

## 7. ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELA TEMPERATURA BAIXA NA FASE VEGETATIVA EM GENÓTIPOS DE ARROZ

Renata Pereira da Cruz<sup>8</sup>, Jaqueline Ineu Golombieski<sup>2</sup>, Maiara Taís Bazana<sup>2</sup>, Caroline Cabreira<sup>3</sup>, Taíse Foletto Silveira<sup>2</sup>, Bruna Sampaio Roberto<sup>2</sup>, Leila Picolli da Silva<sup>2</sup>

Palavras-chave: *Oryza sativa*, insaturação de membrana, tolerância ao frio

### INTRODUÇÃO

A semeadura antecipada (de final de setembro) da cultura do arroz irrigado no Rio Grande do Sul (RS) é uma das práticas de manejo mais importantes no sentido de garantir a coincidência dos períodos de perfilhamento e início do período reprodutivo com a maior radiação solar (Mariot et al., 2005). A ocorrência de temperaturas baixas (mínimas abaixo de 17°C) durante os meses de setembro a novembro é comum no RS e implica em atraso na germinação e na emergência e diminuição do desenvolvimento inicial das plântulas de arroz, o que limita a capacidade de competição com plantas daninhas e atrasa práticas de manejo como adubação nitrogenada em cobertura e início da irrigação. Neste contexto, a incorporação de tolerância ao frio nas fases iniciais de germinação e plântula é extremamente importante para permitir um estabelecimento rápido e uniforme da lavoura e garantir, assim, os benefícios da semeadura antecipada.

Entre os mecanismos fisiológicos envolvidos na resposta diferencial à temperatura baixa em arroz, a membrana plasmática das células é apontada como sendo o sítio primário de dano, ou seja, o local onde iniciam os eventos fisiológicos e metabólicos que diferenciam as cultivares tolerantes das sensíveis (Cruz & Milach, 2000). De acordo com Wang et al. (2006) a exposição à variação de temperatura é um dos maiores estresses ambientais a que as plantas são submetidas. Muitas espécies de origem temperada podem desenvolver tolerância quando expostas à mudança ambiental de temperatura, processo esse conhecido como adaptação térmica que está associada a respostas bioquímicas e fisiológicas, observadas especialmente pelas modificações de fluidez lipídica das membranas (Hur et al., 2004). Estas modificações são propiciadas através da ação de enzimas capazes de alterar o nível de insaturação lipídica das membranas. Por este motivo, a composição em ácidos graxos dos lipídeos que constituem as membranas biológicas das células vegetais vem sendo estudada como fator chave na sensibilidade ao frio (Ito & Simpson, 1996). Estudos relacionados a mudanças na composição de ácidos graxos e sua associação com tolerância ao frio em arroz são escassos na literatura, apesar disso, em um estudo de variação somaclonal, Bertin et al. (1998) comprovaram que a maior tolerância ao frio encontrada em alguns somaclones foi relacionada à alterações na composição de ácidos graxos e à maior insaturação dos mesmos.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar se genótipos de arroz com diferentes reações ao frio na fase vegetativa diferem na composição de ácidos graxos constituintes das membranas celulares sob temperatura normal e após exposição ao frio.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise da composição de lipídeos da membrana plasmática foram utilizados 44 genótipos de arroz (Tabela 1), sendo que os mesmos apresentam origens diferentes e pertencem ao Banco de Germoplasma do Programa de Melhoramento Genético do IRGA.

Sementes dos 44 genótipos foram semeadas em bandejas (59 x 39 x 6 cm) contendo solo coletado nas dependências do IRGA. Em cada bandeja foram colocados cinco genótipos, sendo semeados quatro linhas de 36 cm por genótipo, as quais constituíram uma repetição. Este número de linhas por repetição

<sup>8</sup> Pesquisadora, Equipe de Melhoramento Genético do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), Av. Bonifácio Carvalho Bernardes, 1494, CEP 94.930-090, Cachoeirinha, RS, Brasil. email : renata-cruz@irga.rs.gov.br

<sup>2</sup> Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

<sup>3</sup> Universidade do Vale do Rio dos Sinos (Unisinos)

foi determinado em estudo prévio como sendo o necessário para obter pelo menos 2 gramas de matéria seca de folhas para extração de lipídeos, ou seja, em torno de 80 plantas.

Tabela 1. Origem e subespécie dos 44 genótipos de arroz utilizados no estudo da composição lipídica e tolerância ao frio na fase vegetativa. IRGA, 2009

DENOMINAÇÃO	ORIGEM	SUBESPÉCIE	DENOMINAÇÃO	ORIGEM	SUBESPÉCIE
AKITAKOMACHI	Japão	Japônica	ORIZYCA 1	Colômbia	Indica
NORIN 21	Japão	Japônica	ORYZICA LLANOS 5	Colômbia	Indica
YUNLEN 19	China	Japônica	CICA 8	Colômbia	Indica
YUNLEN 2	China	Japônica	METICA 1	Colômbia	Indica
ALAN	EUA	Japônica	BR-IRGA 409	Brasil	Indica
BLUEBELLE	EUA	Japônica	BR-IRGA 410	Brasil	Indica
CALORO 7985	EUA	Japônica	IRGA 416	Brasil	Indica
DAWN	EUA	Japônica	IRGA 417	Brasil	Indica
LEMONT	EUA	Japônica	IRGA 420	Brasil	Indica
MERCURY	EUA	Japônica	IRGA 422CL	Brasil	Indica
NEW REX	EUA	Japônica	IRGA 423	Brasil	Indica
FRANCES	EUA	Japônica	IRGA 424	Brasil	Indica
Rizabela 2	Hungria	Japônica	IRGA 2852-20-4-3-3V	Brasil	Indica
DIAMANTE	Chile	Japônica	EPAGRI 108	Brasil	Indica
CARNAROLI	Itália	Japônica	EPAGRI 109	Brasil	Indica
AMAROO	Austrália	Japônica	SUPREMO 1	Brasil	Indica
INIA TACUARI	Uruguai	Japônica	MARAVILHA Básica	Brasil	Japônica
L 2825 CA	Uruguai	Japônica	EEA 406 (MUTANTE)	Brasil	Japônica
EL PASO L 144	Uruguai	Indica	BRS BOJURU	Brasil	Japônica
INIA OLIMAR	Uruguai	Indica	PUSA BASMATI-1	India	Indica
IR60	Filipinas	Indica	JASMINE	India	Indica
IR50	Filipinas	Indica	<i>Oryza rufipogon</i>	Ásia	

Foi utilizado o delineamento completamente casualizado com quatro repetições para cada um dos tratamentos de temperatura utilizados, frio (10°C) e controle (28°C), totalizando 72 bandejas. Após a semeadura, o material foi mantido em casa-de-vegetação a 28°C e quando as plantas atingiram o estágio V<sub>4</sub>, metade das bandejas (quatro repetições) foi levada para a sala climatizada para exposição ao estresse por frio (10°C) por dois dias. As outras 36 bandejas equivalentes a quatro repetições permaneceram na casa-de-vegetação como controle. Após os dois dias em sala climatizada, foi feita a coleta das folhas tanto das plantas expostas ao frio como das plantas controle para posterior extração dos ácidos graxos. A coleta das folhas consistiu no corte na base da planta, colocando-se todas as folhas de uma mesma repetição em um saco plástico, o qual foi acondicionado em caixas de isopor contendo gelo.

A extração e determinação de lipídeos foi realizada nos Laboratórios do Núcleo Integrado de Desenvolvimento de Análises Laboratoriais (NIDAL) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFSM, em Santa Maria, RS, conforme descrito a seguir. A metodologia de Bligh & Dyer (1959) foi utilizada para a extração dos lipídeos após a maceração das folhas. A composição de ácidos graxos foi determinada por Cromatografia Gasosa, sendo que a gordura foi saponificada e metanolizada com solução de KOH e então esterificada e metanolizada com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Hartman & Lago, 1973). Os ácidos graxos metil-ésteres foram analisados utilizando um Cromatógrafo Gasoso (Agilent Technologies - HP 6890) ajustado com uma coluna capilar DB-23 (60m x 0,25mm x 0,25µm) com detector de ionização com chama. A injeção e a temperatura de detecção foi em torno de 250°C e a condução pelo gás nitrogênio. A padronização dos ácidos graxos metil-ésteres e subseqüentes tempos de retenção foram usados para a identificação dos ácidos graxos. Os ácidos graxos foram expressos como porcentagem de ácidos graxos totais contidos no padrão, sendo os dados submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste dos mínimos quadrados a 5% de probabilidade.

Para a avaliação da tolerância ao frio dos 44 genótipos de arroz foi utilizado o rebrote das plantas controle, as quais foram mantidas em casa-de-vegetação até apresentarem 4 folhas. Neste

momento foram levadas para a sala climatizada onde permaneceram por dez dias a 10°C. Após este período as plantas voltaram para a casa-de-vegetação onde, após sete dias de recuperação a 28°C, foi feita a avaliação visual da porcentagem de sobrevivência das plantas, utilizando uma escala que variou de altamente tolerante a altamente sensível (Tabela 2).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genótipos de arroz estudados apresentaram uma ampla variação quanto à porcentagem de sobrevivência das plantas ao frio, de zero até 100%, sendo os mesmos avaliados segundo uma escala visual nas classes altamente tolerante, tolerante, intermediário, sensível e altamente sensível (Tabela 2).

Tabela 2. Reação ao frio (10 dias a 10°C) na fase vegetativa (V4) após sete dias de recuperação em casa-de-vegetação (28°C), avaliada como porcentagem de sobrevivência de plantas.

DENOMINAÇÃO	SUBESPÉCIE	TOLERÂNCIA AO FRIO*	DENOMINAÇÃO	SUBESPÉCIE	TOLERÂNCIA AO FRIO
AMAROO	Japônica	Altamente tolerante	EL PASO L 144	Indica	Sensível
BRS BOJURU	Japônica	Altamente tolerante	INIA OLIMAR	Indica	Sensível
AKITAKOMACHI	Japônica	Tolerante	IR60	Indica	Sensível
NORIN 21	Japônica	Tolerante	CICA 8	Indica	Sensível
YUNLEN 19	Japônica	Tolerante	IR50	Indica	Altamente sensível
YUNLEN 2	Japônica	Tolerante	PUSA BASMATI-1	Indica	Altamente sensível
ALAN	Japônica	Tolerante	JASMINE	Indica	Altamente sensível
CALORO 7985	Japônica	Tolerante	ORIZYCA 1	Indica	Altamente sensível
NEW REX	Japônica	Tolerante	ORYZICA LLANOS 5	Indica	Altamente sensível
RIZABELA	Japônica	Tolerante	BR-IRGA 409	Indica	Altamente sensível
DIAMANTE	Japônica	Tolerante	BR-IRGA 410	Indica	Altamente sensível
FRANCES	Japônica	Tolerante	IRGA 416	Indica	Altamente sensível
MARAVILHA	Japônica	Intermediário	IRGA 417	Indica	Altamente sensível
BLUEBELLE	Japônica	Intermediário	IRGA 420	Indica	Altamente sensível
DAWN	Japônica	Intermediário	IRGA 422CL	Indica	Altamente sensível
LEMONT	Japônica	Intermediário	IRGA 423	Indica	Altamente sensível
MERCURY	Japônica	Intermediário	IRGA 424	Indica	Altamente sensível
CARNAROLI	Japônica	Intermediário	IRGA 2852-20-4-3-3V	Indica	Altamente sensível
INIA TACUARI	Japônica	Intermediário	EPAGRI 108	Indica	Altamente sensível
L 2825 CA	Japônica	Intermediário	EPAGRI 109	Indica	Altamente sensível
EEA 406	Japônica	Intermediário	SUPREMO 1	Indica	Altamente sensível
			METICA 1	Indica	Altamente sensível
			<i>Oryza rufipogon</i>		Altamente sensível

\* Escala utilizada: Altamente tolerante = 100% de sobrevivência; Tolerante = entre 70% e 99% de sobrevivência; intermediário = entre 30 e 70% de sobrevivência; sensível = entre 1 e 30% de sobrevivência; altamente sensível = 0% de sobrevivência.

Observa-se que a maioria dos genótipos Japônica variou de intermediário a altamente tolerante ao frio, enquanto que os genótipos pertencentes à subespécie Indica se mostraram sensíveis ou altamente sensíveis ao frio. O acesso da espécie silvestre *O. rufipogon* se apresentou altamente sensível ao frio (Tabela 2).

Os dados de ácidos graxos totais obtidos foram divididos em ácidos graxos saturados e insaturados, somando-se as médias de cada tipo de ácido graxo saturado e insaturado obtidas em cada repetição de cada tratamento (frio e controle). Os resultados foram sumarizados como apresentado na Tabela 3, em que os valores de ácidos graxos saturados e insaturados totais foram expressos para cada classe de reação ao frio. Para tal os genótipos tolerantes e altamente tolerantes foram agrupados na classe “tolerante” e os genótipos sensíveis e altamente sensíveis foram agrupados na classe “sensível”. Os valores de ácidos graxos apresentados são os valores médios de ácidos graxos saturados e insaturados de todos os genótipos agrupados em uma determinada classe de reação ao frio (Tabela 3).

Em primeiro lugar observa-se que a porcentagem de ácidos graxos insaturados é superior a de ácidos graxos saturados para todos os genótipos, ficando em torno de 70% dos ácidos graxos totais enquanto que os saturados correspondem a 30%. Isto é esperado, uma vez que se trata de uma espécie

vegetal, em que a insaturação de lipídeos é superior à saturação. Quando se observa a composição lipídica nas diferentes classes de tolerância ao frio verifica-se que na temperatura normal de desenvolvimento para a espécie (28°C), não há diferenças significativas entre as diferentes classes de tolerância tanto no que se refere aos ácidos graxos saturados quanto insaturados (Tabela 3). Após a exposição de dois dias à temperatura baixa de 10°C no estádio V<sub>4</sub>, porém, ocorreu um aumento não significativo na concentração de ácidos graxos saturados nos genótipos sensíveis ao frio, enquanto que nos genótipos tolerantes e intermediários esta praticamente não se alterou. Já no caso dos ácidos graxos insaturados ocorreu o oposto, ou seja, estes diminuíram de forma não significativa sua concentração nos genótipos sensíveis e intermediários e aumentaram nos tolerantes. Desta forma, as diferenças não significativas entre as classes de tolerância a 28°C passaram a ser significativas a 10°C, sendo que os genótipos sensíveis ao frio apresentaram maior quantidade de ácidos graxos saturados e menor de ácidos graxos insaturados que os tolerantes nesta condição (Tabela 3).

Tabela 3. Médias de porcentagem de ácidos graxos saturados e insaturados totais nas diferentes classes de reação ao frio obtidas pela avaliação do comportamento de 44 genótipos de arroz.

Reação ao frio	Ácidos graxos saturados			Ácidos graxos insaturados		
	28(°C)	10(°C)	Varição	28(°C)	10(°C)	Varição
Tolerante	A 28,7 a	A 28,6 a	-0,1	A 72,0 a	A 72,6 a	0,6
Intermediário	A 29,1 a	A 29,2 ab	0,1	A 72,0 a	A 70,5 a	-1,5
Sensível	A 29,3 a	A 31,8 b	2,5	A 71,1 a	A 68,7 b	-2,4

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste dos mínimos quadrados ( $\alpha = 0,05$ )

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste dos mínimos quadrados ( $\alpha = 0,05$ )

Estes dados revelam uma clara tendência à redução na insaturação e aumento na saturação de ácidos graxos em genótipos sensíveis ao frio na fase vegetativa de desenvolvimento, o que é um forte indicativo do papel da manutenção da estabilidade da membrana plasmática na tolerância ao frio em arroz. A continuação deste estudo envolverá a determinação do grau de correlação da insaturação de ácidos graxos com a tolerância ao frio e a determinação de quais tipos de ácidos graxos tem sua concentração alterada de forma significativa após a exposição ao frio em arroz.

## CONCLUSÕES

Os genótipos de arroz estudados não diferem quanto à composição de ácidos graxos sob temperatura normal, porém sob temperatura baixa os genótipos sensíveis ao frio apresentam maior quantidade de ácidos graxos saturados e menor quantidade de ácidos graxos insaturados que genótipos tolerantes ao frio, podendo ser este um possível mecanismo envolvido na reação diferencial entre genótipos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTIN, P. et al. Somaclonal variation and chilling tolerance improvement in rice: changes in fatty acid composition. **Plant Growth Regulation**. v. 24, p. 31-41, 1998.
- BLIGH, E.C., DYER, W. J. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- CRUZ, R. P.da, MILACH, S. C. K. Melhoria genética para tolerância ao frio em arroz irrigado. **Ciência Rural**. v.30, n. 5, p.909-917, 2000.
- HARTMAN, L., LAGO, B. C. A. Rapid preparation of fatty, methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**. v. 22, p. 457-477, 1973.
- HUR, J. et al. Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. **Plant Science**. v.167, p. 417-426, 2004.
- ITO, M. K., SIMPSON, K. L. The biosynthesis of  $\omega$ 3 fatty acids from 18:2 $\omega$  in *Artemia* spp. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 115B, p. 69-76, 1996.
- MARIOT, C.H.P. et al. Influência da época de semeadura no rendimento de grãos de cultivares de arroz irrigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4., 2005, Santa Maria, **Anais...** Santa Maria: Editora Orium, 2005. p.251-253.
- WANG, J. et al. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) gene encoding a temperature-dependent chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 340, p. 1209-1216, 2006.