



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA
DOUTORADO EM FITOTECNIA

LISIANE LUCENA BEZERRA

**INDICADORES FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM
CÁRTAMO (*Carthamus tinctorius* L.) SUBMETIDO AO ESTRESSE SALINO E
DÉFICIT HÍDRICO**

MOSSORÓ/RN

2015

LISIANE LUCENA BEZERRA

**INDICADORES FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM
CÁRTAMO (*Carthamus tinctorius* L.) SUBMETIDO AO ESTRESSE SALINO E
DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada ao Doutorado em Agronomia: Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia/Fitotecnia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Sc. Cristiane Elizabeth Costa de Macêdo

MOSSORÓ/RN

2015

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data da defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)

Setor de Informação e Referência

B574i Bezerra, Lisiane Lucena.

Indicadores fisiológicos, bioquímicos e moleculares em Cártamo *Carthamus tinctorius* L. submetido ao estresse salino e déficit hídrico / Lisiane Lucena Bezerra. - Mossoró, 2016. 99f: il.

Orientador: Prof. Dra. Cristiane Elizabeth Costa de Macêdo

Tese (DOUTORADO EM FITOTECNIA) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação.

1. *Carthamus*. 2. Ajustamento osmótico. 3. Estresse salino - tolerância. 4. Status hídrico - plantas. 5. Indicadores de crescimento - solutos orgânicos e inorgânicos. I. Título

RN/UFERSA/BOT /023

CDD: 583.99

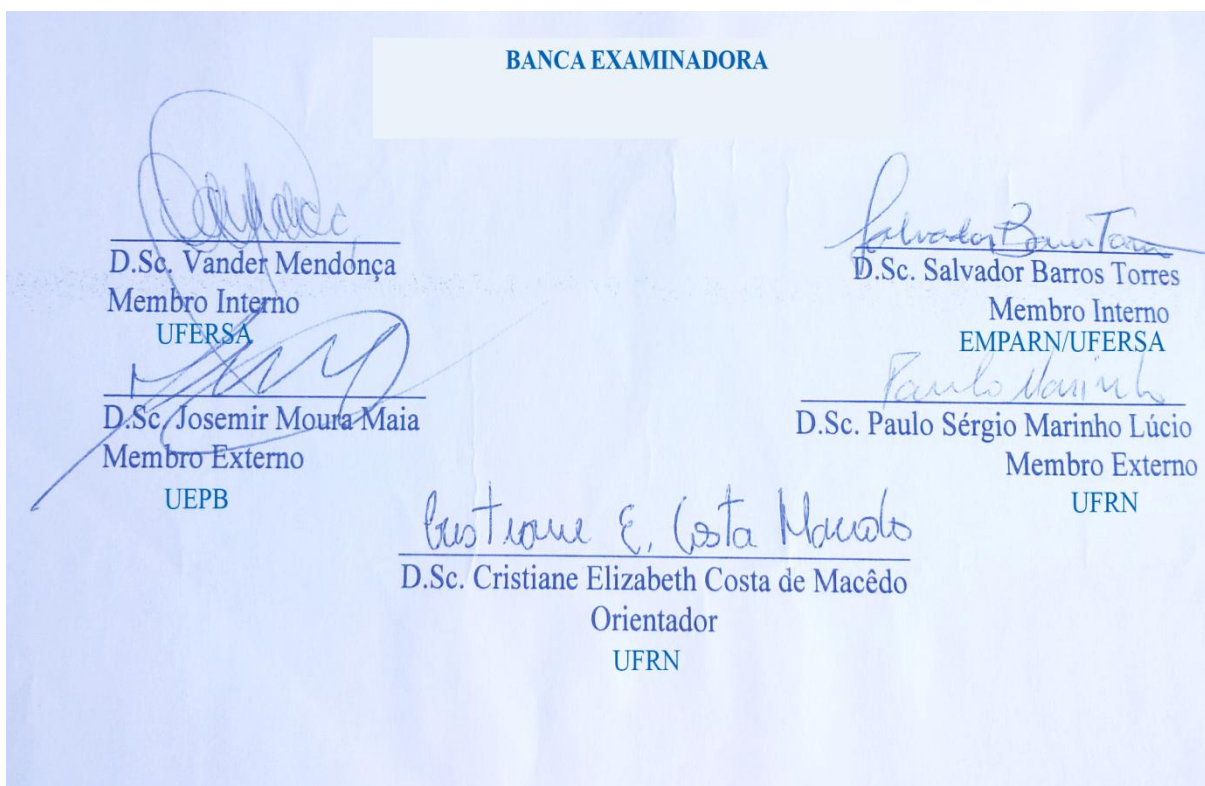
Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza Borba

LISIANE LUCENA BEZERRA

**INDICADORES FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM
CÁRTAMO (*Carthamus tinctorius* L.) SUBMETIDO AO ESTRESSE SALINO E
DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada ao Doutorado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia/Fitotecnia.

Aprovada em: 29/06/2015.



*À minha filha,
Cecília Lucena Bezerra de Melo,
por ser o meu porto seguro sempre.
Te Amo!*

Dedico

*Aos meus pais Francisco (Pêco) e Francisca
(Chikuta), aos meus avós Antônio (Tôzin) e
Maria, ao meu tio Sales e sua esposa Nazaré
e ao meu esposo Marcos.*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, único digno de honra e glória, por estar comigo sempre, e me amparar nos momentos mais difíceis, iluminando minha vida e meu caminho.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) pela qualidade de ensino e pesquisa; ao curso de Pós-graduação em Fitotecnia pela oportunidade; ao coordenador do curso Prof. Dr. Vander Mendonça pelo apoio; e a todos os professores e funcionários do programa;

A minha querida orientadora Prof^a Dra. Cristiane Elizabeth Costa de Macêdo, pela dedicação, apoio e incentivo. Obrigada pelos ensinamentos, por aceitar me orientar no mestrado e doutorado, e por me acolher durante todos esses anos, com seus ensinamentos e principalmente com paciência. A senhora, serei eternamente grata.

À UFRN e ao Laboratório de Estudos em Biotecnologia Vegetal (LaBioTec), pelo acolhimento ao desenvolver essa pesquisa; E ao secretário Francisco (Fran) pela disponibilidade de sempre ajudar.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Marinho Lúcio por contribuir com seus ensinamentos e em parte desta pesquisa, e por ceder seu laboratório para realizar parte da pesquisa. Obrigada pela paciência, incentivo, apoio e positividade.

Ao Prof. Dr. Josemir Moura Maia por seus ensinamentos, acessibilidade, disponibilidade e contribuição na minha vida acadêmica.

Ao Projeto MES/CUBA e ao Prof. Dr. Loiret Fernández García pela contribuição na realização de parte desta pesquisa.

À banca examinadora (Prof. D. Sc. Paulo Sérgio Marinho Lúcio, D. Sc. Josemir Moura Maia, D. Sc. Salvador Barros Torres e D. Sc. Vander Mendonça), pela disponibilidade e contribuir com o nosso trabalho;

À equipe de pesquisa do LaBioTec, Yuri, Cibelle e Monique, não tenho como descrever a ajuda de vocês na minha vida acadêmica. Obrigada pela amizade, companheirismo, dedicação e carinho. E aos demais integrantes do laboratório, Ana Paula, Danilo, Hudson, Adna, Renata, Bruno, Denilson, Hanieri, Ciro, Paula e Demétrios, obrigada pela ajuda na pesquisa e pelos momentos de descontração.

Aos meus pais, Francisco Bezerra e Francisca Bezerra, pelo amor e educação que me concederam, e aos meus irmãos, Lariano, Lariely, Léverton e Layane pelo carinho e incentivo.

Aos meus avós paternos, Antônio Biserra Cavalcante (Tôzin) e Maria Xavier da Conceição, e maternos, Aida Lima de Araújo e Gester de Sá Lucena (*in memoriam*) pelo amor, compreensão e apoio nessa jornada.

Ao meu tio Sales Bezerra e a sua esposa “Mamãe Nazaré”, por cuidarem de Cecília como se fosse uma filha. E aos primos-irmãos, Sarajane, Sário e Sales Jr., pelo amor e carinho. Serei eternamente grata. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Ao meu esposo, Marcos Vieira de Melo Sobrinho, pelo amor, paciência, compreensão, dedicação e incentivo. Por ser esse pai maravilhoso e dedicado, e acima de tudo, por ser pai e mãe, da nossa filha, nos momentos que estive ausente.

Ao meu sogro (Neto), minha sogra (Dulce), e aos cunhados (Michele e Marlon), pela compreensão e apoio.

À minha filha, Cecília Lucena Bezerra de Melo, razão do meu viver, te dedico toda luta e esforço. Esse mérito é por você, pra você!

À Cibelly, Monique e Damiana, pelo acolhimento, companheirismo e por me receber na casa de vocês durante minha estadia em Natal. À vocês, meu carinho e minha gratidão.

As amigas Doralice e Dalila, pelo apoio, incentivo, carinho e por sempre acreditarem em mim.

Agradeço aos familiares, amigos, e todos que contribuíram direta e/ou indiretamente para concretização deste trabalho.

Muito Obrigada!

*Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades...
Lembraí-vos de que as grandes proezas da história foram
conquistas do que parecia impossível.*

Charlie Chaplin

RESUMO

BEZERRA, Lisiane Lucena. **Indicadores fisiológicos, bioquímicos e moleculares em cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) submetido ao estresse salino e déficit hídrico.** 2015. 99f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

O *Carthamus tinctorius* L. vem se destacando nas pesquisas por ser uma espécie promissora para produção de biodiesel, ter boa adaptação a regiões de baixa pluviosidade, além de ser considerada uma cultura moderadamente tolerante a salinidade, podendo ser cultivada em diferentes regiões áridas e semiáridas do mundo. Como os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares implicados na tolerância e/ou susceptibilidade aos estresses salino e déficit hídrico ainda não estão plenamente compreendidos para *C. tinctorius*, este trabalho teve como objetivo observar os indicadores de crescimento e status hídrico, a possível contribuição dos solutos inorgânicos e orgânicos no ajustamento osmótico, e o comportamento da expressão dos genes P5CS e P5CR, enzimas de síntese da prolina e BADH, enzima de síntese da glicina-betaína, em folhas e raízes de cártamo submetido aos estresses salino e déficit hídrico. Plantas de *C. tinctorius* responderam de forma diferenciada aos estresses salino e hídrico, induzidos por soluções de NaCl (50 e 100 mM) e por soluções de PEG 6000 (-0,25 e -0,50 MPa), respectivamente. Os tratamentos com NaCl e PEG 6000 foram capazes de induzir alterações significativas nos indicadores de crescimento e status hídrico, nos conteúdos de solutos orgânicos e inorgânicos e ainda na expressão dos genes. Contudo a intensidade e tipo de resposta foram diferentes em relação aos estresses aplicados. Para as variáveis de crescimento e status hídrico, o cártamo mostrou-se mais sensível ao estresse hídrico, possivelmente devido aos íons salinos manter o potencial osmótico. Com relação aos solutos inorgânicos, e em relação ao controle, o estresse salino provocou aumento do conteúdo de Na⁺ nas folhas, sendo de 8 vezes nas plantas tratadas 100 mM de NaCl, e de 2 vezes nas raízes tratadas com 50 mM de NaCl. Já o déficit hídrico provocou acúmulo de K⁺ nas folhas das plantas tratadas com PEG 6000. A relação Na⁺/K⁺ foi maior que 0,6 indicando uma possível toxidez iônica. Os solutos orgânicos acumularam-se quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico. As folhas acumularam açúcares, proteínas, aminoácidos, prolina e glicina betaína, e as raízes acumularam proteínas, aminoácidos e glicina betaína. Tais efeitos, evidenciam um possível ajustamento osmótico. Quando tratadas com NaCl, as plantas mantiveram o conteúdo de solutos orgânicos em relação ao controle. Quanto a expressão dos genes P5CS, P5CR e BADH, o cártamo respondeu de forma diferenciada. O gene P5CS expressou-se apenas nas folhas de cártamo, e somente sob os estresses salino e hídrico severos (100 mM de NaCl e -0,50 MPa). E o gene P5CR expressou-se em todos os tratamentos submetidos, como também nas folhas e raízes. BADH se expressou nas folhas somente quando submetidas ao déficit hídrico, e nas raízes, houve expressão em ambos estresses (salino e déficit hídrico). Plantas de cártamo respondem de forma diferenciada aos efeitos da salinidade e déficit hídrico, mostrando que a resposta das plantas é tratamento, dose e órgão dependente.

Palavras-chave: Crescimento; ajustamento osmótico; expressão gênica.

ABSTRACT

BEZERRA, Lisiane Lucena. **Physiological, biochemical and molecular indicators in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) submitted to salt stress and drought.** 2015. 99f. Thesis (PhD in Agronomy/Plant Science) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

Carthamus tinctorius L. is promising specie for biodiesel production due to its better adaptation to low rainfall regions, moderate tolerance to salinity and good capacity to grow in different arid and semi-arid regions in the world. Meanwhile, its physiological, biochemical and molecular mechanisms involved in tolerance or susceptibility to salt and drought stresses are not yet fully understood. The aim of this work was to analyze growth and water status indicators as well as the possible contribution of inorganic and organic solutes in osmotic adjustment. Also, we have carried out semi-quantitative RT-PCR assays to detect P5CS, P5CR and BADH, enzymes involved in proline and glycine betaine pathways respectively in leaves and roots submitted to salt stress and drought. *C. tinctorius* responds differently to salt (50-100 mM NaCl) and water (-0.25 to -0.50 MPa PEG 6000) stresses. Treatments with NaCl and PEG 6000 have induced significant changes in growth, organic and inorganic solutes content and gene expression. However the intensity and type of response were different for each stress condition. Safflower was more sensitive to water stress. Salt stress has increased Na⁺ content in the leaves (8x in plants exposed to 100 mM NaCl and 2x in roots treated with NaCl 50 mM). Drought caused K⁺ accumulation in the leaves (Na⁺/K⁺ higher than 0.6) indicating a possible ionic toxicity. Organic solutes (sugar, protein, amino acid, proline and glycine betaine) have accumulated in leaves when submitted to water deficit as also in roots (proteins, amino acids and glycine betaine consider levels, and the roots accumulated proteins, amino acids and glycine betaine). Such effects show a possible osmotic adjustment. When treated with NaCl, the plants kept the content of organic solutes in the control. The gene marker expression shown that P5CS gene was expressed only in safflower leaves under salt and water severe stresses (100 mM NaCl and -0.50 MPa). P5CR was detected in all treatments and in the same level as well as in leaves and roots. BADH has been expressed in leaves only when subjected to drought. In roots, there was expression in both stresses (salt and water deficit). Safflower plants respond differently to the effects of salinity and water stress showing that plant response is treatment, dose and organ dependent.

Keywords: Growth; osmotic adjustment; gene expression

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Planta de cártamo (<i>Carthamus tinctorius</i> L.) | 20 |
| Figura 2 | Esquema da via metabólica da biossíntese de prolina a partir de glutamato em plantas | 24 |
| Figura 3 | Síntese da glicina betaína no cloroplasto | 25 |

CAPÍTULO II

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Folhas de <i>Carthamus tinctorius</i> L. do tratamento controle, escaneadas para aferição da área foliar | 43 |
|----------|--|----|

CAPÍTULO IV

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Expressão gênica de P5CS em folhas e raízes de cártamo submetidas aos estresses salino (S1, 50 mM de NaCl; S2, 100 mM de NaCl) e déficit hídrico (P1, -0,25MPa; P2, -0,50MPa) simulado pelo PEG 6000 | 94 |
| Figura 2 | Expressão gênica de P5CR em folhas e raízes de cártamo submetidas aos estresses salino (S1, 50 mM de NaCl; S2, 100 mM de NaCl) e déficit hídrico (P1, -0,25MPa; P2, -0,50MPa) simulado pelo PEG 6000 | 95 |
| Figura 3 | Expressão gênica de BADH em folhas e raízes de cártamo submetidas aos estresses salino (S1, 50 mM de NaCl; S2, 100 mM de NaCl) e déficit hídrico (P1, -0,25MPa; P2, -0,50MPa) simulado pelo PEG 6000 | 96 |

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO II

- Gráfico 1 A - Taxa de Crescimento Absoluto (TCA) e B - Taxa de Crescimento Relativo (TCR) em plantas de *Carthamus tinctorius* L., submetidas aos tratamentos submetidas Controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) durante 2 dias em cultivo hidropônico 47
- Gráfico 2 A - Razão da Área Foliar (RAF) e B - Área Foliar Específica (AFE) em plantas de *Carthamus tinctorius* L., submetidas aos tratamentos Controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) durante 2 dias em cultivo hidropônico 48
- Gráfico 3 A - Relação Peso Foliar (RPF), B - Relação Peso da Raiz (RPR) e C - Relação Raiz/Parte Aérea (RR/PA) em plantas de *Carthamus tinctorius* L., submetidas aos tratamentos Controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) durante 2 dias em cultivo hidropônico 50
- Gráfico 4 Conteúdo relativo de água (CRA) em folhas (A) e raízes (B), percentual de umidade (%U) em folhas (C) e raízes (D) de *Carthamus tinctorius* L., submetidas aos tratamentos Controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) durante 2 dias em cultivo hidropônico 52
- Gráfico 5 Vazamento de eletrólitos (VE) em folhas (A) e raízes (B) de *Carthamus tinctorius* L., submetidas aos tratamentos Controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) durante 2 dias em cultivo hidropônico 53

CAPÍTULO III

- Gráfico 1 Conteúdo de sódio (Na^+) em folhas - A e raízes - B, conteúdo de potássio (K^+) em folhas - C e raízes - D e relação sódio/potássio (Na^+/K^+) em folhas - E e raízes - F de *Carthamus tinctorius* L. submetido aos tratamentos: controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) 70
- Gráfico 2 Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST) em folhas - A e raízes - B de *Carthamus tinctorius* L. submetido aos tratamentos: controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa

| | | |
|-----------|---|----|
| | (PEG 1 e 2, respectivamente) | 73 |
| Gráfico 3 | Conteúdo de proteínas solúveis totais (PST) em folhas - A e raízes - B de <i>Carthamus tinctorius</i> L. submetido aos tratamentos: controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) | 74 |
| Gráfico 4 | Conteúdo de aminoácidos livres totais (AALT) em folhas - A e raízes - B de <i>Carthamus tinctorius</i> L. submetido aos tratamentos: controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) | 75 |
| Gráfico 5 | Conteúdo de prolina (PRO) em folhas - A e raízes - B de <i>Carthamus tinctorius</i> L. submetido aos tratamentos: controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) | 76 |
| Gráfico 6 | Conteúdo de glicina betaína (GB) em folhas - A e raízes - B de <i>Carthamus tinctorius</i> L. submetido aos tratamentos: controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) | 77 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Resumo de análise de variância das variáveis taxa de crescimento absoluto (TCA), taxa de crescimento relativo (TCR), razão da área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), razão do peso foliar (RPF), razão do peso radicular (RPR), razão do peso do caule (RPC) e relação raiz/parte aérea (RR/PA) em plantas de <i>Carthamus tinctorius</i> L. sob condições de estresse salino e déficit hídrico | 46 |
| Tabela 2 | Resumo de análise de variância das variáveis conteúdo relativo de água (CRA) em folhas e raízes, percentual de umidade (%U) em folhas e raízes vazamento de eletrólitos (VE) em folhas e raízes de <i>Carthamus tinctorius</i> L. em condições de estresse salino e déficit hídrico | 51 |

CAPÍTULO III

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Resumo de análise de variância das variáveis conteúdo de sódio (Na^+) em folhas e raízes, conteúdo de potássio (K^+) em folhas e raízes e relação sódio/potássio (Na^+/K^+) em folhas e raízes de <i>Carthamus tinctorius</i> L. sob condições de estresse salino e déficit hídrico | 69 |
| Tabela 2 | Resumo de análise de variância das variáveis Açúcares Solúveis Totais (AST), Proteínas Solúveis Totais (PST), Aminoácidos Livres Totais (AALT), Prolina (PRO) e Glicina-Betaína (GB) em folhas e raízes de <i>Carthamus tinctorius</i> L. sob condições de estresse salino e déficit hídrico | 72 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|--|----|
| Cap I | INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓTICO | |
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL | 18 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 20 |
| 2.1 | Aspectos Gerais do <i>Carthamus tinctorius</i> L. | 20 |
| 2.2 | Estresse Salino e Déficit Hídrico em Plantas | 21 |
| 2.3 | Mecanismos de Ajustamento Osmótico | 22 |
| 2.3.1 | <i>Prolina</i> | 24 |
| 2.3.2 | <i>Glicina-Betaína</i> | 25 |
| 2.4 | Expressão dos Genes Associados ao Estresse Salino e Déficit Hídrico .. | 26 |
| 2.4.1 | <i>Genes P5CS, P5CR e BADH</i> | 27 |
| 3 | REFERÊNCIAS | 29 |
| | | |
| Cap II | INDICADORES DE CRESCIMENTO EM <i>Carthamus tinctorius</i> L. SUBMETIDOS AOS ESTRESSES SALINO E DÉFICIT HÍDRICO | |
| | RESUMO | 39 |
| | ABSTRACT | 40 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 41 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 2.1 | Condução do Experimento | 43 |
| 2.2 | Determinação dos Indicadores de Crescimento | 43 |
| 2.3 | Determinação dos Indicadores de Status Hídrico | 44 |
| 2.4 | Delineamentos Experimental e Análise Estatística | 45 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 46 |
| 3.1 | Indicadores de Crescimento | 46 |
| 3.2 | Indicadores de Status Hídrico | 51 |
| 3 | CONCLUSÕES | 55 |
| 4 | REFERÊNCIAS | 56 |
| | | |
| Cap III | INDICADORES DE AJUSTAMENTO OSMÓTICO EM <i>Carthamus tinctorius</i> L. SUBMETIDOS AOS ESTRESSES SALINO E DÉFICIT HÍDRICO | |
| | RESUMO | 61 |
| | ABSTRACT | 62 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 63 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 65 |
| 2.1 | Caracterização da Área Experimental | 65 |
| 2.2 | Material Vegetal e Condições Experimentais | 65 |
| 2.3 | Determinação dos Solutos Inorgânicos | 65 |
| 2.3.1 | Na^+ , K^+ e Relação Na^+/K^+ | 65 |
| 2.4 | Determinação dos Solutos Orgânicos | 66 |
| 2.4.1 | <i>Açúcares Solúveis Totais (AST)</i> | 66 |
| 2.4.2 | <i>Proteínas Solúveis Totais (PST)</i> | 66 |
| 2.4.3 | <i>Aminoácidos Livres Totais (AALT)</i> | 66 |
| 2.4.4 | <i>Prolina (PRO)</i> | 67 |
| 2.4.5 | <i>Glicina-Betaína (GB)</i> | 67 |
| 2.5 | Delineamento Experimental e Análise Estatística | 68 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 69 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.1 | Conteúdo de Na ⁺ , K ⁺ e Relação Na ⁺ /K ⁺ | 69 |
| 3.2 | Solutos Orgânicos | 72 |
| 4 | CONCLUSÕES | 78 |
| 5 | REFERÊNCIAS | 79 |
| | | |
| Cap IV | EXPRESSÃO DOS GENES P5CS, P5CR E BADH EM <i>Carthamus tinctorius</i> L. SUBMETIDO AOS ESTRESSES SALINO E DÉFICIT HÍDRICO | |
| | RESUMO | 87 |
| | ABSTRACT | 88 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 89 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 91 |
| 2.1 | Material Vegetal | 91 |
| 2.2 | Escolha dos Primers | 91 |
| 2.3 | Extração de RNA | 92 |
| 2.4 | Preparo do cDNAs | 92 |
| 2.5 | Amplificações de PCR | 93 |
| 2.6 | Eletroforese em Gel de Agarose | 93 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 94 |
| 4 | CONCLUSÕES | 97 |
| 5 | REFERÊNCIAS | 98 |

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO GERAL

Carthamus tinctorius L. é cultivada em regiões semiáridas da Ásia, México, Irã e América do Norte (KNOWLES, 1989; GOLKAR et al., 2010), apresenta uma boa adaptação a regiões de baixa pluviosidade (RASHID et al., 2002) e tolerância a salinidade (ZHANG & LI, 1993). É uma planta economicamente importante dentre as oleaginosas, devido ao elevado teor de óleo (32 a 40%) com 70% de ácido linoleico e 30% de ácido oleico, ideais para a produção de biodiesel (VIVAS, 2002; OPLINGER et al., 2010). Tem baixo custo de produção, e menores necessidades de água e de nutrientes, tornando-se um recurso viável aos agricultores como uma planta alternativa em áreas de cultivo (COSGE & KAYA, 2008).

A salinidade e o déficit hídrico são uns dos principais fatores abióticos limitantes da produção agrícola no semiárido (DANTAS et al., 2011). O efeito em comum de ambos estresses nas plantas é a perda da homeostase hídrica, que afeta os processos de absorção, acúmulo e manutenção do conteúdo de água e de íons nos tecidos, o que desencadeia danos celulares levando a desidratação e à perda de turgor nas células induzidas por solutos externos (IMADA et al., 2009; VICENTE et al., 2004; D'SOUZA & DEVERAJ, 2010).

Uma estratégia para garantir a manutenção da homeostase hídrica é o ajustamento osmótico, ou osmorregulação, que consiste na síntese e acumulação de solutos orgânicos compatíveis no citosol (ASHRAF & HARRIS, 2004; BUCHANAN et al., 2009) e na absorção de íons inorgânicos, tais como Na^+ , K^+ e Cl^- , que são compartimentalizados, ou sequestrados nos vacúolos, reduzindo o potencial osmótico e aumentando o potencial de turgescência da célula, garantindo a absorção de água e a manutenção do crescimento celular (SILVEIRA et al., 2010).

Solutos orgânicos, mais especificamente os osmólitos compatíveis, são sintetizados em condições de estresse hídrico e salino, auxiliando no ajustamento osmótico, na proteção subcelular e na redução de danos oxidativos (BUCHANAN et al., 2002). Os osmoprotetores mais comumente estudados e que contribuem na osmoregulação em diferentes espécies são os açúcares redutores (D'SOUZA & DEVARAJ, 2010) e não redutores (JENCI & NATARAJAN, 2009), as proteínas (OLIVEIRA et al., 2014), a prolina (VICENTE et al., 2004; KÖSKEROSGLU & TUNA, 2010) e os compostos quaternários de amônio como a glicina betaína (KHOLOVA et al., 2010).

O estudo da expressão dos genes envolvidos com a resistência e/ou tolerância aos estresses salino e déficit hídrico é de grande importância para a agricultura, uma vez que melhoria da produtividade vegetal depende do conhecimento aprofundado. Pode-se citar,

como exemplo, os genes DREB1A (KASUGA et al., 1999, LIU et al., 1998); CpMYBIO (VILLALOBOS et al., 2004); AtALDH3 (SUNKAR et al., 2003); AtHsp17.6 (SUN et al., 2001); A VP1 (GAXIOLA et al., 2001), todos responsáveis pelo aumento da tolerância ao sal e à seca, e caracterizados em *Arabidopsis*.

Além desses genes que respondem aos estresses salino e déficit hídrico, outros foram caracterizados em função de sua importância na síntese de compostos osmoreguladores classicamente envolvidos com essa situação fisiológica. É o caso dos genes P5CS e P5CR da via de biossíntese da prolina, e BADH da glicina-betaína, solutos compatíveis que são acumulados em resposta ao estresse osmótico, sendo considerado essa acumulação uma importante estratégia adaptativa ao estresse salino e hídrico (RHODES & HANSON, 1993).

Como os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares implicados na tolerância e/ou susceptibilidade aos estresses salino e déficit hídrico ainda não estão plenamente compreendidos para *C. tinctorius*, este trabalho teve como objetivo observar os indicadores de crescimento e status hídrico, a possível contribuição dos solutos inorgânicos e orgânicos no ajustamento osmótico, e o comportamento da expressão dos genes P5CS e P5CR, enzimas de síntese da prolina e BADH, enzima de síntese da glicina betaína, em folhas e raízes de cártamo submetido aos estresses salino e déficit hídrico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos Gerais do *Carthamus tinctorius* L.

O Cazaquistão foi o maior produtor de cártamo em 2013, com uma produção de 175 mil hectares, seguido da Índia com uma produção de 109 mil hectares. Os Estados Unidos e México ocuparam o terceiro e quarto lugar, com uma produção de 95 e 91 mil hectares, respectivamente. A Argentina ficou em quinto lugar com produção em torno de 50 mil hectares (FAOSTAT, 2015).

O cártamo também conhecido como “açafraão bastardo”, pertence à família Asteraceae, gênero *Carthamus* e espécie *Carthamus tinctorius* L. É uma herbácea, anual, de caule ereto, ramificado, com altura variando entre 30 cm e 150 cm e apresenta flores globulares denominadas capítulos (SEHGAL & RAINA, 2005; CHAPMAN et al., 2010; WANG et al., 2011; DAJUE & MÜNDEL 1996). O sistema radicular é pivotante e pode atingir até 3 m de profundidade, o que torna a cultura bastante tolerante ao estresse hídrico (DAJUE & MÜNDEL, 1996).



Figura 1: Planta de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) (Fonte:Panaac)

O cártamo se desenvolve bem em regiões com precipitações de 300 a 600 mm anuais e em altitudes que variam do nível do mar até 2000 m. Suporta grande amplitude de temperaturas que pode variar de -7 a 40°C dependendo do seu estágio de desenvolvimento. Esta cultura não tolera solos encharcados e alta umidade relativa do ar (EMONGOR, 2010).

Cada planta de cártamo produz até cinco frutos, os quais produzem cerca de 30 sementes, totalizando 150 sementes por planta, com produtividade de 1000 a 3000 Kg de

sementes por hectare, e produtividade de óleo de 300 a 1440 Kg de óleo por hectare. A planta possui um ciclo produtivo de 130 a 140 dias desde o plantio até a colheita. A época de produção é diversificada, sendo possível mais de 2 colheitas por ano (MEDEIROS, 2011). As sementes de cártamo possuem teor de óleo em torno de 27 a 37% (SIDDIQUI & OAD, 2006), rico em ácido linoléico (70 a 87%) (HAN et al., 2009), 36% de proteínas e 3% de amido como materiais de reserva. O óleo é de ótima qualidade tanto para o consumo humano, como para uso industrial (ABUD et al., 2010).

O óleo industrial é empregado na fabricação de tintas, esmaltes, sabões, entre outros. A torta das sementes, que é um subproduto da indústria de óleo, possui cerca de 25% de proteína e pode ser utilizada na alimentação de ruminantes (OELKE et al., 1992; EKIN, 2005). Além disso, o cártamo pode ser utilizado para fins medicinais, como planta ornamental e na alimentação de pássaros (EMONGOR, 2010; DANIELI et al., 2011), sendo também uma alternativa na produção de biocombustíveis (DORDAS & SIOULAS, 2008).

Em relação às condições de cultivo, o cártamo possui elevada tolerância ao déficit hídrico, às altas temperaturas, à baixa umidade relativa do ar e a solos salinos. Se adapta as diferentes condições das regiões semiáridas, se desenvolve bem nos mais diferentes tipos de solos, desde que sejam profundos e possuam boa drenagem (KIZIL et al., 2008; BAGHERI & SAM-DAILIRI, 2011).

2.2 Estresse Salino e Déficit Hídrico nas Plantas

A seca e a salinidade são comuns em regiões áridas e semiáridas. O processo de salinização ainda é acelerado pelo uso da irrigação com água contendo altas concentrações de sais (OLIVEIRA et al., 2012), que combinado à baixa precipitação pluvial e à alta taxa de evaporação, permitem que os sais não sejam lixiviados, podendo ser acumulados em quantidades prejudiciais ao processo fisiológico das plantas (LAMBERS, 2003; RUIZ et al., 2006), interferindo drasticamente no crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas e ocasionando enormes prejuízos sócio-econômicos (GHEYI, 2000; MUNNS, 2002).

A seca é provavelmente um dos mais importantes fatores que limita a produtividade agrícola nas grandes regiões do mundo, principalmente nas regiões semiáridas (JONES & CORLETT, 1992; BRILHANTE, 2006), pois afeta a absorção de água e nutrientes, a germinação da semente, o fechamento e abertura dos estômatos, a atividade fotossintética, a transpiração, a atividade enzimática e vários outros processos fisiológicos e metabólicos. O efeito desse estresse na planta é caracterizado pelo componente osmótico, e um dos primeiros

sintomas da falta de água nos tecidos vegetais é a perda de turgor, com consequente redução do crescimento celular, na taxa de expansão foliar e em menor grau, na taxa de aparecimento das folhas (AGUIRREZABAL et al., 2001; CASADEBAIG et al., 2008).

O estresse salino, além do componente osmótico, causado por uma diminuição no potencial hídrico do solo, possui o componente iônico, gerado pela absorção e acumulação de íons como Na^+ e Cl^- nos diferentes órgãos da planta (MUNNS et al., 1995; NAVARRO, 2007). O excesso de Na^+ e principalmente o excesso de Cl^- no protoplasma, ocasionam distúrbios em relação ao balanço iônico, bem como o efeito específico dos íons sobre as enzimas e membranas (LARCHER, 2004). Para Koyro (2006), o estresse osmótico gerado pela seca e salinidade representam os mais comuns estresses ambientais, que limitam o crescimento vegetal e a produtividade das culturas.

Em condições de déficit hídrico e salinidade determinados processos como a síntese de proteínas, metabolismo de lipídios e fotossíntese são afetados. Uma das respostas iniciais das plantas aos estresses é a redução da expansão da superfície foliar, que acompanha a intensificação do estresse, promovendo redução nas concentrações de carboidratos tornando-os indispensáveis para o desenvolvimento celular (WANG & NIL, 2000; ESTEVES & SUZUKI, 2008). Contudo, as plantas desenvolvem mecanismos para manter o status hídrico, denominado ajustamento osmótico.

2.3 Mecanismos de Ajustamento Osmótico

As plantas desenvolvem vários mecanismos para garantir a sua sobrevivência em ambientes estressantes. Os efeitos da seca e salinidade sobre a planta comumente resultam em maior concentração de solutos nas células, perda de turgor, mudança no volume celular, mudança na integridade das membranas, desnaturação de proteínas e outros componentes fisiológicos e moleculares (LAWLOR & CORNIC, 2002).

Para minimizar os efeitos da salinidade e da seca, as plantas desenvolvem estratégias como acúmulo de íons, exclusão de íons, controle na absorção dos íons e seu transporte para as folhas, compartimentalização dos íons na célula, síntese de solutos compatíveis, mudanças na rota fotossintética, alteração na estrutura das membranas, indução de enzimas antioxidantes e hormônios vegetais, aumento no crescimento da raiz, folhas menores em tamanho e quantidade, dentre outros (MELO, 2012; PARIDA & DAS, 2005; LEI et al., 2006).

Dentre as estratégias das plantas em tolerância a seca e a salinidade, está o ajustamento osmótico, mecanismo definido geralmente como uma diminuição no potencial

osmótico do fluido celular resultante de um aumento líquido no conteúdo de osmólitos no meio intracelular, impedindo a perda da água pelas células (BAJJI et al., 2001; NAVARRO, 2007), e solutos compatíveis mantendo os processos fisiológicos como a abertura estomática, a fotossíntese, mantendo o turgor da célula, garantindo a expansão celular durante o crescimento da planta (SERRAJ & SINCLAIR, 2002).

Os osmólitos intracelulares incluem os íons inorgânicos, que são absorvidos principalmente do meio em que as plantas se encontram, sendo esses sequestrados no vacúolo, e os solutos orgânicos, que são compartimentalizados no citoplasma, sintetizados e transportados para balancear o baixo potencial osmótico nos vacúolos (MORANT-MANCEAU, 2004). Em algumas espécies, a acumulação dos íons Na^+ e Cl^- também favorece o ajustamento osmótico e a redução do potencial hídrico da planta. Porém, a exposição ao excesso de sais por um longo período pode causar na planta danos por toxicidade, quando não exportados, secretados ou compartimentados adequadamente (FRICKE et al., 2006).

Os osmólitos compatíveis, são sintetizados em condições de estresse salino e déficit hídrico, auxiliando no ajustamento osmótico, na proteção subcelular e na redução de danos oxidativos (BUCHANAN et al., 2002). Esses osmorreguladores são importantes para o balanço osmótico e ao mesmo tempo, compatíveis com o metabolismo celular e podem se concentrar distintamente em diferentes partes da planta e cada um deles pode apresentar um efeito fisiológico diferente, ou seja, enquanto alguns podem proteger enzimas e estruturas órgão-específicas, outros podem contribuir para o balanço osmótico parcial da planta, evitando o acúmulo de solutos inorgânicos (GARCIA et al., 1997).

Os solutos orgânicos de maior contribuição para o potencial osmótico são os aminoácidos e carboidratos solúveis, e tem sido estudado intensamente em plantas sob condições de estresse salino e hídrico (AZEVEDO NETO et al., 2004), pois plantas com altas concentrações de prolina, manitol, ou outros produtos provenientes do metabolismo de açúcares, comumente estão associados à possível tolerância aos efeitos causados pelo déficit hídrico ou toxicidade por íons salinos (TAJI et al., 2004).

Os osmoprotetores mais comumente estudados e que contribuem na osmoregulação em diferentes espécies são os açúcares redutores (D'SOUZA & DEVARAJ, 2010) e não-redutores (JENCI & NATARAJAN, 2009), os compostos quaternários de amônio como a glicina betaína (KHOLOVA, et al., 2010), as proteínas (OLIVEIRA et al., 2014), e a prolina (VICENTE et al., 2004; KÖSKEROSGLU & TUNA, 2010).

2.3.1 Prolina

No ajustamento osmótico de plantas sob estresses abióticos, a prolina é um dos aminoácidos mais estudados em plantas submetidas ao déficit hídrico e/ou estresse salino, sendo considerada um osmólito compatível por se acumular nas células, com função osmoprotetora (ERRABII et. al., 2007; GIANNAKOULA et al., 2008; SHARMA & DUBEY, 2005). O acúmulo de prolina pode ativar várias funções celulares: reserva de carbono e nitrogênio utilizado no crescimento para restabelecimento após estresse; desintoxicação do excesso de amônia; estabilizador de proteínas e membranas; e eliminadores de radicais livres (KAVI-KISHOR et al., 2005).

A síntese da prolina em plantas superiores acontece por duas vias: a via L-ornitina e a via L-glutamato (Figura 2). A ornitina e o glutamato são principais precursores da biossíntese da prolina e este processo é mediado pelas enzimas D¹-pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) e redutase (P5CR). A síntese ocorre no citosol ou no estroma dos cloroplastos, onde o glutamato (GLU) é reduzido a glutamato semialdeído (GSA) pela P5CS e então convertido a prolina pelas enzimas P5C e P5CR. A síntese da prolina ainda pode dar-se a partir da ornitina, que sofre transaminação pela enzima OAT produzindo GSA, que é então convertido em prolina pela P5C (PARVAIZ & SATYAWATI, 2008; MAJUMDER et al., 2010; SZABADOS & SAVOURÉ, 2010).

A via glutamato é predominante em plantas sob condições de estresse osmótico e falta de nitrogênio, tornando a enzima P5CS limitante para a biossíntese de prolina em plantas e sensível à inibição por retroalimentação (DELAUNEY & VERMA, 1993; ZHANG et al., 1995).

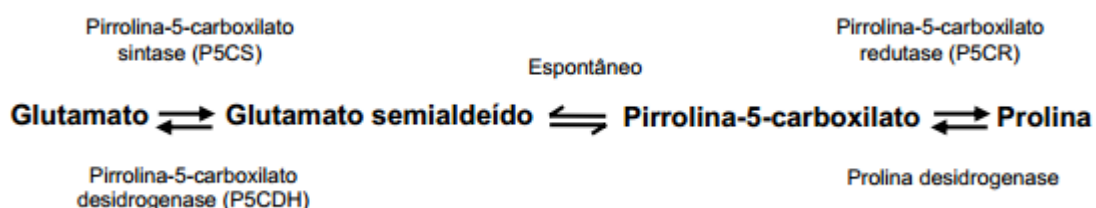


Figura 2: Esquema da via metabólica da biossíntese de prolina a partir de glutamato em plantas; (Fonte: CAMPOS, 2009).

A síntese de prolina e sua degradação mostra-se ser altamente correlacionada com o ambiente osmótico. Em muitas plantas, o acúmulo de prolina representa uma resposta ao estresse hídrico, e juntamente com compostos contendo nitrogênio, como é o caso dos aminoácidos, estão entre os principais solutos que se acumulam em resposta à salinidade

(BRILHANTE, 2006; PARIDA & DAS, 2005; GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2007).

Estudos em *Anacardium occidentale* L. (SILVEIRA et al., 2010), *Reaumuria vermiculata* L. (GORAI & NEFFATI, 2011) e *Zea mays* (KÖSKEROSGLU & TUNA, 2010) têm demonstrado que a acumulação de prolina está relacionada à resistência a estresses abióticos, o que indica que esse soluto tem papel na osmoproteção. Para estudos em algumas espécies vegetais sob estresse salino, o acúmulo de prolina não está relacionado diretamente com a tolerância ao estresse, sendo apenas resultado de distúrbios generalizados no metabolismo de aminoácidos associado com o aumento do catabolismo de proteínas, a senescência induzida pela salinidade ou outros distúrbios metabólicos provocados pelo sal (LUTTS et al., 1999; ROCHA, 2003; SILVEIRA et al., 2003).

2.3.2 Glicina-Betaína

A glicina-betaína, composto quaternário de amônio, é distribuída extensamente em plantas superiores e sintetizada em elevadas taxas em muitas espécies de plantas em resposta aos vários tipos de estresses ambientais (RHODES & HANSON, 1993). Seu principal papel seria, provavelmente, o de proteção das células vegetais por meio da preservação do balanço osmótico; da estabilização da estrutura de proteínas, tal como a Rubisco; da proteção do aparato fotossintético e de sua atuação como eliminadora de espécies reativas de oxigênio (EROS) (CHA-UM et al., 2006).

Em plantas superiores, a glicina-betaína é sintetizada em dois passos: a colina é convertida em aldeído betaína, pela colina por mono-oxigenase (CMO), que é então convertido em glicina betaína pela betaína aldeído desidrogenase (BADH) (ZHOU et al., 2008) (Figura 3).



Figura 3: Síntese da glicina-betaína no cloroplasto. (Fonte: MUNÔZ-CLARES & VELASCO-GARCIA, 2004).

Existe uma correlação positiva entre a acumulação de glicina-betaína e a tolerância ao estresse salino e déficit hídrico através do mecanismo de ajustamento osmótico (VOLLET, 2006), isto é, a célula torna-se apta a acumular compostos e reduzir o potencial hídrico durante os períodos de estresse osmótico, aumentando a capacidade de absorção de água das plantas e atenuando os efeitos do déficit hídrico no conteúdo relativo de água da planta (BABU et al., 1999; TAIZ & ZEIGER, 2004; PAGTER et al., 2005.).

A glicina-betaína é conhecida por se acumular em resposta ao estresse em muitas plantas, dentre elas, as espécies *Beta vulgaris*, *Spinacia oleracea*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor*, *Lablab purpureus* e *Excoecaria agallocha*, onde o acúmulo de glicina-betaína normalmente ocorre mais nos genótipos tolerantes do que nos genótipos sensíveis (WEIMBERG et al., 1984; FALLON & PHILLIPS, 1989; McCUE & HANSON, 1990; RHODES & HANSON, 1993; YANG et al., 2003; D'SOUZA & DEVARAJ 2010; JENCI & NATARAJAN 2009).

2.4 Expressão dos Genes Associados ao Estresse Salino e Déficit Hídrico

O estudo da expressão dos genes envolvidos com a resistência e/ou tolerância aos estresses salino e déficit hídrico é de grande importância, pois as respostas fisiológicas específicas ao estresse hídrico e salino envolvem uma combinação de eventos moleculares que são ativados e desativados em resposta ao estresse (BRAY, 1993). Compreender como esses eventos interagem é um passo importante no desenvolvimento de maior tolerância a estresses abióticos. Genes e proteínas envolvidos em respostas induzidas pelo déficit hídrico podem promover a tolerância à desidratação: proteção do citoplasma; alterações no potencial osmótico da célula para aumentar a absorção de água; metabolização de compostos degradados pelo estresse; controle no acúmulo de íons e regulação adicional de expressão gênica (NEPOMUCENO et al., 2000). Entretanto, a expressão de alguns genes e seus produtos durante o estresse não garante que a planta possa sobreviver a essa condição (BRAY, 1993).

Em resposta ao estresse salino e déficit hídrico, vários avanços se deram, essencialmente, pela identificação de genes envolvidos na resposta ao estresse e na sua caracterização seja por estudos de expressão ou pela obtenção de mutantes (BARTELS, 2005; MUNNS & TESTER, 2008). Como exemplo, tem-se os genes DREB1A (KASUGA et al., 1999, LIU et al., 1998); CpMYBIO (VILLALOBOS et al., 2004); AtALDH3 (SUNKAR et

al., 2003); AtHsp17.6 (SUN et al., 2001); A VP1 (GAXIOLA et al., 2001); todos responsáveis pelo aumento da tolerância ao sal e à seca, e caracterizados em *Arabidopsis*.

Além desses genes que respondem aos estresses salino e déficit hídrico, outros foram caracterizados em função de sua importância na síntese de compostos orgânicos denominados osmoreguladores, que estão envolvidos no ajustamento osmótico em plantas. É o caso dos genes da via de biossíntese da prolina e da glicina-betaína, solutos compatíveis que são acumulados em resposta ao estresse osmótico, sendo considerado essa acumulação uma importante estratégia adaptativa aos estresses salino e hídrico (RHODES & HANSON, 1993).

2.4.1 Genes *P5CS*, *P5CR* e *BADH*

Os genes marcadores escolhidos fazem parte das vias metabólicas de dois indicadores de ajustamento osmótico, a *P5CS* e a *P5CR* (1-pirrolina-5-carboxilato redutase) integrantes da via de síntese da prolina, e a *BADH* (betaína aldeído desidrogenase) da via de síntese da glicina-betaína.

A enzima 1-pirrolina-5-carboxilato redutase (*P5CR*) foi a primeira a ser identificada e caracterizada em muitas espécies de plantas (KRUEGER et al., 1986; TREICHEL, 1986; LAROSA et al., 1991). A localização desta enzima no cloroplasto foi reportada em ervilha (RAYAPATI et al., 1989). Por outro lado, atividade da enzima *P5CR* foi observada na fração citosólica de raízes e nódulos de soja, bem como em células de folha. As diferentes localizações da enzima *P5CR* indicam que a prolina pode ser sintetizada em diferentes compartimentos celulares, como no citosol e estroma de cloroplastos (SZOKE et al., 1992).

O gene codificando a enzima *P5CR* foi identificado por teste de complementação direta de uma linhagem de *E. coli proC* auxotrófica com clones de uma biblioteca de cDNA de nódulos de soja (DELAUNEY & VERMA, 1990), facilitando o isolamento de *P5CR* homólogos de *Pisum sativum* (WILLIAMSON & SLOCUM, 1992) e *Arabidopsis thaliana* (VERBRUGGEN et al., 1993). Transcritos de *P5CR* aumentam abundantemente em resposta ao estresse osmótico, indicando que o gene *P5CR* transcrito é controlado sob estresse osmótico (DELAUNEY & VERMA, 1990; WILLIAMSON & SLOCUM, 1992; VERBRUGGEN et al., 1993). O promotor do gene *P5CR* proporciona forte expressão de GUS em ápices radiculares, meristema, células guarda, grãos de pólen, óvulos e sementes em desenvolvimento (HUA et al., 1997).

Estudos realizados com a soja, submetida a 400 mM de NaCl, reforçam que a superexpressão do gene *P5CR* está associado ao aumento da prolina (DELAUNEY &

VERMA, 1990). O cDNA de *P5CR* de soja, quando superexpresso em tabaco, não resultou em um aumento significativo nos níveis de prolina em plantas transgênicas, apesar de um aumento de 100 vezes na atividade da enzima comparado ao controle (SZOKE et al., 1992). Assim, *P5CR* mostrou não ser o passo limitante no acúmulo de prolina em plantas superiores (LAROSA et al., 1991; DELAUNEY & VERMA, 1993).

A enzima *P5CS* é limitante para a síntese de prolina, sendo sensível à inibição por retroalimentação. Estudos superexpressando o gene *P5CS* em plantas transgênicas de tabaco parecem ter demonstrado aumento a sua tolerância ao estresse hídrico e salino (KISHOR et al., 1995). Estudos em *Arabidopsis thaliana* mostram que houve um aumento da expressão do gene *P5CS* nas plantas expostas ao estresse hídrico, salino e tratadas com ABA e que este aumento está associado ao acúmulo de prolina, reforçando o papel deste aminoácido como osmorregulador (STRIZHOV et al., 1997).

O gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* foi introduzido em arroz sob o controle de um promotor ABA-induzido, e as plantas transgênicas de arroz acumularam mais prolina que as plantas controle sob condição de estresse. Em plantas transgênicas de arroz com superexpressão do gene *P5CS*, sob condições de estresse hídrico e salino, os resultados preliminares mostraram aumento da biomassa (ZHU et al., 1998). Plantas de citrange Carrizo, transformadas com o gene mutante *P5CS*, acumularam altas concentrações de prolina, e conseqüentemente, apresentaram maior tolerância ao estresse hídrico (MOLINARI et al., 2004).

Quanto a utilização da glicina-betaína, estudos com aumento da expressão de transcritos de *BADH* em resposta ao estresse osmótico tem sido amplamente observado (ISHITANI et al., 1995; MOGHAIEB et al., 2004). Em estudo com cevada observou-se a indução e acúmulo de *BADH* sob salinidade e seca, o que indica uma comum resposta da planta a alterações osmótica que afetam o conteúdo de água (ISHITANI et al., 1995). Em estudos com arroz, o gene da *BADH* tem sido transferido com sucesso gerando plantas transgênicas com produção aumentada de glicina betaina. Algumas dessas espécies transformadas, têm mostrado melhor aclimação em níveis elevados de NaCl quando comparadas com as plantas não transformadas. Apesar das concentrações desse soluto protetor em plantas transgênicas muitas vezes não ser elevadas, essa área da pesquisa é promissora na obtenção de plantas mais resistentes (SILVEIRA et al., 2009).

3 REFERÊNCIAS

ABUD, H. F.; GONÇALVES, N. R.; REIS, R. G. E.; GALLÃO, M. I.; INNECO, R. Morfologia de sementes e plântulas de cártamos. **Revista Ciência Agronômica**, v.41, n.2, p.259-265, 2010.

AGUIRREZÁBAL, L. A. N.; ORIOLI, G. A.; HERNÁNDEZ, L. F.; PEREYRA, V. R.; MIRAVÉ, J. P. Girasol: Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento. **Unidad Integrada Balcarce**. INTA y Facultad de Ciencias Agrarias de La Universidad de Mar del Plata. 2001.

MORANT-MANCEAU, A.; PRADIER, E.; TREMBLIN, G. Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species under salt stress, **Journal of Plant Physiology**, v.161, n.1, p.25-33, 2004.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v.166, n.1, p.3-16, 2004.

AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS FILHO, J.; LACERDA, C. F.; SILVA, J. V.; COSTA, P. H. A.; GOMES FILHO, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.16, n.1, p.31-38, 2004.

BABU, R. C.; PATHAN, M. S; BLUM, A.; NGUYEN, H. T. Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivar. **Crop Science**, v.39, n.1, p.150-158, 1999.

BAGHERI, B; SAM-DAILIRI, M. Effect of water estress on agronomic traits of safflower spring (*Carthamus tinctorius*). **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.5, n.12, p. 2621-2624, 2011.

BAJJI, M.; LUTTS, S.; KINET, J. M. Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. **Plant Science**, v.160, n.4, p.669-681, 2001.

BARTELS, D; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.24, n.1, p.23-58, 2005.

BRAY, E. A. Molecular responses to water-deficit. **Plant Physiology**, v.103, n.4, p.1035-1040, 1993.

BRILHANTE, J. C. A. Contribuição de solutos orgânicos e inorgânicos no potencial osmótico de folhas de *Atriplex nummularia* submetidas ao NaCl, seca e PEG. 195p. **Dissertação**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W. JONES, R. L. Biochemistry e Molecular Biology of Plants. 1 ed. Rockville. **American Society of Plant Physiologists**, 2009, 1407p.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**, 1 ed., 2002.

CAMPOS, M. K. F. Relações hídricas, trocas gasosas e atividade de enzimas antioxidantes em plantas transgênicas de citrumelo 'swingle' com alto acúmulo de prolina submetidas ao déficit hídrico. 114p. **Dissertação**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CASADEBAIG, P.; DEBAEKE, P.; LECOEUR, J. Thresholds for leaf expansion and transpiration responses to soil water deficit in a range of sunflower genotypes. **European Journal of Agronomy**, v.28, n.4, p.646-654, 2008.

CHAPMAN, M. A.; HVALA, J.; STREVER, J.; BURKE, J. M. Population genetic analysis of safflower (*Carthamus tinctorius*; Asteraceae) reveals a near eastern origin and five centers of diversity. **American Journal of Botany**, v.97, n.5, p.831-840, 2010.

CHA-UM, S.; SUPAIBULWATANA, K.; KIRDMANEE, C. Water relation, photosynthetic ability, and growth of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica cv. KDML105) to salt stress by application of exogenous glycinebetaine and choline. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.192, n.1, p.25-36, 2006.

COSGE, B.; KAYA, D. Performance of some safflower (*Carthamus tinctorius* L.) varieties sown in late autumn and late spring. Süleyman Demirel Üniversitesi, **Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, v.12, n.1, p.13-18, 2008.

D'SOUZA, M. R. D.; DEVARAJ, V. R. Biochemical responses of Hyacinth bean (*Lablab purpureus*) to salinity stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.2, p.341-353, 2010.

DAJUE, LI.; MÜNDEL, H. H. Safflower *Carthamus tinctorius* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 7. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben. **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome, Italy. 1996, 83p.

DANIELI, P. P.; PRIMI, R.; RONCHI, B.; RUGGERI, R.; ROSSINI, F.; PUGLIA, S. D.; CERETI, C. F. The potential role of spineless safflower (*Carthamus tinctorius* L. var. *Inermis*) as fodder crop in central Italy. **Italian Journal of Agronomy**, v.4, n.6, p19-22, 2011.

DANTAS, C. V. S.; SILVA, I. B.; PEREIRA, G. M.; MAIA, J. M.; LIMA, J. P. M. S.; MACEDO, C. E. C. Influência da sanidade e déficit hídrico na germinação de sementes de *Carthamus tinctorius* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.3, p.574-582, 2011.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. A soybean delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase gene was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. **Molecular Genomics and Genetics**, v.221, n.3, p.299-305, 1990.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, v.4, n.2, p.215-223, 1993.

DORDAS, C. A.; SIOULAS, C. Safflower yield, chlorophyll content, photosynthesis, and water use efficiency response to nitrogen fertilization under rainfed conditions. **Industrial Crops and Products**, v.27, n.1, p.75-85, 2008.

EKIN, Z. Resurgence of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) utilization: A global view. **Journal Agronomic**, v.4, n.2, p.83-87, 2005.

EMONGOR, V. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) the underutilized and neglected crop: A review. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.9, n.6, p.299-306, 2010.

ERRABII, T.; GANDONOU, C. B.; ESSALMANI, H.; ABRINI, J.; IDAOMAR, M.; SENHAJI, N. S. Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.29, n.2, p.95-102, 2007.

ESTEVEZ, B. S.; SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.4, p. 662-679, 2008.

FALLON, K. M.; PHILLIPS, R. Responses to water stress in adapted and unadapted carrot cell suspension cultures. **Journal of Experimental Botany**, v.40, n.6, p.681-687, 1989.

FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION. Safflower Seed. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> Acesso em: 06 Jun. 2015.

FRICKE, W.; AKHIYAROVA, G.; WEI, W.; ALEXANDERSSON, E.; MILLER, A.; KJELLBOM, P.O.; RICHARDSON, A.; WOJCIECHOWSKI, T.; SCHREIBER, L.; VESELOV, D.; KUDOYAROVA, G.; VOLKOV, V. The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.5, p.1079-1095, 2006.

GARCIA, A. B.; ENGLER, J. A.; IYER, S.; GERATS, T.; VAN MONTAGU, M.; CAPLAN, A. B. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. **Plant Physiology**, v.115, n.1, p.159-169, 1997.

GARCÍA-SÁNCHEZ, F.; SYVERTSEN, J. P.; GIMENO, V.; BOTÍA, P.; PEREZ-PEREZ, J. G. Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. **Physiologia Plantarum**, v.130, n.4, p.532-542, 2007.

GAXIOLA, R. A.; LI, J.; UNDURRAGA, S.; DANG, L. M.; ALLEN, G. J.; ALPER, S. L.; FINK, G. R. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.20, p.11444-11449, 2001.

GHEYI, H. R. Problemas de salinidade na agricultura irrigada. In: OLIVEIRA, T. S.; ASSIS JÚNIOR, R. N.; ROMERO, R. E.; SILVA, J. R. C. (Eds.). Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.329-346, 2000.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; MYLONA, P.; PAPADAKIS, I.; YUPSANIS, T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v.165, n.4, p.385-396, 2008.

GOLKAR, P.; ARZANI, A.; REZAEI, A. M. Inheritance of flower color and spinelessness in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Journal of Genetics**, v.89, n.2, p.259-262, 2010.

GORAI, M.; NEFFATI, M. Osmotic adjustment, water relations and growth attributes of the xero-halophyte *Reaumuria vermiculata* L. (Tamaricaceae) in response to salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, n.4, p.1425-1433, 2011.

HAN, X.; CHENG, L.; ZHANG, R.; BI, J. Extraction of safflower seed oil by supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v.92, n.4, p.370-376, 2009.

HUA, X. J.; VAN DE COTTE, B.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.114, n.4, p.1215-1224, 1997.

IMADA, S.; YAMANAKA, N.; TAMAI, S. Effects of salinity on the growth, Na partitioning, and Na dynamics of a salt-tolerant tree, *Populus alba* L. **Journal of Arid Environments**, v.73, n.3, p.245-251, 2009.

ISHITANI, M.; NAKAMURA, T.; HAN, S.I.; TAKABE, T. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. **Plant Molecular Biology**, v.27, n.2, p.307-315, 1995.

JENCI, A.; NATARAJAN, S. Growth and organic constituent variations with salinity in *Excoecaria agallocha* L., an important Halophyte. **Botany Research International**, v.1, n.2, p.50-54, 2009.

JONES, H. G.; CORLETT, J. E. Current topics in drought physiology. **Journal of Agricultural Science**, v.119, n.3, p. 291-296, 1992.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, v.17, n.3, p.287-291, 1999.

KAVI-KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI-LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v.88, n.3, p.424-438, 2005.

KHOLOVA, J.; SAIRAM, R. K.; MEENA, R. C. Osmolytes and metal ions accumulation, oxidative stress and antioxidant enzymes activity as determinants of salinity stress tolerance in maize genotypes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.3, p.477-486, 2010.

KIZIL, S.; ÇAKMAK, Ö.; KIRICI, S.; INAN, M. Comprehensive study on Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) in semi-arid conditions. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.4, n.1, p.947-953, 2008.

KNOWLES, P. F. Safflower. In: Oil Crops of the World, ROBBELEN, G.; DOWNEY, R. K.; ASHRI, A. (Eds.). McGraw-Hill Publishers, p.361-374, 1989.

KÖSKEROSGLU, S.; TUNA, A. L. The investigation on accumulation levels of proline and stress parameters of the maize (*Zea mays* L.) plants under salt and water stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.3, p.541-549, 2010.

KOYRO, H. W. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). **Environmental and Experimental Botany**, v.56, n.2, p.136-146, 2006.

- KRUEGER, R.; JAGER, H. J.; HINTZ, M.; PAHLICH, E. Purification to homogeneity of pyrroline-5-carboxylate reductase of barley. **Plant Physiology**, v.80, n.1, p.142-144, 1986.
- LAMBERS, H. Dryland salinity: a key environmental issue in southern Australia. **Plant and Soil**, v.257, n.2, p.5-7, 2003.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMA Artes e Textos, 2004, 531p.
- LAROSA, P. C.; RHODES, D.; RHODES, J. C.; BRESSAN, R. A.; CSONKA, L. N. Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered delta1-pyrroline -5-carboxylate reductase. **Plant Physiology**, v.96, n.1, p.245-250. 1991.
- LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, v.25, n.2, p.275-294, 2002.
- LEI, Y.; YIN, C.; LI, C. Differences in some morphological, physiological and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. **Physiologia Plantarum**, v.127, n.2, p.182-191, 2006.
- LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.10, n.8, p.1391-1406, 1998.
- LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J. -M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, v.105, n.3, p.450-458, 1999.
- MAJUMDER, A. L.; SENGUPTA, S.; GOSWANI, L. Osmolyte regulation in abiotic stress. In: PAREEK, A.; SOPORY, S. K.; BOHNERT, H. J.; GOVINDJEE (eds.). Abiotic stress adaptation in plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation. **Springer**, Dordrecht, cap.16, p.350-367, 2010.
- MCCUE, K. F.; HANSON, A. D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. **Trends in Biotechnology**, v.8, n.12, p.358-362, 1990.
- MEDEIROS, P. T. Viabilidade técnica do biodiesel metílico do óleo de duas variedades de *Carthamus tinctorius* L. como substituto do diesel de petróleo. 87p. **Dissertação**. Universidade Federal da Paraíba, 2011.
- MELO, Y. L. Desempenho agrônomo e caracterização de genótipos de girassol (*Helianthus annuus* L.) quanto a marcadores fenológicos, fisiológicos e bioquímicos em duas microrregiões edafoclimáticas do Rio Grande do Norte. 97p. **Dissertação**. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2012.
- MOGHAIEB, R. E. A.; SANEOKA, H.; FUJITA K. Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritima*. **Plant Science**, v.166, n.5, p.1345-1349, 2004.

- MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; BESPALHOK FILHO, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PILEGGI, M.; PEREIRA, F. P. P.; VIEIRA, L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v.167, n.6, p.1375-1381, 2004.
- MUNNS, R.; SCHACHTMAN, D. P.; CONDON, A. G. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.22, n.4, p.561-569, 1995.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell & Environment**, v.25, n.2, p.239-250, 2002.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.651-681, 2008.
- MUNÔZ-CLARES, R. A.; VELASCO-GARCIA, R. Genio y figura de la betaína aldehído deshidrogenasa. **Mensaje Bioquímico**, v.28, p.203-223, 2004.
- NAVARRO, A.; BAÑON, S.; OLMOS, E.; SÁNCHEZ-BLANCO, M. J. Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultrastructure of *Arbutus unedo* plants. **Plant Science**, v.172, n.3, p.473-480, 2007.
- NEPOMUCENO, A. L.; STEWART, J. M.; OOSTEHUIS, D. M.; TURKEY, R.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B. Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.7, p.1407-1416, 2000.
- OELKE, E. A.; OPLINGER, E. S.; TEYNOR, T. M.; PUTNAM, D. H.; DOLL, J. D.; KELLING, K. A.; DURGAN, B. R.; NOETZEL, D. M. Safflower. **Alternative Field Crops Manual**, 1992.
- OLIVEIRA, M. D. M.; BEZERRA, L. L.; DANTAS, C. V. S.; VOIGT, E. L.; MAIA, J. M.; MACÊDO, C. E. C. M. The role of xylopodium in Na⁺ exclusion and osmolyte accumulation in faveleira [*Cnidocolus phyllacanthus* (d. arg.) Pax et K. Hoffm] under salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, n.11, p.2871-2882, 2014.
- OLIVEIRA, M. D. M. Indicadores de estresse salino em faveleira [*Cnidocolus phyllacanthus* (M. Arg.) Pax et K. Hoffm.], espécie promissora para produção do biodiesel. 121p. **Tese**. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2012.
- OPLINGER, E. S.; PUTNAM, D. H.; KAMINSKI, A. R.; HANSON, C. V.; OELKE, E. A.; SCHULTE, E. E.; DOLL, J. D. Sesame. In: **Alternative Field Crops Manual**. Disponível: www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/sesame.html. Acesso em: 10 mar 2015.
- PAGTER, M.; BRAGATO, G.; BRIX, H. Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. **Aquatic Botany**, v.81, n.4, p.285-299, 2005.
- PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, n.3, p.324-349, 2005.
- PARVAIZ, A.; SATYAWATI, S. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants – a review. **Plant, Soil and Environment**, v.54, n.3, p.89-99, 2008.

- RASHID, A.; BEG, A.; ATTARY, A. A.; POURDAD, S. S.; ALIZADEH, K. Oilseed crops for the highlands of CWANA. **ICARDA Caravan**, v.16, p.27-29. 2002.
- RAYAPATI, P. J.; STEWART, C. R. Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. **Plant Physiology**, v.95, n.3, p.787-791. 1991.
- RHODES, D.; HANSON, A. D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.44, p.357-384, 1993.
- ROCHA, I. M. A. Regulação metabólica da acumulação de prolina em folhas de cajueiro expostas ao estresse salino. 104p. **Tese**. Universidade Federal do Ceará, 2003.
- RUIZ, H. A.; SAMPAIO, R. A.; OLIVEIRA, M.; FERREIRA, P. A. Características físicas de solos salino-sódicos submetidos a parcelamento da lamina de lixiviação. **Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal**, v.6, n.3, p.1-12, 2006.
- SEHGAL, D.; RAINA, S. N. Genotyping safflower (*Carthamus tinctorius*) cultivars by DNA fingerprints. **Euphytica, Wageningen**, v.146, n.1-2, p.67-76, 2005.
- SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant Cell & Environment**. v.25, n.2, p.333-341, 2002.
- SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. **Journal of Plant Physiology**, v.162, n.8, p.854-862, 2005.
- SIDDIQUI, M. H.; OAD, F. C. Nitrogen requirement of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) for growth and yield traits. **Asian Journal of Plant Sciences**. v.5, n.3, p.563-565, 2006.
- SILVEIRA, J. A. G.; VIÉGAS, R. A.; ROCHA, I. M. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Proline accumulation and glutamine synthetase are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.160, n.2, p.115-123, 2003.
- SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino. **In**: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, p.161-180, 2010.
- STRIZHOV, N.; ABRAHÁ, E.; ÖKRÉSZ, L.; BLICKLING, S. ZILBERSTEIN, A.; SCHELL, J.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.12, n.3, p.557-569, 1997.
- SUN, W.; BERNARD, C.; VAN DE COTTE, B.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. *At-HSP17.6A*, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. **The Plant Journal**. v.27, n.5, p.407-415, 2001.
- SUNKAR, R.; BARTELS, D.; KIRCH, H. H. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. **The Plant Journal**, v.35, n.4, p.452-464, 2003.

- SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v.15, p.89-97, 2010.
- SZOKE, A.; MIAO, G. H.; HONG, Z.; VERMA, D. P. S. Subcellular location of delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. **Plant Physiology**, v.99, p.1642-1649, 1992.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3a ed. Trad. Eliane Romanato Santarém et al. Porto Alegre: **Artmed**, 2004, 719p.
- TAJI, T; SEKI, M; SATOU, M; SAKURAI, T; KOBAYASHI, M; ISHIYAMA, K; NARUSAKA, Y; NARUSAKA, M; ZHU, J-K; SHINOZAKI, K. Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarrays. **Plant Physiology**, v.135, p.1697-1709, 2004.
- TREICHEL, S. The influence of NaCl on delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase in proline-accumulating cell suspension cultures of *Mesembryanthemum nodiflorum* and other halophytes. **Plant Physiology**, v.67, p.173-181. 1986.
- VERBRUGGEN, N.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M. Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.** v.103, p 771-781, 1993.
- VICENTE, O.; BOSCAIU, M.; NARANJO, M. A.; ESTRELLES, E.; BELLÉS, J. M.; SORIANO, P. Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). **Journal of Arid Environments**, v.58, p.463-481, 2004.
- VILLALOBOS, M. A.; BARTELS, D.; ITURRIAGA, G. Stress Tolerance and Glucose Insensitive Phenotypes in *Arabidopsis* Overexpressing the *CpMYB10* Transcription Factor Gene. **Plant Physiology**, v.135, n.1, p.309-324, 2004.
- VIVAS, M. J. Culturas Alternativas - Cártamo, Sésamo e Camelina. **Melhoramento**, v.38, p.183-192, 2002.
- VOLLET, V. C. Teores de glicina betaína no sistema radicular de genótipos de guandu sob efeito do estresse salino associado à poliamina exógena. 59f. Dissertação. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2006.
- WANG, C. C.; CHOY, C. S.; LIU, Y. H.; CHEAH, K. P.; LI, J. S.; WANG, J. T.; YU, W. Y.; LIN, C. W.; CHENG, H. W.; HU, C. M. Protective effect of dried safflowerpetal aqueous extract and its main constituent, carthamus yellow, against lipopolysaccharide induced inflammation in RAW264.7 macrophages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.91, n.2, p.218-225, 2011.
- WANG, Y.; NIL, N. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.75, n.1, p.623-627, 2000.

WEIMBERG, R.; LERNER, H. R.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Changes in growth and water soluble concentrations in *Sorghum bicolor* stressed with sodium and potassium salts. **Physiologia Plantarum**, v.62, n.3, p.472-480, 1984.

WILLIAMSON, C. L.; SLOCUM, R. D. Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the delta1-pyrroline -5-carboxylate reductase (*proC*) gene in pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**, v.100, n.3, p.1464-1470, 1992.

YANG, W. J.; RICH, P. J.; AXTELL, J. D.; WOOD, K. V.; BONHAM, C. C.; EJETA, G.; MICKELBART, M. V.; RHODES, D. Genotypic variation for glycine betaine in sorghum. **Crop Science Society of America**.v.43, n.1, p.162-169, 2003.

ZHANG, L.; LI, D. Evaluation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germplasm: salt tolerance of indigenous and exotic safflower. p. 366-373, 1993. **In:** Proceedings of the Third International Safflower Conference, Beijing, China, 9-13 June 1993 (Li Dajue and Han Yunzhou, eds.). **Beijing Botanical Garden**, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences.

ZHANG, C-S.; LU,Q.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. **The Journal Biology Chemistry**, v.270, p.20491-20496, 1995.

ZHOU, S.; CHEN, X.; ZHANG, X. Improved salt tolerance in tobacco plants by co-transformation of a betaine synthesis gene *BADH* and a vacuolar Na^+/K^+ antiporter gene *SeNHX1*. **Biotechnology Letters**, v.30, n.2, p.369-376, 2008.

ZHU, B.; SU, J.; CHANG, M. C.; VERMA, D. P. S.; FAN, Y. L.; WU, R. Overexpression of a Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt-stress in transgenic rice. **Plant Science**, v.139, n.1, p.41-48, 1998.

CAPÍTULO II

INDICADORES DE CRESCIMENTO EM CÁRTAMO (*Carthamus tinctorius* L.) SUBMETIDO AO ESTRESSE SALINO E DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO

BEZERRA, Lisiane Lucena. **Indicadores de crescimento em cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) submetido ao estresse salino e déficit hídrico.** 2015. 99f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

O *Carthamus tinctorius* L. vem se destacando nas pesquisas por ser uma espécie promissora para produção de biodiesel, ter boa adaptação a regiões de baixa pluviosidade, além de ser considerada uma cultura moderadamente tolerante a salinidade, podendo ser cultivada em diferentes regiões áridas e semiáridas do mundo. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar o efeito dos estresses salino e déficit hídrico sobre indicadores de crescimento e de status hídrico. Plantas de cártamo foram submetidas aos estresses salino e déficit hídrico, simulados, respectivamente, por cloreto de sódio (NaCl) e polietilenoglicol (PEG 6000). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando cinco tratamentos (controle; 50 mM de NaCl; 100 mM de NaCl; -0,25 MPa de PEG 6000; e -0,50 MPa de PEG 6000) e 15 repetições. Dois dias após os estresses salino e déficit hídrico, as plantas foram coletadas, raízes e folhas separadas, para obtenção das taxas de crescimento absoluta (TCR) e relativo (TCR) assim como a relação área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), relação peso da folha (RPF), relação peso da raiz (RPR) e relação raiz/parte aérea (RR/PA), e os indicadores de status hídrico, conteúdo relativo de água (CRA), percentual de umidade (%U) e o vazamento de eletrólitos (VE). Plantas de *C. tinctorius* respondem de forma diferenciada aos estresses salino e hídrico, induzidos por soluções de NaCl (50 e 100 mM) e por soluções de PEG 6000 (-0,25 e -0,50 MPa), respectivamente. Os tratamentos com NaCl e PEG 6000 foram capazes de induzir alterações significativas em todos os indicadores de crescimento e status hídrico. Contudo a intensidade e tipo de resposta foram diferentes em relação aos estresses aplicados. O déficit hídrico diminuiu as TCA, TCR, RAF, AFE e RPF, e o CRA e o %U nas folhas de cártamo. O estresse salino afetou as variáveis de crescimento, diminuindo as TCA, RAF, AFE, RPR e RR/PA. Os estresses salino e hídrico causaram danos às membranas celulares das folhas e das raízes, sendo maior quando tratadas com PEG 6000. O cártamo mostrou-se mais sensível ao estresse hídrico, possivelmente devido aos íons salinos manterem o potencial osmótico. Os resultados mostraram que a resposta das plantas de cártamo aos estresses salino e déficit hídrico é tratamento e dose dependente.

Palavras-chave: Salinidade; polietilenoglicol; status hídrico.

ABSTRACT

BEZERRA, Lisiane Lucena. **Growth indicators in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) submitted to salt stress and drought.** 2015. 99f. Thesis (PhD in Agronomy/Plant Science) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

Carthamus tinctorius L. is a promising species for biodiesel production due to its better adaptation to low rainfall regions, moderate tolerance to salinity and good capacity to grow in different arid and semi-arid regions in the world. In this work we analyze the effects of salt and drought stresses on plant growth patterns and water status. Safflower plants were exposed to drought and salt stress mediated by sodium chloride (NaCl) and polyethylene glycol (PEG 6000) solutions (control; 50 mM NaCl, 100 mM NaCl; -0,25 MPa PEG 6000, and -0,50 MPa PEG 6000) in a completely randomized experiment with five treatments and 15 repetitions. Two days after treatments plant were harvested to determine absolute and relative growth rates (AGR/RGR), relative leaf area (LAR), specific leaf area (SLA), leaf weight ratio (LWR) root weight ratio (RWR) and root/shoot aerial part ratio (RSR/AP). Water status indicators were also determined regarding relative water content (RWC), moisture percentage and electrolyte leakage (EL). *C. tinctorius* responds differently to salt and water stress induced by NaCl solutions (50 and 100 mM) and PEG 6000 solutions (-0.25 and -0.50 MPa) respectively. Treatments with NaCl and PEG 6000 were able to induce significant changes in all growth and water status indicators. However, the intensity and type of response were different according to the stress conditions assays. Water deficit decreased AGR/RGR, LAR, SLA, LWR, RWC and moisture percentage. Salt stress affected growth variables reducing AGR, LAR, SLA, RWR and RSR/AP. Salt and water stresses caused damage to cell membranes of leaves and roots being higher when treated with PEG 6000. Safflower was more sensitive to water stress possibly the maintenance of osmotic potential. The results showed that the response of safflower plants to salt stress and water deficit is treatment and dose- dependent.

Keywords: Salinity; polyethylene glycol; water status

1 INTRODUÇÃO

O semiárido corresponde a quase 70% da região Nordeste (BRAGA, 2004). Este clima caracteriza-se pelas frequentes secas, devido a baixas precipitações e irregularidades pluviométricas da região (PARAHYBA et al., 2009). Estas características, somadas às más condições de drenagem, à presença de camadas impermeáveis do solo e às elevadas taxas de evapotranspiração, contribuem para o aumento da concentração de sais solúveis na solução do solo (RIBEIRO, 2010), o que caracteriza o estresse salino.

A concentração excessiva de íons salinos (principalmente Na^+ e Cl^-) pode causar perda da homeostase hídrica induzida pela alta osmolaridade da solução do solo (MUNNS, 2002), e ainda toxicidade iônica, gerando danos metabólicos, fisiológicos, estresse oxidativo, e desbalanço nutricional causado pela interferência na absorção de nutrientes essenciais (MUNNS et al., 2006; MUNNS & TESTER, 2008). As consequências lesivas da elevada salinidade podem ser notadas na planta inteira, resultando na inibição do crescimento, diminuição da produtividade e em casos mais severos, a morte (ESTEVES & SUZUKI, 2008).

A redução no potencial hídrico dos tecidos causada pelo excesso de sais e/ou pelo déficit hídrico provoca restrição no crescimento uma vez que as taxas de alongação e de divisão celular dependem diretamente do processo de extensibilidade da parede celular (ASHRAF & HARRIS, 2004). Dessa forma, o equilíbrio osmótico é essencial para o crescimento dos vegetais em meio salino e qualquer falha resultará em injúrias semelhantes aos da seca, como a perda de turgescência e a redução no crescimento, resultando em plantas atrofiadas, desidratação e finalmente a morte das células (ASHRAF & HARRIS, 2004).

Neste contexto, é importante considerar que ao se explorar comercialmente qualquer cultura, o conhecimento dos efeitos dos sais e da seca sobre a mesma, são extremamente importantes, pois isto pode levar a um manejo adequado do cultivo, afim de aumentar o rendimento da cultura. Diante disso, estudos de mecanismos de tolerância a salinidade e à seca, e a identificação de espécies resistentes a tais fatores ambientais são de fundamental importância, pois são formas econômicas e mais viáveis de aumentar a produtividade agrícola em regiões áridas e semiáridas.

O cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) vem ganhando destaque nas pesquisas por ser uma espécie promissora para produção de biodiesel e principalmente por sua relevância na produção de óleo comestível (DAJUE & MUNDEL, 1996). Tem boa adaptação a regiões de baixa pluviosidade (RASHID et al., 2002) devido as raízes profundas, e é considerado uma

cultura moderadamente tolerante a salinidade (MAAS, 1986), além de ser cultivado em diferentes regiões áridas e semiáridas do mundo e com água de baixa qualidade (MAJIDI et al., 2011), o que a torna uma boa alternativa de cultivo para o semiárido nordestino.

Na literatura, diferentes trabalhos apontam o cártamo como uma das culturas de sementes oleaginosas que melhor se adapta a baixos índices pluviométricos. Dado a importância da espécie e o número reduzido de estudos relacionados aos efeitos dos agentes estressores (NaCl e PEG 6000) que induzem respectivamente os estresses salino e hídrico, este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos dos estresses salino e déficit hídrico sob indicadores de crescimento e status hídrico em *C. tinctorius*, visando uma maior compreensão dos efeitos da salinidade e da seca sobre essas variáveis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condução do Experimento

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, localizado no Departamento de Biologia Celular e Genética, no Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal/RN (5°47' de latitude ao sul; 35°12' de longitude a oeste e altitude de 30,9 m).

Sementes de cártamo, adquiridas em loja de alimentação para pássaros, foram selecionadas e colocadas para germinar em sistema de rolo de papel toalha do tipo Germitest[®], conforme descrito por Dantas et al. (2011), em sala de crescimento com temperatura média de 25°C no escuro durante 5 dias. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para o sistema hidropônico na casa de vegetação. As plântulas foram fixadas em vasos plásticos contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) com ¼ de força e pH ajustado para 6,0. As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob temperatura de 30±5°C e umidade relativa do ar de 40±10%, por um período de aclimação de 30 dias.

2.2 Determinação dos Indicadores de Crescimento

Após 30 dias de aclimação as plantas foram utilizadas neste experimento. Dentre as 90 plantas, 15 foram coletadas no tempo zero (T0). Em seguida, as plantas foram separadas em partes (folha, caule e raiz) e pesadas. As folhas foram escaneadas para aferir a área foliar (Figura 1). Em seguida, foram pesadas a massa fresca e levadas para estufa a 60°C por 96 horas para obtenção da massa seca.



Figura 1: Folhas de *Carthamus tinctorius* L. do tratamento controle, escaneadas para aferição da área foliar.

Logo após a primeira coleta, as plantas foram submetidas aos tratamentos, que foram distribuídos em soluções nutritivas Hoagland & Arnon (1950) com modificações, constituídos de: controle (C), sal moderado (50 mM de NaCl), sal severo (100 mM de NaCl), PEG moderado (-0,25 MPa) e PEG severo (-0,50 MPa).

Após 48 horas de cultivo nos diferentes tratamentos, as plantas foram coletadas no tempo final (T1) e feito o mesmo processo da coleta do tempo 0 (T0). A coleta destes dados permitiu a determinação de indicadores de crescimento conforme Benincasa (2000), com adaptações.

A taxa de crescimento absoluta (TCA) e a taxa de crescimento relativo (TCR) foram calculadas através das fórmulas: $TCA = (W_2 - W_1)/(T_2 - T_1)$ e $TCR = (\ln W_2 - \ln W_1)/(T_2 - T_1)$; onde W_2 e W_1 são as massas secas totais da planta aferidas ao final de 2 dias (T1) e no início do experimento (T0), respectivamente; T_2 e T_1 os tempos final e inicial, respectivamente, em que as plantas foram medidas por dia. Para a determinação da área foliar (AF), as folhas foram escaneadas e as imagens digitais foram manuseadas no Software ImageJ® (Powerful Image Analysis) de domínio público. A relação da área foliar (RAF) foi obtida através da fórmula $RAF = (A_2 - A_1).(\ln W_2 - \ln W_1)/(W_2 - W_1).(\ln A_2 - \ln A_1)$; onde A_2 e A_1 são as áreas foliares final e inicial das plantas, respectivamente; W_2 e W_1 são as massas secas final e inicial das plantas, respectivamente. A área foliar específica (AFE), foi calculada através da fórmula $AFE = A/MSf$; onde A refere-se a área foliar e MSf a massa seca das folhas. As relações do peso foliar (RPF) e do peso radicular (RPR) foram calculadas através da razão entre a massa seca das folhas (MSf) e a massa seca total da planta (W) = $RPF: MSf/W$; e da massa seca da raiz (MSr) e a massa seca total da planta (W) = $RPR: MSr/W$, respectivamente. A relação raiz/parte aérea (RR/PA) foi obtida através da relação $MSr/MSf+MSc$; onde MSr é a massa seca da raiz, MSf é a massa seca das folhas e MSc é a massa seca do caule.

2.3 Determinação dos Indicadores de *Status* Hídrico

Folhas e raízes das plantas de cártamo foram avaliadas quanto a indicadores de *status* hídrico, representados pelo conteúdo relativo de água (CRA) e percentual de umidade (%U) segundo Irigoyen et al. (1992) e Slavick (1974), com pequenas modificações. O cálculo do CRA foi realizado com base na expressão matemática $CRA = (MF - MS / MT - MS) \times 100$ e o percentual de umidade foi determinado utilizando-se a relação $\%U = [(MF - MS) / MF] \times 100$.

O vazamento de eletrólitos (VE), medida indireta utilizada para aferir o grau de dano causado às membranas do tecido vegetal, foi determinada segundo Blum e Ebercon, 1981. O percentual de danos às membranas foi calculado através da expressão $VE (\%) = (L1 / L2) \times 100$.

2.4 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (controle; 50mM de NaCl; 100mM de NaCl; -0,25MPa de PEG 6000; e -0,50MPa de PEG 6000) e 15 repetições. Todas as variáveis foram analisadas por análise de variância (ANOVA) mediante significância do teste T e comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com auxílio do software SISVAR.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indicadores de crescimento

Os processos de crescimento são particularmente sensíveis ao efeito dos sais, tornando análises de crescimento como altura média, números de folhas, área foliar, biomassa, e outros, bons critérios para a avaliação da severidade do estresse e da capacidade da planta de superá-lo (ESTEVEVES & SUZUKI, 2008).

Os estresses salino e déficit hídrico, simulados pelo NaCl e PEG 6000, respectivamente, afetaram o crescimento das plantas de cártamo para as seguintes variáveis: taxa de crescimento absoluta (TCA), taxa de crescimento relativo (TCR), razão da área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), razão do peso foliar (RPF), razão do peso radicular (RPR), e relação raiz/parte aérea (RR/PA), sendo significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo de análise de variância das variáveis taxa de crescimento absoluto (TCA), taxa de crescimento relativo (TCR), razão da área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), razão do peso foliar (RPF), razão do peso radicular (RPR), razão do peso do caule (RPC) e relação raiz/parte aérea (RR/PA) em plantas de *Carthamus tinctorius* L. sob condições de estresse salino e déficit hídrico.

| Fontes de variação | GL | Quadro Médio | | | | | | |
|--------------------|----|--------------|---------|-----------|------------|----------|---------|---------|
| | | TCA | TCR | RAF | AFE | RPF | RPR | RR/PA |
| Tratamentos | 4 | 0,105** | 0,011** | 1672,33** | 14070,24** | 0,0049** | 0,021** | 0,641** |
| Erro | 70 | 0,017 | 0,003 | 9,38 | 86,92 | 0,0011 | 0,001 | 0,059 |
| CV (%) | | 36,81 | 33,54 | 13,82 | 13,62 | 10,43 | 28,12 | 21,93 |
| Média | | 0,360 | 0,168 | 22,15 | 68,47 | 0,324 | 0,158 | 1,11 |

** significativo a 1%; ^{ns} não significativo; * significativo a 5%; CV- coeficiente de variação.

Os tratamentos que simularam os estresses salino e déficit hídrico diminuíram significativamente a taxa de crescimento absoluta (TCA), estimada com base na biomassa total da planta por unidade de tempo, provocando redução em relação ao controle. O tratamento com NaCl moderado (50 mM) e severo (100 mM) apresentaram decréscimo de aproximadamente 0,34 e 0,17 vezes, respectivamente em relação ao controle. No tratamento com PEG 6000 moderado (-0,25 MPa) houve uma diminuição de 0,24 vezes na biomassa das plantas de cártamo quando comparado com o controle (Gráfico 1A). A taxa de crescimento relativa (TCR) seguiu a mesma tendência da TCA, com decréscimo de 0,17 vezes para o tratamento com sal moderado, e de 0,28 vezes para o tratamento com PEG 6000 moderado (Gráfico 1B). A diminuição nas TCA e TCR de cártamo, pode ser devido ao componente osmótico e/ou iônico, uma vez que a presença de sais na solução do solo reduz o seu potencial

osmótico, afetando a capacidade de absorção radicular da planta e conseqüentemente o seu metabolismo, além do efeito direto dos íons, causando perturbação nutricional da planta, dificultando dessa forma o seu desenvolvimento. Javed et al., (2014) estudando o efeito do sal em seis cultivares de cártamo obteve redução na biomassa e na produção de massa fresca e seca. A redução e/ou inibição do crescimento e a produção de fitomassa causadas pela salinidade tem sido observado em outras espécies como *Ricinus communis* L. (PINHEIRO et al., 2008), *Anacardium occidentale* L. (FERREIRA-SILVA et al., 2008), *Schinopsis quebracho colorado* (MELONI et al., 2008), *Populus alba* L. (IMADA et al., 2009), *Mentha pulegium* (OUESLATI et al., 2010) e *Jatropha curcas* (SILVA et al., 2009; DÍAZ-LÓPEZ et al., 2012). Istanbulluoglu (2009) estudando o efeito do regime de irrigação em plantas de cártamo, obtiveram rendimento significativamente menor das plantas exposta ao déficit hídrico do que o controle totalmente irrigado, em um ou mais estágio de crescimento. Observa-se claramente os efeitos deletérios da salinidade e da seca sob o crescimento das plantas de cártamo. O déficit hídrico provoca diminuição de crescimento, de vigor e do ganho de massa na maioria das espécies vegetais. Dentre outros motivos, isto ocorre devido ao suprimento de água se dar em quantidades inferiores às requeridas, baixando o componente de potencial de pressão do protoplasto sobre a parede da célula, resultando em diminuição de turgor, e, por fim, afetando a alongação e a divisão celular (XIONG & ZHU, 2001; TAIZ & ZEIGER, 2010).

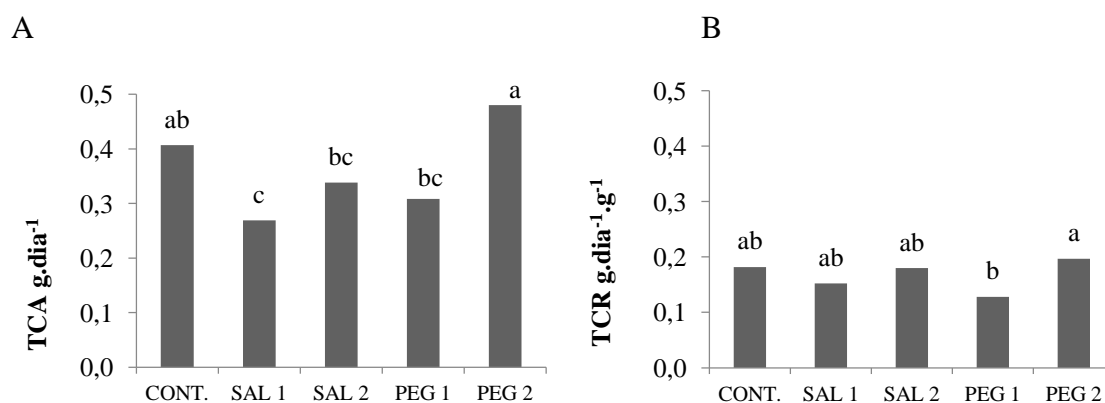


Gráfico 1. A - Taxa de crescimento absoluto (TCA) e B - taxa de crescimento relativo (TCR) em plantas de *Carthamus tinctorius* L., submetidas aos tratamentos controle, NaCl 50 e 100 mM (sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) durante 2 dias em cultivo hidropônico. * Letras iguais não diferem perante o teste de Tukey a 5% de probabilidade

A razão da área foliar (RAF), estimada com base na relação área foliar e peso total da planta apresentou um decréscimo significativo quando as plantas de cártamo foram

submetidas ao estresse salino e déficit hídrico (Gráfico 2A). Observou-se que a diminuição da RAF foi maior nas plantas submetidas ao déficit hídrico que nas tratadas com NaCl. As plantas submetidas ao déficit hídrico obtiveram uma redução de 0,65 e 0,7 vezes para os tratamentos com PEG1 (moderado) e PEG2 (severo) respectivamente, em relação ao controle. Enquanto que nos tratamentos salinos, a redução no estresse moderado foi de 0,18 vezes e no severo foi 0,2 vezes em relação ao controle. A redução observada na RAF de cártamo provavelmente foi devido à perda de turgor da célula vegetal, causando desidratação e consequentemente inibindo a expansão celular. No caso do sal ter reduzido menos em relação ao PEG (indutor do estresse hídrico) é possível que os íons salinos absorvidos tenham diminuído o potencial osmótico da planta para manter o turgor celular, minimizando assim os efeitos do estresse osmótico pela salinidade. Bassil & Kaffka, (2002) estudando o efeito da irrigação salina em plantas de *C. tinctorius*, observou que a área foliar diminuiu, mas não afetou a produção de sementes (floração) da planta. A redução da RAF foi observada por Aragão et al. (2005) em plantas de *Phaseolus vulgaris* e Carmo et al. (2003) em plantas de *Musa velutina*.

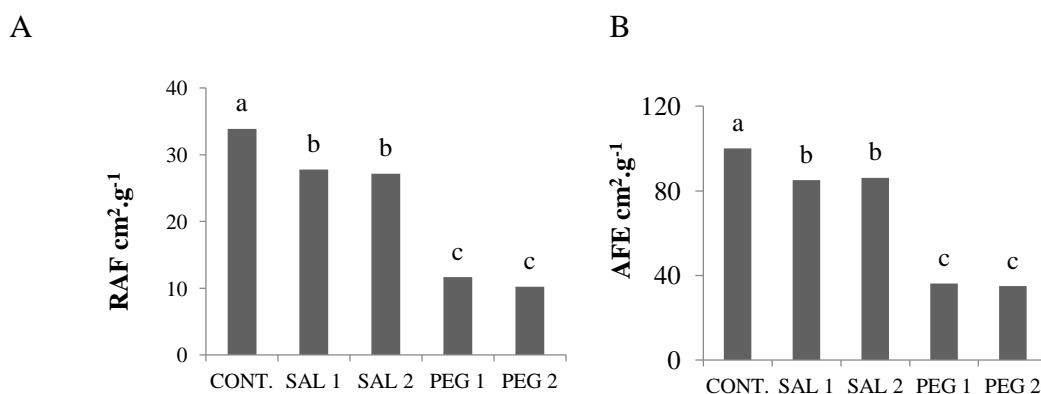


Gráfico 2. A - Razão da área foliar (RAF) e B - área foliar específica (AFE) em plantas de *Carthamus tinctorius* L., submetidas aos tratamentos Controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) durante 2 dias em cultivo hidropônico. * Letras iguais não diferem perante o teste de Tukey a 5% de probabilidade

Uma das primeiras respostas das plantas ao estresse salino é a redução na taxa de crescimento foliar, reduzindo a área foliar disponível para a fotossíntese. Para Bergamaschi et al. (2004), a baixa disponibilidade de água no solo pode provocar redução da área foliar, por secamento ou queda das folhas; trata-se de uma tentativa da planta reduzir a perda de água por transpiração, aumentando a eficiência de uso da água; todavia, isto resulta em queda da

fotossíntese total que, por sua vez, reduz a taxa de crescimento e a produção da planta. Assim, a redução da área foliar pode ser considerada não só um efeito do estresse osmótico, mas também uma linha de defesa contra a seca (KERBAURY, 2009; CORDEIRO et al., 2009).

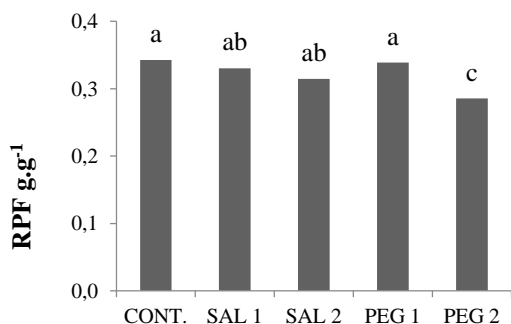
Na área foliar específica (AFE), que relaciona a área foliar com o peso da folha, o estresse salino e o déficit hídrico afetaram as plantas de cártamo. Quando submetidas aos estresses, as plantas de cártamo tiveram uma diminuição da AFE de 0,15 e 0,14 vezes para os tratamentos com NaCl moderado e severo, e 0,64 e 0,65 vezes para os estresses com PEG 6000 moderado e severo, respectivamente, em relação ao controle (Gráfico 2B). A diminuição da AFE em plantas de cártamo foi mais expressiva em presença do déficit hídrico, provavelmente devido ao componente osmótico, que ocasiona à desidratação e à perda de turgor nas células induzida por solutos externos conforme já observado para a RAF. De acordo com Imada et al., (2009) as plantas submetidas ao estresse hídrico sofrem prejuízos nos processos de absorção, acúmulo e manutenção do conteúdo de água e de íons nos tecidos, desencadeando modificações no potencial hídrico, na nutrição mineral, no balanço de íons e na eficiência fotossintética. A redução e/ou inibição do crescimento e da produção de fitomassa causadas pelo déficit hídrico foi observada em *Brachiaria Brizantha* (PEZZOPANE et al., 2015) e pela salinidade tem sido observado em outras espécies como *Ricinus communis* L. (PINHEIRO et al., 2008), *Anacardium occidentale* L. (FERREIRA-SILVA et al., 2008), *Schinopsis quebracho colorado* (MELONI et al., 2008), *Populus alba* L. (IMADA et al., 2009), *Mentha pulegium* (OUESLATI et al., 2010) e *Jatropha curcas* (SILVA et al., 2009; DÍAZ-LÓPEZ et al., 2012).

A relação do peso foliar (RPF), estimada com base na relação entre a massa seca do peso foliar e o peso total da planta, teve decréscimo de 0,03 e 0,09 vezes no estresse salino (moderado e severo) respectivamente, e quando submetido ao déficit hídrico, o decréscimo da RPF foi significativo apenas no tratamento severo de PEG 6000 com uma diminuição de 0,12 vezes em relação ao controle (Gráfico 3A). Considerando que as folhas são o centro de produção de matéria seca através da fotossíntese e, que as demais partes da planta dependem dessa fitomassa, a RPF expressa então a massa não exportada (BENINCASA, 2003). Lima et al., (2007) encontraram redução da massa seca de folha em diferentes culturas, quando submetidos ao estresse salino.

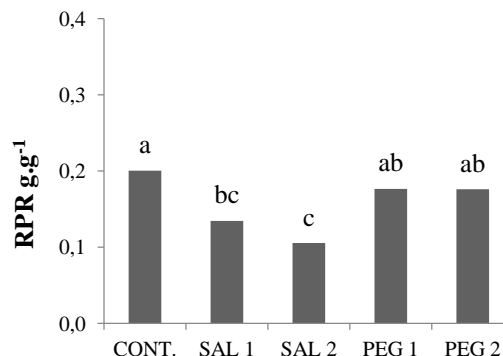
A relação do peso radicular (RPR), estimada na relação entre a massa seca do peso da raiz e o peso total da planta, teve decréscimo significativo quando submetido ao estresse salino (moderado e severo) com uma diminuição de 0,35 e 0,45 vezes respectivamente, em

relação ao controle. Quando tratadas com PEG 6000, a RPR não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos estudados (Gráfico 3B).

A



B



C

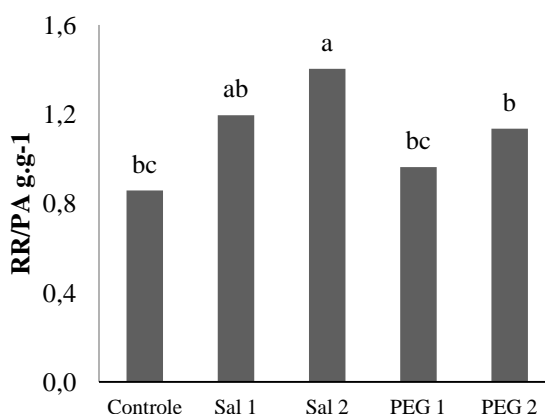


Gráfico 3. A - Relação peso foliar (RPF), B - relação peso da raiz (RPR) e C - relação raiz/parte aérea (RR/PA) em plantas de *Carthamus tinctorius* L., submetidas aos tratamentos Controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) durante 2 dias em cultivo hidropônico. * Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Na relação raiz e parte aérea (RR/PA), estimada entre a massa seca de raiz pela massa seca da parte aérea (folha + caule), houve um aumento significativo de 0,4 vezes para o estresse salino moderado e de 0,33 vezes para o estresse salino severo, em relação ao controle. Nas plantas submetidas ao déficit hídrico, o aumento da RR/PA foi de 0,15 e 0,32 vezes no tratamento com PEG moderado e severo respectivamente, em relação ao controle (Gráfico 3C). A adição de NaCl e PEG 6000 na solução nutritiva aumentou a razão raiz/parte aérea no estresse salino e no déficit hídrico, indicando que o efeito da salinidade e da seca foram mais evidentes na parte aérea que no sistema radicular. Lima et al. (2007) observaram que a salinidade prejudicou mais o sistema radicular que a parte aérea em plantas de *Phaseolus*

vulgaris. Em plantas de cártamo, o estresse salino diminuiu a biomassa das folhas e das raízes em relação a biomassa total da planta. O estresse hídrico diminuiu apenas a biomassa da folha em relação a planta total. As alterações na distribuição percentual da matéria seca provocadas pelo estresse salino são condizentes com o fato de que a salinidade, além de reduzir a produção de biomassa pode também alterar a partição de fotoassimilados entre as diferentes partes das plantas (SILVA, 2003).

3.2 Indicadores de *status* hídrico

O conteúdo relativo de água (CRA) e o percentual de umidade (%U) dizem respeito à quantidade de água da planta em porcentagem levando em consideração a sua capacidade máxima e o percentual bruto de água presente na planta, respectivamente. Sendo assim, ambos podem ser considerados bons indicadores indiretos de *status* hídrico no vegetal.

Os estresses salino e déficit hídrico, simulados pelo NaCl e PEG 6000, respectivamente, afetaram o *status* hídrico das plantas de cártamo para as seguintes variáveis: conteúdo relativo de água (CRA) em folhas e raízes, percentual de umidade (%U) apenas em folhas e vazamento de eletrólitos (VE) em folhas e raízes, sendo significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, com exceção do CRA em raízes que significativo a 5% (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo de análise de variância das variáveis conteúdo relativo de água (CRA) em folhas e raízes, percentual de umidade (%U) em folhas e raízes vazamento de eletrólitos (VE) em folhas e raízes de *Carthamus tinctorius* L. em condições de estresse salino e déficit hídrico.

| Fontes de variação | GL | Quadro Médio | | | | | |
|--------------------|----|--------------|----------|----------|--------------------|-----------|----------|
| | | CRA FOLHA | CRA RAIZ | %U FOLHA | %U RAIZ | VE FOLHA | VE RAIZ |
| Tratamentos | 4 | 1599,74** | 44,23* | 282,73** | 1,80 ^{ns} | 1396,56** | 769,04** |
| Erro | 20 | 43,64 | 13,83 | 21,21 | 0,83 | 26,43 | 54,42 |
| CV (%) | | 9,46 | 4,60 | 5,11 | 0,95 | 24,31 | 29,20 |
| Média | | 69,83 | 80,81 | 90,07 | 96,62 | 21,14 | 45,87 |

** significativo a 1%; * significativo a 5%; ^{ns} não significativo a 5%; CV- coeficiente de variação.

O estresse salino simulado pelo NaCl, não interferiu na quantidade de água das folhas de plantas de cártamo, expressa pelo CRA e pelo %U. Já nas folhas das plantas tratadas com PEG 6000 houve uma diminuição do CRA e do %U (Gráficos 4A e 4C). Nas folhas, tal efeito foi mais acentuado, com uma diminuição significativa de 0,3 e 0,5 vezes CRA, e de 0,1 e 0,2 vezes no %U, para o déficit hídrico moderado e severo respectivamente, e em relação aos seus controles. Nas raízes, o CRA aumentou 0,2 no estresse salino (moderado e severo) e 0,1 e 0,2

no déficit hídrico moderado e severo respectivamente (Gráfico 4B). O %U nas raízes não foi afetado pelos estresses salino e hídrico (Gráfico 4D).

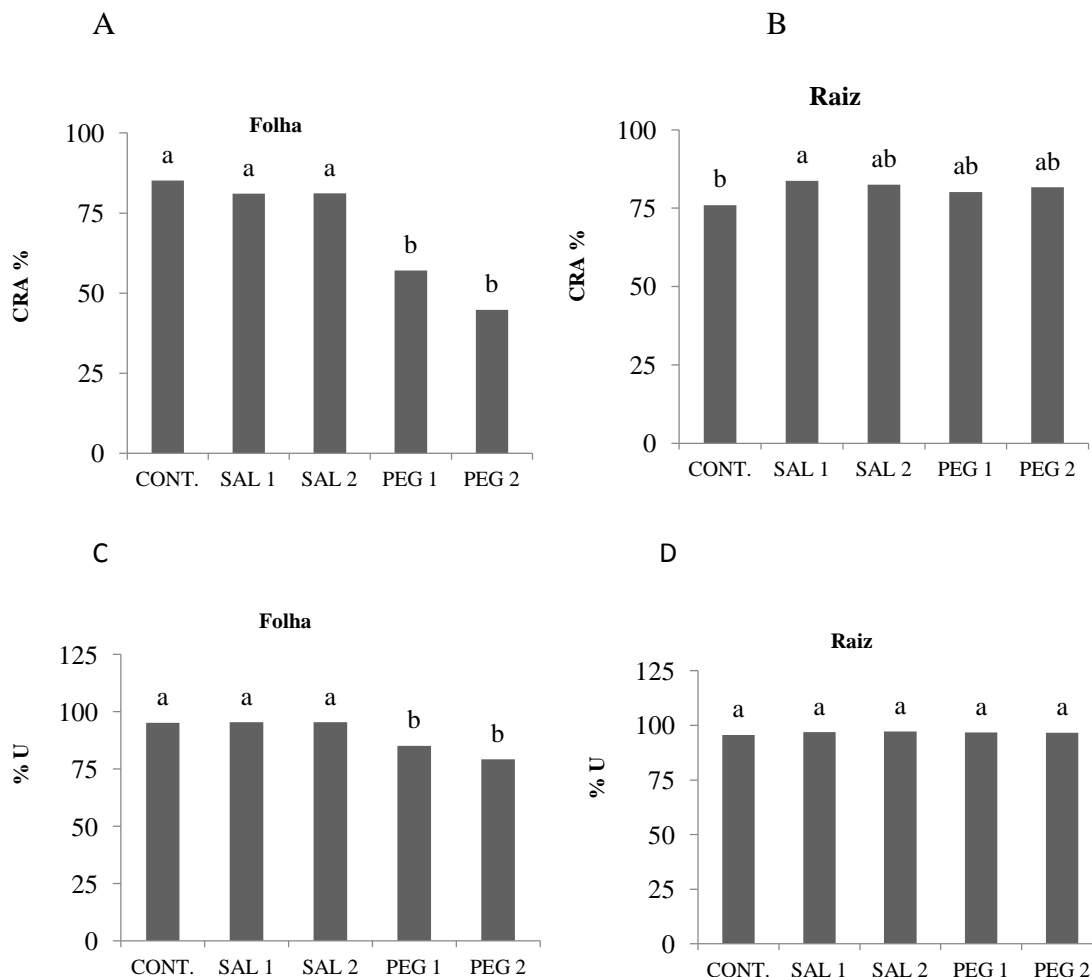


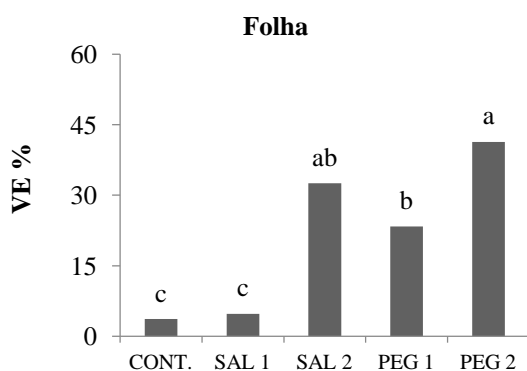
Gráfico 4. Conteúdo relativo de água (CRA) em folhas (A) e raízes (B), percentual de umidade (%U) em folhas (C) e raízes (D) de *Carthamus tinctorius* L., submetidas aos tratamentos controle, NaCl 50 e 100 mM (sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) durante 2 dias em cultivo hidropônico. * Letras iguais não diferem perante o teste de Tukey a 5% de probabilidade

Observou-se com os resultados que o cártamo é mais afetado pelo estresse hídrico induzido pelo PEG 6000 e que no caso do componente osmótico da salinidade, é possível que os íons salinos absorvidos tenham sido responsáveis por uma diminuição do potencial osmótico da planta suficiente para manter o status hídrico, anulando parcialmente ou completamente os efeitos do estresse osmótico pela salinidade. Resultados obtidos por Araújo et al. (2006), com a halófita *Atriplex nummularia* L., e por Silva et al. (2009), com *Jatropha curcas* L., mostram que o sal não interferiu no status hídrico da planta. Contrariamente, neste trabalho, os resultados do CRA das folhas das plantas cultivadas em presença de NaCl diferem dos resultados obtidos por Siddiqi & Ashraf (2008), também com *Carthamus*

tinctorius, que observaram redução no CRA em folhas das plantas cultivadas em presença de estresse salino. Provavelmente, essas diferenças são devido às condições experimentais, mais precisamente a dose de NaCl utilizada para simular o estresse salino e o tempo de exposição ao mesmo em cada trabalho, visto que Siddiqi & Ashraf (2008) utilizaram uma concentração de 150 mM de NaCl, ou seja, 50% mais da concentração máxima utilizada neste experimento, e o tempo de permanência no estresse foi de seis semanas enquanto nesse trabalho o tempo de estresse foi de dois dias.

A condutividade elétrica mede o vazamento de eletrólitos (VE) para a solução, sendo utilizada como medida indireta para avaliar os danos as membranas celulares, causadas pelos estresses salino e déficit hídrico. O estresse salino, imposto pelo tratamento severo (100 mM) aumentou o vazamento de eletrólitos, nas folhas de cártamo em comparação ao controle. Tal aumento foi de quase 8 vezes em relação ao controle (Gráfico 5A). Com relação ao déficit hídrico imposto pelo PEG 6000, o VE aumentou conforme o aumento da concentração deste agente indutor. No déficit hídrico moderado (-0,25MPa) o aumento foi de 5,3 vezes, enquanto que no severo (-0,50MPa) o aumento foi de 10,2 vezes em relação ao controle. Nas raízes, o vazamento de eletrólitos, foi bem maior que nas folhas (Gráfico 5B). Provavelmente esse acréscimo ocorreu devido a um contato direto deste órgão com a solução salina e com o PEG 6000. Tanto no tratamento salino como no hídrico as raízes tiveram um aumento do dano de membrana, proporcional ao aumento da concentração do estresse. Em relação ao controle, observou-se um aumento de 0,6 e 1,3 vezes para os tratamentos com NaCl (50 e 100 mM) e de 1 e 1,3 vezes para os tratamentos com PEG 6000 (-0,25 MPa e -0,50 MPa) respectivamente.

A



B

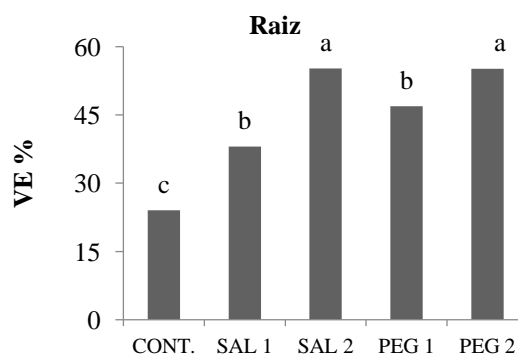


Gráfico 5. Vazamento de eletrólitos (VE) em folhas (A) e raízes (B) de *Carthamus tinctorius* L., submetidas aos tratamentos controle, NaCl 50 e 100 mM (sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente) durante 2 dias em cultivo hidropônico. * Letras iguais não diferem perante o teste de Tukey a 5% de probabilidade

As membranas celulares são uma das primeiras estruturas afetadas pelos estresses salino e hídrico em condições típicas de ambiente semiárido. Nesse contexto, o VE em cártamo submetidos aos estresses salino e hídrico pode estar relacionado mais ao efeito osmótico, devido a dificuldade de absorção de água da solução nutritiva. Com a diminuição do conteúdo de água do solo, há, proporcionalmente, uma diminuição da pressão hidrostática, podendo fazer com que os valores desta pressão sejam negativos e que as plantas percam a força de sucção suficiente para absorver a água do solo. Como consequência do decréscimo do conteúdo de água da planta, as células se contraem, havendo uma diminuição da pressão de turgescência contra as paredes celulares e um aumento da concentração de solutos nessas células (TAIZ & ZEIGER, 2010). No caso do estresse salino, além do efeito osmótico, existe o efeito iônico, que se dá através da toxicidade da planta pela absorção de íons específicos e, como efeito secundário, pela interferência dos sais nos processos fisiológicos, causando um desbalanceamento nutritivo (LÄUCHLI & GRATTAN, 2007; MUNNS & TESTER, 2008; DIAS & BLANCO, 2010). Resultados referentes a relação entre o aumento de concentração de PEG 6000 e o dano de membrana também foram descritos por Faria (2010) em folhas de cinco cultivares de *Ricinus communis* L. (mamoneira).

4 CONCLUSÕES

Plantas de *C. tinctorius* respondem de forma diferenciada aos estresses salino e déficit hídrico, induzidos por soluções de NaCl (50 e 100 mM) e por soluções de PEG 6000 (-0,25 e -0,50 MPa), respectivamente.

Os tratamentos com NaCl e PEG 6000 são capazes de induzir alterações significativas nos indicadores de estresse associados ao crescimento (TCA, TCR, RAF, AFE, RPF, RPR e RPC) ao status hídrico (CRA, %U) e as membranas celulares (VE) das plantas de cártamo.

O déficit hídrico isolado afeta o crescimento e o status hídrico das plantas, diminuindo as TCA, TCR, RAF, AFE e RPF nas variáveis de crescimento, e o CRA e o %U nas folhas de cártamo.

O estresse salino afeta as variáveis de crescimento, diminuindo as TCA, RAF, AFE, RPR e RR/PA.

Os estresses salino e hídrico causam danos às membranas celulares das folhas e das raízes, sendo maior quando tratadas com PEG 6000.

O cártamo mostra-se mais sensível ao estresse hídrico, possivelmente devido aos íons salinos manter o potencial osmótico.

A salinidade e a seca afetam o crescimento e o status hídrico das plantas de cártamo, mostrando que a resposta das plantas ao estresse salino e hídrico é tratamento e dose dependente.

5 REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, M. E. F.; GUEDES, M. M.; OTOCH, M. L. O.; GUEDES, M. I. F.; MELO, D. F.; LIMA, M. G. S. Differential responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activities of two *Vigna unguiculata* cultivars to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n.2, p.207-212, 2005.
- ARAÚJO, S. A. M.; SILVEIRA, J. A. G.; ALMEIDA, T. D.; ROCHA, I. M. A.; MORAIS, D. L.; VIÉGAS, R. A. Salinity tolerance of halophyte *Atriplex nummularia* L. grown under increasing NaCl levels. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, n.4, p.848-854, 2006.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v.6, n.1, p.3-16, 2004.
- BASSIL, E. S.; KAFFKA, S. R. Response of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to saline soils and irrigation. II. Crop response to salinity. **Agricultural Water Management**. v.54, n.1, p.81-92, 2002.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 42p. 2003.
- BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G. A.; BERGONCI, J. I.; BIANCHI, C. A. M.; MÜLLER, A. G.; COMIRAN, F.; HECKLER, B. M. M. Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.9, p.831-839, 2004.
- BLUM, A.; EBERCON, A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. **Crop Science**, v.21, n.1, p.43-47, 1981.
- BRAGA, O. R. Educação e convivência com o semi-árido: introdução aos fundamentos do trabalho político-educativo no semi-árido brasileiro. Educação no contexto do semi-árido brasileiro. Fundação Konrad Adenauer, p.25-44, 2004.
- CARMO, G. A.; MEDEIROS, J. F.; TAVARES, J. C.; GHEYI, H. R.; SOUZA, A. M.; PALÁCIO, E. A. Q. Crescimento de bananeiras sob diferentes níveis de salinidade da água de irrigação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.3, p.513-518, 2003.
- CORDEIRO, Y. E. M.; PINHEIRO, H. A.; FILHO, B. G. S.; CORREA, S. S.; SILVA, J. R. R. E.; FILHO, M. B. D. Physiological and morphological responses of young mahogany (*Swietenia macrophylla* King) plants to drought. **Forest Ecology and Management**, v.258, n.7, p.1449-1455, 2009.
- DAJUE, LI.; MÜNDEL, H. H. Safflower *Carthamus tinctorius* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 7. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben. **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome, Italy. 1996, 83p.
- DANTAS, C. V. S.; SILVA, I. B.; PEREIRA, G. M.; MAIA, J. M.; LIMA, J. P. M. S.; MACEDO, C. E. C. Influência da sanidade e déficit hídrico na germinação de sementes de *Carthamus tinctorius* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.3, p.574-582, 2011.

DIAS, N. S.; BLANCO, F. F. Efeitos dos sais no solo e na planta. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, p.130-141, 2010.

DÍAZ-LÓPEZ, L.; GIMENO, V.; LIDÓN, V.; SIMÓN, I.; MARTÍNEZ, V.; GARCÍA-SÁNCHEZ, F. The tolerance of *Jatropha curcas* seedlings to NaCl: an ecophysiological analysis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.4, p.34-42, 2012.

ESTEVES, B. S.; SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasileira**, v.4, n.12, p.662-679, 2008.

FARIA, A. P. Avaliação *ex vivo* da tolerância de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) ao déficit hídrico. 71p. **Dissertação** – Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

FERREIRA-SILVA, S. L.; SILVEIRA, J. A. G.; VOIGT, E. L.; SOARES, L. S. P.; VIÉGAS, R. A. Changes in physiological indicators associated with salt tolerance in two contrasting cashew rootstocks. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.20, n.1, p.51-59, 2008.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**, Berkeley. 1950, 347p.

IMADA, S.; YAMANAKA, N.; TAMAI, S. Effects of salinity on the growth, Na partitioning, and Na dynamics of a salt-tolerant tree, *Populus alba* L. **Journal of Arid Environments**, v.73, n.3, p.245-251, 2009.

IRIGOYEN, J. J.; EMERICH, D. W.; SANCHEZ-DIAZ, M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfafa (*Medicago sativa*) plants. **Physiologia Plantarum**, v.84, n.1, p.55-66, 1992.

ISTANBULLUOGLU, A. Effects of irrigation regimes on yield and water productivity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under Mediterranean climatic conditions. **Agricultural Water Management**. v.96, n.12, p.1792-1798, 2009.

JAVED, S.; BUKHARI, S. A.; ASHRAF, M. Y.; MAHMOOD, S.; IFTIKHAR, T. Effect of salinity on growth, biochemical parameters and fatty acid composition in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v.46, n.4, p.1153-1158, 2014.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, 452p.

LÄUCHLI, A.; GRATTAN, S. R. Plant growth and development under salinity stress. In: JENKS, M. A.; HASEGAWA, P. M.; JAIN, S. M. Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops. **Springer**, p.1-32, 2007.

LIMA, C. J. G. S.; OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS, J. F.; OLIVEIRA, M. K. T. O.; ALMEIDA JÚNIOR, A. B. Resposta do feijão-caupi a salinidade da água de irrigação. **Revista Verde de Agroecologia e Agricultura Sustentável**, v.2, n.2, p.79-86, 2007.

MAAS, E. V. Salt tolerance of plants. **Applied Agricultural Research**, v.1, n.1, p.12-26, 1986.

- MAJIDI, M. M.; TAVAKOLI, V.; MIRLOHI, A.; SABZALIAN, M. R. Wild safflower species (*Carthamus oxyacanthus* Bieb.): A possible source of drought tolerance for arid environments. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.8, p.1055-1063, 2011.
- MELONI, D. A.; GULOTTA, M. R.; MARTÍNEZ, C. A. Salinity tolerance in *Schinopsis quebracho colorado*: Seed germination, growth, ion relations and metabolic responses. **Journal of Arid Environments**, v.72, n.10, p.1785-1792, 2008.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell and Environment**, v.25, n.2, p.239-250, 2002.
- MUNNS, R.; JAMES, R. A.; LÄUCHLI, A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.5, p.1025-1043, 2006.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mecanismos of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.651-681, 2008.
- OUESLATI, S.; KARRAY-BOURAOUI, N.; ATIA, H.; RABHI, M.; KSOURI, R.; LACHASAL, M. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.2, p.289-296, 2010.
- PARAHYBA, R. E. R.; CAVALCANTI, V. M. M.; PERLATTI, F. Mineração no semiárido brasileiro. Departamento Nacional de Produção Mineral, Brasília, 2009.
- PEZZOPANE, C. G.; SANTOS, P. M.; CRUZ, P. G.; ATLOÉ, J.; RIBEIRO, F. A.; VALLE, C. B. Estresse por deficiência hídrica em genótipos de *Brachiaria brizantha*. **Ciência Rural**, v.45, n.5, p.871-876, 2015.
- PINHEIRO, H. A.; SILVA, J. V.; ENDRES, L.; FERREIRA, V. M.; CÂMARA, C. A.; CABRAL, F. F.; OLIVEIRA, J. F.; CARVALHO, L. W. T.; SANTOS, J. M.; FILHO, B. G. Leaf gas exchange, chloroplastic pigments and dry matter accumulation in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings subjected to salt stress conditions. **Industrial Crops and Products**, v.27, n.3, p.385-392, 2008.
- RASHID, A.; BEG, A.; ATTARY, A. A.; POURDAD, S. S.; ALIZADEH, K. Oilseed crops for the highlands of CWANA. **ICARDA Caravan**, v.16 p.27-29. 2002.
- RIBEIRO, M. R. Origem e classificação dos solos afetados por sais. **In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados.** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, p.12-19, Fortaleza, 2010.
- SIDDIQI, E. H.; ASHRAF, M. Can leaf water relation parameters be used as selection criteria for salt tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v.40, n.1, p.221-228, 2008.
- SLAVICK, B. **Methods of studying plant water relations.** New York: Springer Verlong, 1974, 449p.
- SILVA, J. V.; LACERDA, C. F.; AZEVEDO-NETO, A. D.; COSTA, P. H. A.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; GOMES-FILHO, E. Crescimento e osmorregulação em dois

genótipos de sorgo forrageiro submetidos a estresse salino. **Revista Ciência Agronômica**, v.33, p.125-131, 2003.

SILVA, E. N.; SILVEIRA, J. A. G.; RODRIGUES, C. R. F.; LIMA, C. S.; VIÉGAS, R. A. Contribuição de solutos inorgânicos no ajustamento osmótico de pinhão-mansão submetido à salinidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.5, p.437-445, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed, Artmed, Porto Alegre, 2010.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994, 164p.

XIONG, L.; ZHU, J. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v.25, n.2, p.131-139, Nottingham, 2001.

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

CAPÍTULO III

INDICADORES DE AJUSTAMENTO OSMÓTICO EM CÁRTAMO (*Carthamus tinctorius* L.) SUBMETIDO AO ESTRESSE SALINO E DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO

BEZERRA, Lisiane Lucena. **Indicadores de ajustamento osmótico em cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) submetido ao estresse salino e déficit hídrico.** 2015. 99f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

Carthamus tinctorius L. é uma planta economicamente importante dentre as oleaginosas, devido ao elevado teor de óleo (32 a 40%), ideal para a produção de biodiesel. É resistente à condição salina e ao déficit hídrico. Tem baixo custo de produção, menores necessidades de água e de nutrientes, tornando-se assim uma alternativa a mais de cultivo para os agricultores em regiões áridas e semiáridas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos estresses salino e déficit hídrico relacionados a uma possível contribuição de solutos orgânicos e inorgânicos no ajustamento osmótico do cártamo. Plantas de cártamo foram cultivadas em sistema hidropônico com solução nutritiva de Hoagland & Arnon. Após 30 dias de aclimação, as plantas foram submetidas aos estresses (moderado e severo) com NaCl e PEG 6000 durante dois dias. Foram 5 tratamentos: controle; estresse salino (50 e 100 mM de NaCl) e déficit hídrico (-0,25 e -0,50 MPa), com cinco repetições. As plantas foram coletadas, sendo avaliados os solutos inorgânicos: sódio (Na^+) e potássio (K^+) e orgânicos (açúcares solúveis totais - AST, proteínas solúveis totais - PST, aminoácidos livres totais AALT prolina - PRO, e glicina-betaína - GB). Os resultados mostraram que em relação ao controle, o estresse salino provocou aumento do conteúdo de Na^+ nas folhas, sendo de 8 vezes nas plantas tratadas 100 mM de NaCl, e de 2 vezes nas raízes tratadas com 50 mM de NaCl. Já o déficit hídrico provocou acúmulo de K^+ nas folhas das plantas tratadas com PEG 6000. A relação Na^+/K^+ foi maior que 0,6, indicando uma possível toxidez iônica. Os solutos orgânicos foram acumulados quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico. As folhas acumularam AST, PST, AALT, PRO e GB e as raízes acumularam PST, AALT e GB. Tais efeitos evidenciam um possível ajustamento osmótico. Quando tratadas com NaCl, as plantas mantiveram o conteúdo de solutos orgânicos em relação ao controle. Plantas de cártamo respondem de forma diferenciada aos efeitos da salinidade e do déficit hídrico quanto ao acúmulo de solutos inorgânicos e orgânicos, mostrando que a resposta das plantas é tratamento e dose dependente.

Palavras-chave: Cártamo; solutos orgânicos; solutos inorgânicos; osmorregulação.

ABSTRACT

BEZERRA, Lisiane Lucena. **Osmotic adjustment indicators in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) submitted to salt stress and drought.** 2015. 99f. Thesis (PhD in Agronomy/Plant Science) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

Carthamus tinctorius L. is an economically oleaginous crop appropriated for biodiesel production due to oil contain (32 - 40%), resistance to salt and drought stresses, low production costs and good adaptation to arid and semi-arid regions. The aim of this work was to evaluate the effects of salt and water stress in the osmotic adjustment of safflower. Plants were grown and hydroponics acclimated in Hoagland & Arnon solution for 30 days then submitted to stress (moderate and severe) with NaCl and PEG 6000 for two days in 5 treatments: control; salt stress (50 and 100 mM NaCl) and water deficit (-0.25 and -0.50 MPa) with five repetitions. Plant were collected and inorganic (Na^+ , K^+) and organic (total soluble sugars - TSS, total soluble protein - TSP, total free amino acids - TFAA, proline - PRO, and glycine betaine - GB) amounts were determined. Salt stress has increased the content of Na^+ in the leaves (8 times on 100 mM), and roots (2 times treated with 50 mM). Drought caused accumulation of K^+ in the leaves of plants treated with PEG 6000. The Na^+/K^+ rate was higher than 0.6 indicating a possible ionic toxicity. Organic solutes were accumulated when the plants were submitted to water deficit. The leaves accumulated TSS, TSP, TFAA, PRO and GB and the roots accumulated TSP, TFAA and GB. Such effects indicates a possible osmotic adjustment. When treated with NaCl plants kept the content of organic solutes compared to control. Safflower plants respond differently to the effects of salinity and drought as the accumulation of inorganic and organic solutes showing that the response is treatment and dose-dependent.

Keywords: Safflower; organic solutes; inorganic solutes; osmoregulation.

1 INTRODUÇÃO

A salinidade e o déficit hídrico são uns dos principais fatores abióticos limitantes da produção agrícola no semiárido (DANTAS et al., 2011). O efeito em comum de ambos estresses nas plantas é a perda da homeostase hídrica, caracterizada pelo componente osmótico. Tal efeito afeta os processos de absorção, acúmulo e manutenção do conteúdo de água e de íons nos tecidos, o que desencadeia danos celulares levando a desidratação e à perda de turgor nas células induzidas por solutos externos (IMADA et al., 2009; VICENTE et al., 2004; D'SOUZA & DEVERAJ, 2010).

Adicionalmente o estresse salino possui um segundo componente, o iônico, que envolve a interferência dos íons salinos na absorção, distribuição e utilização dos nutrientes minerais, acarretando distúrbios na homeostase iônica celular (MAATHIUS et al., 1996; ZHU, 2003; SHABALA & CUIN, 2008; SHABALA, 2009). Estas alterações afetam a atividade de enzimas que atuam em processos metabólicos fundamentais como a síntese de proteínas, a respiração e a fotossíntese (ELLOUZI et al., 2011; SHABALA et al., 2012).

Uma estratégia para garantir a manutenção da homeostase hídrica é o ajustamento osmótico, ou osmorregulação, que consiste na síntese e acumulação de solutos orgânicos compatíveis no citosol (ASHRAF & HARRIS, 2004; BUCHANAN et al., 2009) e na absorção de íons inorgânicos que são compartimentalizados, ou sequestrados nos vacúolos, fazendo assim com que haja um aumento na concentração de solutos na célula. Desta forma, esse mecanismo permite a redução no potencial osmótico e aumento no potencial de turgescência da célula, garantindo a absorção de água e a manutenção do crescimento celular (SILVEIRA et al., 2010). Assim, a homeostase hídrica depende da contribuição relativa de diferentes solutos inorgânicos e orgânicos (OUESLATI et al., 2010).

Solutos orgânicos, mais especificamente os osmólitos compatíveis, ou osmoprotetores são sintetizados em condições de estresse hídrico e salino, auxiliando no ajustamento osmótico, na proteção subcelular e na redução de danos oxidativos (BUCHANAN et al., 2002). Os osmoprotetores mais comumente estudados e que contribuem na osmoregulação em diferentes espécies são os açúcares redutores (D'SOUZA & DEVARAJ, 2010) e não redutores (JENCI & NATARAJAN, 2009), os compostos quaternários de amônio como a glicina-betaína (KHOLLOVA et al., 2010), as proteínas (OLIVEIRA et al., 2014), e a prolina (VICENTE et al., 2004; KÖSKEROSGLU & TUNA, 2010). Dentre os solutos inorgânicos, e em algumas espécies, foi evidenciado que o acúmulo de íons, tais como Na^+ , K^+ e Cl^- ,

também favoreceram o ajustamento osmótico (KHOLLOVA et al., 2010; MELONI et al., 2008; SONG et al., 2006). Entretanto, segundo Ashraf & Harris (2004), as contribuições relativas desses elementos variam entre as espécies, entre as cultivares de uma mesma espécie, entre órgãos e tecidos de uma mesma planta e até entre diferentes compartimentos de uma célula.

Nesse contexto, o acúmulo e a distribuição de íons, bem como a contribuição ao ajustamento osmótico, no estabelecimento e na produtividade de plantas cultivadas em resposta aos estresses salino e hídrico vem sendo largamente estudados (BOYER, 1982; SERRAJ & SINCLAIR, 2002; VIÉGAS et al., 2004; SOUZA et al., 2011). Contudo, em algumas espécies, como é o caso do *Carthamus tinctorius* L., não existem trabalhos relacionados a contribuição de solutos orgânicos e inorgânicos no ajustamento osmótico, sob estresse salino e hídrico.

O cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) é cultivada em regiões semiáridas da Ásia, México, Irã e América do Norte (KNOWLES, 1989; GOLKAR et al., 2010). Uma planta economicamente importante dentre as oleaginosas, devido ao elevado teor de óleo (32 a 40%) com 70 % de ácido linoléico e 30% de ácido oléico, ideais para a produção de biodiesel (VIVAS, 2002; OPLINGER et al., 2010). É resistente à condição salina (BASSIL & KAFFKA, 2002) e ao estresse hídrico (BASSIRI, 1977). Tem baixo custo de produção, e menores necessidades de água e de nutrientes, tornando-se um recurso viável aos agricultores como uma planta alternativa em áreas de cultivo (COSGE & KAYA, 2008).

Diante do exposto, faz-se necessário o estudo de mecanismos de tolerância das plantas de cartamo a salinidade e a seca, visando uma posterior introdução da referida espécie, como forma econômica viável do seu cultivo em regiões semiáridas e áridas. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos estresses salino e déficit hídrico no *Carthamus tinctorius* L. relacionados a uma possível contribuição de solutos orgânicos e inorgânicos no ajustamento osmótico da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da Área Experimental

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, localizado no Departamento de Biologia Celular e Genética, no Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal/RN (5°47' de latitude ao sul; 35°12' de longitude a oeste e altitude de 30,9 m).

2.2 Material Vegetal e Condições Experimentais

Sementes de cártamo, adquiridas de uma loja de alimentação para pássaros, foram selecionadas e colocadas para germinar em sistema de rolo de papel toalha do tipo Germitest[®], conforme descrito por Dantas et al. (2011), em sala de crescimento com temperatura média de 25°C no escuro durante 5 dias. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para o sistema hidropônico na casa de vegetação. As plântulas foram fixadas em vasos plásticos contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) com ¼ de força e pH ajustado para 6,0. As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob temperatura de 30±5°C e umidade relativa do ar de 40±10%, por um período de aclimação de 30 dias.

Após 30 dias de aclimação, as plantas de cártamo foram submetidas aos tratamentos, que foram distribuídos em soluções nutritivas Hoagland & Arnon com modificações, constituídos de: controle (C), sal moderado (50 mM de NaCl), sal severo (100 mM de NaCl), PEG moderado (-0,25 MPa) e PEG severo (-0,50 MPa), onde permaneceram nos estresses por um período de 48 horas. Após esse período de estresse, as plantas foram coletadas e armazenadas no freezer a -80°C como também na estufa, para a realização das análises dos solutos inorgânicos e orgânicos.

2.3 Determinação dos Solutos Inorgânicos

2.3.1 Na^+ , K^+ e Relação Na^+/K^+

As determinações das concentrações de sódio e potássio foram realizadas segundo Silva et al. (2009). Os solutos inorgânicos foram obtidos a partir da massa seca de folhas e raízes das plantas de cártamo. A extração foi feita utilizando 25 mg do tecido vegetal (folhas e raízes) para 5 mL de água deionizada em banho-maria a 100 °C por 1 hora. O extrato obtido

foi centrifugado e seu sobrenadante foi analisado em fotômetro de chama (Micronal B462) para determinação dos conteúdos de Na^+ e K^+ . A relação Na^+/K^+ também foi determinada.

2.4 Determinação dos Solutos Orgânicos

2.4.1 Açúcares Solúveis Totais (AST)

O extrato foi obtido a partir da massa seca de folhas e raízes das plantas, utilizando 50 mg da massa seca para 5 mL de água destilada, em tubos hermeticamente fechados e aquecidos em banho-maria a 100 °C por 1 hora. A solução líquida restante no frasco foi filtrada e armazenada a -20°C em *freezer* para posterior dosagem de osmorreguladores. A concentração de AST foi realizada pelo método de “fenol-sulfúrico” descrito por Dubois et al. (1956). Alíquotas de 100 µL da amostra foram adicionadas a tubos de ensaio, completados com 400 µL de água destilada, acrescido de 500 µL de Fenol a 5% e agitados em vórtex. Para iniciar a reação, foi adicionado de uma única vez e no centro do tubo, 2500 µL de H_2SO_4 concentrado. Logo após, os tubos foram agitados em vórtex, para usar o calor da reação para uma melhor homogeneização. Posteriormente os tubos permaneceram por 20 minutos em temperatura ambiente para leitura em espectrofotômetro a 490 nm de absorbância.

2.4.2 Proteínas Solúveis Totais (PST)

Para extração de PST foi utilizado 1g da massa fresca de folhas e raízes das plantas. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido com o auxílio de gral e pistilo. Em seguida, foram adicionados 3,0 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 + EDTA 1 mM. O extrato foi então colocado em *ependorfs* e centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada. Por fim, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi armazenado em *freezer* a -80 °C. A concentração de PST foi determinada segundo a metodologia de Bradford (1976). Alíquotas das amostras de raízes e das folhas foram colocadas em tubos de ensaio de vidro, acrescidos do reagente de Bradford. A proporção de volume para a quantificação foi de 100 µL do extrato + 2,5 mL do reagente de Bradford. Em seguida a solução foi agitada manualmente e delicadamente para evitar a desnaturação de proteínas e realizou-se leitura em espectrofotômetro a 595 nm de absorbância.

2.4.3 Aminoácidos Livres Totais (AALT)

O extrato foi obtido a partir da massa seca de folhas e raízes das plantas, utilizando 50 mg da massa seca para 5 mL de água destilada, em tubos hermeticamente fechados e

aquecidos em banho-maria a 100 °C por 1 hora. A solução líquida restante no frasco foi filtrada e armazenada a -20 °C em *freezer* para posterior dosagem de osmorreguladores. A concentração de AALT foi determinada segundo o método descrito por Peoples et al. (1989) com algumas modificações. Aliquotas de 100 µL do extrato foram colocadas em tubos de ensaio acrescidas de 400 µL de água destilada. Em seguida foram adicionados 250 µL de solução de Tampão Citrato a 200 mM (pH = 5,0) e 250 µL de reagente de ninhidrina (0,1 mmol L⁻¹ de KCN e 5% de ninhidrina em methoxy etanol). Os tubos foram hermeticamente fechados, agitados em vórtex e levados ao banho-maria a 100 °C por 15 minutos. Logo após, a reação da solução foi interrompida imediatamente com banho de gelo. Por fim, foram adicionados à solução 1,5 mL de Etanol a 50% (v/v). Após nova agitação em vórtex, os tubos permaneceram por 20 minutos em temperatura ambiente para posterior leitura em espectrofotômetro a 570 nm de absorbância.

2.4.4 Prolina (PRO)

O extrato foi obtido a partir da massa seca de folhas e raízes das plantas, utilizando 50 mg da massa seca para 5 mL de água destilada, em tubos hermeticamente fechados e aquecidos em banho-maria a 100 °C por 1 hora. A solução líquida restante no frasco foi filtrada e armazenada a -20 °C em *freezer* para posterior dosagem de osmorreguladores. A concentração de Prolina foi determinada segundo metodologia descrita por Bates (1973). Em tubos de ensaio foram colocadas alíquotas de 1 mL do extrato obtido e adicionado 1 mL do reagente de ninhidrina ácida (1 g de ninhidrina + 24 mL de ácido acético glacial 98% + 16 mL ácido fosfórico 6 M), mais 1 mL de ácido acético glacial (98%). Após homogeneização os tubos foram hermeticamente fechados, agitados em vórtex e levados ao banho-maria por 1 hora a 100 °C. Logo após, a reação foi interrompida imediatamente com banho de gelo. Em seguida, foram adicionados à solução 2 mL de Tolueno (97%) e os tubos foram agitados em vórtex por 20 segundos. Após estabilização, duas fases foram formadas, sendo a fase aquosa superior formada pelo Tolueno + Cromóforo de coloração avermelhada. Esta foi recuperada e submetida à leitura em espectrofotômetro a 520 nm de absorbância.

2.4.5 Glicina-Betaina (GB)

O extrato foi obtido a partir da massa seca de folhas e raízes das plantas, utilizando 25 mg da massa seca para 2 mL de água destilada, em eppendorfs e agitados no shacker por 4 horas a 25 °C. Após, foram centrifugadas e o sobrenadante foi coleta e armazenado para

posterior dosagem de osmorregulador. Os compostos quaternários de amônio (CQA) foram mensurados como equivalentes a GB de acordo com Grieve & Grattan (1983). Para quantificação, 250 μL de extrato + 250 μL de H_2SO_4 2N foram colocadas em eppendorfs no banho de gelo por 1h. Em seguida foi adicionado 200 μL de reagente (KI-I2) e as amostras foram mantidas a 4°C por 16 h. Em seguida, os tubos serão centrifugados a 10.000 $\times g$ por 15 min a 0 °C, fazendo 2 lavagens com H_2SO_4 1N. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e os cristais foram dissolvidos em 1,2-dicloroetano e misturados vigorosamente. Após 2 h de repouso, as absorvâncias foram mensuradas a 365 ηm .

2.5 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC), constituído de cinco tratamentos: controle; sal 1 (50 mM de NaCl); sal 2 (100 mM de NaCl); PEG 1 (-0,25 MPa) e PEG 2 (-0,50 MPa), com 5 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e nos casos de significância procedeu-se o teste de Tukey ao nível de 0,05 de probabilidade, com auxílio do software SISVAR.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Conteúdo de Na⁺, K⁺ e Relação Na⁺/K⁺

O estresse salino e déficit hídrico influenciaram significativamente o conteúdo de potássio (K⁺), o conteúdo de sódio (Na⁺) e a relação sódio/potássio (Na⁺/K⁺) nas folhas e nas raízes de *Carthamus tinctorius* L. (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo de análise de variância das variáveis conteúdo de sódio (Na⁺) em folhas e raízes, conteúdo de potássio (K⁺) em folhas e raízes e relação sódio/potássio (Na⁺/K⁺) em folhas e raízes de *Carthamus tinctorius* L. sob condições de estresse salino e déficit hídrico.

| Fontes de variação | GL | Quadro Médio | | | | | |
|--------------------|----|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| | | Na ⁺ Folha | Na ⁺ Raiz | K ⁺ Folha | K ⁺ Raiz | Na ⁺ /K ⁺ Folha | Na ⁺ /K ⁺ Raiz |
| Tratamentos | 4 | 135,62** | 74,99** | 4418,33** | 850,77** | 12807,28** | 38,96** |
| Erro | 20 | 1,28 | 4,14 | 94,59 | 47,82 | 36,57 | 0,47 |
| CV (%) | | 28,20 | 25,10 | 9,73 | 26,07 | 8,82 | 17,04 |
| Média | | 4,01 | 8,10 | 99,91 | 26,52 | 68,57 | 4,05 |

** significativo a 1%; * significativo a 5%; ^{ns} não significativo a 5%; CV- coeficiente de variação.

O conteúdo de Na⁺ nas folhas teve aumento significativo conforme o aumento da concentração de NaCl. Na concentração de sal moderado (50 mM de NaCl) o aumento de Na⁺ nas folhas foi de 1 vez, e no estresse salino severo (100 mM de NaCl) o aumento foi de 8,4 vezes em relação ao controle. Quando submetido ao déficit hídrico (moderado e severo) o conteúdo de Na⁺ nas folhas não foi alterado (Gráfico 1A). O conteúdo de Na⁺ nas raízes de cártamo obteve um aumento de 1,1 e 0,3 vezes para as concentrações de 50 e 100 mM de NaCl respectivamente. Quando tratadas com PEG 6000, as raízes não tiveram alterações significativas no conteúdo de Na⁺ em relação ao controle (Gráfico 1B). O conteúdo de Na⁺ nas folhas e nas raízes das plantas de cártamo aumentaram apenas quando submetido ao estresse salino. Isso sugere que *C. tinctorius* sob estresse salino, não possui mecanismos efetivos de exclusão de Na⁺ após sua absorção mediante o antiporte Na⁺/H⁺ no plasmalema das células radiculares, nem tampouco mecanismos que evitem o transporte desse cátion para as folhas. Esses resultados corroboram com Soheilikhah et al. (2013), que observaram em 5 genótipos de *Carthamus tinctorius* L. sob cultivo *in vitro*, o aumento da concentração de Na⁺ e diminuição do teor de K⁺ quando submetidos a diferentes concentrações de NaCl. Resultados semelhantes também foram encontrados em *Jatropha curcas* L. (CUNHA, 2009) e *Cnidocolus phyllacanthus* (OLIVEIRA et al., 2014).

Nas folhas de cártamo, o teor de K⁺ foi maior nas plantas tratadas com PEG 6000 que nas plantas tratadas com NaCl. Em relação ao controle, as folhas das plantas tratadas com NaCl apresentou decréscimo de 0,2 no teor de K⁺ para o estresse salino moderado e severo

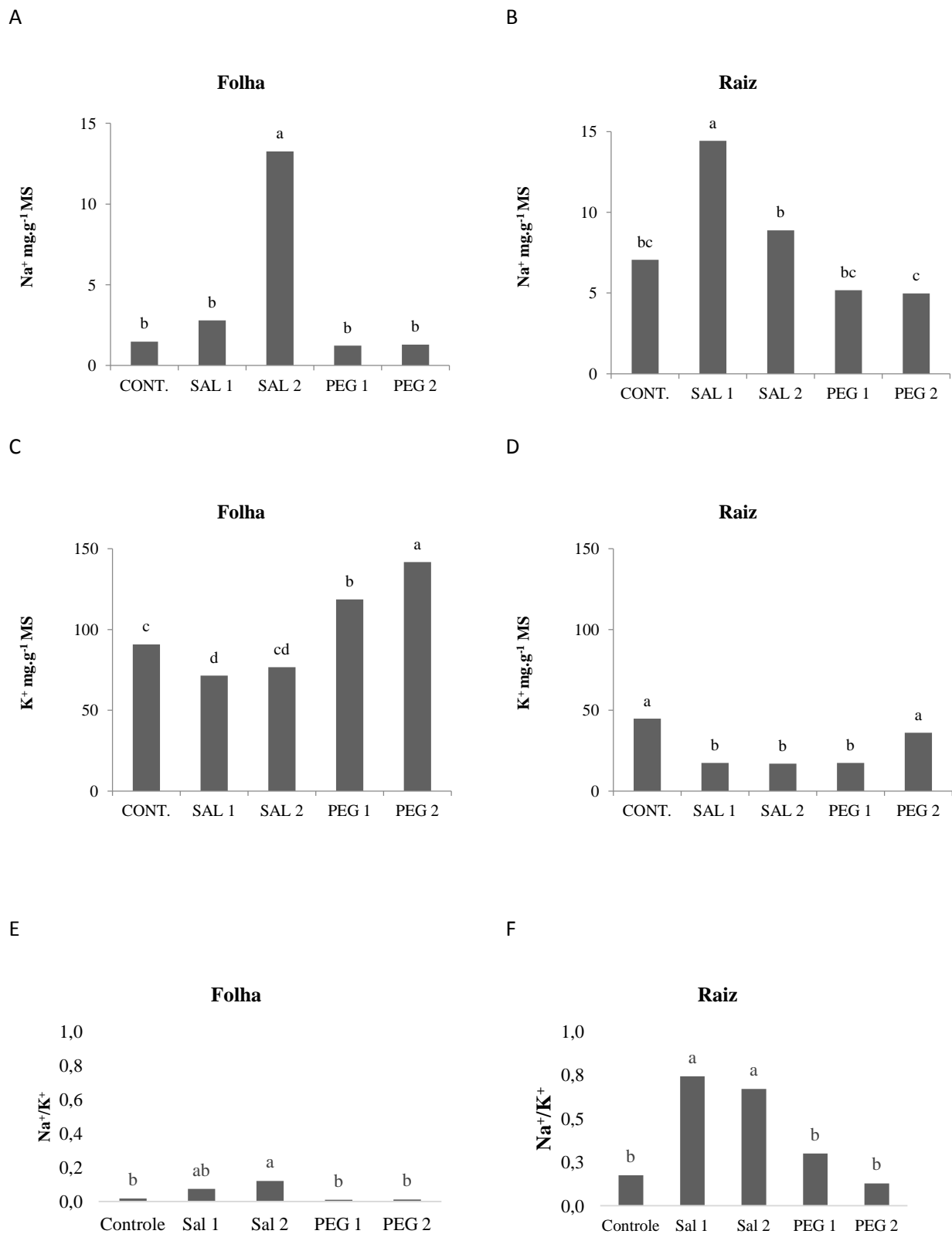


Gráfico 1. Conteúdo de sódio (Na⁺) em folhas - A e raízes - B, conteúdo de potássio (K⁺) em folhas - C e raízes - D e relação sódio/potássio (Na⁺/K⁺) em folhas - E e raízes - F de *Carthamus tinctorius* L. submetido aos tratamentos: controle, NaCl 50 e 100 mM (sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente). * Letras iguais não diferem perante o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

respectivamente. Já nas plantas tratadas com PEG 6000 houve um aumento de 0,3 e 0,6 vezes no teor de K^+ para o déficit hídrico moderado e severo respectivamente, em relação ao controle (Gráfico 1C). Nas raízes, observou-se que o teor de K^+ diminuiu para ambos os estresses em relação ao controle. O percentual de diminuição foi em torno de 0,6 vezes para os tratamentos com NaCl e 0,6 e 0,2 vezes o déficit hídrico moderado e severo respectivamente (Gráfico 1D). Os distúrbios metabólicos gerados pelo acúmulo de Na^+ na célula são, em parte, resultantes da competição com o K^+ pelos sítios ativos das enzimas (BLUMWALD, 2000) e ribossomos (TESTER & DAVENPORT, 2003). Em cártamo, a redução de K^+ quando submetido ao estresse salino, pode ser atribuída à maior competição entre o Na^+ e o K^+ pelos sítios de absorção. A manutenção e/ou acúmulo de K^+ observado nas folhas de cártamo submetida ao estresse hídrico pode indicar efeitos benéficos no status hídrico, induzido ao menos em parte, por reduções no potencial osmótico celular. Resultados reforçando a importância do K^+ no ajustamento osmótico foram observados em *Vitis vinifera* (PATAKAS et al., 2002), *Anacardium occidentale* L. (MORAIS et al., 2007), *Jatropha curcas* L. (CUNHA, 2009) e *Cnidioscolus phyllacanthus* (OLIVEIRA et al., 2014).

A relação sódio/potássio (Na^+/K^+) das plantas de cártamo tratadas com NaCl apresentou aumento significativo quando submetida ao estresse salino. Nas folhas, o aumento da relação Na^+/K^+ foi proporcional ao aumento da concentração de sal, de 2,7 vezes para as plantas submetidas a 50 mM de NaCl e de 5 vezes para as plantas submetidas a 100 mM de NaCl, em relação ao controle. Quando submetidas aos tratamentos com PEG 6000, a relação Na^+/K^+ não diferiu do controle (Gráfico 1E). Nas raízes, observou-se aumento significativo na relação Na^+/K^+ sob estresse salino, com 3,4 vezes para o estresse salino moderado (50 mM) e de quase 3 vezes para o estresse salino severo (100 mM), em relação ao controle. Já nas raízes tratadas com PEG 6000, não houve grandes variações na relação Na^+/K^+ em relação ao controle (Gráfico 1F). Segundo Greenway & Munns (1980), uma relação Na^+/K^+ igual ou menor que 0,6 é necessária para a manutenção da eficiência do metabolismo em plantas não-halófitas. No presente trabalho, foi observado um aumento da relação de Na^+/K^+ acima de 0,6 nas folhas e raízes das plantas de cártamo quando submetidas a concentrações de 50 e 100 mM de NaCl. Na concentração salina severa, constatou-se o aparecimento de sintomas de clorose nas bordas das folhas das plantas, além de necrose. Os aparentes sintomas de toxidez salina provavelmente foram devido aos elevados teores de Na^+ no tecido das plantas, sugerindo que esse acúmulo superou a capacidade de acumulação desse cátion no vacúolo. O sequestro de Na^+ para o vacúolo é um mecanismo de defesa que atua protegendo o citosol

contra o excesso do íon, permitindo que as atividades metabólicas da célula ocorram dentro da normalidade (MUNNS & TESTER, 2008). Resultados semelhantes foram observados em *Jatropha curcas* L. (CUNHA, 2009) e *Cnidioscolus phyllacanthus* (OLIVEIRA et al., 2014).

3.2 Conteúdo de Solutos Orgânicos

Em *Carthamus tinctorius* L., os estresses salino e hídrico influenciaram significativamente o conteúdo de açúcares solúveis totais (AST), proteína solúveis totais (PST), aminoácidos livres totais (AALT), conteúdo de prolina (PRO) e glicina-betaína (GB) nas folhas e raízes (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo de análise de variância das variáveis Açúcares Solúveis Totais (AST), Proteínas Solúveis Totais (PST), Aminoácidos Livres Totais (AALT), Prolina (PRO) e Glicina Betaína (GB) em folhas e raízes de *Carthamus tinctorius* L. sob condições de estresse salino e déficit hídrico.

| Fontes de variação | GL | Quadro Médio | | | | | |
|--------------------|----|--------------|---------------------|-----------|----------|------------|-----------|
| | | AST Folha | AST Raiz | PST Folha | PST Raiz | AALT Folha | AALT Raiz |
| Tratamentos | 4 | 884,81** | 20,29 ^{ns} | 77,27** | 3,97** | 1647,34** | 15,64** |
| Erro | 20 | 121,75 | 22,01 | 14,97 | 0,15 | 107,06 | 2,21 |
| CV (%) | | 21,84 | 15,98 | 12,72 | 21,93 | 40,97 | 28,12 |
| Média | | 50,51 | 29,35 | 30,43 | 1,80 | 25,25 | 5,29 |

| Fontes de variação | GL | Quadro Médio | | | |
|--------------------|----|--------------|----------------------|----------|-----------|
| | | PRO Folha | PRO Raiz | GB Folha | GB Raiz |
| Tratamentos | 4 | 3,20** | 0,0007 ^{ns} | 82,43** | 6269,07** |
| Erro | 20 | 0,11 | 0,0200 | 0,33 | 33,73 |
| CV (%) | | 32,00 | 36,57 | 16,10 | 33,43 |
| Média | | 1,06 | 0,0865 | 3,58 | 17,37 |

** significativo a 1%; * significativo a 5%; ^{ns} não significativo a 5%; CV- coeficiente de variação.

O estresse salino e déficit hídrico provocaram um aumento significativo no conteúdo de açúcares solúveis totais (AST) apenas nas folhas de plantas de cártamo (Gráfico 2A-B). Contudo, tal efeito foi mais pronunciado em presença de PEG 6000. As plantas, quando submetidas ao estresse salino, observou-se nas folhas, um aumento dos AST de 0,2 vezes para o tratamento severo (100 mM de NaCl) em relação ao controle. E quando submetidas ao déficit hídrico, o aumento do conteúdo de AST foi de 0,8 vezes para o estresse moderado e 0,7 vezes para o estresse severo, em relação ao controle (Gráfico 2A). Nas raízes, o conteúdo de AST não diferiram estatisticamente entre os tratamentos estudados (Gráfico 2B). Os açúcares contribuem em cerca de 50% ou mais para o potencial osmótico total sob estresses abióticos (ASHRAF & HARRIS, 2004), além de prevenir contra a desidratação e serem fonte de energia para células ativas sob condições de estresse (ELAVUMOOTIL et al., 2003). Em cártamo, sobretudo na presença de PEG 6000, é possível que o aumento dos AST observado

nas folhas possa estar relacionado à osmorregulação e/ou a uma maior degradação de amido e/ou um menor consumo desses açúcares pelos tecidos foliares. De acordo com Munns & Weir (1981) a acumulação de açúcares tais como frutose e sacarose, que fazem parte do pool de AST, pode estar relacionada a uma menor utilização desses carboidratos quando o crescimento é inibido ou reduzido, ou ainda a uma inibição da atividade enzimática da sacarose sintase ou invertase (STURM & TANG, 1999).

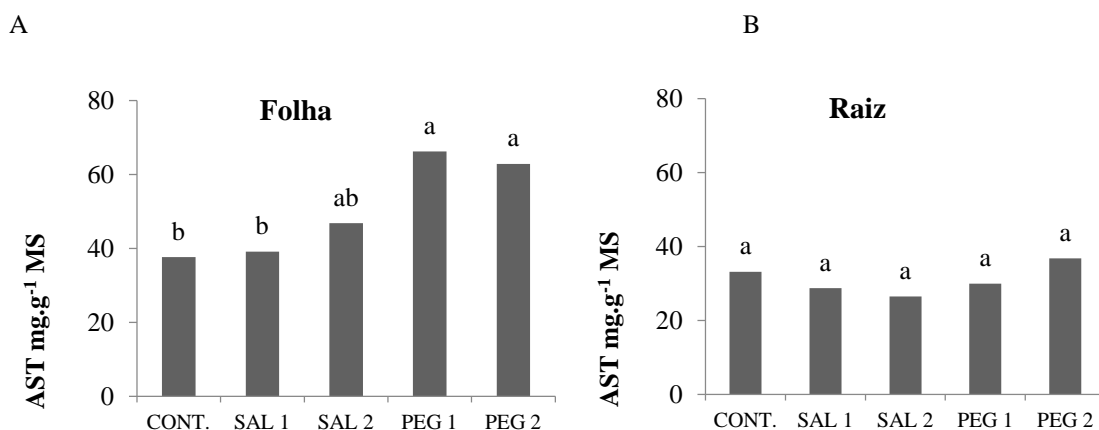


Gráfico 2. Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST) em folhas - A e raízes - B de *Carthamus tinctorius* L. submetido aos tratamentos: controle, NaCl 50 e 100 mM (Sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente). * Letras iguais não diferem perante o teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Letras iguais não diferem perante o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O conteúdo de proteínas solúveis totais (PST), comparando-se os dois órgãos analisados (folhas e raízes) e independentemente da ausência ou presença dos tratamentos com NaCl e PEG, foi maior nas folhas, e mais expressivo quando as plantas foram cultivadas em presença de PEG 6000. Nas folhas, esse aumento foi de 0,1 vez na concentração de sal severo (100 mM) e quando submetidas ao déficit hídrico o aumento foi de 0,2 e 0,3 vezes para os estresses moderado e severo respectivamente, em relação ao controle (Gráfico 3A). Nas raízes, o aumento no conteúdo de PST foi de 0,1 e 0,2 vezes para o estresse salino (moderado e severo) respectivamente. E quando submetidas aos tratamentos com PEG 6000, observou-se um decréscimo de 0,8 vezes do conteúdo de PST no déficit hídrico moderado (-0,25 MPa), enquanto que na concentração severa (-0,50 MPa) observou-se um aumento de 0,6 vezes do conteúdo de PST em relação ao controle (Gráfico 3B). A salinidade e a seca podem estimular a síntese de proteínas solúveis que participam do ajustamento osmótico (KOYRO, 2006) e da manutenção da estrutura de outras proteínas. Esses dados mostram que os estresses salino e

hídrico estimularam a síntese de proteínas nas folhas e nas raízes sendo de forma mais intensa nas folhas. Embora seja frequente a diminuição no teor de proteínas solúveis totais nas plantas submetidas à salinidade em consequência da diminuição da síntese proteica ou pelo aumento da proteólise (PARIDA & DAS, 2005), sabe-se que muitas plantas tem a síntese proteica estimulada quando submetidas as condições de salinidade (SEN et al., 2002) e seca. Pode ocorrer um aumento da síntese de uma ampla variedade de proteínas em resposta aos estresses salino e hídrico, as quais podem atuar na estabilização das membranas celulares e na sinalização de resposta ao estresse salino e déficit hídrico (TESTER & DAVENPORT, 2003). Resultados semelhantes foram observados em *Carthamus tinctorius* L. sob estresse salino e hídrico (LIMA-MELO, 2011), e em *Sorghum bicolor* L. (OLIVEIRA et al., 2006) e *Cnidocolus phyllacanthus* (OLIVEIRA, 2012) sob estresse salino.

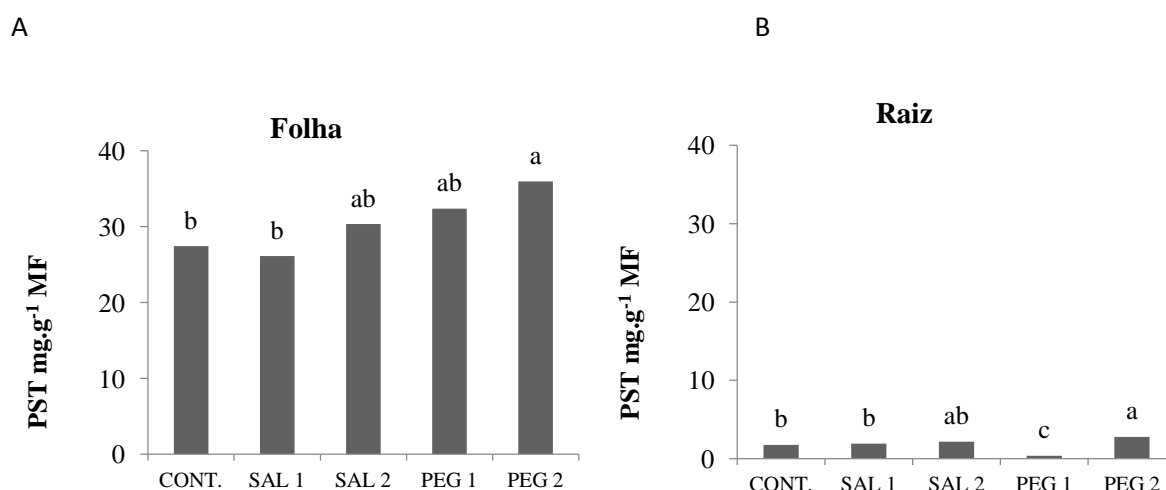


Gráfico 3. Conteúdo de proteínas solúveis totais (PST) em folhas - A e raízes - B de *Carthamus tinctorius* L. submetido aos tratamentos: controle, NaCl 50 e 100 mM (sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente). * Letras iguais não diferem perante o teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os teores de aminoácidos livres totais (AALT) independente da ausência ou presença dos agentes estressores NaCl e PEG, foram bem maiores nas folhas que nas raízes e mais pronunciados em presença de PEG 6000. O teor de AALT nas folhas tratadas com NaCl não diferiu do controle. Quando tratadas com PEG 6000, a concentração de AALT teve um aumento significativo de 0,5 vezes para o déficit hídrico moderado (-0,25 MPa) e de 2,6 vezes para o déficit hídrico severo (-0,5 MPa) (Gráfico 4A). Nas raízes, o teor de AALT sob estresse salino não diferiram estatisticamente do controle. Quando tratadas com PEG 6000, o teor de AALT teve um aumento significativo, de 0,2 vezes para o déficit hídrico moderado (-0,25 MPa), e quando tratada com o déficit hídrico severo (-0,5 MPa) o aumento foi de 0,8

vezes em relação ao controle (Gráfico 4B). Os AALT se acumulam nos tecidos seja por ativação de suas vias de síntese (anabolismo) e/ou pelo processo de ativação do catabolismo de proteínas, provavelmente devido à proteólise, o que é comum em plantas cultivadas sob estresses ambientais (LUTTS et al., 1996; LUTTS et al., 1999; VIÉGAS & SILVEIRA, 1999; ROCHA, 2003; SILVEIRA et al., 2003). No caso do cártamo e relacionando os dados de AALT com os de PST, provavelmente o aumento das concentrações de AALT é uma resposta fisiológica da planta como tentativa de ajustamento osmótico, devido a ativação de vias de síntese de aminoácidos (anabolismo) uma vez que as PST não diminuíram em ambos órgãos das plantas quando submetidas aos estresses salino e hídrico. Resultados semelhantes foram observados em *Carthamus tinctorius* L. (LIMA-MELO, 2011). O aumento significativo da concentração de AALT em condição de déficit hídrico também foram relatados em experimentos de Abdel-Nasser & Abdel-Aal (2002) com folhas de *Carthamus mareoticus* L.. Já o aumento do teor de AALT sob condições de estresse salino foram observados em *Helianthus annuus* L. (RADY et al., 2011 e BEZERRA, 2011).

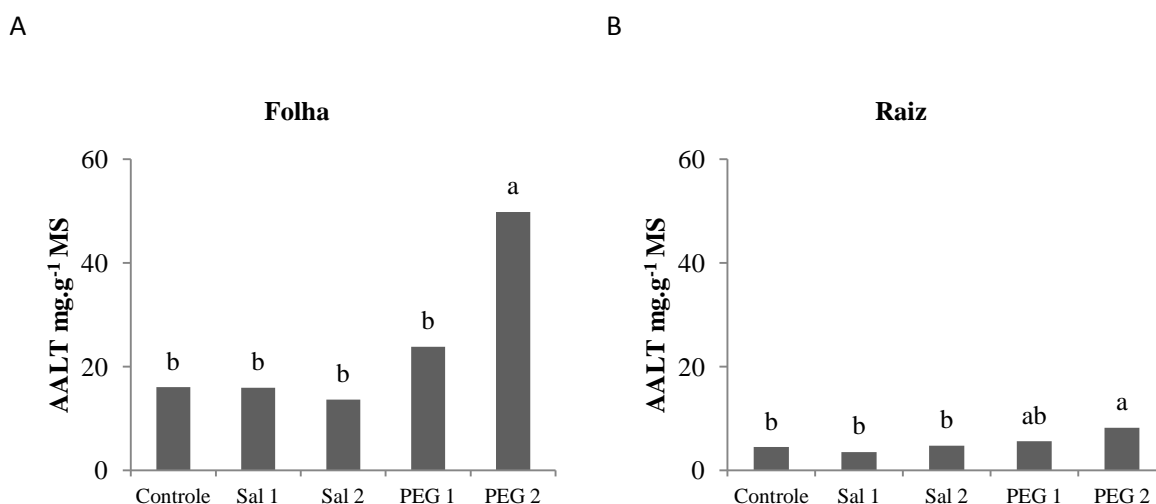
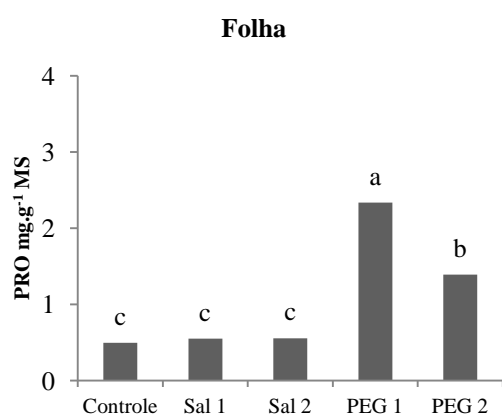


Gráfico 4. Conteúdo de aminoácidos livres totais (AALT) em folhas - A e raízes - B de *Carthamus tinctorius* L. submetido aos tratamentos: controle, NaCl 50 e 100 mM (sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente). * Letras iguais não diferem perante o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O aumento no conteúdo de prolina (PRO) foi significativo quando as plantas de cártamo foram cultivadas apenas na presença de PEG 6000. Nas folhas das plantas tratadas com PEG 6000, observou-se um aumento no conteúdo de PRO de 3,8 e 1,8 vezes para o déficit hídrico (-0,25 e -0,50 MPa) respectivamente, em relação ao controle (Gráfico 5A). Nas raízes, os estresses simulados com NaCl e PEG 6000 não foram significativos estatisticamente (Gráfico 5B). Em condições de estresse salino e hídrico, as respostas

bioquímicas relacionadas às vias metabólicas e compostos nitrogenados são bastante complexas. A PRO tende a se acumular nos tecidos vegetais sob estresse hídrico (FERREIRA et al., 2002). É interessante destacar que entre os N-aminossolúveis que se acumulam em resposta ao estresse osmótico, a prolina é indiscutivelmente a mais relatada (FERREIRA et al., 2002). Em cártamo, o aumento da PRO pode ser devido a um ajustamento osmótico, considerando que não houve proteólise, mas houve um aumento no conteúdo de AALT e do referido aminoácido nas folhas. Estudos em *Anacardium occidentale* L. (SILVEIRA et al., 2012), *Reaumuria vermiculata* L. (GORAI & NEFFATI, 2011) e *Zea mays* (KÖSKEROSGLU & TUNA, 2010) têm demonstrado que a acumulação de prolina está relacionada à resistência a estresses abióticos, o que indica que esse soluto tem papel na osmoproteção.

A



B

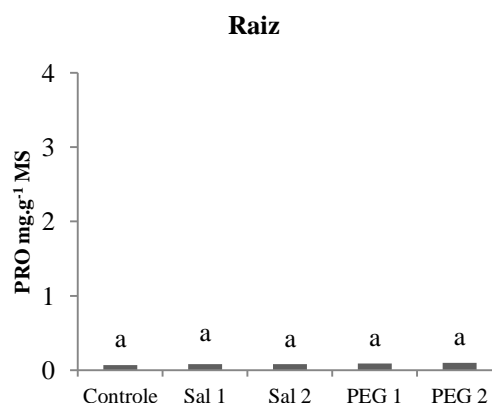


Gráfico 5. Conteúdo de prolina (PRO) em folhas – A e raízes - B de *Carthamus tinctorius* L. submetido aos tratamentos: controle, NaCl 50 e 100 mM (sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente). * Letras iguais não diferem perante o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação ao conteúdo de glicina-betaína (GB) nas plantas de cártamo, observou-se um aumento significativo em relação aos demais tratamentos, em folhas e raízes, apenas quando as mesmas foram cultivadas em presença de PEG 6000. Em relação ao controle, o aumento de GB foi de 1 vez para as folhas das plantas tratadas com déficit hídrico moderado (-0,25 MPa) e de 6,1 vezes para as folhas tratadas com o déficit hídrico severo (-0,5 MPa) (Gráfico 6A). Já nas raízes, sob estresse salino severo, o aumento no conteúdo de GB foi de 1,7 vezes em relação ao controle. E sob déficit hídrico, o conteúdo de GB teve um aumento de quase 80 vezes para as raízes tratadas com estresse severo (-0,5 MPa) (Gráfico 6B). A glicina betaína age como estabilizador osmótico e ajuda na proteção de macromoléculas sob desidratação, sendo considerado um excelente osmoprotetor (HASSINE et al, 2008), além de estar associada a compartimentos celulares, na proteção de proteínas e na estabilização das

membranas (SAKAMOTO & MURATA, 2000). O acúmulo desses compostos nos órgãos das plantas diminui o potencial hídrico, o que aumenta a capacidade de absorção de água das plantas e atenua os efeitos do déficit hídrico no conteúdo relativo de água da planta (PAGTER et al., 2005). O fato da GB se acumular em folhas e raízes de cártamo quando submetidos a seca, pode estar associado a uma forma de diminuição do potencial hídrico para absorção de água, exercendo seu papel protetor, e/ou a um osmorregulador, já que a GB é conhecido por se acumular em resposta aos estresses em plantas como: *Beta vulgaris*, *Spinacia oleracea*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor*, *Lablab purpureus* e *Excoecaria agallocha* (WEIMBERG et al., 1984; FALLON & PHILLIPS, 1989; MCCUE & HANSON, 1990; RHODES & HANSON, 1993; YANG et al., 2003; D'SOUZA & DEVARAJ 2010; JENCI & NATARAJAN, 2009).

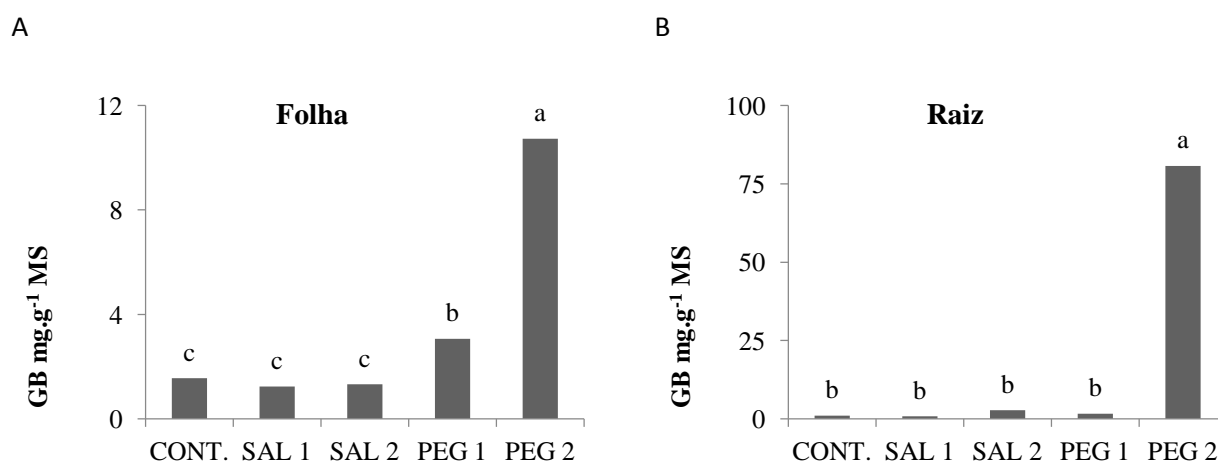


Gráfico 6. Conteúdo de glicina-betaína (GB) em folhas – A e raízes – B de *Carthamus tinctorius* L. submetido aos tratamentos: controle, NaCl 50 e 100 mM (sal 1 e 2, respectivamente) e PEG -0,25 e -0,50 MPa (PEG 1 e 2, respectivamente). * Letras iguais não diferem perante o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 CONCLUSÕES

Carthamus tinctorius L. responde de forma diferenciada aos efeitos da salinidade (50 e 100 mM de NaCl) e do déficit hídrico (-0,25 e 0,50 MPa) quanto ao acúmulo de solutos inorgânicos e orgânicos.

Os solutos inorgânicos foram acumulados nas plantas. O estresse salino aumentou o conteúdo de Na⁺ nas folhas e raízes, provocando toxidez nas plantas, já que a relação Na⁺/K⁺ foi maior que 0,6. O acúmulo de K⁺ sob déficit hídrico pode indicar efeito benéfico nas folhas.

O déficit hídrico provocou acúmulo de solutos orgânicos nas plantas de cártamo, obtendo melhor resposta em relação aos demais tratamentos. As folhas acumularam AST, PST, AALT, PRO e GB e as raízes acumularam PST, AALT e GB. Tais efeitos, evidenciam um possível ajustamento osmótico. Quando tratadas com NaCl, as plantas mantiveram o conteúdo de solutos orgânicos em relação ao controle.

Os efeitos dos solutos orgânicos e inorgânicos em plantas de cártamo foi avaliado e a resposta das plantas é tratamento e dose dependente.

5 REFERÊNCIAS

- ABDEL-NASSER, L. E.; ABDEL-AAL, A. E. Effect of elevated CO² and drought on proline metabolism and growth of safflower (*Carthamus mareoticus* L.) seedlings without improving water status. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.5, n.5, p.523-528, 2002.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v.166, n.1, p.3-16, 2004.
- BASSIL, E. S.; KAFFKA, S. R. Response of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to saline soils and irrigation. II. Crop response to salinity. **Agricultural Water Management**. v.54, n.1, p.81-92, 2002.
- BASSIRI, A. Identification and polymorphism of cultivars and wild ecotypes of safflower based on isozyme patterns. **Euphytica**, v.26, n.3, p.709-719, 1977.
- BATES, L. S., WALDREN, R. P., TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v.39, n.1, p.205-207, 1973.
- BEZERRA, L. L. Caracterização de genótipos de girassol (*Helianthus annuus* L.) submetidos ao estresse salino. 63p. **Dissertação**. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.
- BLUMWALD, E. Sodium transport and salt tolerance in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, v.12, n.4, p.431-434, 2000.
- BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, n.218, n.4571, p.443-448, 1982.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**, 1ed., 2002.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry e Molecular Biology of Plants. Rockville. **American Society of Plant Physiologists**, 2009, 1407p.
- COSGE, B.; KAYA, D. Performance of some safflower (*Carthamus tinctorius* L.) varieties sown in late autumn and late spring. Süleyman Demirel Üniversitesi, **Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, v.12, n.1, p.13-18, 2008.
- CUNHA, P. C. Aspectos fisiológicos e bioquímicos de *Jatropha curcas* L. cultivada sob estresse salino. 60p. **Dissertação**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.
- DANTAS, C. V. S.; SILVA, I. B.; PEREIRA, G. M.; MAIA, J. M.; LIMA, J. P. M. S.; MACEDO, C. E. C. Influência da sanidade e déficit hídrico na germinação de sementes de *Carthamus tinctorius* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.3, p.574-582, 2011.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

D'SOUZA, M. R. D.; DEVARAJ, V. R. Biochemical responses of Hyacinth bean (*Lablab purpureus*) to salinity stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.2, p.341-353, 2010.

ELAVUMOOTIL, O. C; MARTIN, J. P; MORENO, M. L. Changes in sugars, sucrose synthase activity and proteins in salinity tolerant callus and cells suspension cultures of *Brassica oleraceae* L. **Biologia Plantarum**. v.46, n.1, p.7-12, 2003.

ELLOUZI, H.; HAMED, K. B.; CELA, J.; MUNNÉ-BOSCH, S.; ABDELLEY, C. Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte). **Physiologia Plantarum**, v.142, n.2, p.128-143, 2011.

FALLON, K. M., PHILLIPS, R. Responses to water stress in adapted carrot cell suspension cultures. **Journal of Experimental Botany**, v.40, n.6, p.681-687, 1989.

FERREIRA, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; OLIVEIRA, L. E. M.; PURCINO, A. A. C. Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.13-17, 2002.

GOLKAR, P.; ARZANI, A.; REZAEI, A.M. Inheritance of flower color and spinelessness in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Journal of Genetics**, v.89, n.2, p.259-262, 2010.

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

GREIVE, C. M.; GRATAN, S. R. Rapid assay for determination of water-soluble quaternary amino compounds. **Plant Soil**, v.70, n.2, p.303-307, 1983.

HASSINE, A. B.; GHANEM, M. E.; BOUZID, S.; LUTTS, S. An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.6, p.1315-1326, 2008.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**, Berkeley. 1950, 347p.

IMADA, S.; YAMANAKA, N.; TAMAI, S. Effects of salinity on the growth, Na partitioning, and Na dynamics of a salt-tolerant tree, *Populus alba* L. **Journal of Arid Environments**, v.73, n.3, p.245-251, 2009.

JENCI, A.; NATARAJAN, S. Growth and organic constituent variations with salinity in *Excoecaria agallocha* L., an important Halophyte. **Botany Research International**, v.1, n.2, p.50-54, 2009.

KHOLOVA, J.; SAIRAM, R. K.; MEENA, R. C. Osmolytes and metal ions accumulation, oxidative stress and antioxidant enzymes activity as determinants of salinity stress tolerance in maize genotypes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.3, p.477-486, 2010.

KNOWLES, P. F. Safflower: In oil crops of the World. **Mcgraw-Hillpublishers**, London, p.361-374, 1989.

KÖSKEROSGLU, S.; TUNA, A. L. The investigation on accumulation levels of proline and stress parameters of the maize (*Zea mays* L.) plants under salt and water stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n.3, p.541-549, 2010.

KOYRO, H. W. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). **Environmental and Experimental Botany**, v.56, n.2, p.136-146, 2006.

LIMA-MELO, Y. Evidências de ajustamento osmótico em plantas de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) sob estresses salino e hídrico. **Monografia**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

LUTTS, S.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. **Annals of Botany**, v.78, n.3, p.389-398, 1996.

LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J. M.; NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, v.105, n.3, p.450-458, 1999.

MAATHIUS, F. J. M.; DAWN VERLIN, F.; SMITH, F. A.; SANDERS, D.; FERNANDEZ, J. A.; WALKER, N. A. The physiological relevance of the Na⁺ coupled K⁺ transport. **Plant Physiology**, v.112, n.2, p.1609-1616, 1996.

McCUE, R. F., HANSON, A. D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. **Trends in Biotechnology**, v.8, n.12, p.358-362, 1990.

MELONI, D. A.; GULOTTA, M. R.; MARTÍNEZ, C. A. Salinity tolerance in *Schinopsis quebracho colorado*: Seed germination, growth, ion relations and metabolic responses. **Journal of Arid Environments**, v.72, n.10, p.1785-1792, 2008.

MORAIS, D. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVA, L. M. M.; LIMA JR, A. R.; COSTA, R. C. L.; ROCHA, I. M. A.; SILVEIRA, J. A. G. Acumulação de íons e metabolismo de N em cajueiro anão em meio salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.2, p.125-133, 2007.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.651-681, 2008.

MUNNS, R.; WEIR, R. Contribution of sugars to osmotic adjustment in elongating and expanded zones of wheat leaves during moderate water deficit at two light levels. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.8, n.1, p.93-105, 1981.

- OLIVEIRA, L. A. A.; BARRETO, L. P. NETO, E. B.; SANTOS, M. V. F.; COSTA, J. C. A. Solutos orgânicos em genótipos de sorgo forrageiro sob estresse salino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.31-35, 2006.
- OLIVEIRA, M. D. M. Indicadores de estresse salino em faveleira [*Cnidoscolus phyllacanthus* (M. Arg.) Pax et K. Hoffm.], espécie promissora para produção do biodiesel. 121p. **Tese**. UFERSA, Mossoró, 2012.
- OLIVEIRA, M. D. M.; BEZERRA, L. L.; DANTAS, C. V. S.; VOIGT, E. L.; MAIA, J. M.; MACÊDO, C. E. C. M. The role of xylopodium in Na⁺ exclusion and osmolyte accumulation in faveleira [*Cnidoscolus phyllacanthus* (d. arg.) Pax et K. Hoffm] under salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, n.11, p.2871-2882, 2014.
- PAGTER, M.; BRAGATO, G.; BRIX, H. Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. **Aquatic Botany**, v.81, n.4, p.285-299, 2005.
- PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v.60, n.3, p.324-349, 2005.
- PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; REAKASEM, B.; HERRIDGE, D. F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Canberra: Australian Center for International Agricultural Research, 1989, 76p.
- RADY, M. M.; SADAK, M. S.; EL-BASSIOUNY, H. M. S.; ABD EL-MONEM, A. A. Alleviation the adverse effects of salinity stress in sunflower cultivars using nicotinamide and α -tocopherol. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.10, n.5, p.342-355, 2011.
- RASHID, A.; BEG, A.; ATTARY, A. A.; POURDAD, S. S.; ALIZADEH, K. Oilseed crops for the highlands of CWANA. **ICARDA Caravan**, v.16, p.27-29. 2002.
- ROCHA, I. M. A. Regulação metabólica da acumulação de prolina em folhas de cajueiro expostas ao estresse salino. 104p. **Tese** – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.
- SAKAMOTO, A.; MURATA, N. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.342, p.81-88, 2000.
- SEN, D. N.; KASERA, P. K.; MOHAMMED, S. Biology and Physiology of Saline Plants. In: Pessaraki, M. (Ed.). Handbook of plant and crop physiology. New York: Marcel Dekker, 2002, 563p.
- SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, v.25, n.2, p.333-341, 2002.
- SHABALA, S.; CUIN, T.A. Potassium transport and plant salt tolerance. **Physiologia Plantarum**, v.133, n.4, p.651-669, 2008.

SHABALA, S. Salinity and programmed cell death: unravelling mechanisms for ion specific signalling. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.3, p.709-711, 2009.

SHABALA, L.; MACKAY, A.; TIAN, Y.; JACOBSEN, S.; ZHOU, D.; SHABALA, S. Oxidative stress protection and stomatal patterning as components of salinity tolerance mechanism in quinoa (*Chenopodium quinoa*). **Physiologia Plantarum**, v.146, n.1, p.1-13, 2012.

SILVA, E. N.; SILVEIRA, J. A. G.; RODRIGUES, C. R. F.; LIMA, C. S.; VIÉGAS, R. A. Contribuição de solutos orgânicos e inorgânicos no ajustamento osmótico de pinhão-mansinho submetido à salinidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.5, p.437-445, Brasília, 2009.

SILVEIRA, J. A. G.; VIÉGAS, R. A. ROCHA, I. M. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.160, n.2, p.115-23, 2003.

SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, p.161-180, Fortaleza, 2010.

SONG, J.; FENG, G.; TIAN, C. Y.; ZHANG, F. S. Osmotic adjustment traits of Suaeda physophora, Haloxylon ammodendron and Haloxylon persicum in field or controlled conditions. **Plant Science**, v.170, n.1, p.113-119, 2006.

SOHEILIKHAH, Z.; KARIMI, N.; GHASMPOUR, H. R.; ZEBARJADI, A. R. Effects of saline and mannitol induced stress on some biochemical and physiological parameters of *Carthamus tinctorius* L. varieties callus cultures. **Australian Journal of Crop Science**, v.7, n.12, p.1866-1874, 2013.

SOUSA, A. E. C.; GHEYI, H. R.; CORREIA, K. G.; SOARES, F. A. L.; NOBRE, R. G. Crescimento e consumo hídrico de pinhão mansinho sob estresse salino e doses de fósforo. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p.310-318, 2011.

STURM, A.; TANG, G-Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. **Trends in Plant Science**, v.4, n.10, p.401-407, 1999.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v.15, n.2, p.89-97, 2010.

OPLINGER, E. S.; PUTNAM, D. H.; KAMINSKI, A. R.; HANSON, C. V.; OELKE, E. A.; SCHULTE, E. E.; DOLL, J. D. Sesame. In: Alternative Field Crops Manual. Disponível: www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/sesame.html . Acesso em: 10 março 2015.

OUESLATI, S.; KARRAY-BOURAOUI, N.; ATIA, H.; RABHI, M.; KSOURI, R.; LACHASAL, M. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.2, p.289-296, 2010.

PATAKAS, A.; NIKOLAOU, N.; ZIOZIOIU, E.; RADOGLU, K.; NOITSAKIS, B. X. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. **Plant Science**, v.163, n.2, p.361-367, 2002.

RHODES, D.; HANSON, A. D.; Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher-plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.44, p.357-384, 1993.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. **Annals of Botany**, v.91, n.5, p.503-527, 2003.

VICENTE, O.; BOSCAIU, M.; NARANJO, M. A.; ESTRELLES, E.; BELLÉS, J. M.; SORIANO, P. Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). **Journal of Arid Environments**, v.58, n.4, p.463-481, 2004.

VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long term exposure to NaCl-salinity. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.153-159, Viçosa, 1999.

VIÉGAS, R. A.; SILVA, L. M. M.; VIÉGAS, P. R. A.; QUEIROZ, J. E.; ROCHA, I. M. A. Redução assimilatória de NO⁻³ em plantas de cajueiro cultivados em meio salinizado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.8, n.2/3, p.189-195, 2004.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

VIVAS, M. J. Culturas Alternativas - Cártamo, Sésamo e Camelina. **Melhoramento**, v.38, p.183-192, 2002.

WEIMBERG, R.; LERNER, H. R.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Changes in growth and water soluble solute concentrations in *Sorghum bicolor* stressed with sodium and potassium. **Physiologia Plantarum**, v.62, n.3, p.472-480, 1984.

YANG, W.-J.; RICH, P. J.; AXTELL, J. D.; WOOD, K. V.; BONHAM, C. C.; EJETA, G.; MICKELBART, M. V.; RHODES, D. Genotypic variation for glycine betaine in sorghum. **Crop Science**. v.43, n.1, p.162-169, 2003.

ZHANG, L.; LI, D. Evaluation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germplasm: salt tolerance of indigenous and exotic safflower. p. 366-373, 1993. **In:** Proceedings of the Third International Safflower Conference, Beijing, China, 9-13 June 1993 (Li Dajue and Han Yunzhou, eds.). **Beijing Botanical Garden**, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences.

ZHU, J. K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, n.5, p.441-445, 2003.

CAPÍTULO IV

**EXPRESSÃO DOS GENES P5CS, P5CR E BADH EM *Carthamus tinctorius* L. SUBMETIDO
AOS ESTRESSES SALINO E DÉFICIT HÍDRICO**

RESUMO

BEZERRA, Lisiane Lucena. **Expressão dos genes P5CS, P5CR E BADH em cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) submetido ao estresse salino e déficit hídrico.** 2015. 99f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

Carthamus tinctorius L. é uma oleaginosa economicamente importante que apresenta baixos custos de produção, resistência ao sal e à seca, boa adaptação as regiões áridas e é uma espécie promissora para a produção de biodiesel. Neste trabalho estudou-se a expressão de genes envolvidos diretamente na resposta ao estresse salino e déficit hídrico em *C. tinctorius*. Os ensaios semi-quantitativo de RT-PCR foram realizados com P5CR, P5CS e BADH, os genes de síntese de prolina e glicina-betaína, conhecidos como marcadores bem estabelecidos do estresse salino e hídrico. A expressão dos genes foi estudada a partir de RNA total (25 amostras) extraída e reversamente transcrito a partir de folhas e raízes das plantas expostas ao estresse salino e déficit hídrico simulado por cloreto de sódio (NaCl) e polietilenoglicol (PEG 6000) nas soluções (controle; 50 mM de NaCl; 100 mM de NaCl; --0,25Mpa de PEG 6000 e -0,50 MPa de PEG 6000). *C. tinctorius* responde de forma diferenciada quanto a expressão dos genes P5CS, P5CR e BADH sob efeitos da salinidade (50 e 100 mM de NaCl) e do déficit hídrico simulado pelo PEG 6000 (-0,25 e -0,50 MPa). O gene P5CS expressou-se apenas nas folhas de cártamo, e somente sob os estresses severos (50 mM de NaCl e -0,50 MPa de PEG 6000). O gene P5CR expressou-se em todos os tratamentos submetidos, como também nas folhas e raízes de cártamo. BADH se expressou nas folhas somente sob quando submetidas ao déficit hídrico. E nas raízes, houve expressão em ambos estresses (salino e déficit hídrico). A resposta da expressão dos genes estudados e envolvidos na síntese da prolina (P5CS e P5CR) e glicina betaína (BADH) em plantas de cártamo é tratamento e dose dependente.

Palavras-chave: Expressão gênica; via da prolina; via da glicina betaína.

ABSTRACT

BEZERRA, Lisiane Lucena. **Osmotic adjustment indicators in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) submitted to salt stress and drought.** 2015. 99f. Thesis (PhD in Agronomy/Plant Science) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

Carthamus tinctorius L. is an economically oleaginous crop presenting low production costs, resistance to salt and drought stress, well adaptation do arid regions and constitutes a promising candidate for biodiesel production. In this work we have investigated the expression of genes directly involved in the response to salt and drought in *C. tinctorius*. Semi-quantitative RT-PCR assays have been carried out with P5CR, P5CS and BADH, genes from proline and betaine synthesis and known as well established markers for salt and drought stress. Gene expression was studied from total RNA (25 samples) extracted and reverse transcribed from leaves and roots from plants exposed to drought and salt stress mediated by sodium chloride (NaCl) and polyethylene glycol (PEG 6000) solutions (control; 50 mM NaCl, 100 mM NaCl; -0,25MPa PEG 6000, and -0,50MPa PEG 6000). *C. tinctorius* presents different expression of P5CS, P5CR and BADH under the effect of salinity (50 and 100 mM NaCl) and water deficit simulated by PEG 6000 (-0.25 and -0.50 MPa). The P5CS gene was expressed only in the leaves of safflower, and only under severe stresses (50 mM NaCl, and -0.50 MPa) while P5CR gene was expressed in all the subject treatments, as well as in leaves and roots. BADH has been detected in leaves only under water deficit. In the roots, there was expression in both stress conditions (salinity and water deficit). The response of expression of the genes studied and involved in the synthesis of proline in safflower plants is treatment and dose-dependent.

Keywords: Gene expression; means for proline; via the glycine betaine

1 INTRODUÇÃO

Carthamus tinctorius L. é uma planta que apresenta uma boa adaptação a regiões de baixa pluviosidade (RASHID et al., 2002) e tolerância a salinidade (ZHANG & LI, 1993). É cultivado em diferentes regiões áridas e semiáridas do mundo (MAJIDI et al., 2011) podendo ser uma boa alternativa de cultivo para o semiárido nordestino. O estudo da expressão dos genes envolvidos com a resistência e/ou tolerância aos estresses salino e déficit hídrico é de grande importância para a agricultura, uma vez que melhoria da produtividade vegetal depende do conhecimento aprofundado. Isto é, da caracterização funcional dos genes envolvidos nos eventos de resposta das plantas às condições de estresse.

Nesse sentido, com o sequenciamento e a disponibilização do genoma de *Arabidopsis thaliana* planta modelo para os estudos em fisiologia molecular, muito se produziu nos últimos anos. Esses avanços se deram, essencialmente, pela identificação de genes envolvidos na resposta ao estresse e na sua caracterização seja por estudos de expressão ou pela obtenção de mutantes (BARTELS, 2005; MUNNS & TESTER, 2008). Podemos citar, como exemplo, os genes DREB1A (KASUGA et al., 1999; LIU et al., 1998); CpMYBIO (VILLALOBOS et al., 2004); AtALDH3 (SUNKAR et al., 2003); AtHsp17.6 (SUN et al., 2001); A VP1 (GAXIOLA et al., 2001), todos responsáveis pelo aumento da tolerância ao sal e à seca, e caracterizados em *Arabidopsis*.

Além desses genes que respondem ao estresse salino e déficit hídrico, outros foram caracterizados em função de sua importância na síntese de compostos orgânicos denominados osmoreguladores, que estão envolvidos no ajustamento osmótico em plantas. É o caso dos genes da via de biossíntese da prolina e da glicina betaína, solutos compatíveis que são acumulados em resposta ao estresse osmótico, sendo considerado essa acumulação uma importante estratégia adaptativa aos estresses salino e hídrico (RHODES & HANSON, 1993).

Os genes marcadores escolhidos fazem parte das vias metabólicas de dois indicadores de ajustamento osmótico, a P5CS e a P5CR (1-pirrolina-5-carboxilato redutase) integrantes da via de síntese da prolina, e a BADH (betaína aldeído desidrogenase) da via de síntese da glicina betaína.

Em plantas, a prolina é sintetizada a partir do glutamato que é reduzido a glutamato semi-aldeído pela enzima P5CS (1-pirrolina-5-carboxilato sintetase) e a P5CR (1-pirrolina-5-carboxilato redutase) em seguida reduz o intermediário P5C (1-pirrolina-5-carboxilato) a prolina (SZABADOS & SAVOURÉ, 2010). A glicina-betaína é sintetizada em dois passos, a partir da colina via betaína-aldeído. Os dois passos são catalizados pela CMO (colina

monooxigenase) e pela BADH (betaína aldeído desidrogenase) (ZHOU et al., 2008).

Como os mecanismos fisiológicos implicados na tolerância e/ou susceptibilidade aos estresses salino e déficit hídrico ainda não estão plenamente compreendidos para *C. tinctorius*, este trabalho teve como objetivo observar o comportamento da expressão dos genes P5CS e P5CR, enzimas de síntese da prolina e BADH, enzima de síntese da glicina-betaína, em folhas e raízes submetidas aos estresses salino e déficit hídrico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Sementes de cártamo, adquiridas em loja de alimentação para pássaros, foram colocadas para germinar em sistema de rolo de papel toalha do tipo Germitest[®], descrito por Dantas (2011). Após 4 dias de germinação, as plântulas foram transferidas para o sistema hidropônico na casa de vegetação, na solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) com ¼ de força e pH ajustado para 6,0. Após 30 dias de aclimatação, as plantas de cártamo foram submetidas aos tratamentos, que foram distribuídos em soluções nutritivas Hoagland & Arnon com modificações. Para extração de RNA foram coletadas 25 folhas e 25 raízes de plantas submetidas aos estresses salino e déficit hídrico nas seguintes condições: controle (C), sal moderado (50 mM de NaCl), sal severo (100 mM de NaCl), PEG moderado (-0,25 MPa) e PEG severo (-0,50 MPa), que permaneceram nos tratamentos por um período de 48 horas. Após esse período de estresse, as plantas foram coletadas e armazenadas no *freezer* a -80°C.

2.2 Escolha dos Primers

A escolha dos primers para a amplificação dos genes P5CS, P5CR e BADH, e dos controles internos para genes constitutivos ACT (Actina) e KASS (Keto acyl-acyl carrier protein synthase II (FAD2)), foi feita a partir de uma busca por homologia de sequência em bancos de dados. Inicialmente realizou-se uma busca utilizando-se do pacote BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar os genes homólogos em *Arabidopsisthaliana*. Em seguida, uma vez obtidas as sequências correspondentes aos genes de interesse efetuou-se uma busca também no NCBI (National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov) empregando o mesmo programa para, em banco de cDNA de *Carthamustinctorius* L., obter as sequências de cDNA correspondentes aos genes de interesse.

Os primers CtACTF (5'ATCGCTGATTGGAATGGAAG3'); CtACTR (5'GGTGCAACCACCTTGATCTT3'); CtKASSF (5'CATGCAACATCAACACCA3'); CtKASSR (5'CACCCTCCTCTGGATTTTCA3'); CtP5CSF (5'GCGTTAGACGGGATACGGAA3'); CtP5CSR (5'GTCGCTTCAAATGCCATCCA3'); CtP5CRF (5'AGTTGCTGGTGTCAAGTTAAAAGAC3'); CtP5CRR (5'TTCTCATCAGCCTTCCATATCTTAC3'); CtBADHF (5'TTATTTGGAGGGGAACGCC3'); CtBADHR

(5'GCTTGACAGAAGCATGGCTG3') foram escolhidos utilizando o programa PRIMER3 (<http://primer3.ut.ee/>).

2.3 Extração de RNA

A extração de RNA foi feita a partir de 1g de tecido vegetal, seja folha ou raiz, utilizando-se TRI Reagent® Solution como inibidor de RNAses, segundo o protocolo do fornecedor (AppliedBiosystems). O material vegetal foi inicialmente pulverizado no nitrogênio líquido até obter consistência em pó. Em seguida, foi transferido para tubos tipo eppendorfs, adicionado 1 mL de TRI Reagent e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Após, o extrato foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, coletando-se o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio com consequente agitação por 15 segundos. Incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente e em seguida o extrato foi submetido a uma segunda centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi então transferida para novos tubos e adicionou-se 500 µL de isopropanol, vortexando e incubando por 10 minutos. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 8 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. Ao precipitado de RNA obtido, foi adicionado 1 mL de etanol 75% para lavagem e centrifugou-se a 7.500 rpm por 5 minutos. Após a remoção do etanol adicionou-se 300 µL de água livre de RNase e levou-se o precipitado ao banho-maria a 55 °C por no máximo 5 minutos para dissolvê-lo. Os RNAs foram armazenados em *freezer* -80 °C. A quantificação do RNA foi realizada a partir da relação de absorbâncias 260/280 nm, obtida em espectrofotômetro de luz UV (NanoDrop 2000® - ThermoScientific Inc.).

2.4 Preparo dos cDNAs

Para síntese de cada cDNA das 50 amostras (25 folhas e 25 raízes), foi utilizado o protocolo da Transcriptase Reversa (SuperScript™ III Reverse Transcriptase) fornecida pela (Invitrogen) de acordo com as modificações do fabricante. Alíquotas das amostras de RNA de 0,5 µg foram transferidas para microtubos e em seguida adicionadas de 1 µL de Oligo-dT + 1 µL de dNTP, totalizando um volume de 13 µL. As reações foram incubadas em banho-maria a 65°C por 5 minutos e em seguida os tubos foram mantidos em gelo por 1 minuto. Em seguida, acrescentou-se 4 µL do tampão de reação concentrado 5 vezes (5X First-Strand Buffer), 1 µL de DTT (0,1 M DTT) 1 µL de RNase OUT™ e 1 µL de SuperScript III RT. Agitou-se suavemente e os tubos foram incubados no banho-maria a 50 °C por 1 hora para a

obtenção dos cDNAs totais das amostras. Em seguida a transcriptase reversa foi inativada por aquecimento a 70 °C por 15 minutos e as reações acondicionadas a -20 °C.

2.5 Amplificações de PCR

Para a amplificação dos cDNAs correspondentes aos genes de interesse, estabeleceu-se uma reação de base contendo 1 µL de cDNA, 1 µL de dNTPs, 2,5 µL de tampão da Taq DNA Polimerase (Invitrogen – 11615-010), 1 µL de MgCl₂, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase, 1 µL de cada *primer* F (*forward*) R (*reverse*). As condições de ciclagem no termociclador seguiram um padrão geral em que foi efetuada uma desnaturação inicial a 95 °C seguida de 40 ciclos de 95 °C por 30s, 50 °C por 45s e 75 °C por 1 min. Foi adicionada uma extensão final de 72 °C por 5 min. Para a P5CR a temperatura de anelamento foi de 55 °C. As reações foram acondicionadas no congelador a -20 °C para posterior realização de eletroforese.

2.6 Eletroferese em Gel de Agarose

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% adicionando-se à amostra 2 µL do intercalador de bases GelRed 10,000x 41003 (Biotium), 3 µL de tampão de depósito (Blue/Orange 6x LoadingDye G190A, Promega) totalizando 10 µL. A eletroferese foi feita em equipamento Pharmacia empregando-se 100V por 30 min. Os géis foram visualizados e fotografados em equipamentos de fotodocumentação CLEAVER.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão gênica neste trabalho foi estudada a partir de cDNAs obtidos de RNAs totais em plantas de cártamo submetidas aos estresses salino e déficit hídrico a partir de folhas e raízes. Os genes marcadores escolhidos fazem parte das vias metabólicas de dois indicadores de ajustamento osmótico, a P5CS (1-pirrolina-5-carboxilato sintetase) e a P5CR (1-pirrolina-5-carboxilato redutase) integrantes da via de síntese da prolina, e a BADH (betaína aldeído desidrogenase) da via de síntese da glicina-betaína.

Nas plantas de cártamo, a expressão do gene P5CS foi diferente nos tratamentos analisados, como também nas folhas e nas raízes (Figura 1). Quando submetidas ao estresse salino, a expressão do gene P5CS nas folhas aumentou conforme o aumento da concentração de NaCl (50 e 100 mM), e quando submetida ao déficit hídrico observou-se um aumento da expressão do gene P5CS, sendo maior no tratamento PEG 6000 severo (-0,50 MPa). As raízes não apresentaram expressão do gene P5CS. Esse aumento de expressão do gene P5CS pode ser devido a síntese da prolina, uma vez que sob estresse salino e déficit hídrico as plantas tendem a acumular osmorreguladores, dentre eles a prolina. Adicionalmente, observou-se que o padrão de expressão da P5CS observado neste trabalho é distinto em função dos tratamentos, concentrações e órgãos analisados. Estudos em *Arabidopsis thaliana* mostram que houve um aumento da expressão do gene P5CS nas plantas expostas ao estresse hídrico, salino e tratadas com ABA e que este aumento está associado ao acúmulo de prolina, reforçando o papel deste aminoácido como osmorregulador (STRIZHOV et al., 1997).

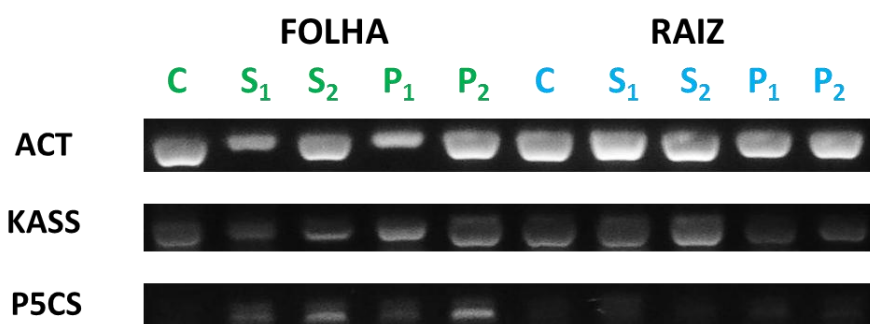


Figura 1: Expressão gênica de P5CS em folhas e raízes de cártamo submetidas aos estresses salino (S1, 50 mM de NaCl; S2, 100 mM de NaCl) e déficit hídrico (P1, -0,25MPa; P2, -0,50MPa) simulado pelo PEG 6000.

A expressão do gene P5CR (1-pirrolina-5-carboxilato redutase) foi observada nas folhas e raízes das plantas de cártamo. Nas folhas, quando submetidas ao estresse salino a expressão do gene P5CR aumentou em comparação ao controle, sendo mais expressivo no

estresse salino severo (100 mM de NaCl) (Figura 2). Sob déficit hídrico, observou-se que a expressão do gene P5CR nas folhas foi maior apenas quando as plantas foram submetidas ao tratamento com PEG 6000 moderado (-0,25 MPa). Nas raízes, não houve diferença na expressão do gene P5CR quando comparadas ao controle. Conforme já observado para P5CS, observou-se um aumento que possivelmente está relacionado ao aumento de síntese das enzimas de prolina, o aminoácido que em determinadas espécies age como osmorregulador. Trabalhos realizados com a soja, submetida a 400 mM de NaCl, reforçam que a superexpressão do gene P5CR está associado ao aumento da prolina (DELAUNEY & VERMA, 1990).

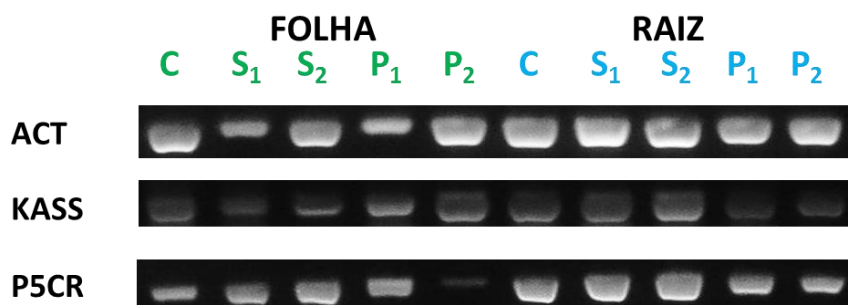


Figura 2: Expressão gênica de P5CR em folhas e raízes de cártamo submetidas aos estresses salino (S1, 50 mM de NaCl; S2, 100 mM de NaCl) e déficit hídrico (P1, -0,25MPa; P2, -0,50MPa) simulado pelo PEG 6000.

O acúmulo de glicina-betaína está associado a uma regulação positiva da expressão dos genes para as enzimas CMO (colina monooxigenase) e BADH (betaína aldeído desidrogenase) concomitantemente, conduzindo assim um aumento na atividade enzimática das mesmas. Em plantas de cártamo observou-se a expressão do gene BADH tanto nas folhas, quanto nas raízes. Nas folhas, a expressão do gene BADH foi maior que o controle apenas quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico (-0,25 e -0,50 MPa). Nas raízes, observou-se que a expressão do gene BADH foi maior tanto sob o estresse salino (50 e 100 mM de NaCl), quanto sob déficit hídrico (-0,25 e -0,50 MPa). No caso das folhas ter diminuído a expressão da BADH sob déficit hídrico severo pode ser devido a planta já ter sintetizado a glicina betaína, e se isso aconteceu, provavelmente os genes foram desativados e/ou degradados após a síntese da glicina betaína. Em cevada observou-se a indução e acúmulo de BADH sob salinidade e seca, o que indica uma resposta da planta a alterações osmótica que afetam o conteúdo de água (ISHITANI et al., 1995).

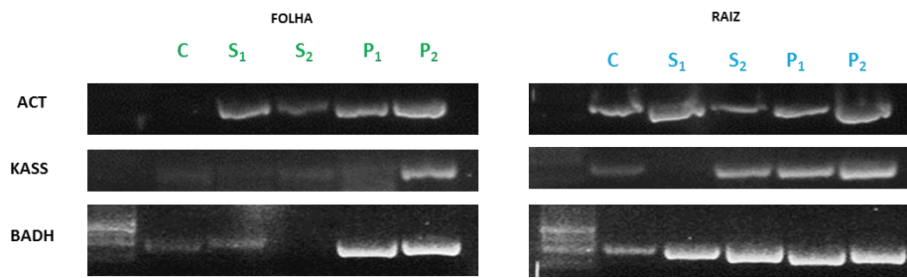


Figura 3: Expressão gênica de BADH em folhas e raízes de cártamo submetidas aos estresses salino (S1, 50 mM de NaCl; S2, 100 mM de NaCl) e déficit hídrico (P1, -0,25MPa; P2, -0,50MPa) simulado pelo PEG 6000.

4 CONCLUSÕES

C. tinctorius responde de forma diferenciada quanto a expressão dos genes P5CS, P5CR e BADH sob efeitos da salinidade (50 e 100 mM de NaCl) e do déficit hídrico simulado pelo PEG 6000 (-0,25 e 0,50 MPa).

P5CS e P5CR expressaram-se de forma diferenciada nas plantas de cártamo. O gene P5CS expressou-se apenas nas folhas de cártamo, e somente sob os estresses salino e hídrico severos (100 mM de NaCl e -0,50 MPa). E o gene P5CR expressou-se em todos os tratamentos submetidos, como também nas folhas e raízes de cártamo.

BADH se expressou nas folhas somente quando submetidas ao déficit hídrico. E nas raízes, houve expressão em ambos estresses (salino e déficit hídrico).

A resposta da expressão dos genes estudados e envolvidos na síntese da prolina (P5CS e P5CR) e glicina betaína (BADH) em plantas de cártamo é tratamento, dose e órgãos dependente.

5 REFERÊNCIAS

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, v.24, n.1, p.23-58, 2005.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. A soybean delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase gene was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. **Molecular Genomics and Genetics**, v.221, n.3, p.299-305, 1990.

GAXIOLA, R. A.; LI, J.; UNDURRAGA, S.; DANG, L. M.; ALLEN, G. J.; ALPER, S. L.; FINK, G. R. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.20, p.11444-11449, 2001.

ISHITANI, M.; NAKAMURA, T.; HAN, S. I.; TAKABE, T. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. **Plant Molecular Biology**, v.27, n.2, p.307-315, 1995.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by genetransfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, v.17, n.3, p.287-291, 1999.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.10, n.8, p.1391-406, 1998.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.651-681, 2008.

STRIZHOV, N.; ABRAHÁ, E.; ÖKRÉSZ, L.; BLICKLING, S. ZILBERSTEIN, A.; SCHELL, J.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.12, n.3, 557-569, 1997.

SUN, W.; BERNARD, C.; VAN DE COTTE, B.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. *At-HSP17.6A*, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. **The Plant Journal**, v.27, n.5, p.407-415, 2001.

SUNKAR, R.; BARTELS, D.; KIRCH, H. H. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. **The Plant Journal**, v.35, n.4, p.452-464, 2003.

VILLALOBOS, M. A.; BARTELS, D.; ITURRIAGA, G. Stress Tolerance and Glucose Insensitive Phenotypes in *Arabidopsis* Overexpressing the *CpMYB10* Transcription Factor Gene. **Plant Physiology**, v.135, n.1, p.309-324, 2004.

ZHOU, S; CHEN, X; ZHANG, X; LI, YINXIN. Improved salt tolerance in tobacco plants by co-transformation of betaine synthesis gene *BADH* and vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *SeNHX1*. **Biotechnology Letters**, v.30, n.2, p.369-376, 2008.