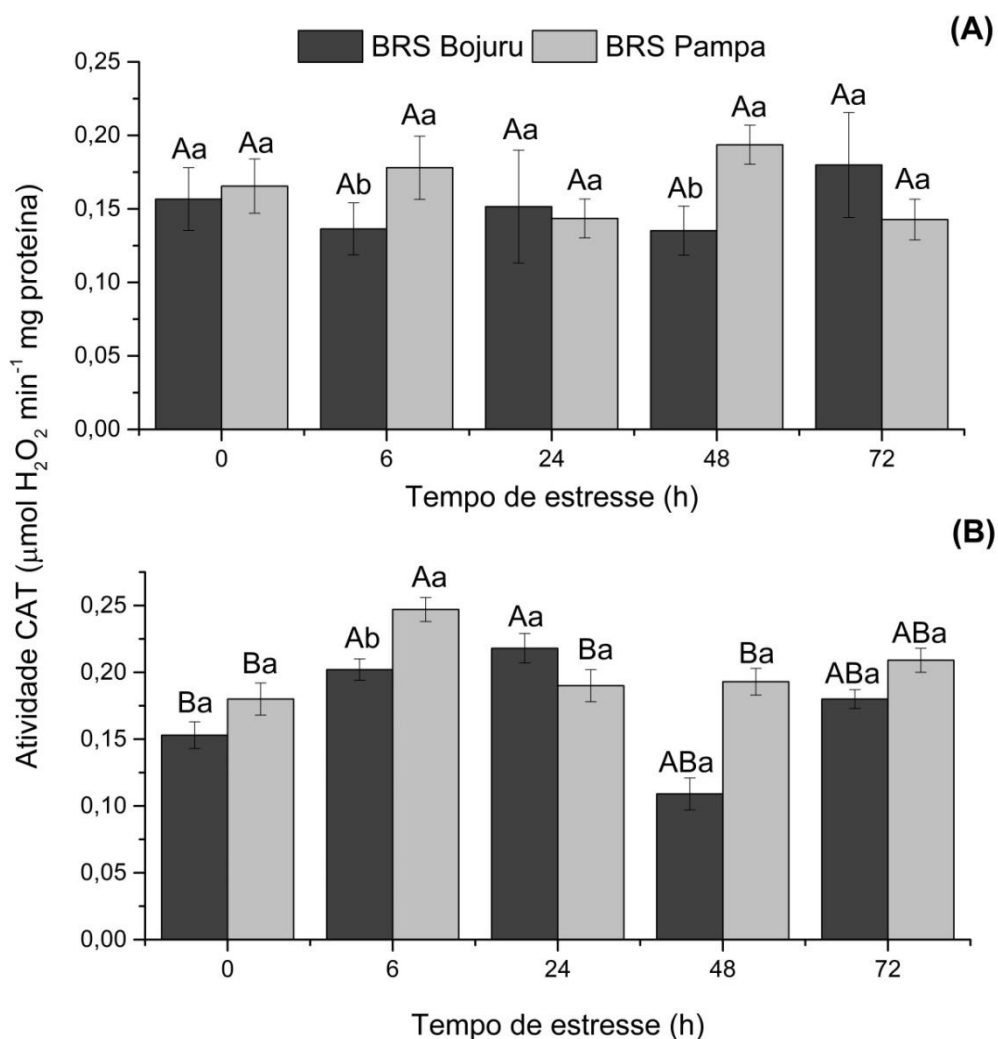


Figura 3- Atividade da enzima Catalase em dois genótipos de arroz (BRS Bojuru e BRS Pampa) submetido a condições de salinidade (150 mM de NaCl) (A) e baixa temperatura (13°C) (B) em diferentes tempos de estresse. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os diferentes genótipos dentro de cada tempo de estresse.

4.1.2 Expressão gênica dos genes codificadores das isoformas da CAT

Nos diferentes tempos de estresse por sal para o genótipo tolerante, observou-se maior valor de expressão dos genes homólogos *OsCATA* (QR=6,65) e *OsCATB* (QR=2,82) em plantas submetidas ao tratamento de 6 h com subsequente redução, enquanto que para o gene homólogo *OsCATC* somente o tempo de 48h apresentou valor acima do controle. Para o genótipo sensível, maiores valores de

QR foram observados para o gene homólogo *OsCATC* as 24 h e 48 h (QR=10,12 e QR=12,12, respectivamente) e *OsCATA* as 6 h e 24 h (QR=15,7 e QR=17,23; respectivamente) de estresse, enquanto que para o gene homólogo *OsCATB* o maior valor de expressão ocorreu no tempo inicial de estresse com subsequente redução nos demais tempos.

O gene homólogo *OsCATA*, apresentou aumento gradual nos níveis de mRNA ao longo do tempo de exposição ao frio, apresentando maior valor de expressão, 7,26 (genótipo tolerante) e 27,06 (genótipo sensível), às 72 h de estresse (Figura 4C e 4D). O gene homólogo *OsCATB*, apresentou para os dois genótipos, maior valores de transcritos nos tempos de 24 h (QR=18,0 genótipo tolerante; QR=7,47 genótipo sensível) e 72 h (QR=13,8 genótipo tolerante, QR=20,94 genótipo sensível) de estresse. Quanto ao gene homólogo *OSCATC*, foi possível observar que ele apresenta quantidade de transcritos inferior aos genes homólogos *OSCATB* e *OSCATC* e que seus maiores valores de expressão ocorreram no tempo de 48 h (QR=2,64) de estresse, para o genótipo tolerante e no tempo de 72 h (QR=3,49) para o genótipo sensível (Figuras 4C e 4D).

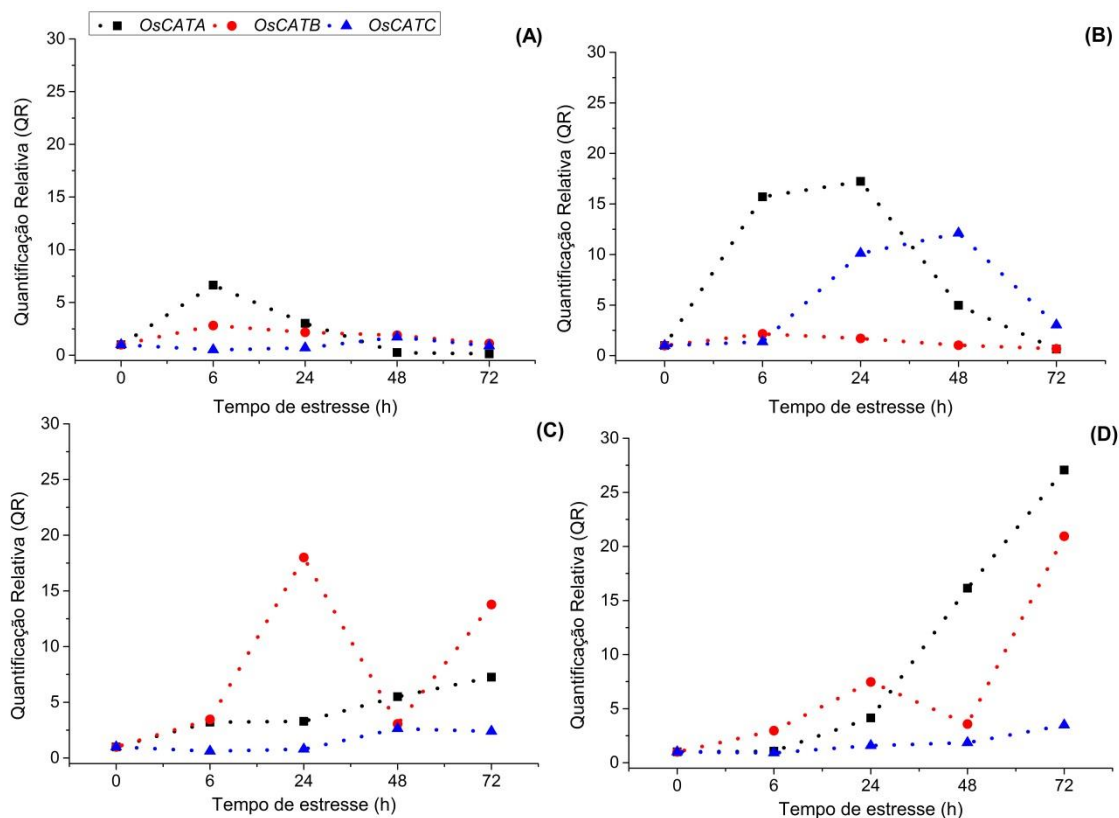


Figura 4- Expressão dos genes codificadores das três isoformas da catalase (CAT) em dois genótipos de arroz, BRS Bojuru (A e C) e BRS Pampa (B e D), submetido a condições de salinidade (150 mM de NaCl) (A e B) e baixa temperatura (13°C) (C e D) em diferentes tempos de estresse.

4.1.3 Análise de *Cis*-elementos

Foi visualizado diferentes *cis*-elementos presentes nas regiões promotoras dos genes *OsCATA*, *OsCATB*, *OsCATC*, para cada genótipo estudado. Foi identificado um total de 120 *cis*-elementos diferentes para o genótipo BRS Bojuru, distribuídos de acordo com a figura 5A. Do total de *cis*-elementos encontrados, foram selecionados seis deles (ABRERATCAL, ANAERO2CONSENSUS, ANAERO3CONSENSUS, CAREOSREP1, DRECRTCOREAT e TATABOXOSPAL) na região promotora do gene *OsCATA*, dois (ACGTABOX e ACGTOSGLUB1) na região promotora do gene *OsCATB* e cinco (AMYBOX1, GARE1OSREP1, MYCATRD22, TATCCAOSAMY e TATCCAYMOTIFOSRAMY3D) na região promotora do gene *OsCATC*.

Para o genótipo BRS Pampa identificou-se um total de 112 *cis*-elementos diferentes, distribuídos de acordo com a Figura 5B, no qual se selecionou, na região

promotora do gene *OsCATA*, o *cis*-elemento ANAERO3CONSENSUS, que também foi encontrado no genótipo BRS Bojuru. Na região promotora do gene *OsCATB* foram selecionados três *cis*-elementos (ABREOSRAB21, ABRERATCAL, CGACGOSAMY3) e na região promotora do gene *OsCATC*, seis (ANAERO2CONSENSUS, E2FCONSENSUS, MYCATRD22, PREATPROD, PROLAMINBOXOSGLUB1, WUSATAg). Todos os *cis*-elementos encontrados neste trabalho estão listados nas Tabelas suplementares (ANEXOS 1 e 2)

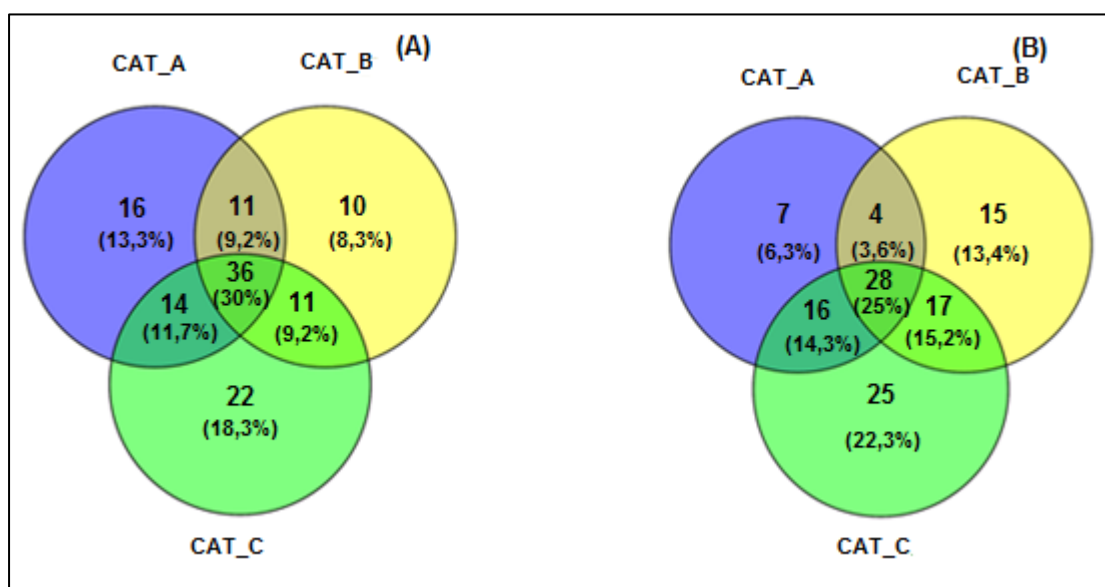


Figura 5- Diagrama de Venn ilustrando a distribuição de *cis*-elementos na região promotora (1200 pb) dos genes *OsCATA*, *OsCATB* e *OsCATC* para o genótipo BRS Bojuru (A) e para o genótipo BRS Pampa (B).

Com relação aos diferentes *cis*-elementos de cada gene homólogo da Catalase entre os genótipos, observou-se que o genótipo BRS Bojuru apresentou um maior número de *cis*-elementos no promotor dos genes *OsCATA* e *OsCATB* e que o genótipo BRS Pampa mostrou maior número de *cis*-elementos no promotor do gene *OsCATC* (Figura 6). Dentre os *cis*-elementos selecionados para a isoforma *OsCATA* encontrados no genótipo BRS Bojuru, pode-se citar: ABRERATCAL, ANAERO2CONSENSUS, ANAERO3CONSENSUS, CAREOSREP1, DRECRCTCOREAT, TATABOXOSPAL, E2FCONSENSUS e MYB2CONSENSUSAT e para o genótipo BRS Pampa: ACGTABOX, ACGTOSGLUB1, CGACGOSAMY3, MYCATERD1 e PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A. Com relação ao gene homólogo *OsCATB*, os *cis* elementos selecionados para o genótipo BRS Bojuru foram:

ACGTOSGLUB1, MYBCORE, MYCATERD1, MYCCONSENSUSAT e para o genótipo BRS Pampa: ABREOSRAB21, ABRERATCAL, ACGTCBOX. Já para o gene homólogo *OsCATC*, foram selecionados para o genótipo BRS Bojuru os *cis*-elementos; AMYBOX1, BIHD1OS, CGACGOSAMY3, GARE1OSREP1, GCN4OSGLUB1, MYCATERD1, PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A, ATCCAOSAMY, TATCCAYMOTIFOSRAMY3D e para o genótipo BRS Pampa; ABRELATERD1, ACGTABOX, ANAERO1CONSENSUS, ANAERO2CONSENSUS, WRKY71OS e WUSATAg.

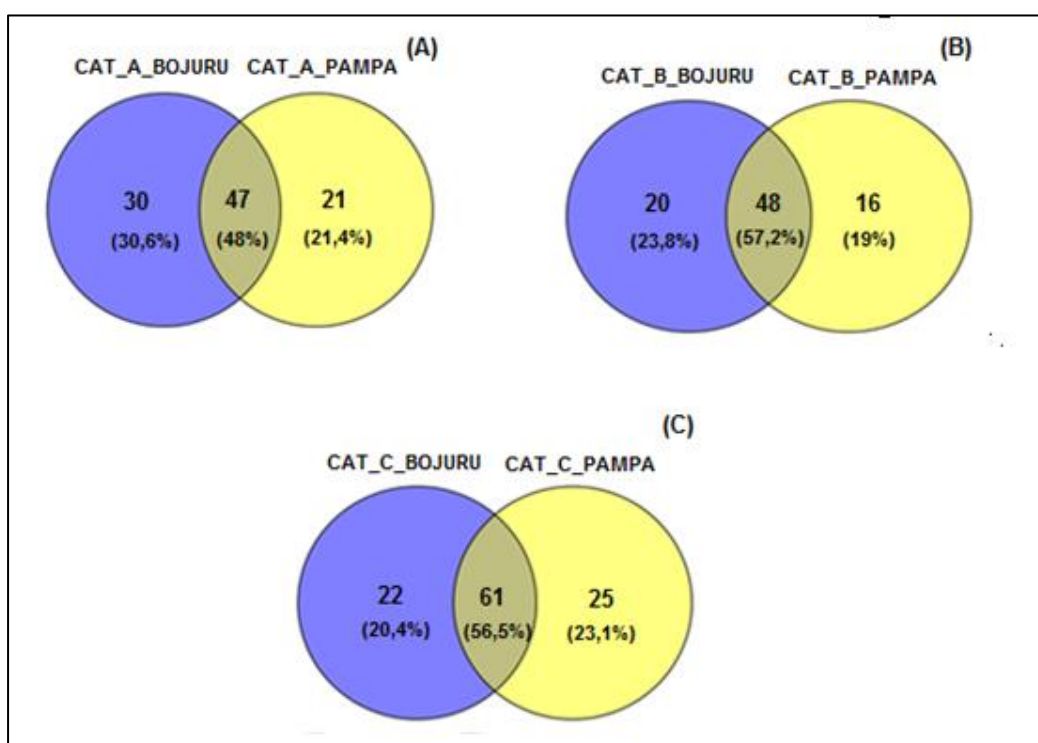


Figura 6- Diagrama de Venn ilustrando a distribuição de *cis*-elementos na região promotora (1200 pb) dos genes *OsCATA* (A), *OsCATB* (B) e *OsCATC* (C) para o genótipo BRS Bojuru e para o genótipo BRS Pampa.

4.2 DISCUSSÃO

Estresses ambientais podem desencadear nas plantas o estresse oxidativo, gerando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Apesar das EROs ter o potencial de causar danos oxidativos, estudos têm demonstrado que elas desempenham papel de sinalizador molecular das condições ambientais, em particular ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MITTLER, 2002; MILLER et al., 2008).

De acordo com Yun et al. (2010) a expressão gênica mediada pelo estresse oxidativo ocorre durante as horas iniciais de tratamento por frio e que o H_2O_2 age como um sinal nesta resposta.

Neste estudo foi observado, para o genótipo tolerante, aumento nos níveis de H_2O_2 quando as plantas foram submetidas ao estresse salino e decréscimo frente ao estresse por baixa temperatura. Os níveis de peroxidação lipídica diminuíram ao longo dos dias de estresse salino e aumentaram quando as plantas foram submetidas à baixa temperatura. O estresse oxidativo induzido pela salinidade e pela baixa temperatura pode causar intensa peroxidação lipídica, no entanto, a intensidade dos danos oxidativos pode variar dependendo de quão rápida é a proteção oxidativa (MUNNS; TESTER, 2008). Foi observado aumento na atividade enzimática da catalase para os dois estresses testados, para o genótipos tolerante, no entanto quando as plantas foram submetidas ao estresse por sal os níveis de MDA diminuíram, sugerindo que o genótipo tolerante possa ter uma melhor proteção contra os danos oxidativos sob estresse salino e que esta proteção pode estar relacionada com o eficiente sistema antioxidante, evidenciado pelo aumento da atividade da enzima CAT, no final do estresse (Figura 3A).

Com relação ao genótipo sensível, observou-se diminuição nos níveis de H_2O_2 para as duas condições de estresse testadas. Tanto para o estresse salino quanto para o estresse por frio, alterações no conteúdo de peróxido de hidrogênio foram observadas já no início do estresse, atingindo valores mínimos no tempo de 24 horas, sendo observado um decréscimo maior quando as plantas foram submetidas ao estresse por baixa temperatura, quando comparado ao controle. Em estresse salino, ocorreu aumento nos níveis de MDA, já um comportamento distinto foi observado para o estresse por frio, onde os níveis de MDA mantiveram-se constante no decorrer dos tratamentos, com exceção do tempo de 24 h (Figuras 2A e 2B).

A CAT é uma das principais enzimas na eliminação do H_2O_2 gerado durante a fotorrespiração e a β -oxidação dos ácidos graxos e pode ser encontrada nos peroxissomos, glioxissomos e organelas relacionadas (GARG; MANCHANDA, 2009). H_2O_2 é produzido nas células das plantas não apenas sob condições normais, mas também pelo stress oxidativo, provocado por diversos fatores ambientais (SHARMA et al, 2012).

Neste trabalho foi observado o aumento na atividade enzimática da CAT e diminuição das EROs, em ambos estresse para o genótipo sensível, porém os níveis de MDA não foram afetados no decorrer do estresse por frio, mas aumentou significativamente quando em estresse salino, sugerindo que as plantas do genótipo BRS Pampa são melhor protegidas contra o dano oxidativo, quando submetidas a baixa temperatura. Por outro lado, o aumento no teor de MDA, demonstra que embora tenha ocorrido aumento na atividade CAT nos diferentes tempos de estresse a defesa dessa enzima foi insuficiente para suprimir o aumento na produção de EROs que pode ser resultante do estresse, do aumento da fotorrespiração ou difusão de outros compartimentos celulares. Resultados semelhantes foram obtidos por Turan et al. (2013), os quais observaram decréscimo nos níveis H_2O_2 e aumento na atividade da CAT e no teor de MDA em genótipos tolerantes e sensíveis ao estresse salino. Já os resultados obtidos por Huang; Guo (2005), indicaram que aumentos na atividade da CAT estão associados com a tolerância ao frio em genótipos de arroz. Tang et al. (2010), trabalhando com estresse por alagamento em genótipos contrastantes de milho, observaram, para os dois genótipos, decréscimo na atividade da CAT no final dos períodos de tratamento (de 6 a 10 dias), o que resultou em acúmulo de níveis elevados de H_2O_2 e um aumento na peroxidação lipídica, aumentando o conteúdo MDA e possivelmente induzindo danos. De acordo com Gondim et al. (2012), o aumento da atividade da CAT aparece estar ligada à regulação da expressão gênica, e o menor dano oxidativo foi detectada em plantas com maior atividade da CAT, considerando a função protetora desta enzima.

Há uma evidência crescente dos múltiplos papéis da catalase em uma variedade de tecidos em diferentes estádios de desenvolvimento e seu envolvimento nas vias de transdução de sinal em respostas a vários estresses (FUKAMATSU et al., 2003; VERSLUES et al., 2007).

Nossos resultados sugerem que aumentos nos níveis dos transcritos *OsCATA* e *OsCATC* contribuíram para manter a atividade da enzima catalase no genótipo sensível quando as plantas foram submetidas à salinidade. No entanto em baixa temperatura, os genes *OSCATA* e *OSCATB* foram os que contribuíram para o aumento da CAT. No genótipo tolerante, o aumento na atividade da CAT pode estar relacionada aos genes *OsCATA* e *OsCATB*, sendo o gene homólogo *OsCATB* a mais responsiva ao estresse por frio. Já Yamane et al. (2010), trabalhando com

estresse salino em arroz, observaram que o aumento na atividade da enzima CAT pode estar relacionada com a expressão dos níveis de transcritos dos genes homólogos *OsCATB* e *OsCATC*, em genótipos tolerantes. Neste estudo foi observado que os níveis de transcritos não foram diretamente correlacionados com a atividade da enzima quando as plantas foram expostas à salinidade, indicando que os níveis de mRNA nem sempre estão correlacionadas com as proteínas correspondentes, em parte devido à regulação pós-transcricional.

Com o intuito de elucidar o mecanismo de tolerância ao estresse oxidativo e identificação de tolerância cruzada, Chakraborty; Bhattacharjee (2015) trabalharam com genótipos contrastantes de arroz à salinidade e em condições extremas de temperatura. Esses autores observaram que ocorreu aumento na atividade da enzima CAT e na expressão gênica do gene homólogo *OsCATA* nos dois genótipos testados, quando submetidos ao estresse por frio e calor. Porém, esses aumentos foram maiores no genótipo tolerante contrariando os resultados do presente trabalho, onde o genótipo sensível apresentou maiores níveis de atividade da catalase e expressão dos genes homólogos para os dois estresses testados, embora o estresse por baixa temperatura tenha apresentado valores mais expressivos. Turan; Tripathy (2013), também observaram uma correlação com o aumento da atividade da CAT e os níveis de transcritos do gene homólogo *OsCATA* para genótipos de arroz tolerantes e sensíveis a salinidade. No entanto, é importante salientar que a atividade de uma enzima representa o efeito cumulativo da expressão que se localizam em diferentes compartimentos celulares.

Os elementos *cis* funcionam como interruptores moleculares em resposta aos sinais de estresse do ambiente e estão envolvidos na regulação transcricional de uma rede dinâmica de genes que controlam vários processos biológicos, incluindo resposta a estresses abióticos, hormônios e processos de desenvolvimento (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Existem dois principais elementos de ação *cis* que funcionam na regulação da expressão gênica em resposta a estresses osmóticos e de temperatura: ABRE (*ABA responsive element*) e DRE (*dehydration responsive element*) – ABA-dependente e ABA-independente, respectivamente. As vias de sinalização ABA-dependentes têm sido descritas como vias que medeiam a adaptação ao estresse pela ativação de, pelo menos, dois grupos diferentes: (I) o ABRE/ABF (*ABA-responsive element-*

binding protein/ABA-binding factor) e (ii) o MYC/MYB (ABE et al, 1997;. BUSK; PAGE'S, 1998). Já as vias de sinalização ABA-independente são descritas como: (i) CBF/DREB (*cold-binding factor/dehydration responsive elemento binding*) e (ii) o NAC e ZF-HD (*zinc-finger homeodomain*) (SAIBO et al., 2009). De acordo com Lata; Prasad (2011), embora as vias de resposta aos diferentes estresses normalmente funcionam de forma independente, é possível que exista algum nível de *cross-talk* entre eles.

Dentre os genes responsivos ao estresse osmótico regulados por vias de sinalização ABA-dependentes e ABA independentes encontrados neste trabalho pode-se citar: ABRERATCAL, ABREOSRAB21, ABRELATERD1, DRECRTCOREAT, AMYBOX1, MYCATRD22, MYB2CONSENSUSAT, MYBCORE, MYCATERD1, MYCCONSENSUSAT. Os dados de expressão obtidos neste trabalho mostrou que o gene homólogo *OsCATA* apresentou melhor resultado quanto aos níveis de transcritos para ambos os estresses estudados, o que pode estar relacionado com os *cis*-elementos encontrados na região promotora do gene *OsCATA*. No entanto, foi encontrado um maior número de *cis*-elementos (ABRERATCAL, DRECRTCOREAT e MYB2CONSENSUSAT) para o genótipo BRS Bojuru quando comparado com o genótipo BRS Pampa (MYCATERD1). Na região promotora dos genes *OsCATB* e *OsCATC*, para os genótipos estudados, também verificou-se a presença de *cis*-elementos sinalizados por vias ABA-dependentes e ABA-independentes. De acordo com Lee et al. (2002), a interação de *cis*-elementos com fatores de transcrição leva à ativação ou à repressão da expressão gênica em resposta a fatores ambientais ou de desenvolvimento. Dubouzet et al. (2003), trabalhando com arroz, isolaram cinco cDNAs para homólogos DREB e observaram que a expressão dos *cis* elementos *OsDREB1A* e *OsDREB1B* foram induzida pelo frio, enquanto que a expressão do *cis*-elementos *OsDREB2A* foi induzida pela desidratação e por salinidade. Segundo Nakashima; Yamaguchi-Shinozaki (2010), DRE/CRT é um dos principais elementos de atuação *cis* que funcionam na expressão dos genes não-responsivos durante estresses abióticos. Estudos realizados com *Arabidopsis* por Abe et al. (2003), indicaram que proteínas *AtMYC2* e *AtMYB2* funcionam como ativadores transcripcionais na expressão dos genes sob estresse por seca em plantas.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se que; (i) o aumento da CAT, no genótipo BRs Pampa (sensível) em ambos os estresses, indicou uma maior proteção contra danos oxidativos, como demonstrado pela menor produção de EROs, no entanto percebeu-se que o genótipo sensível foi mais responsivo frente ao estresse por frio; (ii) sob estresse por frio, os genes homólogos *OsCATA* e *OsCATB* apresentaram maiores níveis de transcritos no genótipo sensível, contribuindo para o aumento da atividade da enzima catalase, portanto, está relacionada na defesa dos genótipos ao estresse por frio; o gene homólogo *OsCATC* foi mais responsivo ao estresse salino, para o genótipo BRS Pampa; (iii) a presença dos *cis*-elementos ABRRATCAL, ABREOSRAB21, ABRELATERD1, DRECRTCOREAT, AMYBOX1, MYCATRD22, MYB2CONSENSUSAT, MYBCORE, MYCATERD1, MYCCONSENSUSAT, e MYB2CONSENSUSAT, provavelmente estão relacionados à expressão dos genes homólogos *OsCATA*, *OsCATB* e *OsCATC* em resposta aos estresses por frio e salinidade.

CAPÍTULO 3

Metabolismo de prolina: regulação em condições de salinidade e baixa temperatura

1 INTRODUÇÃO

As respostas das plantas às condições de estresse abiótico têm despertado grande interesse das pesquisas, as quais buscam constantemente por genótipos mais produtivos sob ambientes desfavoráveis (MONTEIRO et al., 2014). Quando cultivadas em condições de estresse, as plantas sofrem danos metabólicos e fisiológicos prejudiciais ao seu pleno crescimento e desenvolvimento (QIN et al., 2015). Assim, pesquisas que tratam do tema são necessárias para maior compreensão dos mecanismos de adaptação das plantas a ambientes não favoráveis de cultivo, os quais, devido às constantes mudanças climáticas, serão cada vez mais frequentes (KUMAR et al., 2011; FARIDUDDIN et al., 2013).

Seca, alta salinidade e baixa temperatura são algumas das condições ambientais que têm efeito adverso sobre a produtividade da maioria das culturas, com destaque principal à cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2006). O estresse salino inibe o crescimento e desenvolvimento das plantas causando: estresse osmótico, devido à redução na disponibilidade de água; toxicidade iônica, pelo acúmulo de sódio e desbalanço nutricional; estresse oxidativo, através da formação de espécies reativas de oxigênio e desbalanço hormonal (SILVA-ORTEGA et al., 2008). O estresse por baixa temperatura é um problema que atinge plantas de arroz em 25 países, com impactos negativos na produtividade (CRUZ et al., 2013). As baixas temperaturas causam clorose, necrose, mudanças no teor de clorofila e fluorescência, alterações na estrutura e composição lipídica da membrana celular, além de aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de malondialdeído (MDA), causando dano

oxidativo celular (THEOCHARIS et al., 2012; ZHANG et al., 2014). Ambos os estresses, salinidade e baixa temperatura, causam, além dos efeitos acima citados, estresse osmótico, exigindo que as plantas acionem o ajuste osmótico para manter o potencial hídrico, turgor e homeostase celular.

O ajuste osmótico é um mecanismo fisiológico que se estabelece mediante o acúmulo, no vacúolo ou no citosol, de solutos compatíveis, como prolina, glicina betaína, trealose e sacarose, que contribuem para a manutenção do equilíbrio hídrico e preservação da integridade de proteínas, enzimas e membranas celulares em condições de estresse (ASHRAF et al., 2011; MARIJUAN e BOSCH, 2013). O aminoácido prolina é o soluto compatível mais estudado, em razão de sua sensibilidade de resposta às condições adversas, como salinidade, déficit hídrico e baixa temperatura (TROVATTO et al., 2008; VERBRUGGEN e HERMANS, 2008; ASHRAF et al., 2011).

Em plantas, a prolina é sintetizada, principalmente, a partir do glutamato, o qual é reduzido a glutamato-semialdeído (GSA) pela enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) e, espontaneamente convertido a pirrolina-5-carboxilato (P5C). Na sequência, a enzima P5C redutase (P5CR) reduz P5C em prolina. Na maioria das espécies de plantas, P5CS e P5CR são codificadas por dois e um gene, respectivamente (VERBRUGGEN et al., 1993; SAVOURÉ et al., 1995; ARMENGAUD et al., 2004; SZABADOS e SAVOURÉ, 2010). A biossíntese de prolina ocorre, geralmente, no citosol de maneira constitutiva, sendo controlada pelo gene *P5CS2*. Por outro lado, em condições de estresse, sua biossíntese é aumentada nos cloroplastos, sendo controlada, principalmente, pelo gene *P5CS1* (SZÉKELY et al., 2008).

O catabolismo de prolina ocorre nas mitocôndrias pela ação sequencial das enzimas pirrolina desidrogenase (PDH) e P5C desidrogenase (P5CDH), que converte P5C em glutamato. PDH é codificada por dois genes, enquanto que um único gene *P5CDH* foi identificado em *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* (RIBARITS et al., 2007). Como alternativa, a prolina pode ser sintetizada a partir da ornitina, a qual é transaminada pela ornitina-delta-aminotransferase (OAT) (DELAUNEY et al., 1993; SZABADOS e SAVOURÉ, 2010).

De acordo com Xue et al. (2009), a produção de prolina é ativada e seu catabolismo reprimido durante estresse. Uma vez reestabelecida a condição ideal é

acionada a regulação oposta. No entanto, em algumas espécies, os dados nem sempre indicam uma correlação positiva entre o acúmulo de prolina e adaptação ao estresse. Em estudos com arroz, os dados são particularmente contraditórios. Alguns autores sugerem que o acúmulo de prolina pode estar relacionado com o grau de tolerância, enquanto outros sugeriram que o acúmulo deste aminoácido é um “sintoma” das injúrias causadas, ao invés de um indicador de tolerância (Hien et al., 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar o metabolismo de prolina em plantas de arroz, através do padrão de expressão dos genes envolvidos na biossíntese e catabolismo desse aminoácido e verificar se a quantidade de transcritos está diretamente relacionada com o conteúdo de prolina produzido em condições de salinidade e baixa temperatura. Embora existam vários estudos sobre o papel da prolina em resposta a estresses abióticos, vale ressaltar que o diferencial deste estudo está no fato de estudar a expressão simultânea de todos os genes envolvidos na rota de prolina e não genes isolados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de estresse

Os experimentos foram conduzidos com dois genótipos brasileiros de arroz que apresentam resposta contrastante aos estresses por salinidade e baixa temperatura: BRS Pampa (subespécie *indica* – sensível) e BRS Bojuru (subespécie *japonica* - tolerante).

As sementes foram germinadas em rolo de papel *germitest* a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 dias em câmara de germinação climatizada. Posteriormente, para simular o estresse salino, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação com temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ em sistema de cultivo hidropônico do tipo *floating* com bandejas contendo 20 litros de solução nutritiva de Yoshida et al. (1976). Foram utilizadas três bandejas/genótipo com 50 plântulas, permanecendo nestas condições até apresentarem quatro folhas (estádio V4). Após este período foi adicionado 150 mM de NaCl à solução nutritiva, conforme Singh et al. (2010), permanecendo nestas condições durante 72 horas para a realização das coletas.

Para o estresse por baixa temperatura, as plântulas foram transferidas para bandejas plásticas (3L) contendo solo comercial adubado conforme as recomendações para a cultura do arroz irrigado. Foram utilizadas três bandejas/genótipo com 50 plântulas, as quais foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e irrigadas com solução nutritiva de Yoshida (1976) até as plantas apresentarem quatro folhas (estádio V4). Após este período, as plantas do tratamento controle foram coletadas e as bandejas restantes foram transferidas para câmara de crescimento com temperatura de 13°C onde permaneceram durante 72 horas para as coletas.

A coleta do material para as análises (folhas) foi realizada da seguinte forma para os dois estresses: C1 (coleta 1) 0 hora = plantas não expostas ao estresse por frio ou sal; C2 = 6 horas de estresse; C3 = 24 horas de estresse; C4 = 48 horas de estresse e C5 = 72 horas de estresse. O delineamento experimental foi completamente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2×5 (2 genótipos \times 5 tempos de exposição ao estresse), com três repetições por tratamento. A unidade experimental foi composta por um *bulk* de 10 plantas. A análise estatística dos estresses foi realizada separadamente.

2.2 Quantificação do conteúdo de prolina livre

Para a determinação do conteúdo de prolina foi utilizada a metodologia descrita por Bates et al. (1973), com algumas modificações. Aproximadamente 0.5 g de tecido foliar foram homogeneizados com 2 mL de solução aquosa de ácido sulfossalicílico 3% (p/v) e, em seguida, centrifugados a 4000 g por 20 minutos. Em tubos de ensaio, adicionou-se 1 mL do sobrenadante, 2 mL de ácido glacial acético, 2 mL de ninhidrina ácida e 2 mL de água destilada, os quais foram mantidos em banho-maria a 100°C por 60 minutos. Após este período os tubos foram resfriados em banho de gelo e adicionados 4 mL de tolueno. As amostras foram agitadas vigorosamente e ao atingir a temperatura ambiente procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 520 nm. As absorbâncias obtidas foram comparadas com a curva padrão de prolina e os resultados expressos em μmol prolina g^{-1} MF (massa fresca). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey (5%) utilizando o programa estatístico SAS 9.3 (SAS Institute, Cary NC).

2.3 Extração de RNA, síntese de cDNA e desenho de *primers*

O RNA total foi extraído a partir de 0.1 g de folhas utilizando-se o reagente *PureLink® Kit* (Invitrogen™). Para eliminação total de resíduos de DNAs as amostras foram tratadas com *DNase I* (Invitrogen™). A qualidade, concentração e pureza do RNA total foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% e NanoDrop ND-1000. Cada amostra foi reversamente transcrita em cDNA usando o kit comercial *SuperScript First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen™).

Foram desenhados *primers* na região transcrita dos genes de arroz envolvidos na biossíntese (*P5CS1*; *P5CS2*; *P5CR* e *OAT*) e catabolismo de prolina ((*P5CDH*, *PDH*), utilizando as sequências depositadas no banco de dados *RAP-DB* e o programa PerlPrimer v.1.1.21. Como normalizador interno das reações de RT-qPCR utilizou-se o gene *UBQ10*, previamente testado para as condições experimentais (MORAES et al., 2015). Somente iniciadores que apresentaram curva de dissociação com pico único e eficiência de amplificação próxima a 100% foram utilizados neste estudo (Tabela 1).

2.4 Reações de RT-qPCR

O volume total das reações foi de 12 µL, sendo 6.25 µL do fluoróforo SYBR Green (Roche®), 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 reações foram realizadas em Termociclador Bio-Rad CFX Real Time, utilizando-se os seguintes parâmetros de amplificação: 95°C por 10 minutos, 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. A quantificação relativa da expressão (QR) de cada gene foi obtida conforme descrito por Pfaffl (2001).

Tabela 1 - Sequência dos *primers* da biossíntese e catabolismo de prolina utilizados para análise de expressão gênica através de RT-qPCR. Temperatura de anelamento 60°C

Gene	RAP-DB	Senso/Antisenso	Amplicon (pb)
<i>P5CS1</i>	Os05t0455500-01 (AK101985)	5'AGAGATTGTTCAAGGCATCTACAG 3' 5' AACCAAAGGCTTCTCATATCCAG 3'	161
<i>P5CS2</i>	Os01t0848200-01 (AK101230)	5' GGTGATTATCCAGCAGCGT 3' 5' CCCGCCATAGATAACTACCC 3'	150
<i>P5CR</i>	Os01t0948400-01 (AK070184)	5' GTTGGTCTGGTCATCGAAGATT 3' 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

2.5 Análises de Correlação

Com a finalidade de mensurar a intensidade de correlação entre a expressão de cada gene do metabolismo de prolina e o conteúdo de prolina livre, foi calculado, para cada genótipo dentro de cada estresse, o coeficiente de correlação de Pearson, representado graficamente por *heatmaps*. As análises foram realizadas no software SAS v.9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC), através das rotinas *proc corr* e *proc sgrender*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados

3.1.1 Conteúdo de prolina livre

De acordo com os resultados da análise de variância, houve efeito significativo de interação entre os fatores para o conteúdo de prolina livre tanto no estresse por baixa temperatura quanto no estresse salino. O conteúdo de prolina aumentou a partir das 6 horas de estresse e alcançou o mais alto nível às 72 horas em ambos os genótipos em resposta ao tratamento com sal. No genótipo BRS

Pampa (sensível) os valores variaram de 1.62 a 3.53 μmol de prolina g^{-1} MF, com acréscimo de 2.2 vezes em comparação com o controle, enquanto que no genótipo BRS Bojuru (tolerante) o acréscimo foi de 3.2 vezes após 72 horas de estresse em relação ao controle. Confrontando-se os genótipos, verificou-se diferença estatística entre ambos nos tempos de 6 horas e 48 horas.

Em condições de baixa temperatura, foi observado aumento no conteúdo de prolina de 1.3 e 2.2 vezes no tempo de 72 horas em relação ao controle para BRS Pampa e BRS Bojuru, respectivamente, porém este aumento não foi estatisticamente significativo em comparação com plantas do tratamento controle. Para BRS Pampa houve diferença entre os tempos de 6 horas e 48 horas com o tempo de 72 horas, enquanto que para BRS Bojuru o tempo de 24 horas diferiu estatisticamente do tratamento controle e de 48 horas (Figura 1).

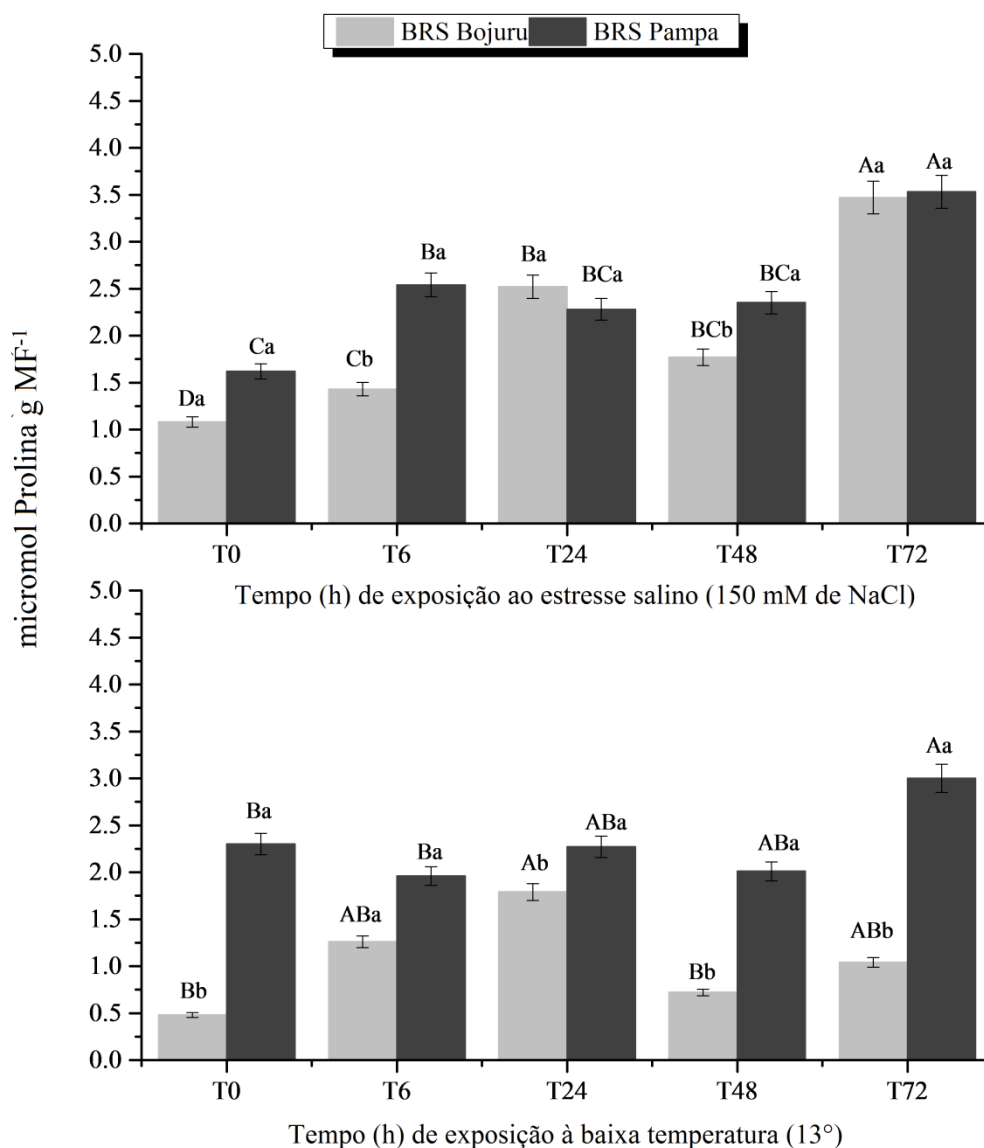


Figura 1 – Concentração de prolina livre em dois genótipos de arroz em condições de salinidade (150 mM de NaCl) e baixa temperatura (13°C). Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os genótipos dentre de cada tempo de estresse.

3.1.2 Expressão de genes do metabolismo de prolina

O aumento no conteúdo de prolina observado nos dois genótipos em condições de salinidade e baixa temperatura ocorreu, provavelmente, em consequência do aumento na expressão dos genes *P5CS1* e *P5CR* cujos os produtos estão envolvidos na biossíntese desse aminoácido, acompanhada por menores alterações na expressão de *P5CDH* e *PDH*, envolvidos no catabolismo mitocondrial de prolina (Figuras 2 e 3).

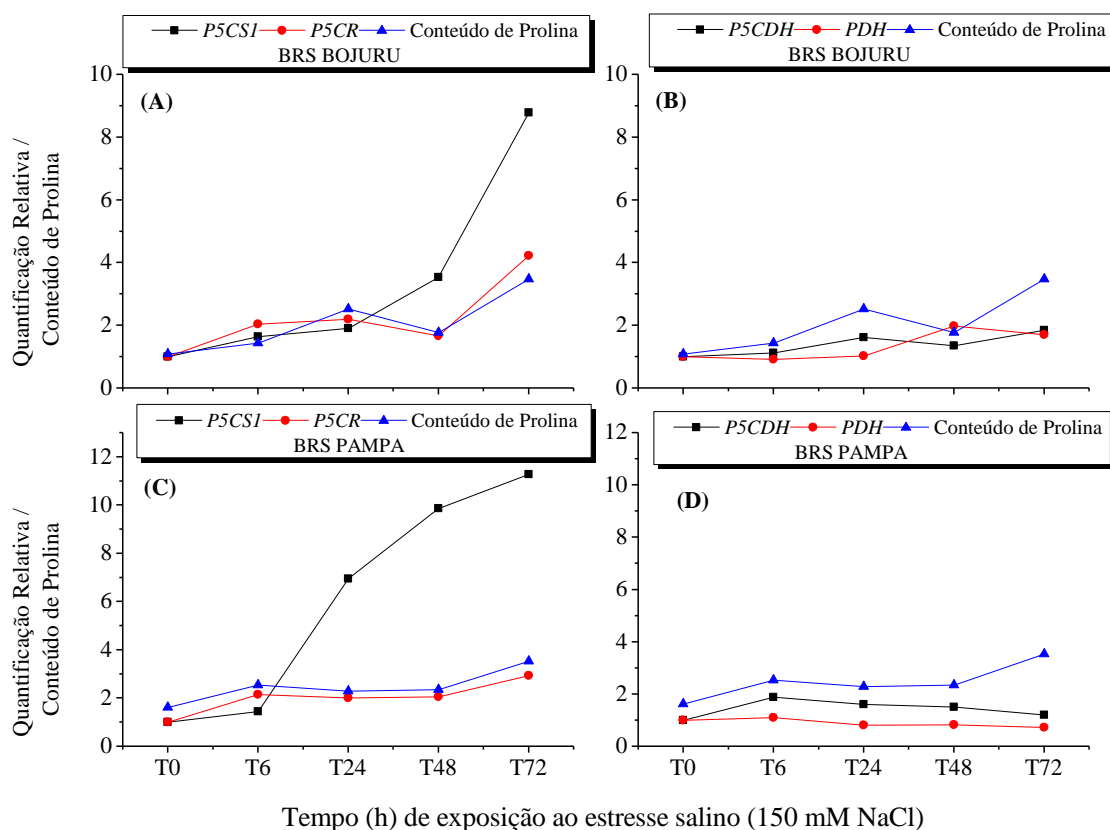


Figura 2 - Quantificação Relativa (QR) da expressão de genes codificadores da biossíntese (*P5CS1* e *P5CR*) e catabolismo (*P5CDH* e *PDH*) de prolina e quantificação do conteúdo de prolina livre nos genótipos de arroz BRS Bojuru (A e B) e BRS Pampa (C e D) em condições de salinidade (150 mM de NaCl).

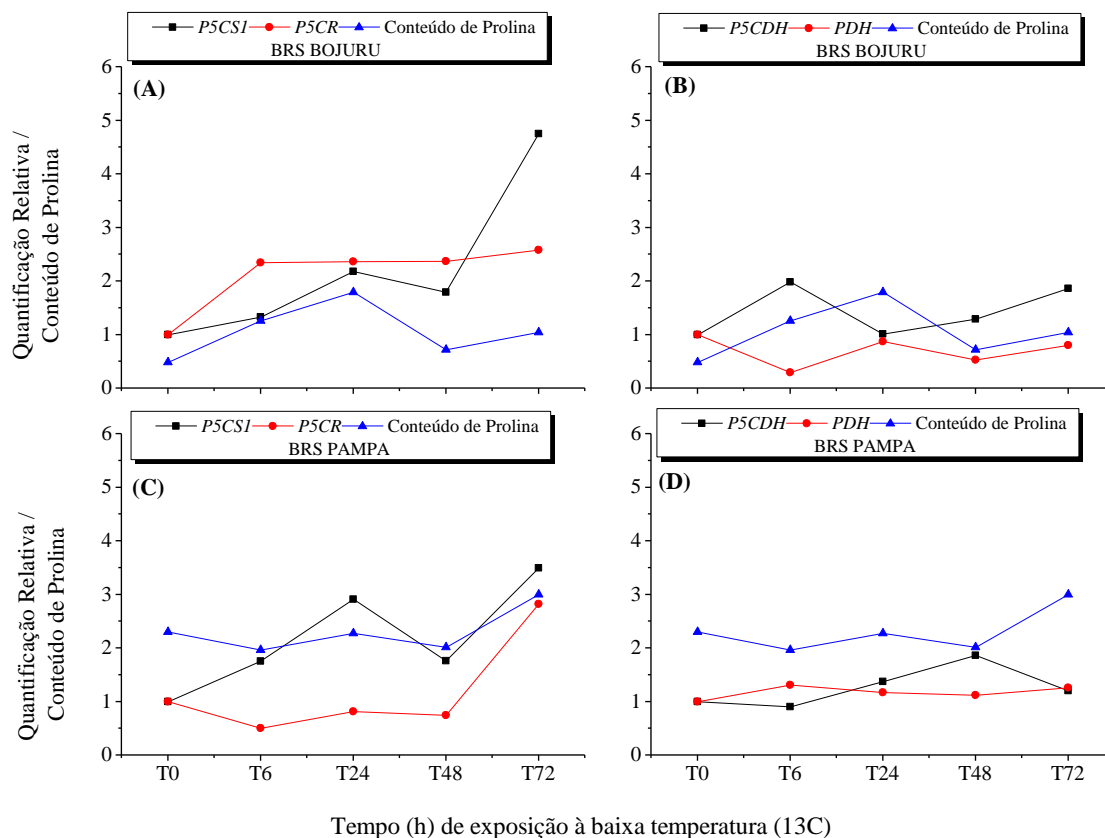


Figura 3 - Quantificação Relativa (QR) da expressão de genes codificadores da biossíntese (*P5CS1* e *P5CR*) e catabolismo (*P5CDH* e *PDH*) de prolina e quantificação do conteúdo de prolina livre nos genótipos de arroz BRS Bojuru (A e B) e BRS Pampa (C e D) em condições de baixa temperatura (13°C).

O gene *P5CS1*, cujo acúmulo de proteína em condições de estresse ocorre, preferencialmente, no cloroplasto, apresentou aumento gradual nos níveis de mRNA ao longo do tempo de exposição ao sal, tendo seu pico máximo, 8.78 e 11.28 nos genótipos tolerante e sensível, respectivamente, às 72 horas de estresse (Figura 2A e 2C). No tratamento com baixa temperatura, o gene *P5CS1* apresentou aumento na expressão em todos os tempos de estresse. No entanto, os maiores valores de quantificação relativa (QR) foram de 4.75 (genótipo tolerante) e 3.49 (genótipo sensível) vezes mais que o controle às 72 horas (Figura 3A e 3C). O gene *P5C* redutase (*P5CR*), cujo o produto reduz P5C em prolina, apresentou aumento de expressão com valores de QR = 4.22 e 2.93 vezes mais no genótipo tolerante e sensível sob salinidade, respectivamente, e de 2.58 e 2.82 sob baixa temperatura na última coleta (Figura 2A, 2C, 3A e 3C). No entanto, foi possível observar que em condições de frio, no genótipo sensível, a quantidade de transcritos de *P5CR* foi inferior ao controle nos tempos de 6 horas, 24 horas e 48 horas, aumentando às 72 horas (QR = 2.82) (Figuras 3C).

Para os genes P5C desidrogenase (*P5CDH*) e pirrolina desidrogenase (*PDH*), cujos produtos estão envolvidos no catabolismo de prolina, com a imposição do estresse, os valores de expressão foram inferiores aos observados nos genes de síntese, com valores de *P5CDH* e *PDH* variando entre 1.12 – 1.85 e 0.92 – 1.98 para BRS Bojuru e 1.20 – 1.88 e 0.73 – 1.10 para BRS Pampa (Figura 2B e 2D). Durante o estresse por baixa temperatura, a expressão de *P5CDH* em BRS Bojuru variou entre 1.01 e 1.98, assemelhando-se ao estresse salino, enquanto que *PDH* apresentou valores inferiores ao controle em todas as épocas de coleta. Em BRS Pampa, os níveis de expressão foram entre 0.91 – 1.86 (*P5CDH*) e 1.12 – 1.31 (*PDH*) (Figura 3B e 3D).

A biossíntese de prolina ocorre, também, pela atividade catalítica do homólogo *P5CS2* e via ornitina, pela atividade da enzima ornitina-delta-aminotransferase (*OAT*). O gene *P5CS2* cuja proteína acumula-se, preferencialmente, no citosol apresentou valores de expressão superiores no genótipo sensível ao estresse salino, atingindo o mais alto nível de mRNA às 72 horas de estresse (QR = 5.95). Por outro lado, o gene *OAT* apresentou-se mais responsivo no genótipo tolerante também às 72 horas (QR = 3.58) (Figura 4A e 4B). No tratamento com baixa temperatura os valores de expressão de *P5CS2* foram inferiores ao controle em todos os tempos de estresse em ambos os genótipos. No entanto, o mesmo não foi observado para *OAT*, o qual foi mais responsivo no genótipo tolerante às 48 horas de estresse (QR = 2.73) (Figuras 4C e 4D).

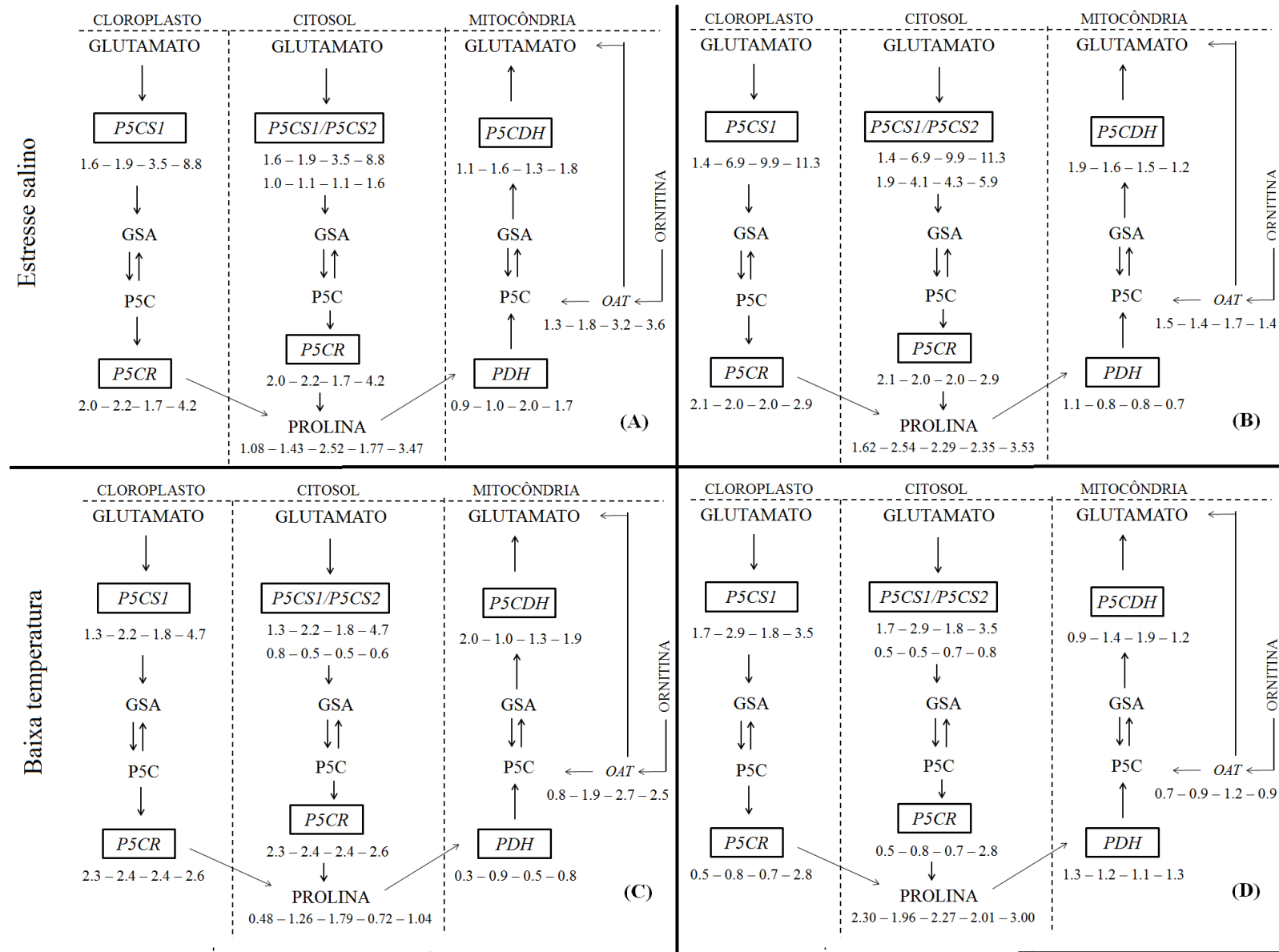


Figura 4 - Esquema do metabolismo de prolina com os respectivos valores de expressão relativa dos genes envolvidos e conteúdo de prolina em plantas de arroz dos genótipos BRS Bojuru (A e C) e BRS Pampa (B e D) em condições de salinidade e baixa temperatura.

3.1.3 Correlação

A amplitude de variação dos valores de correlação foi de 0.42 a 0.99, entre o conteúdo de prolina e a expressão de genes, para BRS Bojuru e de -0.54 a 0.97 para BRS Pampa frente ao estresse salino (Figura 5A e 5B). Deste modo, no genótipo tolerante, todas as correlações entre o conteúdo de prolina e a expressão gênica foram significativas, havendo alta correlação com *P5CDH*, *P5CS2* e *P5CR* e baixa correlação com *PDH*. Considerando os coeficientes de correlação entre os genes do metabolismo de prolina, *P5CS2* apresentou alta correlação com *P5CS1* (0.98) e *P5CR* (0.93), respectivamente. Valores similares foram encontrados para os pares *P5CS1/P5CR* (0.91) e *OAT/PDH* (0.92), enquanto que a correlação mais baixa foi observada no par *PDH/P5CR* (0.37) (Figura 5A).

Respostas contrastantes foram evidenciadas no genótipo sensível, para o qual foi encontrado valor de correlação negativa entre o conteúdo de prolina e o gene *PDH* (-0.54), enquanto que o gene *P5CS2* foi o que apresentou a maior correlação positiva com o conteúdo de prolina (0.97). Entre os genes envolvidos na biossíntese de prolina, *P5CS1* teve correlação de 0.73 com *P5CS2* e de -0.10 com *P5CR*. Para o gene *PDH*, com exceção de *PDH/P5CR*, estimativas de correlação negativa foram observadas entre *PDH* e todos os demais genes, com valores que variaram entre -0.28 (*PDH/OAT*) e -0.94 (*PDH/P5CS1*), indicando resposta contrastante de expressão dentro de cada par de genes. Analisando-se as correlações entre as demais combinações, observou-se que, para conteúdo de prolina/*P5CR*, *P5CS1/P5CR* e *P5CDH/P5CR* não foi observada correlação. Por outro lado, a estimativa de correlação entre conteúdo de prolina/*P5CS2* e *P5CS1/P5CDH* teve alta magnitude (0.97) (Figura 5B).

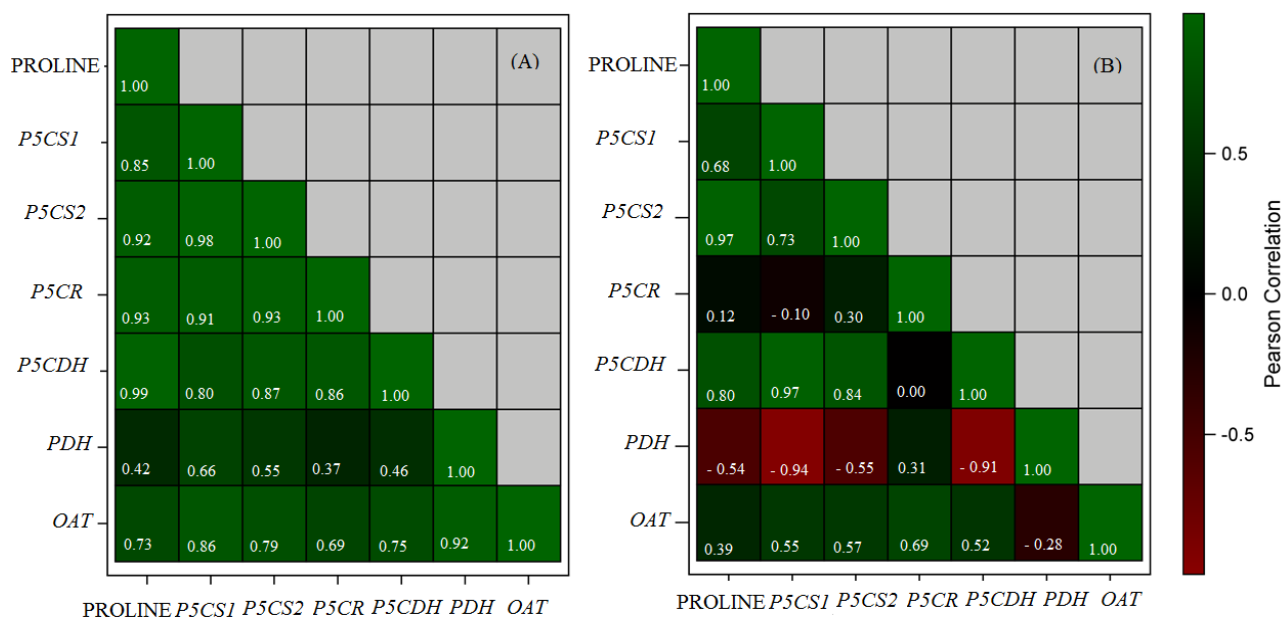


Figura 5 - Correlação de Pearson entre o conteúdo de prolina livre e a expressão de genes codificadores do metabolismo de prolina nos genótipos de arroz BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B) em condições de salinidade (150 mM de NaCl).

No tratamento por baixa temperatura, para o genótipo tolerante, os valores de correlação entre os genes analisados e o conteúdo de prolina foram baixos, sendo o maior valor entre *P5CR*/conteúdo de prolina (0.60), enquanto que o gene *P5CS2* foi o que menos se correlacionou com o conteúdo de prolina encontrado, com o valor de - 0.51. Analisando-se as combinações entre os genes, altas correlações negativas foram observadas com o gene *P5CS2*, sendo elas: *P5CS2/P5CR* (-0.85), *P5CS2/OAT* (-0.81) e *P5CS2/P5CS1* (- 0.48). Ausência de correlação foi constatada para *P5CS2/P5CDH* (-0.07), *OAT*/conteúdo de prolina (-0.01), *OAT/P5CDH* (-0.05), *OAT/PDH* (0.09) e *P5CDH*/conteúdo de prolina (0.10). Por outro lado, as demais combinações correlacionaram-se de maneira positiva, porém com valores inferiores aos encontrados no tratamento com NaCl (Figura 6A).

No genótipo sensível, o conteúdo de prolina apresentou correlação positiva com os genes *P5CS1* (0.70) e *P5CR* (0.97), enquanto que com *OAT* o valor foi negativo (- 0.48). Os genes envolvidos na biossíntese de prolina não apresentaram um alto índice de correlação entre si, visto que para *P5CS1/P5CS2* o valor foi de - 0.26, *P5CS1/P5CR* (0.68) e *P5CS2/P5CR* (0.48). A maioria das correlações negativas foi observada nas combinações com o gene *OAT* e ausência de correlação entre em combinações com *P5CDH* (Figura 6B). Comparando-se os dois

genótipos, observam-se respostas contrastantes, principalmente no que tange o conteúdo de prolina e a expressão dos genes de biossíntese de prolina (*P5CS1*, *P5CS2* e *P5CR*), cujas combinações apresentaram valores de correlação com tendências diferenciadas (Figura 6A e 6B).

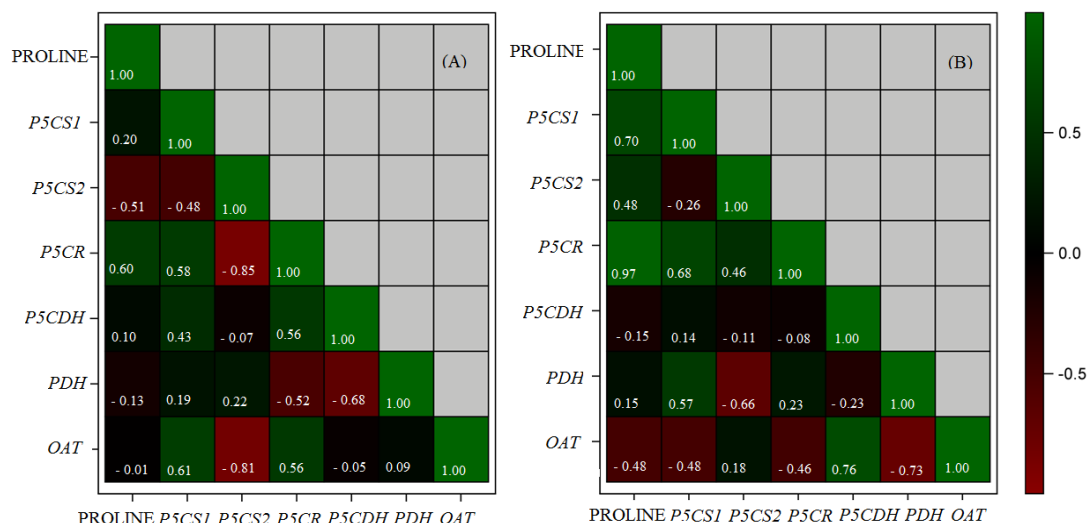


Figura 6 - Correlação de Pearson entre o conteúdo de prolina livre e expressão de genes codificadores do metabolismo de prolina nos genótipos de arroz BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B) em condições de baixa temperatura (13°C).

3.2 Discussão

O ajuste osmótico constitui um dos mecanismos fisiológicos mais eficazes para manutenção da turgescência celular mediante condições de baixo potencial hídrico no solo causado, entre outros, por seca, salinidade e baixa temperatura atmosférica (MARIJUAN e BOSCH, 2013). Este mecanismo se estabelece mediante o acúmulo de solutos compatíveis (prolina, glicina betaína, trealose, sacarose, poliaminas, manitol, pinitol) que contribuem para a manutenção do equilíbrio hídrico intracelular e a preservação da integridade de proteínas, enzimas e membranas celulares (ASHRAF et al., 2011). Neste trabalho, foi avaliado o metabolismo de prolina em plantas de arroz, através do padrão de expressão dos genes envolvidos na biossíntese e catabolismo desse aminoácido e verificado se a quantidade de transcritos está diretamente relacionada com o conteúdo de prolina produzido em condições de salinidade e baixa temperatura.

O aumento no conteúdo de prolina foi observado em ambos os genótipos e tratamentos, porém o acréscimo foi maior em BRS Bojuru (tolerante) frente às duas

condições experimentais testadas. Em estresse salino, as alterações no conteúdo de prolina ocorreram já no início do estresse, atingindo valores máximos no estresse severo (72 horas) nos dois genótipos, sendo observado aumento maior em relação ao controle, no genótipo tolerante. Em condições de baixa temperatura, observou-se também que o genótipo tolerante apresentou o dobro do aumento do genótipo sensível comparando-se plantas do tratamento controle com plantas expostas a 72 horas de frio. (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Hien et al. (2003), os quais observaram aumento relativo no teor de prolina em dois genótipos de arroz tolerantes à salinidade no período de 48 horas após a aplicação do estresse, enquanto que no genótipo sensível não foram observados aumentos mesmo após 72 horas de tratamento com 200 mM de NaCl. Estas diferentes respostas, observadas nos genótipos, podem estar associadas às cascatas de sinalização que regulam o metabolismo de prolina, as quais são controladas por múltiplos mecanismos celulares e sobre os quais ainda são necessários mais estudos (BHASKARA et al., 2015). Entre os fatores envolvidos, o ácido abscísico (ABA) e o cálcio desempenham papel positivo na sinalização e expressão de genes envolvidos na biossíntese de prolina. Por outro lado, as fosfolipases D (PLD) regulam negativamente a biossíntese deste aminoácido (THIERY et al., 2004). Assim, possivelmente, fatores que regulam de forma positiva esta sinalização são ativados primeiramente em plantas tolerantes ao estresse osmótico causado, também, por salinidade e baixa temperatura.

Estão descritas duas rotas para a biossíntese de prolina, a via do glutamato e a via da ornitina (SATO et al., 2002; WINTER et al., 2015). A partir do glutamato, a prolina é sintetizada via pirrolina-5-carboxilato (P5C) por reações catalisadas pelas enzimas P5C sintetase (P5CS) e pirrolina-5-carboxilato redutase P5CR, cujos genes já foram identificados e isolados em muitas espécies de plantas (SRIPINYOWANICH et al., 2013).

No presente estudo, durante o tratamento com NaCl, os dois genes codificadores de *P5CS* tiveram sua transcrição aumentada no genótipo BRS Pampa (sensível). No genótipo BRS Bojuru (tolerante), também foram observados aumentos de expressão para *P5CS1*, porém em níveis mais baixos, enquanto que o gene homólogo *P5CS2* manteve seu nível de mRNA semelhante entre os tempos de coleta. Embora os níveis de transcritos tenham sido menores no genótipo tolerante,

algumas correlações foram maiores, sendo para o conteúdo de prolina/*P5CS1* observada correlação de 0.85 e *P5CS1/P5CS2* de 0.98 (Figura 5A). Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que algumas vezes os níveis transcricionais não estão totalmente relacionados com a atividade enzimática devido aos vários sistemas regulatórios envolvidos na disponibilidade e atividade final de proteínas. Anderson e Seihamer (1997), apresentaram um dos primeiros trabalhos mostrando a comparação entre os níveis de mRNA e proteínas correspondentes, no qual a correlação foi de apenas 0.43.

Estudos anteriores também demonstraram a correlação entre a indução de genes *P5CS* e o acúmulo de prolina em *Arabidopsis thaliana*, arroz e sorgo, com níveis de correlação variáveis, de acordo com o genótipo, tipo e duração do estresse (SU et al., 2011). Em azevém, Li et al. (2012), verificaram uma alta relação causa-efeito entre o aumento de transcritos de ambos os genes homólogos de *P5CS* e o conteúdo de prolina, sendo reguladas positivamente após o estresse salino. Em plantas de arroz, Hur et al. (2004), identificaram que a expressão do gene *P5CS1* foi constante, enquanto *P5CS2* foi induzido por manitol e NaCl.

Em condições de baixa temperatura, ambos os genótipos apresentaram aumento nos níveis de expressão de *P5CS1*, porém em menores valores que frente à salinidade. Em contraste, *P5CS2* foi regulado negativamente pelo frio, com valores de quantificação inferiores ao controle e correlação de 0.50 e 0.48 entre o conteúdo de prolina/*P5CS2* nos genótipos tolerante e sensível, respectivamente (Figura 4C, 4D e 6). De acordo com Kavi et al. (2015), ainda não se sabe claramente como estes genes interagem com outros genes através de redes de componentes celulares. Assim, a disponibilidade de tais mapas poderia auxiliar no entendimento da regulação do metabolismo de prolina e justificar as respostas contrastantes frente às diferentes condições testadas (salinidade e frio).

A enzima pirrolina-5-carboxilato redutase (*P5CR*), codificada pelo gene *P5CR*, é um precursor da biossíntese de prolina em plantas. No presente trabalho foram observadas, novamente, respostas contrastantes tanto entre as condições de estresse quanto entre os genótipos utilizados. Plantas do genótipo tolerante (BRS Bojuru) apresentaram aumento na expressão de *P5CR* e alta correlação entre o conteúdo de prolina/*P5CR* frente à salinidade. Como mencionado anteriormente, a biossíntese de prolina pode ocorrer tanto no citosol quanto no cloroplasto, sendo a

via preferencial, em condições de estresse, a via cloroplastídica através dos produtos gênicos *P5CS1* e *P5CR*. Neste estudo, analisando-se as correlações, infere-se que a biossíntese de prolina pode ter ocorrido por ambas às localizações celulares no genótipo tolerante em condições de estresse salino, uma vez que foram observadas altas correlações entre conteúdo de prolina/*P5CS1*, bem como entre o conteúdo de prolina/*P5CS2*, além de valores significativos entre *P5CS1/P5CR* e *P5CS2/P5CR* (Figura 4A e 5A).

Por outro lado, no genótipo sensível, embora tenham sido observados aumentos de expressão para *P5CR*, a correlação deste gene com o conteúdo de prolina foi de apenas 0.12. Analisando as correlações, acredita-se que a via preferencial de biossíntese de prolina, no genótipo sensível, tenha ocorrido via citosol, uma vez que foram observados maiores valores entre conteúdo de prolina/*P5CS2* (0.97) e *P5CS2/P5CR* (0.30), contra 0.68 entre conteúdo de prolina/*P5CS1* e - 0.10 entre *P5CS1/P5CR* (Figura 4B e 5B). Resultados semelhantes aos do genótipo sensível foram relatados em *Arabidopsis thaliana* sob estresse osmótico, onde somente a expressão do gene *P5CS* foi correlacionada com o teor de prolina, não havendo correlação com a expressão de *P5CR* (SAVOURÉ et al., 1997; SRIPINYOWANICH et al., 2013).

O gene *P5CR*, em condições de baixa temperatura, apresentou a mesma tendência de resposta que o conteúdo de prolina nas plantas sensíveis, com valores significativamente superiores ao controle, explicando a alta correlação encontrada entre conteúdo de prolina/*P5CR* no genótipo BRS Pampa. Em contrapartida, para BRS Bojuru esta correlação foi inferior, justificada pelas mudanças não significativas nos níveis de expressão de *P5CR*, diferindo do conteúdo de prolina, o qual apresentou mudanças ao longo do tempo de estresse por frio. Diferentemente do observado em condições de salinidade, acredita-se que a via preferencial de biossíntese de prolina em baixa temperatura tenha sido, para ambos os genótipos, através do cloroplasto, visto que foram observados valores superiores de correlação entre conteúdo de prolina/*P5CS1*, *P5CS1/P5CR* para BRS Pampa e conteúdo de prolina/*P5CS1*, *P5CS1/P5CR* para BRS Bojuru (Figura 6A e 6B). De acordo com estudos sabe-se que, a regulação de *P5CS* e *P5CR*, depende do cofator NADH ou NADPH (GIBERTI et al., 2014). Assim, possivelmente, esta regulação esteja

atuando de maneira mais eficaz no cloroplasto em ambos os genótipos no estresse por baixa temperatura.

Da mesma forma como a biossíntese de prolina desempenha importante papel em plantas submetidas a estresses, uma degradação rápida de prolina é uma forma de minimizar os efeitos do estresse, por prover agentes redutores que apoiam a fosforilação oxidativa mitocondrial e gerar ATP para que a planta se recupere do estresse e repare os danos acumulados. O catabolismo de prolina ocorre nas mitocôndrias pela ação sequencial das enzimas pirrolina desidrogenase (PDH) e P5C desidrogenase (P5CDH), que converte P5C em glutamato (SZABADOS e SAVOURE, 2009). Avaliando os dados obtidos no experimento com estresse salino, no genótipo tolerante, a correlação entre o acúmulo no conteúdo de prolina e a expressão do gene *PDH* foi de 0.42, justificada pelo comportamento de resposta oposto em todos os tempos de estresse. No genótipo sensível houve correlação negativa entre estas variáveis (Figuras 2 e 5). No tratamento com baixa temperatura, a resposta é inversa à salinidade, no genótipo tolerante a correlação conteúdo de prolina/*PDH* foi negativa e no genótipo sensível não foi observada correlação significativa (Figuras 6A e 6B).

De acordo com Satoh et al. (2002), a expressão do gene *PDH* é reprimida em condições de desidratação, porém é induzida quando as plantas são reidratadas após 10 horas de estresse. Desta mesma forma a elucidação de expressão de *PDH* pode ser útil na compreensão do processo molecular de recuperação de plantas em estresse osmótico. Estes mesmos autores determinaram que o cis-elemento ACTCAT, presente na região promotora, está envolvido na regulação da expressão no gene *PDH* em condições de hiposmolaridade.

Pirrolina-5-carboxilato (P5C) é um produto intermediário tanto da biossíntese como da degradação de prolina. É sintetizado na mitocôndria durante o catabolismo pela enzima PDH e convertido, por pirrolona-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH), em glutamato (QAMAR et al., 2015). Embora o gene *P5CDH* esteja envolvido na degradação de prolina, neste estudo, observou-se alta correlação positiva entre o acúmulo de prolina e a expressão relativa de *P5CDH* em condições de salinidade para ambos os genótipos. Em BRS Bojuru (tolerante), esta alta correlação é explicada pela mesma tendência de resposta entre as duas variáveis, com aumento às 6, 24 e 72 horas e diminuição às 48 horas de estresse. Em BRS Pampa

(sensível), a correlação ocorreu em função do aumento observado nos tempos 6 e 24 horas no conteúdo de prolina e expressão de *P5CDH* e diferença de resposta entre estas variáveis nos tempos de 48 e 72 horas (Figura 2B e 2D). Por outro lado, em condições de baixa temperatura, não houve correlação significativa entre o conteúdo de prolina e *P5CDH* nos dois genótipos (Figura 6A e 6B).

Em muitos casos, o nível de mRNA de um gene não acompanha o nível de atividade da proteína por ele codificado, isso se dá ao fato de mecanismos de regulação pós transcricionais e/ou pós traducionais. Em estudo realizado por Qamar et al. (2015), o gene *P5CDH* foi *downregulated* pós transcripcionalmente por siRNAs em condições de estresse salino. O Catabolismo de prolina gera H_2O_2 como um subproduto ativando, assim, as vias de sinalização antioxidantes (ZHANG e BECKER, 2015). No entanto, há linhas de pesquisas que acreditam que o metabolismo de P5C na mitocôndria aumenta em demasia a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à morte celular (MILLER et al., 2009; NISHIMURA et al., 2010).

Um dos produtos da hidrólise da arginina é a conversão desta em ornitina pela enzima Arginase (ARG), a qual é metabolizada pela enzima ornitina-delta-aminotransferase (OAT) para P5C, deste a GSA e posterior glutamato. A contribuição direta de OAT para o acúmulo de prolina induzida por estresse é controverso (STRÁNSKÁ et al., 2008; WINTER et al., 2015). Nas condições experimentais testadas, houve correlação positiva entre o conteúdo de prolina e a expressão do gene *OAT* no genótipo tolerante, enquanto que no sensível a correlação foi positiva, porém baixa, sob estresse salino. Por outro lado, em condições de frio (13°C), não houve correlação entre estas variáveis para o genótipo tolerante e correlação negativa para o sensível (Figura 5 e 6).

Roosens et al. (2002), levantaram a hipótese de que OAT desempenha um papel importante no acúmulo de prolina durante o estresse osmótico, a qual foi comprovada em plantas de *Arabidopsis thaliana*, através de uma correlação positiva entre o aumento no teor de prolina livre, atividade da enzima OAT e níveis de mRNA do gene *OAT* em plântulas sob estresse salino. Esta hipótese foi reforçada pela análise de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* que superexpressaram OAT, sintetizando mais prolina do que as plantas selvagens sob condições de estresse osmótico (ROOSENS et al., 1998; ROOSENS et al., 2002). Neste mesmo

sentido a superexpressão de *OAT* em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) resultou em níveis mais elevados de prolina e ativou a defesa antioxidante, tornando as plantas mais tolerantes ao estresse por NaCl (YOU et al., 2012). No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender como *OAT* contribui para o aumento de prolina livre e se GSA produzido por *OAT* pode ser usado diretamente para a síntese de prolina ou é obrigatoriamente convertido em glutamato por *P5CDH* (WINTER et al., 2015).

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se que: (i) o aumento no conteúdo de prolina é maior em BRS Bojuru (tolerante) frente às duas condições de estresse estudadas; (ii) sob estresse salino, os níveis de transcritos dos genes de biossíntese estão mais correlacionados com o conteúdo de prolina no genótipo tolerante, enquanto que em condições de baixa temperatura a correlação é maior no genótipo sensível (BRS Pampa); (iii) a biossíntese de prolina ocorre preferencialmente pela via do glutamato, em comparação à ornitina, em ambos os genótipos e tratamentos testados; (iv) a biossíntese de prolina ocorre tanto no citosol quanto no cloroplasto no genótipo tolerante e, preferencialmente, via citosol no genótipo sensível, em condições de estresse salino; (v) a via preferencial de biossíntese de prolina em baixa temperatura, para ambos os genótipos é através do cloroplasto.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram os diferentes níveis de tolerância/suscetibilidade dos genótipos avaliados oportunizando um conhecimento mais aprofundado dos mesmos, sobre os processos fisiológicos e sua relação com a regulação dos diferentes mecanismos moleculares. No entanto, é de fundamental importância, análises posteriores, que caracterizam genótipos tolerantes, bem como a obtenção de um perfil transcriptômico, viabilizando a avaliação das diferenças existentes entre genótipos suscetíveis e tolerantes, com a finalidade de encontrar possíveis genes responsáveis pela tolerância ao estresse por salinidade e baixa temperatura em *Oryza sativa* e que sejam potenciais marcadores moleculares para esta característica. Assim, a grande necessidade de ampliar as pesquisas nessa área, faz-se necessário, sobretudo em função das mudanças climáticas globais que vêm ocorrendo, a fim de obter genótipos de arroz com características bem adaptadas às condições do clima das principais regiões produtoras deste cereal, para atender sua crescente demanda.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, T.; IWASAKI, T.; HOSOKAWA, D.; SHINOZAKI, K. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1859–1868, 1997.
- ABE, H.; URAO, T.; ITO, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. **The Plant Cell**, v. 15, p. 63-78, 2003
- AHMAD, P.; SARWAT, M., SHARMA, S. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants. **Journal of Plant Biology**, v. 51, p. 167-173, 2008.
- AHMAD, P.; JALEEL, C. A.; SALEM, M. A.; NABI, G.; SHARMA, S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Critical Reviews in biotechnology**, v. 30, p. 161–175, 2010.
- 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.
- ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, v. 18, p. 533-537, 1997.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARMENGAUD, P.; THIERY, L.; BUHOT, N.; GRENIER-DE, M. G.; SAVOURÉ, A. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 442-450, 2004.
- ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, v.82, p.1227-1238, 2002. ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p.601–639, 1999.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007. ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers, **Biotechnology Advance**, v. 27, p. 84–93, 2009.
- ASHRAF, M.; AKRAM N, A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M. R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, v. 111, p. 249-296, 2011.

AYDIN, S. S.; BÜYÜK, I.; ARAS, S. Relationships among lipid peroxidation, SOD enzyme activity, and SOD gene expression profile in *Lycopersicum esculentum* L. exposed to cold stress. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 3220-3229, 2013. AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-29, 1998.

BATES, L.S.; WALDREN, R. P. TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for waterstress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973. BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, v.24, p.23-58, 1995.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 24, p. 23-58, 2005. BHASKARA, G. B.; YANG, T-H.; VERSLUES, P. E. Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water limited environments. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 484, 2015.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; VALDEZ, V.; SHARMA K. K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 411- 424, 2008.

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.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILINIK, E. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

BUCKOVA, M.; GODOCIKOVA, J.; ZAMOCKY, M.; POLEK, B. Screening of Bacterial Isolates from Polluted Soils Exhibiting Catalase and Peroxidase Activity and Diversity of their Responses to Oxidative Stress. **Current Microbiology**, v. 61, p. 241-247, 2010.

BUSK, P.K.; PAGE`S, M. Regulation of abscisic acid-induced transcription. **Plant Molecular Biology**, v. 37, p. 425–435, 1998. CARMONA, F. de C. **Salinidade da água e do solo e sua influência sobre o arroz irrigado**. 2011. 113 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

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.

CAVALCANTI, F. R.; LIMA, J. P. M. S.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, GOMES, J. A. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of plant physiology**, v. 164, p. 591-600, 2007.

- CHAKRABORTY, A.; BHATTACHARJEE, S. Differential competence of redox-regulatory mechanism under extremes of temperature determines growth performances and cross tolerance in two indica rice cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v. 176, p. 65–77, 2015.
- CHEN, J.; HUANG, B.; LI, Y.; DU, H.; GU, Y.; LIU, H.; ZHANG, J.; HUANG, Y. Synergistic influence of sucrose and abscisic acid on the genes involved in starch synthesis in maize endosperm. **Carbohydrate**, v. 346, p. 1684-1691, 2011.
- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J. Cold stress regulation of gene expression in plants. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 444–451, 2007.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. 2016. Acesso em 8 de janeiro de 2016.
- CONTOUR-ANSEL, D.; TORRES-FRANKLIN, M. L.; DE CARVALHO; M. H. C., D'ARCY-LAMETA, A.; ZUILY-FODIL, Y. Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment. **Annals of Botany**, v. 98, p. 1279-1287, 2006.
- CRUZ, R. P.; SPEROTTO, R. A.; CARGNELUTTI, D.; ADAMSKI J, M.; TERRA T. F.; FETT J. P. Avoiding damage and achieving cold tolerance in rice plants. **Food and Energy Security**, v. 2, p. 96-119, 2013.
- DELAUNEY, A. J.; HU, C. A.; KISHOR, P. B.; VERMA, D. P. Cloning of ornithine deltaaminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by transcomplementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 18673-18678, 1993.
- DEMIRAL, T.; TURKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p. 247–257, 2005.
- DU, Y. Y.; WANG, P. C.; CHEN, J.; SONG, C. P. Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, p. 1318–1326, 2008.
- DUBOUZET, J. G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M., DUBOUZET, E. G.; MIURA, S.; M SEKI.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. **The Plant Journal**, v. 33, p. 751–763, 2003.
- DOYLE, J. J; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p.11–15, 1987.
- EDWARDS, E. A.; RAWSTHORNE, S.; MULLINEAUX, P. M. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). **Planta**, 180:278–284, 1990.
- EL-SHABRAWI, H.; KUMAR, B.; KAUL, T.; REDDY, M. K.; SILNGLA-PAREEK, S. L.; SOPORY, S. K. Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in Pokkali rice. **Protoplasma**, v.245, p.85-96, 2010.

- EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz. <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>. 2005. Acesso em 8 de janeiro de 2016. FAGUNDES, P. R.;
- MAGALHÃES-JÚNIOR, A. M.; STEINMETZ, S. Tolerância de genótipos de arroz irrigado ao frio nos estádios de germinação e emergência. In: EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 118, 2010.19p.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>. 2008. Acesso em 9 de janeiro de 2016. FARIDUDDIN, Q.; VARSHNEY P.; YUSUF M.; AHMAD A. Polyamines: potent modulators of plant responses to stress. **Journal of Plant Interactions**, 8, 1-16, 2013.
- FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e **Fitoquímicos Bioanálise**, v. 2, p. 32-39, 2007.
- FRYER, M. J.; BALL, L.; OXBOROUGH, K.; KARPINSKI, S.; MULLINEAUX, P. M.; BAKER, N. R. Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organization of *Arabidopsis* leaves. **The Plant Journal**, v. 33, p. 691-705, 2003.
- FUKAMATSU, Y.; YABE, N.; HASUNUMA, K. *Arabidopsis* NDK1 is a component of ROS signaling by interacting with three catalases. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, p. 982-989, 2003.
- GAO, J. P.; CHAO, D. Y.; LIN, H. X. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: recent studies on stress response in rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, p. 742-750, 2007.
- GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, v. 143, p. 8 – 96, 2009.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.
- GIBERTI, S.; FUNCK, D.; FORLANI, G. Δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline dependo whether NADPH or NADH acts as cosubstrate. **New Phytologist**, v. 202, p. 911-919, 2014.
- 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-JUNIOR, R. A.; MOLDES, C.; DELITE, F. S.; POMPEU, G.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*, v. 65, p.1330-1337, 2006.

GÓMEZ, J. M.; JIMÉNEZ, A.; OLMOS, E.; SEVILLA, F. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. **Free Radical Research**, v. 31, p. 11–18, 1999.

GONDIM, F.A.; GOMES-FILHO, E.; COSTA, J.H.; MENDES ALENCAR, N.L.; PRISCO, J.T. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 62–71, 2012.

GUO, Z.; OU, W.; LU, S.; ZHONG, Q. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity, **Plant Physiology Biochemistry**, v. 44, p. 828-836, 2006.

HAKEEM, K.R.; KHAN, F.; CHANDNA, R.; SIDDIQUI, T.O.; IQBAL, M. Genotypic Variability Among Soybean Genotypes Under NaCl Stress and Proteome Analysis of Salt-Tolerant Genotype. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 168, 2309–2329, 2012.

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

HERNANDEZ, J. A.; JIMENEZ, A.; MULLINEAUX, P.; SEVILLA, F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to a long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. **Plant Cell and Environment**, v. 23, p. 853–862, 2000.

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.

HERNANDEZ, M.; FERNANDEZ-GARCIA, N.; DIAZ-VIVANCOS, P.; OLMOS, E. A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 521–535, 2010.

HIEN, D. T.; JACOBS, M.; ANGENON, G.; HERMANS, C.; THU, T. T.; SON, L. V.; ROOSENS, N. H. Proline accumulation and *D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase* gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. **Plant Science**, v. 165, p. 1059-1068, 2003.

HIGO, K.; HIGO, H. Cloning and characterization of the rice CatA catalase gene, a homologue of the maize Cat3 gene. **Plant Molecular Biology**, v. 30, 505–521, 1996.

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.

HONG, C.Y.; CHAO, Y.Y.; YANG, M.Y.; CHENG, S.Y.; CHO, S.C.; KAO, C.H. NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is mediated through hydrogen peroxide but not abscisic acid. **Plant and**

Soil, v. 320, p. 103–115, 2009. HUANG, M., GUO, Z. Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. **Biologia Plantarum**, v. 49, p. 81–84, 2005.

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.

HUSSAIN, K.; NISAR, M. F.; MAJEED, A.; NAWAZ, K.; BHATTI, K. H.; AFGHAN, S.; SHAHAZAD, A.; ZIA-UL-HUSSNIAN, S. What molecular mechanism is adapted by plants during salt stress tolerance? **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 416–422, 2010.

IRGA- Instituto RioGrandense de Arroz. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br/2016>. Acesso em 8 de janeiro de 2016.

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.

JANDA, T.; SZALAI, G.; RIOS GONZALEZ, K.; VEISZ, O.; PALDI, E. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. **Plant Science**, v. 164, p. 301–306, 2003.

JITHESH, M. N.; PRASHANTH, S. R.; SIVAPRAKASH, K. R.; PARIDA, A. K. Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. by mRNA analysis. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 865–876, 2006.

KARAM, F. T.; MENEZES-BENAVENTE, L.; GALVAÕ, 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.

KAVIKISHOR, P. B.; HIMAKUMARI, P.; SUNITA, M.; SREENIVASULU, N. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 544, 2015.

KHARE, T.; KUMAR, V.; KISHOR, K.P.B. Na⁺ and Cl[–] ions show additive effects under NaCl stress on induction of oxidative stress and the responsive antioxidative defense in rice. **Protoplasma**, DOI 10.1007/s00709-014-0749-2, 2014.

KHANNA-CHOPRA, R.; SABARINATH, S. Heat-stable chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase in *Chenopodium Murale*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 1187–11, 2004.

KIM, S. Y., LIM, J. H.; PARK, M. R., KIM, Y. J., PARK, T. I., SEO, Y. W., CHOI, K. G.; YUN, S. J. Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 38, p. 218–224, 2005.

KIM, J.K.; LEE, S.Y.; CHU, S.M.; LIM, S.H.; SUH, S.-C.; LEE, Y.T.; CHO, H.S.; HA, S.H. Variation and correlation analysis of flavonoids and carotenoids in Korean pigmented rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12804-12809, 2010.

KIM, Y.H.; KWAK, S. S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.129-150.

KRATSCH, H.; WISE, R. The ultrastructure of chilling stress. **Plant cell Environment**, 23, 337–350, 2000.

KUMAR, R. R.; KARJOL, K.; NAIK, G. R. Variation of sensitivity to drought stress in pigeon pea (*Cajanus cajan* [L.] Millsp) cultivars during seed germination and early seedling growth. **World Journal of Science and Technology**, v. 1, p. 11-18, 2011.

KUMAR, V.; SHRIRAM, V.; NIKAM, T. D.; JAWALI, N.; SHITOLE, M. G. Antioxidant enzyme activities and protein profiling under salt stress in indica rice genotypes differing in salt tolerance. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 55, p. 379–394. doi:10.1080/03650340802595543, 2009.

LACERDA, C. F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.; RUIZ, H. A. Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under NaCl stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 270-284, 2001.

LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 6, p. 1-18, 2011.

LEE, T.; RINALDI, N.J.; ROBERT, F.; ODOM, D.T.; BAR-JOSEPH, Z.; GERBER, G.K.; HANNETT, N.M.; HARBISON, C.T.; THOMPSON, C.M.; SIMON, I. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Science**, v.298, p.799-804, 2002.

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.

LI, H.; GUO, H.; ZHANG, X.; FU, J. Expression profiles of *Pr5CS1* and *Pr5CS2* genes and proline accumulation under salinity stress in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Plant Breeding**, v. 133, p. 243-249, 2014.

LUNDE, C.; DREW, D. P.; JACOBS, A. K.; TESTER, M. Exclusion of Na⁺ via sodium ATPase (PpENA1) ensures normal growth of *Physcomitrella patens* under moderate salt stress. **Plant Physiology**, v. 144, n. 4, p. 1786-1796, 2007.

LYRA, W.S.; SILVA, E.C.; ARAÚJO, M.C.U.; FRAGOSO, W.D.; VERAS, G. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova**, v. 33, p. 1594-1597, 2010.

MACHADO, A. DE A.; CONCEIÇÃO, A.R. **Sistema de análise estatística para Windows. WinStat. Versão 2.0.** Pelotas: UFPel/NIA, 2003.

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

MASAO, I.; HIGO, H.; HIGO, K. Differential diurnal expression of rice catalase genes: the 5'-flanking region of CatA is not sufficient for circadian control. **Plant Science**, v. 151, p. 39-46, 2000.

MASAO, I.; HIGO, H.; HIGO, K. Strong expression of the rice catalase gene CatB promoter in protoplasts and roots of both a monocot and dicots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 241-249, 2004.

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.

MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; SOARES, R. C.; BALDIGA, R. F.; PESKE, F. B.; MORAES, D. M. de. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 254-262, 2009.

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, p. 4197-4220, 2010.

MISHRA, P.; BHOO MIKA, 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.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002. MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, v. 133, p. 481-489, 2008.

MILLER, G.; HONIG, A.; STEIN, H.; SUZUKI, N.; MITLER, R.; ZILBERSTEIN, A. Unraveling delta 1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression proline oxidation enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 26482-26492, 2009.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses, **Plant Cell Environment**, v. 33, p. 453-467, 2010.

MONTEIRO, J. G.; CRUZ, F. J. R.; NARDIN, M. B.; SANTOS, D. M. M. Growth and proline content in pigeon pea seedlings subjected to osmotic stress and to exogenous putrescine. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 18-25, 2014.

- MORADI, F.; ISMAIL, A.M. Responses of Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and ROS-Scavenging Systems to Salt Stress During Seedling and Reproductive Stages in Rice. **Annals of Botany**, v. 99, p. 1161–1173, 2007.
- MORAES, G.P.; BENITEZ, L.C.; AMARAL DO, M.N.; VIGHI, I.L.; AULER, P. A.; MAIA DA, L. C.; BIANCHI, V. J.; BRAGA, E. J. B. Evaluation of reference genes for RT-qPCR studies in the leaves of rice seedlings under salt stress. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 2384-2398, 2015.
- MORISON, J. I. L.; BAKER, N. R.; MULLINEAUX, P. M.; DAVIES, W. J. Improving water use in crop production. **Philosophical Transactions of the royal society**, v. 363, p. 639-658, 2007.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651-681, 2008. NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867–880, 1981.
- NETONO, G. W.; ONYANGO, J. C.; BECK, E. Sorghum and salinity: gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. **Crop Science**, v. 44, p. 806-811, 2004.
- NISHIMURA, A.; NASANO, R.; TAKAGI, H. The proline metabolism intermediate Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate directly inhibits the mitochondrial respiration in budding yeast. **FEBS Letters**, v. 586, p. 2411-2416, 2012.
- PAIVA, A. L. C.; TEIXEIRA, R. B.; YAMAKI, M.; MENEZES, G. R. O.; LEITE, C. D. S.; TORRES, R. A. Análise de componentes principais em características de produção de aves de postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 285- 288, 2010.
- PAN, Y.; WU, L.J.; YU, Z.L. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquor rice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). **Plant Growth Regulation**, v. 49, p. 157-165, 2006.
- PANDA, S. K.; KHAN, M. H. G. Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. **Journal Agronomy Crop Science**, v. 195, n. 6, p. 442-454, 2009.
- PASTORI, G.; FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P. Low temperature-induced changes in the distribution of H_2O_2 and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. **Journal Experimental Botany**, v. 51, p. 107–113, 2000.
- PFAFFL, M. W. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 30-36, 2001.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, 30: e36, 2002.

QAMAR, A.; MYSORE, K. S.; SENTHIL-KUMAR, M. Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 503, 2015.

QUEVAL, G.; ISSAKIDIS-BOURGUET, E.; HOEBERICHTS, F. A.; VANDORPE, M.; GAKIERE, B.; VANACKER, H.; MIGINIAC-MASLOW, M.; BREUSEGEM, F. V.; NOCTOR, G. Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. **The Plant Journal** v. 52, p. 640–657, 2007.

QIN, J.; MA, X.; TANG, Z.; MENG, Y. Construction of regulatory networks mediated by small RNAs responsive to abiotic stresses in rice (*Oryza sativa*). **Computational Biology and Chemistry**, v. 58, p. 69-80, 2015.

QIU, P. Recent advances in computational promoter analysis in understanding the transcriptional regulatory network. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 495-501, 2003.

RENGASAMY, P. Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 42, p. 351-361, 2002.

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. 1313-1324, 2007.

ROOSENS, N. H.; THU, T. T.; ISKANDAR, H. M.; JACOBS, M. Isolation of the ornithine delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 117, p. 263-271, 1998.

ROOSENS, N. H.; AL, BITAR F.; LOENDERS, K.; ANGENON, G.; JACOBS, M. Overexpression of *ornithine-δ-aminotransferase* increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. **Molecular Breeding**, v. 9, p. 73-80, 2002.

ROY, S. J.; TUCKER, E.J., TESTER, M. Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. **Science Direct**, v. 14, p. 1-8, 2011.

SATOH, R.; NAKASHIMA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ACTCAT, a Novel cis-Acting Element for Proline- and Hypoosmolarity-Responsive Expression of the *ProDH* Gene Encoding Proline Dehydrogenase in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 130, p. 709-719, 2002.

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*. **FEBS Letters**, v. 372, p. 13-19, 1995.

SAVOURÉ, A.; HUA, X. J.; BERTAUCHE, N.; VAN, M. M.; VERBRUGGEN, N. Absciscic acid-independent and absciscic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular & General Genetics**, v. 254, p. 104-109, 1997.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.

SHARMA, P.; JAI, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, p. 1-26, doi:10.1155/2012/217037, 2012.

SHIKANAI, T.; TAKEDA, T.; YAMAUCHI, H.; SANO, S.; TOMIZAWA, K.; YOKOTA, A.; SHIGEOKA, S. Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. **FEBS Letters**, v. 428, p. 47-51, 1998.

SILVA-ORTEGA, 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.

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, 2010, p.161-180.

SIMOVA-STOILOVA, L.; VASEVA, I.; GRIGOROVA, B.; DEMIREVSKA, K.; FELLER, U. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 48, p. 200-206, 2010.

SINGH, R. K.; REDOÑA, E.; REFUERZO, L. Varietal Improvement for Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants: Special Reference to Salinity in Rice. In: **Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomics Foundation**. Springer Science+Business Media LLC, New York, 2010. p.387-415.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Plant Defense: chemical signaling and reactive oxygen species. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 1, p. 9-18, 2007.

SRIPINYOWANICH, S.; KLOMSAKUL, P.; BOONBURAPONG, B.; BANGYEEKHUN, T.; ASAMI, T.; GU H.; BUABOOCHA, 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.

STRÁNSKÁ, J.; KOPECNÝ, D.; TYLICHOVÁ, M.; SNÉGAROFF, J.; SEBELA, M. Ornithine- δ - aminotransferase: An enzyme implicated in salt tolerance in higher plants. **Plant Signaling Behavior**, v. 3, p. 929-935, 2008.

SU, M. X. F.; LI X, Y.; MA, X. J.; ZHAO, P. A. G.; CHENG, L. Q. Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. **Plant Science**, v. 181, p. 652-659, 2011.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 89-97, 2010.

SZÉKELY, G.; ABRAHÁM, E.; CSÉPLO, A.; ZSIGMOND, L.; CSISZÁR, J.; AYAYDIN, F.; STRIZHOV, N.; JÁSIK, J.; SCHMELZER, E.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. **The Plant Journal**, v. 53, p. 11-28, 2008.

TAN, W.; BRESTIC, M.; OLSOVSKA, K.; YANG, X. Photosynthesis is improved by exogenous calcium in heat-stressed tobacco plants. **Journal Plant Physiology**, v. 168, p. 2063-2071, 2011.

TANG^a, B.; XU, S-Z.; ZOU, X-L.; ZHENG, Y-L.; QIU, F-Z. Changes of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of waterlogging-tolerant and waterlogging-sensitive maize genotypes at seedling stage. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, p. 651-661, 2010.

TANG, K.; ZHAN, J-C.; YANG, H-R.; HUANG, W-D. Changes of resveratrol and antioxidant enzymes during UV-induced plant defense response in peanut seedlings. **Journal of Molecular Evolution**, v.167, p. 95-102, 2010.

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.

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.

THEOCHARIS, A.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. **Planta**, v. 235, p. 1091-1105, 2012.

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.

TORO, E. A. T. **Avaliação de linhagens de arroz (*Oryza sativa* L.) suscetíveis e tolerantes a baixas temperaturas em cruzamentos dialélicos parciais**. 2006. 143 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba, São Paulo: USP, 2006.

TRIVEDI, D.; GILL, S.; YADAV, S.; TUTEJA, N. Genome-wide analysis of glutathione reductase (GR) genes from rice and *Arabidopsis*. **Plant Signaling and Behavior**, 8:2, e23201, 2013, doi.org10.4161/psb.23021.

TROVATO, M.; MATTIOLI, R.; COSTANTINO, P. Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. **Rendiconti Lincei**, v. 19, p. 325-346, 2008.

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.

UZILDAY, B.; TURKAN, I.; SEKMEN, A. H.; OZGUR, R.; KARAKAYA, H.C. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. **Plant Science**, v.182, p. 59-70, 2012.

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.; VILLARROEL, R.; VAN, M. M. Osmoregulation of a *pyrroline-5-carboxylate reductase* gene in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 103, p. 771–781, 1993.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, p. 753-759, 2008.

VERSLUES, P.E.; BATELLI, G.; GRILLO, S.; AGIUS, F.; KIM, Y.S.; ZHU, J.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.K. Interaction of SOS2 with nucleoside diphosphate kinase 2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H₂O₂ signaling in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, p. 7771–7780, 2007.

WANG, Y. C.; QU, G. Z.; LI, H. Y.; WU, Y. J.; WANG, C.; LIU, G. F.; YANG, C. P. Enhanced salt tolerance of transgenic poplar plants expressing a manganese superoxide dismutase from *Tamarix androssowii*. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 1119–1124, 2010.

WINTER, G.; TODD, C.D.; TROVATO, M.; FORLANI, G.; FUNCK, D. Physiological implications of arginine metabolism in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 534, 2015.

WITCOMBE, J.R.; HOLLINGTON, P.A.; HOWARTH, C.J.; READER, S.; STEELE, K.A. Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological**, v. 363, p.703–716, 2008.

WU, T. M.; LIN, W. R.; KAO, Y. T.; HSU, Y. T.; YEH, C. H.; HONG, C. Y.; KAO, C. H. Identification and characterization of a novel chloroplast/mitochondria co-localized glutathione reductase 3 involved in salt stress response in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 83, p. 379-390, 2013.

WU, T. M.; LIN, W. R.; KAO, C. H.; HONG, C.Y. Gene knockout of *glutathione reductase 3* results in increased sensitivity to salt stress in rice. **Plant Molecular Biology**, DOI 10.1007/s11103-015-0290-5, 2015.

WUTIPRADITKUL, N.; BOONKOMRAT, S.; BUABOOCHA, T. Cloning and Characterization of Catalases from Rice, *Oryza sativa* L. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75 p. 1900–1906, 2011.

XING, Y.; JIA, W.; ZHANG, J. AtMEK1 mediates stress induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p. 2969–2981, 2007.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J-K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. **The Plant Cell**, v. 14, p 165-183, 2002.

XUE, X.; LIU, A.; HUA, X. Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. **BMB Reports**, v. 42, p. 28-34, 2009.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stressresponsive promoters. **TRENDS in Plant Science**, v.10, p. 88-94 2005.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 781-803, 2006.

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.

YIN, G.; XIN, X.; SONG, C.; CHEN, X.; ZHANG, J.; WU, S.; LI, R.; LIU, XU.; LU, X. Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate-glutathione cycle in artificially aged rice seed. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.80, p. 1-9, 2014.

YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. **Laboratory manual for physiological studies of rice**. 3rd edition. International Rice Research Institutes, Manila, Philippines, 1976. 61 pp.

YOU, J.; HU, H.; XIONG, L. An ornithine δ -aminotransferase 1 gene *OsOAT* confers drought and oxidative stress tolerance in rice. **Plant Science**, v. 197, p. 59-69, 2012.

YUN, K. Y.; PARK, M. R.; MOHANTY, B.; HERATH, V.; XU, F.; MAULEON, R.; WIJAYA, E.; BAJIC, V. B.; R. BRUSKIEWICH, R.; DE LOS REYES, B. G. Transcriptional regulatory network triggered by oxidative signals configures the early response mechanisms of japonica rice to chilling stress. **BMC Plant Biology**, v. 10, p.16, 2010.

ZAMOCKY. M.; FURTMULLER, P. G.; OBINGER, C. Evolution of catalases from bacteria to humans. **Antioxidants and Redox Signaling**,

v. 10, p. 1527–1547, 2008. ZHANG, L.; BECKER, D. Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 552, 2015.

ZENG, L. Exploration of relationships between physiological parameters and growth performance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under salinity stress using multivariate analysis. **Plant and Soil**, v. 268, p. 51-59, 2005.

ZENG, H. W.; CAI, Y. J.; LIAO, X. R.; QIAN, S. L.; ZHANG, F.; ZHANG, D. B. Optimization of catalase production and purification and characterization of a novel cold-adapted Cat-2 from mesophilic bacterium *Serratia marcescens* SYBC-01. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 701-708, 2010.

ZHU, J-K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, p. 66-71, 2001.

ZHU, J.; DONG, C. H.; ZHU, J. K. Inter play between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p. 290–295, 2007.

ANEXOS

Anexo 1 – Lista de *Cis*-elementos encontrados na região promotora (1200 pb) das isoformas *OsCATA*, *OsCATB* e *OsCATC* do genótipo BRS Bojuru

Cis-elemento	Sequência	CATA	CATB	CATC
ABRERATCAL	AACGTGC	2*		
ANAERO2CONSENSUS	AGCAGC	1		
ANAERO3CONSENSUS	TCATCAC	1		
ARFAT	TGTCTC	1		
BOXIINTPATPB	ATAGAA	1		
BS1EGCCR	AGCGGG	1		
CAREOSREP1	CAACTC	1		
DRECRTCOREAT	GCCGAC	1		
QARBNEXTA	AACGTGT	1		
RYREPEATGMGY2	CATGCAT	2		
RYREPEATLEGUMINBOX	CATGCAT	2		
SP8BFIBSP8BIB	TACTATT	1		
SV40COREENHAN	GTGGAAAG	1		
T/GBOXATPIN2	AACGTG	2		
TATABOX4	TATATAA	1		
TATABOXOSPAL	TATTTAA	1		
2SSEEDPROTBANAPA	CAAACAC		1	
ACGTABOX	TACGTA		2	
ACGTOSGLUB1	GTACGTG		1	
NTBBF1ARROLB	ACTTTA		2	
REBETALGLHCB21	AACCAA		1	
SEF1MOTIF	ATATTTATA		1	
TATABOX3	TATTAAT		1	
TRANSINITDICOTS	ACTATGGC		1	
TRANSINITMONOCOTS	ACTATGGC		1	
UP2ATMSD	AAACCCTA		1	
-300CORE	TGTAAAG			1
-300ELEMENT	TGAAAAGG			2
ACGTTBOX	AACGTT			1
AMYBOX1	TAACAGA			1
CATATGGMSAUR	CATATG			1

CIACADIANLELHC	CAAAGGCATC			1
ELRECOREPCRP1	TTGACC			2
GARE1OSREP1	TAACAGA			1
GAREAT	TAACAAG			1
GCN4OSGLUB1	TGAGTCA			1
GT1CORE	GGTTAA			2
LTRE1HVBLT49	CCGAAA			1
MARTBOX	TTTTTTTTTT			1
MYB1LEPR	GTTAGTT			1
MYCATRD22	CACATG			1
PREATPRODH	ACTCAT			2
PROLAMINBOXOSGLUB1	TGCAAAG			1
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	TTTTTTCC			1
RBCSCONSENSUS	AATCCAA			1
SEF3MOTIFGM	AACCCA			2
TATCCAOSAMY	TATCCA			2
TATCCAYMOTIFOSRAMY3D	TATCCAT			2
AACACOREOSGLUB1	AACAAAC	1	2	
ABRELATERD1	ACGTG	2	3	
ANAERO1CONSENSUS	AAACAAA	1	2	
CANBNNAPA	CAAACAC	1	1	
CBFHV	ATCGAC	1	1	
IBOX	GATAAG	1	1	
IBOXCORENT	GATAAGA	1	1	
PRECONSCRHSP70A	CCGATCGATCACGATGAGCGAGCT	2	1	
TATAPVTRNALEU	TTTATATA	1	1	
WBOXNTCHN48	CTGACT	2	2	
WRKY71OS	TGAC	5	4	
BOXLCOREDCPAL	ACCAACC		1	2
CARGCW8GAT	CTTTAATATG		1	1
CGACGOSAMY3	CGACG		1	1
CGCGBOXAT	CCGCGC		2	1
GT1GMSCAM4	GAAAAA		1	2
MYBST1	GGATA		1	1

MYCATERD1	CATGTG	2	3	
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT	2	1	
RAV1AAT	CAACA	1	3	
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	3	3	
SEF4MOTIFGM7S	GTTTTTG	1	4	
ASF1MOTIFCAMV	TGACG	1	1	
E2FCONSENSUS	TTTGGCCG	1	1	
INRNTPSADB	CTCACTCC	1	2	
MYB2CONSENSUSAT	TAACGG	2	2	
NODCON2GM	CTCTT	2	3	
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	2	3	
PALBOXAPC	CCGTCC	1	1	
RAV1BAT	CACCTG	1	1	
RYREPEATBNNAPA	CATGCA	4	2	
S1FBOXSORPS1L21	ATGGTA	1	2	
SORLIP1AT	GCCAC	3	2	
TATABOX5	TTATTT	1	1	
TBOXATGAPB	ACTTTG	2	1	
WBOXATNPR1	TTGAC	1	5	
ACGTATERD1	ACGT	4	9	4
ARR1AT	AGATT	10	4	14
BIHD1OS	TGTCA	3	1	2
CAATBOX1	CAAT	9	1	13
CACTFTPPCA1	TACT	16	7	13
CCAATBOX1	CCAAT	3	1	5
CURECORECR	GTAC	3	10	10
DOFCOREZM	AAAG	10	9	16
DPBFCOREDCDC3	ACACGAG	1	1	1
EBOXBNNAPA	CAACTG	2	2	13
EECCRCAH1	GAATTGC	3	1	1
GATABOX	GATA	4	4	7
GT1CONSENSUS	GGAAAT	4	3	5
GTGANTG10	GTGA	9	6	9
IBOXCORE	GATAA	2	2	2

LTRECOREATCOR15	CGAC	1	4	1
MYB1AT	AAACCA	1	1	3
MYBCORE	CCGTTG	2	1	5
MYBCOREATCYCB1	AACGG	1	1	3
MYBPLANT	AACCAAAC	1	2	2
MYBPZM	CCAACC	1	2	2
MYCCONSUSAT	CAACTG	2	2	13
NODCON1GM	CTCTT	2	1	3
OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	3	1	2
POLASIG1	AATAAA	1	1	2
POLASIG3	AATAAT	1	1	1
POLLEN1LELAT52	AGAAA	7	1	4
REALPHALGLHCB21	AACCAA	2	1	1
RHERPATEXPA7	GCACGT	1	3	2
SITEIIATCYTC	TGGGCC	2	1	2
SORLIP2AT	GCCAC	3	2	2
SREATMSD	TTATCC	1	1	1
SURECOREATSULTR11	GAGAC	4	1	2
TAAAGSTKST1	TAAAG	2	1	2
WBOXHVIS01	TGACT	1	2	4
WBOXNTERF3	TGACC	2	2	7

*valores indicam o número de vezes que os cis-elementos foram encontrados na região promotora.

Anexo 2 – Lista de *Cis*-elementos encontrados na região promotora (1200 pb) das isoformas *OsCATA*, *OsCATB* e *OsCATC* do genótipo BRS Pampa

Cis-elemento	Sequência	CATA	CATB	CATC
ANAERO3CONSENSUS	TCATCAC	1*		
IBOX	GATAAG	1		
IBOXCORENT	GATAAGG	1		
RAV1BAT	CACCTG	1		
RYREPEATGMGY2	CATGCAT	2		
RYREPEATLEGUMINBOX	CATGCAT	2		
SP8BFIBSP8BIB	TACTATT	1		
10PEHVPSBD	TATTCT		1	
2SSEEDPROTBANAPA	CAAACAC		1	
ABREOSRAB21	ACGTCGCC		1	
ABRERATCAL	CACGCGC		1	
ACGTCBOX	TACGTA		1	
BOXLCOREDCPAL	ACCAACC		1	
BS1EGCCR	AGCGGG		1	
CGACGOSAMY3	CGACG		1	
INTRONLOWER	TGCAGG		1	
LECPLEACS2	TAAAATAT		1	
MYBPLANT	CACCAACC		1	
REBETALGLHCB21	CGGATA		1	
S1FBOXSORPS1L21	ATGGTA		1	
SEF4MOTIFGM7S	ATTTTTA		1	
TGACGTVMAMY	TGACGT		2	
300ELEMENT	TGAAAAAT			2
ANAERO2CONSENSUS	AGCAGC			1
BOXIINTPATPB	ATAGAA			2
CBFHV	ATCGAC			1
CCA1ATLHCB1	AAAAATCT			1
CIACADIANLELHC	CAACTATATC			2
E2FCONSENSUS	TTTGCCCC			1
ELRECOREPCR1	TTGACC			1
GCCCORE	GCCGCC			1

GT1CORE	GGTTAA			1
LTRE1HVBLT49	CCGAAA			1
MARTBOX	TTTTTTTTTT			1
MYBCOREATCYCB1	AACGG			3
MYCATRD22	CACATG			3
P1BS	GGATATAC			2
PREATPRODH	ACTCAT			1
PROLAMINBOXOSGLUB1	TGCAAAG			1
RAV1AAT	CAACA			2
REALPHALGLHCB21	AACCAA			2
SURE1STPAT21	AATAGAAAA			1
TATABOX3	TATTAAT			1
TATAPVTRNALEU	TTTATATA			1
UPRMOTIFIIAT	CCTTATAAACTCTTCCACG			1
WBBOXPCWRKY1	TTTGACT			2
WUSATAg	TTAATGG			1
AACACOREOSGLUB1	AACAAAC	1	2	
BIHD1OS	TGTCA	1	1	
EECCRCAH1	GAATTGC	2	1	
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT	1	2	
ABRELATERD1	ACGTG		1	1
ACGTABOX	TACGTA		1	2
ACGTATERD1	ACGT		6	4
CARGCW8GAT	CTTTTTTTTG		1	1
CGCGBOXAT	CCGCGC		1	1
GT1GMSCAM4	GAAAAA		2	6
LTRECOREATCOR15	CGAC		1	4
MYB1AT	AAACCA		1	2
MYBST1	GGATA		1	2
NODCON1GM	AAAGAT		1	1
NTBBF1ARROLB	ACTTTA		2	1
OSE1ROOTNODULE	AAAGAT		1	1
POLASIG3	AATAAT		2	1
QELEMENTZMZM13	AGGTCA		1	1

RHERPATEXPA7	TCACGA		1	1
SITEIIATCYTC	TGGGCC		1	1
TATABOX5	TTATTT		1	2
ANAERO1CONSENSUS	AAACAAA	1	2	2
ARR1AT	TGATT	5	2	7
ASF1MOTIFCAMV	TGACG	1	2	2
CAATBOX1	CAAT	4	2	14
CACTFTPPCA1	CACT	15	8	14
CANBNNAPA	CGAACAC	1	1	1
CURECORECR	GTAC	2	6	5
DOFCOREZM	AAAG	2	6	13
GATABOX	GATA	4	3	6
GT1CONSENSUS	GGAAAT	2	3	10
GTGANTG10	GTGA	8	2	6
IBOXCORE	GATAA	1	1	2
INRNTPSADB	CTCACTCC	1	1	1
MYBPZM	CCAACC	1	1	2
NODCON2GM	CTCTT	2	3	3
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	2	3	3
POLASIG1	AATAAA	1	1	4
POLLEN1LELAT52	AGAAA	1	1	2
PRECONSCRHSP70A	CCGATCATATCTCTTCCATTGATT	2	1	2
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	1	5	5
SORLIP2AT	GCCAC	3	2	4
SURECOREATSULTR11	GAGAC	2	1	3
TAAAGSTKST1	TAAAG	1	3	1
WBOXATNPR1	TTGAC	1	1	5
WBOXHVIS01	TGACT	1	1	3
WBOXNTCHN48	CTGACC	2	1	1
WBOXNTERF3	TGACC	2	1	6
WRKY71OS	TGAC	5	4	9

*valores indicam o número de vezes que os cis-elementos foram encontrados na região promotora.