

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal**



**Tese**

**FISIOLOGIA DO ESTRESSE SALINO EM ARROZ:  
CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA BIOQUÍMICA E MOLECULAR**

**Letícia Carvalho Benitez**

**Pelotas, 2012**

**Letícia Carvalho Benitez**

**FISIOLOGIA DO ESTRESSE SALINO EM ARROZ:  
CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA BIOQUÍMICA E MOLECULAR**

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

Orientadora: Profa. Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Coorientador: Prof. Dr. José Antonio Peters

Coorientador: Prof. PhD. Antonio Costa de Oliveira

Pelotas, 2012

**Dados de catalogação na fonte:**

Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B467f Benitez, Leticia Carvalho

Fisiologia do estresse salino em arroz : caracterização da resposta bioquímica e molecular / Leticia Carvalho Benitez. – 111f. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2012. – Orientador Eugênia Jacira Bolacel Braga ; co-orientador José Antônio Peters, Antonio Costa de Oliveira.

1. *Oryza sativa* L.. 2.Prolina. 3.Salinidade. 4.Expressão diferencial. 5.Análise multivariada. 6.Elementos de transposição. 7.Enzimas antioxidantes. 8.Pigmentos fotossintéticos. I.Braga, Eugênia Jacira Bolacel. II.Peters, José Antônio. III.Oliveira, Antonio Costa de. IV.Título.

CDD: 584.93

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Dr. Sidnei Deuner

Dr<sup>a</sup>. Caroline Marques Castro

Prof. Dr. Valmor João Bianchi

*Aos meus pais Nara e Daniel*  
*A minha avó Angelita, minhas irmãs Natália e Mariana*  
*A minha filha Milena, com amor*  
*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que me deu saúde, coragem e persistência para enfrentar as dificuldades surgidas durante a realização do curso.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de participar do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal para a obtenção do grau de Doutora em Ciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e bolsa sanduíche na Espanha.

Durante a realização de um trabalho sentimos a necessidade de termos pessoas e amigos que nos auxiliem, nos guiem e nos orientem. A estas pessoas, expresso minha gratidão:

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga pela oportunidade, confiança e incentivo, mas principalmente pela amizade, dedicação, ensinamentos e orientação, não somente durante a realização deste trabalho, mas ao longo dos sete anos de convivência, desde meu começo na pós-graduação. Agradeço também pelas longas conversas em que compartilhamos projetos, sonhos, decepções e vida pessoal, certamente ficarão para sempre em minha memória.

Ao Professor Santiago Moreno-Vázquez que me acolheu, na Universidad Politécnica de Madrid, com muito carinho desde o primeiro dia em que cheguei e ao longo dos 11 meses em que estive trabalhando a seu lado. Sua atenção e dedicação fizeram possível a execução deste trabalho e meu amadurecimento tanto no âmbito profissional quanto pessoal.

Aos Professores Dr. José Antônio Peters e Dr. Antonio Costa de Oliveira pela coorientação e sugestões que, certamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

Ao Professor Luciano Carlos da Maia pela incansável e Indispensável colaboração durante toda execução deste projeto.

Ao pesquisador Sidnei Deuner, por todo o apoio, dedicação e colaboração nas análises no Laboratório de Metabolismo Vegetal.

Ao Dr. Ariano Martins de Magalhães Junior pela concessão das sementes de arroz.

Ao Professor Dr. Ricardo Cardellino pela amizade ao longo de tantos anos e pelas sugestões enriquecedoras.

A todos os professores do Curso de Fisiologia Vegetal pelos conhecimentos transmitidos. Aos funcionários do Departamento de Botânica.

As eternas amigas Monalize Mota e Simone Pohl, amigas indispensáveis. Mesmo que a vida tenha nos conduzidos por caminhos diferentes, sempre pude contar com a amizade de vocês.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas (LCTP), em especial Alírcia Moraes Kleinowski, Isabel Rodrigues Brandão, Daiane de Pinho Benemann, Luis Willian Pacheco Arge e Anderson Milech Einhardt, pelas conversas, rodas de chimarrão e por fazerem do laboratório um ambiente agradável

Agradeço a uma colega e amiga em especial, Márcia Vaz Ribeiro, que compartilhou comigo inúmeros momentos durante a execução deste trabalho e com a qual aprendi muitas coisas em nossas longas conversas filosóficas.

Aos meus amados pais Daniel e Nara, pelos exemplos de vida e dedicação, pelas palavras de incentivo e carinho, pela confiança, pelo amor e por, mesmo na distância, nunca terem estado ausentes.

Á minha amada filha Milena, minha fonte inspiradora, pelo seu amor, carinho, alegria constante e compreensão pelos momentos de ausência.

Á minha adorada avó Angelita por ter estado ao meu lado sempre, mas em especial desde 2006, quando aceitou enfrentar ao meu lado os desafios para que a realização deste e outros sonhos fossem possíveis.

Ás minhas queridas irmãs Natália e Mariana, pela enorme e sincera amizade, companhia, palavras de apoio e carinho mesmo estando longe fisicamente.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

BENITEZ, Letícia Carvalho. **Fisiologia do estresse salino em arroz: Caracterização da resposta bioquímica e molecular.** 2012. 111f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

Nos sistemas agrícolas, a produção é severamente influenciada por condições ambientais adversas, dentre as quais se destaca a salinidade. O objetivo deste estudo foi avaliar respostas morfológicas, bioquímicas e moleculares desencadeadas pela salinidade em plantas de arroz. Para atingir este objetivo foram realizados quatro experimentos. No primeiro trabalho foi feita a caracterização morfológica, para a tolerância à salinidade, e os resultados submetidos à análises multivariadas. No segundo experimento, foram quantificados os teores de prolina, pigmentos fotossintéticos, proteínas totais,  $H_2O_2$ , MDA e a atividade de enzimas antioxidantes. A análise da expressão gênica diferencial de quatro genes envolvidos na desintoxicação/defesa celular e de transdução de sinais, que compõem o terceiro experimento, foi avaliada em genótipos com tolerância contrastante ao sal. No último estudo, foram realizados alinhamentos entre a sequência de genes responsivos ao sal e elementos de transposição (TEs) para verificar a distribuição de tais elementos na região gênica, *downstream* e *upstream* destes genes e compará-la com os demais genes do genoma. A partir dos resultados da anotação de TEs foi realizada a análise de distância genética entre 30 genótipos. Dentre os principais resultados obtidos, os métodos agrupamento de Tocher e dispersão gráfica das variáveis canônicas separaram os genótipos em seis grupos distintos. Sob estresse salino, as plantas de arroz, cultivar BRS Ligeirinho, mantiveram a síntese de pigmentos e proteínas totais. Também foi observado aumento na síntese de prolina,  $H_2O_2$  e MDA,

além de queda na atividade das enzimas antioxidantes. Nas análises de expressão diferencial foi observado aumento na expressão do gene *SalT-Os01g034890* na cultivar sensível à salinidade. Comprovou-se, também, que existem mais cópias de TEs associadas a genes responsivos ao sal e que o sistema de marcadores utilizado permitiu agrupar os 30 genótipos em cinco grupos. Os resultados obtidos permitem concluir que, sob estresse salino, as plantas de arroz apresentam respostas diferenciais a nível morfológico, bioquímico e molecular, sendo estas respostas dependentes do tempo, intensidade do estresse e composição genética das cultivares.

**Palavras-chave:** *Oryza sativa* L. Salinidade. Análise multivariada. Enzimas antioxidantes. Pigmentos fotossintéticos. Prolina. Expressão diferencial. Elementos de transposição

## ABSTRACT

BENITEZ, Leticia Carvalho. **Physiology of salt stress in rice: characterization of biochemical and molecular response**. 2012. 111f. Thesis (PhD) – Graduation Program in Vegetal Physiology at Federal University of Pelotas

In agricultural systems, production is hardly influenced by adverse environmental conditions, including salinity. The objective of this study was to evaluate responses morphological, biochemical and molecular triggered by salinity in rice plants. To achieve this goal four experiments were conducted. In the first study was carried a morphological characterization for salinity tolerance, and the results were analyzed with multivariate analyzes. In the second experiment, we quantified the levels of proline, photosynthetic pigments, protein, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA and antioxidant enzymes. The differential expression of four genes involved in detoxification/cellular defense and signal transduction, was evaluated in the third experiment, using genotypes with contrast to salt tolerance. In the latter study, we performed alignments between the sequence of salt responsive genes and transposable elements (TEs) to investigate the distribution of TEs in the transcript, downstream and upstream region of these genes and compare it with all genes from genome. The results of annotating TEs analysis was performed genetic distance among 30 genotypes. Among the main results obtained, the methods Tocher grouping and graphic dispersion of the canonical variables separated the genotypes into six distinct groups. Under salt stress, rice plants, BRS Ligeirinho, maintained the synthesis of pigments and proteins. We also observed increased synthesis of proline, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA, and decrease in antioxidant enzyme activity. In the analysis of differential expression was observed an increased expression of *Os01g034890-Salt* in salt sensitive cultivar. We found more copies of TEs associated with the salt responsive genes and the

molecular marker system used allowed the separation of 30 genotypes in five groups. The results indicate that under salt stress, rice plants have differential responses at morphological, biochemical and molecular. These responses were dependent of time and intensity of stress and genetic background of cultivars.

Key words: *Oryza sativa* L. Salinity. Multivariate analysis. Antioxidant enzymes. Photosynthetic pigments. Proline. Differential expression. Transposable elements

## SUMÁRIO

1. Introdução geral .....	14
2. Referências bibliográficas .....	18
 <b>Artigo 1- Análise Multivariada da divergência genética de genótipos de arroz sob estresse salino durante a fase vegetativa</b>	
Revista Ciência Agronômica (ISSN 1806-6690)	
 Resumo .....	 21
Abstract .....	21
Introdução .....	22
Material e Métodos .....	22
Resultados e Discussão .....	23
Conclusões.....	27
Referências bibliográficas.....	27
 <b>Artigo 2 – Alterações bioquímicas e no mecanismo antioxidante de plantas de arroz sob estresse salino</b>	
Acta Physiologiae Plantarum (ISSN 0137-5881)	
 Resumo .....	 29

Introdução .....	30
Material e Métodos .....	32
Resultados.....	34
Discussão.....	39
Conclusões.....	44
Referências Bibliográficas.....	44

Artigo 3 – **Expressão de genes de defesa celular e transdução de sinais em arroz sob estresse salino**

Pesquisa Agropecuária Brasileira (ISSN 1678-3921)

Resumo.....	49
Abstract.....	50
Introdução.....	51
Material e métodos.....	54
Resultados.....	57
Discussão.....	57
Conclusão .....	63
Referências Bibliográficas .....	63

Artigo 4 – **Distância genética entre genótipos de *Oryza Sativa* L. baseada em genes responsivos ao sal associados a elementos de transposição**

Genetics and Molecular Biology (ISSN 1415-4757)

Resumo.....	74
Introdução.....	75
Material e métodos.....	78
Resultados.....	83
Discussão.....	100
Conclusão .....	104
Referências Bibliográficas .....	104

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a agricultura tem grandes e novos desafios, que serão cada vez maiores no decorrer dos próximos anos. Isso se deve ao fato de que a população mundial continuará crescendo até aproximadamente 2050, ano em que, segundo previsões da ONU, se estabilizará, atingindo o impressionante número de 9,3 bilhões de pessoas. Desta forma, os desafios a serem superados nas próximas décadas, em razão do crescimento populacional, são vários e fortemente debatidos. Um destes desafios será a produção de alimentos para atender à demanda populacional. Para tanto, além de dedicação, será necessário muito conhecimento científico que contribua para solucionar o principal desafio da humanidade: a segurança alimentar.

O Brasil figura entre os dez países onde mais se produz arroz, sendo China e Índia os maiores produtores. Responsável por 2% da produção mundial, o Brasil ocupa a oitava posição e destaca-se por ser o único país não asiático entre os maiores produtores (FAO, 2009). A região Sul do país é responsável por 72,54% da produção nacional de arroz e, o Estado do Rio Grande do Sul contribui com 63,95%

desta produção (CONAB, 2011). Diante destes dados, pesquisas científicas com este cereal são justificadas tanto pelo impacto social quanto econômico da cultura.

A produtividade é o objetivo principal dos programas de melhoramento de plantas, entretanto, caracteres como qualidade industrial e tolerância/ resistência a estresses bióticos e abióticos são fundamentais para o ganho genético na espécie. As plantas, sob condições naturais, estão expostas a vários estresses ambientais que afetam seu metabolismo desencadeando mudanças bioquímicas, celulares e fisiológicas com a finalidade de evitá-los ou tolerá-los. Seca, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes e radiação são alguns dos fatores de estresse mais importantes que limitam a produtividade das culturas. Dentre os fatores abióticos, a salinidade dos solos tem se constituído em um dos mais sérios problemas para a agricultura irrigada em diversas partes do mundo. Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2008), aproximadamente 20% das terras cultivadas no mundo vêm enfrentando problemas de salinização, enquanto no Brasil, a área afetada pela salinidade corresponde a 2% da área total. No Estado do Rio Grande do Sul, maior produtor de arroz no Brasil, aproximadamente 25% dos solos apresentam teores de salinidade limitantes ao cultivo de arroz irrigado.

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

A tolerância do arroz à salinidade varia conforme o estágio de desenvolvimento da cultura, sendo os períodos de plântula e reprodutivo os mais críticos à salinidade da água de irrigação, enquanto que o maior nível de tolerância se dá durante a germinação, período em que o nível crítico de algumas variedades pode chegar a até  $24 \text{ dS m}^{-1}$  (DJARAGUIRAM et al., 2003). Quando em níveis acima do tolerável, a salinidade ocasiona diminuição do perfilhamento e aumento da esterilidade das espiguetas. Vários estudos, com diferentes genótipos e em diferentes ambientes e locais, demonstram uma relação linear entre o aumento nos níveis de salinidade e a diminuição do número de perfilhos, além do aumento do número de perfilhos não produtivos (CASTILHO et al., 2007). Outras consequências do estresse por sal são: alteração na disponibilidade hídrica, desequilíbrio iônico, distúrbios na integridade das membranas, alterações nos níveis de reguladores de crescimento, bem como alterações nas atividades metabólicas, incluindo a fotossíntese e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ZHU 2001; PANDA; KHAN 2009). Em plantas cultivadas sob estresse salino, também são observadas, mudanças na concentração de carboidratos solúveis totais, fenóis totais, glicinabeitaína, prolina, clorofila e proteínas

O controle genético da tolerância à salinidade é quantitativo, envolvendo uma rede gênica de vários locos distribuídos em diferentes regiões do genoma do arroz, os quais, uma vez ativados, podem mitigar o efeito do estresse, levando a um ajustamento celular e tolerância da planta. Em estudos com arroz, muitos grupos de pesquisa têm utilizado estratégias que possibilitam identificar um grande número de genes expressos em resposta a diferentes condições de tratamento e/ou condições de estresse, os quais estão depositados em bancos de dados públicos. Entretanto, os resultados obtidos por sequenciamento e/ou microarranjos são bastante amplos,

sendo necessário que, dentro destes experimentos, alguns genes sejam selecionados como “candidatos”, os quais devem ser validados em análises mais pontuais para quantificar sua expressão em resposta ao estresse.

Uma das grandes descobertas na área da genômica estrutural de plantas é que o genoma dos vegetais é composto também por elementos transponíveis (TEs) (FESCHOTTE et al., 2002) e que, em algumas espécies, como o trigo, estes constituem mais de 70% do genoma nuclear (DEVOS et al., 2005). Em arroz, já foram encontradas a maioria das formas de TEs identificadas em plantas, como os retrotransposon LTR (HIROCHIKA et al., 1996), LINE (KOMATSU et al., 2003) e SINE (TSUCHIMOTO et al., 2008), transposons do tipo *dTOK* (MONN et al., 2006), *nDART* (TSUGANE et al., 2006), *mPing/Pong* (JIANG et al., 2003), CACTA (KANG;KANG, 2008) e hAT (MORENO et al., 2005), além de *Tourist* e *Stowaway*, caracterizados por terem um tamanho menor e elevado número de cópias (OKI et al., 2008). Apesar da contribuição considerável dos TEs para a estrutura do genoma, o seu papel na expressão de genes adjacentes não está totalmente compreendido, porém, são apontados como possíveis elementos controladores do silenciamento ou ativação de genes vizinhos (Kashkush et al., 2003).

Diante da importância social e econômica da cultura do arroz a nível mundial e para o Brasil, e sabendo-se que, muitas vezes as safras da cultura são prejudicadas pelo excesso de sal existente no solo e na água de irrigação, bem como pela falta de genótipos tolerantes a esta condição ambiental, o objetivo deste trabalho foi estudar respostas morfológicas, bioquímicas e moleculares desencadeadas pelo estresse salino, buscando informações que possam ser utilizadas no auxílio à programas de melhoramento genético para a tolerância à salinidade.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARMONA, F.C. **Salinidade da água e do solo e sua influência sobre o arroz irrigado**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

CASTILHO, E.G.; TUONG, T.P.; ISMAIL, A.M.; INUBUSHI, K. Response to salinity rice: comparative effects of osmotic and ionic stresses. **Plant Production Science**. V. 10, p. 159-170, 2007.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/>. Acesso em: 17 jan. 2011

DEVOS, K.M.; MA, J.; PONTAROLI, A.C.; PRATT, L.H.; BENNETZEN, J.L. Analysis and mapping of randomly chosen bacterial artificial chromosome clones from hexaploid bread wheat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, p.19243–19248, 2005.

DJANAGUIRAMAN, M.; RAMADASS, R.; DEVI, D.D. Effect of salt stress on germination and seedling growth in rice genotypes. **The Madras Agricultural Journal**. v. 9, p. 50-53, 2003.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008) Extent and Causes Salt-affected Soils in Participating Countries – Land and Plant nutrition management service Disponível em <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.htm#top>. Acesso em 17 de janeiro de 2012

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database, 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/011/ai473e/ai473e04.htm>. Acesso em: 17 jan. 2011.

FESCHOTTE, C.; JIANG, N.; WESSLER, S.R. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.329–341, 2002.

HIROCHIKA, H.; SUGIMOTO, K.; OTSUKI, Y.; TSUGAWA, H.; KANDA, M. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, p.7783–7788, 1996.

KANG, H.W.; KANG, K.K. Genomic characterization of *Oryza* species-specific CACTA-like transposon. **Molecular Breeding**, v.21, p.283-292, 2008.

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A.A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. **Nature genomics**. v. 33, p. 102-106, 2003.

KOMATSU, M.; SHIMAMOTO, K.; KYOZUKA, J. Two-step regulation and continuous retrotransposition of the rice LINE type retrotransposon Karma. **Plant Cell**, v.15, p.1934–1944, 2003.

JIANG, N.; BAO, Z.; ZHANG, X.; HIROCHIKA, H.; EDDY, S.R.; MCCOUCH, S.R.; WESSLER, S.R. An active DNA transposon family in rice. **Nature**, v.421, p.163–167, 2003.

MOON, S.; JUNG, K.H.; LEE, D.E.; JIANG, W.Z.; KOH, H.J.; HEU, M.H.; LEE, D.S.; SUH, H.S.; AN, G. Identification of active transposon dTok, a member of the hAT family, in rice. **Plant Cell Physiology**, v.47, p.1473–1483, 2006.

MORENO-VÁZQUEZ, S.; NING, J.; MEYERS, B.C. hATpin, a family of MITE-like hAT mobile elements conserved in diverse plant species that forms highly stable secondary structures. **Plant Molecular Biology**, v.58, p.869-886, 2005.

OKI, N.; YANO, K.; OKUMOTO Y.; TSUKIYAMA, T.; TERAISHI, M.; TANISAKA, T. A genome-wide view of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in

rice, *Oryza sativa* ssp. *Japonica*. **Genes & Genetics Systems**, v.83, p.321-329, 2008.

PANDA, S.K.; KHAN, M.H Growth, Oxidative Damage and Antioxidant Responses in Greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term Salinity Stress and its Recovery. **Journal Agronomy Crop Science**, v. 195, p. 442-454, 2009.

TSUCHIMOTO, S.; HIRAO, Y.; OHTSUBO, E.; OHTSUBO, H. New SINE families from rice, OsSN, with ploy(A) at the 3' ends. **Genes & Genetics Systems**, v. 83, p.227-236, 2008.

TSUGANE, K.; MAEKAWA, M.; TAKAGI, K.; TAKAHARA, H.; QIAN, Q.; EUN, C.H.; IIDA, S. An active DNA transposon nDart causing leaf variegation and mutable dwarfism and its related elements in rice. **The Plant Journal**, v.45, p.46–57, 2006.

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

## Análise multivariada da divergência genética de genótipos de arroz sob estresse salino durante a fase vegetativa<sup>1</sup>

### Multivariate analysis of genetic divergence of genotypes of rice under salt stress during the vegetative phase

Letícia Carvalho Benitez<sup>2\*</sup>, Isabel Corrêa da Silva Rodrigues<sup>2</sup>, Luis Willian Pacheco Arge<sup>2</sup>, Márcia Vaz Ribeiro<sup>2</sup> e Eugenia Jacira Bolacel Braga<sup>3</sup>

**Resumo** - A salinidade, dos solos e da água de irrigação, constitui fator limitante para o cultivo do arroz, principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento e no período de floração. A utilização de fontes de água de má qualidade para irrigação resulta no acúmulo de sais no solo, causando toxicidade importante na cultura. Uma solução para o problema seria a introdução de variedades com tolerância à salinidade elevada. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a divergência genética entre genótipos de arroz visando à seleção de genótipos tolerantes à salinidade durante a fase vegetativa. Sementes de 10 genótipos de arroz foram cultivadas *in vitro*, em meio MS acrescido de 0 e 136 mM de NaCl. Após 21 dias, foram avaliados seis caracteres morfológicos e os resultados submetidos a análises multivariadas. Os métodos de otimização de Tocher, baseado na distância de Mahalanobis, e a dispersão gráfica das variáveis canônicas seguiram a mesma tendência de agrupamento dos genótipos, formando seis grupos distintos. A característica massa fresca da parte aérea foi a que mais contribuiu para a dissimilaridade genética entre os genótipos, pelo método de Singh, enquanto as duas primeiras variáveis canônicas foram suficientes para explicar 91,27% da variação observada. Nas condições experimentais testadas, os genótipos apresentaram graus distintos de tolerância à salinidade, sendo BRS Colosso, BRS Bojuru e BR IRGA 410, pertencentes aos grupos três e quatro, os que se mostraram mais tolerantes ao estresse salino e o genótipo Moti, pertencente ao grupo dois, o que se mostrou mais sensível.

**Palavras-chave** - Variáveis canônicas. Métodos de agrupamento. *Oryza sativa* L. Salinidade.

**Abstract** - Soil salinity is a limiting factor for rice cultivation, especially in the early stages of development and the flowering period. The use of sources of poor quality water for irrigation results in the accumulation of salts in the soil, causing major toxicity in culture. A solution to the problem would be the introduction of varieties with tolerance to high salinity. Thus the aim of this work is to evaluate genetic divergence among rice genotypes, aiming at the selection of genotypes tolerant to salinity during the vegetative phase. Seeds of 10 rice genotypes were grown *in vitro* on MS medium supplemented with 0 and 136 mM NaCl. After 21 days, six morphological characters were evaluated and the results subjected to multivariate analysis. The methods of Tocher, based on Mahalanobis distance, and graphic dispersion of canonic variables followed the same pattern of clustering structure, forming six groups. The characteristic of shoot fresh weight was the largest contributor to the genetic dissimilarity between genotypes by the method of Singh, while the other two canonic variables were sufficient to account for 91.27% of observed variation. Under the experimental conditions tested, the genotypes showed different degrees of salinity tolerance, while Colossus BRS, BRS Bojuru and BR IRGA 410, belonging to the groups three and four, were those who were more tolerant genotype and Moti, belonging to two what was more sensitive to salt stress.

**Key words** - Canonical variables. Cluster analysis. *Oryza sativa* L. Salinity.

\* Autor para correspondência

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 31/08/2010; aprovado em 31/01/2011

Trabalho submetido e selecionado no primeiro Simpósio Brasileiro de Salinidade realizado de 12-15/10/2010 em Fortaleza, Ceará, Brasil; Pesquisa desenvolvida junto a Universidade Federal de Pelotas; tema de Tese financiada pela CAPES

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354, Pelotas-RS, Brasil, 96.010-900, [lecbenitez@gmail.com](mailto:lecbenitez@gmail.com)

<sup>3</sup>Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354, Pelotas-RS, Brasil, 96.010-900,

## Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma planta da família Poaceae, monocotiledônea da ordem Poales, cuja duração do ciclo da planta, de semente a semente, varia de 80 a 280 dias, dependendo da variedade (MARCONDES; GARCIA, 2009). Este cereal apresenta considerável valor econômico, sendo a principal fonte de alimentação para dois terços da população mundial, com grande influência no desenvolvimento sócio-econômico. Os maiores produtores mundiais de arroz são China, Índia e Indonésia. No Brasil, os maiores produtores nacionais são o Rio Grande do Sul e Santa Catarina, os quais produziram 69,8% da safra do cereal no País em 2008 (CONAB, 2008).

No Rio Grande do Sul, o principal sistema de irrigação da cultura do arroz é por inundação, podendo conduzir, com o tempo, à salinização dos solos que possuem drenagem inadequada, impedindo a remoção do sal por lixiviação (MACEDO et al., 2010).

A salinidade dos solos e da água de irrigação é considerada um dos principais fatores abióticos responsável pelo estresse nas plantas, causando danos no metabolismo vegetal, reduzindo a produtividade agrícola e provocando efeitos deletérios em muitos processos fisiológicos (MUNNS, 2002).

O excesso de sais pode alterar tanto as funções fisiológicas quanto bioquímicas das plantas, causando estresse osmótico, o que resulta em distúrbios das relações hídricas, alterações na absorção e utilização de nutrientes essenciais, além do acúmulo de íons tóxicos (AMORIN et al., 2010).

No Brasil, cerca de quatro milhões de hectares de terras são afetadas por sais, as quais proporcionam baixa produtividade (SZABOLCS, 1989). No Rio Grande do Sul, a ocorrência de solos salinos se restringe às áreas de influência de sedimentos marinhos e/ou de contato com águas salinas, sendo mais frequentes em áreas planas e na Planície Costeira, além da região da Laguna dos Patos, Taim, Mangueira e Bojuru, situadas na região Sul do Estado (BISSANI et al., 2008). Esta situação faz com que o uso de genótipos tolerantes à salinidade seja fator importante à viabilidade de produção de alimentos.

Na busca por cultivares superiores, a utilização da variabilidade genética nos cruzamentos de grupos geneticamente divergentes representa uma importante estratégia para obter ganhos de seleção. A importância da diversidade genética para o melhoramento reside no fato de fornecer parâmetros para a identificação de genótipos superiores, uma vez que a escolha de genitores para formação de populações segregantes é uma das principais decisões que o melhorista precisa tomar (BERTAN et al., 2006).

Neste contexto, a utilização de técnicas multivariadas é uma opção viável para esta finalidade, uma vez que permite múltiplas combinações de informações dentro da unidade experimental (MOREIRA et al., 2009). Vários métodos multivariados podem ser usados na predição da diversidade genética. Entre essas técnicas, as mais empregadas são: a análise por componentes principais, a análise por variáveis canônicas e os métodos de agrupamento, cuja aplicação depende da utilização de uma medida de dissimilaridade previamente estimada (OLIVEIRA et al., 2003). A escolha baseia-se na precisão desejada pelo pesquisador, bem como na facilidade da análise e na forma como os dados foram obtidos (BEZERRA NETO et al., 2010).

Vários trabalhos que avaliam a diversidade e a divergência genética utilizando-se caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares foram realizados nos últimos anos (BERTINI et al., 2010). Por exemplo, Sudré et al. (2006) avaliaram a divergência genética entre acessos de *Capsicum* spp. e verificaram a eficiência da utilização de variáveis multicategóricas na discriminação de genótipos. Coimbra et al. (2010), trabalhando com análises multivariadas, realizaram a caracterização e divergência genética de populações de milho do Sudeste de Minas Gerais e, Bertini et al. (2010) estudaram a divergência genética entre genótipos de coentro.

Diante da importância econômica que a cultura do arroz assume em âmbito regional e nacional, a avaliação da diversidade genética de populações, para o caráter tolerância à salinidade, permitirá o conhecimento das melhores combinações híbridas, viabilizando a obtenção de genótipos superiores nas gerações segregantes. Neste trabalho objetivou-se avaliar a divergência genética, quanto à tolerância ao sal, entre genótipos de arroz, através de técnicas multivariadas.

## Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos pertencente ao Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), localizado no município de Pelotas-RS.

Foram utilizados 10 genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sendo cinco pertencentes ao grupo indica (BR IRGA416, BR IRGA 418, BR IRGA 417, BR IRGA 410, BR IRGA 409) e cinco, ao grupo japônica (BRS Colosso, Moti, Oro, BRS Bojuru e Talento).

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram colocadas para germinar em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG,

1962), com metade da concentração das fontes de sais, suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e solidificado com a adição de 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. As plântulas permaneceram em sala de crescimento durante 21 dias, com um fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de 25  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Os tratamentos foram constituídos por duas concentrações de NaCl acrescidos ao meio de cultura. As concentrações utilizadas foram 0 (testemunha) e 136 mM (8 g L<sup>-1</sup>) de NaCl. Após o preparo de cada meio o pH destes foi ajustado para 5,8. Em seguida, os meios foram distribuídos nos tubos de ensaio, os quais foram fechados com algodão e alumínio e autoclavados a 121 °C, durante 20 minutos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo cada uma delas representada por cinco tubos, contendo uma semente cada. Após 21 dias, as plântulas foram avaliadas quanto às características morfológicas: altura da parte aérea (cm), número de folhas, comprimento da raiz (cm), número de raízes e massa fresca da parte aérea e do sistema radicular

(g). Para esses caracteres foram realizados cálculos percentuais de desempenho relativo (aumento ou redução), considerando-se 100% o valor absoluto do tratamento controle (0 mM de NaCl), com a finalidade de observar o comportamento diferencial dos genótipos frente ao estresse.

As medidas de dissimilaridade foram determinadas segundo o modelo de análise multivariada, permitindo a obtenção das matrizes de dissimilaridade, de covariância residual e das médias

dos genótipos. Posteriormente, foram determinadas as variáveis canônicas, conforme relatado por Rao (1952), com o propósito de identificar genótipos similares em gráfico de dispersão bi ou tridimensional. Foi aplicado o método de agrupamento de otimização de Tocher (CRUZ; CARNEIRO, 2003), utilizando a distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ) como medida de dissimilaridade. Utilizou-se, também, o critério de Singh (1981) para quantificar a contribuição relativa dessas características para a divergência genética. As análises foram realizadas utilizando o programa computacional Genes, versão 2007 (CRUZ, 2007).

## Resultados e discussão

As medidas de dissimilaridade genética (TAB. 1), estimadas a partir da distância de Mahalanobis ( $D^2$ ), apresentaram uma magnitude de 3,90 a 351,90, indicando a presença de ampla variabilidade genética para tolerância à salinidade entre os genótipos estudados.

A combinação entre BRS Colosso e Moti foi a mais divergente ( $D^2 = 351,90$ ), seguida pela combinação entre BRS Colosso e Talento ( $D^2 = 309,84$ ), enquanto a menor distância foi obtida entre os genótipos BR IRGA 418 e Oro ( $D^2 = 3,90$ ), seguida pelo par Moti e Talento ( $D^2 = 16,42$ ). É interessante salientar que entre as maiores distâncias encontradas, o genótipo Moti esteve presente em praticamente todas as combinações, mostrando-se um genótipo bastante divergente dos demais.

Tabela 1 - Matriz de dissimilaridade com base na distância de Mahalanobis ( $D^2$ ) entre 10 genótipos de arroz, submetidos à concentração de 136 mM NaCl

*Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0									
2	42,13	0								
3	351,90	167,37	0							
4	77,02	20,85	114,70	0						
5	165,29	49,94	37,11	26,81	0					
6	18,31	35,08	318,16	72,89	138,86	0				
7	86,91	34,18	111,18	3,90	29,41	84,98	0			
8	38,16	23,65	241,83	52,19	98,13	41,62	71,08	0		
9	42,53	19,55	202,81	27,27	67,86	19,08	36,95	30,63	0	
10	309,84	141,15	16,42	89,98	26,96	261,09	92,08	192,58	149,87	0

\*(1) BRS Colosso, (2) BR IRGA 416, (3) Moti, (4) BR IRGA 418, (5) BR IRGA 417, (6) BR IRGA 410, (7) Oro, (8) BR IRGA 409, (9) BRS Bojuru, (10) BRS Talento

A técnica multivariada de quantificação da distância de Mahalanobis ( $D^2$ ) permite quantificar a importância relativa de caracteres para a diversidade genética por meio da avaliação da contribuição destes para os valores de  $D^2$ . Neste experimento, ao verificar a contribuição relativa de cada variável no tocante a dissimilaridade genética, foi identificada variabilidade entre os caracteres analisados.

O parâmetro morfológico que apresentou a maior variação, por conseguinte, aquele que apresentou maior contribuição para a divergência entre os genótipos foi massa fresca da parte aérea, o qual contribuiu com 50,8% para divergência total, enquanto que a variável massa fresca do sistema radicular e número de raízes contribuíram juntas com 32,3% (TAB. 2). Estes resultados reforçam os obtidos por Benitez et al. (2010), os quais, ao investigar a contribuição relativa de cada variável para a dissimilaridade genética entre genótipos de arroz cultivados *in vitro*, observaram que as variáveis massa fresca da parte aérea e de raiz foram os caracteres morfológicos que mais contribuíram para a divergência entre os genótipos.

Assim, entre as características estudadas, estas são as mais eficientes para explicar a dissimilaridade entre os genótipos, devendo ser priorizadas em estudos de dissimilaridade cujo objetivo seja verificar a tolerância de genótipos de arroz submetidos à salinidade em cultivo *in vitro*.

Tabela 2 - Contribuição relativa dos caracteres morfológicos para a dissimilaridade genética de 10 genótipos de arroz cultivados *in vitro*, em meio MS acrescido de 136 mM NaCl, pelo método proposto por SINGH (1981), em ordem crescente de importância

Caracteres Morfológicos	Sj <sup>1</sup>	Contribuição Relativa (%)
Massa fresca da parte aérea (g)	2175,141809	50,8112
Massa fresca do sistema radicular (g)	692,92746	16,1868
Número de raiz	690,206907	16,1232
Comprimento da raiz principal (cm)	336,401794	7,8583
Número de folhas	230,182139	5,377
Altura (cm)	155,968502	3,6434

<sup>1</sup>Sj: contribuição da variável x para o valor da distância de Mahalanobis entre os cultivares *i* e *i'*

A análise de agrupamento pelo método de Tocher, baseada na matriz de Mahalanobis, separou os 10 genótipos em seis grupos distintos (TAB. 3). A formação desses grupos representa uma valiosa informação na escolha de genitores dentro de um programa de melhoramento, pois, segundo Bertan et al. (2006), as novas combinações híbridas a serem estabelecidas devem ser embasadas na magnitude de suas dissimilaridades.

Tabela 3 - Agrupamento baseado em caracteres morfológicos, pelo método de Tocher, de 10 genótipos de arroz cultivados *in vitro*, durante 21 dias, em meio MS, acrescido de 136 mM de NaCl

Grupos	Genótipos
1	BR IRGA 418; Oro
2	Moti; BRS Talento
3	BRS Colosso; BR IRGA 410
4	BR IRGA 416, BRS Bojuru
5	BR IRGA 409
6	BR IRGA 417

O grupo 1 abrangeu 2 genótipos, BR IRGA 418 e Oro, os quais apresentaram a menor dissimilaridade encontrada na matriz de Mahalanobis,  $D^2 = 3,90$ . Estes genótipos apresentaram comportamento semelhante para as variáveis massa fresca da parte aérea e do sistema radicular. Para a primeira variável foram observadas reduções de 38% e 41%, para BR IRGA 418 e Oro, respectivamente. No que diz respeito à massa fresca do sistema radicular, BR IRGA 418 apresentou redução de 46%, enquanto Oro apresentou a segunda maior percentagem de redução, 54%, ficando atrás somente de Moti, com 59% (TAB. 4).

Os genótipos Moti e BRS Talento formaram o segundo grupo e apresentaram dissimilaridade média de  $D^2 = 16,42$ . Ambos pertencem ao grupo japônica e apresentaram comportamento semelhante para os caracteres número de raízes, massa fresca da parte aérea e do sistema radicular, sendo observados, no genótipo Moti, os maiores valores percentuais de redução para a maioria das variáveis.

O percentual de desempenho relativo observado nos genótipos IRGA 418, Oro e Moti, pertencentes aos grupos 1 e 2, indicam sensibilidade destes genótipos ao estresse salino e que os possíveis cruzamentos com essas cultivares diminuem a possibilidade de obtenção de genótipos superiores.

Tabela 4 - Percentual de desempenho relativo de 10 genótipos de arroz cultivados *in vitro*, durante 21 dias, em meio MS, acrescido de 136 mM de NaCl quando comparados ao tratamento-controle (0 mM)

Genótipos**	Desempenho Relativo (%)											
	----Altura----		---Nº Folhas---		--Comp. Raiz--		----Nº Raiz----		----MFPA----		----MFSR----	
	0*	136	0*	136	0*	136	0*	136	0*	136	0*	136
1	7,80	-13	3,33	-5	4,51	+43	4,33	-13	0,109	-21	0,051	-38
2	7,10	-39	5,40	-24	5,28	+29	5,67	-46	0,106	-31	0,049	-32
3	7,81	-34	4,56	-25	8,20	+20	5,78	-73	0,129	-53	0,061	-59
4	10,23	-31	4,56	-24	5,03	+18	8,06	-17	0,105	-38	0,048	-46
5	8,96	-30	4,67	-15	5,19	+15	10,50	-51	0,087	-44	0,046	-46
6	7,32	-13	4,22	+3	6,48	+9	4,72	-15	0,093	-29	0,041	-18
7	10,66	-12	4,22	-18	6,53	+32	5,11	-8	0,150	-41	0,109	-54
8	8,33	-49	3,33	+15	5,70	-1	5,17	-41	0,097	-22	0,051	-43
9	9,86	-16	3,89	-11	7,14	-6	5,22	-14	0,084	-33	0,063	-27
10	8,14	-42	3,44	-12	6,79	-21	5,78	-53	0,085	-52	0,047	-56

\*Valor absoluto encontrado no tratamento controle. (+) Aumento e (-) redução relativa, tomando como referencial o valor absoluto do tratamento-controle (100%). \*\*BRS Colosso (1), BR IRGA 416 (2), Moti (3), BR IRGA 418 (4), BR IRGA 417 (5), BR IRGA 410 (6), Oro (7), BR IRGA 409 (8), BRS Bojuru (9), BRS Talento (10)

De acordo com Cruz e Regazzi (2004), deve-se evitar a escolha de indivíduos de mesmo padrão de dissimilaridade nos cruzamentos, de modo a não restringir a variabilidade genética e, assim, evitar reflexos negativos nos ganhos a serem obtidos pela seleção. Desta forma, o cruzamento entre os genótipos Moti e Talento seria o menos indicado para obtenção de genótipos tolerantes à salinidade, pois sabe-se que, as melhores combinações híbridas a serem testadas em um programa de melhoramento devem envolver parentais tanto divergentes como de elevada performance média.

No grupo três foram inseridos os genótipos BRS Colosso e BR IRGA 410 que apresentam dissimilaridade média de  $D^2 = 18,31$ . Nestes genótipos são observadas algumas das melhores repostas para o desempenho relativo referente aos caracteres altura, (13% de redução), número de folhas, número de raízes e massa fresca da parte aérea e massa fresca do sistema radicular, indicando serem os mais tolerantes à salinidade.

De acordo com o desempenho relativo frente ao estresse, os genótipos BRS Colosso, BRS Bojuru e BR IRGA 410 apresentaram os melhores resultados, sendo, portanto, os mais tolerantes à salinidade na concentração de 136 mM e, desta forma, os mais indicados para obtenção de êxitos em cruzamentos que visem esse caráter. Por outro lado, Moti apresentou as maiores reduções para os caracteres número de raiz e massa fresca da parte aérea e do sistema radicular, mostrando-se um genótipo sensível à salinidade. Assim, seria o menos indicado para combinações híbridas, uma vez que a escolha dos

genótipos para novos cruzamentos devem ser baseadas também no seu potencial agrônômico.

No quarto grupo estão BRS Bojuru e BR IRGA 416, com dissimilaridade média de  $D^2 = 19,55$ . Os genótipos BR IRGA 417 e BR IRGA 409 ficaram em grupos separados e independentes, formando o quinto e sexto grupo, respectivamente.

Como se pode observar, o método de agrupamento de Tocher, aqui utilizado, foi eficiente em discriminar as cultivares quanto à diversidade para tolerância ao sal, de forma que a cultivar mais tolerante (BRS Colosso) e a mais sensível (Moti) foram as mais divergentes pela distância de Mahalanobis e agruparam-se separadamente, enquanto as mais similares, BR IRGA 418 e Oro, permaneceram no mesmo grupo.

A importância relativa das variáveis canônicas foi medida pela percentagem de seus autovalores (variâncias) em relação ao total dos autovalores, ou seja, é a porcentagem da variância total que elas explicam. Os valores da análise de variáveis canônicas, obtidos da matriz de correlação dos caracteres avaliados, revelaram que as duas primeiras variáveis canônicas foram suficientes para explicar 91,27% da variação observada. A primeira variável canônica absorveu 84,58% da variação obtida, tendo sido as características com maior contribuição as massas frescas da parte aérea e do sistema radicular, e as variáveis que menos contribuíram, a altura da parte aérea e comprimento de raiz. A segunda variável canônica absorveu 6,69% da variação entre os genótipos e os caracteres de maior

peso foram comprimento de raiz e número de raízes (TAB. 5).

As importâncias relativas dos caracteres morfológicos nas variáveis canônicas podem ser conferidas na Tabela 6. Quanto maior o valor, maior peso tem a característica naquela variável canônica.

Conforme Cruz et al. (2004), para uma interpretação satisfatória da variabilidade encontrada entre os genótipos é necessário que as duas primeiras variáveis canônicas permitam estimativas mínimas de 80% da variação total contida no conjunto de caracteres. Devido ao fato das duas primeiras variáveis canônicas terem explicado mais de 80% da variância total de caracteres analisados (91,27% da variância total acumulada) é possível explicar de maneira satisfatória a variabilidade manifestada entre os genótipos considerados nesta avaliação, permitindo representá-las em um gráfico de dispersão bidimensional.

A Figura 1 representa a dispersão gráfica no espaço bidimensional dos 10 genótipos em estudo, utilizando-se a primeira e a segunda variáveis canônicas.

Os grupos formados por meio da dispersão gráfica dos escores (FIG. 1) seguem a mesma tendência dos grupos

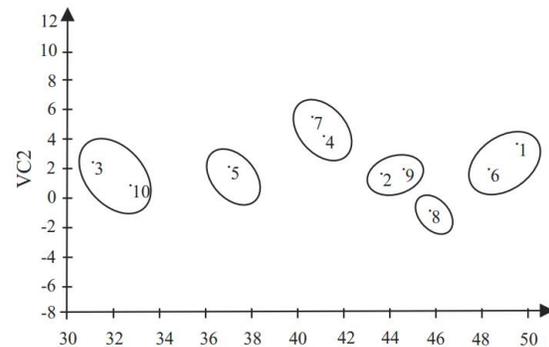


Figura 1 - Gráfico de dispersão de 10 genótipos de arroz cultivados *in vitro* em relação aos escores das duas primeiras variáveis canônicas (VC1 e VC2). BRS Colosso (1), BR IRGA 416 (2), Moti (3), BR IRGA 418 (4), BR IRGA 417 (5), BR IRGA 410 (6), Oro (7), BR IRGA 409 (8), BRS Bojuru (9), BRS Talento (10).

obtidos pelo método de otimização de Tocher (TAB. 3), fortalecendo, desta forma, os dados obtidos pela técnica de agrupamento e pela matriz de dissimilaridade.

Tabela 5 - Variâncias, variâncias percentuais e acumulada das variáveis canônicas obtidas de 10 genótipos de arroz cultivados *in vitro*, em meio MS, acrescido de 136 mM de NaCl

Variáveis Canônicas	Variância		
	Autovalores	Percentual	Percentual Acumulado
1	40,230859	84,581226	84,581226
2	3,184731	6,695567	91,276793
3	2,375844	4,994967	96,27176
4	1,388153	2,918449	99,190209
5	0,285823	0,600913	99,791121
6	0,099353	0,208879	100,0

Tabela 6 - Importância relativa dos caracteres morfológicos em cada variável canônica

Variável Canônica (VC)	Caracteres Morfológicos*					
	AP	NF	CR	NR	MFPA	MFR
VC 1	0,2823	0,6526	0,4727	0,6458	1,0375	0,7612
VC 2	0,0750	-0,2896	0,6708	0,6297	-0,2798	-0,0928
VC 3	0,5926	0,0772	-0,3971	0,0971	-0,3066	0,6144
VC 4	0,2548	0,1577	0,6491	-0,5631	-0,1659	0,6690
VC 5	0,8451	0,4074	-0,1741	-0,3539	0,1102	-0,3344
VC 6	-0,2536	0,8405	0,3106	0,2176	-0,2595	0,1084

\* AP (altura da parte aérea), NF (número de folhas), CR (comprimento de raiz), NR (número de raiz), MFPA (massa fresca da parte aérea), MFR (massa fresca de raiz)

Assim como neste trabalho, inúmeros outros, com diferentes espécies, têm comprovado que a análise da divergência genética através de procedimentos multivariados, como a distância generalizada de Mahalanobis, o método de agrupamento de otimização de Tocher e a dispersão gráfica das variáveis canônicas, concordantes entre si, é eficiente na discriminação de genótipos. Ao avaliar a divergência genética entre acessos de *Capsicum* spp., Sudré et al. (2006) confirmaram a eficiência de análises multivariadas na análise da variabilidade genética entre os diferentes acessos; Coimbra et al. (2010) realizaram a caracterização e divergência genética de populações de milho do Sudeste de Minas Gerais e Bertini et al. (2010), estudando a divergência genética entre genótipos de coentro, também obtiveram sucesso ao utilizar variáveis multicategóricas na discriminação de genótipos, bem como Campos et al. (2010) ao quantificar a divergência genética entre acessos de mandioca. Estas evidências experimentais comprovam que as análises multivariadas são eficientes para discriminar os indivíduos, geneticamente, permitindo agrupá-los de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos.

## Conclusão

Os métodos de otimização de Tocher e dispersão gráfica das variáveis canônicas são concordantes entre si, seguindo a mesma tendência de agrupamento dos genótipos. As características massa fresca da parte aérea, massa fresca de raiz e número de raízes são as que mais contribuem para dissimilaridade genética, existindo variabilidade para tolerância à salinidade entre os 10 genótipos de arroz testados. Os genótipos BRS Colosso, BRS Bojuru e BR IRGA 410 são os mais promissores para cruzamentos e obtenção de progênes superiores quanto à tolerância ao sal, enquanto o genótipo Moti é o menos indicado por apresentar sensibilidade ao excesso de sal.

## Referências

- AMORIN, A. V. et al. Respostas fisiológicas de plantas adultas de cajueiro anão precoce à salinidade. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 01, p. 113-121, 2010.
- BISSANI, C. A., GIANELO, C., CAMARGO, F. A. O., TEDESCO, M. J. Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas. 2. Ed. Porto Alegre: Editora Metrópole, 2008. 344p.
- BENITEZ, L. C. et al. Tolerância à salinidade avaliada em genótipos de arroz cultivados *in vitro*. *Revista Ceres*, v. 57, n. 03, p. 330-337, 2010.
- BERTAN, I. et al. Dissimilaridade genética entre genótipos de trigo avaliados em cultivo hidropônico sob estresse por alumínio. *Bragantia*, v. 65, n. 01, p. 55-63, 2006.
- BERTINI, C. H. M. et al. Análise multivariada e índice de seleção na identificação de genótipos superiores de feijão-caupi. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 32, n. 04, p. 613-619, 2010.
- BERTINI, C. H. M. et al. Desempenho agrônomico e divergência genética entre genótipos de coentro. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 03, p. 409-416, 2010.
- BEZERRA NETO, F. V. B. Descritores quantitativos na estimativa da divergência genética entre genótipos de mamoneira utilizando análises multivariadas. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 02, p. 294-299, 2010.
- CAMPOS, A. L. de. et al. Avaliação de acessos de mandioca do banco de germoplasma da UNEMAT Cáceres - Mato Grosso. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 04, n. 02, p. 44-54, 2010.
- COIMBRA, R. R. et al. Caracterização e divergência genética de populações de milho resgatadas do Sudeste de Minas Gerais. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 01, p. 159-166, 2010.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira: Grãos - Safra 2008/2009 - Terceiro levantamento. Brasília: Conab, 2008. 37 p. 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. 2010.
- CRUZ, C. D. Programa Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística. Versão Windows - 2007, Viçosa, UFV.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético. Viçosa: Editora UFV, 2003. 585 p.
- CRUZ, C. D., REGAZZI. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: Editora UFV, 2004. 480 p.
- MACEDO, V. R. M. et al. 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. 2010.
- MARCONDES, J., GARCIA, A. B. Aspectos citomorfológicos do estresse salino em plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.). *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 76, n. 02, p. 187-194, 2009.
- MOREIRA, R. M. P et al. Potencial agrônomico e divergência genética entre genótipos de feijão-vagem de crescimento determinado. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 30, suplemento 1, p. 1051-1060, 2009.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, v. 25, p. 239-250, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, F. J et al. Divergência genética entre cultivares de caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 38, n. 05, p. 605-611, 2003.

**RAO, R. C.** Advanced statistical methods in biometric research. New York: John Wiley & Sons, 1952. 390p.

**SINGH, D.** The relative importance of characters affecting genetic divergence. The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding, v. 36, p. 237-245, 1981.

**SUDRÉ, C. P. et al.** Variáveis multicatóricas na determinação da divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão. Horticultura Brasileira, v. 24, n. 01, p. 88-93, 2006.

**SZABOLCS, I.** Salt-affected soils. Flórida: Library of Congress, 1989. 274p.

### **Alterações bioquímicas e no mecanismo antioxidante de plantas de arroz sob estresse salino**

#### **Resumo**

Nos sistemas agrícolas, a produção pode ser severamente influenciada por condições ambientais adversas, levando a perdas na produtividade. A salinidade é um dos principais fatores ambientais limitantes ao crescimento e produtividade das culturas. O objetivo do presente estudo foi investigar possíveis alterações no metabolismo de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) quando expostas a altas concentrações salinas. Sementes da cultivar BRS Ligeirinho foram semeadas e as plantas cultivadas em casa de vegetação. A partir dos 14 dias, após a semeadura, as plantas foram irrigadas, alternadamente, com solução nutritiva e água contendo zero, 150 e 300 mM de NaCl. Após 30 dias, foram coletadas folhas e raízes para as análises do teor de prolina, pigmentos fotossintéticos, proteínas totais, peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Os resultados obtidos mostraram que os efeitos da salinidade foram mais expressivos nas folhas em relação às raízes. Houve aumento gradual no teor de prolina, proteínas, peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica com o aumento da concentração salina na água de irrigação. Os pigmentos fotossintéticos tiveram aumento em sua síntese até a concentração de 150 mM de NaCl, enquanto que as enzimas antioxidantes apresentaram queda na sua atividade. Os resultados sugerem que a prolina pode ter atuado como mecanismo de proteção contra a degradação de proteínas e os carotenoides protetores de clorofilas. Por outro lado, frente à baixa atividade das enzimas antioxidantes, a maior parte do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido foi preferencialmente direcionada à peroxidação lipídica.

**Palavras-chave:** *Oryza sativa* L., salinidade, estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica

## Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo. Servindo de alimento básico para cerca de 3 bilhões de pessoas destaca-se por seu excelente balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína necessária à dieta humana.

Nos sistemas agrícolas, a produção é severamente influenciada por condições ambientais adversas, que causam grandes perdas na produtividade. Este cenário encontra-se agravado pelo aumento na erosão e degradação dos solos, associado à crescente demanda alimentar causada pelo aumento da população mundial (Menezes-Benavente et al. 2004). Dentre os fatores ambientais, a salinidade, seca e baixa temperatura, são os maiores limitantes para a produção de arroz. Tais estresses abióticos provocam uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, que reagem com seu potencial genético, limitando seu crescimento, reprodução e produtividade (Mahajan e Tuteja 2006).

O estresse salino, causado, principalmente, pelo acúmulo de cloreto de sódio (NaCl) é um problema para a agricultura em todo o mundo, sendo mais severo nas regiões áridas e semiáridas, onde as elevadas taxas evapotranspiratórias e as baixas precipitações pluviométricas, associadas ao manejo inadequado do solo e da água, têm contribuído para o surgimento de solos salinizados (Zhu 2001). Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO 2008), aproximadamente 20% das terras cultivadas no mundo vêm enfrentando problemas de salinização, enquanto no Brasil, a área afetada pela salinidade corresponde a 2% da área total. No Estado do Rio Grande do Sul, maior produtor de arroz no Brasil, aproximadamente 25% dos solos apresenta teores de salinidade limitantes ao cultivo de arroz irrigado.

Altas concentrações de sal promovem a redução no crescimento e desenvolvimento das plantas, decorrente de seus efeitos osmóticos, tóxicos e nutricionais (Munns 2002). A salinidade altera a disponibilidade hídrica, já que os sais solúveis presentes em excesso no solo aumentam a retenção de solutos na água do solo, reduzindo, desta forma, a água disponível para a planta. O desequilíbrio iônico, causado pelo acúmulo de íons tóxicos como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e a depleção de íons como  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , também é um efeito direto da salinidade (Sumithra et al. 2006). Outras conseqüências do estresse por sal são: distúrbios na integridade das membranas, alterações nos níveis de reguladores de crescimento, bem como alterações nas atividades metabólicas, incluindo a fotossíntese e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Zhu 2001; Panda e Khan 2009). Outras alterações bioquímicas também são observadas em plantas cultivadas sob estresse salino, como por

exemplo, mudanças na concentração de carboidratos solúveis totais, fenóis totais, glicinabeitaína, prolina (Lacerda et al. 2001; Ashraf e Foolad 2007), clorofila (Netono et al. 2004) e proteínas totais (Lunde et al. 2007).

Em situações de estresse abiótico, principalmente hídrico e salino, podem ocorrer alterações nos teores de prolina nas plantas. Estas alterações variam de espécie para espécie e podem apresentar valores 100 vezes maiores em plantas estressadas (Verbruggen e Hermans 2008). Sob estresse osmótico, a prolina atua como um osmorregulador e osmoprotetor, auxiliando no equilíbrio redox dentro da célula, além de ser uma excelente fonte de carbono e nitrogênio. Tem sido proposto que a prolina pode contribuir, também, para a estabilização da estrutura de proteínas, controle das espécies reativas de oxigênio (ERO) e como sinalizador para respostas adaptativas (Maggio et al. 2002).

Em plantas superiores, os principais pigmentos fotossintéticos são as clorofilas e os carotenoides. Os carotenoides estão presentes nos cloroplastos sempre acompanhando as clorofilas e atuando no combate aos radicais livres. Dependendo da espécie em estudo, cultivar, tempo de exposição e concentração de sal existente, a salinidade pode afetar a atividade fotossintética, através da diminuição da síntese ou degradação de clorofila (Santos 2004). Além disso, o acúmulo de cloreto de sódio (NaCl) nos tecidos promove redução nos processos de síntese de ATP acoplada à fase fotoquímica da fotossíntese, além de promover alterações no processo respiratório, assimilação do nitrogênio e metabolismo de proteínas (Munns 2002).

Nos últimos anos, tem-se dado especial atenção aos danos celulares causados pelo acúmulo de ERO sob condições de estresse (Blokhina et al. 2003). Estes radicais, quando produzidos em excesso, podem ser destrutivos para a célula ao reagir com os ácidos graxos insaturados dos fosfolipídeos de membranas, alterando a sua funcionalidade e promovendo a peroxidação de lipídios. Algumas das enzimas antioxidantes envolvidas na eliminação das ERO em plantas são a Superóxido Dismutase (SOD), Ascorbato Peroxidase (APX), Glutaciona Peroxidase (GPX), Catalase (CAT), Monodesidroascorbato Redutase (MDHAR), Desidroascorbato Redutase (DHAR) e a Glutaciona Redutase (GR) (Scandalios 2005). Ao lado de outros mecanismos fisiológicos, a eficiência do sistema antioxidante aumenta a capacidade de tolerância da planta, devido à diminuição dos efeitos causados pelas ERO (Giannakoula et al. 2010).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar a resposta de plantas de arroz (*O. sativa* subespécie *indica*) expostas a altas concentrações de NaCl, tendo em vista as alterações no teor de prolina, proteínas totais, pigmentos fotossintéticos e no mecanismo antioxidante.

## **Material e Métodos**

### **Material vegetal e condições de cultivo**

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L), da cultivar BRS Ligeirinho (subespécie *indica*), foram semeadas em vasos plásticos com capacidade de 2 litros, perfurados na base para garantir a perfeita percolação da água. Como substrato, foi utilizado areia previamente lavada com água e ácido clorídrico 1%.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação com umidade relativa do ar de 70%, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e irrigação diária, alternada com água e solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1938). Aos 14 dias após a semeadura a irrigação passou a ser realizada, alternadamente, com solução nutritiva e água contendo NaCl nas concentrações de: zero, 150 e 300 mM, sendo aplicados 100 mL de solução salina em cada vaso. Após 30 dias de imposição dos tratamentos, foram coletadas folhas e raízes para as análises.

### **Delineamento experimental**

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições/tratamento para análises de pigmentos e prolina e três repetições para as demais análises. Cada repetição foi representada por 1 vaso contendo 10 plantas. Os dados foram submetidos à análise da variância, para testar as fontes de variação (tecido x concentração de NaCl) e suas possíveis interações. Foram considerados significativos os resultados onde  $P \leq 0,05$ , sendo os valores médios comparados pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as análises foi utilizado o software estatístico WinStat (Machado e Conceição 2002).

### **Quantificação do teor de prolina, pigmentos fotossintéticos, $\text{H}_2\text{O}_2$ e peroxidação lipídica**

Para a determinação do teor de prolina foi utilizada a metodologia descrita por Bates et al. (1973), com algumas modificações. Aproximadamente 1,5 g de tecido foliar foram homogeneizados em almofariz de porcelana com 10 mL de solução aquosa de ácido sulfossalicílico 3% (p/v) e, em seguida, centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos. Em tubos de ensaio, adicionou-se 1 mL do sobrenadante e 1 mL de ninhidrina ácida, os quais foram mantidos em banho-maria fervente por 60 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 4 mL de tolueno e as amostras agitadas vigorosamente. Ao atingir a temperatura ambiente, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 520 nm, sendo utilizado tolueno como branco. As absorbâncias obtidas foram comparadas com a curva padrão de prolina e os resultados expressos em  $\mu\text{mol prolina g}^{-1}$  MF (massa fresca).

Os pigmentos fotossintetizantes foram extraídos de 200 mg de folhas maceradas até homogeneização completa em acetona 80% e quantificados em espectrofotômetro, de acordo com a metodologia de Lichtenthaler (1987). Os teores de clorofila a (chl $a$ ), clorofila b (chl $b$ ), clorofila total (chl $t$ ) e carotenoides totais foram expressos em  $\mu\text{g mg}^{-1}$  MF. A partir dos valores obtidos para clorofilas a e b, calculou-se a razão clorofila a/b.

O conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi mensurado de acordo com a metodologia proposta por Sinha et al. (2005). Foram utilizados 200 mg de tecido foliar e radicular, macerados, separadamente, em solução de 0,1% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA), sendo o homogeneizado centrifugado a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, foram coletados 0,5 mL do sobrenadante, aos quais se adicionaram 0,5 mL de tampão, composto por fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1 mL de iodeto de potássio (KI) 1 M. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 390 nm e o conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi calculado comparando as leituras obtidas com a curva padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , expressos em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$  MF.

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Cerca de 200 mg de tecido vegetal (folha e raiz) foram macerados em  $\text{N}_2$  líquido acrescido de 20% de polivinilpirrolidona (PVPP) e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos. Uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionada a 1 mL do meio de reação: 0,5% (p/v) de TBA e 10% (p/v) de TCA. A mistura foi incubada a 95°C durante 30 minutos. Posteriormente, a reação foi interrompida por resfriamento em gelo e as leituras determinadas em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos com o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada e a peroxidação expressa em  $\text{nmol MDA g}^{-1}$  MF.

### **Análises enzimáticas**

Amostras de folhas e raízes (200 mg) foram maceradas em  $\text{N}_2$  líquido acrescido de 50% de polivinilpirrolidona (PVPP) e homogeneizadas em 1,5 mL do tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). As proteínas totais foram eluídas com o mesmo tampão e sua

quantificação determinada pelo método de Bradford (1976). Os valores referentes ao teor de proteínas totais foram expressos em mg proteína g<sup>-1</sup> MF.

A atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) em um meio de reação contendo: fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM (Giannopolitis e Reis 1977). Os tubos com o meio de reação e as amostras foram iluminados por 7 minutos com lâmpada fluorescente de 20 W. Como controle, o mesmo meio de reação, sem a amostra, foi iluminado nas mesmas condições, enquanto o branco foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm, onde uma unidade de SOD foi considerada a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições experimentais. A atividade da SOD foi expressa em U mg<sup>-1</sup> proteína.

Para determinação da atividade da enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi utilizada a metodologia descrita por Azevedo et al. (1998), com algumas modificações. Sua atividade foi monitorada, em espectrofotômetro, pela degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm por 2 minutos, em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), 12,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 50 µL de extrato vegetal, incubado a 28°C. Como branco foi utilizado o mesmo meio de reação livre de extrato vegetal. A atividade da enzima CAT foi expressa em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX, EC 1.1.11.1) foi determinada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O meio de reação foi incubado a 28°C sendo composto de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1 mM. O decréscimo na absorbância foi monitorado por 2 minutos, a partir do início da reação e a atividade da APX expressa em mmol ASA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

## **Resultados**

### **Alterações nos teores de pigmentos fotossintéticos, prolina, proteínas totais, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA**

A análise de variância, para os pigmentos fotossintéticos, constatou que os teores médios de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides totais diferiram significativamente ( $P \leq 0,05$ ) entre as concentrações de NaCl testadas, enquanto que, a razão clorofila a/b não variou em função da presença de sal na água de irrigação.

Na concentração de 150 mM de sal, a síntese de clorofila a, b e total, aumentou em 1,5; 1,6 e 1,5 vezes, respectivamente, em relação ao controle. Na concentração de 300 mM, a síntese de clorofilas foi inferior a observada na

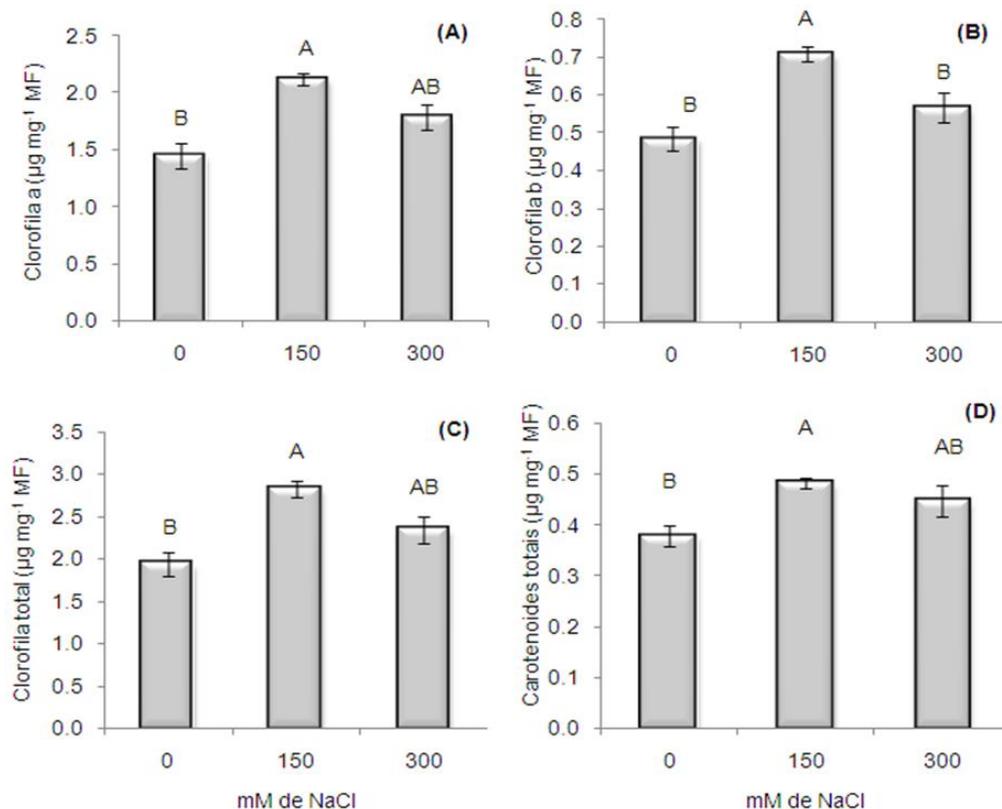
concentração de 150 mM, porém, os valores médios ainda foram superiores aos encontrados no tratamento controle, embora não diferindo significativamente (Fig. 1a, b, c). Estes resultados permitem inferir que as plantas de arroz conservaram sua capacidade de síntese de clorofilas sob estresse salino, as quais são constantemente degradadas e sintetizadas ao longo do ciclo das plantas. Como observado, os teores de clorofila a e b seguiram a mesma tendência de resposta, a qual, possivelmente tenha contribuído para que não houvesse diferença na razão clorofila *a/b* (dados não apresentados). O teor de carotenoides totais, em função da concentração de NaCl, apresentou tendência similar ao das clorofilas, com a maior síntese sendo expressa no tratamento com 150 mM de NaCl, cujo aumento foi de 1,3 vezes em relação ao controle. Na concentração de 300 mM o teor de carotenoides totais diminuiu, porém sendo superior ao do tratamento controle (Fig. 1d).

Os efeitos da salinidade, em termos gerais, foram mais expressivos para os teores de prolina, onde houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre todos os tratamentos. As plantas irrigadas com água na presença de NaCl tiveram maior acúmulo de prolina em suas folhas que as plantas controle, sendo observados acréscimos graduais na ordem de 4,3 e 12,3 vezes superior para os tratamentos com 150 e 300 mM de NaCl, respectivamente, em relação as plantas não estressadas (Fig. 2a). No que se refere às proteínas totais, houve aumento gradual de proteínas com o aumento do estresse salino, tanto nas folhas quanto nas raízes. Para esta variável-resposta houve interação significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre as fontes de variação (tecidos x concentrações de NaCl). Nas folhas, o aumento no teor de proteínas foi significativo, havendo diferença entre as concentrações de 150 mM e 300 mM de NaCl em relação ao controle, porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos para as raízes. Na concentração de 300 mM se observaram os maiores teores de proteínas, 13,75 e 2,55 mg proteína  $g^{-1}$  MF, na folha e na raiz, correspondendo a um aumento de 54% e 33%, respectivamente, em relação as plantas controle (Fig. 2b).

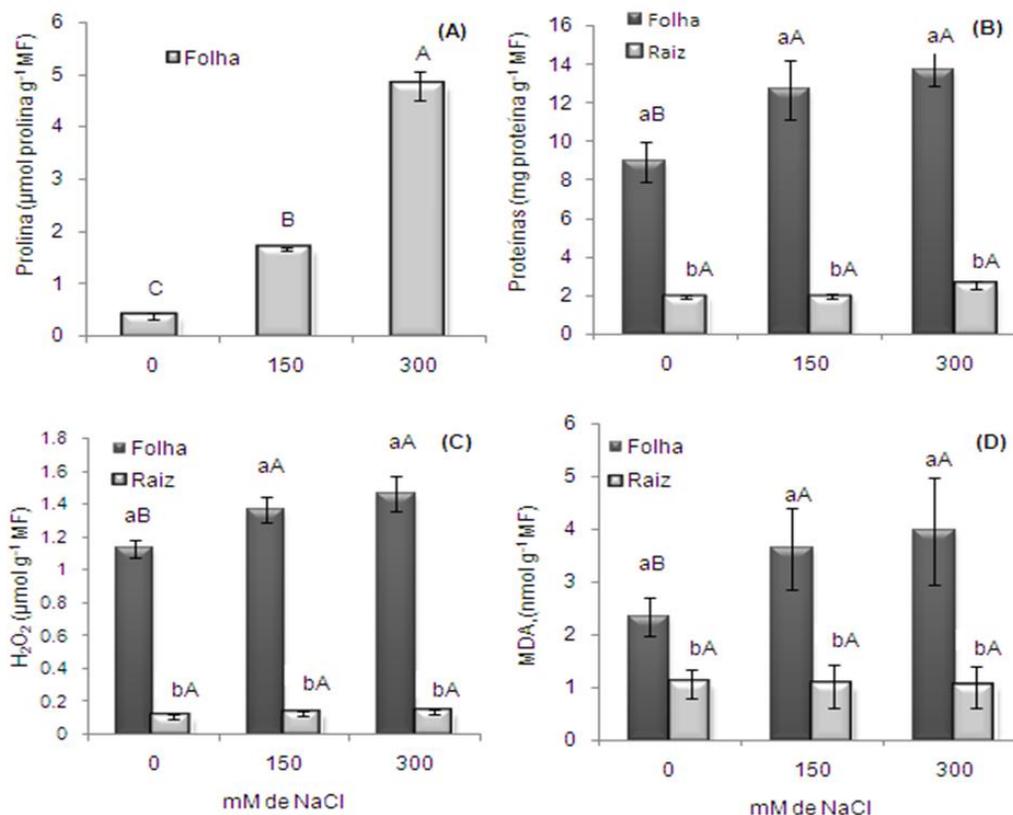
A análise de variância detectou efeito significativo na interação testada entre os fatores para a quantificação de  $H_2O_2$ . Embora os resultados tenham mostrado que, tanto nas folhas quanto nas raízes houve maior produção de  $H_2O_2$  em condições de estresse salino, estas variações foram significativas somente nas folhas. Neste tecido, o conteúdo de  $H_2O_2$  aumentou paralelamente ao acréscimo de sal na água de irrigação, sendo 1,2 e 1,3 vezes maior nas concentrações de 150 e 300 mM de NaCl, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle, após 30 dias de exposição ao estresse (Fig. 2c).

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), aqui representadas pelos níveis de  $H_2O_2$ , pode causar danos às membranas celulares, prejudicando sua função

e integridade, muitas vezes com danos irreversíveis para o funcionamento celular. Neste trabalho, os danos causados pela salinidade às membranas celulares foram evidentes, devido ao aumento no conteúdo celular de malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. Houve efeito significativo da interação entre os fatores testados. As folhas das plantas tratadas com 150 e 300 mM apresentaram, respectivamente, aumento significativo de 1,5 e 1,7 vezes no conteúdo de MDA em relação às plantas controle. Nas raízes, assim como observado para o conteúdo de  $H_2O_2$ , os valores de peroxidação não variaram, indicando que, para a cultivar estudada, o efeito na peroxidação lipídica foi mais severo nas folhas (Fig. 2d).



**Fig.1** Teores de clorofila a (A), clorofila b (B), clorofila total (C) e carotenóides totais (D), em plantas de arroz, cultivar BRS Ligeirinho, submetidas a diferentes concentrações de NaCl durante 30 dias. Tratamentos com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%. Barras verticais indicam o erro padrão (EP) médio de cinco repetições



**Fig.2** Conteúdo de prolina (A), proteínas totais (B), conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (C) e malondialdeído (MDA) (D) em plantas de arroz, cultivar BRS Ligeirinho, submetidas a diferentes concentrações de NaCl durante 30 dias. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%, sendo que letras minúsculas comparam os diferentes tecidos dentro de cada concentração e letras maiúsculas comparam tecidos iguais nas diferentes concentrações de NaCl. Barras verticais indicam o erro padrão (EP) médio de cinco repetições para prolina e três repetições para as demais variáveis.

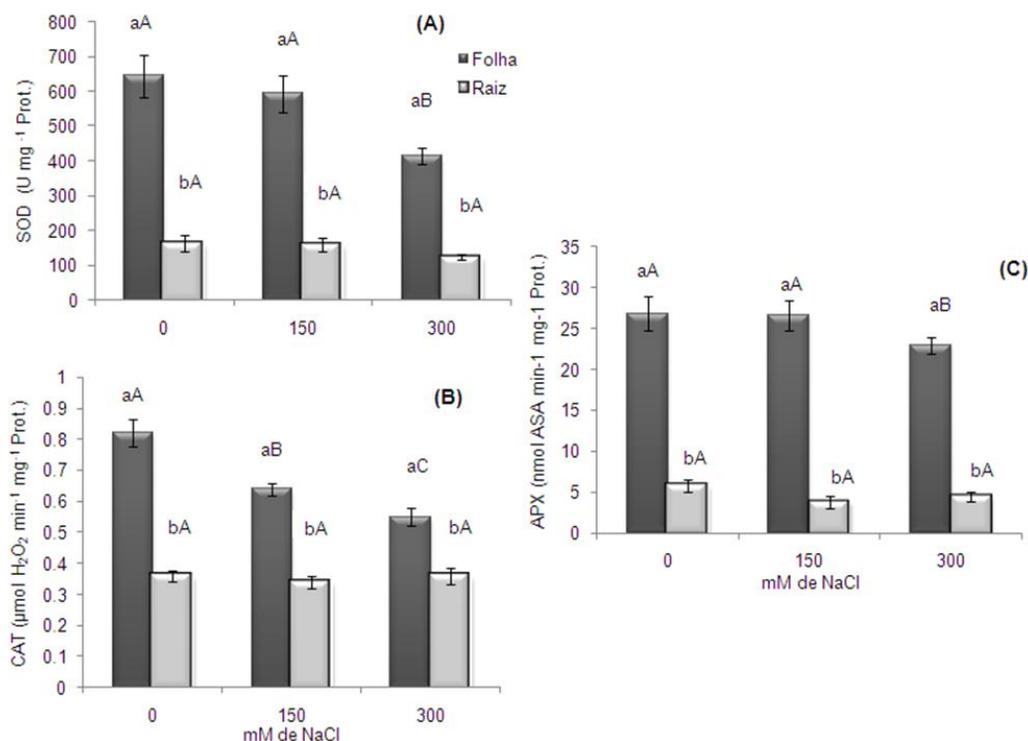
#### Atividade das enzimas SOD, CAT e APX

Para a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), houve interação significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre as fontes de variação testadas. Para esta enzima, foi observada redução em sua atividade com o aumento da concentração de NaCl. Nas folhas, esta diminuição foi de 36% com diferença significativa entre as concentrações de 0 e 300 mM. Nas raízes, foi observada redução de 24%, porém, seus valores médios não diferiram significativamente entre si (Fig 4a).

A atividade das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) nas folhas e raízes das plantas de arroz seguiu a mesma tendência de redução observada na SOD, havendo efeito significativo da interação entre os fatores testados. Nas folhas, a CAT apresentou diminuição em sua atividade de 22% e 33% nas concentrações de 150 e 300 mM, respectivamente, em relação ao tratamento controle, sendo essa variação significativa entre as concentrações testadas. Por outro lado, no

sistema radicular, esta mesma enzima apresentou uma pequena queda, de aproximadamente 6% em sua atividade nas plantas tratadas com 150 mM de NaCl, quando comparadas ao controle, voltando a apresentar incremento para a concentração máxima testada (300 mM), onde seu valor médio de atividade igualou-se ao controle (Fig 4b).

Para a APX, também foi observada diminuição na atividade enzimática nas folhas, porém esta foi menos acentuada em relação à atividade da CAT. As plantas submetidas à salinidade nas concentrações de 150 e 300 mM de NaCl apresentaram respectivas diminuições de 2% e 15% na atividade da APX, quando comparadas às plantas controle (0 mM), onde os tratamentos com 0 e 150 mM de NaCl, diferiram significativamente do tratamento com 300 mM. No sistema radicular, foi observada ligeira tendência de diminuição na atividade da APX, no entanto, estas diferenças não foram significativas (Fig 4c).



**Fig.4** Atividade específica das enzimas SOD (A), CAT (B) e APX (C), em plantas de arroz, cultivar BRS Ligeirinho, submetidas a diferentes concentrações de NaCl durante 30 dias. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%, sendo que letras minúsculas comparam os diferentes tecidos dentro de cada concentração e letras maiúsculas comparam tecidos iguais nas diferentes concentrações de NaCl. Barras verticais indicam o erro padrão (EP) médio de três repetições

## Discussão

Biologicamente, o estresse é considerado em desvio significativo das condições ideais em que as plantas são cultivadas, impedindo-as de expressar plenamente o seu potencial genético de crescimento, desenvolvimento e reprodução (Shafi-ur-Rehman et al. 2005).

Por serem de natureza séssil, ao longo da evolução, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos que permitem perceber as condições adversas. Primeiramente, o sinal é percebido na membrana plasmática por receptores e, posteriormente, transmitido para o interior da célula, resultando na ativação de vários mecanismos para a tolerância ao estresse (Vashisht e Tuteja 2006). A resposta das plantas sob condições de salinidade é um fenômeno extremamente complexo, envolvendo alterações morfológicas e de crescimento, além de processos fisiológicos e bioquímicos, dentre as quais se destaca a capacidade fotossintética.

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes nas plantas, comuns em todas as células fotossintéticas. Os pigmentos envolvidos na fotossíntese são as clorofilas *a* e *b* e os carotenoides. No presente trabalho, as plantas conservaram sua capacidade de síntese de clorofilas sob estresse salino, sendo observados aumentos de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total. Considerando que, na concentração intermediária de NaCl testada (150 mM) foram encontrados os maiores valores médios para síntese destes pigmentos, esta resposta pode ser, em parte, explicada pelas observações realizadas por Santos et al (2004), os quais comentam que a enzima clorofilase pode ser estimulada a sintetizar clorofila sob estresse moderado, entretanto, podendo tal atividade ser inibida por altas concentrações salinas.

O estresse salino tem sido fortemente relacionado à menor capacidade de síntese ou maior degradação de clorofilas em vários tipos de plantas, dentre elas, aquáticas (*Spirodela polyrhiza*) (Chang et al. 2011); leguminosas (*Medicago sativa*), cereais (*Avena sativa*) e gramíneas (*Lolium multiflorum*) (Hernandez-Pinero et al. 2002). No entanto, os resultados do presente estudo indicam que o papel dos pigmentos frente ao estresse salino ainda é divergente e varia conforme a espécie.

De acordo com Parida e Das (2005), alguns autores registram redução no teor de clorofilas, enquanto outros observaram incrementos em resposta ao estresse salino. O incremento no conteúdo de clorofila, em função do estresse salino e hídrico foi registrado em células de *Bouteloua gracilis*, uma gramínea tolerante ao déficit hídrico (García-Valenzuela 2005). Segundo este autor, o comportamento observado pode ser resultado do desenvolvimento do cloroplasto (aumento no número de tilacóides) ou aumento no número dos mesmos, atuando na ativação de um mecanismo de proteção ao aparato fotossintético.

Por outro lado, no presente estudo, foi observada a manutenção na síntese de carotenoides totais, em combinação com o maior teor de clorofilas. Possivelmente, essa resposta está relacionada ao importante papel dos carotenoides como fotoprotetores para as membranas dos cloroplastos, como sugerido por Bartley e Scolnik (1995). De acordo com Sharma e Hall (1991), os carotenoides são pigmentos acessórios na absorção e transferência de energia radiante e protetores da clorofila no tocante à fotoxidação. Assim, possivelmente, a manutenção da síntese de carotenoides implicou na proteção das clorofilas, indicando que, sob estresse, as plantas de arroz parecem se utilizar da rota dos carotenoides para evitar problemas de fotoinibição e fotoxidação.

O aumento na produção de osmólitos, tais como a prolina, é uma das alterações bioquímicas ocasionadas pelo estresse salino (Sripinyowanich et al. 2010). A prolina é um aminoácido sintetizado a partir do glutamato e da arginina sob condições fisiológicas normais, sendo o glutamato o caminho preferencial sob condições de estresse (Chen e Kao 1993).

Durante muito tempo, a prolina foi considerada apenas como um osmólito que protege estruturas subcelulares e macromoléculas sob estresse osmótico (Banu et al. 2009). No entanto, o acúmulo de prolina pode influenciar na proteção contra o estresse de várias maneiras. Tem sido demonstrado que a prolina pode atuar como chaperona molecular, capaz de proteger a integridade das proteínas e a atividade de diferentes enzimas (Szabados e Savoré 2009). Segundo Lehninger (1993), a prolina pode atuar, também, na proteção contra espécies reativas de oxigênio, uma vez que, em sua síntese, a partir do glutamato, ocorrem duas reações de redução à custa de NADPH, primeiro na formação do glutamato semi-aldeído e posteriormente na redução da P5C (pirrolina 5-carboxilato) à prolina. Portanto, a síntese de prolina fornece NADP que será receptor de elétrons no fotossistema I, evitando que esses elétrons reduzam o  $O_2$ , levando a geração de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ , processo conhecido como Reação de Mehler.

Os acréscimos graduais no teor de prolina livre (Pro), encontrados nas plantas de arroz deste trabalho, indicam a existência de um efeito pronunciado da salinidade sobre o teor de prolina em busca de um rápido ajuste osmótico, indicando ser este um mecanismo de proteção ao estresse salino nas plantas de arroz da cultivar em questão. Estes resultados estão de acordo com os encontrados em pesquisas com outros cereais, como, por exemplo, o trigo, onde, Goudarzi e Pakniyat (2009) observaram aumento de 2,6 vezes no teor de prolina em plantas irrigadas com água salina durante quatro semanas.

As proteínas são encontradas em todas as partes das células, sendo fundamentais sob todos os aspectos de estrutura e função celular. Alguns autores

relatam que, sob estresse salino, normalmente há redução no conteúdo de proteínas nas células estressadas, causada tanto pela redução da síntese protéica como pelo aumento da proteólise (Parida e Das 2005). Porém, de acordo com Tester e Davenport (2003), também pode ocorrer um aumento na síntese de uma ampla variedade de proteínas em resposta ao estresse salino, as quais atuam, principalmente, na estabilização das membranas celulares.

Neste estudo, observou-se uma tendência de aumento nos teores de proteínas em função do incremento da concentração salina na água de irrigação. Estes resultados concordam com os obtidos por Goudarzi e Pakniyat (2009), os quais observaram aumento no teor de proteínas totais em cultivares de trigo tolerante e sensível à salinidade. Em plantas de arroz, expostas a 200 mM de NaCl, Hien et al. (2003) relatam que o nível de proteínas se manteve estável, tanto na folha quanto na raiz de plantas tolerantes e sensíveis ao sal. Ainda em arroz, Chen et al. (2001), encontraram aumento na síntese de prolina e diminuição no teor de clorofilas e proteínas totais em plantas tratadas com 10 mM de CuSO<sub>4</sub>, dados que, ao serem comparados com os obtidos neste trabalho levam a inferir que as respostas dos processos biológicos variam, dentre de uma mesma espécie, em função do estresse causado.

A exposição das plantas a determinados estresses ambientais pode levar a formação de ERO, incluindo o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical hidroxílico (HO<sup>•</sup>) e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). O acúmulo de ERO induz ao estresse oxidativo, o qual ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO e os sistemas de defesa antioxidantes (Wang et al. 2005). Lee et al. (2001), demonstraram que o tratamento com NaCl resultou em maior acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas folhas, porém não nas raízes de plantas de arroz. Estes resultados estão de acordo com os observados no presente estudo realizado com a cultivar de arroz BRS Ligeirinho, onde houve aumento significativo no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas folhas tratadas com NaCl em relação as plantas controle, enquanto que nas raízes não foi verificada alteração expressiva.

Cho e Seo (2005) observaram acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em folhas de *Arabidopsis thaliana* proporcional ao aumento das concentrações de cádmio quando submetidas ao estresse por esse metal tóxico durante 21 dias. Os autores admitem que isto ocorreu em razão da menor atividade de enzimas envolvidas diretamente na eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tais como peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX) e glutaciona redutase (GR). Por outro lado, Lin e Kao (2000), observaram diminuição no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em folhas de arroz submetidas a estresse por sal, indicando que esta

resposta deve-se ao aumento da atividade de enzimas responsáveis pela eliminação de  $H_2O_2$ .

Segundo Scandalios (1993), a indução de peroxidação lipídica é um dos efeitos mais danosos das ERO e um indicativo de sua produção. Nossos resultados mostraram que a salinidade induziu o estresse oxidativo, ao nível de peroxidação lipídica observada nas folhas das plantas de arroz, sendo este efeito altamente expressivo na concentração de 300 mM de NaCl. Este fato foi constatado pelo aumento na formação de malondialdeído (MDA) paralelo ao aumento nos níveis de  $H_2O_2$ . O MDA é um produto da peroxidação lipídica, podendo ser utilizado como indicador do grau de peroxidação dos lipídios (Tartoura e Youssef 2011).

De acordo com Hernández e Almansa (2002), o teor de MDA é, geralmente, utilizado como um indicador de danos oxidativos induzidos pelo estresse salino, visto que, evitar danos oxidativos e manter a integridade das membranas celulares é considerado um dos mecanismos de tolerância à salinidade (Stevens et al. 2006). Vários trabalhos relatam o aumento da peroxidação lipídica sob diversos tipos de estresse: altas doses de chumbo, em *Oryza sativa* L. (Verma e Dubey 2003), estresse por frio, em *Glycine max* (L). Merr. (Posmyk et al. 2005), excesso de cádmio, em *Nicotiana tabacum* (Islam et al. 2009) e estresse salino, em *Vigna unguiculata* L. (Deuner et al. 2011).

Para eliminar as ERO, as plantas apresentam um sistema de defesa antioxidante bem desenvolvido, incluindo processos enzimáticos e não-enzimáticos.

A enzima superóxido dismutase (SOD), considerada a primeira linha de defesa no sistema antioxidante enzimático, cataliza a dismutação do  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , através da redução do  $O_2^{\cdot -}$  a  $H_2O_2$  ou da oxidação do  $O_2^{\cdot -}$  a  $O_2$ , no citosol, apoplasto, cloroplastos, peroxissomos e mitocôndria (Sigaud-Kutner et al. 2002). O  $H_2O_2$  formado deve ser removido pela ação das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). A CAT é uma proteína tetramérica que catalisa a conversão do  $H_2O_2$  à  $H_2O$  e  $O_2$ , nos peroxissomos, glioxissomos e mitocôndria, enquanto que a APX converte o  $H_2O_2$  à  $H_2O$ , nos cloroplastos, mitocôndria, peroxissomos, citosol e apoplasto (Shigeoka et al. 2002).

No presente estudo, as enzimas SOD, CAT e APX apresentaram redução em sua atividade nas folhas das plantas de arroz em função da salinidade, contudo, nas raízes, embora a atividade também tenha sido menor, esta redução foi menos acentuada. A diminuição na atividade das enzimas antioxidantes, após longos períodos de exposição ao estresse tem sido relatada por outros autores. Lee et al. (2001) ao quantificar a atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GR, em plantas de arroz cultivadas com 150 mM de NaCl, observaram aumento na atividade da SOD e

APX até o 3º dia de exposição ao sal e diminuição após este período. Deuner et al. (2011) estudando o efeito do NaCl no desenvolvimento de plântulas de quatro genótipos de *Vigna unguiculata* L., observaram que a SOD apresentou aumento em sua atividade até a concentração de 150 mM, e as enzimas APX e CAT somente até a concentração de 100 mM. Porém, a atividade destas enzimas, sob 200 mM de NaCl, reduziu a valores inferiores aos observados no tratamento controle. Neste mesmo sentido, Hu et al. (2012), constataram queda na atividade das enzimas SOD, CAT e APX, em plantas de *Lolium perenne* aos 12 dias de exposição ao estresse por sal. Estes resultados evidenciam que a atividade das enzimas antioxidantes é modulada pelo nível de estresse, onde sob condições severas sua capacidade em eliminar as ERO se torna limitada.

De acordo com Carmak e Horst (1991), a redução na atividade de algumas enzimas, como a catalase, indica que, em algumas plantas mantidas sob condições de estresse, o  $H_2O_2$  produzido pode ser mais consumido em processos oxidativos, como na peroxidação de lipídios, do que eliminado do metabolismo pela ação de enzimas antioxidantes. Esta afirmação pode justificar a baixa atividade enzimática e alta peroxidação lipídica observada neste trabalho. Por outro lado, com a baixa atividade da SOD, CAT e APX, há mais  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  disponível na célula. Estas duas moléculas são os substratos para a reação de Haber-Weiss, a partir da qual haverá a formação do radical hidroxílico ( $HO^{\cdot}$ ), altamente tóxico para a célula.

### **Conclusões**

Sob estresse salino, as plantas de arroz, cultivar BRS Ligeirinho, mantêm a síntese de clorofilas e proteínas a níveis próximos ou superiores aos encontrados nas plantas cultivadas sem NaCl, possivelmente esta resposta está relacionada ao aumento nos níveis de prolina. Por outro lado, estas plantas de arroz, após 30 dias de exposição ao sal, apresentam queda na atividade das enzimas antioxidantes, sendo a maior parte do  $H_2O_2$  produzido preferencialmente direcionado à peroxidação lipídica. Por fim, as alterações causadas pela salinidade são mais acentuadas nas folhas.

### **Agradecimentos**

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Embrapa Clima Temperado-Estação Experimental Terras Baixas, pelo fornecimento das sementes de arroz das cultivares estudadas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro com concessão de bolsas de estudo.

## Referências

- Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* 59:206-216
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998) Responses of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. *Physiol Plant* 104:280-292
- Banu MNA, Hoque MA, Watanabe-Sugimoto M, Matsuoka K, Nakamura Y, Yasuaki S, Murata Y (2009) Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *J Plant Physiol* 166:146-156
- Bartley GE, Scolnik PA (1995) Plant Carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* 7:1027–1038
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 91:179-194
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-310
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Carmak I, Horst WJ (1991) Effect of Al lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max* L.). *Physiol Plant* 834:463-468
- Chang IH, Cheng KT, Huang PC, Lin YY, Cheng LJ, Cheng TS (2011) Oxidative stress in greater duckweed (*Spirodela polyrhiza*) caused by long-term NaCl exposure. *Acta Physiol Plant*. doi: 10.1007/s11738-011-0913-7
- Chen C, Kao CH (1993) Osmotic estress and water estress have opposite effects on putrescine and proline production in excised rice leaves. *Plant Growth Regul* 13:197-202
- Chen CT, Chen LM, Lin CC, Kao CH (2001) Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Sci* 160:283-290
- Cho UH, Seo NH (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci* 168:113-120

- Deuner C, Maia M de S, Deuner S, Almeida A da S, Meneghello GE (2011) Viability and antioxidant activity in seeds of cowpea genotypes submitted to salt stress. *Rev. bras. sementes* 33:711-720
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008) Extent and Causes Salt-affected Soils in Participating Countries – Land and Plant nutrition management service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.htm#top>. Accessed 17 January 2012
- García-Valenzuela X, Garcia-Moya E, Cruz QR, Herrera-Estrella L, Aguado-Santacruz GA (2005) Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells. *J Plant Physiol* 162:650-661
- Giannakoula A, Moustakas M, Syrus T, Yupsanis T (2010) Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. *Environ Exp Bot* 67:487-494
- Giannopolitis CN, Reis SK (1977) Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedlings. *Plant Physiol* 59:315-318
- Goudarzi M, Pakniyat H (2009) Salinity Causes Increase in Proline and Protein Contents and Peroxidase Activity in Wheat Cultivars. *J Appl Sci* 9:348-353
- Hernandez-Pinero JL, Maiti RK, Star J, Diaz G, Onhalez A, Avila ML, Orough-Bakhch R (2002) Effect of lead and cadmium on seedling growth chlorophyll and protein content of common bean (*Phaseolus vulgaris*), alfalfa (*Medicago sativa*), avena (*Avena sativa*) and rye grass (*Lolium multiflorum*) selected as hyperaccumulator of heavy metals. *Res on Crops* 3:473-480
- Hernández JA, Almansa MS (2002) Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of leaves. *Plant Physiol* 115:251–7
- Hien DT, Jacobs M, Angenon G, Hermans C, Thu TT, Son LV, Roosens NH (2003) Proline accumulation and  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. *Plant Sci* 165:1059-1068
- Hoagland DR, Arnon DI (1938) The water culture method for growing plants without soil. University of California College of Agriculture, Berkeley
- Hu L, Li H, Pang H, Fu J (2012) Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) differing in salt tolerance. *J Plant Physiol* 169:146-156. doi: 10.1016/j.jplph.2011.08.020
- Islam MM, Hoque MD, Okuma E, Banu MNA, Shimoishi Y, Nakamura Y, Murata Y (2009) Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *J Plant Physiol* 166:1587-1597. doi: 10.1016/j.jplph.2009.04.002

Lacerda CF, Cambraia J, Cano MAO, Ruiz, HA (2001) Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under nacl stress. Rev. Bras. Fisiol. Veg 13:270-284

Lee DH, Kim YS, Lee CB. (2001) The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). J Plant Physiol 158:737-745

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1993) Principles of Biochemistry, 2ed. Worth Publish, New York

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomem-branes. In: Packer L, Douce R (eds.) Methods in Enzimology. Academic Press, London, UK pp. 350-381.

Lin CC, Kao CH (2000) Effect of NaCl stress on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism in rice leaves. Plant Growth Regul 30:151-155

Lunde C, Drew DP, Jacobs AK, Tester M (2007) Exclusion of na<sup>+</sup> via sodium atpase (ppena1) ensures normal growth of physcomitrella patens under moderate salt stress. Plant Physiol 144:1786-1796

Machado A, Conceição AR (2002) Programa Estatístico Winstat - Sistema de Análise Estatístico para Windows. Versão 2.0. Pelotas: UFPEL

Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas JI, Damsz B, Narasimhan ML, Hasegawa P, Joly RJ, Bressandoes RA (2002) Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction. Plant J 31:699-712

Mahajan S, Tuteja N (2006) Cold, salinity and drought stresses: An overview. Arch Biochem Biophys 444:139-158

Menezes-Benavente L, Teixeira FK, Kamei CLA, Margis-Pinheiro M (2004) Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedling of a Brazilian *indica* rice (*Oryza sativa* L.). Plant Sci 166:323-331. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.10.001

Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ 25:239-250

Nakano Y, ASADA K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol 22:867-880

Netono GW, Onyango JC, Beck E (2004) Sorghum and salinity: gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. Crop Sci 44:806-811

Panda SK, Khan MH (2009) Growth, Oxidative Damage and Antioxidant Responses in Greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term Salinity Stress and its Recovery. Crop Sci 195:442-454

Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 60:324-349

Posmyk MM, Bailly C, Szafranska K, Janas KM, Corbineau F (2005) Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. *J Plant Physiol* 162:403-412. doi:10.1016/j.jplph.2004.08.004

Santos CV (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Sci Hortic (Amsterdam)* 103:93-99

Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol* 101:7-12

Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38:995-1014

Shafi-ur-Rehman, Harris PJC, Ashraf M (2005) Stress environments and their impact on crop production. In: Ashraf M, Harris PJC (eds) *Abiotic Stress – plant resistance through and molecular approaches*, Food Products Press, New York

Sharma PK, Hall DO (1991) Interaction of salt stress and photoinhibition on photosynthesis in barley and sorghum. *J Plant Physiol* 138:614-619

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53:1305-19

Sigaud-Kutner TCS, Pinto E, Okamoto OK, Latorre LR, Colepicolo P (2002) Changes in superoxide dismutase activity and photosynthetic pigment content during growth of marine phytoplankters in batch-cultures. *Plant Physiol* 114:566-71

Sinha S, Saxen R, Singh S (2005) Chromium induced lipid peroxidation the plants of *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidants and antioxidant enzymes. *Chemosphere* 58: 595-604

Sripinyowanich S, Klomsakul P, Boonburapong B, Bangyeekhun T, Asami T, Gu H, Buaboocha T, Chadchawan S (2010) Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of OsP5CS1 and OsP5CR gene expression during salt stress. *Environ Exp Bot*. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.01.009

Stevens J, Senaratna T, Sivasithamparam K (2006) Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilization. *Plant Growth Regul* 49:77-83.

Sumithra K, Jutur PP, Carmel BD, Reddy AR (2006) Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: responses of antioxidativo and proline metabolism. *Plant Growth Regul* 50:11-22

Szabados L, Savoure A (2009) Proline: a multifunctional amino acid. *Cell Press* 15:89-97

Tartoura KAH, Youssef, AS (2011) Stimulation of ROS-scavenging systems in squash (*Curcubita pepo* L.) plants by compost supplementation under normal and low temperature conditions. *Sci Horti (Amsterdam)* 130:862-868. doi: 10.1016/j.scienta.2011.08.015

Tester M, Davenport R (2003) Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann Bot* 91:503-527

Vashisht AA, Tuteja N (2006) Stress responsive DEAD-box helicases: A new pathway to engineer plant stress tolerance. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 84:150-160

Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35:753-759

Verma S, Dubey RS (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164:645-655

Wang FZ, Wang QB, Know SY, Kwak SS, Su, WA (2005) Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *J Plant Physiol* 162:465-472

Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6:66-71

**Submetido à Pesquisa Agropecuária Brasileira (ISSN 1678-3921)**

**Expressão de genes de defesa celular e transdução de sinais em arroz sob  
estresse salino**

**Resumo** – A salinidade é um dos principais estresses ambientais que reduzem a produtividade de arroz irrigado. Porém, a análise de genes envolvidos nesta resposta pode contribuir na elucidação de mecanismos de tolerância ao excesso de sal. O objetivo deste estudo foi avaliar a transcrição e a região promotora de genes responsivos à salinidade em genótipos de arroz. Foram utilizadas as cultivares BRS Bojuru (tolerante) e BRS Agrisul (sensível) submetidas à zero; 12; 24; 36 e 48 horas de exposição ao sal. Para a análise de qRT-PCR foram selecionados dois genes de desintoxicação/defesa celular e dois de transdução de sinais. Para a identificação de *cis*-elementos foram analisados 1000 pb na região *upstream* dos genes candidatos. Para o gene *Os01g0348900-Salt*, foi observado o maior aumento na quantificação relativa da expressão, havendo aumento de 2.078 vezes na cultivar BRS Agrisul, e de 62,7 vezes na cultivar BRS Bojuru. O gene *Os03g0251000-LTP* apresentou aumento contrastante da expressão entre a cultivar sensível (QR = 11,02) e tolerante (QR = 1,53). Foram observadas diferenças nas regiões promotoras dos genes analisados, sendo identificados 38 *cis*-elementos. Com base nos resultados conclui-se que estes genes não mantêm relação direta com a tolerância à salinidade, mas com mecanismos adaptativos a esta condição.

**Termos para indexação:** *Oryza sativa* L., qRT-PCR, estresse salino, *cis*-elementos

### **Expression of cell defense and signal transduction genes in rice under salt stress**

**Abstract** – Salinity is one of the major stresses affecting irrigated rice. The analysis of genes involved in stress response can help to elucidate tolerance mechanisms in plants. The objective of this work was to evaluate the transcription and promoter regions of salt responsive genes in rice genotypes. Leaves from 14-day-old plants from the rice cultivars BRS Bojuru (tolerant) and BRS Agrisul (sensitive) subjected to zero; 12; 24; 36 and 48 hs of exposure to salt. For the qRT-PCR, two genes from each of the following pathways: desintoxication/cell defense and signal transduction were analysed. For the cis-acting element analysis, 1,000 pb from the upstream region of candidate genes were studied. For the gene *Os01g0348900-SalT*, a higher increase in the expression was observed, ca. 2,078 fold in the cultivar BRS Agrisul, and 62.7 fold in the cultivar BRS Bojuru. The gene *Os03g0251000-LTP* presented a contrasting increase between the sensitive (RQ = 11.02) and the tolerant (RQ = 1.53). Differences in the promoter regions of the analysed genes were observed and a total of 38 cis-elements were detected. These results suggest that these genes do not keep a direct relationship to salinity tolerance, but to the adaptation mechanisms related to this condition.

**Index terms:** *Oryza sativa* L., qRT-PCR, salt stress, cis-elements

## Introdução

Dentre os estresses abióticos estudados e que estão em consonância com as alterações ambientais, a salinidade é um dos principais fatores que reduzem a produtividade agrícola no mundo. Na América do Sul, a área afetada pela salinização dos solos é de aproximadamente 85 milhões de hectares. No Brasil, os solos comprometidos pela salinidade ocupam cerca de 160.000 Km<sup>2</sup> ou 2% do território nacional, sendo a Região Nordeste, o Estado do Rio Grande do Sul e o Pantanal Mato-grossense as áreas mais atingidas pelo excesso de sais (Ribeiro et al., 2009). A salinização na área irrigada é determinada pela qualidade da água de irrigação, pelo método de irrigação, tipo de drenagem, grau de permeabilidade do solo e nível do lençol freático (Fageria et al., 2011).

Embora, nos últimos 100 anos, a produção agrícola e a produtividade de espécies cultivadas tenham atingido grandes avanços tecnológicos no sentido da sistematização de métodos de seleção e melhoramento genético, esses avanços não são capazes de garantir plenamente a demanda alimentar. Nesse contexto, a incorporação das áreas comprometidas por sais no processo produtivo de alimentos tem papel fundamental do ponto de vista socioeconômico (Fageria et al., 2010). Para atingir esse objetivo, são necessárias pesquisas sobre os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e genéticos da tolerância das plantas ao estresse salino e, com isso, identificar padrões genéticos e fisiológicos que possibilitem sistematizar cruzamentos que resultem numa progressiva piramidação genética, até a obtenção de variedades tolerantes à salinidade.

Na última década, muitos avanços no estudo sobre estresse abiótico, entre eles a salinidade, foram obtidos, entretanto, existem informações que são iguais e outras que são específicas para as diferentes espécies, o que torna necessária a adoção de espécies modelo para o estudo deste problema. Entre os cereais, o arroz cultivado, *Oryza sativa*

L., foi eleito como organismo modelo, não somente de cereais, mas de todas as monocotiledôneas. Essa escolha se deve ao vasto conhecimento já existente de sua biologia celular, fisiologia e bioquímica; por ter um genoma pequeno, com 389 milhões de pares de bases (Mb), cerca de um sexto do tamanho do genoma do milho e 40 vezes menor que o do trigo e por ter seu genoma mapeado por mapas genéticos saturados (Jung et al., 2008). Além disso, é um organismo para o qual já existem protocolos bem estabelecidos para transformação genética, o que possibilita a análise funcional de genes através da expressão modificada (superexpressão ou silenciamento) dos mesmos (Upadhyaya, 2006).

O arroz é uma planta glicófito, sendo sua exposição às altas concentrações de sal extremamente prejudicial ao seu potencial de crescimento e desenvolvimento. Em nível bioquímico e fisiológico, a salinidade altera o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria e dos cloroplastos, causando aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o oxigênio singlete e o radical hidroxil. Estes radicais, quando produzidos em excesso, acarretam a danificação das membranas (peroxidação de lipídeos), oxidação de proteínas, fragmentação do DNA, ativação de fosfolipases e alterações nos níveis de ácido abscísico (ABA), etileno e ácido jasmônico (Mishra et al., 2011). Nestas condições, para a manutenção do metabolismo celular, as plantas necessitam, principalmente, modular a expressão do sistema de detoxificação (*scavenged*) para a eliminação das ERO e recuperar a condição celular ideal (Wang et al., 2010; Mishra et al., 2011). Também sob estresse, as plantas ativam um sistema para manutenção da homeostase osmótica, através do acúmulo de pequenas proteínas, tais como as Chaperonas LEA (“late embryogenesis abundant”) e HSPs (“heat shock proteins”), além do aminoácido prolina e vários açúcares, como manitol, trealose, galactinol e rafinose (Yamaguchi-Shinozak & Shinozaki, 2006).

Em nível molecular, a primeira resposta celular é a ativação do sistema de transdução de sinais, modulados por proteínas sinalizadoras, como a Fosfolipase C, DAG (“Diacil Glicerol”), IP3 (“Inositol 1,4,5-tris phosphate”), MAPK (“mitogen-activated protein kinase”), CDPK (“Ca<sup>++</sup>-dependent protein kinases”) e Ca<sup>++</sup> (“SOS-Salt Overly Sensitive pathway”), as quais, em um segundo momento, regulam a expressão de famílias de fatores de transcrição, tais como MYB, MYC, NAC, AREB/ABF(bZIP), HD-ZIP e AP3/ERF (Chinnusamy et al., 2003; Yamaguchi-Shinozak & Shinozaki, 2006). Finalmente, em uma terceira fase, estes fatores de transcrição fazem um *feedback* aumentando/reduzindo a expressão de genes com funcionalidades específicas para atuar na tolerância da planta frente ao estresse.

Em estudos com arroz, muitos grupos de pesquisa têm utilizado estratégias que possibilitam identificar um grande número de genes expressos em resposta a diferentes condições de tratamento e/ou condições de estresse, os quais estão depositados em bancos de dados públicos. Entretanto, os resultados obtidos através de técnicas de sequenciamento e/ou microarranjos são bastante amplos, sendo necessário que, dentro destes experimentos, alguns genes sejam selecionados como candidatos, os quais devem ser validados em análises mais pontuais para quantificar sua expressão em resposta ao estresse.

Uma das técnicas de biologia molecular amplamente utilizada para a validação dos dados de expressão gênica, pois apresenta sensibilidade e especificidade na análise de transcritos, é a técnica de qRT-PCR (*real time quantitative RT-PCR*). Este método tem como base o processo de transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) com a incorporação de moléculas fluorescentes covalentemente ligadas nucleotídeos, as quais podem ser quantificadas durante a cinética da reação (em tempo real) (Gachon et al., 2004).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi identificar, através da quantificação relativa da expressão (qRT-PCR), genes candidatos responsivos à salinidade em genótipos de arroz com tolerância contrastante à salinidade, bem como, analisar de forma descritiva, a região promotora destes genes, a fim de identificar possíveis *cis*-elementos que possam influenciar em suas respostas transcricionais.

### **Material e Métodos**

A seleção dos genes candidatos responsivos à salinidade foi feita a partir de dados publicados do transcriptoma comparativo das cultivares de arroz Pokkali (tolerante) e IR64 (sensível ao estresse salino) (Kumari et al., 2009).

Para uma representação de diferentes pontos do metabolismo do estresse, foram selecionados transcritos anotados com ontologias referentes à desintoxicação/defesa celular (*cell rescue defense*) e transdução de sinais (cálcio e fósforo Kinases), conforme os IDs: EF575947, EF576356, EF576188 e EF576186 (Kumari et al., 2009). Posteriormente, para cada transcrito, foi encontrado seu respectivo gene no NCBI Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e RAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). As sequências de regiões transcritas, para cada gene, foram coletadas na anotação atualizada do genoma do arroz (RAP-DB v.5) e utilizadas para o desenho de *primers*, no programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems®). Como normalizador da reação foi escolhido o gene *OsActina*. Algumas configurações foram utilizadas para favorecer a funcionalidade dos *primers*, dentre elas, o tamanho do *amplicom* entre 50 e 150pb, TM entre 58 e 64°C e conteúdo GC entre 40-60% (Tabela 1).

Como material vegetal foram utilizadas sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) dos genótipos BRS Bojuru (subespécie *japonica* – tolerante à salinidade) e BRS Agrisul (subespécie *indica* – sensível à salinidade), procedentes da Embrapa Clima Temperado.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com umidade relativa do ar de 70% e temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , nos meses de novembro e dezembro de 2010.

As sementes foram germinadas em recipientes de plástico com capacidade de 2 L, contendo areia lavada como substrato e irrigadas com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1938). Aos 14 dias após a data da semeadura, as plantas passaram a ser irrigadas, diariamente e de forma alternada, com solução salina contendo 300 mM de NaCl e água. Após zero; 12; 24; 36 e 48 horas de exposição ao estresse salino, as folhas, de ambos os genótipos, foram coletadas, embaladas em papel alumínio, imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior extração de RNA.

O experimento seguiu delineamento experimental inteiramente ao acaso, em esquema fatorial  $2 \times 5$  (2 genótipos  $\times$  5 tempos de exposição à salinidade ) com três repetições, totalizando 30 vasos. No momento da coleta foi feito um *bulk* com as folhas das três repetições de cada tratamento com o intuito de diminuir o erro experimental.

O RNA total foi extraído a partir de 0,1 g de tecido foliar, obtido das plantas expostas aos diferentes tratamentos com NaCl, utilizando *Trizol Reagent* (Invitrogen™), conforme o protocolo indicado pelo fabricante. A quantidade de RNA total foi mensurada em espectrofotômetro a 260 e 280 nm, cuja relação fornece uma estimativa da pureza do RNA. A qualidade e integridade do ácido nucléico foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Posteriormente, as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen™), para a remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, seguindo as recomendações do fabricante. A síntese de cDNA fita simples, para cada amostra, foi feita a partir do mRNA, utilizando *primer* oligo(dT) e demais reagentes do *kit SuperScript FirstStrand System for RT-PCR* (Invitrogen™).

Finalmente, a qualidade do cDNA fita simples foi confirmada através de amplificação de transcritos de *OsActina* através de PCR e eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

As análises de qRT-PCR foram realizadas em equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) utilizando o sistema de fluoróforo SYBR® Green (Invitrogen™). Inicialmente, cada conjunto de *primer* foi avaliado através da curva de dissociação, sendo mantidos neste estudo somente aqueles *primers* com *amplicons* específicos (com um único pico de dissociação das fitas dos produtos da PCR) e com eficiência próxima a 100%, de acordo com a fórmula  $E = [10^{-1/\text{slope}}]$ .

As reações de PCR foram realizadas em triplicata, a partir da mesma amostra, contendo, cada uma delas, um volume total de 20  $\mu$ L. As condições de ciclagem foram: renaturação das amostras por 2 min a 50°C e ativação da enzima *Taq Polymerase* por 10 min a 95°C. Posteriormente, foram feitos 40 ciclos contendo três etapas (95°C por 30s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min) e finalmente uma última etapa a 72°C por 5 minutos.

A quantificação relativa da expressão diferencial foi feita utilizando o “método de comparação de  $C_T$ ” (*comparative threshold cycle method*) (Livack & Schmittgen, 2001), utilizando-se a equação  $QR = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Para cada um dos tratamentos foi identificado o valor de  $C_T$ , tanto para o gene candidato quanto para o gene normalizador (*OsActina*). Do valor de  $C_T$  do gene candidato foi subtraído o valor de  $C_T$  do normalizador, ambos na condição controle, resultando no valor de  $\Delta C_T$  do controle. Posteriormente, dos valores de  $\Delta C_T$  do gene candidato, nas condições de estresse, foram subtraídos o valor de  $\Delta C_T$  do tratamento controle (zero hora de exposição ao sal), sendo encontrado, então, o valor de  $\Delta\Delta C_T$  para cada tratamento (Livack & Schmittgen, 2001).

A identificação de possíveis *cis*-elementos foi feita através de alinhamentos na base de dados para *Oryza sativa* depositada em [www.microsatellite.org](http://www.microsatellite.org). Para isso, foram analisados 1000 pb à montante do suposto sítio de início da transcrição, utilizando,

como referência, as sequências depositadas para a cultivar Nipponbare no *The MSU Rice Genome Annotation Project Database and Resource* (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>). Foram considerados significativos *cis*-elementos com valor de  $P \leq 5$  pelo teste de *Z-score*.

### Resultados e Discussão

Como resultado da seleção de genes com ontologia gênica para desintoxicação/defesa celular (*cell rescue defense*), foram selecionados os transcritos EF575947 e EF576356, referentes aos genes *Os01g0348900-SalT induced protein* e *Os03g0251000-LTP-Plant lipid transfer protein*, respectivamente. Para a função de transdução de sinais, foram selecionados os transcritos EF576188 e EF576186, referentes aos genes *Os03g0688300-CDPK-Putative Calcium-dependent protein kinase* e *Os02g0820000-PP1-Putative Serine/threonine protein phosphatase*, respectivamente.

Para o gene *SalT*, foi observado o maior aumento na quantificação relativa (QR) da expressão em ambos os genótipos. Na cultivar BRS Agrisul, o aumento da expressão foi proporcional ao aumento do tempo de exposição ao estresse. Após 48 horas de indução, houve um incremento estimado em 2.078,3 vezes, na expressão deste gene em comparação ao tratamento controle (0 h). Na cultivar tolerante, houve aumento de 62,7 vezes na expressão do gene *SalT*, nas plantas submetidas a 24 horas de estresse, seguido por uma queda na expressão gênica nos demais tempos de indução, porém, os valores de QR observados ainda foram maiores aos encontrados no tratamento controle (Figura 1).

Ao contrário da hipótese inicial, de que este gene seria mais expresso no genótipo tolerante, os resultados obtidos indicam que o gene *SalT*, aparentemente, não mantém relação direta com a tolerância, mas possivelmente está associado à adaptação

aos danos decorrentes do estresse. Resultados semelhantes ao encontrados neste trabalho são relatados por Garcia et al. (1998), os quais observaram aumento da expressão do gene *Salt* em cultivar de arroz da subespécie *indica*, as quais, normalmente, se caracterizam por serem sensíveis à salinidade. Este mesmo grupo de pesquisa isolou e caracterizou o gene *Salt* incluindo sua região promotora, na qual encontraram sequências correspondentes a elementos móveis do tipo *Castaway* e *Stowaway*. Os autores não excluíram a possibilidade de que a presença de tais inserções esteja relacionada com a expressão do gene.

O gene *Salt* codifica para um grupo de proteínas que se ligam a carboidratos e são comumente descritas como lectinas. Tais proteínas são classificadas de acordo com o tipo de carboidratos a que são capazes de se complexar (Van Damme et al., 2004). Em arroz, um tipo de lectina foi inicialmente identificada como responsiva ao estresse salino e nomeada como SalT (“Salt-induced protein”), sendo caracterizada como função de “Mannose-binding rice lectin” (Claes et al., 1990).

A função das lectinas é amplamente conhecida no sistema imunológico de animais e, em vegetais, tem sido associada com a resposta ao ataque de pragas e patógenos. Além desta função, alguns autores indicam que a conjugação entre lectinas e açúcares tem importante papel na sinalização em resposta a estresses abióticos, modulando sinais nas membranas e no citoplasma (Rüdiger & Gabius, 2001; Van Damme et al., 2004). Em *Arabidopsis* um grupo de lectinas, descritas como “lectin receptor kinases” (LecRK), são aderidas a membrana plasmática e atuam na recepção e transdução de sinais (Gouget et al., 2006). Segundo Claes et al. (1990), não é possível indicar uma função específica para a proteína SalT, mas, possivelmente sua função seja de osmoprotetor, assim como prolina, pequenos açúcares e alguns ácidos orgânicos. Este fato concorda com o grande número de resultados atuais que mostram aumento de

prolina em plantas estressadas, podendo ser este um mecanismo de adaptação, produzido em maior quantidade em genótipos sensíveis (Maggiaio et al., 2004).

O gene *Os03g0251000-LTP* teve aumento na expressão após as plantas serem submetidas a 12 horas de estresse, tanto na cultivar sensível quanto na tolerante, porém, esse aumento foi mais marcante na cultivar sensível, da mesma forma que o gene *SalT*, no entanto, com menor intensidade, 11,0 vezes em relação às plantas controle, enquanto que na cultivar tolerante o aumento observado foi de 1,5 vezes no mesmo período de exposição ao estresse (Figura 2). Assim, estes resultados não indicam este loco do gene como um importante marcador genético de tolerância ao estresse salino, visto que ele foi mais expresso na cultivar sensível, entretanto, existem outros oito locos *LTPs* no genoma do arroz, os quais podem ter diferentes respostas frente ao sal.

As proteínas *LTPs* (“Lipid Transfer Proteins”) compõem uma família também descrita como “Alpha-Amylase Inhibitors” (AAI), “Lipid Transfer” (LT) e “Seed Storage” (SS). Inicialmente, genes desta família tiveram sua função descrita como “Protease amylase inhibitor” em arroz, cevada e milho (Bernhard et al. 1991). Atualmente, a função das *LTPs* tem sido associada à movimentação de lipídeos pelas membranas, respostas ao ataque de vários patógenos (Chae et al., 2010), resposta ao frio, ácido abscísico (ABA), seca e salinidade. Em tomate, um gene *LTP-like* se expressa, especificamente em caules, quando as plantas são tratadas com NaCl e ABA. Em *LTPs* isoladas de trigo, cevada, petúnia e arroz foram encontrados sítios de fosforilação de proteínas Kinases dependentes de Cálcio (CDPK), indicando as *LTPs* como substratos de CDPKs durante a transdução de sinais mediados por  $Ca^{++}$ , o que pode explicar a associação destas em resposta ao estresse (Kader, 1996).

Os dados obtidos na análise da expressão do gene *Os03g0688300-CDPK* indicam que, aparentemente, este loco não tem relação com o estresse salino, visto que,

na maioria dos tratamentos, os valores de QR são inferiores aos observados no tratamento controle em ambos os genótipos avaliados. Na cultivar tolerante, após 24 horas de estresse, houve ligeiro aumento da expressão,  $QR = 1,3$ , no entanto, o mesmo comportamento foi observado na cultivar sensível após 12 horas de exposição ao sal (Figura 3).

Por outro lado, Asano et al. (2011), observaram, em arroz, que a superexpressão do loco *Os04t0584600* (*OsCDPK12*) aumentou a tolerância das plantas ao estresse salino e reduziu o acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), juntamente com aumento da expressão das enzimas *OsAPx2* e *OsAPx8*, sugerindo que este gene promove a tolerância ao sal através da redução no acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Ainda em arroz, a super-expressão do loco *Os03t0128700* (*OsCDPK7*) mostrou aumento de tolerância ao estresse por frio, sal e desidratação (Saijo et al., 2000). Estes resultados associados aos obtidos no presente experimento indicam que, possivelmente, embora exista um grande número de cópias destes genes no genoma do arroz, nem todas as cópias tem importância para o estresse salino.

O cálcio é um mensageiro secundário envolvido na resposta de muitos estímulos e participa como efetor num grande grupo de proteínas descritas como "calcium sensors". Dentre estas proteínas se incluem a "Calmodulin", "Calcium-dependent protein kinases" (CDPK) e "Calcium-regulated phosphatases", as quais atuam fosforilando outras proteínas e interligando redes de transdução de sinais (Abo-El-Saad & Wu, 1995). Estas proteínas pertencem a uma grande família multigênica, identificadas em muitos vegetais e em alguns protozoários, entretanto, não estão presentes em animais. Em *Arabidopsis thaliana* são descritas 34 cópias destes genes e 29 em arroz (Asano et al., 2005; Asano et al., 2011).

Assim como observado para o gene *Os03g0688300-CDPK*, não foi encontrada relação do gene *Os02g0820000-PP1* com a tolerância ou mecanismos adaptativos à salinidade. Para ambas as cultivares, ocorreu redução na expressão deste gene, exceto em 24 horas, onde a cultivar BRS Bojuru manteve valores próximos aos encontrados em 0 hora de indução ao estresse (Figura 3). Entre os diferentes grupos de proteínas “Phosphokinase”, o subgrupo descrito como “Phospho protein phosphatases” (PPPs) compõe algumas famílias protéicas encontradas em todos os eucariotos e subdivididas em “Ser/Thr Phosphatases” e “Tyr Phosphatases”, de acordo com a especificidade de seus substratos. O subgrupo Ser/Thr é composto por proteínas PP1, PP2A, PP2B e PP2C, de acordo com suas estruturas, substrato e cátions inibidores (Cohen et al., 1990).

Estudos recentes mostram que proteínas PPPs têm importante papel na regulação do metabolismo, divisão e desenvolvimento celular, além de participarem na sinalização e ativação de genes em resposta a luz, hormônios e estresse (Xu et al., 2007). Em arroz, a ligação de uma proteína chamada RSS1 (“Rice Salt Sensitive 1”) ao sítio catalítico de proteínas PP1 ativa/desativa a divisão e progressão celular de tecidos sob estresse salino, tornando possível o crescimento celular em contato com o sal. Plantas mutantes *rss1*, foram classificadas como hipersensíveis ao sal, possivelmente em decorrência da não ativação das proteínas PP1 e a paralisação no crescimento celular em contato com o sal (Ogawa et al., 2011). Os resultados obtidos no presente estudo mostraram redução na expressão de *Os02g0820000-PP1*, indicando que, possivelmente, para as cultivares analisadas, este gene não apresenta relação com a tolerância ao estresse salino, contudo, não se descarta a possibilidade de que essa relação seja observada em outros genótipos, órgãos ou períodos de exposição ao sal.

A análise de *cis*-elementos permitiu identificar diferenças nas sequências promotoras dos genes *Os01g0348900-Salt*, *Os03g0251000-LT*, *Os03g0688300-CDPK*

e *Os02g0820000-PP1*. Foi identificado um total de 38 *cis*-elementos, distribuídos de acordo com Diagrama de Venn (Figura 4).

Todos os *cis*-elementos encontrados neste trabalho estão listados na Tabela 2. Do total de *cis*-elementos identificados, seis deles (AACACOREOSGLUB1; ACGTABOX; AGCBOXNPGLB; CRTDREHVCBF2; REBETALGLHCB21 e WBOXATNPR1) foram encontrados apenas na região promotora do gene *Os01g0348900-SalT*, o qual, segundo análise da quantificação relativa da expressão apresentou os maiores valores de QR = 2.078,3 e 62,7, após exposição ao sal, nas cultivares sensível e tolerante, respectivamente. De acordo com Lee et al. (2002), a interação de *cis*-elementos com fatores de transcrição leva à ativação ou à repressão da expressão gênica em resposta a fatores ambientais ou de desenvolvimento. Assim, possivelmente, a presença destes *cis*-elementos module, de forma positiva, a expressão do gene *Os01g0348900-SalT* em resposta ao estresse salino.

Para o gene *Os03g0251000-LTP*, foram encontradas sequências correspondentes aos seguintes *cis*-elementos: GCN4OSGLUB1; INRNTPSADB; SEF3MOTIFGM; POLASIG1 e RYREPEATLEGUMINBOX, os quais não foram identificados nos demais genes em estudo. O gene *Os03g0251000-LTP*, apresentou valores de QR = 11 para a cultivar BRS Bojuru e QR = 1,53 para a cultivar BRS Agrisul, após 24 horas de indução ao estresse por sal.

Como são desconhecidas possíveis alterações nas sequências do promotor deste gene, nas cultivares BRS Bojuru e BRS Agrisul, não se pode descartar a possibilidade de que a ausência de algum destes *cis*-elementos, na cultivar tolerante, BRS Bojuru, possa ser a causa da menor indução deste gene. No entanto, devem-se estender estudos de sequenciamento da região promotora destas cultivares para a confirmação desta hipótese. Os genes *Os03g0688300-CDPK* e *Os02g0820000-PP1*, os quais foram menos

induzidos pelo estresse salino, apresentam dois *cis*-elementos (NODCON2GM e OSE2ROOTNODULE) presentes em comum nas suas regiões promotoras.

### Conclusões

1. Os genes *Os01g0348900-SalT* e *Os03g0251000-LTP* não mantêm relação direta com a tolerância à salinidade, visto que foram mais induzidos na cultivar sensível, mas possivelmente estejam associados à mecanismos adaptativos aos danos em resposta ao estresse. Entretanto, o gene *Os01g0348900-SalT*, pode ser utilizado como marcador na seleção de genótipos sensíveis à salinidade.
2. Os genes *Os02g0820000-PP1* e *Os03g0688300-CDPK*, aparentemente, não estão relacionados com a tolerância ou mecanismos adaptativos à salinidade.
3. A presença dos *cis*-elementos AACACOREOSGLUB1; ACGTABOX; AGCBOXNPGLB; CRTDREHVCFB2; REBETALGLHCB21 e WBOXATNPR1 provavelmente está relacionada à expressão do gene *Os01g0348900-SalT* em resposta ao estresse salino.

### Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Embrapa Clima Temperado-Estação Experimental Terras Baixas, pelo fornecimento das sementes de arroz das cultivares estudadas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro com concessão de bolsas de estudo.

### Referências

- ABO-EL-SAAD, M.; WU, R. A rice membrane calcium-dependent protein kinase is induced by gibberellin. **Plant Physiology**, v.108, p.787-793, 1995.
- ASANO, T.; HAYASHI, N.; KOBAYASHI, M.; AOKI, N.; MIYAO, A.; MITSUHARA, I.; ICHIKAWA, H.; KOMATSU, S.; HIROCHIKA, H.; KIKUCHI, S.;

OHSUGI, R. A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK12 oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance. **Plant Journal**, v.69, p.26-36, 2011.

ASANO, T.; TANAKA, N.; YANG, G.; HAYASHI, N.; KOMATSU, S. Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice. **Plant and Cell Physiology**, v.46, p.356-366, 2005.

BERNHARD, W.R.; THOMA, S.; BOTELLA, J.; SOMERVILLE, C.R. Isolation of a cDNA Clone for Spinach Lipid Transfer Protein and Evidence that the Protein Is Synthesized by the Secretory Pathway. **Plant Physiology**, v.95, p.164-170, 1991.

CHAE, K.; GONONG, B.J.; KIM, S.C.; KIESLICH, C.A.; MORIKIS, D.; BALASUBRAMANIAN, S.; LORD, E.M. A multifaceted study of stigma/style cysteine-rich adhesin (SCA)-like Arabidopsis lipid transfer proteins (LTPs) suggests diversified roles for these LTPs in plant growth and reproduction. **Journal Experimental Botany**, v.61, p.4277-4290, 2010.

CHINNUSAMY, V.; OHTA, M.; KANRAR, S.; LEE, B.H.; HONG, X.; AGARWAL, M.; ZHU, J.K. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. **Genes Development**, v.17, p.1043-1054, 2003.

CLAES, B.; DEKEYSER, R.; VILLARROEL, R.; VAN DEN BULCKE, M.; BAUW, G.; VAN MONTAGU, M.; CAPLAN, A. Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. **Plant Cell**, v.2, p.19-27, 1990.

COHEN, P.T.; BREWIS, N.D.; HUGHES, V.; MANN, D.J. Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. **FEBS Letters**, v.268, p.355-359, 1990.

FAGERIA, N.K.; STONE, L.F.; SANTOS, A.B. dos. Melhoramento para tolerância à salinidade. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de plantas**

**para condições de estresse abiótico.** Viçosa: Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. p. 151-176.

FAGERIA, N.K.; SOARES FILHO, W. dos S.; GHEYI, H.R. Melhoramento genético vegetal e seleção de cultivares tolerantes à salinidade. In: GHEYI, H.R.; DIAS, N. da S.; LACERDA, C.F. de (Ed.). **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados.** Fortaleza: INCT Sal, 2010. p. 205-218.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. **Journal of Experimental Botany**, v.402, p.1445-1454. 2004.

GARCIA, A.B.; ENGLER, J. DE A.; CLAES, B.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M.; GERATS, T.; CAPLAN, A. The expression of the salt-responsive gene *salt* from rice is regulated by hormonal and developmental cues. **Planta**, v.207, p.172-180, 1998.

GOUGET, A; SENCHOU, V.; GOVERS, F.; SANSON, A.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PONT-LEZICA, R.; CANUT, H. Lectin receptor kinases participate in protein-protein interactions to mediate plasma membrane-cell wall adhesions in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.140, p.81-90, 2006.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil.** University of California College of Agriculture, Berkeley, 1938. 39p.

JUNG, K-H.; NA, G.; RONALD, P.C. Towards a better bowl of rice: assigning functions to tens of thousands of rice genes. **Nature Reviews Genetics**, v.9, p.91-101, 2008.

KADER, J.C. Lipid-transfer proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.627-654, 1996.

KUMARI, S.; SABHARWAL, V.P.; KUSHWAHA, H.R.; SOPORY, S.K.; SINGLA-PAREEK, S.L.; PAREEK, A. Transcriptome map for seedling stage specific salinity

stress response indicates a specific set of genes as candidate for saline tolerance in *Oryza sativa* L. **Functional and Integrative Genomics**, v.9, p.109-123, 2009.

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

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

MAGGIO, A.; MIYAZAKI, S.; VERONESE, P.; FUJITA, T.; IBEAS, J.I.; DAMSZ, B.; NARASIMHAN, M.L.; HASEGAWA, P.M.; JOLY, R.J.; BRESSAN, R.A. Does proline accumulation play an active role in stress induced growth reduction. **Plant Journal**, v.31, p.699-712, 2004.

MISHRA, P.; BHOMIKA, K.; DUBEY, R.S. Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Protoplasma**, 2011 Dec 24. [Epub ahead of print].

OGAWA, D.; ABE, K.; MIYAO, A.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; MIZUTANI, M.; MORITA, H.; TODA, Y.; HOBO, T.; SATO, Y.; HATTORI, T.; HIROCHIKA, H.; TAKEDA, S. RSS1 regulates the cell cycle and maintains meristematic activity under stress conditions in rice. **Nature Communication**, v.2, n.278, 1-11, 2011.

RIBEIRO, M.R.; BARROS, M.F. de C.; SANTOS, M.B.G. dos. Química dos solos salinos e sódicos. In: MELO, V. de F.; ALLEONI, L.R.F. (Ed.). **Química e minerologia dos solos. Parte II – Aplicações**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. p.449-484.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H.J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate journal**, v.18, p.589-613, 2001.

SAIJO, Y.; HATA, S.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K.; IZUI, K. Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. **The Plant Journal**, v.23, p.319-327, 2000.

UPADHYAYA, N.M.; ZHU, Q-H.; ZHOU, X-R.; EAMENS, A.E.; HOQUE, M.S.; RAMM, K.; SHIVAKKUMAR, R.; SMITH, K.F.; PAN, S-T.; LI, S. Dissociation (Ds) constructs, mapped Ds launch pads and transiently-expressed transposase system suitable for finalized insertional mutagenesis in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.1326-1341, 2006.

VAN DAMME, E.J.; LANNOO, N.; FOUQUAERT, E.; PEUMANS, W.J. The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. **Glycoconjugate journal**, v.20, p.449-460, 2004.

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

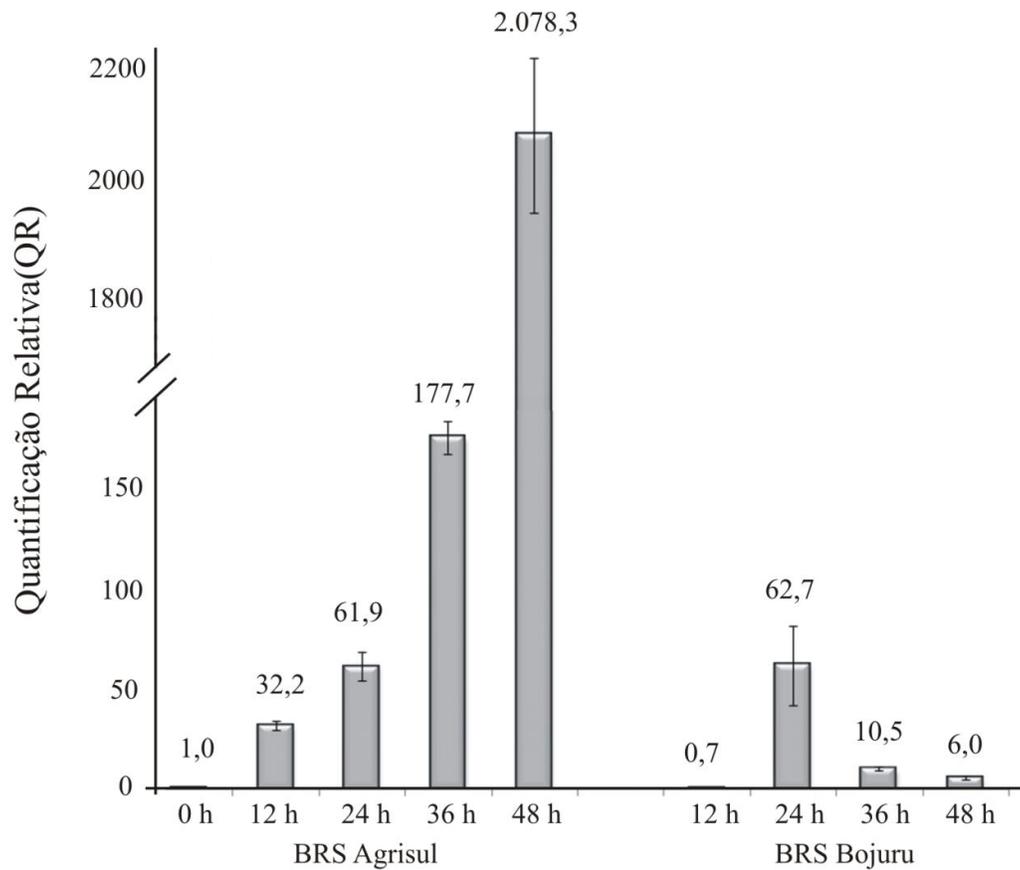
XU, C.; JING, R.; MAO, X.; JIA, X.; CHANG, X. A wheat (*Triticum aestivum*) protein phosphatase 2A catalytic subunit gene provides enhanced drought tolerance in tobacco. **Annals of Botany**, v. 99, p.439-450, 2007.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.781-803, 2006.

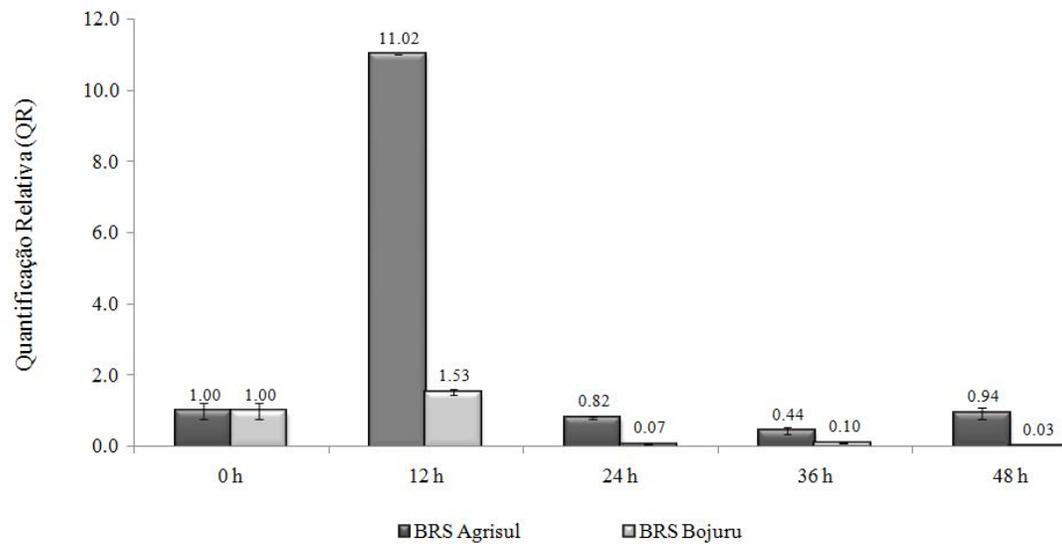
**Tabela 1.** Lista de *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR e tamanho do *amplicon* em pares de bases (pb)

Gene/Transcrito	Seqüência	<i>Amplicon</i>
<i>Salt</i>	F: 5'TCTGGAACGCTTATCGACGC 3'	
<i>Os01g0348900/AK062520</i>	R: 5'TGGGAATCAAGGGTGGACG 3'	50
<i>LTP</i>	F: 5'TATATATCCGCCAGCAGCATGC 3'	
<i>Os03g0251000/AK104253</i>	R: 5'CCTCCATGAAGCACGGCAC 3'	50
<i>CDPK</i>	F: 5'AGGATGGGCGGATCAGCTAC 3'	
<i>Os03g0688300/AK105102</i>	R: 5'TCCCGGATTTTCATCATCGC 3'	50
<i>Ser/thr PPI</i>	F: 5'ATCTGCTGGCGCATGTCTTC 3'	
<i>Os02g0820000/AK120439</i>	R: 5'GCGAAAATGCCGGTTAGTCG 3'	50
<i>Actina 1</i>	F: 5'CAGCCCACTGTCCCCATCTA 3'	
<i>Os03g0718100/AK100267</i>	R: 5'AGCAAGGTCGAGACGAAGGA 3'	66

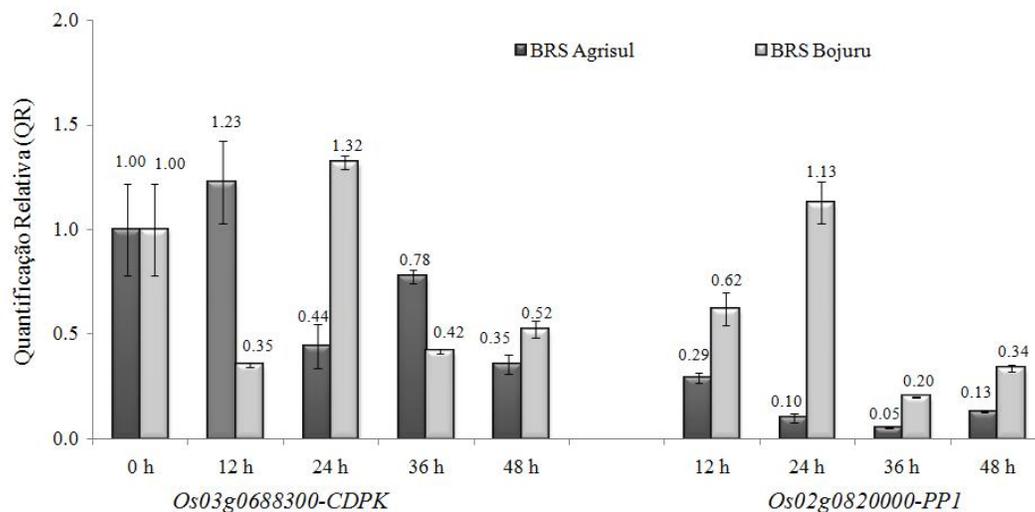
\*Todos os *primers* funcionaram em temperatura de anelamento de 60°C.



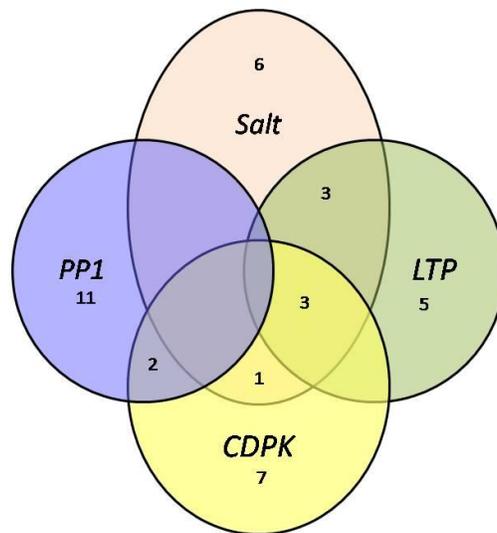
**Figura 1.** Quantificação relativa (QR) da expressão diferencial do gene *Os01g0348900-Salt*, em cinco períodos de exposição a 300 mM de NaCl, nas cultivares BRS Bojuru (tolerante) e BRS Agrisul (sensível). Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão da média de três repetições, cada uma com três replicatas.



**Figura 2.** Quantificação relativa (QR) da expressão diferencial do gene *Os03g0251000-LTP*, em cinco períodos de exposição a 300 mM de NaCl, nas cultivares BRS Bojuru (tolerante) e BRS Agrisul (sensível). Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão da média de três repetições, cada uma com três replicatas.



**Figura 3.** Quantificação relativa (QR) da expressão diferencial dos genes *Os03g0688300-CDPK* e *Os02g0820000-PPI*, em cinco períodos de exposição a 300 mM de NaCl, nas cultivares BRS Bojuru (tolerante) e BRS Agrisul (sensível). Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão da média de três repetições, cada uma com três replicatas.



**Figura 4.** Diagrama de Venn ilustrando a distribuição de *cis*-elementos na região promotora (1000 pb) dos genes *Os01g0348900-Salt*, *Os03g0251000-LTP*, *Os03g0688300-CDPK* e *Os02g0820000-PP1*.

**Tabela 2.** Lista de *cis*-elementos encontrados na região promotora (1000 pb) dos genes *Os01g0348900-SalT*, *Os03g0251000-LTP*, *Os03g0688300-CDPK* e *Os02g0820000-PPI*

<i>Cis</i> -elemento	<i>SalT</i>	<i>LTP</i>	<i>CDPK</i>	<i>PPI</i>
AACACOREOSGLUB1	1 (1.9)*			
ACGTABOX	1 (3.8)			
AGCBOXNPGLB	1 (0.1)			
CRTDREHVCFB2	1 (1.9)			
REBETALGLHCB21	1 (1.1)			
WBOXATNPR1	3 (2.7)			
AMYBOX2	1 (0.1)	1 (0.1)		
MYB2AT	1 (2.8)	1 (2.8)		
TATCCAYMOTIFOSRAMY3 D	1 (1.3)	1 (1.3)		
RYREPEATBNNA	2 (2.0)	2 (2.0)	2 (2.0)	
RYREPEATGMGY2	1 (3.8)	2 (0.0)	1 (3.8)	
RYREPEATVFLEB4	1 (0.1)	1 (0.1)	1 (0.1)	
NODCON2GM			5 (0.1)	4 (1.2)
OSE2ROOTNODULE			5 (0.1)	4 (1.2)
TATABOX3	1 (4.8)		1 (4.8)	
GCN4OSGLUB1		1 (0.0)		
INRNTPSADB		3 (1.0)		
POLASIG1		4 (0.5)		
RYREPEATLEGUMINBOX		2 (0.1)		
SEF3MOTIFGM		2 (0.1)		
ARFAT			1 (3.8)	
CAREOSREP1			2 (0.1)	
CBFHV			3 (0.6)	
DOFCOREZM			11 (4.2)	
DRE2COREZMRAB17			1 (1.5)	
LTRECOREATCOR15			7 (2.1)	
TATAPVTRNALEU			1 (0.6)	
BP5OSWX				1 (0.0)
CACTFTPPCA1				13 (3.6)
CURECORECR				6 (5.2)
GTGANTG10				9 (0.4)
MRNASTA2CRPSBD				1 (0.1)
P1BS				1 (7.8)
QARBNEXTA				1 (0.0)
RAV1AAT				6 (0.0)
SEF4MOTIFGM7S				3 (2.5)
T/GBOXATPIN2				1 (2.0)
TRANSINITDICOTS				1 (0.9)

\*Valores fora dos parênteses indicam o número de vezes em que o *cis*-elementos foi encontrado na região promotora e valores entre parênteses indicam o valor de *P* pelo teste de *Z-score*.



## 25 **Introdução**

26 O arroz cultivado, *Oryza sativa* L., pertence à família Poaceae, é uma planta anual  
27 semi-aquática e geralmente cresce até 1,2 m de altura. Seu fruto, chamado grão ou cariopse,  
28 serve de alimento básico para mais da metade da população mundial, principalmente em  
29 países em desenvolvimento (Sasaki e Burr, 2000). Além de sua importância econômica na  
30 alimentação, o arroz destaca-se por sua importância científica, a qual provém do fato desta  
31 espécie ter o menor genoma haplóide dentre as gramíneas (440 Mb distribuídas em 12  
32 cromossomos) e este estar sequenciado, o que eleva o conteúdo informativo disponível para  
33 estudos de genética clássica e reversa, tornando o arroz uma espécie modelo para estudos de  
34 fisiologia e genética em monocotiledôneas (Krishnan *et al.*, 2009).

35 A produtividade é o objetivo principal dos programas de melhoramento, entretanto,  
36 caracteres como qualidade industrial e tolerância/resistência a estresses bióticos e abióticos  
37 são fundamentais para o ganho genético. Dentre os fatores abióticos, a salinidade dos solos e  
38 da água de irrigação é um dos principais fatores que afeta a produtividade de inúmeras  
39 culturas, dentre elas o arroz. A redução na produtividade destas espécies cultivadas em solos  
40 salinizados suscita sérias preocupações para a produção futura de alimentos, visto que se  
41 espera um aumento na população mundial para 9,3 bilhões até 2050 (Cheng-Jiang *et al.*,  
42 2010).

43 O controle genético da tolerância à salinidade é quantitativo, envolvendo uma rede  
44 gênica de vários locos distribuídos em diferentes regiões do genoma do arroz, os quais, uma  
45 vez ativados, podem mitigar o efeito do estresse, levando a um ajustamento celular e  
46 tolerância da planta. Assim, a identificação de genes envolvidos na tolerância à salinidade é  
47 fundamental para o conhecimento do controle genético desta característica e para o  
48 desenvolvimento de linhagens capazes de tolerar diferentes níveis de estresse salino.

49 Os avanços na área de biologia molecular, genômica e proteômica impulsionaram a  
50 criação de um grande volume de dados, tornando difícil o armazenamento, análise e  
51 interpretação destes dados sem o uso de modernas e potentes ferramentas de bioinformática  
52 (Binneck, 2004). A quantidade de informações disponíveis para cada espécie depende  
53 basicamente da complexidade do genoma e da importância econômica ou científica que essa  
54 espécie possui. Para o arroz (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica* cv. Nipponbare), as  
55 informações existentes são bastante grandes, incluindo bancos de dados de sequências  
56 genômicas, genes expressos (ESTs e/ou *fl*-cDNA), ontologia com as funções dos genes, além  
57 de bancos de dados de informações de elementos de transposição (TEs). Desta forma, a  
58 prospecção de informações moleculares nestes bancos de dados é uma metodologia eficiente  
59 para identificar genes e TEs potencialmente envolvidos na resposta ao estresse salino em  
60 arroz.

61 Uma das grandes descobertas na área da genômica estrutural de plantas é que o genoma  
62 dos vegetais é composto também por elementos transponíveis (Feschotte et al., 2002) e que,  
63 em algumas espécies, como o trigo, estes constituem mais de 70% do genoma nuclear (Devos  
64 et al., 2005). Finnegan (1989) propôs o primeiro sistema de classificação de TEs, separando-  
65 os em duas classes, de acordo com o seu intermediário de transposição. Os TEs pertencentes à  
66 Classe I ou Retrotransposons, apresentam um mecanismo de transposição através de um  
67 intermediário de RNA que é codificado para DNA por uma transcriptase reversa, enquanto  
68 que os TEs da Classe II ou Transposons se movem via DNA. O mecanismo de transposição  
69 da Classe I é comumente conhecido como “copia e cola” e o da classe II “recorta e cola”. No  
70 entanto, a descoberta de TEs com mecanismo “copia e cola”, porém sem intermediário de  
71 RNA e presentes em um grande número de cópias, os chamados MITEs (miniatura de  
72 elementos transponíveis com repetições invertidas), tem alterado esse sistema de classificação  
73 com duas classes. No entanto, neste trabalho foi adotado o sistema de classificação

74 hierárquico proposto por Wicker *et al.* (2007), o qual inclui níveis de classes, subclasses,  
75 ordens, superfamílias, famílias e subfamílias.

76 Apesar da contribuição considerável dos TEs para a estrutura do genoma, o seu papel  
77 na expressão de genes adjacentes não está totalmente compreendido, porém, são apontados  
78 como possíveis elementos controladores do silenciamento ou ativação de genes vizinhos  
79 (Kashkush *et al.*, 2003). De acordo com Feschotte (2008) os TEs podem influenciar a  
80 expressão de genes de várias formas, tanto em nível transcricional quanto pós-transcricional.

81 Em nível transcricional, os TEs podem se inserir na região promotora de um gene,  
82 sendo essa inserção entre ou dentro de *cis*-elementos, formando um novo sítio de início de  
83 transcrição ou silenciamento. Nesse caso, a inserção do TE pode regular a expressão de forma  
84 positiva ou negativa. Em outro caso, ao se transpor, o TE pode levar consigo um trecho de  
85 DNA correspondente à região promotora de outro gene contendo um *cis*-elemento. Nesse  
86 caso a resposta do gene poderá ser alterada em resposta ao novo *cis*-elemento presente. Os  
87 TEs podem, ainda, se inserir dentro de *introns*, podendo resultar no silenciamento gênico.

88 Em nível pós-transcricional, os TEs podem interferir na formação de proteínas de  
89 inúmeras formas. Algumas delas são: 1) pela inserção de um sítio alternativo de  
90 poliadenilação, 2) pela inserção de sequências reconhecidas por miRNA, 3) por alterar os  
91 padrões normais de *splicing* do pré-mRNA (hRNA) dando origem a várias formas de *splicing*  
92 alternativo e, 4) pela inserção de *stop codon*, formando, no momento da tradução, uma  
93 isoforma da proteína original (Feschotte, 2008).

94 Assim, diante da importância social e econômica da cultura do arroz a nível mundial e  
95 para o Brasil, e sabendo-se que, muitas vezes as safras da cultura são prejudicadas pelo  
96 excesso de sal existente no solo e na água de irrigação, torna-se necessária a realização de  
97 pesquisas que visem à obtenção de informações sobre os mecanismos fisiológicos e  
98 moleculares de tolerância à salinidade. Para este fim, a integração de análises moleculares

99 com predição *in silico* de regiões genômicas contendo genes candidatos e elementos de  
100 transposição, envolvidos na tolerância à salinidade, possibilitará identificar alguns genes e/ou  
101 regiões do genoma do arroz que serão informativos na seleção genética assistida por  
102 marcadores moleculares para esse tipo de estresse.

103 Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a distribuição de elementos de  
104 transposição em regiões de genes associados à salinidade, bem como, caracterizar a distância  
105 genética entre 30 genótipos de arroz baseada em genes responsivos ao sal associados a  
106 elementos de transposição.

107

## 108 **Material e Métodos**

### 109 **Identificação de genes responsivos ao sal e elementos de transposição (TEs) no** 110 **genoma de arroz**

111 A partir de dados obtidos do transcriptoma comparativo entre as cultivares de arroz  
112 Pokkali (tolerante à salinidade) e IR64 (sensível à salinidade) (Kumari *et al.*, 2009) foram  
113 selecionadas 14 sequências gênicas responsivas ao estresse salino e chamados “genes  
114 candidatos”. O critério para a seleção das sequências foi a confirmação de que estes genes  
115 tiveram aumento na expressão em resposta ao estresse. Para este fim, foram utilizadas  
116 informações de dados experimentais de microarranjo envolvendo as cultivares FL478  
117 (tolerante ao sal) e IR29 (sensível ao sal) (Walia *et al.*, 2005) contidas no banco de dados do  
118 NCBI-GeoProfiles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles>). Posteriormente, utilizando a  
119 anotação do genoma da cultivar Nipponbare (subespécie *japonica*), disponível no banco de  
120 dados *The MSU Rice Genome Annotation Project Database and Resource* release 6  
121 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>), foi coletado, para cada gene candidato, informações sobre  
122 sua função, posição no genoma, região gênica e as sequências de 5000 pb *upstream* e

123 *downstream*. Na Tabela 1 estão listados os genes candidatos, respectivas funções e posição no  
124 genoma.

125 Para a identificação dos elementos de transposição foram realizados alinhamentos  
126 com as sequências dos genes candidatos na base de dados GIRI REPBASE  
127 (<http://www.girinst.org/>), através da ferramenta RepeatMasking, sendo considerados  
128 significativos os alinhamentos com valor de *score* => 600. A ferramenta de informática base  
129 utilizada para realizar as anotações foi ARTEMIS *DNA sequence viewer and annotation tool*  
130 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>).

131 Uma vez identificados os elementos de transposição (TEs) inseridos na região gênica,  
132 *downstream* e *upstream* dos “genes candidatos”, foi avaliada a distribuição destes mesmos  
133 transposons na região gênica, *downstream* e *upstream* de 14 genes escolhidos de forma  
134 aleatória e não responsivos ao sal Para estes genes, também foram obtidas informações  
135 referentes à função e posição no genoma (Tabela 1).

136 Paralelamente, foi feita uma estimativa da distribuição dos TEs nas regiões gênica,  
137 *downstream* e *upstream* de 953 genes relacionados à salinidade, descritos por Kumari *et al.*  
138 (2009). Estes resultados foram então comparados com a distribuição de TEs nas regiões  
139 gênica, *downstream* e *upstream* de 55818 genes distribuídos no genoma do arroz. Foram  
140 levados em consideração os TEs presentes a uma distância de, no máximo, 5000 pb da UTR  
141 5’ e UTR 3’ dos genes. Para estas análises, foi construído um PIPELINE em linguagem Pearl,  
142 através do qual foram realizados alinhamentos locais (BLASTn) entre as sequências dos  
143 elementos de transposição identificados e as regiões gênica, *downstream* e *upstream*  
144 anteriormente citadas, sendo considerados penas os alinhamentos com *e-value*  $\leq 10^{-5}$  e, no  
145 mínimo, 50 pb de sobreposição.

**Tabela 1-** Genes candidatos e aleatórios selecionados: posição e função de acordo com banco de dados *MSU*.

<b>Gene candidato</b>	<b>Posição</b>	<b>Função</b>	<b>Gene aleatório</b>	<b>Posição</b>	<b>Função</b>
LOC_OS01g41880	Chr1: 23740813..23744995	hyaluronan/mRNA binding family domain	LOC_Os01g12940	Chr1: 7185483..7188038	phosphorylase domain
LOC_OS03g14654	Chr3: 7965164..7966101	LTPL108 - Protease inhibitor/seed storage	LOC_Os01g01470	Chr1: 241641..243468	no apical meristem protein
LOC_OS07g39630	Chr7: 23753108..23760707	calcium-binding protein	LOC_OS02g07800	Chr2: 4083023..4086047	transcription factor
LOC_OS08g20544	Chr8: 12331526..12342183	expressed protein	LOC_OS03g42810	Chr3: 23849970..23852188	endonuclease/exonuclease/phosphatase
LOC_OS11g06720	Chr11: 3278435..3279425	abscisic stress-ripening	LOC_OS04g45280	Chr4: 26752194..26757287	histidine triad family protein
LOC_OS07g07050	Chr7: 3471789...3476921	aldehyde oxidase	LOC_Os06g35530	Chr6: 20717740..20724744	Kinase
LOC_OS02g57450	Chr2: 35207612..35211426	Ser/Thr protein phosphatase	LOC_Os07g23710	Chr7: 13382831..13383995	cytochrome P450
LOC_OS03g44500	Chr3: 25042315..25051072	serine/threonine protein phosphatase	LOC_Os07g33330	Chr7: 19920336..19924334	RNA recognition motif
LOC_OS01g43870	Chr1: 25132885..25138147	NLI interacting factor-like phosphatase	LOC_Os08g04800	Chr8: 2406033..2407778	riacylglycerol lipase like protein
LOC_OS06g48950	Chr6: 29656969..29665195	auxin response factor 19	LOC_Os08g14700	Chr8: 8837255..8839386	glucan endo-1,3-beta-glucosidase
LOC_OS08g10020	Chr8: 5806458..5808458	photosystem II 10 kDa polypeptide	LOC_Os09g07920	Chr9: 4042693..4045478	NOI protein, nitrate-induced
LOC_OS02g41590	Chr2: 24940446..24946648	kinase, pfkB family	LOC_Os09g27010	Chr9: 16422278..16425218	tyrosine protein kinase
LOC_OS09g38700	Chr9: 22243893..22249302	STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 5	LOC_Os11g05800	Chr11: 2682643..2687848	HVA22
LOC_OS04g38270	Chr4: 22773468..22778458	expressed protein	LOC_Os11g31340	Chr11: 18294409..18296934	no apical meristem protein

## 146 **Material Vegetal**

147 Para a caracterização molecular foram utilizados 30 genótipos de arroz (*Oryza sativa*  
148 L.) fornecidos pela Estação Experimental Terras Baixas (EMBRAPA - Clima Temperado), os  
149 quais estão listados na Tabela S1. Os genótipos foram divididos em três grupos, de acordo  
150 com a genealogia.

## 151 **Caracterização Molecular**

152 A partir dos dados colhidos na anotação de elementos de transposição em torno aos  
153 genes candidatos, foram desenhados *primers* específicos para cada loco de interesse,  
154 buscando que os produtos de amplificação apresentassem, ao menos, um elemento  
155 transponível potencialmente ativo (baseado na integridade de sua sequência) ou, no mínimo,  
156 900 pb na região *upstream* do gene. Assim, foram levadas em consideração cinco  
157 possibilidades de amplificação, conforme a Figura 1.

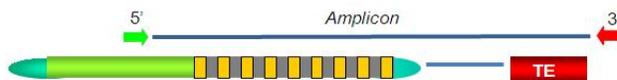
158 Como norma geral, os *primers* foram ancorados em regiões onde se pudesse observar  
159 um alto grau de conservação entre as subespécies *indica e japonica*, afim de que o mesmo par  
160 de *primers* pudesse ser utilizado em ambas às subespécies. Para isso, foi realizada a busca de  
161 sequências, na subespécie índica 9311, que sejam homólogas a Nipponbare, através da  
162 ferramenta *BLAST* no banco de dados *BGI Rice Genome Database*  
163 (<http://rice.genomics.org.cn/rice/index2.jsp>). Para o desenho dos *primers* foi utilizado o site  
164 do NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Na  
165 Tabela S2 estão listados os *primers* utilizados neste estudo.

166

167

168

Possibilidade 1: *Primer* forward ancorado no gene candidato e reverse ao lado do elemento transponível (TE) na região downstream do gene candidato.



Possibilidade 2: *Primer* forward ancorado ao lado do TE na região upstream do gene e reverse no gene candidato.



Possibilidade 3: *Primer* forward e reverse ancorados no gene candidato com TE dentro do gene.



Possibilidade 4: amplificação da região *downstream* ou *upstream* do gene candidato, contendo TE.



Possibilidade 5: amplificação da região *upstream* do gene candidato, não contendo TE.



169

170 **Figura 1** – Possibilidades de amplificação.

171 A extração do DNA genômico foi realizada pelo método CTAB, segundo a  
 172 metodologia descrita por Weising *et al.* (2005). A massa do material vegetal foi aferida e 100  
 173 mg de folhas frescas foram maceradas em nitrogênio líquido. A qualidade e quantidade do  
 174 DNA extraído das amostras foi verificado em gel de agarose 0,8%, utilizando o marcador de  
 175 peso molecular *Lambda DNA/HindIII*.

176 As reações de PCR, para amplificação dos fragmentos, foram realizadas em volume  
 177 final de 20  $\mu\text{L}$  contendo 5  $\mu\text{L}$  ( $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) de DNA, 2  $\mu\text{L}$  de tampão 10x contendo  $\text{MgCl}_2$  (20  
 178 mM), 0,4  $\mu\text{L}$  de mix de dNTPs (10 mM), 0,7  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo iniciador (10  $\mu\text{M}$ )  
 179 e 0,35  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase ( $1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ ) (Biotools B&M Labs, S.A.), completando o  
 180 volume final com água ultrapura. As condições da PCR utilizadas foram: desnaturação a  $94^\circ\text{C}$   
 181 (4 min), seguido de 35 ciclos de  $94^\circ\text{C}$  (40 seg),  $T_m$   $65^\circ\text{C}$  (40 seg),  $72^\circ\text{C}$  (2:30 min), e uma  
 182 etapa de extensão final de  $72^\circ\text{C}$  (7 min). Os produtos das amplificações foram separados por

183 eletroforese em gel de agarose 1,5% durante 4 horas. Como marcador de peso molecular foi  
184 utilizado *DNA Ladder Mix* (GeneRuler™). Posteriormente, os géis foram corados em  
185 brometo de etídio ( $0,5\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 10 minutos, sendo as bandas visualizadas sob luz  
186 ultravioleta.

187 O dendrograma representativo da distância genética entre os genótipos foi construído a  
188 partir da distância obtida pelo coeficiente de Rogers (1972) modificado por Wright (1978)  
189 (Rogers-W), levando em consideração a frequência alélica. Com base na matriz de  
190 dissimilaridade genética gerada foi aplicada a análise de agrupamento utilizando a média das  
191 distâncias entre todos os pares de genótipos para a formação de cada grupo, denominado  
192 método da distância média (UPGMA). Para a estimativa do ajuste entre a matriz de  
193 dissimilaridade e o dendrograma gerado foi calculado o coeficiente de correlação cofenética  
194 ( $r$ ). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa computacional NTSYS pc 2.1  
195 (Rohlf 2000).

#### 196 **Sequenciamento de fragmentos de DNA polimórficos**

197 Para o sequenciamento dos fragmentos polimórficos de DNA, foi feita a purificação  
198 direta dos produtos de PCR utilizando o kit comercial *SPEEDTOOLS PCR CLEAN-UP KIT*:  
199 *Designed for the direct purification of DNA from PCR products* (Biotools B&M Labs, S.A.),  
200 seguindo as recomendações do fabricante. Uma vez purificado, as amostras de DNA foram  
201 encaminhadas para sequenciamento na empresa *SECUGEN (Sequencing and molecular*  
202 *diagnostics)*, com sede em Madrid/Espanha. As reações de sequenciamento foram efetuadas  
203 com a utilização dos iniciadores no sentido senso e anti-senso separadamente. A análise das  
204 sequências foi realizada com *Sequencher 5.0 - DNA Sequence Analysis Software* e o  
205 alinhamento com a ferramenta *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

206

207

## 208 **Resultados**

### 209 **Ocorrência de elementos de transposição (TEs) no genoma do arroz**

210 A análise de alinhamento, na base de dados GIRI REPBASE, da região gênica,  
211 *downstream* e *upstream* dos 14 genes candidatos detectou a ocorrência de 100 elementos de  
212 transposição (TEs) com  $score \geq 600$ . Deste total, 16% foram encontrados na região gênica,  
213 34% na região *downstream* e 50% na região *upstream*. Comparativamente, o número de TEs  
214 encontrado nos 14 genes aleatórios (não relatados como responsivos ao sal) foi inferior ao  
215 encontrado nos genes candidatos, totalizando 45 TEs. No entanto, embora o número total de  
216 TEs encontrado neste grupo tenha sido menor, eles seguiram a mesma tendência de  
217 distribuição, sendo encontrados 7% na região gênica, 22% e 71% nas regiões *downstream* e  
218 *upstream*, respectivamente.

219 Os TEs apresentam uma grande diversidade em sua estrutura, fato que reflete no  
220 grande número de famílias de TEs já descritas. Utilizando o critério de classificação  
221 hierárquica, proposto por Wicker *et al.* (2007), o qual inclui níveis de classe, subclasses,  
222 ordem, superfamília, família e subfamília, os resultados obtidos neste trabalho apontam um  
223 maior número de cópias de TEs pertencentes à classe II, tanto no grupos de genes candidatos  
224 quanto de genes aleatórios, sendo os transposons não autônomos, do tipo MITEs, os mais  
225 frequentes (Tabela 1).

226 A análise das sequências dos genes candidatos permitiu identificar que, dentre os TEs  
227 da classe I, foram encontrados, em sua maioria, homólogos à retrotransposons sem LTR,  
228 sendo 30% deles pertencentes à ordem LINE e 70% à ordem SINE. Entre os TEs da classe II,  
229 o maior número de cópias identificadas, 98,8%, correspondem à TEs da subclasse 1, sendo,  
230 dentro dos transposons autônomos, *hAT*, com 4% e *Mutator* com 7%, os mais frequentes,  
231 enquanto que, dentre os não autônomos (MITEs), os elementos da família *Stowaway* e  
232 *Tourist*, aparecem com 46,4% e 35% das cópias identificadas, respectivamente. Com relação

233 à distribuição de TEs nos genes aleatórios, 98% dos elementos foram classificados como  
 234 pertencentes à Classe II, dentre os quais 45% apresentavam características de MITEs da  
 235 família *Tourist* e 36% de *Stowaway*. Vale ressaltar que, nos dois grupos de genes, o TE da  
 236 subfamília *Stowaway 41* foi o encontrado em maior número de cópias, enquanto que, dentre  
 237 os TEs da família *Tourist*, os mais frequentes foram: *Wanderer* e *Typem* nos genes candidatos  
 238 e *OLO24C* nos genes aleatórios. A distribuição de TEs encontrados, da Classe II (transposons  
 239 autônomos e MITEs), está representada na Figura 2, enquanto que a classificação completa  
 240 dos TEs encontrados e o número de cópias de cada um, em ambos os grupos de genes,  
 241 encontra-se nas Tabelas S3 e S4.

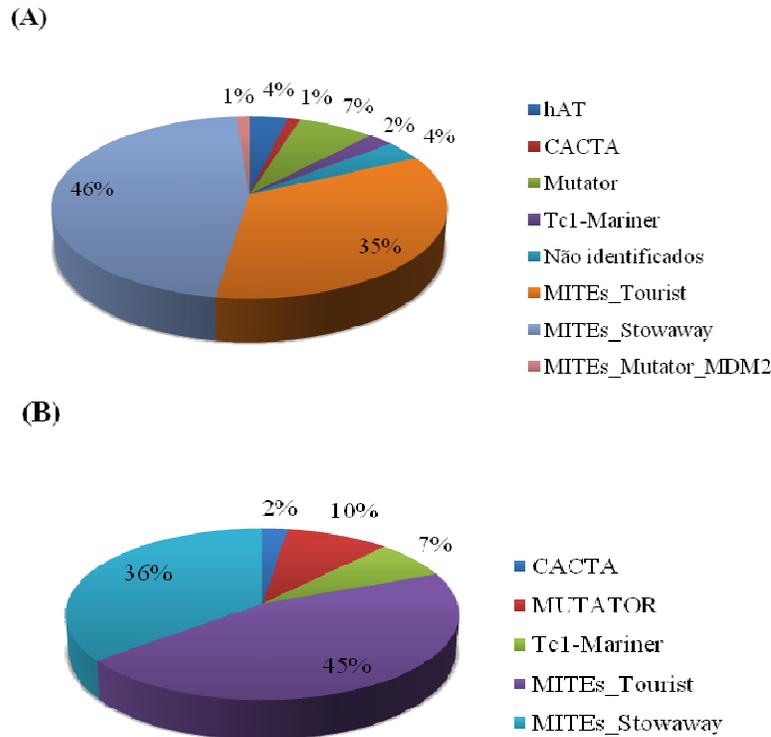
242

243 **Tabela 1** – Número de cópias de TEs pertencentes às classes I e II encontrados em 14 genes  
 244 candidatos e aleatórios

Classes	Número de cópias	
	Genes candidatos	Genes aleatórios
<b>Classe I</b>		
LTR Retrotransposon	3	---
Non LTR Retrotransposon	10	1
<b>Classe II</b>		
<i>Subclasse 1</i>		
Transposons	15	8
MITEs (não autônomos)	69	34
<i>Subclasse 2</i>		
Helitron	1	2
<b>Classe Não identificada</b>	2	---
<b>Total de TEs encontrados</b>	100	45

245

246



247 **Figura 2** - Distribuição de TEs encontrados, da Classe II (transposons autônomos e MITEs),  
 248 no grupo de genes candidatos (A) e aleatórios (B), incluindo região gênica, *downstream* e  
 249 *upstream*.

250

251 O estudo comparativo do padrão de distribuição de TEs nas regiões gênica,  
 252 *downstream upstream* de 953 genes caracterizados como responsivos ao sal e 55818 genes do  
 253 genoma do arroz, apontou um padrão de distribuição semelhante ao encontrado na  
 254 comparação entre os 14 genes candidatos e os 14 genes aleatórios, havendo um maior número  
 255 de TEs dentro e no entorno de genes responsivos ao sal. Na Tabela 2 está descrita a  
 256 porcentagem de regiões analisadas que apresentam cópias homólogas a TEs O maior número  
 257 de TEs foi encontrado na região *upstream*, sendo que 95% e 78% destas regiões analisadas  
 258 nos 953 genes responsivos ao sal e nos 55818 genes do genoma, respectivamente,  
 259 apresentaram, no mínimo, uma cópia homóloga a TEs. A alta frequência de TEs na região

260 *upstream* de genes pode resultar em efeitos na resposta de genes tanto a nível transcricional  
 261 quanto pós-transcricional.

262 Os alinhamentos correspondentes à região gênica detectaram que 5% destas regiões,  
 263 no grupo de genes responsivos ao sal e, 3,8% nos genes distribuídos no genoma, apresentam  
 264 sequências correspondentes à TEs, sendo, portanto, esta região o sítio de menor inserção de  
 265 TEs.

266

267 **Tabela 2** – Porcentagem de regiões analisadas que apresentaram, no mínimo, uma sequência  
 268 homóloga à TEs

Regiões analisadas	Genes candidatos	Genes aleatórios	Genes responsivos ao sal	Genoma
Região <i>upstream</i>	86%	64%	95%	78%
Região gênica	57%	14%	5%	3,8%
Região <i>downstream</i>	79%	29%	52%	39,2%

269

270 A Figura 3 mostra a porcentagem com que cada TE foi encontrado na região *upstream*  
 271 de genes responsivos ao sal e outros genes do genoma. Pode-se observar que, com exceção de  
 272 *Amy/LTP*, *Mermite 18B*, *Stowaway 34*, *Stowaway 43*, *LTR Truncator2* e *SINE9*, que aparecem  
 273 em maior número de cópias nas regiões *upstream* do genoma em geral, todos os demais tipos  
 274 de TEs encontrados, são mais frequentes na região *upstream* de genes envolvidos na resposta  
 275 ao estresse salino.

276 Assim como observado na análise comparativa entre 14 genes candidatos e aleatórios,  
 277 os TEs pertencentes à subclasse 1 (Classe II), foram os encontrados com maior número de  
 278 cópias. Os TEs das famílias *Tourist* e *Stowaway* são os mais frequentes, neste caso, com  
 279 destaque para *OLO24C*, o qual foi encontrado em, aproximadamente, 11% das regiões  
 280 *upstream* dos genes responsivos ao sal, seguido de *Gaijin*, *Wanderer*, *Stowaway2* e

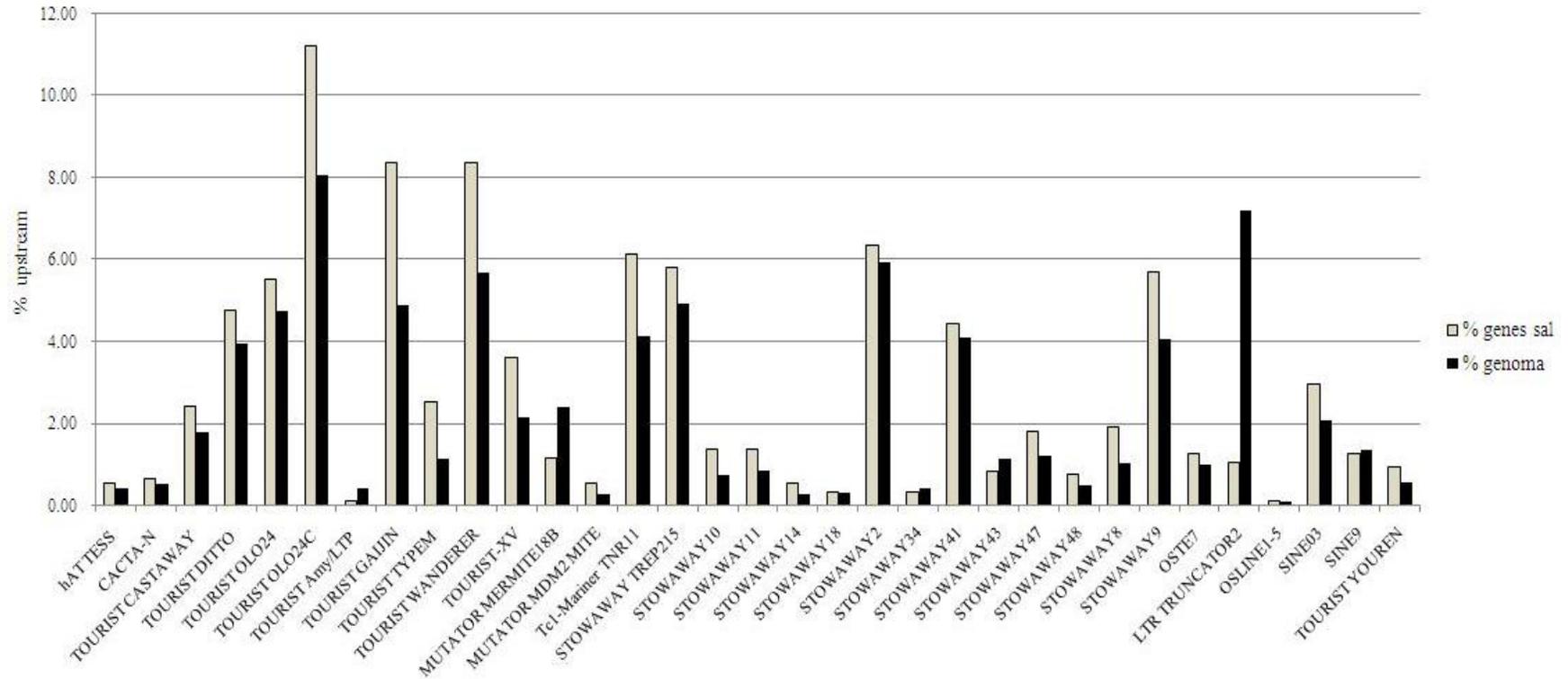
281 *Stowaway9*. Por outro lado, o TE do tipo *LTR Truncator 2* (Classe I), apresentou um número  
282 de cópias significativo, estando presente em cerca de 7,5% das regiões *upstream* dos genes do  
283 genoma, ficando atrás apenas de *OLO24C*, o qual foi observado em 8% das regiões  
284 analisadas, indicando que, possivelmente, TEs deste tipo são encontrados com frequência em  
285 regiões que flanqueiam tanto genes responsivos ao sal quanto outros tipos de genes.

286 Em relação à porcentagem de TEs encontrados na região gênica, pode-se observar  
287 que, assim como a região *upstream*, há uma maior frequência de TEs em genes responsivos à  
288 salinidade. Nesta região, foram encontradas em sua maioria, cópias correspondentes a TEs da  
289 Classe II, classificados como *Tourist* e *Stowaway*. No entanto, observou-se uma inversão na  
290 frequência de TEs *Stowaway41* e *Stowaway43*, os quais foram detectados em maior  
291 quantidade em genes responsivos ao sal e do genoma, respectivamente, na região *upstream*.  
292 Na região gênica, foram encontradas cópias de *Stowaway41* em 1,7% dos genes do genoma e  
293 em 1,4% dos genes responsivos ao sal analisados. Por outro lado, em 1,65% dos genes  
294 relatados como responsivos ao sal foram identificadas cópias de *Stowaway43*, enquanto que  
295 entre os genes do genoma apenas 0,8% apresentam este tipo de inserção.

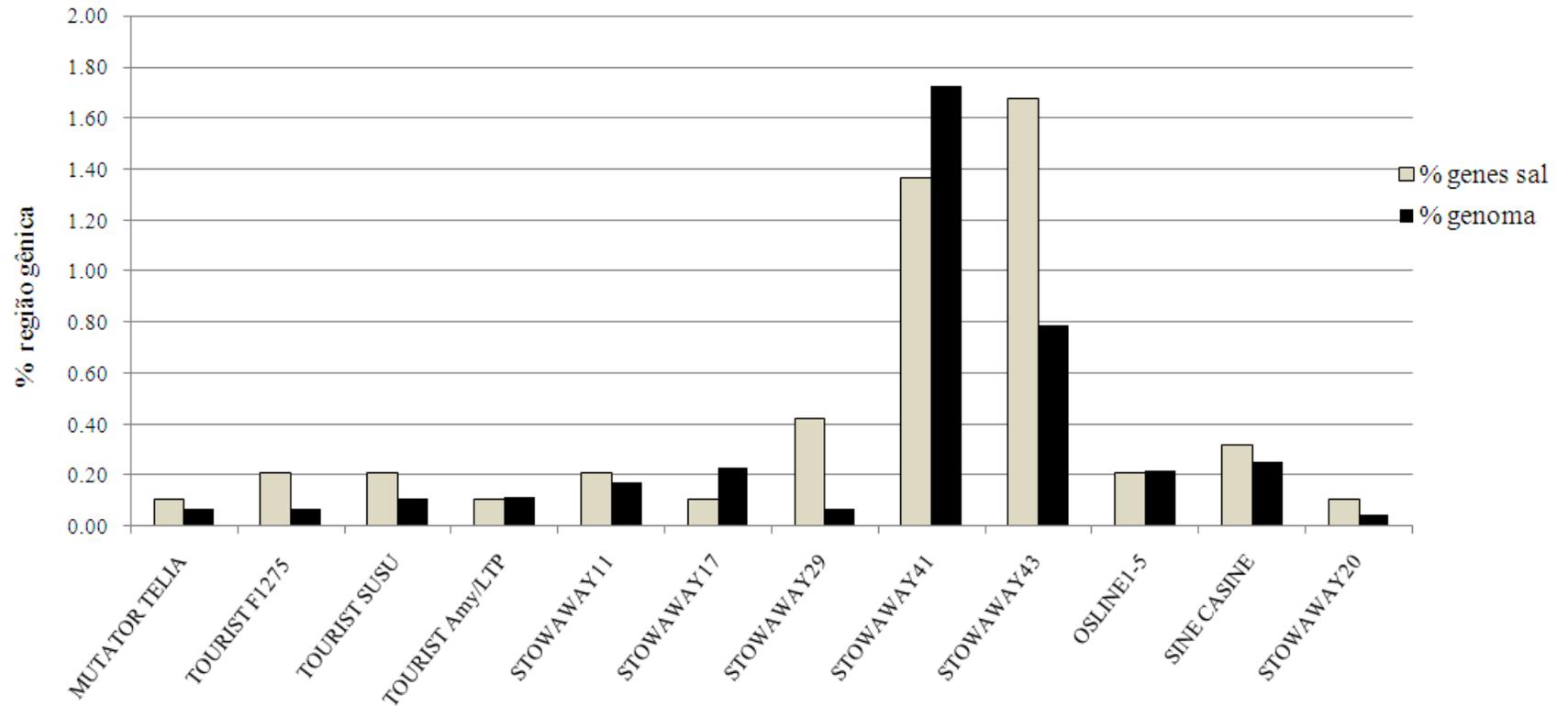
296 Para TEs do tipo *Stowaway29* e *Stowaway17*, encontrados na região gênica de ambos  
297 os grupos, não foram identificadas cópias nas regiões *upstream* e *downstream*, o que nos  
298 permite inferir que, possivelmente, este tipo de inserção exerça um papel modulador na  
299 estrutura dos genes hospedeiros, como a formação de RNA fita dupla, silenciamento e a  
300 inserção de novos sítios de poliadenilação.

301 Vale ressaltar ainda, que foram encontradas, na região gênica, cópias de um único tipo  
302 de transposon autônomo, pertencente à superfamília *Mutator* e dois tipos de retrotransposon  
303 sem LTR: *OSLINE1-5* e *CASINE* (Figura 4).

304



**Figura 3** – Porcentagem de regiões *upstream*, de genes responsivos ao sal e outros genes do genoma do arroz, contendo TEs.



**Figura 4** – Porcentagem de regiões gênicas, de genes responsivos ao sal e outros genes do genoma do arroz, contendo TEs.

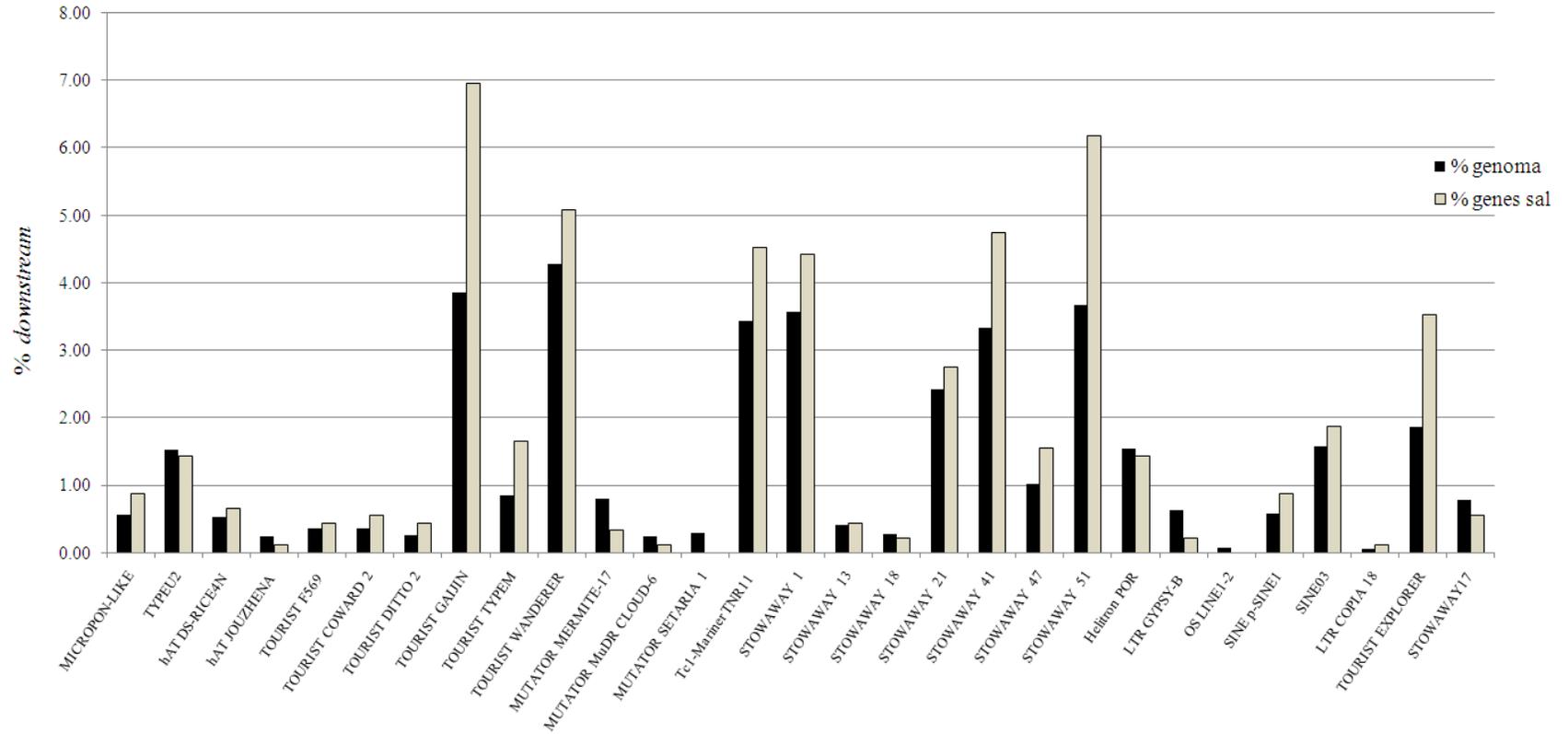
305 Ao analisar a região *downstream* dos genes, foi possível observar, assim como para as  
306 demais regiões, uma quantidade superior de TEs próximos a genes responsivos ao sal quando  
307 comparados a genes envolvidos em outras respostas no genoma. Foram encontradas cópias  
308 dos TEs *Gaijin*, *Stowaway51* e *Wanderer* em, respectivamente, 7%, 6% 5% das regiões  
309 downstream de genes para salinidade, sendo os TEs mais frequentes nesta região. Estes  
310 mesmo TEs foram os mais identificados na região *downstream* dos demais genes do genoma,  
311 no entanto, em concentrações de, aproximadamente, 3,8% (*Gaijin*), 4,4% (*Wanderer*) e 3,6%  
312 (*Stowaway51*).

313 Para os TEs das subfamílias *TNR11*, *Stowaway41* e *Stowaway1*, foram encontradas  
314 cópias em 4,5%, 4,8% e 4,4% das regiões *downstream* dos genes em resposta à salinidade,  
315 sendo, os dois primeiros frequentes, também, na região upstream e o último presente apenas  
316 na posição *downstream*.

317 No que se refere à presença de TEs do tipo Retrotransposons com LTR, as  
318 superfamílias Copia e Gypsy, neste estudo, representadas por *Copia18* e *Gypsy-B*, foram  
319 identificadas apenas na região *downstream*, diferindo, entretanto, em relação ao grupo de  
320 genes nos quais foram mais freqüentes. Enquanto *Copia18* foi encontrado em maior  
321 quantidade no grupo de genes responsivos ao sal, o número de cópias de *Gypsy-B* foi superior  
322 nos demais genes do genoma. Resposta semelhante à de *Gypsy-B* foi identificada para o TE  
323 *Truncator 2*, o qual foi identificado apenas nas regiões upstream, com maior frequência em  
324 genes do genoma. Dentre os Retrotransposons sem LTR, *SINE3*, foi o mais frequente na  
325 região *downstream*, assim como observado para *upstream*.

326 O TE *Setaria1*, um tipo de transposon autônomo da superfamília *Mutator*, foi  
327 identificado, apenas, na região *downstream* de genes do genoma não caracterizados como  
328 responsivos ao sal (Figura 5).

329



**Figura 5** – Porcentagem de regiões *downstream*, de genes responsivos ao sal e outros genes do genoma do arroz, contendo TEs.

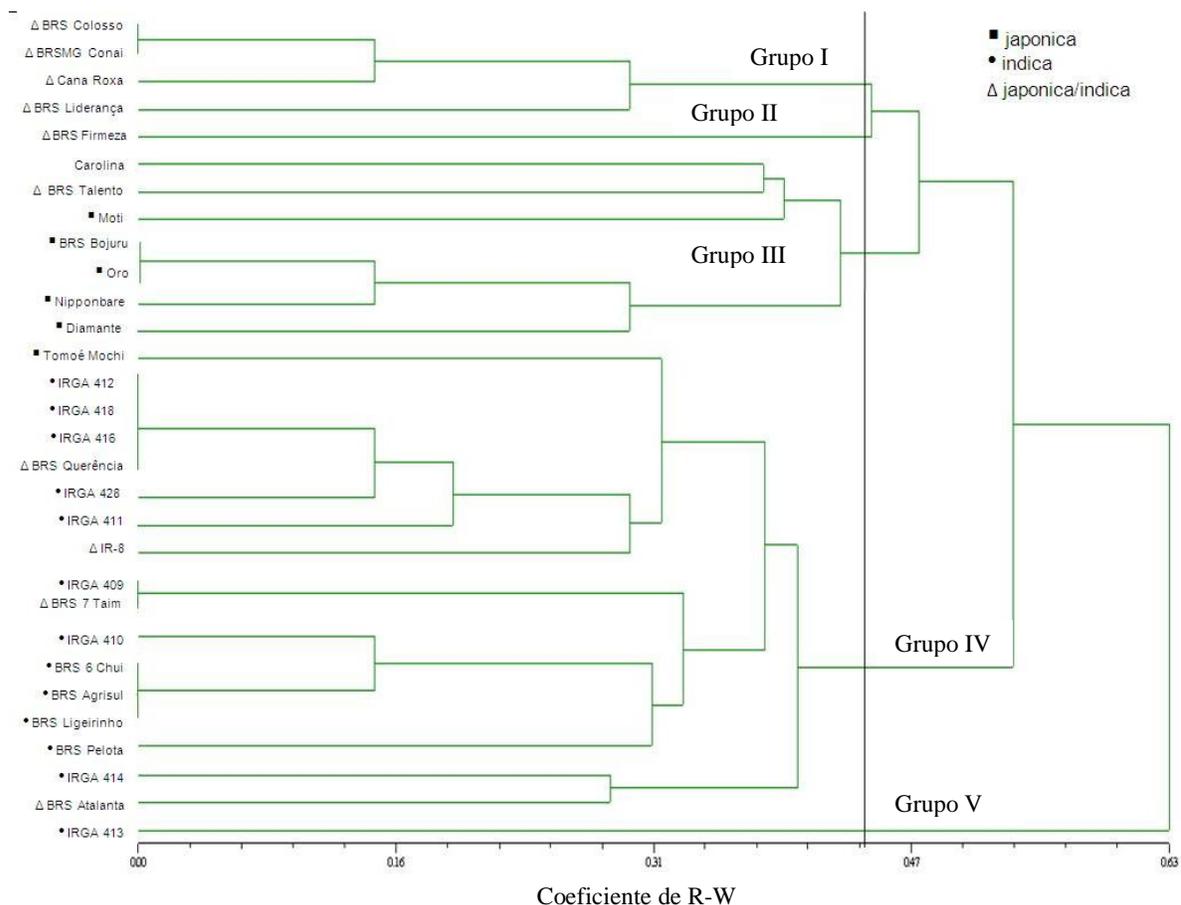
### 330 **Caracterização Molecular**

331 Foram testados no total 22 *primers* (Tabela S2), distribuídos em diferentes locos dos  
332 14 genes candidatos, sendo que, destes, 55% desses locos foram polimórficos e revelaram 27  
333 alelos, evidenciando diferenças entre os genótipos estudados. Foram encontrados dois alelos  
334 para os locos: LOC\_OS03g14654(4), LOC\_OS08g10020(9), LOC\_OS06g48950(12),  
335 LOC\_OS09g38700(15), LOC\_OS09g38700(16), LOC\_OS11g06720(19),  
336 LOC\_OS08g20544(20), LOC\_OS04g38270(21) e LOC\_OS07g39630(22), enquanto que para  
337 os locos LOC\_OS03g14654(1), LOC\_OS02g41590(3) e LOC\_OS01g41880(6) foram  
338 observados 3 alelos. Vale ressaltar que, dentre os locos monomórficos, o loco  
339 LOC\_OS08g10020 (10), permitiu a identificação de todos os indivíduos como heterozigotos.

340 A partir da variação alélica observada foi gerada a matriz de distância genética entre  
341 os indivíduos com 27 alelos, utilizando-se o coeficiente de distância de Rogers-W. Esta  
342 matriz permitiu a construção de um dendrograma de agrupamento pelo método UPGMA, o  
343 qual apresentou índice de correlação cofenética ( $r$ ) de 0,87, mostrando que esse dendrograma  
344 representa 87% da matriz de Rogers-W. Os genótipos foram separados em cinco grupos  
345 distintos, sendo que as medidas de distância entre eles tiveram uma magnitude de 0,01 a 0,77,  
346 com distância média de 0,45 (Figura 6).

347 O primeiro grupo abrangeu quatro genótipos, sendo que BRS Colosso e BRSMG  
348 Conai foram os mais próximos entre si, apresentando uma distância igual a 0,01 e os  
349 genótipos Cana Roxa e Liderança os mais distantes geneticamente (0,32). De acordo com os  
350 levantamentos de genealogia (Tabela S1), os genótipos BRS Colosso e BRSMG Conai  
351 possuem como ancestral comum o genótipo Aimoré enquanto que BRS Colosso e BRS  
352 Liderança descendem de cruzamentos com o genótipo Kaybonnet. Por outro lado, para Cana  
353 Roxa não foi identificada sua genealogia, no entanto, sabe-se que, assim como as demais, teve  
354 origem no Brasil e pertence ao grupo japônica/indica. BRS Colosso e BRSMG Conai não

355 diferiram em nenhum loco analisado. O genótipo Cana Roxa apresentou heterozigidade  
 356 para o loco LOC\_OS02g41590 (3), o que não foi observado nos demais genótipos deste  
 357 grupo, enquanto que em BRS Liderança não foi detectada presença do loco  
 358 LOC\_OS09g38700 (16).



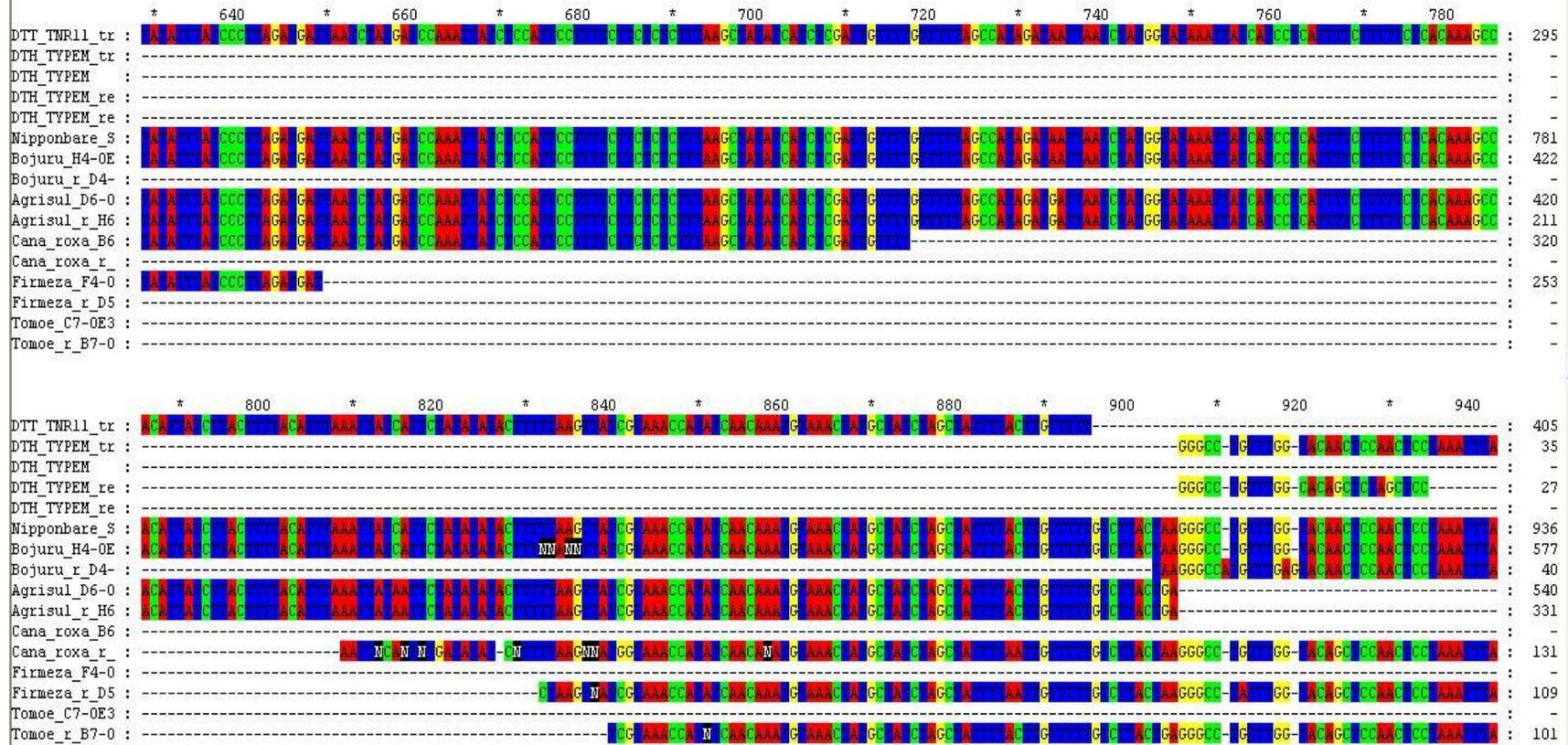
359

360 **Figura 6** – Dendrograma gerado pelo método UPGMA para a representação das distâncias  
 361 genéticas, entre 30 genótipos de arroz, obtidas pelo coeficiente de Rogers-W para 12  
 362 marcadores baseados em genes de resposta à salinidade associados a elementos de  
 363 transposição.

364 Os genótipos BRS Firmeza e IRGA 413 ficaram em grupos isolados, formando os  
 365 grupos II e V, respectivamente. Para IRGA 413 foram encontradas as maiores medidas de  
 366 distância em todas as combinações. Este genótipo não apresentou amplificação nos locos  
 367 LOC\_OS03g14654(4), LOC\_OS11g06720(19) e LOC\_OS04g38270 (21), além de apresentar  
 368 um alelo de tamanho diferente aos demais genótipos no loco LOC\_OS01g41880 (6), o que

369 permite inferir que as maiores distâncias genéticas observadas para este genótipo na matriz de  
370 similaridade sejam em virtude destas diferenças. Por outro lado, não foram observadas  
371 ampliações no genótipo BRS Firmeza para os seguintes locos: LOC\_OS08g20544(20),  
372 LOC\_OS07g39630(22), além de ser heterozigoto para o loco LOC\_OS02g41590(3), bem  
373 como IRGA 11, do qual é descendente. Por fim, este genótipo apresentou um alelo de  
374 tamanho menor ao esperado no loco LOC\_OS01g41880(6), visto que este genótipo não  
375 apresenta toda sequência do transposon Tc1-Mariner TNR11, o qual foi localizado na região  
376 *downstream* do gene candidato e estava inserido dentro do *amplicon* esperado (Figura 7).

377 No grupo III foram inseridos sete genótipos, dos quais cinco pertencem ao grupo  
378 japônica. Vale salientar, que com exceção de Tomoé Mochi, todos os demais genótipos  
379 pertencentes ao grupo japônica foram inseridos neste mesmo grupo, indicando eficiência dos  
380 marcadores utilizados para separar os genótipos de acordo com o grupo ao qual pertencem. O  
381 par BRS Bojuru e ORO apresentaram a menor distância genética (0,01) presente neste grupo  
382 e mostraram o mesmo perfil de amplificação para todos os locos analisados, inclusive para o  
383 loco LOC\_OS02g41590(3), para o qual foram heterozigotos. A heterozigosidade para este  
384 loco foi igualmente observada nos genótipos BRS Talento, Moti e Diamante, também  
385 pertencentes ao grupo III. Provavelmente, a estreita distância genética (0,28) observada entre  
386 Oro e Diamante se deva ao fato de que ambos são de origem chilena. Ainda no terceiro grupo,  
387 os genótipos Carolina e BRS Talento diferiram entre si apenas nos locos  
388 LOC\_OS06g48950(12), o qual não foi encontrado em BRS Talento e LOC\_OS02g41590(3),  
389 para o qual Carolina foi identificado como homozigoto, assim como Nipponbare.



**Figura 7** – Alinhamento entre os genótipos Nipponbare, BRS Bojuru, BRS Agrisul, Cana Roxa, BRS Firmeza e Tomoé Mochi para o loco LOC\_OS01g41880(6).

390 No grupo IV, foi inserido o maior número de genótipos, sendo um deles pertencente  
391 ao grupo japonica, quatro ao japonica/indica e 12 ao grupo indica, ressaltando que todos os  
392 genótipos do grupo indica, utilizados neste trabalho, foram inseridos no presente grupo. Os  
393 genótipos IRGA 412, IRGA 418, IRGA 416 e BRS Querência (subgrupo I), juntamente com  
394 o trio BRS 6 Chui, BRS Agrisul e BRS Ligeirinho (subgrupo II) e o par BRS 7 Taim e IRGA  
395 409 (subgrupo III), apresentaram a menor distância genética (0,01) observada na matriz  
396 dentro do quarto grupo.

397 Quanto ao perfil de amplificação apresentado, IRGA 412, IRGA 418, IRGA 416 e  
398 BRS Querência foram idênticos em todos os locos analisados, sendo o mesmo observado  
399 entre BRS 6 Chui, BRS Agrisul e BRS Ligeirinho, além de BRS 7 Taim e IRGA 409. Por  
400 outro lado, IRGA 409 e BRS 7 Taim diferiram do subgrupo I por não apresentarem  
401 amplificação nos locos LOC\_OS03g14654(4) e LOC\_OS04g38270(21) e do subgrupo II por  
402 serem homozigotos para o loco LOC\_OS02g41590(3), enquanto que os genótipos do  
403 subgrupo II, juntamente com BRS Atalanta e IRGA 428, são heterozigotos, além de  
404 apresentarem o loco LOC\_OS03g14654(4).

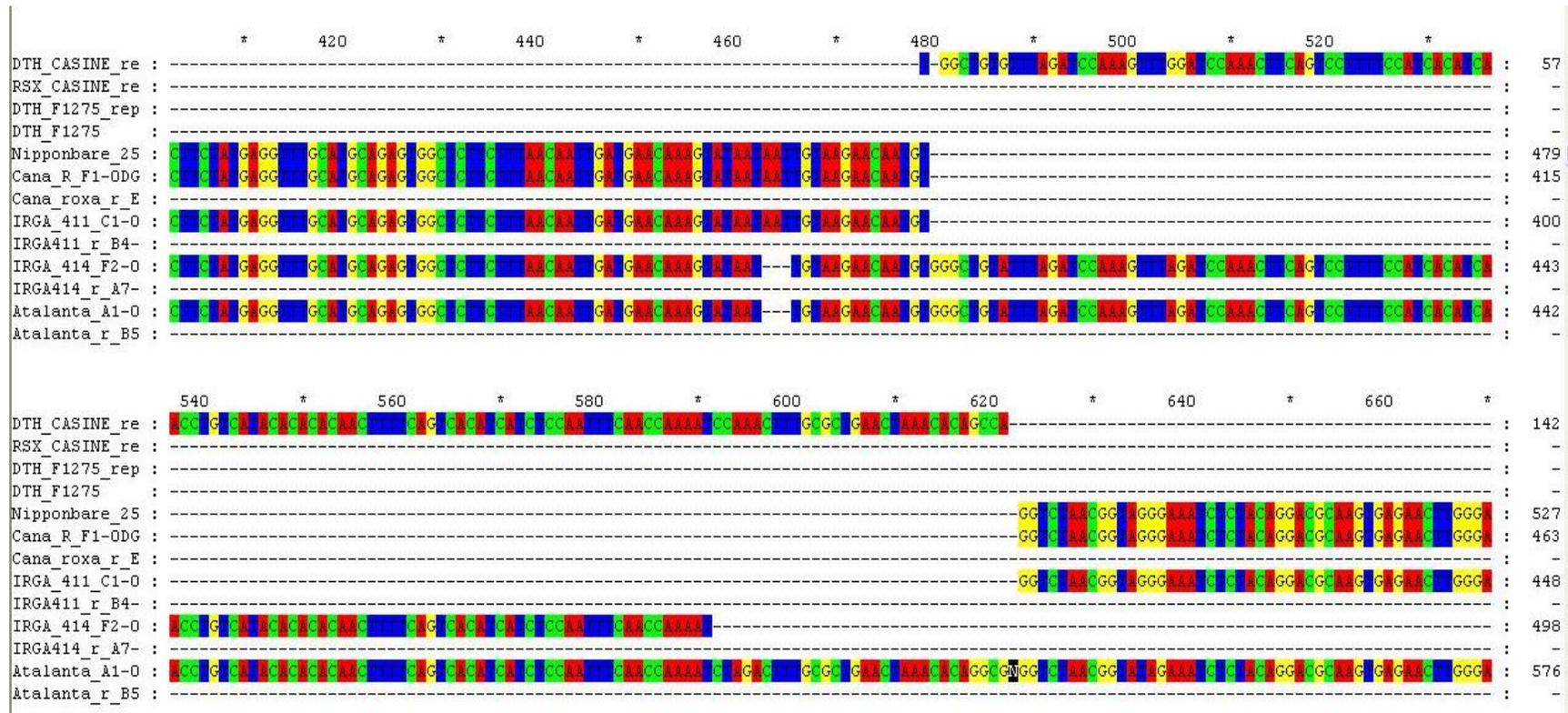
405 O genótipo BRS 6 Chui é procedente de uma seleção de uma planta lisa, de ciclo  
406 precoce, feita na cultivar IRGA 410, a qual, neste trabalho também foi inserida dentro do  
407 grupo IV. IRGA 410 e BRS 6 Chui apresentaram uma distância de 0,14 e diferiram apenas no  
408 loco LOC\_OS02g41590 (3), sendo a primeira homozigoto e a segunda heterozigota para este  
409 loco.

410 A partir do trabalho feito com a anotação de TEs dentro ou próximos aos genes  
411 candidatos, foi encontrado no loco LOC\_OS09g38700(15), na região gênica do gene, um TE  
412 classificado como *Tourist F1275*. Dessa forma, foi desenhado um par de *primers* para  
413 amplificar a região gênica do gene candidato. A amplificação deste fragmento mostrou

414 polimorfismos quanto ao tamanho do *amplicon*, sendo, para os genótipos IRGA 411 e BRS  
415 Atalanta, encontrados fragmentos de tamanho maior.

416 Para confirmar a origem do polimorfismo detectado, foram sequenciados os  
417 fragmentos dos genótipos IRGA 414 e BRS Atalanta (alelos maiores) e como controles foram  
418 escolhidos Nipponbare, Cana Roxa e IRGA 411 (alelos menores), os quais apresentam  
419 fragmentos iguais a todos os demais genótipos. A análise de sequenciamento mostrou a  
420 presença de um TE do tipo SINE *Casine*, que não havia sido identificado nos alinhamentos  
421 com o banco de dados GIRI REPBASE para este loco.

422 A Figura 8 mostra o resultado deste alinhamento, indicando a presença de um TE  
423 *Casine* apenas nos genótipos que apresentaram alelos maiores, IRGA 414 e BRS Atalanta.  
424 Por outro lado, a Figura 9 mostra outra parte do alinhamento para este mesmo loco e mesmos  
425 genótipos confirmando a presença, em todos os genótipos, do TE *Tourist F1275*, que havia  
426 sido identificado no processo de anotação de TEs.



**Figura 8** – Alinhamento entre os genótipos Nipponbare, Cana Roxa, IRGA 411, IRGA 414 e BRS Atalanta para o loco LOC\_OS09g38700(15).



## 427 **Discussão**

428 Os elementos transponíveis (TEs) são caracterizados como segmentos de DNA que  
429 possuem a capacidade de catalisar seu próprio movimento e inserir-se em novas regiões do  
430 genoma. Como consequência de sua atividade os TEs podem gerar alterações funcionais nos  
431 genes aos quais se associam. Quando inseridos dentro da região codificante de um  
432 determinado gene podem inativá-lo ou alterar seu produto. Quando inseridos dentro ou  
433 próximo a regiões promotoras podem alterar os padrões de expressão do gene (Kashkush *et*  
434 *al.*, 2003). Em decorrência dessa característica os TEs podem ser considerados uma fonte de  
435 variabilidade genética e, conseqüentemente, podem influenciar no funcionamento e evolução  
436 dos genomas.

437 De acordo com Grandbastien (2004) tem sido observada a ativação dos TEs em  
438 situações de estresse, tanto de origem biótica quanto abiótica. Se essa ativação dos TEs  
439 implica no aumento das taxas de mutação no genoma hospedeiro, isto é um indício de que  
440 podem atuar no processo de adaptação de seu organismo hospedeiro frente a pressões  
441 evolutivas. No presente estudo, foi avaliada a ocorrência e distribuição de TEs na região  
442 gênica, *downstream* e *upstream* de genes relacionados à salinidade e genes relacionados a  
443 outras respostas no genoma do arroz. Os resultados mostraram uma maior ocorrência de TEs  
444 na região *upstream*, seguida de *downstream* e gênica, bem como uma maior ocorrência em  
445 genes responsivos ao sal. Estes resultados levantam a hipótese de que estes TEs,  
446 principalmente os inseridos na região *upstream* e gênica, possam estar envolvidos na resposta  
447 de alguns destes genes frente ao excesso de salinidade, conferindo maior ou menor  
448 plasticidade adaptativa às plantas.

449 Hipótese semelhante foi avaliada por Singh *et al.* (2010), os quais constataram que o  
450 gene *OsGT61-1*, codificador de glicosiltransferase em arroz, é responsivo a ácido abscísico e  
451 NaCl. Ao avaliarem a região promotora deste gene encontraram dois TEs do tipo MITEs,

452 denominados *Gaijin* (144 pb) e *Wanderer* (211 pb), porém, constataram que a presença destes  
453 TEs influencia de forma negativa a expressão do gene.

454 Por outro lado, à menor incidência de TEs observada na região gênica, tanto de genes  
455 relacionados ao estresse quanto dos demais genes, pode ser explicada pela afirmação de Sakai  
456 *et al.* (2007), os quais indicam que 30% do genoma do arroz está composto por TEs e que é  
457 de se esperar que regiões gênicas contenham menos TEs, de modo a evitar a ruptura do gene.  
458 Estes mesmos autores, ao avaliarem a distribuição de TEs no genoma do arroz, verificaram  
459 que 10% dos 20507 genes avaliados portavam algum tipo de TEs em sua região gênica. Estes  
460 dados são superiores aos encontrados no presente trabalho quando comparado ao grupo de  
461 genes do genoma, dos quais 3,8% dos genes continham TEs na região gênica, porém,  
462 concordam com os 14% de regiões gênicas que apresentaram TEs no grupo de genes  
463 relacionados à salinidade.

464 No que se refere ao número de cópias identificado em cada tipo de TE, de forma geral,  
465 nossos dados indicam uma maior frequência de TEs da Classe II, *Tourist* e *Stowaway*,  
466 classificados como MITEs. TEs deste tipo não apresentam a capacidade de codificar enzima  
467 tranposase, necessárias para sua transposição. Desta forma, a existência de transposons que  
468 potencialmente podem codificar transposases funcionais e que compartilham similaridade de  
469 sequência com alguns MITEs, levou a hipótese de que estes MITEs podem ser sequências  
470 remanescentes, derivadas de deleções de transposons, que são mobilizadas em “trans” pelas  
471 transposases codificadas pelos transposons (Feschotte *et al.* 2002). Segundo Zhang *et al.*  
472 (2001), os MITEs do tipo *Tourist* são derivados de transposons *PIF/Harbinger* e, os do tipo  
473 *Stowaway* derivados de *Tc1-Mariner*. Os MITEs se caracterizam por apresentarem sequências  
474 curtas (menores que 600 pb), pelo alto número de cópias e por estarem inseridos,  
475 preferencialmente, em regiões próximas a genes (Grzebelus *et al.*, 2009). Esta última  
476 característica pode ser confirmada pelos resultados obtidos no presente trabalho, onde foi

477 identificado um grande número de cópias de MITEs nas regiões próximas tanto a genes  
478 responsivos ao sal quanto a genes aleatórios. Assim, devido o seu alto potencial de  
479 duplicação, os eventos de transposição dos MITEs podem ser uma importante fonte de  
480 variabilidade alélica.

481 Por outro lado, nossos resultados indicam uma baixa incidência de cópias de TEs da  
482 Classe I. Estes dados corroboram a afirmação de Jiao e Deng (2007), de que uma pequena  
483 fração de retrotransposons no genoma do arroz está associada a genes e de que pouco se sabe  
484 sobre a conservação desses retrotransposons em diferentes cultivares de arroz, bem como,  
485 sobre sua origem e evolução (Xu e Ramakrishna, 2008).

486 Em relação à caracterização de genótipos de arroz com a utilização de marcadores  
487 relacionados a genes responsivos ao sal e TEs, os dados apresentados neste estudo evidenciam  
488 que estes marcadores, os quais geraram apenas 27 alelos polimórficos, foram eficientes na  
489 separação dos genótipos com base no grupo ao qual pertencem, no entanto, um número maior  
490 de marcadores seria mais eficiente para separar os genótipos de acordo com a resposta à  
491 salinidade. Em estudos anteriores, o genótipo BRS Colosso, foi considerado como promissor  
492 para cruzamentos em programas de melhoramento dirigidos à tolerância à salinidade, pois  
493 mostrou tolerância ao sal na fase vegetativa do desenvolvimento (dados não apresentados).  
494 Da mesma forma, o genótipo BRS Bojuru é considerado material de referência com relação à  
495 tolerância à salinidade pelo Programa de Melhoramento de Arroz Irrigado da EMBRAPA. No  
496 entanto, estes dois genótipos não foram agrupados juntos, pelo sistema de marcadores  
497 utilizado neste experimento. Neste mesmo sentido, o genótipo ORO, caracterizado como  
498 sensível a salinidade, apresentou, em relação à BRS Bojuru, uma das menores distâncias  
499 genéticas observadas. O mesmo foi observado para o genótipo BRS Pelota, caracterizado  
500 como tolerante à salinidade na fase reprodutiva por Scivittaro *et al.* (2010), e que no  
501 agrupamento gerado neste experimento apresentou-se distante geneticamente de BRS Bojuru.

502 Por outro lado, o genótipo BRS Querência, descrito como moderadamente sensível à  
503 salinidade (Scivittaro *et al.* 2009), foi inserido em um grupo separado de BRS Bojuru e BRS  
504 Colosso (tolerantes) e no mesmo grupo que BRS 7 Taim, BRS Agrisul e BRS Ligeirinho  
505 previamente descritas como sensíveis ao estresse salino (Lima *et al.*, 2004). Ainda neste  
506 sentido, Brondani *et al.* (2006), ao caracterizar genótipos de arroz com marcadores SSR,  
507 observou alta similaridade genética entre BRS Colosso e BRS Liderança, o que também foi  
508 observado em nossos resultados.

509 Um grande número de pesquisas tem sido realizado para a caracterização das  
510 diferentes subespécies e cultivares de arroz baseada no polimorfismo originado pela inserção  
511 de TEs, como por exemplo, os marcadores RBIPs, baseados no polimorfismo pela inserção de  
512 retrotransposons. Huang *et al.* (2008) obtiveram sucesso na caracterização das subespécies de  
513 arroz *japonica* e *indica* baseada em marcadores de tipo RBIPs. Em nosso estudo foi proposta  
514 uma metodologia baseada na predição *in silico* de regiões genômicas contendo genes  
515 candidatos e elementos de transposição, envolvidos na tolerância à salinidade e, na  
516 amplificação destes locos específicos do genoma, diferente de sistemas do tipo RBIPs que  
517 buscam identificar o maior número possível de cópias de determinado TE. No entanto,  
518 embora não tenha sido o principal foco do trabalho, nosso sistema mostrou-se, assim como o  
519 sistema RBIPs, eficiente na caracterização de subespécies de arroz e na identificação de  
520 polimorfismos provenientes de inserções de TEs, conforme observado para as cultivares  
521 IRGA 414 e BRS Atalanta, em relação aos demais genótipos analisados, no loco  
522 LOC\_OS09g38700(15) e em BRS Firmeza no loco LOC\_OS01g41880(6).

523

524

525

526

**527 Conclusões**

- 528 1. A partir do trabalho de anotação de genes responsivos à salinidade e elementos de  
529 transposição nas regiões destes genes, se conclui que há uma alta incidência de  
530 TEs, principalmente *Tourist* e *Stowaway*, associados a genes envolvidos na  
531 resposta à salinidade, principalmente nas regiões *upstream* e *downstream*;
- 532 2. Aparentemente, há maior número de cópias de TEs em regiões de genes  
533 relacionados ao estresse, quando comparado com outros genes do genoma do  
534 arroz;
- 535 3. O sistema de marcadores moleculares adotado é eficiente para agrupar genótipos  
536 de arroz em relação aos grupos de subespécies, porém, para agrupá-los em relação  
537 ao nível de tolerância à salinidade, recomenda-se o uso de mais marcadores, que  
538 possibilitem a detecção de mais locos polimórficos.

539

**540 Referências**

- 541 Brondani C, Caldeira KS, Borba TCO, Rangel PN, Morais OP, Castro EM, Rangel, PHN,  
542 Mendonça JN, Brondani RV (2006) Genetic variability analysis of elite upland rice genotypes  
543 with SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 6:9-17.
- 544 Cheng-Jiang R., Teixeira da Silva A, Mopper S, Qin P, Lutts S (2010) Halophyte  
545 Improvement for Salinized World. *Critical Review in Plant Sciences* 29:329-359.
- 546 Devos KM, Ma J, Pontaroli AC, Pratt LH, Bennetzen JL (2005) Analysis and mapping of  
547 randomly chosen bacterial artificial chromosome clones from hexaploid bread wheat.  
548 *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:19243–19248.
- 549 Feschotte C, Jiang N, Wessler SR (2002) Plant transposable elements: where genetics meets  
550 genomics. *Nature Reviews Genetics* 3:329–341.

- 551 Feschotte C (2008) Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nature*  
552 *Reviews Genetics* 9:397-405.
- 553 Finnegan DJ (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in*  
554 *Genetics* 5:103-107.
- 555 Grandbastien MA (2004) Stress activation and genomic impact of plant retrotransposons.  
556 *Journal of Social Biology* 198:425-432.
- 557 Grzebelus D, Gladysz M, Macko-Podgórn A, Gambin T, Golis B, Rakoczy, Gambin A  
558 (2009) Population dynamics of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in  
559 *Medicago truncatula*. *Gene* 448:214-220.
- 560 Huang X, Lu G, Zhao Q, Liu X, Han B (2008) Genome-Wide Analysis of Transposon  
561 insertion Polymorphisms Reveals Intraspecific Variation in Cultivated Rice. *Plant Physiology*  
562 148:25-40.
- 563 Jiao Y, Deng XW (2007) A genome-wide transcriptional activity survey of rice transposable  
564 element-related genes. *Genome Biology* 8, R28.
- 565 Kashkush K, Feldman M., Levy AA (2003) Transcriptional activation of retrotransposons  
566 alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature genomics* 33:102-106.
- 567 Krishnan A, Guiderdoni E., An G, Hsing YI, Han CD, Lee MC, Yu SM, Upadhyaya N,  
568 Ramachandran S, Zhang Q, Sundaresan V, Hirochika H, Leung H, Pereira A (2009) Mutant  
569 resources in rice for functional genomics of the grasses. *Plant Physiology* 149:165-170.
- 570 Kumari S, Sabharwal VP, Kushwaha HR, Sopory SK, Singla-Pareek, SL, Pareek A (2009)  
571 Transcriptome map for seedling stage specific salinity stress response indicates a specific set  
572 of genes as candidate for saline tolerance in *Oryza sativa* L. *Functional and Integrative*  
573 *Genomics* 9:109-123.
- 574 Lima, MGS, Lopes NF, Bacarin MA, Mendes CR (2004) Effect of salt stress on pigments and  
575 proline concentration in leaves of rice. *Bragantia* 63:335-340.

- 576 Rogers JS (1972) Measures of genetic similarity and genetic distance. Austin: University of  
577 Texas Publication (Studies in genetics, 7).
- 578 Sakai H, Tanaka T, Itoh T (2007) Birth and death of genes promoted by transposable  
579 elements in *Oryza sativa*. *Gene* 392:59-63.
- 580 Sasaki T, Burr B (2000) International Rice Genome Sequencing Project: the effort to  
581 completely sequence the rice genome. *Current Opinion in Plant Biology*.3:138-141.
- 582 Singh A, Singh U, Mittal D, Grover A (2010) Transcript expression and regulatory  
583 characteristics of a rice glycosyltransferase *OsGT61-1* gene. *Plant Science* 179:114-122.
- 584 Walia H, Wilson C, Condamine P, Liu X, Ismail AM, Zeng L, Wanamaker SI, Mandal J, Xu  
585 J, Cui X, Close TJ (2005) Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice  
586 genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiology* 2:822-  
587 835.
- 588 Weising K, Nybom, H, Wolff K., Kahal, G (2005). *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi:*  
589 *Principles, Methods and Applications*. 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press, London, 444p.
- 590 Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P,  
591 Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Shulman AH (2007) A unified classification  
592 system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics* 8:973-982.
- 593 Wright S. (1978) *Evolution and the genetics of populations: variability within and among*  
594 *natural populations*. Chicago: University of Chicago Press, v. 4.
- 595 Xu Z, Ramakrishna W (2008) Retrotransposon insertion polymorphisms in six rice genes and  
596 their evolutionary history. *Gene* 412:50-58.
- 597 Zhang X, Feschotte C, Zhang Q, Jiang N, Eggelston W, Wessler SR. (2001) P instability  
598 factor: an active maize transposon system associated with the amplification of *Tourist*-like  
599 MITEs and a new superfamily of transposases. *Proceedings of the National Academy of*  
600 *Sciences* 98:12572-12577.

**Tabela S1** - Lista de genótipos com respectivos grupo e genealogia

Genótipo	Grupo	Genealogia
BRS Colosso	Japonica/indica	Kaybonnet/Aimoré (origem Brasil)
BRSMG Conai	Japonica/indica	Confiança/Aimoré (origem Brasil)
Cana Roxa	Japonica/indica	N.I. <sup>1</sup> (origem Brasil)
BRS Liderança	Japonica/indica	Kaybonnet/CNA 7119 (origem Brasil)
BRS Querência	Japonica/indica	CL 246/Zho Fee N10 (origem Brasil)
BRS 7 Taim	Japonica/indica	Contém genes da cultivar Tetep (origem Brasil)
BRS Atalanta	Japonica/indica	Dawn/Hayayuki//IRGA 410//Colombia 1 (origem Brasil)
BRS Talento	Japonica/indica	CT7244-9-1-5-3/CT6196-33-11-1-3//CT6946-2-5-4-4-2-M (origem Brasil)
IR 8	Japonica/indica	Peta 5/Belle Patna (origem Filipinas)
Tomoé Mochi	Japonica	N.I. (origem Japão)
Moti	Japonica	N.I. (origem Brasil)
BRS Bojuru	Japonica	N.I. (origem Brasil)
Oro	Japonica	N.I. (origem Chile)
Nipponbare	Japonica	N.I. (origem Japão)
Diamante	Japonica	Blue Rose/RB2//Balilla//Agostano/P6 (origem Chile)
BRS Firmeza	Japonica/Indica	IRGA 411/Bluebelle (origem Brasil)
BRS 6 Chui	Indica	Seleção IRGA 410 (origem Brasil)
BRS Ligeirinho	Indica	IR 930-53/IR 665-31-2-4 (origem Brasil)
BRS Agrisul	Indica	BRS Ligeirinho/IRGA 409 (origem Brasil)
BRS Pelota	Indica	Seleção IRGA 410 (origem Brasil)
IRGA 412	Indica	IR 930-2/IR 665-31-2-4 (origem Brasil)
IRGA 418	Indica	IRGA 412/Cica 9//IRGA 409 (origem Brasil)
IRGA 410	Indica	IR 930-53/IR 665-31-2-4 (origem Brasil)
IRGA 428	Indica	IRGA 420/CL (origem Brasil)
IRGA 411	Indica	Dawn/IRGA 407 (origem Brasil)
IRGA 409	Indica	IR 930-2/IR 665-31-2-4 (origem Brasil)
IRGA 416	Indica	IR 841-67-1/IRGA 409 (origem Brasil)
IRGA 414	Indica	IR 930-2/IR 665-31-7-4 (origem Brasil)
IRGA 413	Indica	IR 930-2/IR 665-31-2-4 (origem Brasil)
Carolina	Arroz Americano	N.I. (origem USA)

<sup>1</sup>N.I. Não identificado.

**Tabela S2** - Lista de *primers* utilizados

Gene (loco)	Possibilidade de <i>Amplicon</i>	Sequência	<i>Amplicon</i>
LOC_OS03g14654(1)	4 ( <i>downstream</i> )	PF: CGTACCATCTGCACCCGCTCTGAA PR: AGTGGTGCAGCCGAACACACCT	989 pb
LOC_OS03g44500 (2)	3	PF: CGTAACAAGGCCAGGGCCTCGAG PR: CCTCCACCTGGGGTTCGGTTGC	1987 pb
LOC_OS02g41590 (3)	3	PF: TGTTAGCGGCAGCATGCTCAGC PR: TTACCCTCCCGGCTTACTGG	1899 pb
LOC_OS03g14654 (4)	2	PF: GCCGGTGTGGCATGGGTT PR: CACCCAACCACCACCCTCAATT	1352 pb
LOC_OS06g48950 (5)	4 ( <i>downstream</i> )	PF: ATTCGGCAGCAAAGCGTGGGT PR: GGCCCATGTTTTCCAGCCCTCGA	1162 pb
LOC_OS01g41880 (6)	1	PF: CTCCGCTGTCGGCCATCATCC PR: AAGCGCAGTTTCCCGGCTTGG	1549 pb
LOC_OS07g39630(7)	4 ( <i>downstream</i> )	PF: GGCAATATCCGAAGGCCCGCCA PR: AAGTACCAGGGGCCAGGCAA	1490 pb
LOC_OS07g07050 (8)	5	PF: TCTTGGCTGGTAAGCCAACCG PR: GCACGGGGTACCGACCGATC	1401 pb
LOC_OS08g10020 (9)	3	PF: GAAGCCCGGTGGTTCCTGCAG PR: ATTGAGGTGGCATGTCAGTCGA	1204 pb
LOC_OS08g10020 (10)	2	PF: TCTTCCCACCGCTGCAGACGA PR: TGGGGATTTGGGGTGGGGTACA	1318 pb
LOC_OS01g43870 (11)	1	PF: GCAGTCGTCGCCATGGCTTGTA PR: GCCGTACAATGCGGCCCACTAA	2229 pb
LOC_OS06g48950 (12)	4 ( <i>upstream</i> )	PF: CGTTTTGCGCGTGAACCCCA PR: ATTGCCCCCTTGCTAGCTGCC	2319 pb
LOC_OS03g14654(13)	4 ( <i>upstream</i> )	PF: GAGGTTGGCAGCGAACGCACA PR: CAGCGTCCCCATACGTACGAGC	2461 pb
LOC_OS02g57450(14)	4 ( <i>upstream</i> )	PF: GCTGGCTGATCTGCACGCATGT PR: CGTCTGGGGCACGGTGACTGA	2374 pb
LOC_OS09g38700 (15)	3	PF: CCAAGCTGCGCCATACAAATATC PR: GCTGCAGTGATTGAGTGCACCCA	2206 pb
LOC_OS09g38700 (16)	2	PF: GCACGCATTTGCATCTCCGCA PR: AACCACATTTGGTGGGAAGCTGGT	1895 pb
LOC_OS01g41880(17)	4 ( <i>downstream</i> )	PF: GCCTGAGCCGTTGTGCGGTA PR: GCAATGGACAAAACAGTCGGCCA	2266 pb
LOC_OS07g39630(18)	1	PF: CAAACCGAAGCAAGCTTCTCCGA PR: CCACCAGATGAATTGGACGGGAA	2030 pb
LOC_OS11g06720(19)	4 ( <i>upstream</i> )	PF: TGTACAGTAAAGCAGTGGCCTGT PR: GAGACCCACTGGCCAGGGAGA	2127 pb
LOC_OS08g20544 (20)	1	PF: GGCTACTCACACCGGCTCATTGC PR: ATGTGATGGGCAAGGCTGACCCA	2025 pb
LOC_OS04g38270 (21)	3	PF: TCGCTACGCTTGCTTGGTGCA PR: TCCCCACGAGCGGTGGAATGTA	1645 pb
LOC_OS07g39630 (22)	2	PF: GCAGTGCCACACCATCTGATT PR: CAGCTCCGCTCGGATGGTACGT	1497 pb

\*Todos os *primers* funcionaram a uma temperatura de anelamento de 65°C.

\* Número entre parênteses corresponde ao número do *primer*.

**Tabela S3** – Classificação, segundo Wicker *et al.* (2007), dos TEs encontrados nos 14 genes candidatos e o número de cópias detectado

Classe	Sub Classe	Ordem	Superfamília	Subfamília	Código	Estrutura	Cópias
I	N/E	LTR retrotransposon	COPIA	COPIA18	RLC	LTR Retrotransposon	1
I	N/E	LTR retrotransposon	GYPSY	GYPSY-B	RLG	LTR Retrotransposon	1
I	N/E	LTR retrotransposon	TRUNCATOR	TRUNCATOR2	N.I. <sup>1</sup>	LTR Retrotransposon	1
I	N/E	LINE retrotransposon	N.I.	OSLINE-05	RIX	Non LTR Retrotransposon	1
I	N/E	LINE retrotransposon	N.I.	OSLINE1-2 ZM	RIX	Non LTR Retrotransposon	1
I	N/E	LINE retrotransposon	N.I.	OSLINE1-5	RIX	Non LTR Retrotransposon	1
I	N/E	SINE retrotransposon	N.I.	P-SINE1_OS	RSX	Non LTR Retrotransposon	1
I	N/E	SINE retrotransposon	N.I.	CASINE	RSX	Non LTR Retrotransposon	1
I	N/E	SINE retrotransposon	N.I.	SINE03 OS	RSX	Non LTR Retrotransposon	2
I	N/E	SINE retrotransposon	N.I.	SINE9 OS	RSX	Non LTR Retrotransposon	3
II	1	TIR	hAT	DS-RICE4N	DTA	Transposon	1
II	1	TIR	hAT	JOUZHENA	DTA	Transposon	1
II	1	TIR	hAT	TESS	DTA	Transposon	1
II	1	TIR	CACTA	CACTA-N	DTC	Transposon	1
II	1	TIR	MUTATOR	MERMITE-17	DTM	Transposon	1
II	1	TIR	MUTATOR	MERMITE18B	DTM	Transposon	2
II	1	TIR	MUTATOR	MuDR CLOUD-6	DTM	Transposon	1
II	1	TIR	MUTATOR	SETARIA1	DTM	Transposon	1
II	1	TIR	MUTATOR	TELIA	DTM	Transposon	1
II	1	TIR	Tc1-MARINER	TNR11	DTT	Transposon	2
II	1	TIR	N.I.	OSTE7	N.I.	Transposon	2
II	1	TIR	N.I.	TYPEU2	N.I.	Transposon	1
II	1	N.I.	N.I.	MICROPON-LIKE-1	N.I.	N.I.	2
II	1	TIR	MUTATOR	MDM2	DTM	MITE	1
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST F1275	DTH	MITE	1
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST F569	DTH	MITE	1
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST OLO24	DTH	MITE	3

II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST OLO24C	DTH	MITE	2
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST SUSU	DTH	MITE	1
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST YOUREN	DTH	MITE	1
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST Amy/LTP	DTH	MITE	2
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST CASTAWAY	DTH	MITE	1
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST COWARD-2	DTH	MITE	1
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST DITTO	DTH	MITE	2
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST DITTO-2	DTH	MITE	1
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST EXPLORER	DTH	MITE	1
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST GAIJIN	DTH	MITE	2
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST TYPEN	DTH	MITE	4
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST WANDERER	DTH	MITE	5
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST TOURIST-XV	DTH	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY1 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY2 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY8 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY9 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY10 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY11 OS	DTT	MITE	3
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY13 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY14 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY17 OS	DTT	MITE	2
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY18 OS	DTT	MITE	3
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY20 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY21 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY29 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY34 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY41 OS	DTT	MITE	10
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY43 OS	DTT	MITE	3

II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY47 OS	DTT	MITE	2
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY48 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY51 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY_TREP215	DTT	MITE	3
II	2	HELITRON	HELITRON	Helitron RPO OS	DHH	-	1

<sup>1</sup> Não Identificado.

**Tabela S4** – Classificação, segundo Wicker *et al.* (2007), dos TEs encontrados nos 14 genes aleatórios e o número de cópias detectado

Classe	Sub Classe	Ordem	Superfamília	Subfamília	Código	Estrutura	Cópias
I	N/E	SINE retrotransposon	N.I.	SINE9 OS	RSX	Non LTR Retrotransposon	1
II	1	TIR	CACTA	CACTA-N	DTC	Transposon	1
II	1	TIR	MUTATOR	MERMITE18B	DTM	Transposon	4
II	1	TIR	Tc1-MARINER	TNR11	DTT	Transposon	3
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST OLO24	DTH	MITE	3
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST OLO24C	DTH	MITE	8
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST YOUREN	DTH	MITE	2
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST EXPLORER	DTH	MITE	2
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST GAJJIN	DTH	MITE	1
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST WANDERER	DTH	MITE	2
II	1	TIR	HARBINGER	TOURIST TOURIST-XV	DTH	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY2 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY9 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY10 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY17 OS	DTT	MITE	2
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY21 OS	DTT	MITE	1
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY41 OS	DTT	MITE	4
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY51 OS	DTT	MITE	2
II	1	TIR	MARINER	STOWAWAY_TREP215	DTT	MITE	3
II	2	HELITRON	HELITRON	Helitron RPO OS	DHH	-	2



