



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**DETECÇÃO DE GENES E EXPRESSÃO ENZIMÁTICA EM CULTIVARES DE  
ARROZ (*Oryza sativa* L.) CRESCIDAS SOB ESTRESSE SALINO**

**MARIA DA GRAÇA DE SOUZA LIMA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Nei Fernandes Lopes, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doutora em Ciências (D. Sc).

PELOTAS  
Rio Grande do Sul - Brasil  
Julho de 2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados de catalogação na fonte:  
( Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744 )

L 732d Lima, Maria da Graça de Souza

Detecção de genes e expressão enzimática em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L. ) crescidas sob estresse salino / Maria da Graça de Souza Lima. - Pelotas, 2008.  
93f.+ XVI : il.

Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2008, Nei Fernandes Lopes, Orientador.

1. Arroz 2. CK1 3. Isoenzimas 4. Padrões eletroforéticos 5. Salinidade 6. SOS1 I. Lopes, Nei Fernandes (orientador) II Título.

CDD 633.18

**MARIA DA GRAÇA DE SOUZA LIMA**

**DETECÇÃO DE GENES E EXPRESSÃO ENZIMÁTICA EM CULTIVARES DE  
ARROZ (*Oryza sativa* L.) CRESCIDAS SOB ESTRESSE SALINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Nei Fernandes Lopes, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doutora em Ciências (D. Sc.).

APROVADA: 18 de julho de 2008.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudete Miranda Abreu

---

Prof. Dr. Luciano do Amarante

---

Prof. Dr. Dario Munt de Moraes  
(Co-orientador)

---

Prof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer  
(Co-orientador)

---

Prof. Dr. Nei Fernandes Lopes  
(Orientador)

*“Há que se cuidar do broto para que a vida nos dê flor e frutos.”*

Milton Nascimento

Às minhas razões de viver

Deus

Meu filho Pedro Júnior

Meu esposo Pedro

Meus pais Iara e Vitorino

Meus irmãos

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade do Doutorado.

Ao Instituto de Biologia, Departamento de Botânica e ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal que me acolheram em seu corpo docente, contribuindo em minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Prof. Nei Fernandes Lopes pela orientação, mas principalmente pela confiança, amizade e apoio dados desde a graduação, influenciando em minha formação profissional e principalmente pessoal, mostrando-me que vale a pena ir atrás dos sonhos.

Ao Prof. Dario Munt de Moraes pelo apoio, amizade e incansável colaboração no transcorrer do curso, incentivando-me a sempre ir em frente.

Ao Prof. Marcos Antonio Bacarin pelo apoio desde a graduação, oportunizando-me conhecer a área de pesquisa.

Ao Prof. Paulo Dejalma Zimmer pela co-orientação e colaboração.

Ao meu esposo Pedro e meu filho Pedro Júnior pela presença em todos os momentos e incansáveis apoio e incentivo, impelindo-me na concretização deste sonho, e principalmente, por demonstrarem seu amor diariamente apesar de minha ausência no lar e momentos de dificuldade. Pela contribuição na execução das tarefas domésticas e acadêmicas.

Aos meus pais Iara e Vitorino e irmãos Jorge, Zilda, Lourdes, Rita, João e

Luciane pelo apoio, incentivo e imprescindível auxílio e acompanhamento nos momentos agradáveis e difíceis.

Ao meu irmão João Vitor e minha avó Zilda *in memorium* pela valiosa e disposta colaboração e principalmente grande lição de vida de que somos capazes mesmo diante das maiores adversidades.

Aos meus afilhados(as), sobrinhos(as), cunhados(as), sogro(a) e demais familiares pelo incentivo e credibilidade.

Às amigas e irmãs de coração Cristina Rodrigues Mendes e Claudete Miranda Abreu pela ajuda durante o transcorrer do trabalho e incalculável amizade e companheirismo em todos os momentos e por assegurarem suas presenças mesmo distantes.

Aos amigos Antelmo, Ariadne, Caroline, Clauber, Cristina Larré, Fabiana, Luisa, Patricia, Rafael e Suzi pelos fraternos momentos de convivência e presença em todos as situações agradáveis e de dificuldade.

Aos amigos e funcionários do Instituto de Biologia Rudinei, Honório e Ari pelo apoio e agradável convivência.

Aos colegas e funcionários do laboratório de BioSementes, do Departamento de Fitotecnia Alice Castro, Cibele Ferrari e Géri Meneghello pela amizade e valiosa colaboração na execução do experimento.

Ao Laboratório de BioSementes por permitir o uso de suas instalações.

Aos membros da Banca Examinadora por aceitarem o convite de participação na Defesa de Tese.

Aos demais professores e funcionários do IB e colegas do Programa de Pós-Graduação que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigado.

## Lista de Figuras

### CAPITULO 1

- FIGURA 1** - Zimograma da enzima peroxidase em folhas de cultivares de arroz Bojurú (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl. .... 17
- FIGURA 2** - Zimograma da enzima peroxidase em raízes de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl. .... 18
- FIGURA 3** - Zimograma da enzima superóxido dismutase em folhas de cultivares de arroz Atalanta (A), Bojurú (B), Formosa (F) e GoyaKuman (G) aos 14 e 28 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl. .... 19
- FIGURA 4** - Zimograma da enzima catalase em folhas de cultivares de arroz Bojurú (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A); Querência (Q) e Taim (T) aos 14 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl..... 21

### CAPITULO 2

- FIGURA 1** - Padrões eletroforéticos obtidos com a enzima esterase em folhas de arroz nas cultivares Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl..... 29
- FIGURA 2** - Padrões eletroforéticos da enzima esterase em raízes de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T) aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl..... 30
- FIGURA 3** - Padrões eletroforéticos da enzima desidrogenase alcoólica em folhas de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl..... 32

<b>FIGURA 4</b>	- Padrões eletroforéticos da enzima $\alpha$ -amilase em folhas de cultivares de arroz Atalanta (A) e Bojuru (B); aos 14 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.....	34
<b>FIGURA 5</b>	- Padrões eletroforéticos da enzima $\alpha$ -amilase em raízes de cultivares de arroz Atalanta (A) e Bojuru (B); aos 14 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.....	34
<b>FIGURA 6</b>	- Padrões eletroforéticos da enzima málica em folhas de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.....	35
<b>FIGURA 7</b>	- Padrões eletroforéticos da enzima málica em raízes de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.....	37
<b>FIGURA 8</b>	- Padrões eletroforéticos da enzima glutamato desidrogenase em folhas de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl. ....	39
<b>FIGURA 9</b>	- Padrões eletroforéticos da enzima glutamato desidrogenase em raízes de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl. ....	40
<b>FIGURA 10</b>	- Padrões eletroforéticos da enzima malato desidrogenase em folhas de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl. ....	42
<b>FIGURA 11</b>	- Padrões eletroforéticos da enzima malato desidrogenase em raízes de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl. ....	44
<b>FIGURA 12</b>	- Padrões eletroforéticos da enzima fosfoglico isomerase em folhas de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.....	46
<b>FIGURA 13</b>	- Padrões eletroforéticos da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase em folhas de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.....	47

### CAPITULO 3

- FIGURA 1** - Gel de eletroforese para detecção do gene SOS1 em plantas de cultivares de arroz Taim (T); Atalanta (A); Formosa (F); Bojuru (B); Querência (Q) e GoyaKuman (G), utilizando-se os *primers* SOS1-1; SOS1-2 e SOS1-3. Marcador de peso molecular Ladder 100pb (M) e controle sem DNA com 2 µL H<sub>2</sub>O (C). ..... 58
- FIGURA 2** - Gel de eletroforese para detecção do gene CK1 em plantas de cultivares de arroz Taim (T); Formosa (F); Atalanta (A); Bojuru (B); Querência (Q) e GoyaKuman (G), utilizando-se os *primers* CK1-1; CK1-2 e CK1-3. Marcador de peso molecular Ladder 100pb (M) e controle sem DNA com 2 µL H<sub>2</sub>O (C)..... 60

## Lista de Tabela

<b>Tabela 1</b> - Relação de seqüências dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR, para amplificação dos genes SOS1 e CK1, com orientação forward (Left – L) e reverse (Right – R) e temperatura de anelamento (TM).....	57
---	----

## INDICE

Resumo .....	xiii
Abstract.....	xv
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>10</b>
<b>PADRÕES ELETROFORÉTICOS DE ISOENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS DE ARROZ CRESCIDAS EM SALINIDADE</b>	
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>23</b>
<b>EXPRESSÃO DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS EM CULTIVARES DE ARROZ CRESCIDAS EM ESTRESSE SALINO</b>	
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>50</b>
<b>DETECÇÃO DE GENES QUE CONFEREM TOLERÂNCIA À SALINIDADE EM PLANTAS DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.)</b>	
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>

<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>62</b>
<b>Referências .....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>76</b>

## Resumo

LIMA, MARIA DA GRAÇA DE SOUZA, D. Sc. Universidade Federal de Pelotas, junho de 2008. **Deteccção de genes e expressão enzimática em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) crescidas sob estresse salino.** Prof. Orientador: Nei Fernandes Lopes. Co-orientadores: Professores Dario Munt de Moraes e Paulo Dejalma Zimmer.

No Rio Grande do Sul, o principal sistema de irrigação da cultura do arroz é por inundação, podendo conduzir à salinização os solos com drenagem inadequada, especialmente as lavouras da região litorânea que utilizam a água da Laguna dos Patos, que está sujeita à salinização pela entrada do mar quando é baixo o nível da referida Laguna, tornando-se uma das maiores limitações ambientais na produção de arroz. Esta pesquisa teve como objetivos analisar a expressão enzimática de cultivares de *Oryza sativa* L. ssp. *indica* S. Kato e *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato, crescidas em diferentes níveis de salinidade e detectar genes envolvidos com a tolerância à salinidade, com base na hipótese de que as cultivares da Segunda subespécie apresentam maior tolerância à salinidade. No experimento foram utilizadas as cultivares BRS Bojuru, IAS 12-9 Formosa e Goyakuman pertencentes à *O. sativa* ssp. *japonica* e as cultivares de *O. sativa* ssp. *indica* BRS-7 Taim, BRS Querência e BRS Atalanta. As plântulas de arroz com 10 dias após a emergência (DAE) foram transferidas para casa de vegetação com temperatura e umidade controlada e crescidas em bacias de 15 L, contendo solução nutritiva de Hoagland meia força acrescida de 0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl. As plântulas foram coletadas aos 14, 28, 42 e 56 dias após a transferência (DAT) e imediatamente armazenadas em ultrafreezer à -70 °C para posterior aná-

-lises. Os tecidos vegetais foram macerados e colocados em tubos *ependorf* com solução extratora de Scandális. A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida 7% colocados em cubas eletroforéticas verticais. As bandas foram reveladas para os sistemas enzimáticos superóxido dismutase, peroxidase, catalase, esterase, glutamato desidrogenase, álcool desidrogenase, fosfoglucose isomerase, malato desidrogenase, enzima málica, alfa amilase e glucose-6-fosfato desidrogenase. Por intermédio de pesquisa *in silico*, realizada junto ao *National Center for Biotechnology Information* foram identificados os genes AY785147 – SOS e AF319481 - CK1, envolvidos na tolerância a salinidade. A detecção dos genes consistiu da extração de DNA genômico segundo o método CTAB 2%, seguido de reações de PCR realizadas em termociclador mediante a utilização dos *primers* desenhados também *in silico*. Os produtos da amplificação foram detectados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. A visualização do DNA corado com brometo de etídio foi feita sobre iluminação ultravioleta e as imagens digitalizadas. A expressão das enzimas envolvidas nos mecanismos de tolerância ao estresse salino é maior em *O. sativa* ssp. *japonica*. Fragmento do gene SOS1 foi encontrado em todas cultivares, com exceção da BRS Atalanta e o gene CK1 está presente em todas as cultivares avaliadas. Conclui-se que os sistemas enzimáticos são mais expressos nas cultivares de *O. sativa* ssp. *japonica*, nas folhas e aos 14 DAT, apresentando bandas mais intensas conforme o aumento da salinidade. A expressão das enzimas envolvidas nos mecanismos de tolerância ao estresse salino é maior em *O. sativa* ssp. *japonica* e os genes estudados estão presentes nas duas subespécies.

## Abstract

LIMA, MARIA DA GRAÇA DE SOUZA, D. Sc. Universidade Federal de Pelotas, junho de 2008. **Detection of gene and enzyme expression in rice cultivars (*Oryza sativa* L.) grown in salt stress.** Advisor: Nei Fernandes Lopes. Comitê: Dario Munt de Moraes e Paulo Dejalma Zimmer.

In Rio Grande do Sul State, the main system for irrigation of rice cultivation is by flooding, can lead to the salinization of soils with inadequate drainage, especially at the coastal region where crops using water from the Laguna dos Patos, which is subject to the salinization by sea water. This is a major environmental problem in the rice production. This survey aimed to examine the expression of enzyme in *Oryza sativa* L. ssp. *indica* S. Kato e *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato, grown in different levels of salinity, in order to identify genes involved in tolerance to salinity, based on the assumption that the second subspecies show greater tolerance to salinity. In the experiment were used *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato (BRS Bojuru, IAS 12-9 Formosa and Goyakuman) and *Oryza sativa* L. ssp. *indica* S. Kato (BRS-7 Taim, BRS Querência and BRS Atalanta). The seedling was done in plastic trays, containing sand washed as substrate. The seedlings were transferred to greenhouse with 10 days of emergency under temperature 25 °C and humidity 85 % controlled and placed in basins of 15 L containing nutrient solution of Hoagland half strength increased of 0, 25, 50, 75 and 100 mM NaCl. Seedlings were collected at 14, 28, 42 and 56 days after the transfer and immediately stored in ultrafreezer to -70 °C to subsequent analyses. The plant tissues were macerated and placed in tubes *ependorf* with extractor solution of Scandális. The electrophoresis was performed in 7% of polyacrylamide gels placed in vertical vats. The bands were revealed for several enzymes systems: superoxide dismutase, peroxidase, catalase, esterase,

glutamate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, fosfoglucoase isomerase, malate dehydrogenase, málica enzyme, alpha amylase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Through the search *in silico*, conducted with the *National Center for Biotechnology Information* identified the genes AY785147 - SOS and AF319481 - CK1 involved in the salinity tolerance. The detection of the gene was the extraction of DNA using the method CTAB 2%, followed by reactions of PCR thermocycler held on through the use of *primers* also drawn *in silico*. The products of amplification were detected by agarose gel electrophoresis of 1.5%. The view of the DNA stained with bromide etídio was made on ultraviolet light and scanned images. The expression of enzymes involved in the mechanisms of tolerance to salt stress is greater in *O. sativa* ssp. *japonica*. Fragment of SOS1 gene was found in all cultivars, except for BRS Atalanta. CK1 gene is present in all cultivars evaluated. It allows to conclude that enzyme systems were more expressed in cultivars *O. sativa* ssp. *japonica*, in the leaves and the 14 DAT, featuring bands more intense as the increase of salinity. The expression of enzymes involved in the mechanisms of tolerance to salt stress is greater in *O. sativa* ssp. *japonica* and the genes studied are present in both subspecies.

## INTRODUÇÃO GERAL

O arroz é a principal fonte de alimentação para cerca de dois terços da população mundial, com importante influência no desenvolvimento sócio-econômico. Ao todo, são 15 mil produtores que empregam diretamente 232 mil pessoas no cultivo de 2,97 milhões de hectares de arroz no Brasil (INTERARROZ, 2008; IRGA, 2008). Estima-se para esta safra (2007/2008) uma produção de 12,0 milhões de toneladas, superior à safra anterior. Desse total, os dois estados produtores de arroz na região Sul do Brasil (RS e SC) produzirão 69,8%, da safra do cereal no País. Com destaque para o Rio Grande do Sul, que participa com 86,0% da produção regional (CONAB, 2008). As projeções atuais indicam que o consumo de arroz neste ano atingirá 620 milhões de toneladas para uma produção de 618 milhões de toneladas. O Brasil tem um consumo previsto para 2008 de 13,2 milhões de toneladas e a safra está projetada em 12 milhões, confirmando a necessidade de importação (AGROBRASIL, 2008). Os estoques mundiais devem cair mais uma vez, devido às perspectivas de pequeno aumento da produção, enquanto o consumo global deve crescer 1,1% neste ano (Villar, 2008).

A lavoura arrozeira, na região Sul do País, utiliza a inundação como principal sistema de irrigação da cultura, o que pode ocasionar a salinidade dos solos. Cerca de um terço das áreas irrigadas do mundo é afetada pela salinidade, que representa um dos mais importantes estresses ambientais, por limitar a produção das culturas, indo de encontro com a crescente demanda por alimento (Flowers e Yeo, 1997). Constitui um estresse ambiental distribuído por todo o mundo, devido a ciclos sucessivos de encharcamento e evaporação (Félix e Duarte, 2005), especialmente em áreas tropicais, irrigadas e com drenagem inadequada (Souza

Filho et al., 2003). Ocorre naturalmente em regiões costeiras (Souza-Filho et al., 2003), áridas e semi-áridas (Kusnetsov e Shevyacova, 1997; Costa et al., 2003), afetando milhões de hectares, devido ao uso intenso para a agricultura e à irrigação excessiva (Silva Júnior et al., 2002; Menezes-Benavente et al., 2004). A alta concentração de sódio ( $\text{Na}^+$ ) de um solo pode não apenas prejudicar diretamente as plantas, mas também degradar a estrutura do mesmo, diminuindo a porosidade e a permeabilidade à água (Taiz e Zeiger, 2004). Mesmo sendo uma água considerada de excelente qualidade, a prática da irrigação pode ser um importante fator de salinização do solo, se não for manejada corretamente, principalmente se o sistema não contemplar drenagem, sendo um dos principais impactos negativos da agricultura irrigada (Brito, 2008).

No Brasil, a área afetada pelo estresse salino corresponde a 2% da área total (Menezes-Benavente et al., 2004), sendo grande obstáculo à produtividade das lavouras (Perozzi, 2005). No Rio Grande do Sul, o principal sistema de irrigação da cultura do arroz é por inundação, podendo conduzir, com o tempo, à salinização os solos que possuem drenagem inadequada, impedindo a remoção do sal por lixiviação (Marschner, 1995; Toenissen, 1995). Principalmente as lavouras da região litorânea que utilizam a água da Laguna dos Patos (Marschner, 1995; Toenissen, 1995; Macedo et al., 2007; SOSBAI, 2007), que estão sujeitas à salinização pela entrada da água do mar quando é baixo o nível desta Laguna, especialmente em janeiro e fevereiro, quando ocorre baixa precipitação e elevada evapotranspiração, coincidindo com a fase reprodutiva da cultura (SOSBAI, 2007). Embora não seja um problema que ocorra em todos os anos, isso acontece com certa frequência nas lavouras, quando os sais atingem teores elevados (Macedo et al., 2007), sendo uma das maiores limitações ambientais na produção de arroz. Trabalhos realizados concluíram que as cultivares de arroz com alto potencial produtivo cultivadas no RS e SC não toleram irrigação com água cujo teor de NaCl seja igual ou superior a 0,25% (SOSBAI, 2007).

As plantas podem ser divididas em dois grupos amplos, com base na sua resposta às altas concentrações de sais. As halófitas que são nativas de solos salinos e completam o seu ciclo de vida naqueles ambientes e as glicófitas, que não possuem resistência ao sal no mesmo grau que as halófitas. Geralmente, existe um limiar de concentração de sal acima do qual as glicófitas começam a mostrar sinais de inibição do crescimento, descoloração foliar e perda de massa seca (Larcher,

2000; Lima e Lopes, 2002). A tolerância salina varia com a espécie, sendo o arroz classificado como moderadamente suscetível (Loomis e Connor, 1992), e evidentemente deve ocorrer, também, variações de tolerância salina entre genótipos da mesma espécie. As cultivares de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato são consideradas como moderadamente tolerantes, enquanto as de *Oryza sativa* L. ssp. *indica* S. Kato como sensíveis à salinidade (Machado e Terres, 1997).

O estudo da tolerância à salinidade em plantas é de especial importância, pois o sal se constitui em fator limitante para a produção agrícola, causando dois tipos distintos de estresse. Nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta, o estresse salino, causa estresse osmótico, pois o decréscimo do potencial hídrico na rizosfera ocasiona dificuldade de absorção d'água (Souza Filho et al., 2003), tornando a água menos disponível para a planta, induzindo à diminuição do potencial osmótico (Prisco, 1980), que provoca a ativação de rotas de sinalização relacionadas ao déficit hídrico e ao acúmulo de proteínas envolvidas na aclimação à salinidade (Taiz e Zeiger, 2004). Porém com o passar do tempo, produz adicionalmente fitotoxicidade iônica específica (Niu et al., 1995), devido ao excesso de absorção de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$ , ocasionando desbalanço iônico (pelo distúrbio de concentração intracelular de íons) e diminuição na absorção de nutrientes e no crescimento (Alshammary et al., 2004), interferindo no mecanismo estomático, provocando distúrbios nas atividades metabólicas em geral (Mansour e Salama, 2004), incluindo a fotossíntese (Levitt, 1972, Greenway e Munns, 1980; Brungoli e Lauteri, 1991; Bohnert et al., 1995) e a atividade enzimática (Souza Filho et al., 2003; Menezes-Benavente, 2004; Taiz e Zeiger, 2004).

As plantas não cultivadas que toleram o sal e crescem em ambientes salinos, possuem altos níveis de sal intracelular. A utilização de íons inorgânicos para o ajustamento osmótico pode sugerir que plantas tolerantes ao sal são aptas a suportar altos níveis de sais dentro de suas células. No entanto, enzimas extraídas dessas plantas mostraram alta sensibilidade ao sal, sugerindo que estão aptas a manter os íons  $\text{Na}^+$  excluídos do citosol (Blumwald, 2001). Algumas plantas resistentes ao sal, tais como *Tamarix* sp. e *Atriplex* sp., não eliminam íons pelas raízes, mas, em vez disso, tem glândulas de sal na superfície das folhas. Os íons são transportados para essas glândulas, onde o sal cristaliza, não sendo prejudicial (Larcher, 2000).

As plantas podem usar três estratégias para manter a concentração citosólica de sódio baixa, por meio da exclusão de sódio, compartimentação e secreção. Em plantas sensíveis ao sal a resistência, a níveis moderados de salinidade no solo, depende em parte da capacidade das raízes de impedir que íons potencialmente prejudiciais alcancem a parte aérea. Os íons de sódio penetram nas raízes passivamente, via apoplasto, ou são transportados ativamente pela rota simplástica, usando energia metabólica (ATP) para carregar ou expelir o sódio de volta para a solução externa (Marengo e Lopes, 2007). As plantas necessitam realizar ajustes osmóticos para obter água do ambiente externo com baixo potencial hídrico. As células vegetais ajustam seu potencial hídrico em resposta ao estresse osmótico, pelo abaixamento do seu potencial de soluto ( $\Psi_s$ ). Dois processos intracelulares contribuem para o decréscimo do potencial de soluto: o acúmulo de íons no vacúolo e a síntese de solutos compatíveis no citosol, como glicina-betaína, sorbitol, manitol, pinitol, sacarose (Prisco, 1980; Rodríguez et al., 1997) e prolina (Liu e Zhu, 1997b), que possuem também a função de proteção da membrana plasmática (Mansour e Salama, 2004) e das enzimas do citosol (Greenway e Munns, 1980). A quantidade de carbono empregada para a síntese desses solutos orgânicos é grande e esse desvio de carbono para ajustar o potencial hídrico, reduz o crescimento, a biomassa total e a produtividade das colheitas. Sob condições não salinas, o citosol de células de plantas superiores contém de 100 a 200 mM de  $K^+$  e de 1 a 10 mM de  $Na^+$ , sendo ambiente iônico onde muitas enzimas alcançam o seu ótimo. Uma razão  $Na^+/K^+$  anormalmente alta e/ou concentrações altas de sais totais inativam as enzimas e inibem a síntese protéica (Cramer et al., 1985).

A salinidade induz a produção de enzimas antioxidantes para minimizar os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (Jebara et al., 2005). O oxigênio, apesar de ser requerido pelas plantas para processos indispensáveis a sua sobrevivência, é potencialmente danoso, podendo ser reduzido a espécies reativas de oxigênio (ROS), na forma de oxigênio "singlet" ( $^1O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^*$ ) que são produtos gerados também pelo metabolismo dos organismos aeróbicos (Angelova et al., 2000) e provocam "estresse oxidativo" devido à sua ação tóxica e mutagênica sobre as células (Angelova et al., 2000; Mallick e Mohn, 2000). Portanto, a produção acentuada de ROS durante o estresse pode representar uma ameaça às células. Apesar disso, as ROS também podem agir como sinalizadores na ativação de

resposta ao estresse e como vias de defesa. Muitos efeitos dos estresses ambientais no metabolismo das plantas são mediados pelo aumento na produção das ROS (Vaidyanathan et al., 2003). Para proteção das organelas e das membranas celulares dos efeitos danosos de concentrações tóxicas de ROS, as plantas desenvolveram um complexo mecanismo de defesa (Foyer et al., 1994; Mehdy et al., 1996), incluindo um sistema enzimático, que mantém baixo os níveis de enzimas, que compreendem a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase, catalase, glutathione redutase e tioredoxina redutase, e um sistema não-enzimático, composto por moléculas antioxidantes, como ácido ascórbico, glutathione, carotenóides e tocoferol (Mittler, 2002).

As plantas submetidas ao estresse salino podem reduzir a área foliar ou perder as folhas por abscisão, durante estresse osmótico. Além disso, as mudanças na expressão gênica associadas ao estresse osmótico estão similarmente associadas ao estresse salino. No entanto, é necessário ter em mente que, além da aclimação ao meio com baixo potencial hídrico, as plantas sob estresse salino precisam fazer frente à toxicidade de concentrações iônicas elevadas presentes nestes ambientes.

A salinidade do solo cria estresse iônico e osmótico nas plantas. O aspecto iônico do estresse salino é distinto de outros estresses abióticos como a seca e o frio, havendo uma via de sinalização dedicada especificamente ao excesso de sódio associado à deficiência de potássio (Zhu, 2001b), que altera a homeostase iônica do citoplasma (Hasegawa et al., 2000). A função de vários transportadores iônicos é limitar a entrada e saída de sódio nas células, para regular a compartimentação de sódio no vacúolo e importar seletivamente potássio sobre sódio (Blumwald et al., 2000). Quando as plantas são sujeitas a salinidade, alguns transportadores iônicos precisam ser ativados ou terem sua atividade aumentada, enquanto outros necessitam ter sua atividade suprimida. Visto que o NaCl é o sal mais abundante encontrado pelas plantas sob estresse salino, os sistemas de transportadores que facilitam a compartimentação de sódio para o vacúolo são críticos (Binzel et al., 1988). Sob concentrações elevadas de sódio, é inibida a absorção de potássio por meio de um transportador com afinidade alta a  $K^+-Na^+$  (HKT1), e o transportador opera como um sistema de absorção de sódio. O cálcio, por outro lado, aumenta a seletividade  $K^+/Na^+$  e, assim procedendo, aumenta a tolerância ao sal (Liu e Zhu, 1997a). A atividade das bombas de prótons é necessária para o transporte

secundário do excesso de íons associado às respostas das plantas ao estresse salino, mostrando que a atividade dessas bombas é aumentada pela salinidade, e parte dessa super-regulação pode ser atribuída à expressão gênica induzida. Um mecanismo para o transporte de sódio para fora da célula é a operação dos transportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  do tipo antiporte, localizados na membrana plasmática, confirmados pela caracterização do SOS1 (*Salt Overly Sensitive 1* = demasiadamente sensível ao sal), da membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* (Shi et al., 2000). A eficiente compartimentação de sódio é igualmente acompanhada pela operação de transportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  vacuolares, do tipo antiporte, que removem os íons potencialmente prejudiciais para os vacúolos (Apse et al., 1999), tal como a *Arabidopsis* AtNHX1, indivíduos transgênicos de *Arabidopsis* e de tomateiro, por superexpressão do gene que codifica AtNHX1, exibem acentuada tolerância ao sal (Apse et al., 1999; Quintero et al., 2000). Estes íons agem dentro do vacúolo para manter o fluxo hídrico para a célula (Glenn et al., 1999). Os transportadores usam a força gerada por enzimas vacuolares do tipo  $\text{H}^+$ -translocadoras,  $\text{H}^+$ -adenosina trifosfatase (ATPase) e  $\text{H}^+$ -pirofosfatase inorgânica (PPIase). Alguns dos determinantes moleculares da exclusão de sódio e da compartimentação vacuolar têm sido determinados, estabelecendo uma rota de sinalização, a rota SOS, que regula a expressão desses genes envolvidos na homeostase iônica.

Metodologias de seleção são freqüentemente usadas no desenvolvimento de genótipos tolerantes aos estresses abióticos, em diferentes partes do mundo (Flowers e Yeo, 1997). A descoberta de novos genes, a determinação de seus padrões de expressão em resposta ao estresse abiótico e melhor entendimento de seu papel na adaptação ao estresse, fornecerão a base de novas estratégias para incrementar a tolerância das culturas ao estresse (Cushman e Bohnert, 2000).

A adaptação ao estresse salino é acompanhada por alterações nos níveis de proteínas, mRNAs e numerosos metabólitos. Vários genes os quais a expressão é ativada em resposta a salinidade, foram identificados (Kawasaki et al., 2001). Enquanto alguns desses genes codificam para proteínas de proteção tais como a osmotina, proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) e transportadores iônicos, outros codificam para enzimas que participam no processo metabólico especificamente acionado pelo estresse salino (Gong et al., 2001). Embora, os estresses por frio, seca e sal tenham natureza física diferentes e as plantas respondam de maneira específica a cada um, ativando reações comuns na planta,

pela indução de alguns genes (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997), como RD (Responsive to desiccation), COR (Cold-regulated), KIN (Cold-inducible) e LTI (Low-temperature-induced), podem ser o sinal indutivo derivado de danos comuns causados por estes estresses.

Tais descobertas moleculares constituem outro exemplo da riqueza de novas informações que emergem de estudos sobre plantas transgênicas, seqüenciamento gênico e caracterização de proteínas. A performance e a diversidade genética de duas variedades tradicionais de arroz (Pokkali e Nona-Bokra) com suficiente nível de tolerância salina foram investigadas e apresentaram quatro fragmentos específicos amplificados, os quais devem estar potencialmente envolvidos nos genes de tolerância à salinidade (Xie et al., 2000). Plantas transgênicas de canola (*Brassica napus* L.) na presença de 200 mM de NaCl crescem, florescem e produzem sementes, enquanto que as não modificadas são severamente afetadas (Blumwald et al., 2000).

A análise dos mutantes de *Arabidopsis SOS* revelou uma nova proteína cinase regulada pelo  $Ca^{2+}$  em resposta ao aspecto iônico do estresse salino. A via de sinalização para a regulação da homeostase iônica e da tolerância à salinidade tem surgido da clonagem e da caracterização bioquímica de diversos genes SOS e seus produtos em *Arabidopsis* (Zhu, 2001a).

O gene SOS1 codifica um transportador do tipo antiporte  $Na^+/H^+$  localizado na membrana plasmática, que é controlado em nível transcricional e pós-transcricional pela rota SOS. Assim, a função fisiológica e bioquímica do SOS1 é remover  $Na^+$  do citoplasma e exportá-lo para o espaço extracelular das raízes. O SOS1 tem papel indireto na aquisição de  $K^+$ , bem como de elevar a concentração deste elemento através de co-transportadores do tipo  $H^+-K^+$ . O transcrito SOS1 está presente em plantas de *Arabidopsis* mesmo sem estresse salino, mas os seus níveis são aumentados por tratamento com NaCl (Shi et al., 2000). O aumento do nível de transcritos de SOS1, como resultado do estresse salino, está parcialmente sob o controle dos genes SOS2 e SOS3.

O estresse salino ativa um canal de cálcio, que produz aumento do cálcio citosólico, ativando a cascata SOS por meio de SOS3 (Taiz e Zeiger, 2004). O gene SOS2 codifica uma proteína cinase serina-treonina que é similar à proteína cinase em levedura e em mamíferos (Liu et al., 2000). Embora, todas as rotas de sinais SOS sejam completamente definidas, evidências genéticas e bioquímicas indicam

que o efeito principal regulado pela via é o sistema de transporte envolvido na homeostase iônica (Taiz e Zeiger, 2004). O gene SOS2 possui um domínio regulatório e um catalítico, havendo interação regulatória-catalítica dentro do SOS2 (Guo et al., 2001). Esta interação intramolecular parece manter o SOS2 num estado inativo. De fato a deleção do domínio regulatório resulta em uma proteína cinase constitutivamente ativa. O gene SOS3 codifica uma proteína ligada ao cálcio (Nelson et al., 2002). O SOS3 interage fisicamente e ativa o SOS2 (Halfter et al., 2000), sendo o cálcio o segundo mensageiro para que haja a ativação, em resposta ao estresse salino.

Em resumo, a salinidade ativa várias rotas de proteínas cinases. O excesso de sódio no meio de crescimento ativa um sinalizador de cálcio citoplasmático que é percebido pela proteína  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente SOS3 (Ishitani et al., 2000). O SOS3 interage e ativa o SOS2, uma proteína cinase. A rota SOS3-SOS2 regula a atividade do transportador de íons SOS1, mantendo baixa a concentração tóxica de sódio no citoplasma (Halfter et al., 2000; Shi et al., 2000). A homeostase iônica definida por SOS3/SOS2/SOS1 parece ser única nas plantas.

Resultados dos primeiros estudos com plantas transgênicas demonstraram que, após a transferência de genes, as plantas mostram tolerância a estresses (Tarczynski et al., 1993). O gene transferido codifica a enzima manitol desidrogenase e sua expressão induz acúmulo de manitol. A transferência de outros genes geram plantas transgênicas que acumulam outros solutos como trealose (Holmström et al., 1996), prolina (Kishor et al., 1995) e frutana (Pilon-Smits et al., 1995)

O germoplasma do arroz possui variabilidade genética para tolerância salina, mas o nível de tolerância não é muito alto (Xie et al., 2000). Há vários genes identificados, os quais a expressão é ativada em resposta ao estresse salino. O estresse ambiental desempenha papel importante na determinação de como o solo e o clima limitam a distribuição de espécies vegetais, sendo de grande importância para a agricultura e para o meio ambiente, compreender os processos fisiológicos e os mecanismos de adaptação e aclimatação de plantas aos estresses ambientais que resultam de eventos anatômicos, morfológicos, celulares, bioquímicos e moleculares, conferindo tolerância e assegurando a sua sobrevivência (Shinozaki e Dennis, 2003).

Os eventos moleculares, ligando a percepção de um sinal de estresse às respostas genômicas que levam à tolerância, são investigados exhaustivamente nos últimos anos (Larcher, 2000) e a transferência de genes que supostamente medeiam a tolerância ao estresse da planta, onde são superexpressos ou alterados de alguma maneira, tem fornecido novas e importantes ferramentas científicas no estudo de genes envolvidos na tolerância ao estresse (Tarczynski et al., 1993). Estes estudos ilustram o uso combinado de pesquisas genéticas, fisiológicas e bioquímicas para a elucidação dos determinantes moleculares da homeostase iônica e seu sinal de regulação nas plantas, contribuindo para o desenvolvimento de genótipos tolerantes à salinidade (Mansour e Salama, 2004). Além do mais, a utilização de cultivares tolerantes à salinidade é alternativa viável para o reaproveitamento de áreas degradadas e para o uso da água de baixa qualidade (Willadino et al., 1999).

Diante do exposto, os objetivos desta pesquisa foram analisar a expressão enzimática de cultivares de *O. sativa* ssp. *japonica* e *O. sativa* ssp. *indica*, crescidas em diferentes níveis de salinidade e detectar genes envolvidos com a tolerância à salinidade, com base na hipótese de que as cultivares da primeira subespécie apresentam maior tolerância.

## CAPÍTULO 1

### PADRÕES ELETROFORÉTICOS DE ISOENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS DE ARROZ CRESCIDAS EM SALINIDADE

#### INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo, com grande importância do ponto de vista econômico e social (Bonow et al., 2001). O Rio Grande do Sul destaca-se como principal produtor, participando com um percentual de aproximadamente 60% da produção nacional (IRGA, 2008). Destacam-se as regiões sul do Estado e a litorânea como grandes produtores. Nesses locais a irrigação constante por inundação pode conduzir os solos com drenagem inadequada à salinização. Na cultura do arroz, as cultivares de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato são consideradas tolerantes enquanto as de *Oryza sativa* L. ssp. *indica* S. Kato, sensíveis ao estresse salino (Machado e Terres, 1997).

O estudo da tolerância à salinidade em plantas é de especial importância, pois o sal constitui num fator limitante para a produção agrícola, causando dois tipos distintos de estresse, primeiro o decréscimo do potencial hídrico na rizosfera; e segundo, a toxicidade iônica, devido ao excesso de absorção de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$ , ocasionando desbalanço iônico, provocando distúrbios nas atividades metabólicas em geral (Mansour e Salama, 2004), incluindo a atividade enzimática (Souza Filho et al., 2003; Menezes-Benavente, 2004; Taiz e Zeiger, 2004).

A análise por isoenzimas é utilizada na caracterização de cultivares de arroz (Bonow et al., 2001), constituindo numa das técnicas de marcadores bioquímicos mais utilizados desde a década de 60. A premissa básica adotada ao utilizar dados isoenzimáticos é que, diferenças na mobilidade de isoenzimas num campo elétrico são resultantes de diferenças ao nível de seqüências de DNA que codificam tais enzimas. Desse modo, quando os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, é assumido que estas diferenças possuam base genética (Murphy et al., 1990). Resguardadas as diferenças decorrentes da expressão gênica que podem ser moduladas pelo ambiente. Marcadores isoenzimáticos, além do baixo custo e acessibilidade da técnica, geralmente, fornecem ampla informação genética para diversas aplicações (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A salinidade induz a produção de enzimas antioxidantes para minimizar os danos causados pelas ROS (Jebara et al., 2005), como os radicais superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), radicais hidroxila ( $\text{OH}^*$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio "singlet" ( $^1\text{O}_2$ ) que provocam "estresse oxidativo" devido à ação tóxica e mutagênica sobre as células (Angelova et al., 2000; Mallick e Mohn, 2000). Estas ROS são extremamente citotóxicas e podem causar sérios danos no metabolismo por meio da oxidação nos lipídios (Alscher et al., 2002; Foyer e Noctor, 2000, 2003), ácidos nucléicos (Alscher et al., 2002) e proteínas (Herbette et al., 2002). Ainda que, o aumento da produção de ROS possa ser um perigo potencial para a célula, também é provável que estas espécies atuem como sinais para a ativação de defesa dos estresses em plantas (Mittler, 2002; Neill et al., 2002). Muitos efeitos dos estresses ambientais no metabolismo das plantas são mediados pelo aumento na produção das ROS (Vaidyanathan et al., 2003). Deste modo, as ROS podem ser vistas como Indicadores de estresse e como mensageiro secundário envolvido na transdução de sinais em resposta ao estresse (Mittler, 2002; Mittler et al., 2004). As plantas têm desenvolvido sistemas de defesa contra as ROS, envolvendo tanto a remoção

quanto a limitação na formação (Alscher et al., 2002), para evitar os efeitos danosos de concentrações tóxicas de ROS. As plantas desenvolveram complexo mecanismo de defesas enzimáticas, incluindo enzimas antioxidantes como as fenol peroxidase, ascorbato peroxidase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase, as quais, juntas com outras enzimas do ciclo da ascorbatoglutationa, promovem a retirada das ROS (Hernández et al., 2000). Os efeitos do estresse salino (NaCl) em respostas antioxidantes têm sido estudados em um número significativo de espécies de plantas. Estas pesquisas indicam que as respostas antioxidativas estão muito correlacionadas com a sensibilidade e tolerância das cultivares ao estresse salino (Bandeoglu et al., 2004), sendo importantes nas respostas de defesa e aclimação das plantas às condições de estresse (Cavalcanti et al., 2004).

A superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1) caracteriza um grupo de metaloenzimas encontradas no citoplasma celular e matriz mitocondrial que catalisam a reação de dismutação de radicais superóxidos livres ( $O_2^-$ ), produzidos em diferentes locais na célula, para oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), consumindo-os e livrando as células do risco de oxidação por esses radicais. A SOD é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por ROS nas células (Alscher et al., 1997). Estas metaloenzimas têm três classes conhecidas dependendo do metal co-fator do sítio ativo Mn, Fe ou CuZn (Scandalios, 1993; Niyogi, 1999; Mallick e Mohn, 2000), sendo que a Cu/Zn-SODs são consideradas as mais abundantes em vegetais (Wingsle et al., 1991), cada uma tem papel chave na proteção contra o estresse oxidativo (Santos et al., 2000). De maneira geral, as Cu/Zn-SODs são encontradas no citosol e no estroma dos cloroplastos (Hayakawa et al., 1984) e são sensíveis a concentrações de  $CN^-$  (radical cianeto) (Mallick e Mohn, 2000). As Mn-SODs e Fe-SOD não são sensíveis ao  $CN^-$ , sendo encontradas geralmente na matriz mitocondrial de células eucarióticas e em células procarióticas, embora exista Mn-SOD associada à membrana dos cloroplastos de algumas plantas. A Fe-SOD foi determinada em algumas famílias de plantas e está associada principalmente com os cloroplastos (Mallick e Mohn, 2000). Em outros compartimentos subcelulares, o peróxido de hidrogênio é removido pelas peroxidases (POX - EC 1.11.1.7), que estão associadas a processos bioquímicos e fisiológicos como crescimento, formação celular, desenvolvimento de frutos, biossíntese do etileno, bem como resposta a vários estresses (Matamoros et al., 2003). As POX utilizam o peróxido de hidrogênio para oxidar uma grande variedade

de substâncias doadoras de hidrogênio como fenóis, grupos com anéis aromáticos, diaminas, ácido ascórbico, aminoácidos e alguns íons inorgânicos. Também estão relacionadas à peroxidação de lipídios. As catalases (CAT – EC 1.11.1.6) estão relacionadas com a decomposição de peróxido de hidrogênio nas células (Muniz et al., 2007).

O entendimento dos efeitos da salinidade nas células é fundamental para a elucidação dos mecanismos de tolerância do tecido e da planta inteira. Quando uma característica tiver um papel na tolerância à salinidade e for definida em nível celular é essencial que o impacto desta característica seja determinado em toda a planta. Então, tal característica pode contribuir para o desenvolvimento de genótipos tolerantes a salinidade (Mansour e Salama, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar padrões eletroforéticos de isoenzimas antioxidantes em plântulas de arroz, das cultivares *O. sativa* ssp. *japonica* e *O. sativa* ssp. *Indica*, submetidas a diferentes níveis de salinidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

No experimento foram utilizadas subespécies de *O. sativa* ssp. *japonica* consideradas tolerantes à salinidade e de *O. sativa* ssp. *indica* sensíveis ao estresse salino (Machado e Terres, 1997; Lima et al., 2004 e 2005). As cultivares de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato foram BRS Bojurú, IAS 12-9 Formosa e Goyakuman e as de *Oryza sativa* L. ssp. *indica* S. Kato BRS-7 Taim, BRS Querência e BRS Atalanta, de uso comum na orizicultura gaúcha.

Inicialmente, foi realizada a semeadura em bandejas plásticas, contendo como substrato areia lavada. Aos 10 dias após a emergência as plântulas foram transferidas para casa de vegetação com temperatura e umidade controladas. As plântulas colocadas em bacias com capacidade para 15 L, contendo solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) meia força e acrescida de 0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl. As soluções foram trocadas a cada 4 dias. Placas de isopor foram utilizadas como suporte para 30 plântulas fixadas com algodão, permanecendo nas bacias pelo período de 3 coletas realizadas à intervalos de 14 dias. As plântulas foram coletadas aos 14, 28 e 42 dias após a transferência e imediatamente armazenadas em ultra freezer à -70 °C para posterior análises.

As análises foram realizadas no Laboratório de BioSementes, do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Os tecidos vegetais (as três últimas folhas, da base para o ápice, e raízes) foram macerados em gral de porcelana sobre gelo. Uma alíquota de 200 a 300 mg do extrato vegetal foi colocada em tubo *ependorf* com solução extratora, contendo tampão do gel (Tris 0,051 M, ácido cítrico 0,0076 M e água qsp 1 L), tampão

do eletrodo (Hidróxido de lítio 0,38 M, ácido bórico 0,192 M e água qsp 1 L) e 0,15% de 2-mercaptoetanol na proporção 9:1:2 (p/v) (Scandális, 1969). As amostras foram armazenadas em geladeira por 24 h para extração das enzimas, sendo depois centrifugadas a 16100 g por 5 min. à 4 °C.

A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida 7%, colocando 20 µL de cada amostra, em orifícios feitos com o auxílio de um pente de acrílico. Os padrões enzimáticos foram analisados pelo sistema de tampões (Scandális, 1969). Os géis foram colocados em cubas eletroforéticas verticais mantidas em câmara fria com temperatura entre 4 e 6 °C.

As migrações eletroforéticas foram realizadas com uma diferença de potencial de 1,0 V mm<sup>-1</sup>, até que a linha de frente formada pelo azul de bromofenol atingisse 90 mm do ponto de aplicação. As bandas foram reveladas, para os sistemas enzimáticos superóxido dismutase (SOD) de acordo com Alfenas (1998), peroxidase (PO) por Payne (1985) e catalase (CAT) por Brewer e Sing (1970).

Os géis de eletroforese foram fixados em solução de água destilada: metanol: ácido acético na proporção de 5:5:1 (v/v).

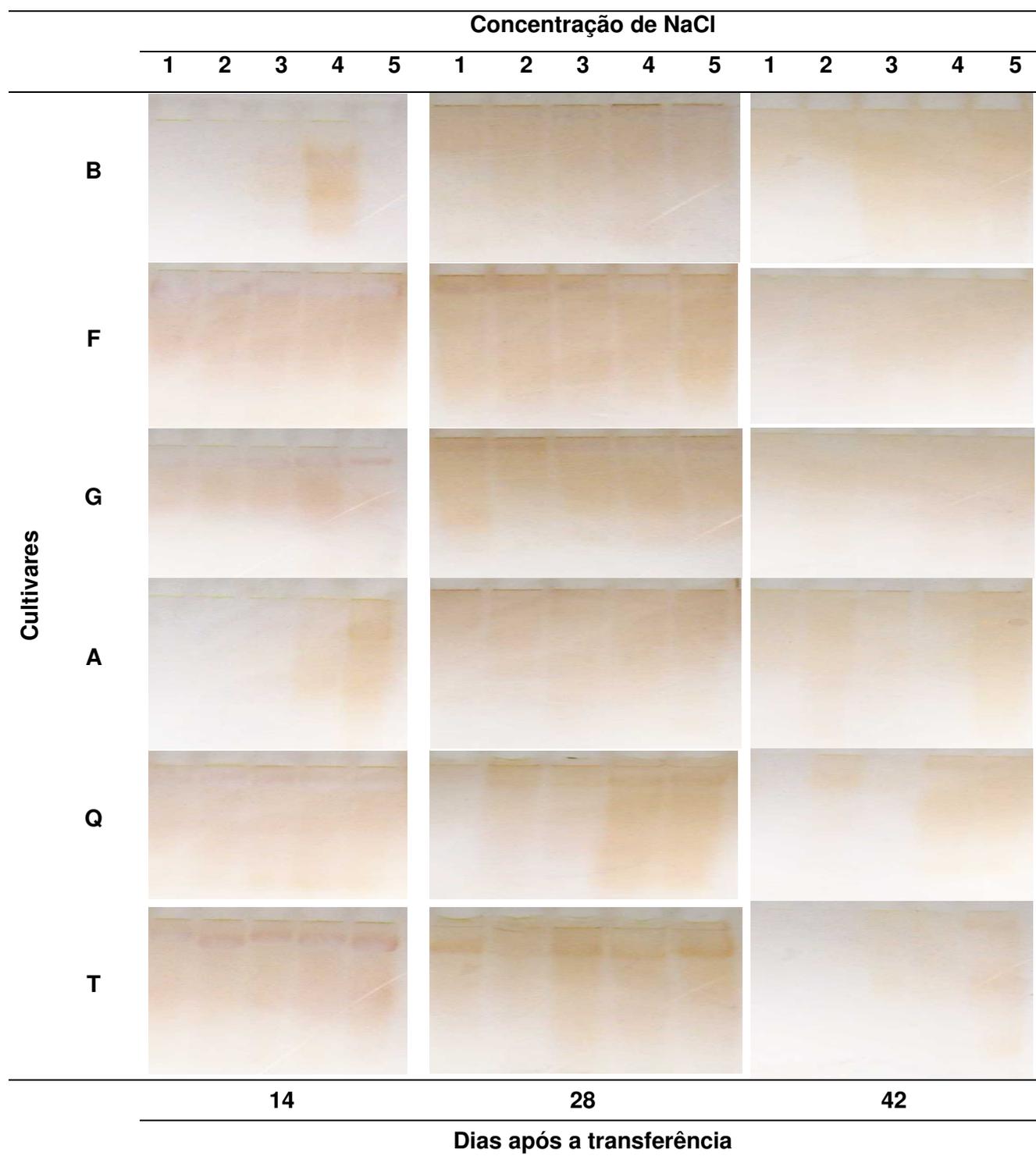
A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando em consideração a presença/ausência e a intensidade de cada banda eletroforética. Os géis, obtidos de extratos das plantas coletadas em diferentes épocas, que não tiveram atividade enzimática não foram apresentados nos resultados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

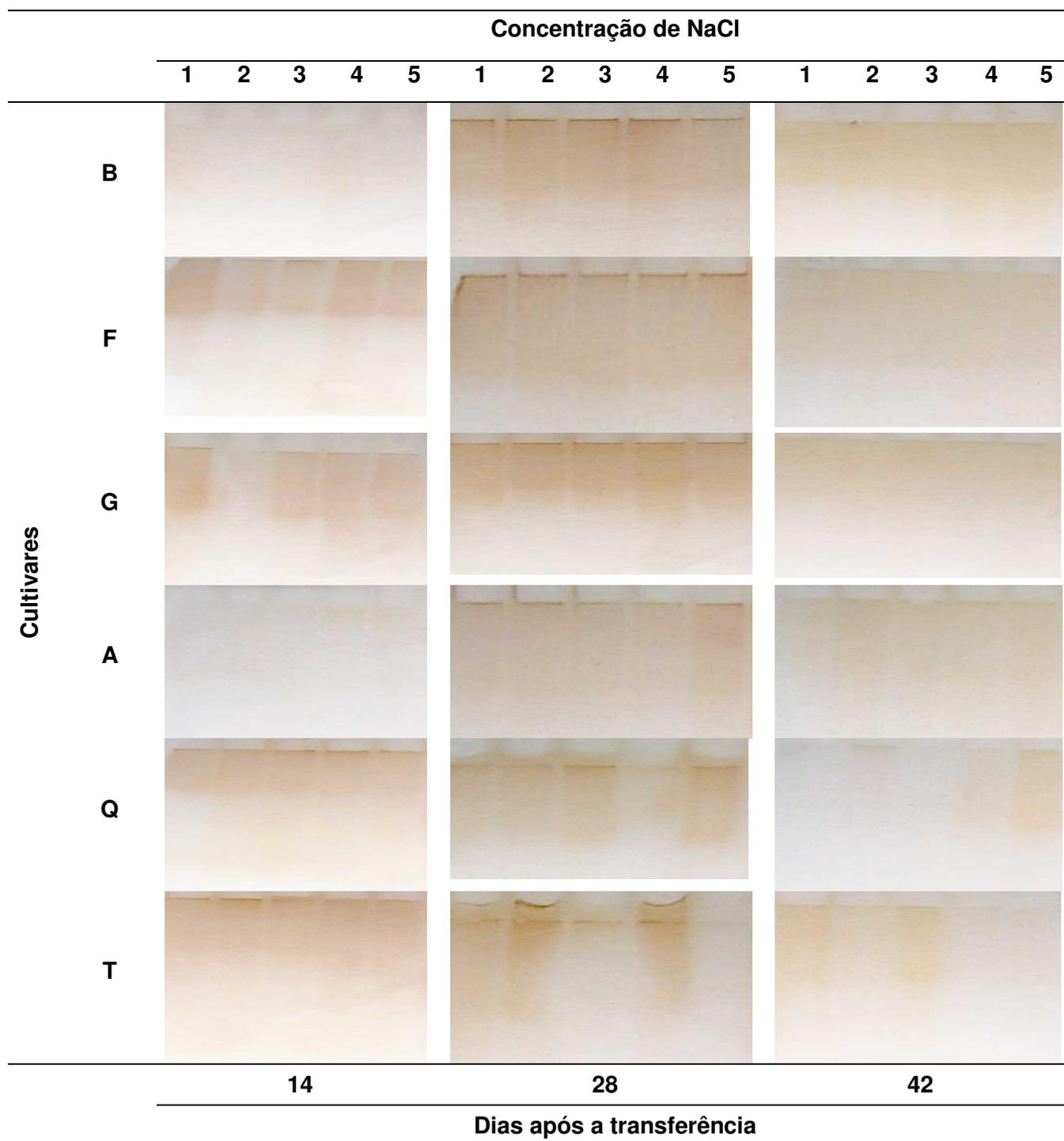
Analisando os padrões eletroforéticos da enzima peroxidase na primeira coleta, aos 14 dias após a transferência (DAT), foi constatado que as cultivares de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato apresentaram maior atividade da enzima quando comparadas as de *Oryza sativa* L. ssp. *indica* S. Kato, com exceção das cultivares BRS-7 Taim nas folhas (Figura 1) e BRS Querência nas raízes (Figura 2).

Na segunda coleta, aos 28 DAT, as folhas e raízes, revelaram bandas mais intensas, demonstrando tendência de aumento em função do tempo de exposição ao estresse, revelando maior atividade enzimática neste período (Figuras 1 e 2). Entretanto, não houve alteração em relação à intensidade das mesmas tanto entre os diferentes tratamentos como nas diferentes cultivares utilizadas. Segundo Siegel (1993), em condições de estresse, as plantas apresentam alta atividade das peroxidases e, freqüentemente, estas são as primeiras enzimas a alterarem a atividade depois da estimulação. No entanto, o efeito do estresse salino pode provocar estímulo ou inibição de enzimas envolvidas nos processos metabólicos como a peroxidase (Lima et al., 1999). Na terceira coleta, aos 42 DAT, a enzima praticamente não apresentou atividade em todas as concentrações e cultivares analisadas, tanto nas folhas quanto nas raízes (Dados não apresentados).

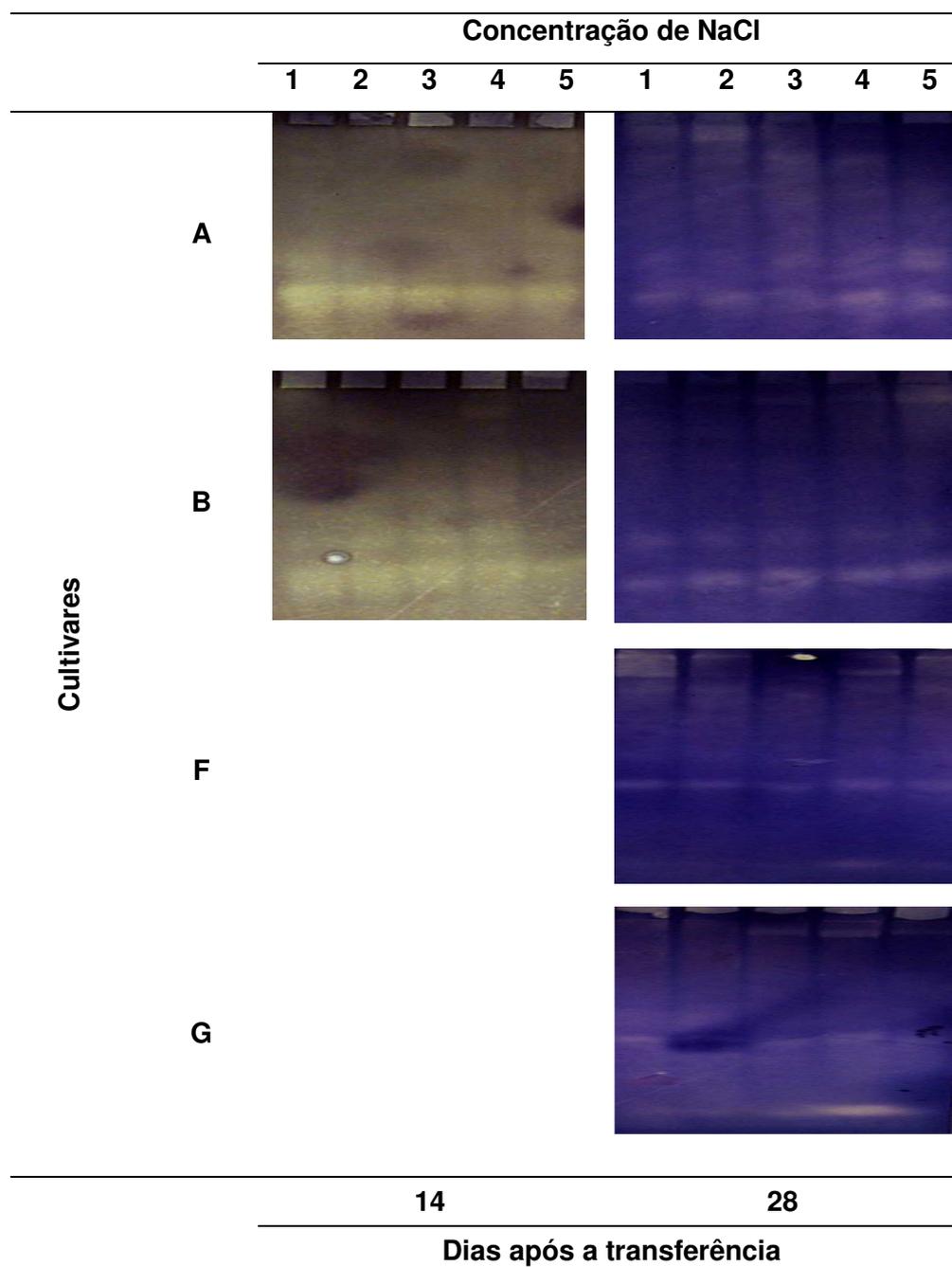
Nos sistemas isoenzimáticos da superóxido dismutase de folhas de plantas de arroz na primeira coleta (14 DAT) apenas as cultivares BRS Atalanta e BRS Bojurú apresentaram atividade. Aos 28 DAT as cultivares BRS Querência e BRS-7 Taim não mostraram atividade. Na terceira coleta (42 DAT) todas as cultivares e tratamentos utilizados não revelaram bandas (Figura 3).



**FIGURA 1** - Zimograma da enzima peroxidase em folhas de cultivares de arroz Bojurú (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.



**FIGURA 2** - Zimograma da enzima peroxidase em raízes de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.



**FIGURA 3** - Zimograma da enzima superóxido dismutase em folhas de cultivares de arroz Atalanta (A), Bojurú (B), Formosa (F) e GoyaKuman (G) aos 14 e 28 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.

Na primeira coleta a cv. BRS Atalanta apresentou bandas mais intensas nas concentrações menores, ou seja, no tratamento testemunha e 25 mM de NaCl. A cv. BRS Bojurú apresentou intensidade maior em todos os tratamentos com exceção do

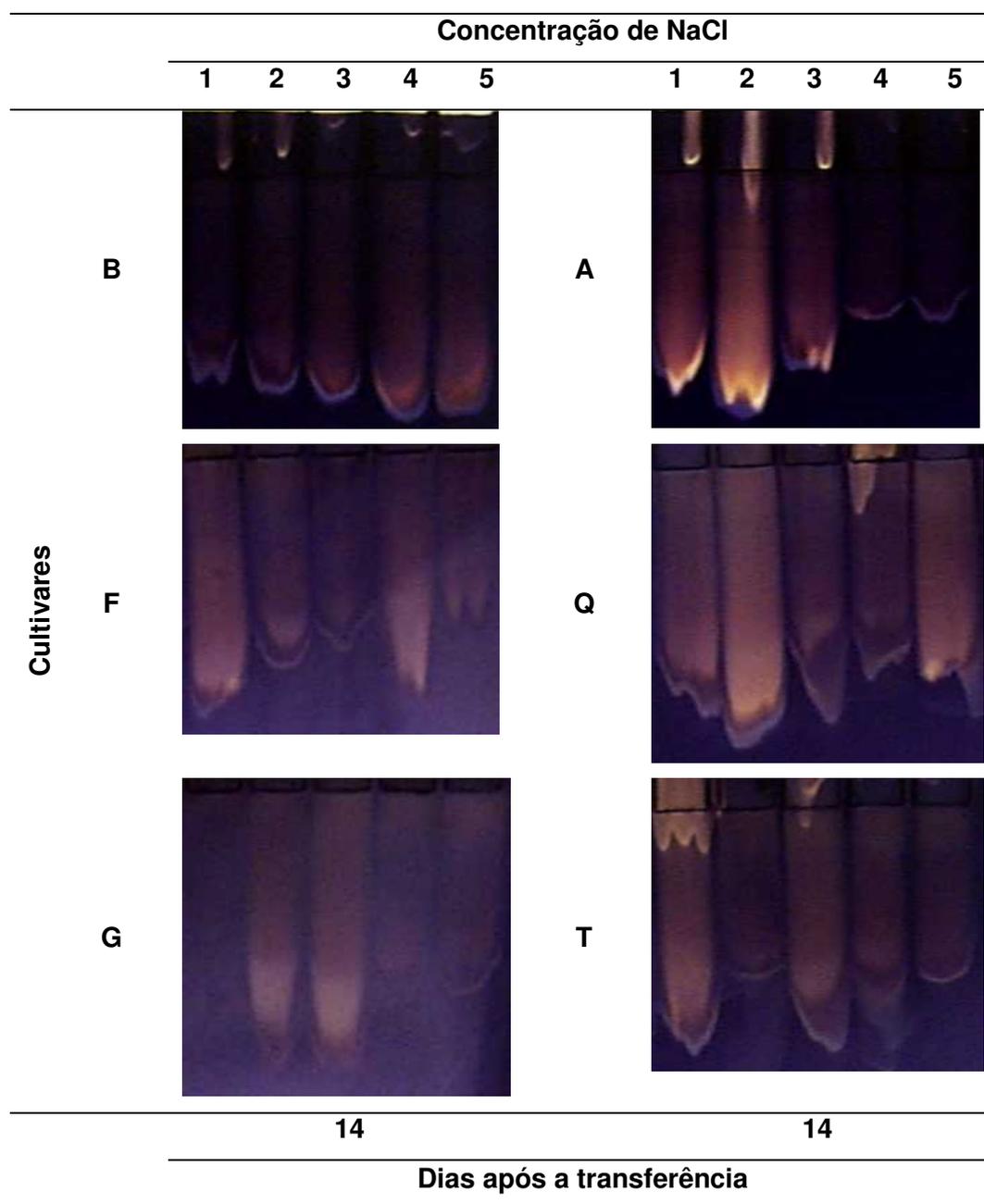
tratamento 100 mM de NaCl. Contudo na segunda coleta observa-se atividade da enzima superóxido dismutase em todas as cultivares apresentadas, porém a cultivar de *O. sativa* ssp. *japonica* BRS Bojurú mostrou bandas mais intensas, quando comparada as demais, sugerindo que esta cultivar tenha maior atividade enzimática da SOD, devido à exposição ao estresse salino, provavelmente como estratégia de detoxificação, considerando que esta enzima desempenha importante papel na resposta ao estresse oxidativo nas plantas (Taiz e Zeiger, 2004). Possivelmente esta diminuição na intensidade das bandas das demais cultivares corresponda à perda de atividade, considerando que esteja relacionada à sensibilidade ao estresse salino. Pois em espécies sensíveis à salinidade como *Vigna mungo* L. ocorre diminuição na atividade das enzimas, prejudicando o ajustamento osmótico (Dash e Panda, 2001). Os zimogramas da superóxido dismutase das raízes de cultivares de arroz da primeira, segunda e terceira coleta (14, 28 e 42 DAT) não revelaram atividade enzimática para todos os tratamentos e cultivares testados (Dados não apresentados).

O sistema catalase apresentou atividade em todas as amostras de folhas das cultivares de arroz analisadas (Figura 4), o mesmo não ocorreu com as amostras das raízes, nas quais não se registrou presença de bandas.

As cultivares *O. sativa* ssp. *indica* BRS Atalanta e BRS Querência apresentaram maior intensidade nos tratamentos iniciais (0 e 25 mM de NaCl), demonstrando que as mesmas quando submetidas à salinidade em concentrações maiores apresentam queda na atividade da enzima catalase, o que implica em maior sensibilidade a este tipo de estresse. Enquanto, na cultivar BRS Bojuru foi observado aumento da intensidade das bandas conforme o incremento na concentração salina, indicando novamente maior tolerância a este tipo de estresse, quando comparadas com as demais. A presença ou ausência de bandas, bem como modificações na intensidade das mesmas, auxiliam de forma significativa na diferenciação isoenzimática de plantas (Jarret e Litz, 1986).

A enzima catalase demonstrou ser mais eficiente na diferenciação das cultivares quanto à salinidade. Em sementes de milho a aquisição de tolerância à secagem sob alta temperatura é associada à atividade da enzima catalase e pouco associada à atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase (Rosa et al., 2005). Em quatro variedades de *Stylosanthes guianensis* L., as enzimas analisadas apresentam atividade diferenciada quando submetidas ao estresse salino (Gonela et

al., 2004). No entanto, há fortes indícios de que a CAT seja crucial na remoção do peróxido de hidrogênio fotorrespiratório (Cavalcanti et al., 2004).



**FIGURA 4** - Zimograma da enzima catalase em folhas de cultivares de arroz Bojurú (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A); Querência (Q) e Taim (T) aos 14 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.....

## CONCLUSÕES

O sistema enzimático catalase permite detectar diferenças relacionadas a tolerância à salinidade entre as cultivares;

As cultivares de *O. sativa* ssp. *japonica* apresentam os perfis eletroforéticos das enzimas antioxidantes sob estresse salino, salientando os do genótipo BRS Bojuru.

## **CAPÍTULO 2**

### **EXPRESSÃO DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS EM CULTIVARES DE ARROZ CRESCIDAS EM ESTRESSE SALINO**

#### **INTRODUÇÃO**

No Brasil a área afetada pelo estresse salino corresponde a 2% da área total (Menezes-Benavente et al., 2004), sendo grande obstáculo à produtividade das lavouras, especialmente no Rio Grande do Sul, onde o principal sistema de irrigação da cultura do arroz é por inundação e a água usada para irrigação provém de rios abastecidos por lagoas costeiras (Perozzi, 2005), podendo conduzir à salinização os solos que possuem drenagem inadequada, impedindo a remoção do sal por lixiviação. Especialmente as lavouras da região litoral que utilizam a água salgada da Laguna dos Patos e rios litorâneos, que estão sujeitas à salinização pela entrada da água do mar quando é baixo o nível da laguna, sendo uma das maiores limitações do meio na produção de arroz (Marschner, 1995; Toenissen, 1995), principalmente nos meses de verão, quando ocorre baixa precipitação pluvial e elevada evapotranspiração, coincidindo com a fase reprodutiva da cultura. Embora não seja um problema que ocorra em todos os

anos, isso acontece com certa frequência nas lavouras, quando os sais atingem teores elevados (SOSBAI, 2007). Na orizicultura gaúcha, os problemas estão mais relacionados às altas concentrações de sódio e cloro (NaCl), especialmente na fase reprodutiva (Macedo et al., 2007). O arroz é considerado moderadamente tolerante à salinidade, porém Lima et al. (2004) concluíram que as cultivares de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato possuem maior tolerância ao estresse salino, quando comparadas com as *Oryza sativa* L. ssp. *indica* S. Kato. A planta necessita fazer ajustes osmóticos para adaptar-se ao estresse, envolvendo maior gasto de energia devido à síntese de solutos orgânicos (Rodríguez et al., 1997), os quais atuam como protetores enzimáticos (Greenway e Munns, 1980; Solomon et al., 1994; Liu e Zhu, 1997b).

A análise de isoenzimas é utilizada na caracterização de cultivares de arroz (Bonow et al., 2001), constituindo numa das técnicas de marcadores bioquímicos mais utilizados na caracterização de cultivares desde a década de 60. Diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças em nível de seqüências de DNA que codificam tais enzimas. Assim, quando os padrões de bandas de dois indivíduos diferem é assumido que estas diferenças possuam base genética (Murphy et al., 1990). A presença ou ausência de bandas, bem como modificações na intensidade das mesmas, auxiliam de forma significativa na diferenciação isoenzimática de plantas (Jarret e Litz, 1986), sendo o ambiente fator importante na modulação da expressão gênica. O monitoramento dessas mudanças pode ser feito com a ajuda de marcadores moleculares, pois, além de fornecerem dados úteis sobre a estrutura e diversidade genética das populações de plantas, possibilitam a visualização da atividade das enzimas nos diferentes estádios da planta (Alfenas et al., 1991). As modificações na atividade de determinadas isoenzimas são comuns e refletem diferenças na estabilidade das isoenzimas sob determinadas condições fisiológicas celulares (Alfenas et al., 1991), podendo estar relacionado com a idade da planta utilizada nas amostras para extração das isoenzimas, uma vez que, em estádios diferentes de desenvolvimento da planta, ocorre diferenças na atividade enzimática (Ferreira e Grattapaglia, 1998)

A falta de conhecimento sobre mecanismos de tolerância dificulta o desenvolvimento de cultivares tolerantes (Félix e Duarte, 2005). Entretanto, a

utilização de cultivares tolerantes à salinidade é alternativa viável para o reaproveitamento de áreas degradadas no uso da água para irrigação de baixa qualidade (Willadino et al., 1999).

Diante do exposto, o objetivo deste experimento foi identificar perfis de expressão enzimática relacionados ao estresse salino em cultivares de *O. sativa* ssp. *japonica* e *O. sativa* ssp. *indica*.

## MATERIAL E MÉTODOS

No experimento foram utilizadas subespécies de *O. sativa* ssp. *japonica* consideradas tolerantes à salinidade e de *O. sativa* ssp. *indica* sensíveis ao estresse salino (Machado e Terres, 1997; Lima et al., 2004 e 2005). As cultivares de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato foram BRS Bojurú, IAS 12-9 Formosa e Goyakuman e as de *Oryza sativa* L. ssp. *indica* S. Kato BRS-7 Taim, BRS Querência e BRS Atalanta, de uso comum na orizicultura gaúcha.

Inicialmente, foi realizada a semeadura em bandejas plásticas, contendo como substrato areia lavada. As plântulas foram transferidas aos 10 dias após a emergência (DAE), para casa de vegetação com temperatura e umidade controladas e colocadas em bacias com capacidade para 15 L, contendo solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) meia força acrescida de NaCl nas concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 mM, trocadas de 4 em 4 dias. Placas de isopor foram utilizadas como suporte para 30 plântulas fixadas com algodão, permanecendo nas bacias por 42 dias após a transferência (DAT). Durante esse período foram realizadas 3 coletas em intervalos de 14 dias. As plântulas foram coletadas aos 14, 28 e 42 DAT e imediatamente armazenadas em ultrafreezer à -70 °C para análises posteriores.

As análises foram realizadas no Laboratório de BioSementes, do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Os tecidos vegetais (as três últimas folhas, da base para o ápice, e as raízes) foram macerados em gral de porcelana sobre gelo. Alíquota de 200 a 300 mg do extrato vegetal foi colocada em tubo *eppendorf*

com solução extratora, contendo tampão do gel (Tris 0,051 M, ácido cítrico 0,0076 M e água qsp 1 L), tampão do eletrodo (Hidróxido de lítio 0,38 M, ácido bórico 0,192 M e água qsp 1 L) e 0,15% de 2-mercaptoetanol na proporção 9:1:2 (p/v) (Scandálíos, 1969) e armazenadas em geladeira por 24 h para extração das enzimas, sendo após centrifugadas a 16100 g por 5 min. à 4 °C.

A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida 7%, colocando 20 µL de cada amostra, em orifícios feitos com o auxílio de um pente de acrílico. Os padrões enzimáticos foram analisados pelo sistema de tampões (Scandálíos, 1969). Os géis foram colocados em cubas eletroforéticas verticais mantidas em câmara fria com temperatura entre 4 e 6 °C.

As migrações eletroforéticas foram realizadas com uma diferença de potencial de 1,0 V mm<sup>-1</sup>, até que a linha de frente formada pelo azul de bromofenol atingisse 90 mm do ponto de aplicação.

As bandas foram reveladas, para os sistemas enzimáticos esterase (EST) de acordo com Scandálíos (1969), glutamato desidrogenase (GDH), álcool desidrogenase (ADH), fosfoglucose isomerase (PGI), malato desidrogenase (MDH) e enzima málica (EM) descritos por Alfenas (1991), alfa amilase (α-AMY) e glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de conformidade com Alfenas (1998).

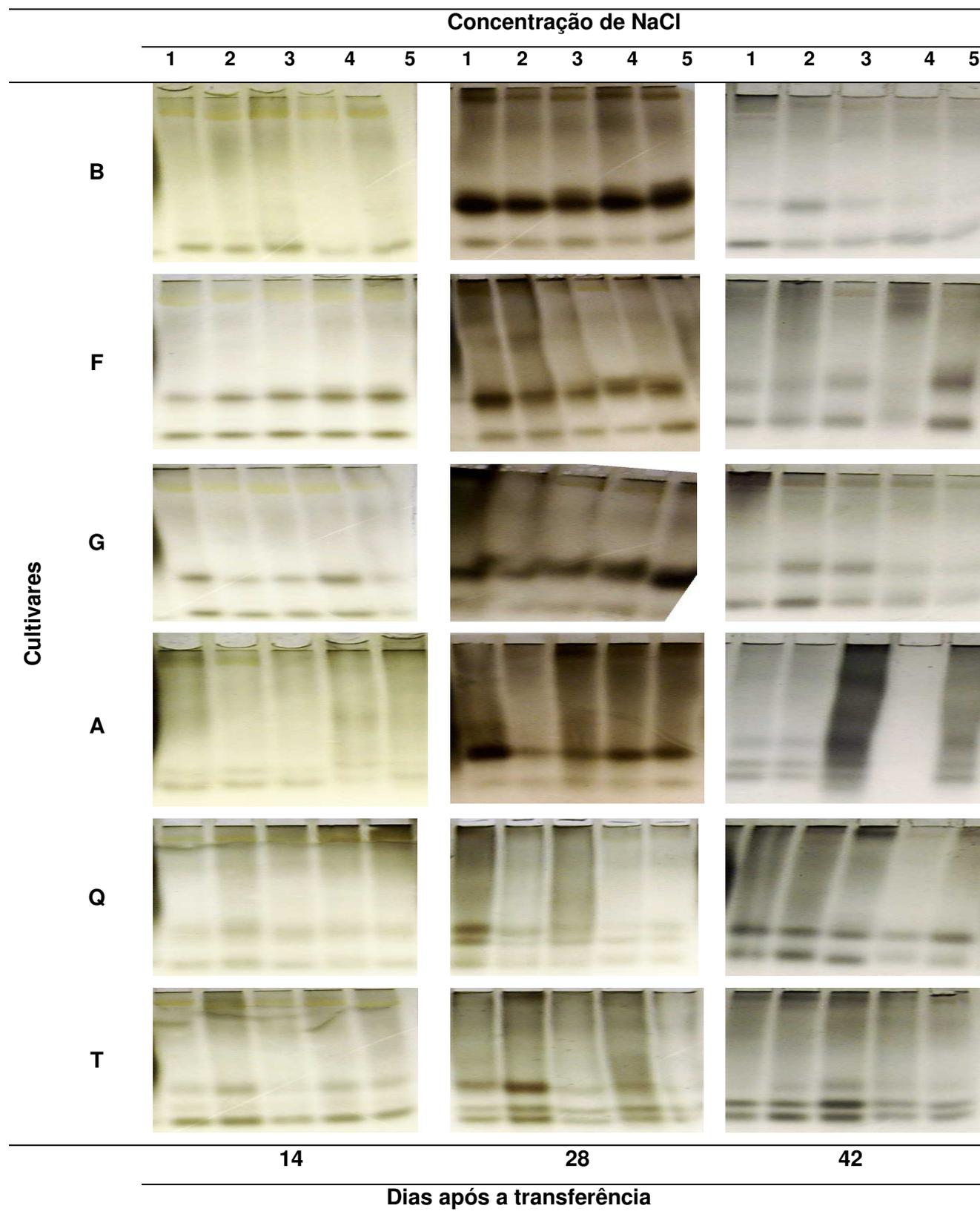
Os géis de eletroforese foram fixados em solução, de água destilada:metanol:ácido acético na proporção de 5:5:1 (v/v).

A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando em consideração a presença/ausência e a intensidade de cada banda eletroforética. Os géis obtidos de extratos das plantas coletadas em diferentes épocas, que não expressaram atividade enzimática não foram apresentados nos resultados.

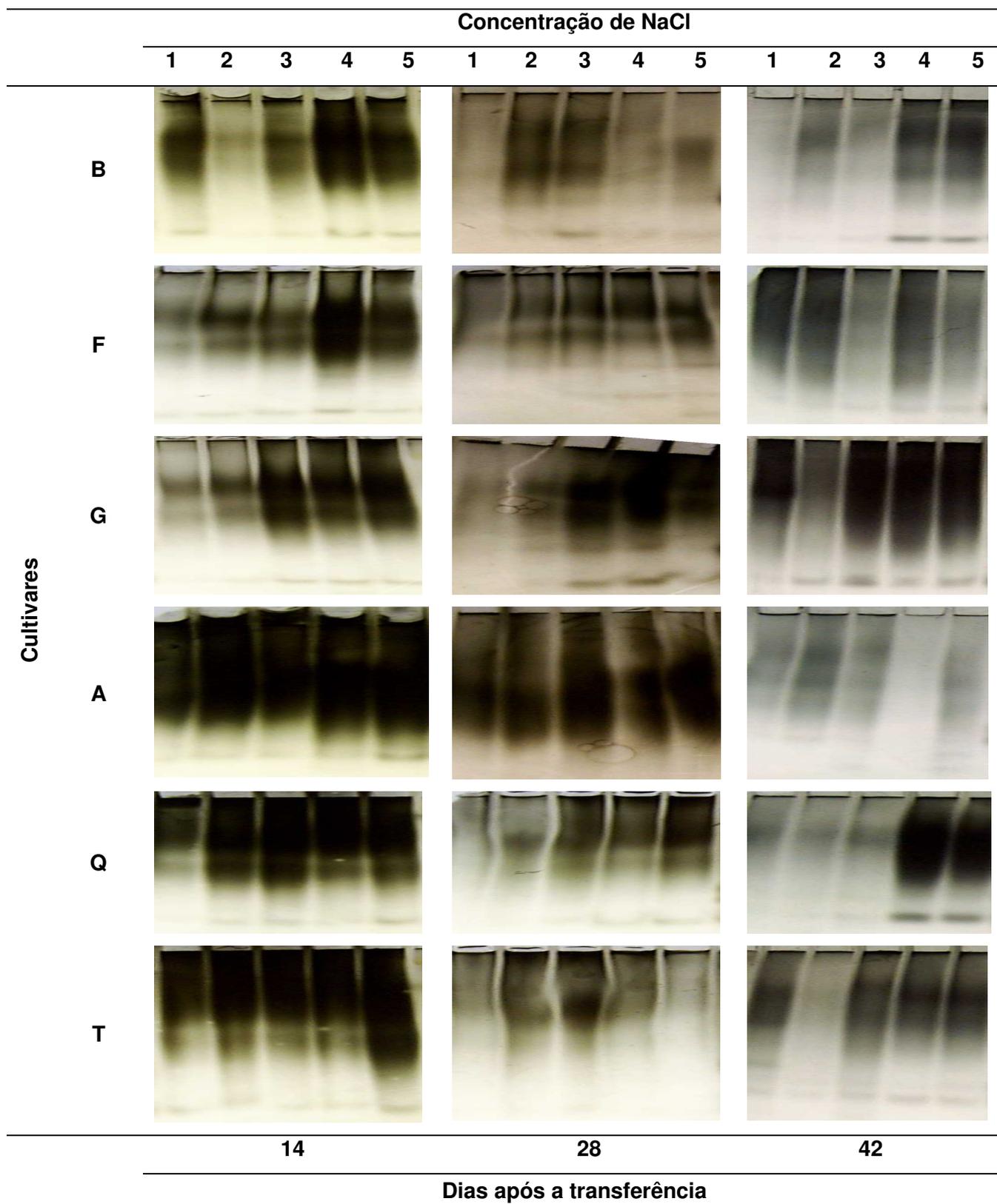
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os padrões eletroforéticos da esterase (EST – E.C. 3.1.1.1) nas folhas, demonstraram a presença da enzima nos três períodos de coleta (14, 28 e 42 DAT), porém a maior intensidade das bandas foi observada aos 28 DAT. Na primeira coleta as cultivares de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato (Bojuru - B; Formosa – F e GoyaKuman - G) e a cv. de *Oryza sativa* L. ssp. *indica* S. Kato BRS-7 Taim apresentaram maior expressão da esterase. Ainda, aos 14 DAT na cv. IAS 12-9 Formosa a intensidade das bandas aumentou conforme o acréscimo na salinidade, sugerindo maior atividade da enzima nesta cultivar quando submetida a estresse salino. O mesmo padrão foi obtido para todas as cultivares de *O. sativa* ssp. *japonica* testadas aos 28 DAT. Não ocorreu grande variação na intensidade de resposta para as diferentes concentrações de sal, porém expressão diferencial entre genótipos. Na terceira coleta a intensidade das bandas diminuiu em todas as cultivares em relação aos períodos anteriores. Porém na BRS Querência e BRS-7 Taim as bandas foram mais intensas até o tratamento 50 mM de NaCl. A cultivar IAS 12-9 Formosa apresentou banda mais intensa no tratamento com maior concentração salina (100 mM de NaCl), o que pode indicar o envolvimento da esterase numa possível tolerância desta cultivar ao estresse salino (Figura 1).

A enzima esterase nas raízes mostrou atividade nos três períodos de coleta, resposta também verificada em folhas. Todavia a atividade diminuiu em relação ao primeiro período de análise (14 DAT), mostrando intensidade diferenciada entre genótipos, períodos de coleta e concentração salina. A



**FIGURA 1** - Padrões eletroforéticos obtidos com a enzima esterase em folhas de arroz nas cultivares Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.

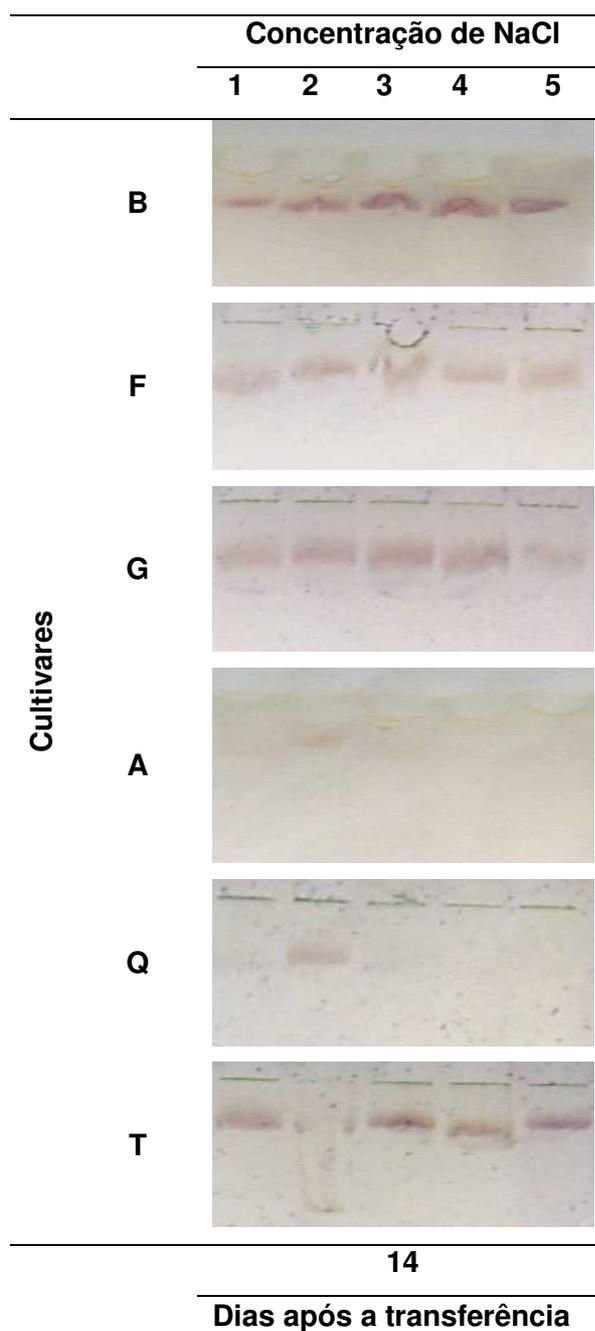


**FIGURA 2** - Padrões eletroforéticos da enzima esterase em raízes de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T) aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.

intensidade de resposta foi mantida aos 28 DAT para BRS Atalanta e IAS 12-9 Formosa. Maior intensidade das bandas nas concentrações mais elevadas de NaCl foram registrados aos 42 DAT nos demais genótipos (Figura 2). Lima et al. (2004), ao estudarem o efeito do estresse salino em plântulas de arroz, verificaram que as cultivares de *O. sativa* ssp. *japonica* possuem maior tolerância à salinidade. Possivelmente a alteração na expressão da enzima conforme o nível de salinidade esteja relacionada a algum mecanismo de defesa da planta, pois a enzima esterase está envolvida no catabolismo de lipídios. Esta degradação pode servir de fonte de carbono para a síntese de novas moléculas (Bewley e Black, 1994), o que justificaria o padrão diferenciado na cultivar IAS 12-9 Formosa. Fatores ambientais afetam o metabolismo das plantas, influenciando a atividade das isoenzimas, especialmente das esterases, peroxidases, fosfatases e fenolases, causando o aparecimento de padrões ou atividades diferentes (Pinto et al., 1995).

A enzima desidrogenase alcoólica (ADH – E.C. 1.1.1.1) apresentou atividade somente nas folhas da primeira coleta aos 14 DAT (Figura 3) nas cultivares *O. sativa* ssp. *japonica* e na cultivar de *O. sativa* ssp. *indica* BRS-7 Taim. Na cv. BRS Bojuru é notável a presença de bandas de atividade mais destacadas em relação as dos demais genótipos, ocorrendo aumento na intensidade das mesmas de acordo com o incremento na concentração de NaCl. A ADH é uma enzima que atua no processo respiratório, removendo substâncias tóxicas, como acetaldeído e etanol, que são produzidos quando as células passam a respirar anaerobicamente (Faria et al., 2003). Assim, quando a rota aeróbica está comprometida, a via anaeróbica da respiração é ativada e produtos tóxicos às células como acetaldeído e etanol. No metabolismo anaeróbico, na fermentação alcoólica, o piruvato, primariamente produzido na glicólise, é convertido à acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase, sendo o acetaldeído reduzido a etanol pela álcool desidrogenase.

Plantas com maior resistência à salinidade possuem a característica de compartimentalizar o sal para diminuir seus efeitos danosos (Larcher, 2000). Provavelmente, esta compartimentalização tenha ocorrido no citosol e não nos vacúolos das folhas das cultivares mais resistentes, uma vez que a atividade

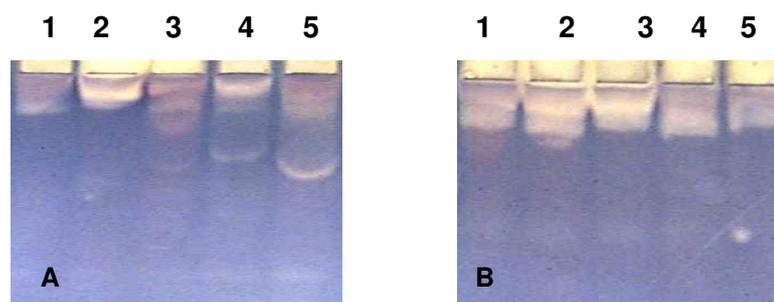


**FIGURA 3** - Padrões eletroforéticos da enzima desidrogenase alcoólica em folhas de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.

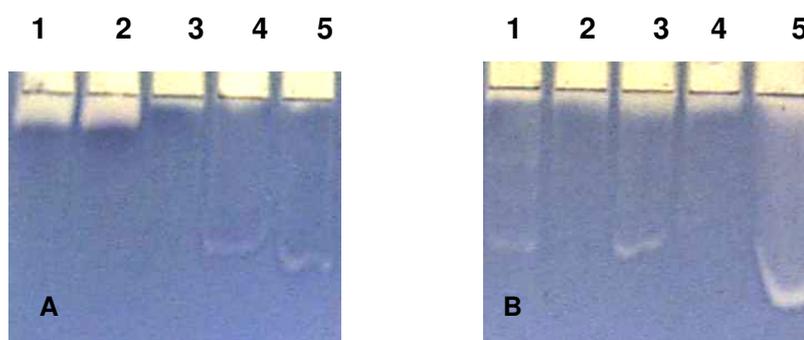
da enzima não foi detectada nas raízes. Este fato possivelmente desencadeou o processo fermentativo e como recurso para minimizar os danos do sal à célula e os efeitos danosos do acúmulo de acetaldeído, houve ativação da

desidrogenase alcoólica para formação de etanol. O etanol e, sobretudo, o lactato são considerados produtos tóxicos para o metabolismo celular, porém o efeito deletério do ácido láctico ocorre devido a sua capacidade de reduzir o pH do citosol, prejudicando o metabolismo celular (Marengo e Lopes, 2007). No entanto, há forte dúvida sobre o verdadeiro efeito tóxico do acúmulo de etanol durante a fermentação, existindo evidências de que o acúmulo do acetaldeído pode ser mais prejudicial ao metabolismo celular (Drew, 1997). Além disso, os lipídios são solúveis em etanol, o que torna possível a sua difusão para o meio externo através da membrana, onde seria diluído ou metabolizado por microrganismos. Os efeitos negativos da hipoxia e da anoxia estão mais relacionados à acidificação do citosol e à falta de energia para o funcionamento normal do maquinário celular do que ao acúmulo de etanol por si só (Kennedy et al., 1992).

A atividade da enzima  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$  - AMY – E.C. 3.2.1.1) foi detectada apenas nas cultivares BRS Atalanta e BRS Bojuru e na primeira coleta, tanto nas folhas quanto nas raízes (Figuras 4 e 5). A ausência de atividade nas demais coletas (24 e 48 DAT) e cultivares, provavelmente esteja relacionada à atuação da enzima responsável pela hidrólise do amido durante o processo de germinação e crescimento inicial. É possível que as demais cultivares tenham demonstrado atividade da enzima em período anterior aos da primeira coleta (14 DAT), o que justificaria a não formação de bandas. No entanto, nas folhas a  $\alpha$ -amilase participa da mobilização do amido armazenado no cloroplasto, mas plântulas jovens não acumulam amido, sendo desnecessário a síntese de  $\alpha$ -amilase. Nas sementes, a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase é máxima cerca de dez dias após a germinação (Bewley e Black, 1994). Também na fase inicial, o crescimento é lento e a demanda por fotoassimilados é grande para o crescimento das raízes e de folhas novas não ocorrendo acúmulo de amido que propicie a síntese da  $\alpha$ -amilase.

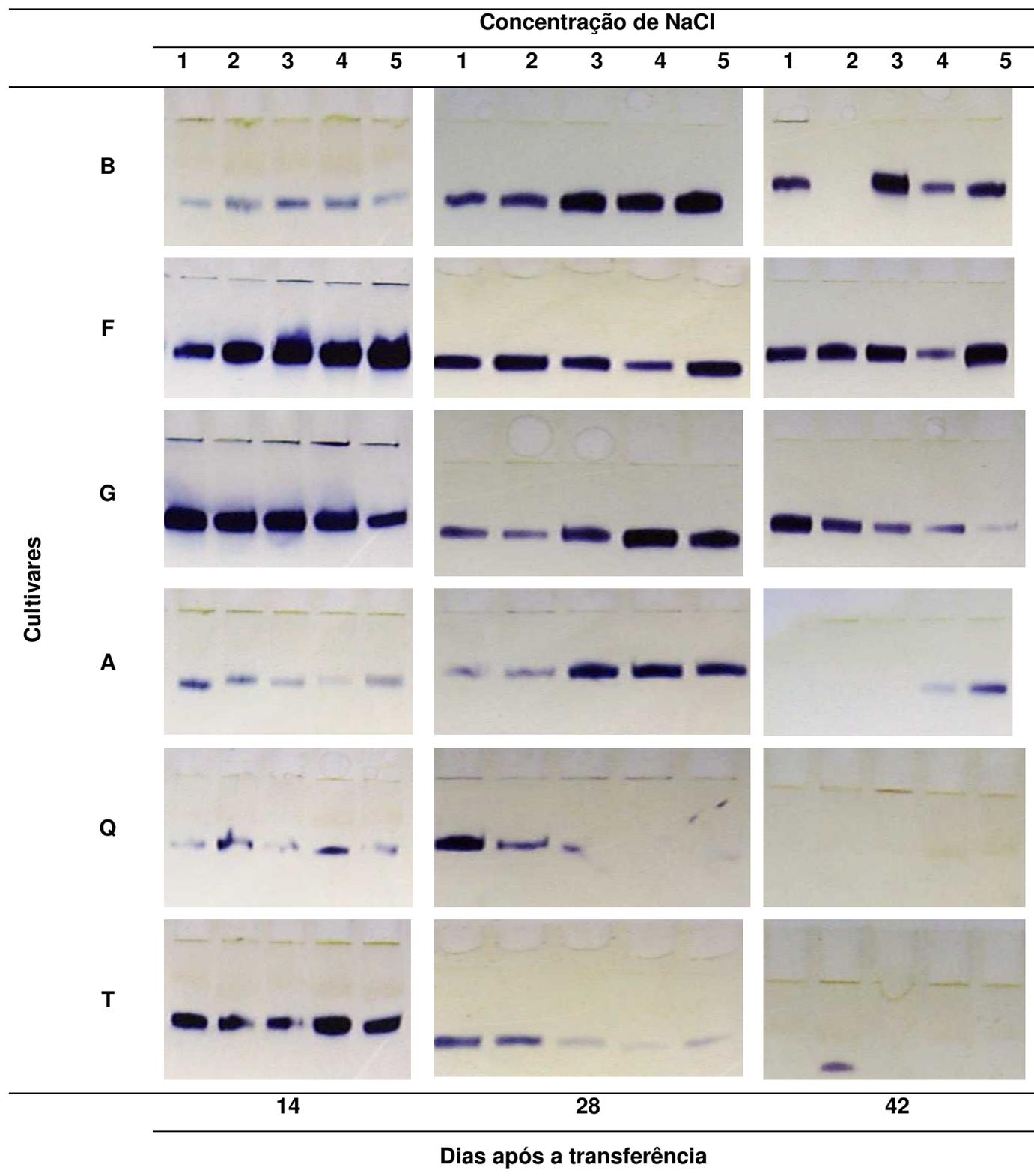


**FIGURA 4** - Padrões eletroforéticos da enzima  $\alpha$ -amilase em folhas de cultivares de arroz Atalanta (A) e Bojuru (B); aos 14 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.



**FIGURA 5** - Padrões eletroforéticos da enzima  $\alpha$ -amilase em raízes de cultivares de arroz Atalanta (A) e Bojuru (B); aos 14 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.

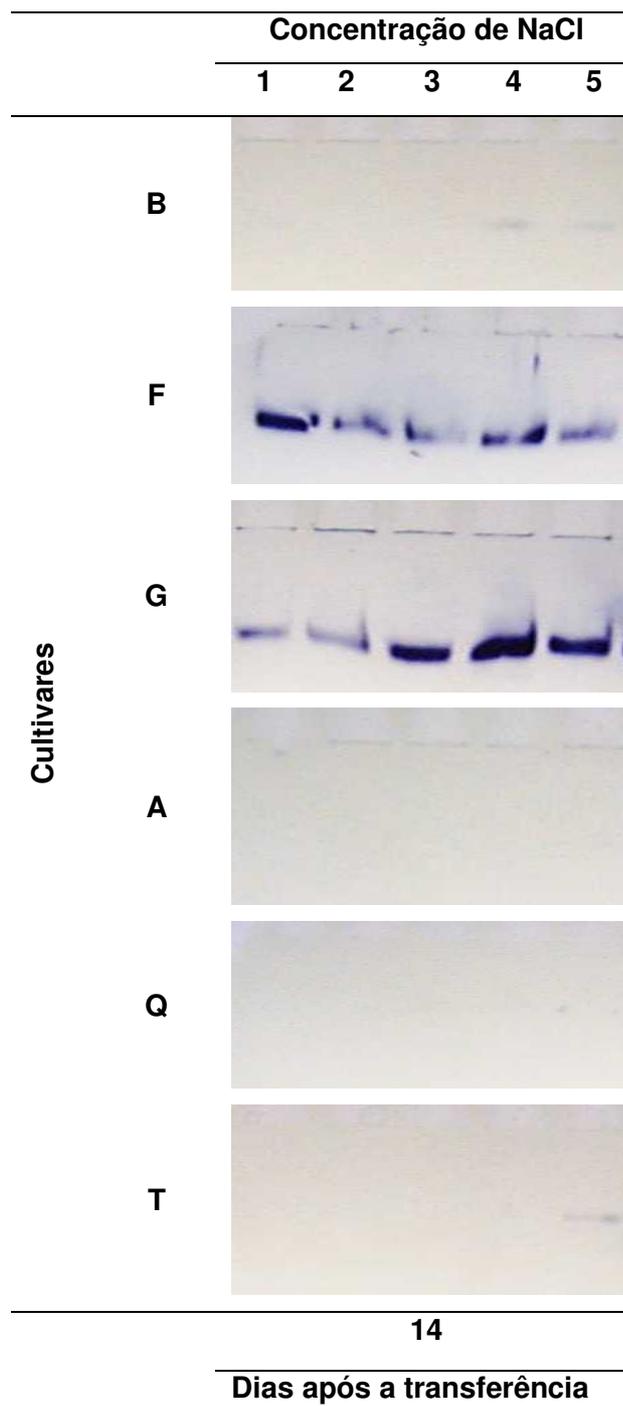
Os zimogramas da enzima málica (EM – E.C. 1.1.1.40) em folhas indicam que a mesma apresentou atividade nos três períodos de coleta 14, 28 e 42 DAT (Figura 6). Na primeira coleta as bandas de atividade enzimática foram maiores na cultivar *O. sativa* ssp. *indica* BRS-7 Taim e nas cultivares



**FIGURA 6** - Padrões eletroforéticos da enzima málica em folhas de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.

*O. sativa* ssp. *japonica* Goyakuman e IAS 12-9 Formosa, esta última com bandas mais intensas conforme o incremento da salinidade. Na segunda coleta as bandas apresentaram maior intensidade nas cultivares *O. sativa* ssp. *japonica* BRS Bojuru e Goyakuman nas concentrações de 50, 75 e 100 mM de NaCl. A IAS 12-9 Formosa, de maneira geral, teve atividade similar nos diferentes tratamentos. Das cultivares de *O. sativa* ssp. *indica*, a BRS Atalanta exibiu bandas nas concentrações mais elevadas, porém as demais mostraram atividade no controle e em 25 mM de NaCl. Na terceira coleta apenas as cvs. BRS Bojuru, IAS 12-9 Formosa e Goyakuman expressaram atividade, sendo que em IAS 12-9 Formosa as bandas tiveram uniformidade na intensidade, tanto no controle como nos demais tratamentos. Na BRS Atalanta foi detectado a presença de uma banda no tratamento sob maior concentração de sal embora com menor intensidade do que o obtido aos 28 DAT e em Goyakuman houve diminuição da expressão da enzima com aumento da salinidade. A EM descarboxila malato a piruvato, permitindo aos mitocôndrios vegetais operarem rotas alternativas para o metabolismo do fosfoenolpiruvato (PEP) derivado da glicólise, conferindo às plantas flexibilidade metabólica (Taiz e Zeiger, 2004). Esse mecanismo leva à sugestão de que as plantas submetidas à salinização, convertem piruvato a etanol, em condições de anaerobiose, como mencionado anteriormente (Figura 3) e na ausência ou deficiência do mesmo, as plantas oxidam malato ou citrato, em rotas alternativas, sem o envolvimento do piruvato originário da glicólise, possibilitando às plantas submetidas a estresse salino tal flexibilidade como meio de resposta a este tipo de ambiente.

Nas raízes foram constatadas bandas expressivas de atividade de EM somente na primeira coleta e nas cultivares *O. sativa* ssp. *japonica* IAS 12-9 Formosa e Goyakuman, sendo que na última as bandas foram de maior intensidade nos tratamentos de concentrações mais elevadas de sal, demonstrando capacidade desta cultivar em manter a atividade da enzima mesmo quando as raízes estão sob salinidade elevada (Figura 7).

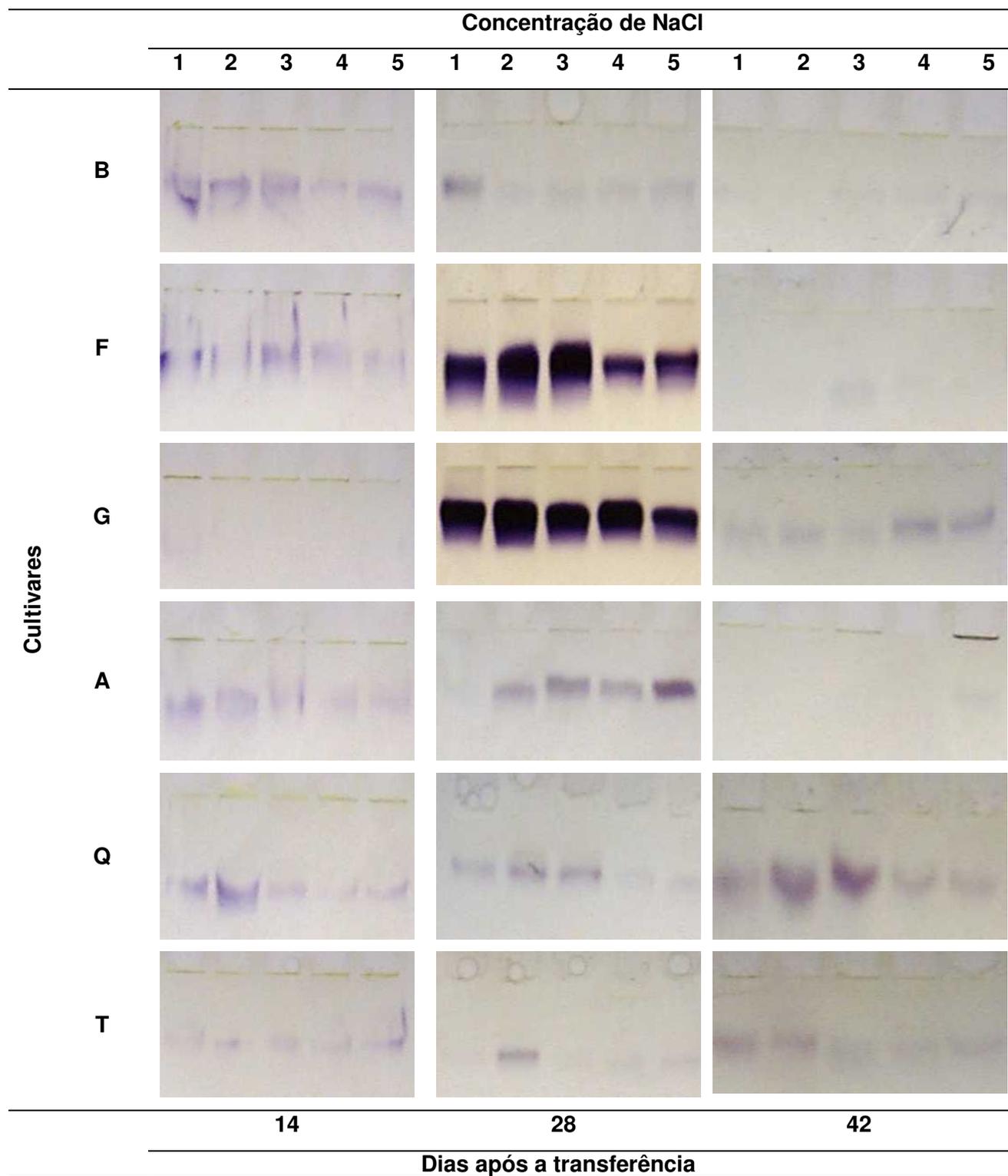


**FIGURA 7** - Padrões eletroforéticos da enzima málica em raízes de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.

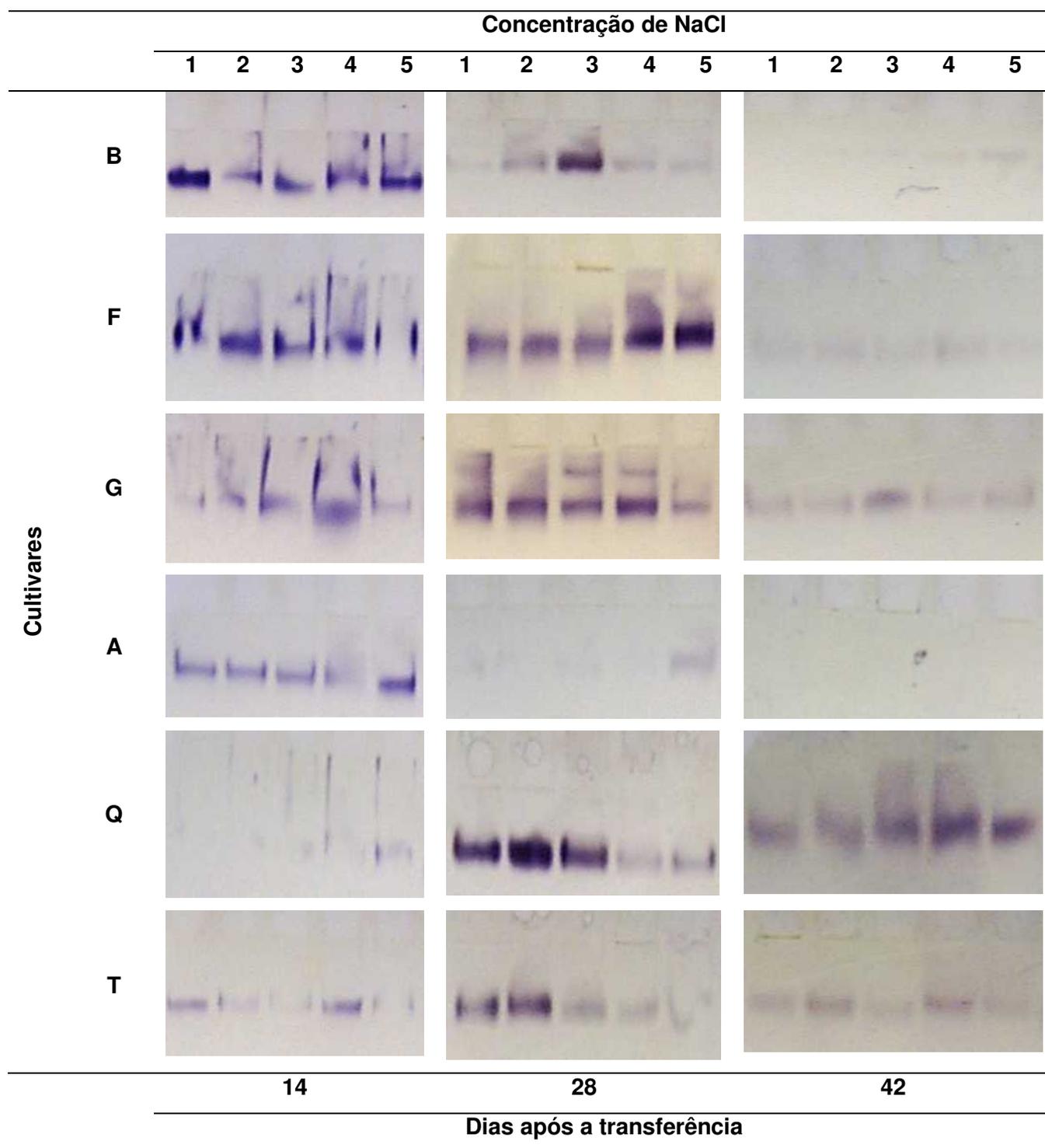
As bandas de atividade da glutamato desidrogenase (GDH – E.C. 1.4.1.3) em folhas foram pouco expressivas em função do tempo de tratamento e concentração salina na maioria das cultivares (Figura 8). No entanto, foi observada forte expressão da enzima nas cultivares IAS 12-9 Formosa e

Goyakuman aos 28 DAT para todas as concentrações salinas, diminuindo drasticamente aos 42 DAT. Parece haver um metabolismo diferenciado nessas cultivares em relação aos demais genótipos.

A expressão de GDH nas raízes foi nitidamente maior que a observada nas folhas (Figuras 8 e 9), sugerindo que esta enzima possui maior atividade no sistema radical, possibilitando às plantas submetidas ao estresse salino a assimilação do amônio por meio de uma rota alternativa, pois a GDH catalisa a reação reversível que sintetiza ou desamina o glutamato (Taiz e Zeiger, 2004). Aos 14 DAT foram detectadas bandas de atividade de GDH nas cultivares BRS Atalanta, BRS Bojuru, IAS 12-9 Formosa e Goyakuman, superiores aos demais genótipos. A expressão da enzima foi diferenciada aos 28 DAT, mostrando maior intensidade na concentração de 50 mM na BRS Bojuru; 75 e 100 mM na IAS 12-9 Formosa. Na cv. Goyakuman, houve diminuição da intensidade da banda na concentração mais elevada de sal, não sendo visível diferenças na intensidade de resposta entre os demais tratamentos. Em relação às cultivares de *O. sativa* ssp. *indica* BRS Querência e BRS-7 Taim, a atividade diminuiu com o aumento da concentração salina. A intensidade das bandas aos 42 DAT foi pouco expressiva ou não detectada, sugerindo que a adaptação metabólica da planta ao estresse salino possivelmente foi obtida por mecanismo independente de GDH. A expressão de GDH nas cultivares testadas sugere sua participação no ajuste metabólico diferenciado entre genótipos frente ao estresse salino, o que parece ser dependente da dose e tempo de exposição ao sal. A GDH além de atuar no catabolismo de proteínas de reserva, fornecendo energia para as células e/ou na redução de  $\alpha$ -cetoglutarato para a síntese de aminoácidos (Brandão-Júnior et al., 1999), também fornece glutamato para a biossíntese de prolina sob condições de alta salinidade (Wang et al., 2007). No entanto, sob concentração de 300 mM de NaCl a atividade da NADH-GDH aumenta enquanto a da glutamina sintetase (GS) diminui (Wang et al., 2007).



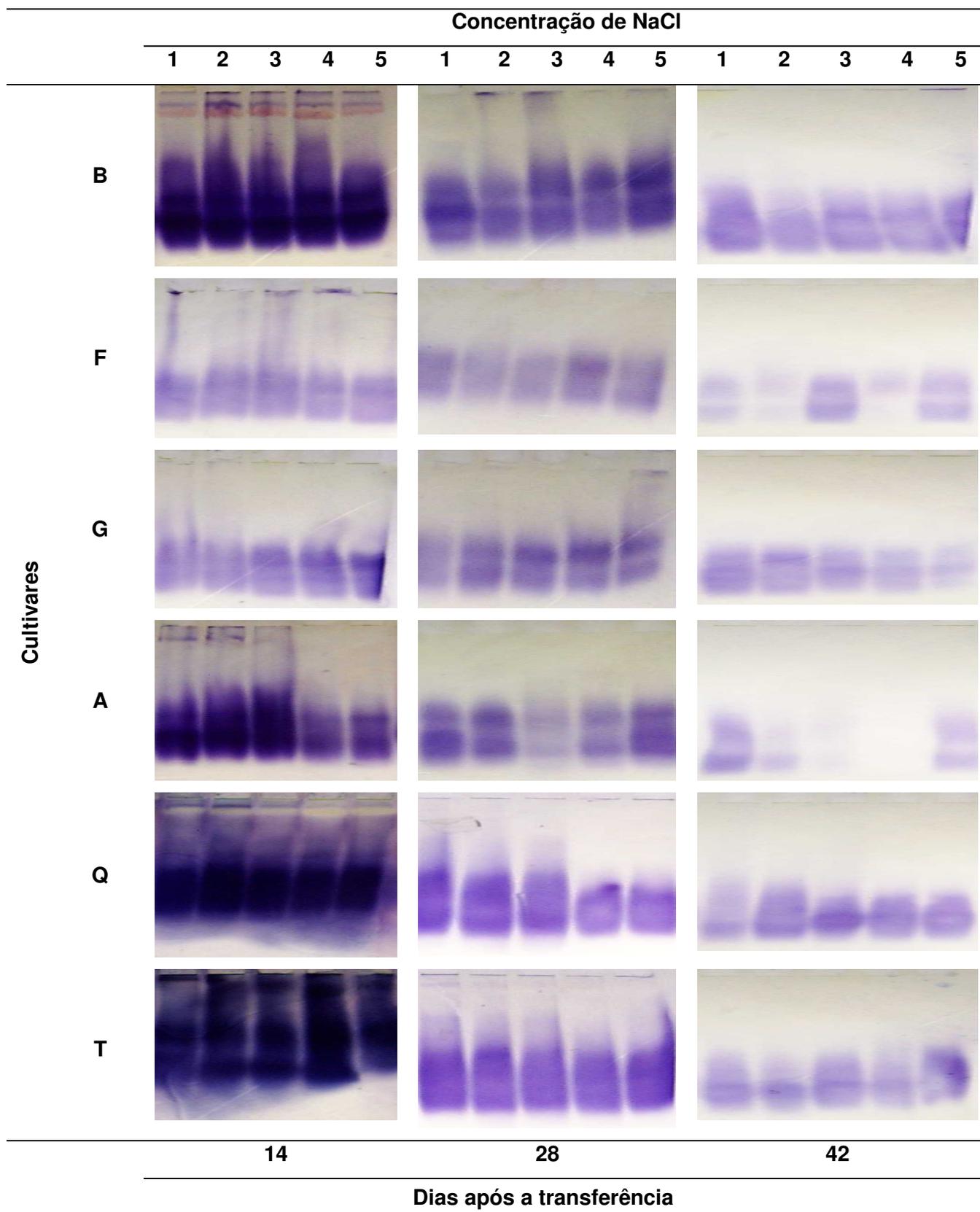
**FIGURA 8** - Padrões eletroforéticos da enzima glutamato desidrogenase em folhas de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.



**FIGURA 9** - Padrões eletroforéticos da enzima glutamato desidrogenase em raízes de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.

Acúmulo significativo de prolina foi detectado apenas sob exposição à alta salinidade, enquanto que o glutamato, precursor da prolina, aumentou drasticamente sob baixa e alta salinidade, sugerindo que a GS deve ser a principal via de síntese de glutamato em baixa salinidade. Porém a 300 mM de NaCl, o glutamato parece ser preferencialmente sintetizado por meio do processo catalisado pela NADH-GDH. O aumento do amônio em plântulas de trigo estressadas pela salinidade é resultado da elevação da fotorrespiração, responsável pela maior atividade da NADH-GDH (Wang et al., 2007). Em cultivares de arroz, a enzima GDH aumenta a atividade conforme o incremento da salinidade nas cultivares tolerantes, enquanto nas suscetíveis a atividade diminui com o incremento do sal (Kumar et al., 2000). Para Lehninger et al. (1995), esta enzima tem apenas um papel secundário na assimilação da amônia ( $\text{NH}_3$ ), sendo importante na assimilação de  $\text{NH}_3$  apenas em situações de emergência, caracterizadas por elevadas concentrações de  $\text{NH}_3$  nos tecidos vegetais superiores. Provavelmente, a GDH tenha um papel duplo: a NADH-GDH (aminativa) atua na presença de altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  de origem endógena e exógena, enquanto que a  $\text{NAD}^+$ -GDH (desaminação oxidativa) fornece energia e esqueletos de carbono.

Os zimogramas da malato desidrogenase (MDH – E.C. 1.1.1.37) nas folhas (Figura 10), mostrou atividade da enzima nos três períodos de coleta, porém a maior intensidade da MDH foi na primeira coleta (14 DAT) em todas as cultivares. Dentre as cultivares de *O. sativa* ssp. *japonica* (Figura 10 B, F e G), a BRS Bojuru teve bandas mais intensas nas três coletas e nos tratamentos mais salinos. As cultivares IAS 12-9 Formosa e Goyakuman apresentaram padrão enzimático similar na primeira e segunda coletas, porém na cv. Goyakuman as bandas foram mais intensas conforme o aumento da concentração de NaCl, sugerindo maior atividade da enzima nestas cultivares quando a salinidade do ambiente é incrementada. Cultivares de arroz consideradas tolerantes apresentam aumento na atividade da MDH conforme o incremento na salinidade (Kumar et al., 2000), corroborando com os dados desse trabalho. As cultivares de *O. sativa* ssp. *indica* (Figura 10 A, Q e T) apresentaram padrão de expressão semelhante entre si nas três coletas, porém a cv. BRS Atalanta teve bandas mais intensas nas três doses mais bai-

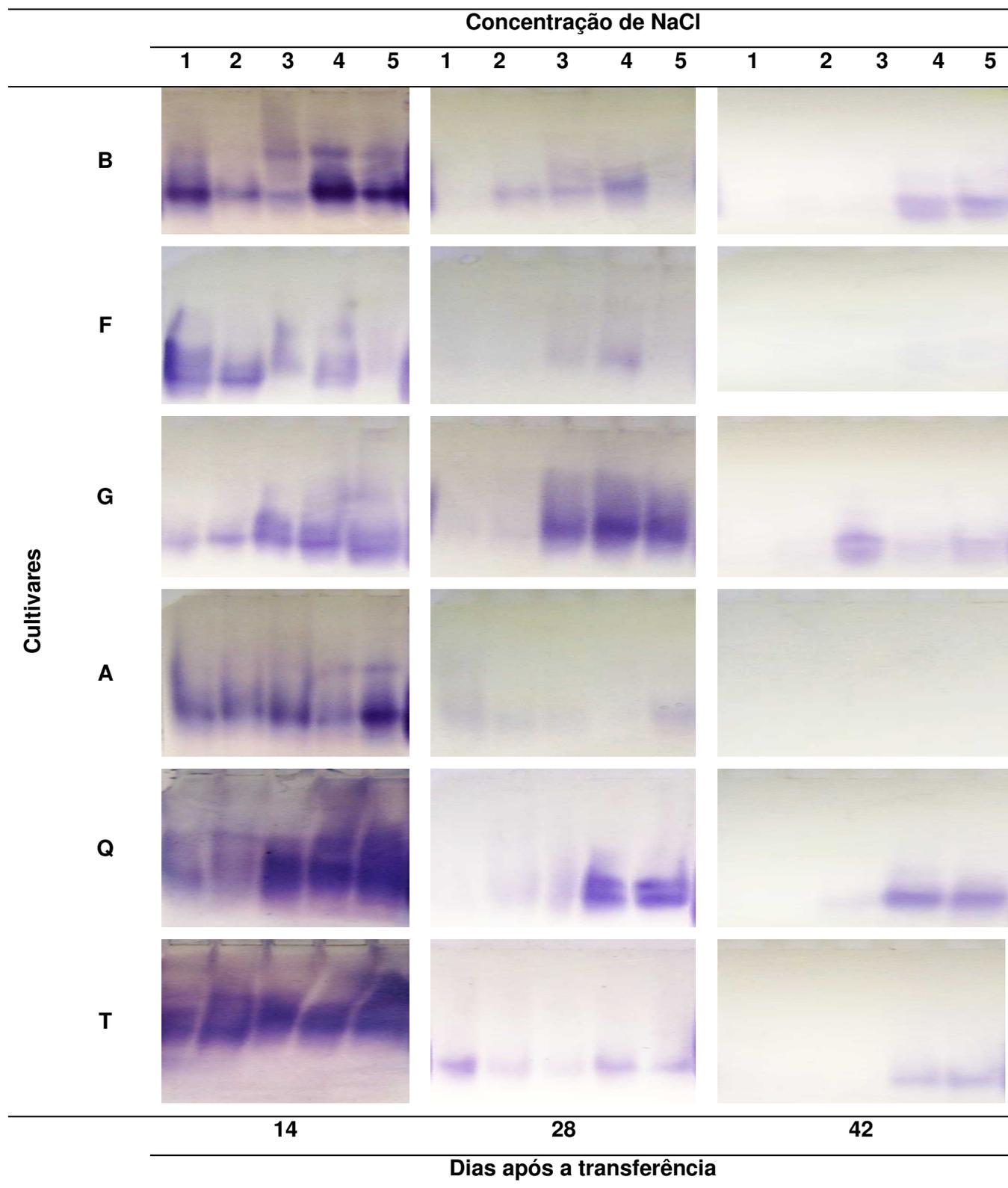


**FIGURA 10** - Padrões eletroforéticos da enzima malato desidrogenase em folhas de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.

-xas, na primeira coleta e praticamente não demonstrou atividade na terceira coleta.

Os perfis isoenzimáticos da malato desidrogenase nas raízes (Figura 11) foram análogos ao das folhas, em relação à maior intensidade das bandas na primeira coleta. Com exceção das cultivares IAS 12-9 Formosa e BRS-7 Taim, as demais exibiram bandas mais intensas nas doses maiores de NaCl. Esta tendência foi expressa na segunda e terceira coletas para as variedades BRS Bojuru, Goyakuman, BRS Querência e BRS-7 Taim. A enzima MDH catalisa a conversão de malato a oxalacetato, tendo importante função dentro do ciclo de Krebs (Manchenko, 2000), além de participar do movimento de malato através da membrana mitocondrial e da fixação de CO<sub>2</sub> nas plantas, possui ainda função metabólica na produção de NADPH, participa da fotorrespiração, regulação iônica e ajuste osmótico (Taiz e Zeiger, 2004). Para Greenway e Munns (1980), as plantas necessitam realizar ajustes osmóticos a fim de obter água do ambiente externo com baixo potencial hídrico, ajustando-o em resposta ao estresse osmótico, pelo abaixamento do potencial de soluto ( $\Psi_s$ ), por intermédio de dois processos intracelulares, o acúmulo de íons no vacúolo e a síntese de solutos compatíveis no citosol, como glicina-betaína, sorbitol, manitol, pinitol, sacarose (Prisco, 1980; Rodríguez et al., 1997) e prolina (Liu e Zhu, 1997b), que possuem também a função de proteção da membrana plasmática (Mansour e Salama, 2004) e das enzimas do citosol.

A quantidade de carbono empregada para a síntese desses solutos orgânicos é grande e esse desvio de carbono para ajustar o potencial hídrico, reduz o crescimento, a biomassa total e a produtividade das colheitas. A MDH ocorre tanto na matriz mitocondrial como no citoplasma das células. Nos mitocôndrios atua nas duas reações finais do ciclo do ácido cítrico, o fumarato é hidratado para produzir malato, que é subseqüentemente oxidado pela MDH, para regenerar oxaloacetato (OAA) e produzir outra molécula de NADH. A produção de OAA será capaz de reagir com outro acetil-CoA e continuar o ciclo, o NADH produzido será oxidado na cadeia respiratória mitocondrial para produção de ATP por fosforilação oxidativa (Taiz e Zeiger, 2004). No citoplasma, a MDH catalisa a reação de redução de OAA, proveniente da carboxilação do fosfoenolpiruvato, para malato produzindo NAD<sup>+</sup> que é

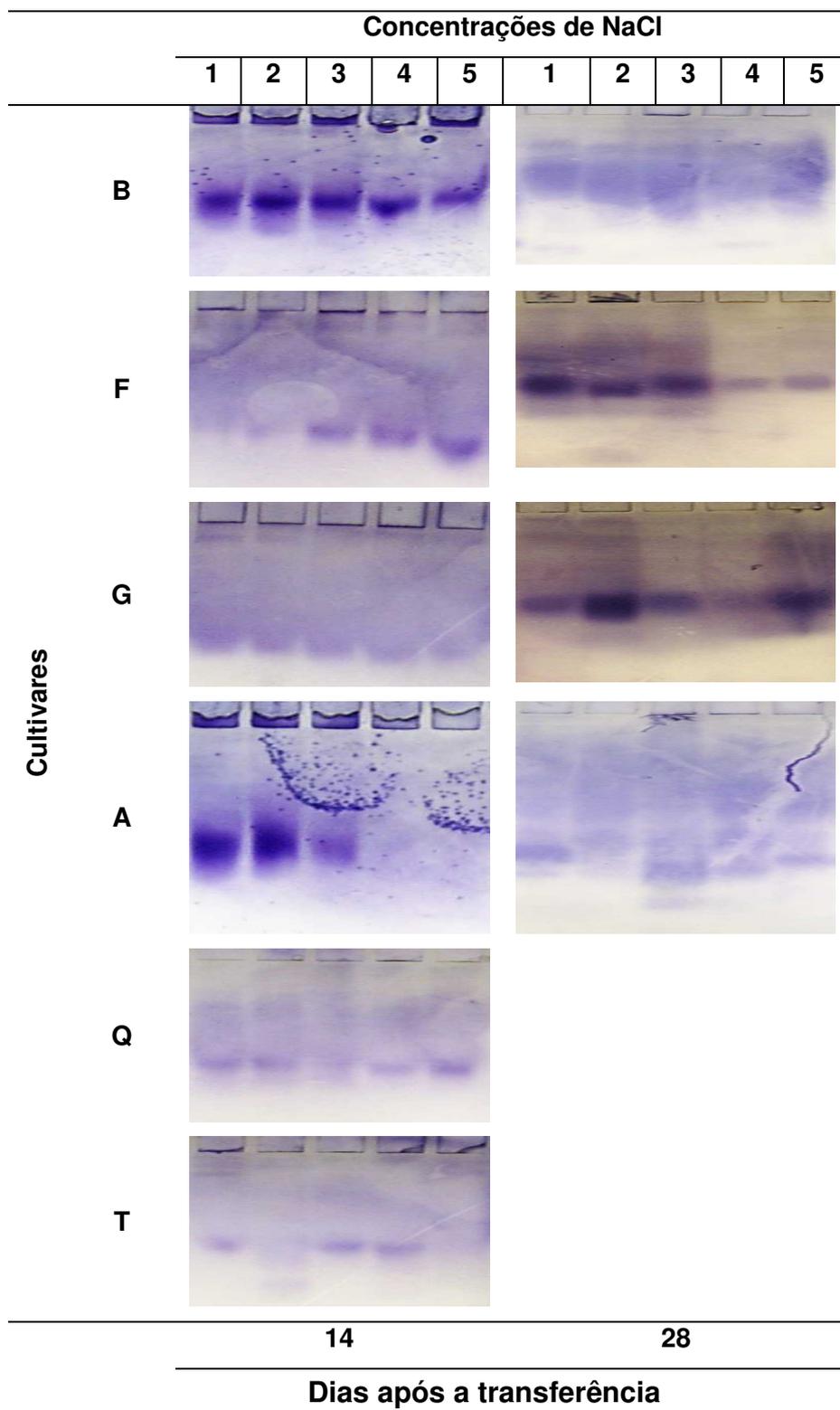


**FIGURA 11** - Padrões eletroforéticos da enzima malato desidrogenase em raízes de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.

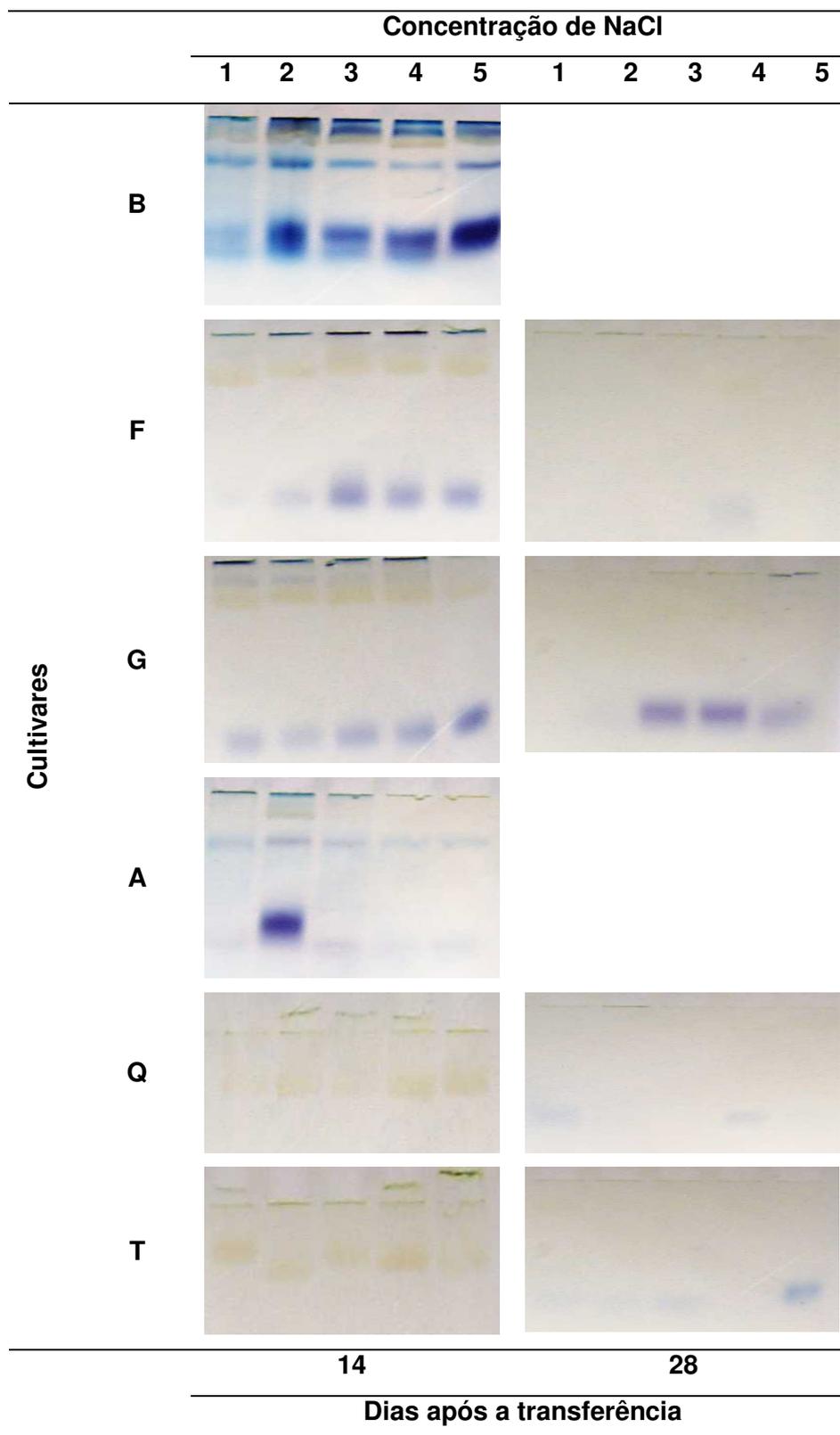
necessário para a glicólise. A MDH também atua no ciclo do glioxilato na oxidação do malato a OAA que se combina com outra acetil-CoA para continuar o ciclo, dentro do glioxissomo e no citosol, quando oxida o malato transportado do mitocôndrio em OAA que convertido a fosfoenolpiruvato será metabolizado para produzir sacarose pela rota gliconeogênica (Taiz e Zeiger, 2004).

A fosfoglico isomerase (PGI – E.C. 5.3.1.9) mostrou atividade somente nas folhas (Figura 12). A cultivar BRS Atalanta apresentou bandas apenas na primeira coleta nos tratamentos 0, 25 e 50 mM de NaCl. Enquanto, a BRS Bojuru na primeira coleta exibiu bandas com padrões de intensidade semelhantes para todos os tratamentos utilizados. Na IAS 12-9 Formosa as bandas foram detectadas na primeira coleta nas concentrações de 50, 75 e 100 mM de NaCl, enquanto na segunda coleta nas concentrações de 0, 25 e 50 mM. Na cultivar Goyakuman as bandas foram mais intensas na segunda coleta e nos níveis de salinidade de 25 e 100 mM. A enzima PGI atua na glicólise, catalisando a isomerização reversível de G6P à F6P (Manchenko, 2000; Taiz e Zeiger, 2008).

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH – E.C. 1.1.1.49) que atua na primeira reação da via das pentoses fosfato, por meio da desidrogenação enzimática da glicose-6-fosfato, apresentou atividade somente nas folhas da primeira coleta (14 DAT). Assim a cv. BRS Atalanta teve apenas uma banda no tratamento 25 mM de NaCl. Por outro lado, as cultivares *O. sativa* ssp. *japonica* (Figura 13 B, F e G) exibiram bandas mais intensas nos tratamentos com maior concentração salina. A enzima teve atividade aos 28 DAT apenas na cv. Goyakuman nos tratamentos com maior concentração de NaCl. A enzima G6PDH das cultivares *O. sativa* ssp. *japonica* demonstrou ser um bom indicador da tolerância no arroz a este tipo de estresse, uma vez que faz parte da rota alternativa de oxidação de açúcares em células vegetais. Apesar da glicólise ser a rota de degradação dominante, a rota das pentoses fosfato (RPF) contribui com o fluxo de carbono, pois de acordo com Taiz e Zeiger (2004) parte desta força redutora gerada pela RPF pode contribuir para o metabolismo energético celular; isto é, elétrons do NADPH podem terminar reduzindo  $O_2$  e gerando ATP, o que tornaria a rota uma via alternativa de pro-



**FIGURA 12** - Padrões eletroforéticos da enzima fosfoglicico isomerase em folhas de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.



**FIGURA 13** - Padrões eletroforéticos da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase em folhas de cultivares de arroz Bojuru (B), Formosa (F), GoyaKuman (G), Atalanta (A), Querência (Q) e Taim (T), aos 14, 28 e 42 dias após a transferência para soluções de zero (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) e 100 (5) mM de NaCl.

-ção de ATP em caso de estresse. A rota é importante pois fornece compostos intermediários para a biossíntese de aminoácidos, os quais têm a concentração aumentada em plantas submetidas a estresse salino (Greenway e Munns, 1980; Larcher, 2000; Taiz e Zeiger, 2004, 2008). Além disso, a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase é eficiente em acompanhar a melhoria na performance das sementes de pimentão submetidas à condicionamento osmótico (José et al., 1999).

De maneira geral, os sistemas enzimáticos foram mais expressos nas cultivares *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato, nas folhas e aos 14 DAT, apresentando bandas mais intensas conforme o aumento da salinidade. A expressão das enzimas envolvidas nos mecanismos de tolerância ao estresse salino foi maior em *O. sativa* ssp. *japonica*, indicando que estas plantas recorreram a tais mecanismos como forma de tolerar o estresse, utilizando-os como rota alternativa para o metabolismo, como fonte de carbono e energia para síntese de novas moléculas, na remoção de substâncias tóxicas como acetaldeído e etanol, na regulação iônica e/ou ajuste osmótico.

## CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi realizado e diante dos resultados obtidos, de maneira geral, conclui-se que:

- Há maior expressão nas folhas de cultivares *O. sativa* ssp. *japonica* nos sistemas enzimáticos ADH, EM, MDH e PGI aos 14 DAT e EST e EM aos 28 DAT;
- os sistemas enzimáticos EST, EM, MDH são expressos com maior intensidade nas raízes das cultivares *O. sativa* ssp. *japonica* aos 14 DAT e o GTDH aos 14 e 28 DAT;
- as cultivares *O. sativa* ssp. *japonica* demonstram maior intensidade das bandas nas enzimas EST, EM, MDH, ADH, GTDH e G6PDH conforme aumenta a salinidade.

## CAPÍTULO 3

### DETECÇÃO DE GENES QUE CONFEREM TOLERÂNCIA À SALINIDADE EM PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

#### INTRODUÇÃO

A tolerância salina varia com a espécie, sendo o arroz classificado como moderadamente sensível (Loomis e Connor, 1992), e evidentemente deve ocorrer, também, variações de tolerância salina dentre genótipos da mesma espécie. As cultivares de *O. sativa* ssp. *japonica* são consideradas como moderadamente tolerantes, enquanto as de *O. sativa* ssp. *indica* como sensíveis à salinidade (Machado e Terres, 1997; Lima et al., 2004).

Em condições normais as plantas mantêm altas concentrações de potássio ( $K^+$ ) e baixa de sódio ( $Na^+$ ) no citosol (Binzel et al., 1988). A limitação da entrada de  $Na^+$  na célula é provavelmente o mecanismo mais importante para manter baixa a concentração deste íon no citosol. Contudo, sob concentrações elevadas de sódio, a absorção de potássio é inibida por meio do transportador com alta afinidade a  $K^+-Na^+$  (HKT1), que opera como um sistema de absorção de sódio (Binzel et al., 1988). Uma vez o sódio dentro da célula, as plantas adotam mecanismos para manter baixos os níveis de sal no citoplasma, com a finalidade

de evitar os efeitos adversos do estresse salino no crescimento e desenvolvimento (Schachtman e Liu, 1999; Hasegawa et al., 2000). Sob prolongada exposição ao NaCl, o  $\text{Na}^+$  é translocado das raízes para as folhas onde pode aumentar em níveis tóxicos. O acúmulo de  $\text{Na}^+$  nos vacúolos é uma eficiente maneira de proteger as células das folhas de injúrias provocadas por este sal. A capacidade de acumulação resulta em aumento na tolerância salina (Apse et al., 1999; Zhang e Blumwald, 2001).

A remoção do sódio do citosol envolve mecanismos de transporte do sal para o vacúolo ou para fora da célula de modo a retirá-lo do meio de crescimento, (Blumwald et al., 2000). A função de vários transportadores iônicos é limitar a entrada e saída de sódio nas células, para regular a compartimentação de  $\text{Na}^+$  no vacúolo e importar seletivamente potássio em detrimento do sódio (Blumwald et al., 2000). A compartimentação vacuolar é uma estratégia eficaz de evitar os efeitos deletérios do sódio no citosol, pois os íons armazenados contribuem para o ajuste osmótico (Greenway e Munns, 1980; Flores, 1990; Marengo e Lopes, 2007). Assim, a sobrevivência e o crescimento são dependentes das adaptações que restabelecem a homeostase iônica, minimizando com isso a duração da exposição celular ao desequilíbrio iônico (Zhang e Blumwald, 2001; Shi et al., 2002a). O transporte dos íons é realizado por transportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , do tipo antiporte, localizados no tonoplasto ou na membrana plasmática (Blumwald et al., 2000; Hasegawa et al., 2000). A atividade dos transportadores é dirigida pelo gradiente eletroquímico, gerado pelas bombas de  $\text{H}^+$  (prótons), criado por  $\text{H}^+$ -ATPases e  $\text{H}^+$ -pirofosfatase inorgânica (PPiase) (Shi et al., 2002b; Qiu et al., 2004).

Determinantes moleculares da exclusão de sódio e da compartimentação vacuolar são intensamente estudados, estabelecendo uma rota de sinalização, a rota SOS, que regula a expressão dos genes envolvidos na homeostase iônica. Em *Arabidopsis* foi identificado um transportador de membrana  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , do tipo antiporte, codificado pelo gene SOS1, cuja expressão é aumentada em plantas submetidas a 25 mM de NaCl (Shi et al., 2000). A extrusão de  $\text{Na}^+$  do citoplasma pelo SOS1 garante a permeabilidade da membrana ao  $\text{K}^+$ , e em particular, protege o canal HKT1 da inibição por  $\text{Na}^+$  (Qi e Spalding, 2004). O gene SOS1 codifica um transportador do tipo antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localizado na membrana

plasmática, que é controlado a nível transcricional e pós-transcricional pela rota SOS. Assim, a função do SOS1 é restringir a absorção de  $\text{Na}^+$  na raiz, atuando na remoção de  $\text{Na}^+$  do citosol e na exportação para o espaço extracelular (apoplasto), com a finalidade de limitar e prevenir rápido acúmulo de  $\text{Na}^+$  na parte aérea. O SOS1 tem papel indireto na aquisição de  $\text{K}^+$ , bem como de elevar a concentração deste elemento através de co-transportadores do tipo  $\text{H}^+\text{-K}^+$  (Shi et al., 2002b). Também, o SOS1 reduz o fluxo de  $\text{Na}^+$  das células meristemáticas das raízes que contêm vacúolos de tamanho insuficiente para compartimentalizar  $\text{Na}^+$  de forma eficaz e restringir o acúmulo de sódio na parte aérea, pelo controle do carregamento do xilema na raiz (Shi et al., 2002b; Rus et al., 2004). Ainda, o SOS1 aumenta a tolerância ao NaCl associada a redução no acúmulo de sódio, presumivelmente, porque o transportador recupera o cátion tóxico do xilema para envolver as células do parênquima, reduzindo o sal transportado para a parte aérea (Shi et al., 2003). O aumento do nível de transcritos de SOS1, como resultado do estresse salino, está parcialmente sob o controle dos genes SOS2 e SOS3. A rota SOS3-SOS2 regula a atividade do transportador de íons SOS1, mantendo baixa a concentração tóxica de sódio no citoplasma (Halfter et al., 2000; Shi et al., 2000). Entretanto, o SOS1 possui papel principal na tolerância à salinidade, quando comparado com SOS2 e SOS3. O acionamento da via SOS é realizado por um sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (Zhu, 2002). O SOS3 associado ao  $\text{Ca}^{2+}$  ativa a proteína cinase SOS2 dirige-se a membrana plasmática, ativando o SOS1 (Quintero et al., 2002), conforme figura 1 do anexo.

A análise dos mutantes de *Arabidopsis* SOS revelou uma nova proteína cinase regulada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  em resposta ao aspecto iônico do estresse salino. A via de sinalização para a regulação da homeostase iônica e da tolerância a salinidade tem surgido da clonagem e da caracterização bioquímica de diversos genes SOS e seus produtos em *Arabidopsis* (Zhu, 2001a).

Recentemente uma única família de proteínas sensoras de cálcio foi identificada em *Arabidopsis* (Liu e Zhu, 1998), mostrando que há interação entre os sensores e que estes possuem várias funções no processo de sinalização (Guo et al., 2001). As propriedades bioquímicas e estruturais da proteína OsCK1 são muito similares às da cascata SOS presente em *Arabidopsis* (Kim et al., 2003).

A presença de íons na solução externa, principalmente  $\text{Na}^+$ , influencia a absorção de  $\text{Ca}^{2+}$ , cujas funções estão associadas à manutenção da estabilidade da membrana e da parede celular (Marschner, 1995). O  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha também papel de mensageiro secundário, acoplando os sinais ambientais ao crescimento e desenvolvimento da planta (Marengo e Lopes, 2007). Os receptores dos mensageiros secundários normalmente são cinases e/ ou fosfatases (Silva, 2008). A proteína cinase regulada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  mais abundante é a proteína cinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDPK ou CPK), a qual participa na transdução de sinais de estresse (Harper et al., 1991). As CDPKs representam uma classe de proteínas cinases ativadas pelo cálcio, mas insensíveis à calmodulina (Harmon et al., 1987). As proteínas são caracterizadas por dois domínios: um catalítico e outro semelhante a calmodulina. A presença da calmodulina no domínio explica porque a enzima não requer calmodulina para a atividade (Taiz e Zieger, 2008). As CDPKs são amplamente encontradas em plantas, sendo isoladas de *Nicotiana tabacum* L. (Lee e Rudd, 2002; Zhang et al., 2005), *Oryza sativa* L. (Yang et al., 2003) e *Cucumis sativus* L. (Kumar et al., 2004). Possuem papel essencial na resposta à estímulos ambientais (Harmon et al., 1987, Harper et al., 1991; Lee e Rudd, 2002; Kumar et al., 2004; Zhang et al., 2005), recebendo informações dos receptores que percebem as condições ambientais, fitormônios e outros fatores externos e convertendo-os em respostas apropriadas como mudança no metabolismo, na expressão gênica, na divisão e crescimento celular (Hardie, 1999). Em arroz o gene CK1 dependente de cálcio e independente de calmodulina está envolvido na percepção de sinal em resposta ao estresse ambiental. Um gene CDPK, desenhado como *OsCDPK13*, clonado de plântulas de arroz mostrou alto nível de similaridade com outros genes CDPK (Yang et al., 2003).

As mudanças na expressão gênica associadas ao estresse osmótico estão similarmente associadas ao estresse pela salinidade. No entanto, é necessário ter em mente que, além da aclimação ao meio com baixo potencial hídrico, as plantas sob estresse salino precisam fazer frente à toxicidade de concentrações iônicas elevadas presente neste ambiente. A identificação dos genes induzidos em resposta ao estresse salino tem grande relevância nesse sentido, pois os genes que conferem tolerância podem ser identificados e manipulados para se

estabelecer qual a crucial importância das proteínas por eles codificadas (Félix e Duarte, 2005). Em estudos que envolvem sequenciamento o gene de interesse pode ser encontrado em banco de dados por meio da pesquisa *in silico*.

Portanto é de grande importância para a agricultura e para o meio ambiente, compreender os processos fisiológicos e os mecanismos pelos quais as plantas percebem os sinais ambientais e transmitem à maquinaria celular (Xiong et al., 2002) para ativar resposta de adaptação e aclimação de plantas aos estresses ambientais que conferem tolerância e asseguram a sobrevivência das plantas (Xiong et al., 2002; Shinozaki e Dennis, 2003). Os eventos moleculares, ligando a percepção de um sinal de estresse às respostas genômicas que levam a tolerância, têm sido investigados exaustivamente nos últimos anos (Larcher, 2000). A descoberta de novos genes, a determinação de seus padrões de expressão em resposta ao estresse abiótico e o melhor entendimento de seu papel na adaptação ao estresse, fornecerão a base de novas estratégias para melhorar a tolerância das culturas ao estresse (Cushman e Bohnert, 2000). O conhecimento sobre a transdução dos sinais é também vital para o desenvolvimento continuado de seleção racional e estratégias transgênicas para melhorar a tolerância nas culturas (Xiong et al., 2002).

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi verificar a presença de genes SOS1 e CK1, envolvidos na tolerância salina, em cultivares de arroz *O. sativa ssp. japonica* e *O. sativa ssp. indica*.

## MATERIAL E MÉTODOS

No experimento foram utilizadas subespécies de *O. sativa* ssp. *japonica* consideradas tolerantes à salinidade e de *O. sativa* ssp. *indica* sensíveis ao estresse salino (Machado e Terres, 1997, Lima et al., 2004 e 2005). As cultivares de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato foram BRS Bojurú, IAS 12-9 Formosa e Goyakuman e as de *Oryza sativa* L. ssp. *indica* S. Kato BRS-7 Taim, BRS Querência e BRS Atalanta, de uso comum na orizicultura gaúcha.

Inicialmente, a semeadura foi realizada bandejas plásticas, contendo como substrato, areia lavada. Aos 10 dias após a emergência as plântulas foram transferidas para casa de vegetação com temperatura e umidade controladas. As plântulas foram colocadas em bacias com capacidade para 15 L, contendo solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) meia força acrescida de doses de zero, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl. As plantas dos tratamentos controle foram coletadas aos 56 dias após a transferência (DAT) e imediatamente armazenadas em ultrafreezer. Uma planta de cada cultivar foi triturada com gelo seco e acondicionada em sacos plásticos, identificados e imediatamente levadas ao freezer para posterior extração do DNA..

O DNA genômico de plantas de cada cultivar foi extraído segundo o método CTAB 2% (Saghai-Marooft et al., 1984), utilizando-se 200 mg de material vegetal. A quantificação e análise de integridade do DNA foi realizada aplicando 4 µL de DNA e 4 µL de tampão de corrida em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio 0,2 µg mL<sup>-1</sup> (Sambrook et al., 1989). As condições de corrida foram 100 V durante 50 minutos. Após a eletroforese, os géis foram analisados em transiluminador sob luz ultravioleta (254 nm) e as

imagens digitalizadas. O marcador  $\lambda$  *Hind* III (Invitrogen) foi usado como referência de massa molecular.

A detecção do gene consistiu da extração de DNA genômico, seguido de reações de PCR utilizando *primers* desenhados para amplificarem fragmentos de genes envolvidos na tolerância à salinidade. Por intermédio de análise de pesquisas *in silico*, realizada junto ao NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foram identificados genes envolvidos na tolerância à salinidade, sendo identificados os genes AY785147 – SOS1 com 3660pb e AF319481 - CK1 com 4206pb. Foram desenhados três (3) pares de *primers* para cada gene, sendo um a cada 1200pb para o SOS1 e 1400pb para o CK1 com o objetivo de amplificar diferentes regiões dentro do gene, utilizando o programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/Primer3/>).

Cada 20  $\mu$ L de reação continha 2  $\mu$ L de DNA; 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), e as seguintes concentrações finais: 0,5  $\mu$ M de *primer* forward e reverse, 0,2 mM de dNTPs, tampão PCR 1X e 2,5 mM de  $MgCl_2$ .

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC-100 MJ Research, empregando o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos; sendo a extensão final de 10 minutos a 72°C.

Também, foram adicionados 4  $\mu$ L de tampão de corrida ao DNA amplificado. Os produtos da amplificação foram detectados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1X. As condições de corrida foram 120 V durante 60 min. A visualização do DNA corado com brometo de etídio foi feita sobre iluminação ultravioleta (254 nm) e as imagens digitalizadas. Os resultados foram avaliados por intermédio da comparação visual do padrão das bandas após amplificação em PCR.

O marcador de massa molecular Ladder 100pb (Invitrogen) foi utilizado como padrão para a estimativa da massa molecular.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

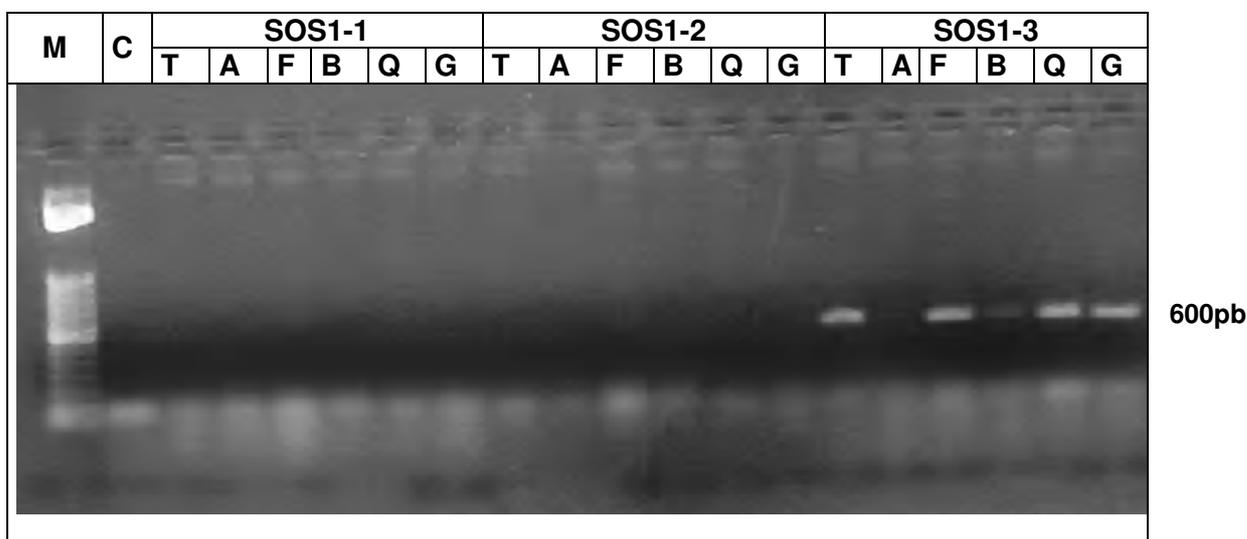
Os *primers* desenhados mediante a utilização de pesquisa *in silico* estão relacionados na tabela 1.

**Tabela 1** - Relação de seqüências dos *primers* utilizados na reação de PCR, para amplificação dos genes SOS1 e CK1, com orientação forward (Left – L) e reverse (Right – R) e temperatura de anelamento (TM)

Gene	Primer	Orientação	Seqüência	TM °C
AY785147	SOS1-1	L	GAAGAACTTTTCGATGCAGGA	58
		R	ATTTCCCAGAAATGATGCAA	
	SOS1-2	L	TGGACAGATTAGCAGCAACA	58
		R	TTGGGTAGGAACAAGATCCA	
	SOS1-3	L	GCTCTAATAAAGCGCACAGC	58
		R	CCAACAATTACTTGGGTTGC	
AF319481	CK1-1	L	GGTTTTTCCAACCAACTCCT	58
		R	GGGCTTCAGAAACTGACAGA	
	CK1-2	L	GAGAACTTCCTGCTGCTGAG	58
		R	ATCTTCCTGACGAGGTCCTT	
	CK1-3	L	TACAGCATTCCAAGTGCTCA	58
		R	TGCTCAATTCGTTGTCTGA	

A cultivar BRS Atalanta não apresentou amplificação do gene SOS em nenhum dos *primers* desenhados, o que permite inferir que a mesma não possui o gene que confere tolerância à salinidade. Nas demais cultivares

ocorreu amplificação somente no *primer* SOS1-3, com bandas de 600pb, sugerindo que as cultivares avaliadas apresentam o gene SOS1 (Figura 1). Como os *primers* foram desenhados a partir de um único gene e somente a região do *primer* SOS1-3 apresentou amplificação, é possível que esta região do gene foi conservada ao longo do processo evolutivo, possivelmente o gene sofreu alguma alteração na região coberta pelos outros dois *primers*. O resultado sugere, a presença do gene nas cultivares BRS-7 Taim, IAS 12-9 Formosa, BRS Querência, Goyakuman e BRS Bojuru a qual mostrou banda menos intensa. O transcrito SOS1 está presente em plantas de *Arabidopsis* mesmo sem estresse salino, mas os seus níveis são aumentados por tratamento com NaCl (Shi et al., 2000). Plantas transgênicas de canola (*Brassica napus* L.), nas quais o gene SOS1 de *Arabidopsis* foi inserido, cresceram, floresceram e produziram sementes na presença de 200 mM de NaCl, enquanto que as não transgênicas foram severamente afetadas (Blumwald et al., 2001; Zhang et al., 2001). Resultado semelhante foi obtido com plantas de *Lycopersicon esculentum* L. (Borsani et al., 2001). A análise dos mutantes de *Arabidopsis* SOS revelou uma via de sinalização para a regulação da homeostase iônica e da tolerância a salinidade

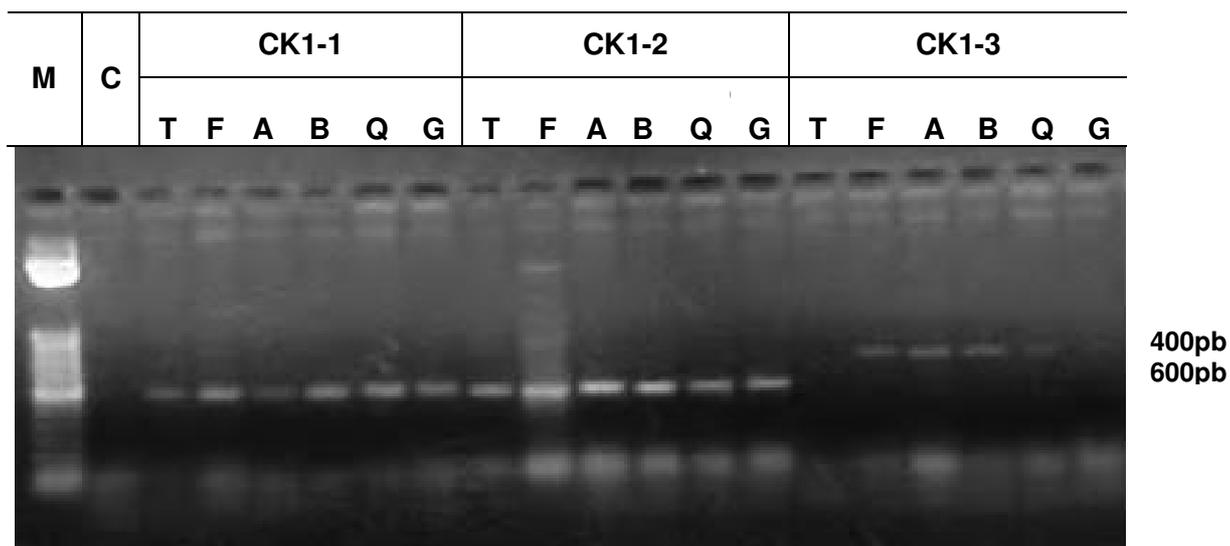


**FIGURA 1** - Gel de eletroforese para detecção do gene SOS1 em plantas de cultivares de arroz Taim (T); Atalanta (A); Formosa (F); Bojuru (B); Querência (Q) e Goyakuman (G), utilizando-se os *primers* SOS1-1; SOS1-2 e SOS1-3. Marcador de peso molecular Ladder 100pb (M) e controle sem DNA com 2  $\mu$ L H<sub>2</sub>O (C).

(Zhu, 2001a). É possível que o SOS1 opere como transportador do tipo antiporte e como canal iônico no carregamento do xilema ou transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , do tipo simporte, no descarregamento do xilema (Shi et al., 2002b). Em *Arabidopsis* foi identificado um transportador de membrana  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  do tipo antiporte codificado pelo gene SOS1, cuja a expressão é aumentada em plantas submetidas a 25 mM de NaCl (Shi et al., 2000). A identificação e comparação de genes induzidos pelo estresse salino em arroz e em *Arabidopsis* indica que existem mecanismos moleculares semelhantes de resposta ao estresse entre ambas espécies (Rabbani et al., 2003).

Em relação ao gene CK1 todas as cultivares de arroz testadas amplificaram os três *primers* utilizados (Figura 2), porém no *primer* CK1-1, as cultivares BRS-7 Taim e BRS Atalanta apresentaram bandas com menor intensidade. No *primer* CK1-2 as bandas tiveram padrão de intensidade similar, com exceção da cv. IAS 12-9 Formosa em que a banda foi mais intensa que as demais. Os dois primeiros *primers* apresentaram 600pb. No *primer* CK1-3 as bandas, com 400pb, tiveram padrão de intensidade menor quando comparado aos demais *primers*, sendo que as cvs. BRS-7 Taim, BRS Querência e Goyakuman não foram amplificadas. Pode-se inferir que as cultivares tanto *O. sativa* ssp. *japonica* quanto as *O. sativa* ssp. *indica* apresentaram o gene CK1 que está envolvido na percepção de sinal em resposta ao estresse ambiental.

O mecanismo de sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  originalmente encontrado em *Arabidopsis* também está presente no arroz e o gene *OsCK1* desempenha papel importante na resposta aos diferentes tipos de estresse (Kim et al., 2003). Há cerca de 34 genes CDPK no genoma de *Arabidopsis* que estão envolvidos em resposta ao estresse ambiental e sinalização hormonal (Taiz e Zieger, 2008). A sobrevivência e o crescimento são dependentes do restabelecimento da homeostase iônica (Zhang e Blumwald, 2001) que é realizado por transportadores. A importância dos transportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  na tolerância à salinidade é comprovada pela detecção da superexpressão de um deles, o AtNHX1, que aumenta a tolerância ao estresse salino (Apse et al., 1999).



**FIGURA 2** - Gel de eletroforese para detecção do gene CK1 em plantas de cultivares de arroz Taim (T); Formosa (F); Atalanta (A); Bojuru (B); Querência (Q) e GoyaKuman (G), utilizando-se os *primers* CK1-1; CK1-2 e CK1-3. Marcador de peso molecular Ladder 100pb (M) e controle sem DNA com 2  $\mu$ L H<sub>2</sub>O (C).

Testes futuros devem ser realizados para averiguar a expressão do referido gene nas diferentes subespécies sob concentrações diferentes de salinidade. Indivíduos transgênicos de *Arabidopsis* e de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), por superexpressão do gene que codifica AtNHX1, exibem acentuada tolerância ao sal (Apse et al., 1999; Quintero et al., 2000). Esses íons agem dentro do vacúolo para manter o fluxo hídrico para a célula (Glenn et al., 1999). Os transportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> do tipo antiporte excluem Na<sup>+</sup> do citosol e estão localizados nas membranas plasmática e vacuolar. A atividade dos transportadores no tonoplasto de plantas consideradas tolerantes à salinidade aumenta drasticamente em resposta ao estresse salino.

## CONCLUSÕES

- O gene SOS1 foi encontrado em todas as cultivares, com exceção da BRS Atalanta.
- O gene CK1 está presente em todas as cultivares avaliadas.

## CONCLUSÕES GERAIS

- A expressão das enzimas envolvidas nos mecanismos de tolerância ao estresse salino é maior na subespécie *O. sativa* ssp. *japonica*.
- Os genes SOS1 e CK1 estão presentes nas cultivares estudadas de *O. sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato e *O. sativa* L. ssp. *indica* S. Kato.

## Referências

AGROBRASIL. Disponível em <[www.revistaagrobrasil.com.br](http://www.revistaagrobrasil.com.br)>. Acesso em 15 mai. 2008.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Reactive oxygen species and antioxidants relationship in green cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.100, n.1, p.224-233, 1997.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, n.372, p.1331-1341, 2002.

ALSHAMMARY, S.F.; QIAN, Y.L.; WALLNER, S.J.; Growth response of four turfgrass species to salinity. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v.66, n.1, p.97-101, 2004.

ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SLOKOSKA, L.S. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus nidulans* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.26, n.7, p.544-549, 2000.

APSE, M.P., AHARON, G.S., SNEDDEN, W.A.; BLUMWALD, E. Salt tolerance conferred by over expression of vacuolar Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v.285, n.5431, p.1256-1258, 1999.

BANDEOGLU, E.; EYIDOGAN, F.; YUCEL, M.; OKTEM, H.A. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.23, n.2, p.69-77, 2004.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds. Physiology of development and germination**. 2<sup>a</sup> ed. Plenum Press, New York, 1994. 445p.

BINZEL, M.L.; HESS, F.D.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.86, n.2, p.607-614, 1988.

BLUMWALD, E.; AHARON, G.S.; APSE, M.P. Sodium transport in plant cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, Amsterdam, v.1465, p.140-151, 2000.

BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in crop plants. p.4-6. Dezembro 2001 Disponível em <[www.isbnewsreport](http://www.isbnewsreport.com)>. Acesso em 21 mai. 2006.

BOHNERT, H.J.; NELSON, D.E.; JENSEN, R.G. Adaptations to environmental stress. **The Plant Cell**, Rockville, v.7, n.7, p.1109-1111, 1995.

BONOW, S.; AUGUSTIN, E.; FRANCO, D.F.; PETERS, J.A.; TERRES, A.L. da S. Caracterização isoenzimática de genótipos de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p.291-300, 2001.

BORSANI, O.; CUARTERO, J.; FERNÁNDEZ, J.A.C.; VALPUESTA, V.; BOTELLA, M.A. Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance. **The Plant Cell**, Rockville, v.13, n.4, p.873–887, 2001.

BRANDÃO-JUNIOR, D.S.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.1, p.114-121, 1999.

BREWER, G.J.; SING, C.F. **An introduction to isozyme techniques**. Academic Press, New York, 1970. 186p.

BRITO, L.T. de L. Qualidade de água para irrigação. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em 25 jan. 2008.

BRUNGOLI, E.; LAUTERI, M. Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity and carbon isotope discrimination of salt tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C3 non-halophytes. **Plant Physiology**, Rockville, v.95, n.2, p.628-635, 1991.

CAVALCANTI, F.R.; OLIVEIRA, J.T.A.; MARTINS-MIRANDA, A.S.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, Cambridge, v.163, n.3, p.563-571, 2004.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Disponível em <[www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo\\_safra.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo_safra.pdf)>. Acesso em 01 mar. 2008.

COSTA, P. H. A.; SILVA, J. V.; BEZERRA, M. A.; ENEAS FILHO, J.; PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidas à salinidade. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.26, n.3, p.1-10, 2003.

CRAMER, G.R.; LDUCHLI, A.; POLITO, V.S. Displacement of Ca<sup>+</sup> by Na<sup>+</sup> from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? **Plant Physiology**, Rockville, v.79, n.1, p.207-211, 1985.

CUSHMAN, J.C.; BOHNERT, H.J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, n.2, p. 117-124, 2000.

DASH, M.; PANDA, S.K. Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating Phaseolus mung seeds. **Biologia Plantarum**, Praha, v.44, n.4, p.587-589, 2001.

DREW, M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.48, p.223-250, 1997.

FÉLIX, J.M.; DUARTE, R. Estresse salino em arroz. Disponível em <[www.cafe.cbmeg.unicamp.br](http://www.cafe.cbmeg.unicamp.br)>. Acesso em 20 out. 2005.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3<sup>a</sup> ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

FLORES, H.E. **Polyamines and plant stress** In: ALSCHER, R.G.; CUMMING, J.R. (Eds.). Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms. New York, 1990, p.217-239.

FLOWERS, T.J.; YEO, A.R. **Breeding for salt resistance in plants**. In: JAIWAL, P.K.; SINGH, R.P.; GULTI, A. (Eds.) Strategies for improving salt tolerance in higher plants. New Delhi, 1997, p.247-264.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.92, n.4, p.696-717, 1994.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. **New Phytologist**, Cambridge, v.146, n.3, p.359-388, 2000.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.119, n.3, p.355-364, 2003.

GLENN, E.P.; BROWN, J.J.; BLUMWALD, E. Salt-tolerant mechanisms in crop potential of halophytes. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.18, p.227-255, 1999.

GONELA, A.; LEMOS, E.G.M.; RODRIGUES, T. de J.D.; PATERNIANI, M.L.S. Reação enzimática ao estresse salino durante a germinação de estilosantes. *Notas Científicas. Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.39, n.1, p.93-95, 2004.

GONG, Z.; KOIWA, H.; CUSHMAN, M.A.; RAY, A.; BUFFORD, D.; KORE-EDA, S.; MATSUMOTO, T.K.; ZHU, J.-K.; CUSHMAN, J.C.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitivity (*sos*) mutants. **Plant Physiology**, Rockville, v.126, n.1, p.363-375, 2001.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.31, p.149-190, 1980.

GUO, Y.; HALFTER, U.; ISHITANI, M.; ZHU, J.-K. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. **The Plant Cell**, Rockville, v.13, n.6, p.1383-1400, 2001.

HALFTER, U., ISHITANI, M.; ZHU, J.-K. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v.97, n.7, p.3735-3740, 2000.

HARDIE, D.G. Plant protein serine/threonine kinases: Classification and Functions. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.50, p.97-131, 1999.

HARMON, A.C.; PUTNAM-EVANS, C.; CORMIER, M.J. A calcium-dependent but calmodulin-independent protein kinase from soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v.83, n.4, p.830-837, 1987.

HARPER, J.F.; SUSSMAN, M.R.; SCHALLER, G.E.; PUTNAM-EVANS, C.; CHARBONNEAU, H.; HARMON, A.C. A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. **Science**, Washington, v.252, n.5008, p.951-954, 1991.

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

HAYAKAWA, T.; KANEMATSU, S.; ASADA, K. Occurrence of Cu, Zn-Superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach-chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.25, n.6, p.883-889, 1984.

HERBETTE, S.; LENNE, C.; DE LABROUHE, D.T.; ROECKEL-DREVET, J.R.; ROECKEL-DREVET, P. Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.119, n.3, p.418-428, 2003.

HERNÁNDEZ, J.A.; JIMENEZ, A.; MULLINEAUX, P.; SEVILLA, F. Tolerance of pea plants (*Pisum sativum*) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.23, n.8, p.853-862, 2000.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Berkely: University of California Agricultural Experiment Station, circular n.347, 1950. 34 p.

HOLMSTRÖM, K.O.; MÄNTYLÄ, E.; WELIN, B.; MANDAL, A.; PALVA, E.T.; TUNNELA, O.E.; LONDESBOROUGH, J. Drought tolerance in tobacco. **Nature**, London, v.379, p.683-684, 1996.

INTERARROZ. Disponível em: <[www.arroz.agr.br/site/interarroz/zip/0208pt.pdf](http://www.arroz.agr.br/site/interarroz/zip/0208pt.pdf)>. Acesso em 29 fev. 2008.

INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ (IRGA). Tendências e projeções para a safra de 2007/2008. Disponível em: <[www.irga.rs.gov.br/arquivos](http://www.irga.rs.gov.br/arquivos)> . Acesso em 29 fev. 2008.

ISHITANI, M.; LIU, J.; HALFTER, U.; KIM, C.S. WEI, M.; ZHU, J.-K. SOS3 function in plant salt tolerance requires myristoylation and calcium-binding. **The Plant Cell**, Rockville, v.12, n.9, p.1667-1677, 2000.

JARRET, R.L.; LITZ, R.E. Isoenzymes as genetic markers in bananas and plantains. **Euphytica**, Dordrecht, v.35, n.2, p.539-549, 1986.

JEBARA, S.; JEBARA, M.; LIMAM, F.; AOUBANI, M.E. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodules under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.162, n.8, p.929-936, 2005.

JOSÉ, S.C.B.R.; VIEIRA, M. das G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; RODRIGUES, R. Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de pimentão submetidas ao osmocondicionamento, utilizando diferentes agentes osmóticos e meios de embebição. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.2, p.217-223, 1999.

KAWASAKI, S.; BORCHERT, C.; DEYHOLOS, M.; WANG, H.; BRAZILLE, S.; KAWAI, K.; GALBRAITH, D.; BOHNERT, H.J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. **The Plant Cell**, Rockville, v.13, n.4, p.889-905, 2001.

KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, n.1, p.1-6, 1992.

KIM, K.-N.; LEE, J.-S.; HAN, H.; CHOI, S.A.; GO, S.J.; YOON, I.S. Isolation and characterization of a novel rice  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated protein kinase gene involved in responses to diverse signals including cold, light, cytokinins, sugars and salts. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.52, n.6, p.1191-1202, 2003.

KISHOR, P.B.K.; HONG, Z.; MIAO, G.H.; HU, C.A.A.; VERMA, D.P.S. Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.108, n.4, p.1387-1394, 1995.

KUMAR, R.G.; SHAH, K.; DUBEY, R.S. Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. **Plant Science**, Limerick, v.156, n.1, p.23-34, 2000.

KUMAR, K.G.S.; ULLANAT, R.; JAYABASKARAN, C. Molecular cloning, characterization, tissue-specific and phytohormone-induced expression of calcium-dependent protein kinase gene in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.161, n.9, p.1061-1071, 2004.

KUZNETSOV, V.V.; SHEVYAKOVA, N.I. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.100, n.2, p.320-326, 1997.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos, RiMa, 2000. 531 p.

LEE, J.; RUDD, J.J. Calcium-dependent protein kinases: versatile plant signalling components necessary for pathogen defence. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, n.3, p.97-98, 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2ª ed. SARVIER, São Paulo, 1995. 839p.

LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stress**. Academic Press, New York, 1972. 697 p.

LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A.M. de Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.56, n.1, p.21-26, 1999.

LIMA, M. da G. de S.; LOPES, N.F. **Sensibilidade de genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) ao estresse salino**. Dissertação de Mestrado. UFPel, Pelotas, 2002. 52p.

LIMA, M. da G. de S.; LOPES, N.F.; BACARIN, M.A.; MENDES, C.R. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. **Bragantia**, Campinas, v.63, n.3, p.335-340, 2004.

LIMA, M. da G. de S.; LOPES, N.F.; MORAES, D.M. de; ABREU, C.M. Qualidade fisiológica de sementes de arroz ao estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.1, p.54-61, 2005.

LIU, J.P.; ZHU, J.-K. An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v.94, n.26, p.14960-14964, 1997a.

LIU, J.P.; ZHU, J.-K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v.114, n.2, p.591-596, 1997b.

LIU, J.; ZHU, J.-K. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. **Science**, Washington, v.280, n.5371, p.1943-1945, 1998.

LIU, J.P.; ISHITANI, M.; HALFTER, U.; KIM, C.S.; ZHU, J.-K. The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v.97, n.7, p.3730-3734, 2000.

LOOMIS, R.S., CONNOR, D.J. **Crop ecology: productivity and management in agricultural systems**. Cambridge, University Press, 1992. 538p.

MACEDO, V.R.M.; MARCOLIN, E.; ANGHINONI, I.; GENRO JUNIOR, S.A.; VEZZANI, F.M. **Salinidade na cultura do arroz no Rio Grande do Sul**. Divisão de Pesquisa Estação Experimental do Arroz Equipe de Solos e Águas. Disponível em <[www.irga.gov.br](http://www.irga.gov.br)>. Acesso em 13 jul. 2007.

MACHADO, M.O.; TERRES, A.L. da S. Melhoramento do arroz irrigado na EMBRAPA – CPACT. 9. Tolerância de genótipos à salinidade da água de irrigação, do início da diferenciação da panícula à maturidade safras 1995/96 e 1996/97. Resumos da XXII Reunião da cultura do arroz irrigado, Balneário Camboriú, SC, 1997. p. 68-71.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.157, n.2, p.183-193, 2000.

MANCHENKO, G.P. **Handbook of detection of enzymes in electrophoretic gels**. CRC Press, Boca Raton, 2000. 341p.

MANSOUR, M.M.F.; SALAMA, K.H.A. Cellular basis of salinity tolerance in plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.52, n.2, p.113-122, 2004.

MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. 2ª ed., Editora UFV, Viçosa, 2007. 469p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2ª ed. Academic Press Harcourt Brace and Company, Germany, 1995. 889 p.

MATAMOROS, M.A.; DALTON, D.A.; RAMOS, J.; CLEMENTE, M.R.; RUBIO, M.C.; BECANA, M. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. **Plant Physiology**, Rockville, v.133, n.2, p.499-509, 2003.

MEHDY, M.C.; SHARMA, Y.K.; SATHASIVAN, K.; BAYS, N.W. The role of activated oxygen species in plant diseases resistance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.98, n.2, p.365-374, 1996.

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**, Limerick, v.166, n.2, p.323-331, 2004.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, n.9, p.405-410, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.9, n.10, p.490-498, 2004.

MUNIZ, F.R.; CARDOSO, M. das G.; VON PINHO, É.V.R.; VILELA, M. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.29, n.2, p.195-204, 2007.

MURPHY, R.W.; SITES, J.W.Jr.; BUTH, D.G.; HAUFLE, C.H. **Proteins I: isozyme electrophoresis**. In: Molecular Systematics. HILLIS, D.M.; MORITZ, C. (Eds). Sinauer Associates, Sunderland MA., 1990. p.45-126.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R.D.; HANCOCK, J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, n.372, p.1237-1247, 2002.

NELSON, M.R.; THULIN, E.; FAGAN, P.A.; FORSEN, S.; CHAZIN, W.J. The EF-hand domain: A globally cooperative structural unit. **Protein Science**, Cold Spring Harbor, v.11, n.2, p.198-205, 2002.

NIU, X.; BRESSAN, R.A.; HASEGANA, P.M.; PARDO, J.M.; Ion homeostasis in NaCl stress environment. **Plant Physiology**, Rockville, v.109, n.3, p.735-742, 1995.

NIYOGI, K.K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.50, p.333-359, 1999.

PAYNE, R.C. Electrophoresis testing procedure used by Federal Seed Laboratory to help distinguish varieties. Federal Seed Laboratory Bulletin, 1985. 20p.

PEROZZI, M.B. Arroz em foco – gene para tolerância ao sal é encontrado no arroz. Disponível em <www.SciDev.net>. Acesso em 26 set. 2005.

PINTO, L.R.; SADER, R.; LEMOS, E.G.M. Variações nos perfis eletroforéticos de isoenzimas: aplicação na identificação de cultivares de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.17, n.1, p.52-56, 1995.

PILON-SMITS, E.A.H.; EBSKAMP, M.J.M.; PAUL, M.J.; JEUKEN, M.J.W.; WEISBEEK, P.J.; SMEEKENS, S.C.M. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, n.1, p.125-130, 1995.

PRISCO, J.T. Alguns aspectos da fisiologia do "stress" salino. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.3, p.85-94, 1980.

QI, Z.; SPALDING, E.P. Protection of plasma membrane K<sup>+</sup> transport by the Salt Overly Sensitive Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiporter during salinity stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.136, n.1, p.2548-2555, 2004.

QUINTERO, F.J.; BLATT, M.R.; PARDO, J.M. Functional conservation between yeast and plant endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v.471, n.2-3, p.224-228, 2000.

QUINTERO, F.J.; OHTA, M.; SHI, H.; ZHU, J.-K.; PARDO, J.M. Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.99, n.13, p. 9061-9066, 2002.

QIU, Q.-S.; GUO, Y.; QUINTERO, F.J.; PARDO, J.M.; SCHUMAKER, K.S.; ZHU J.-K. Regulation of Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange in *Arabidopsis thaliana* by the Salt-Overly-Sensitive (SOS) Pathway . **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.279, n.1, p.207-215, 2004.

RABBANI, M.A.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KHAN, M.A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. **Plant Physiology**, Rockville, v.133, n.4, p.1755-1767, 2003.

RODRIGUES, A.C.; DINIZ, A.C.; FACHINELLO, J.C.; SILVA, J.B. da, FARIA, J.L.C. Peroxidases e fenóis totais em tecidos de porta-enxertos de *Prunus sp.* nos períodos de crescimento vegetativo e de dormência. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.559-564, 2002.

RODRÍGUEZ, H.G.; ROBERTS, J.K.M.; JORDAN, W.R.; DREW, M.C. Growth, water relation, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.113, n.3, p.881-893, 1997.

ROSA, S.D.V.F. da; Von PINHO, E.V.R.; VIEIRA, E.S.N.; VEIGA, R.D.; VEIGA, A.D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas *lea* associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.2, p.91-101, 2005.

RUS, A.; LEE, B.-H.; MUÑOZ-MAYOR, A.; SHARKHUU, A.; MIURA, K.; ZHU, J.-K.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. *AtHKT* facilitates Na<sup>+</sup> homeostasis and K<sup>+</sup> nutrition in planta. **Plant Physiology**, Rockville, v.136, n.1, p.2500-2511, 2004.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.81, n.24, p.8014-8018, 1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning laboratory manual**. 2<sup>a</sup> ed. United States of America, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, v.3, p.5.

SANTOS, R.; HE´ROUART, D.; PUPPO, A.; TOUATI, D. Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in Rhizobium-legume symbiosis. **Molecular Microbiology**, Salem, v.38, n.4, p.750-759, 2000.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemistry genetics**, New York, v.3, p.37-79, 1969.

SCANDALIOS, J.G. **Isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa : UFV, 1991. 242p.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, n.1, p.7-12, 1993.

SCHACHTMAN, D.; LIU, W. Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.4, n.7, p.281-287, 1999.

SHI, H., ISHITANI, M., KIM, C.; ZHU, J.-K. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> antiporter. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v.97, n.1, p.6896-6901, 2000.

SHI, H.; XIONG, L.; STEVENSON, B.; LU, T.; ZHU, J.-K. The *Arabidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance. **The Plant Cell**, Rockville, v.14, n.3, p.575-588, 2002a.

SHI, H.; QUINTERO, F.J.; PARDO, J.M.; ZHU, J.-K. The putative plasma membrane Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> antiporter *SOS1* controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v.14, n.2, p.465-477, 2002b.

SHI, H.; LEE, B.-H.; WU, S.-J.; ZHU, J.-K. Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology**, New York, v.21, n.1, p.81-85, 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUSHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water stress response. **Plant Physiology**, Rockville, v.115, n.2, p.327-334, 1997.

SHINOZAKI, K.; DENNIS, E.S. Cell signalling and gene regulation global analyses of signal transduction and gene expression profiles. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, n.5, p.405-409, 2003.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: an organism perspective. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.12, n.4, p.303-312, 1993.

SILVA, E.F. da C. e As fosfatases e a linguagem intracelular, p.43-57. Disponível em <<http://www.google/fosfatase>>. Acesso em 03 fev. 2008.

SILVA JÚNIOR, C.D. da; PASSOS, E.E.M.; GHEYI, H.R. Aplicação de água salina no desenvolvimento e comportamento fisiológico de coqueiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.6, n.1, p.39-44, 2002.

SOLOMON, A.; BEER, S.; WAISEL, G.; JONES, P.; PALEG, L.G. Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.90, n.1, p.198-204, 1994.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO (SOSBAI) Arroz irrigado: **Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil** / Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado; V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, XXVII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. – Pelotas: SOSBAI, 2007. 161 p.

SOUZA FILHO, G.A. de S.; FERREIRA, B.S.; DIAS, J.M.; QUEIROZ, K.S.; BRANCO, A.T.; BRESSAN-SMITH, R.E.; OLIVEIRA, J.G.; GARCIA, A.B. Accumulation of SALT protein in rice plants as a response to environmental stress. **Plant Science**, Limerick, 164, n.4, p.623-628, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 3<sup>a</sup>ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**, 4<sup>a</sup>ed. Sinauer Associates *On Line*. Disponível em <[www.plantphys.net](http://www.plantphys.net)>. Acesso em 03 fev. 2008.

TARCZYNSKI, M.C., JENSEN, R.G.; BOHNERT, H.J. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. **Science**, Washington, v.259, n.5094, p.508-510, 1993.

TOENISSEN, G. H. **The Rockefeller foundation's international program on rice biotechnology**. In: ALTMAN, D.W.; WATANABE, K.N. (Eds). *Plant Biotechnology in Developing Countries*, R.G. Lands Company, 1995, p.193-212.

VAIDYANATHAN, H.; SIVAKUMAR, P.; CHAKRABARLY, R.; THOMAS, G. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) – differential response in salt tolerance and sensitive varieties. **Plant Science**, Limerick, v.165, n.6, p.1411-1418, 2003.

VILLAR, P.M. del INTERARROZ - Informativo mensal do mercado mundial de arroz. Fevereiro 2008, n.48. Disponível em [www.arroz.agr.br/site/interarroz](http://www.arroz.agr.br/site/interarroz). Acessado em 29/02/2008.

WANG, Z.-Q.; YUAN, Y.-Z.; OU, J.-Q.; LIN, Q.-H.; ZHANG, C.-F. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings exposed to different salinity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.164, n.6, p.695-701, 2007.

WILLADINO, L.; MARTINS, M.H.V.; CAMARA, T.R.; ANDRADE, A.G.; ALVES, G.D. Resposta de genótipos de milho ao estresse salino em condições hidropônicas. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.4, p.1209-1213, 1999 suplemento.

WINGSLE, G.; GARDESTRÖM, P.; HÄLLGREN, J.; KARPINSKI, S. Isolation, purification, and subcellular localization of isozymes of superoxide dismutase from scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. **Plant Physiology**, Rockville, v.95, p.21-28, 1991.

XIE, J.H.; ZAPATA-ARIAS, F.J.; SHEN, M.; AFZA, R. Salinity tolerant performance and genetic diversity of four rice varieties. **Euphytica**, Dordrecht, v.116, n.2, p.105-110, 2000.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K.S.; ZHU, J.-K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **The Plant Cell**, Rockville, Suplemento 1, p.165-183, 2002.

YANG, G.; SHEN, S.; YANG, S.; KOMATSU, S. *OsCDPK13*, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced in response to cold and gibberellin. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.41, n.4, p.369-374, 2003.

ZHANG, H.-X.; BLUMWALD, E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. **Nature Biotechnology**, New York, v.19, n.8, p.765-768, 2001.

ZHANG, H.-X.; HODSON, J.N.; WILLIAMS, J.P.; BLUMWALD, E. Engineering salt-tolerant Brassica plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.98, n.22, p.12832-12836, 2001.

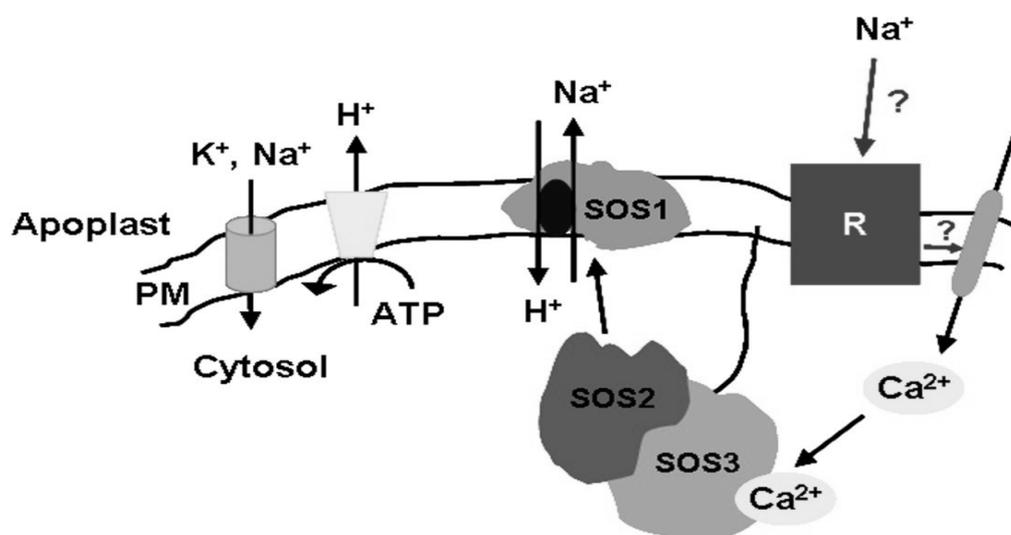
ZHANG, M.; LIANG, S.; LU, Y.-T. Cloning and functional characterization of NtCPK4, a new tobacco calcium-dependent protein kinase. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, Amsterdam, v.1729, n.3, p.174-185, 2005.

ZHU, J.-K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.53, p.247-73, 2002.

ZHU, J.-K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, n.5, p.401-406, 2001a.

ZHU, J.-K. Plant salt tolerance. **Trends Plant Science**, Oxford, v.6, n.2, p.66-71, 2001b.

## **ANEXOS**



**Figura 1** – Modelo da rota SOS - A salinidade aumenta o  $Ca^{2+}$  citoplasmático, que é percebido pela proteína SOS3, juntos ativarão o SOS2. Esta cascata ativa o SOS1, um transportador do tipo antiporte, localizado na membrana plasmática, tendo por função regular a homeostase iônica durante o estresse salino.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)