

KLEITON LIMA DE GODOY MACHADO

**POSSÍVEL PAPEL DO SILÍCIO, MEDIADO PELO ETILENO,
NA FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA EM RAÍZES DE ARROZ**

Dissertação submetida à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M149p
2018

Machado, Kleiton Lima de Godoy, 1990-

Possível papel do silício, mediado pelo etileno, na formação
do aerênquima em raízes de arroz / Kleiton Lima de Godoy
Machado. – Viçosa, MG, 2018.

vii, 45f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Fábio Murilo da Matta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.20-23.

1. Arroz. 2. Análise foliar. 3. Hipoxia. 4. Plantas -
Metabolismo. 5. Etileno. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 633.18

KLEITON LIMA DE GODOY MACHADO

**POSSÍVEL PAPEL DO SILÍCIO, MEDIADO PELO ETILENO,
NA FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA EM RAÍZES DE ARROZ**

Dissertação submetida à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 19 de fevereiro de 2018.

Marília Contin Ventrella

Carlos Eduardo Aucique Perez

Fábio Murilo DaMatta
(Orientador)

***“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
Arthur Schopenhauer***

AGRADECIMENTOS

São muitos os “nãos” proporcionados pela vida àqueles que almejam galgar outros lugares; por isso, aos que permitiram que eu chegasse até aqui, eu lhes agradeço:

Primeiramente, aos meus pais, Marília e Júlio, pelos esforços depositados na minha formação acadêmica e pessoal. Nunca fui limitado por essas duas grandes pessoas que contribuíram e contribuem tanto para a pessoa que sou. Minha avó materna, Eda, com quem tive a honra de conviver 25 anos de minha vida. Ela moldou meu caráter e me deu o exemplo da empatia, fazendo possível todas as minhas realizações e laços afetivos até o presente momento. Agradeço aos meus avós paternos, que me ensinaram a não desistir e de acatar o peso das minhas decisões. Carrego comigo todos eles.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pelo conhecimento adquirido e amparo durante as disciplinas e a pesquisa, bem como seus professores e funcionários. Sei que não fui o mais fácil pós-graduando a ser orientado; dessa forma, agradeço ao meu orientador, Fábio DaMatta, especialmente pela paciência, tempo e amizade, guiando-me por esta etapa profissional de grande valia. Também a minha coorientadora, Marília Ventrella, por me receber com dedicação e por ter-me dado todo o suporte necessário. Além destes, agradeço aos meus colegas de laboratório, pelo suporte e sentimento de fraternidade, em especial a Kelly, Marcela, Leonardo, Raylla e Villian, que contribuíram neste trabalho. Também têm minha gratidão os alunos e técnicos dos laboratórios de anatomia que sempre me ajudaram, desde o primeiro dia, com as análises anatômicas. Um obrigado especial aos colegas do Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, que me ajudaram com o cultivo das plantas e análises de produção de etileno, em especial ao Fred, Fabrício, Lucas, Nilo e Rafael. Também agradeço a ajuda dos colegas da UCP (Unidade de Crescimento de Plantas), em especial ao Jorge Condori, pela ajuda na bancada e ao professor Wagner Araújo, por ter cedido, gentilmente, alguns reagentes para análises de biologia molecular.

Aos meus professores de graduação, Leandro Astarita e Eliane Santarém, meu obrigado pela dedicação e preocupação em me tornar um grande profissional, não medindo esforços para que avançasse em minha carreira e alimentando meus sonhos

com empenho e exemplo. São duas grandes pessoas que me mostraram o que é ser um profissional de excelência.

Reconheço a estimada ajuda de Álefe, Lucas, Rodrigo, Webert, e aos demais colegas por estarem sempre presentes em minha vida aqui em Viçosa, tornando a jornada muito menos penosa, com seus ensinamentos, suas palavras de conforto e por me ouvirem, quando necessário.

Por fim, aos não citados, mas que contribuíram indiretamente para a conclusão deste sonho, meu muito obrigado!

CONTEÚDO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
Introdução	1
Materiais e Métodos	6
Experimento 1.....	6
Obtenção de plantas e análises de biologia molecular	6
Obtenção de plântulas e análise anatômica	7
Experimento 2.....	8
Análise anatômica de plântulas	8
Experimento 3.....	8
Produção de Etileno e quantificação de ACC e outros fitormônios	8
Análise de metabólitos	9
Análise de biologia molecular.....	10
Experimento 4.....	12
Resultados	13
Experimento 1.....	13
Experimento 2.....	14
Experimento 3.....	14
Perfil metabólico e hormonal	14
Expressão de genes	15
Experimento 4.....	16
Discussão	17
Conclusão	20
Tabelas.....	25
Figuras	30
Referências	21

RESUMO

MACHADO, Kleiton Lima de Godoy, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Possível papel do silício, mediado pelo etileno, na formação do aerênquima em raízes de arroz.** Orientador: Fábio Murilo DaMatta.

O arroz é a base alimentar de quase metade da população mundial. O arroz acumula silício e possui transportadores específicos para absorção desse elemento. O silício afeta a anatomia das raízes de arroz, aumentando a lignificação da endoderme e exoderme e afeta o metabolismo do arroz, contribuindo para que a planta produza mais etileno em suas raízes. Contudo, praticamente nada se sabe sobre como o silício afeta o metabolismo e o desenvolvimento das plantas, sob condições não estressantes. Sabe-se que o etileno constitui um dos sinais responsáveis pela morte celular programada, processo pelo qual aerênquimas são formados. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi testar a hipótese de que o silício aumenta a porosidade da raiz, via maior desenvolvimento das lacunas do aerênquima radicular, o que estaria associado ao incremento da produção de etileno nesse órgão. A fim de testar esta hipótese, foram realizadas análises anatômicas, de abundância de transcritos, níveis de alguns fitohormônios e quantificação de perfil metabólico de raízes de plantas de arroz tratadas ou não com silício. O silício foi associado a um aumento significativo da porosidade da raiz, estimada pelo aumento do teor de lacunas do aerênquima, maior produção de etileno e maiores níveis de transcritos relacionados ao metabolismo de etileno, biossíntese de paredes celulares, glicólise, entre outros, nos tecidos radiculares. Além disso, plantas suplementadas com silício tiveram, aparentemente, maior giro do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e da via da fermentação (produção de lactato), provavelmente para satisfazer a demanda de processos energeticamente custosos, como a morte celular programada nessas raízes. Também foram observadas mudanças importantes nos níveis de aminoácidos. Os resultados sugerem que o silício altera a fisiologia do arroz aumentando a porosidade da raiz por intermédio do fitohormônio etileno.

ABSTRACT

MACHADO, Kleiton Lima de Godoy, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2018. **A possible role for silicon, mediated through ethylene, on the formation of aerenchyma of rice roots.** Adviser: Fábio Murilo DaMatta.

Rice is the food basis of almost half the world's population. The rice plant accumulates silicon and has specific transporters to absorb this element. Silicon affects the anatomy of rice roots, increasing the lignification of both the endodermis and exodermis, and affects rice metabolism, contributing to increase ethylene production on plant roots. However, practically nothing is known about how silicon affects plant metabolism and development under non-stressful conditions. Ethylene is known to be one of the signals responsible for programmed cell death, a process by which aerenchyma is formed. Thus, the objective of the present work was to test the hypothesis that silicon increases root porosity due to the greater development of root aerenchymal spaces, which would be associated with an increase of ethylene production in this organ. To test this hypothesis, anatomical traits, abundance of transcripts, levels of some phytohormones and metabolic profile were assessed on roots of rice plants treated or not with silicon. Silicon application led to significant increases in root porosity, higher ethylene production and higher levels of transcripts related to ethylene metabolism, cell wall biosynthesis and glycolysis, among others, in root tissues. In addition, silicon-supplemented plants apparently had a greater turnover of the tricarboxylic acid cycle and fermentation pathway (lactate production), probably as a mean to satisfy the demand for costly energetic processes such as programmed cell death. Important changes in amino acid levels were also observed. The results suggest that silicon changes the physiology of rice by increasing the porosity of the root tissues through ethylene.

Introdução

O arroz é uma das culturas de maior importância entre os vegetais cultivados e melhorados de todo o globo. Estima-se que cerca de 3 bilhões de pessoas dependam do grão na sua alimentação (Woolston, 2014). O cultivo do arroz (*Oryza sativa* L. subs. *japonica*) depende de regiões com abundância de água, já que é estabelecida, principalmente, sob alta irrigação, o que garante menor prevalência de patógenos aeróbicos e plantas daninhas. Essa condição de alagamento ou submersão gera, potencialmente, estresse tanto no sistema radicular como na parte aérea, principalmente pela falta de oxigênio (O_2) nos tecidos.

A submersão é caracterizada quando a planta está completamente abaixo da lâmina d'água ou se encontra apenas com uma pequena porção de sua parte aérea não submersa (Catling, 1992). O evento de alagamento, por sua vez, diz respeito à condição em que os espaços intercoloidais do solo se encontram preenchidos com água ou sob altíssima umidade, impedindo/dificultando a difusão de gases no sistema radicular (Setter e Waters, 2003). Ambas condições reduzem o metabolismo aeróbico do vegetal, já que o O_2 apresenta uma taxa de difusão na água de 1/10.000 em relação à difusão no ar (Armstrong e Drew, 2002). Em plantas tolerantes e intolerantes à submersão ou alagamento, observam-se respostas metabólicas como a ativação do metabolismo anaeróbico do piruvato, o que implica no incremento do fluxo glicolítico e, em última instância, o aumento da produção de ATP proveniente da glicólise. Além disso, há desvios de metabólitos para rotas mais eficientes na utilização de energia em plantas sob hipóxia (Bologa et al., 2003). Nesse sentido, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) pode ser dividido em duas partes independentes: oxidativa e redutiva, em combinação com a ativação de rotas biossintéticas de alanina e do ácido γ -aminobutírico (GABA), que resulta na acumulação de metabólitos como alanina, GABA e succinato, sob condições de baixa concentração de O_2 (Limami et al., 2008; Rocha et al., 2010; Kreuzwieser e Rennenberg, 2014).

O arroz é tolerante a condições de submersão, utilizando-se de duas estratégias: a estratégia de quiescência – síndrome da quiescência por baixo O_2 – e a estratégia de escape – síndrome de escape sob baixas concentrações de O_2 (Colmer e Voesenek, 2009). A primeira é governada pelo gene *SUB1* e, a segunda, pelos genes *SNORKEL*: *SK1* e *SK2*. As plantas com estratégia de quiescência têm o gene *SUB1* ativado, associado à supressão de genes que degradam amido e sacarose (α -amilase e sacarase

sintase), e aumento de expressão de genes associados com a fermentação alcoólica, permitindo, assim, as plantas de aclimatarem-se à submersão (Xu et al., 2006). Em contrapartida, para que haja escape à submersão de longa duração, os genes acionados são os *SNORKEL*, respondentes também ao etileno, que é produzido e acumulado (pela baixa taxa difusional no ambiente aquático) nos colmos, acarretando a degradação do ácido abscísico (ABA) e maiores respostas ao ácido giberélico; em última instância, isso gera um rápido estiolamento do caule, até que as folhas estejam acima da lâmina d'água, permitindo o intercâmbio gasoso e a produção de fotoassimilados (Voesenek e Bailey-Serres, 2009). As raízes normalmente apresentam, constitutivamente, a formação de espaços intercelulares, mas uma vez que a planta de arroz esteja sob condições de alagamento, a proporção desses espaços aumenta (Justin e Armstrong, 1991). Esses espaços intercelulares são denominados lacunas do aerênquima e estão interligados com as lacunas do aerênquima presentes na parte aérea (colmos e folhas), criando dutos de ar entre os tecidos da planta de arroz (Colmer e Voesenek, 2009). Sabe-se que o aerênquima no arroz é do tipo lisógeno, ou seja, ocorre a partir da morte celular programada (MCP) e de outras rotas de sinalização (Nishiuchi et al., 2012).

A MCP em plantas está envolvida com processos constitutivos, como a formação de vasos condutores, reprodução, senescência e em resposta a estresses bióticos (Greenberg, 1996). Entretanto, esse processo pode ser estimulado em raízes de milho e arroz, por exemplo, em que situações de hipóxia levam à MCP de células corticais e, assim, formação das lacunas do aerênquima (Pennell e Lamb, 1997). A MCP é específica e controlada por diversos mecanismos, que envolvem ativação de rotas metabólicas, como degradação de material genético, dissolução de membranas e ativação de proteínas do tipo caspases em plantas, havendo também ativação de genes até os estádios finais do processo da MCP; esse processo difere da necrose, que se caracteriza em morte celular acidental (Drew et al., 2000; Evans, 2004). O processo de formação de aerênquima lisógeno necessita de um eliciador endógeno, como etileno, agindo somente num grupo restrito de células, que, no caso do arroz, ocorre no córtex medial da raiz (Justin e Armstrong, 1991; He et al., 1992). Em seguida, a iniciação da MCP é caracterizada pela perda de íons para o ambiente extracelular, invaginação da membrana plasmática e o aparecimento de pequenas vesículas no citoplasma, sendo estas repletas de proteases (Fomicheva et al., 2012). Logo, há condensação da cromatina, aumento da atividade de hidrolases de parede celular e de organelas e

membranas. Por fim, há lise celular com degradação da parede celular e absorção do conteúdo celular por células próximas (Evans, 2003).

As espécies reativas de oxigênio (EROs), que se acumulam sob baixa pressão de O₂, podem elicitar a MCP juntamente com o etileno em plantas de *Arabidopsis thaliana* (Yang, 2014). A formação de EROs é mediada pela enzima “Respiratory burst oxidase homolog” (*RBOH*) (Torres e Dangel, 2005). Em contrapartida, a enzima *Metallothionein* (*MT*) captura essas EROs, minimizando os danos e processos ocasionados por suas interações (Xue et al., 2009; Zhang et al., 2016). Em arroz, utilizando técnicas de expressão tecido específicas, foi observado aumento da expressão de genes homólogos de enzimas *RBOH* e queda na expressão de enzimas *MT*, em células corticais, evidenciando o papel das EROs na formação do aerênquima (Rajhi et al., 2011). Foram observados altos níveis de EROs bem como alta expressão da isoforma *RBOH* em células corticais da raiz de arroz submetidas a condições não aeradas. Além disso, por meio do uso de mutantes “knockout” do gene que codifica para *RBOH*, observaram-se menores níveis de EROs e menor taxa de crescimento de aerênquima em suas raízes (Yamauchi et al., 2017). O processo de MCP ocorre com a percepção de sinais endógenos (etileno e EROs) e exógenos (hipóxia ou ataques bióticos), conferindo à planta de arroz maior valor adaptativo. Entretanto, a formação de aerênquima pode ser respondente a outros eliciadores, como elementos nutricionais, por exemplo.

O silício é um elemento benéfico aos vegetais e, aparentemente, modula diversas respostas das plantas (Epstein, 2009; Heckman, 2013). Foram descritos carreadores e canais específicos do elemento em arroz: *Lsi1*, presente na membrana plasmática de células da exoderme e endoderme; *Lsi2*, um canal de influxo de silício dependente de gradiente de prótons, presente na zona proximal da exoderme e endoderme; e *Lsi6*, localizado na face adaxial do parênquima do xilema e responsável pelo aporte de silício do xilema para células do mesófilo foliar (Ma et al., 2011). Evidências sugerem que o silício medeia o aumento nos níveis de fitohormônios em resposta a patógenos, como ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno, conferindo resistência a diversas espécies vegetais (Fauteux et al., 2006; Van Bockhaven et al., 2012). O arroz, em especial, é um hiperacumulador de silício (até 10% de sua massa seca foliar é composta por silício) (Yamamoto et al., 2012). Esse elemento é encontrado depositado nas paredes celulares, o que foi atribuído a um papel mecânico do elemento em arroz (Jones e Handreck, 1967). Entretanto, foram obtidas evidências de que o silício tem papel como agente de

priming em plantas de arroz (Conrath et al., 2015; Hilker et al., 2016). Esse tipo de pré-resposta (*priming*), desencadeada pelo silício em plantas, vem sendo observada por diversos pesquisadores que utilizaram técnicas de análise de transcriptoma (Watanabe et al., 2004; Chain et al., 2009; Ghareeb et al., 2011), o que explicaria a necessidade de um segundo estímulo para que haja resposta fenotípica e, em alguns casos, sistêmica ao estresse ou elicitor (Conrath et al., 2015; Hilker et al., 2016). Além dessa modulação do sistema imune vegetal, o silício altera a produtividade em plantas de arroz, uma vez que aumenta o número de grãos por planta, a massa de mil grãos e o número de grãos por panícula em relação a plantas sem suplementação de silício (Detmann et al., 2012).

O silício também parece afetar a morfologia das raízes, incrementando a suberização das células da exoderme, contribuindo positivamente como uma barreira contra a perda radial de O₂ (Fleck et al., 2011). Além disso, em cortes longitudinais, foi observado maior diâmetro em raízes de plantas suplementadas por silício, especialmente no ponto de 2 cm a partir da coifa, devido a um incremento na área do cilindro radicular como um todo e não somente a aumento nos vasos condutores, pois a razão entre a área ocupada pelo feixe em relação à área total do cilindro da raiz manteve-se idêntica, independentemente a suplementação ou não com silício (Lavinsky, 2013). Ademais, verificou-se que o silício aumentou a suberização das células da endoderme e de células esclerenquimatosas, bem como contribuiu com maior lignificação da endoderme e exoderme, em paralelo. Também verificou-se que o silício aumentou atividade da enzima fenilalanina amônia liase; além disso, análises micromorfométricas indicaram aumento na porosidade das raízes de plantas tratadas com silício, via incremento da área da lacuna do aerênquima (Lavinsky, 2013). Sabendo que a MCP é o processo que contribui para a formação das lacunas do aerênquima em arroz, sugere-se, aqui, que, pelo menos em parte, os efeitos do silício sobre a morfologia radicular estariam associados com o aumento da síntese de etileno em plantas de arroz tratadas com silício.

Diante do exposto, a hipótese principal testada por este trabalho é de que o silício aumenta a proporção de aerênquima nas raízes de plantas de arroz por mediar um aumento na síntese de etileno. Esperou-se gerar evidências de um possível papel do silício no desenvolvimento das lacunas celulares do aerênquima e compreender o papel do silício na sinalização e estruturação da formação dessas lacunas em condições anaeróbicas, com objetivo de elucidar mecanismos pelos quais o silício alteraria a morfologia de raízes de arroz. Para tanto, cultivaram-se plantas de arroz com ou sem

silício, avaliando-se as áreas da raiz e do aerênquima, via espaços intercelulares no córtex das raízes, a expressão de genes relacionados com o metabolismo primário e respondentes ao etileno, bem como aspectos do metabolismo primário e do perfil hormonal de raízes de plantas de arroz da cultivar Oochikara. Adicionalmente, foram analisados possíveis efeitos do silício sobre a anatomia radicular e produção de etileno utilizando um mutante defectivo no gene *lsi1* (low silicion rice 1) (Ma et al., 2006).

Materiais e Métodos

Com a finalidade de buscar evidências acerca dos mecanismos de aumento da porosidade de raízes de arroz induzidas por silício, foram feitos quatro experimentos, utilizando plantas de 30 dias e plântulas de 10 dias de idade. Em todas análises foram utilizadas cinco repetições, contendo cinco replicatas (raízes de cinco plantas para análises bioquímicas e moleculares, e cinco raízes, de plantas diferentes, em análises anatômicas) distribuídos totalmente ao acaso. No Experimento 1, foram utilizadas plantas adultas para avaliação dos níveis de transcritos de diversos genes relacionados à resposta e à produção de etileno; biossíntese de lignina (e, logo, a formação de barreira contra perda radial de O₂); fermentação alcoólica; transportadores de silício e genes respondentes ao ABA. Em função dos resultados obtidos, foram utilizadas plântulas de 10 dias para novas análises, já que as lacunas do aerênquima podem ser características tanto constitutivas quanto induzíveis. Para tal, foram testados pontos de amostragem na raiz no Experimento 1, com a cultivar Oochikara e o mutante *lsi1*. Com a definição do ponto de amostragem, foram realizadas novas análises de parâmetros anatômicos dos genótipos selvagens e mutante no Experimento 2. Em seguida, no Experimento 3, foi realizada análise de expressão de genes citados anteriormente, quantificação de metabólitos, ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), etileno e outros fitormônios em raízes de plântulas, somente com o genótipo selvagem, tendo em vista que o mutante não apresentou as variações anatômicas de interesse (Experimento 2). Por fim, realizou-se o Experimento 4, utilizando inibidores da rota de biossíntese do fitormônio etileno, ácido aminoxiacético (AOA) ou adicionando-se CoCl₂ ao meio de cultura. Quando se utilizou AOA, foram analisados os níveis de etileno e a expressão de genes relacionados aos transportadores de silício e genes respondentes aos fitormônios ABA e etileno apenas no genótipo selvagem; com o uso do CoCl₂, foram quantificadas a área da raiz, a área relativa das lacunas do aerênquima e a produção de etileno nos dois genótipos, buscando-se avaliar potenciais diferenças anatômicas entre os genótipos mutante e selvagem.

Experimento 1

Obtenção de plantas para análises de biologia molecular

Sementes de arroz foram germinadas em papel germtest em câmara germinadora do tipo BOD, a 30°C, durante quatro dias, sob ausência de luz, transferindo-se as plantas para recipientes plásticos de volume de 5 L. As plantas foram cultivadas em

solução nutritiva, como descrito em Hoagland e Arnon (1950), e modificada como segue: 1,0 mmol L⁻¹ KNO₃; 0,25 mmol L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 0,1 mmol L⁻¹ NH₄Cl; 0,5 mmol L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1,0 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂; 0,30 µmol L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 0,33 µmol L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 11,5 µmol L⁻¹ H₃BO₃; 3,5 µmol L⁻¹ MnCl₂.4H₂O; 0,1 µmol L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 25 µmol L⁻¹ FeSO₄.7H₂O e 25 µmol L⁻¹ EDTA bisódico. As plantas foram divididas em dois grupos: com silício (+Si) ou sem silício (-Si). O silício foi disponibilizado na forma de ácido monossilícico (H₄SiO₄), na concentração de 2 mmol L⁻¹, obtido a partir da passagem de silicato de potássio através de uma coluna de troca catiônica (Amberlite IR120B, H⁺ form; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação com temperatura controlada (30/25 ± 2 °C, dia/noite) e luminosidade natural. O pH foi ajustado diariamente para 5,6. Aos 30 dias pós-germinação, foram coletadas as raízes dessas plantas e foi analisada a expressão de genes citados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Obtenção de plântulas para análise anatômica

A fim de avaliar-se a área de lacunas do aerênquima em arroz, sementes de arroz (cv. Oochikara do tipo selvagem e o mutante *lsi1*) foram germinadas como citado anteriormente. As plântulas foram transferidas para meio de cultura com solução nutritiva como citado acima, a ¼ da força. As plântulas foram cultivadas sob fotoperíodo de 16 h. As plântulas foram cultivadas sob aeração por sete dias e, então, divididas em dois grupos: com silício (2 mmol L⁻¹, +Si) ou sem silício (-Si), no meio de cultura. O pH foi ajustado diariamente para 5,6. A aeração foi interrompida e foi realizada aplicação do silício. As raízes foram coletadas no terceiro dia após adição de silício e suspensão da aeração. As amostras foram retiradas a 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 cm a partir do ápice da raiz. Cinco raízes de cada tratamento e ponto de secção foram amostradas e fixadas em solução FAA₅₀ (formalina: ácido acético glacial: etanol 50%. 5:5:90, v/v/v), por 48 h, e armazenadas em etanol 70%. As raízes foram incluídas em resina de metacrilato como descrito em Johansen (1940). Os cortes transversais foram preparados utilizando micrótomo rotatório, coradas com azul de toluidina 1%, e fotografadas utilizando-se de um microscópio óptico (Modelo AX70TRF, Olympus Optical, São Paulo, Brasil) acoplado a uma câmera digital (U-photo system). A área das lacunas do aerênquima foi medida utilizando-se o programa ImageJ (Ver. 1.43u, National Institute of Health, US). A média foi obtida e o teste *t* de Student foi aplicado a fim de compararem-se diferenças entre os tratamentos em relação às plantas-controle

($p \leq 0,05$), utilizando-se o programa de análise estatística SPSS versão 22 (IBM Software, Armonk, EUA).

Experimento 2

Análise anatômica de plântulas

Plântulas foram cultivadas sob as mesmas condições em que as utilizadas no Experimento 1. O ponto de amostragem, para análises anatômicas, das raízes foi definido no experimento um e serviu de padrão para todos experimentos futuros. Raízes de 2 cm de comprimento, medidas a partir do ápice radicular, foram coletadas e submersas em solução de FAA₅₀, por 48 horas, e estocadas em álcool 70%. As raízes foram seccionadas em cortes de 5 mm de comprimento, na altura de 1,5 cm, a partir do ápice da raiz, e foram emblocadas em metacrilato (historesina). Foram realizados cortes transversais de 5 μ m com auxílio de micrótomo rotativo. O material foi corado com azul de toluidina 1% e foram obtidos dados de área da raiz e porosidade, através de quantificação de área total de lacunas do aerênquima. Essas variáveis foram analisadas com o programa ImageJ e submetidas ao teste *t* de Student ($p \leq 0,05$).

Experimento 3

Produção de Etileno e quantificação de ACC e outros fitormônios

Os níveis de produção de etileno, ACC, ABA, ácido indol-3-acético (IAA), ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA) foram quantificados. Plântulas de arroz foram cultivadas conforme metodologia descrita anteriormente. Para quantificação de produção de etileno, três raízes foram armazenadas em frascos de 10 mL, com tampas selantes, acrescidos de 1 mL de água desionizada para evitar-se a desidratação dos tecidos. Logo, os frascos selados foram incubados em BOD, por 6 h, a 30°C. Foi coletada 1 mL da atmosfera do frasco com auxílio de seringa (Focus GC, Thermo Fisher Scientific, Waltham EUA), inserindo-se o volume em cromatógrafo a gás (modelo 5890, Series II, Hewlett-Packard, Palo Alto, EUA), equipado com coluna “stainless-steel” (1,0 m x 6,0 mm), embalada com malha Porapak-N 80-100. O etileno produzido foi quantificado pelo detector de ionização por chama e comparado a um padrão externo. O resultado foi expresso com base no peso fresco de três raízes de cada tratamento, utilizando-se de cinco repetições biológicas.

A análise de ACC e demais fitormônios foi realizado como descrita por Müller et al. (2011): 400 μ L de metanol:álcool isopropílico:ácido acético (20:79:1) foram adicionados a 110 mg de tecido macerado. As amostras foram analisadas com auxílio de

cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com ionização por “electrospray” / MS-MS de modelo Agilent 1200 (infinity series), do fabricante Agilent Technologies (Santa Clara, EUA), acoplado a espectrômetro de massa do tipo quadrupolo triplo (QqQ), modelo 6430 Agilent Technologies (Santa Clara, EUA). A separação cromatográfica foi realizada por uma coluna modelo Zorbax Eclipse Plus C18 (1,8 µm, 2,1 x 50 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), em série, com uma coluna de modelo Zorbax SB-C18, 1.8 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). Os solventes utilizados foram (A) ácido acético 0,02 % em água e (B) ácido acético 0,02 % em acetonitrila, em um gradiente A/B: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. A razão de fluxo do solvente foi de 0,3 mL/min em uma coluna a 30 °C de temperatura. A ionização eletrônica foi utilizada como método de ionização, usando as seguintes condições: corrente de carreamento corona de 5 µA, voltagem no capilar de 3500 V, vaporizador aquecido a 280 °C, razão de fluxo de nitrogênio a 7 L/min, fonte de 210 °C de calor e pressão de nebulizador a 32 psi. O equipamento foi operado no modo MRM (“Multiple reaction monitorin”). O precursor de passagem ion/fragmento estabelecido foi monitorado por testes de fragmentação de cada molécula: ACC (102, 1/56, 2); ABA (263/153); IAA (176/130), SA (137/93) e JA (209/59). ACC e IAA foram escaneados no modo positivo, e os demais fitormônios no modo negativo. Uma curva de calibração, utilizando padrões autênticos para cada molécula, foi gerada para permitir a quantificação absoluta dos hormônios citados. Os dados gerados foram analisados utilizando-se do programa computacional “Mass Hunter Workstation” para obterem-se as áreas dos picos para cada molécula. Os resultados foram expressos em ng/g de massa fresca da raiz.

Análise de metabólitos

A fim de quantificarem-se metabólitos primários em raízes de plântulas, cinco replicatas biológicas foram utilizadas. Foi adicionado 1 mL de metanol:água 3:1 (v:v) a 10 mg do tecido macerado, como descrito anteriormente (Giavalisco et al., 2011). Foram utilizados 100 µL da fase orgânica para derivação, como descrito em Roessner (2001). Foram analisadas amostras (1 µL) derivadas em um Combi-PAL “autosampler” (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Alemanha) acoplado a um cromatógrafo a gás Agilent 7890, acoplado a espectrômetro de massas do tipo “time-of-flight” Leco Pegasus 2 (LECO, St. Joseph, EUA), como descrito em Weckwerth et al. (2004). Os cromatogramas foram exportados do programa Leco ChromaTOF (versão 3.25) para o programa R. A detecção de picos e o alinhamento do tempo de retenção, de acordo com

as bibliotecas, foram realizados com o pacote do R Target Search (Cuadros-Inostroza et al., 2009). Os metabólitos foram quantificados pela intensidade do pico de massa selecionada. A intensidade dos metabólitos foi normalizada por ribitol e pela massa seca e, em seguida, os dados foram transformados em escala logarítmica. A significância da diferença entre os metabólitos das plantas +Si e o controle (-Si) foi analisada ($p \leq 0,05$).

Análise de biologia molecular

A expressão dos genes citados nas Tabelas 1, 2 e 3 foi avaliada utilizando-se RT-PCR. Os *primers* para todos os genes foram desenhados utilizando-se o programa PrimerQuest Tool (<https://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>). Sua estabilidade foi testada pelos programas Oligocalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) e OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), e especificidade pelo programa BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/blast>). O RNA total foi extraído das amostras vegetais, utilizando-se reagente TRIzol[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). A integridade do RNA foi avaliada por gel de agarose 1% (w/v) e a concentração foi medida utilizando o equipamento QIAxpert system (QIAgen, Hilden, Alemanha) antes e depois da digestão por DNase I (Aplication Grade DNase I, Invitrogen, Carlsbad, EUA), com auxílio de espectrofotômetro. A digestão com DNase I foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi transcrito em cDNA usando SuperScrip III Synthesis SuperMix para qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A programação do PCR foi realizada de acordo com as exigências do fabricante. Foi utilizado o PCR em tempo real Step One Plus TM Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, EUA) com detecção de reagente “SYBR green” fluorescente (Applied Biosystem, Foster City, EUA), utilizando Platinum SYBR Green qPCR super mix-UDG com ROX kit, de acordo com as exigências dos primers dos genes de interesse. A abundância de transcritos foi calculada a partir de uma curva-padrão de cada gene e normalizado utilizando o gene de expressão constitutiva de ubiquitina e histona H3 de arroz. A média de CT do gene-controle de referência foi usado para expressão relativa. Para normalização dos dados de expressão gênica, cada valor de CT foi subtraído pelo CT do gene de referência (ΔCT). Para obtenção do $\Delta\Delta CT$, ΔCT de interesse foi subtraído pelo ΔCT de controle e entre o de tratamento (+Si). Os resultados foram transformados em escala logarítmica e foram expressos em relação ao grupo-controle de cada experimento.

Experimento 4

Plântulas de arroz foram obtidas e cultivadas como descrito anteriormente e cultivadas em solução nutritiva com adição de silício (2 mmol L^{-1}), AOA ou CoCl_2 , na concentração de 100 mM e $2,5 \text{ }\mu\text{M}$, respectivamente. As plântulas continuaram nos meios de cultura até que diferenças visuais entre os tratamentos (com ou sem acréscimo de inibidores), já que a inibição do etileno provoca mudanças morfoanatômicas radiculares (Yang et al., 2015). Foram coletadas raízes para análise anatômica, para expressão de genes e de níveis de etileno, conforme descrito anteriormente.

Resultados

Experimento 1

No Experimento 1, foi avaliada a abundância de uma ampla variedade de transcritos em resposta ao silício, usando plataforma RT-PCR. Nas plantas +Si, foram observados aumentos na abundância de todos os transcritos de genes relacionados à biossíntese de etileno, incluindo o gene homólogo da *ACC sintase*, *ACC oxidase* e *Ethylene Overproducer (ETOL1) 1-like* e dois homólogos *ETOL* (*ETOL2* e *ETOL3*) (Figura 1). Também foi observado aumento na expressão de genes relacionados a respostas de aclimação à submergência em arroz, que são ativados por etileno, como: *Snorkell (SK1)* e o gene *SUBMERGENCE-1B (SUB1B)* e *SUBMERGENCE-1C (SUB1C)*. O silício não afetou a abundância dos genes relacionados ao seu transporte (*Lsi1* e *Lsi2*) e genes respondentes a ABA que codificam fatores de transcrição: *TRAB1*, *RAB 16* e *LEA3* (Figura 2). Além disso, a suplementação de silício incrementou a abundância de transcritos de genes associados com a fermentação alcoólica, tais como álcool desidrogenase 1 e 3 (*ADH1* e *ADH3*), piruvato descarboxilase (*PDC2*) e piruvato desidrogenase plástica (*pPDH*) (Figura 3). Adicionalmente, genes relacionados direta ou indiretamente com a biossíntese de lignina apresentaram maior expressão em resposta ao silício, tais como peroxidases de classe III (*POD4*, *POD5* e *POD6*), α,β -hidrolase (*HD*), diacilglicerol-O-aciltransferase (*AT*), fenilalanina amônia-liase (*PAL*), 4-cumarato-CoA ligase (*4CLL6*), glicerol-3-fosfato aciltransferase (*GPAT 4*) e Proteína transportadora de miristosil-acil tioesterase (*My*) (Figura 4). Por fim, houve diferença significativa nos níveis de transcritos dos genes glutationa transferase (*GST2*), que teve o nível de transcritos diminuído em relação ao das plantas-controle e do citocromo P450 (*Cyt*), que teve sua expressão aumentada (Figura 5), ambos os genes relacionados com a cadeia de transporte de elétrons.

O resultados acima descritos indicaram que o silício pode estar afetando a morfologia e a anatomia da raiz, com reflexos na abundância das lacunas do aerênquima, via modulação dos níveis de etileno. Uma vez que os dados supracitados foram obtidos com plantas de 30 dias de idade, procedeu-se com análises anatômicas usando-se plantas de aproximadamente 10 dias de idade, buscando-se avaliar os possíveis efeitos do silício nas fases iniciais de formação das lacunas do aerênquima. Foram avaliadas plantas selvagens (wt) e mutante *lsi1*. Não se observou qualquer diferença na arquitetura das raízes entre os genótipos mutante e selvagem, independentemente do silício. Em todo o caso, o silício promoveu aumentos de até 70%

na porosidade nas plantas wt, fato associado a incremento nas lacunas do aerênquima em toda extensão da raiz, à exceção da região a 0,5 cm do ápice radicular. Vale ressaltar que as lacunas do aerênquima do genótipo *lsi1* não foram afetadas pela suplementação de silício (Figuras 6, 7 e 8).

Experimento 2

Quando avaliados cortes transversais de raízes de plântulas de arroz supridas com silício (+Si) ou sem silício (-Si), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos +Si e -Si, e entre os genótipos wt e mutante *lsi1* com relação à área do corte da secção (Figura 9). Isso foi um resultado importante, pois demonstra padronização na amostragem anatômica, visto que diferenças na maturidade dos tecidos radiculares poderiam ser observadas ao longo do órgão, devido ao desenvolvimento dos tecidos e não exatamente em resposta ao tratamento aplicado, ou seja, raízes de áreas diferentes sugeririam estádios de desenvolvimento diferentes, e, assim, a porosidade seria mais uma função do estágio de desenvolvimento da raiz e não uma resposta direta à aplicação de silício. Registre-se que o silício acarretou aumento na área da lacuna do aerênquima (cerca de 65%), mas apenas no genótipo wt (Figura 10).

Experimento 3

Perfil metabólico e hormonal

Avaliou-se o perfil metabólico somente em plântulas de 10 dias do genótipo wt, uma vez que o silício não afetou significativamente a porosidade da raiz das plantas *lsi1*. Observou-se uma clara diferença nos níveis de aminoácidos e ácidos orgânicos, em resposta à adição de silício. O silício não afetou os níveis de açúcares (sacarose, frutose e glicose), mas diminuiu os níveis de ácidos orgânicos associados com o CAT e aumentou o teor de aminoácidos. Entretanto, foi observado um decréscimo significativo no “pool” de intermediários de CAT (succinato e malato), enquanto fumarato foi invariável. Os níveis de piruvato, ácido orgânico-chave associado com a via glicolítica, também permaneceram inalterados; por outro lado, lactato, composto-chave na via de respiração anaeróbica, teve seus níveis aumentados pelo silício, bem como moléculas sinalizadoras como as poliaminas putrescina e espermidina (Figuras 11 e 12). O silício não afetou os níveis de ácidos orgânicos como benzoato e 4-cumarato. Dos aminoácidos analisados, as concentrações de 17 (incluindo aminoácidos aromáticos como fenilalanina e triptofano) foram mais abundantes, enquanto as de alanina e glutamina

foram menos abundantes em plantas +Si do que nas -Si. As maiores diferenças nos níveis de aminoácidos foram encontradas para histidina, ornitina, metionina e asparagina, respectivamente. Arginina também teve maiores níveis nas plantas +Si. As concentrações de aspartato e tirosina não mudaram em resposta à suplementação de silício, e glutamina não foi detectada nas plantas +Si (Figura 13).

Foram analisadas as concentrações de alguns fitormônios em plântulas tratadas com silício. Notavelmente, plantas tratadas com silício tiveram menores níveis de ACC (83%), um precursor de etileno, e, em paralelo, maiores concentrações de etileno (181%), ácido salicílico (354%) e ácido jasmônico (2340%). As concentrações de ácido indol-3-acético (auxina) e ABA não foram afetadas pelo silício (Figura 14).

Expressão de genes

Assim como em plantas adultas +Si (Experimento 1), em plântulas +Si também observou-se aumento significativo da abundância de transcritos de genes associados à biossíntese de etileno, incluindo *ACS*, *ACO*, *ETOL1*, *ETOL2* e *ETOL3*; e de genes respondentes ao ABA (*RAB16* e *TRAB1*) (Figura 15). Respostas similares também foram observadas em genes associados com aclimação ao alagamento, como os genes *SUB1B* e *SK1*, em plântulas +Si (Figura 16). Não se observou um padrão na abundância de transcritos de genes associados à via da fermentação. Dois genes tiveram aumentos significativos nos níveis de seus transcritos: piruvato descarboxilase (*PDC1* e *PDC3*) e piruvato ortofosfato dicinase plastídica (*pPDK*). Dos genes associados com o CAT e/ou biossíntese de ácidos graxos, todos foram regulados positivamente, mas somente piruvato desidrogenase plastídica e mitocondrial (*pPDH* e *mPDH*) foram significativamente maiores nas plantas +Si, a saber: piruvato cinase plastídica, piruvato desidrogenase plastídica e piruvato ortofosfatase plastídica. Supreendentemente, apenas um dos genes analisados foi regulado negativamente pelo silício: o gene que codifica a enzima málica plastídica dependente de NADP (*pME*) mas, paralelamente, a expressão de sua versão citosólica (*cME*) foi aumentada, embora não significativamente (Figura 17).

Em relação aos genes relacionados à biossíntese de parede celular, constatou-se uma tendência de aumento em sua expressão em resposta ao silício, como foi o caso da abundância dos transcritos dos genes glicerol-3-fosfato aciltransferase (*GPAT2* e *GPAT4*), peroxidases: *POD3*, *POD4*, transportadores do tipo ABC (*ABC*, *ABC1* e *ABC3*) e genes que codificam enzimas como: *My*, *HD*, *KCS1* e *KCS2* e *PAL*,

significativamente maiores nas plantas +Si. Por fim, dentre os genes relacionados à cadeia transportadora de elétrons, apenas glutathione S-transferase 1 (*GST1*) teve sua abundância aumentada significativamente pelo silício (Figuras 18 e 19).

Experimento 4

Em experimento utilizando inibidores de vias da biossíntese de etileno, a concentração de etileno foi reduzida nas plantas -Si e tratadas com AOA quando comparadas à daquelas sem o inibidor. Nas plantas +Si, não se detectou produção de etileno quando o meio de cultura foi suprido com AOA (Figura 20). Além disso, tanto plantas +Si e -Si tiveram menor alongamento, fenótipo característico mediado por etileno, em raízes de plantas de arroz submetidas de submergência (dados não mostrados). Genes relacionados à resposta ao etileno (*ETOL1*, *ETOL2*, *ETOL3*, *ACO*, *ACS*, *SK1*, *SK2*, *SUB1B*, e *SUB1C*) foram expressos em plantas +Si não tratadas com AOA. Em contrapartida, esses genes não foram expressos em plantas +Si tratadas com AOA (Figura 21). Interessantemente, o CoCl_2 não diminuiu a produção de etileno nas plantas +Si, mas foi observada tendência de redução nas áreas das lacunas do aerênquima nas plantas tratadas com o inibidor (Figuras 22, 23 e 24).

Discussão

O presente trabalho apresenta evidências contundentes de que o silício atua modificando o padrão de expressão gênica de plantas de arroz, aumentando a formação de aerênquima em plantas wt +Si e, dessa forma, potencializando a capacidade intrínseca dessas plantas de aclimatarem-se ao alagamento. Tal modificação também é acompanhada por uma série de alterações metabólicas necessárias para possibilitar tanto a ocorrência da via de MCP quanto a manutenção da estrutura do aerênquima. Nesse contexto, evidenciou-se, neste trabalho, que o silício pode afetar as plantas em nível de transcritos, de metabólitos e de estruturas teciduais.

O aerênquima lisógeno é formado constitutivamente sob normoxia, entretanto sua formação pode ser induzível pelo fitormônio etileno (Shiono et al., 2008). Foram encontradas evidências de que plantas tratadas com silício tiveram aumento marcante nas concentrações de produção de etileno, em consonância com o aumento de expressão de genes relacionados à codificação de duas enzimas-chave: ACC sintase, a enzima responsável por converter S-adenosil metionina em ACC, e ACC oxidase, a enzima que converte ACC em etileno. Em contrapartida, plantas -Si apresentaram maiores níveis de ACC em suas raízes, em paralelo a menor produção de etileno, sugerindo que o consumo de ACC na via de produção de etileno é, de algum modo, limitada na ausência do silício. Outros genes respondentes ao fitormônio como *SUB1B*, *SUB1C*, *SK1*, *ETOL1*, *ETOL2* e *ETOL3* também tiveram maiores abundâncias de transcritos. Esta resposta foi relativamente rápida, apenas três dias após a aplicação de silício, corroborando com o tempo de amostragem após aplicação do silício ao meio de cultura, como observado em outros trabalhos (Rajhi et al., 2011; Yamauchi et al., 2011).

A maior capacidade de plantas tratadas com silício de aumentar a porosidade da raiz (em paralelo a aumentos na concentração de O₂) levaria a uma adaptação à condição de hipóxia sem diminuição da via glicolítica e de biossíntese de aminoácidos, por demandarem altas concentrações de ATP. Tal resposta foi observada em tubérculos de batata em diferentes profundidades nos tecidos do órgão, sendo que tecidos mais internos respondiam aos menores níveis de O₂, restringindo as vias citadas anteriormente (Geigenberger et al., 2000). Neste sentido, a análise do perfil metabólico evidenciou que o silício induziu uma extensa reprogramação no metabolismo central, com alterações claras nos níveis de uma ampla variedade de amino ácidos e ácidos orgânicos nas raízes de arroz. Nas plantas +Si, a via glicolítica foi induzida, a julgar-se

pelos níveis invariáveis de piruvato correlacionados com aumentos substanciais no “pool” de aminoácidos derivados de intermediários da glicólise (glicina, serina, fenilalanina, triptofano) ou piruvato (valina, leucina, isoleucina, treonina) (Figura 13). Além disso, plantas tratadas com silício apresentaram maiores níveis de lactato, sugerindo um aumento em vias de fermentação em paralelo com regulação positiva de genes que codificam enzimas relacionadas a vias anaeróbicas (Figura 12). É lícito sugerir-se que condições de hipóxia sejam responsáveis por aumentos nas vias de fermentação. Entretanto, esse aumento poderia ser causado por uma maior demanda energética para processos aparentemente desencadeados pelo silício, como biossíntese de componentes da parede celular e/ou processos de MCP. Registre-se, entretanto, que a maioria dos intermediários do CAT tiveram seus níveis reduzidos nas plantas +Si; essa resposta, todavia, foi associada a um incremento de alguns amino ácidos derivados de CAT (por exemplo, glutamato, prolina, histidina, asparagina, lisina e metionina). Sugere-se, pois, que tal aumento poderia estar associado a uma maior demanda energética para processos que o silício tenha desencadeado, como biossíntese de componentes da parede celular e/ou processos de MCP, ambos energeticamente custosos para a planta (Elmore, 2007; Van Hautegeem et al., 2015). Destaca-se, também, o provável desvio de intermediários do CAT para a biossíntese de alguns aminoácidos, como glutamato, prolina, histidina, asparagina, lisina e metionina.

Nas plantas -Si, sob condições de hipóxia, foram observados maiores níveis de GABA, succinato e alanina, indicando o desvio para biossíntese de GABA. A biossíntese de GABA está correlacionada negativamente com os níveis de carboidratos de cadeia pequena, metabolismo de lipídeos, síntese de ATP via cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, desenvolvimento de tecidos, entre outros fatores (Fait et al., 2008). Assim sendo, menores níveis de GABA parecem sugerir aumento de vias glicolíticas e desenvolvimento radicular observados nas plantas +Si.

É possível que o CAT esteja com maior atividade nas plantas +Si não somente para suportar o aumento da produção de aminoácidos mas também por que outras rotas biossintéticas necessitariam de outros intermediários-chave do CAT, como o malato, que é substrato para biossíntese de ácidos graxos que, por sua vez, são precursores de formação de suberina (Voeseinek e Bailey-serres, 2015). Neste sentido, outras alterações metabólicas-chave, como aumento na concentração da β -alanina, que está envolvida na biossíntese de acetil-CoA, que, por sua vez, é um cofator essencial tanto no

metabolismo primário quanto no metabolismo secundário em vias dos fenilpropanóides (Broeckling et al., 2008). Também foi observado aumento nas concentrações de amino ácidos aromáticos, que podem ser precursores do ácido hidroxicinâmico e ligninas (Dixon, 2001). Tais regulações parecem ser parte de uma alteração orquestrada para suportar mudanças morfológicas nas raízes causadas pelo silício. Por fim, aumentos em metionina, que é um precursor-chave para biossíntese de S-adenosil-L-metionina (molécula precursora de etileno e poliaminas) é consistente com o aumento de etileno e poliaminas nas plantas +Si.

A capacidade de o silício alterar a anatomia de tecidos radiculares, como a extensão das lacunas do aerênquima, tem sido observada em diversos trabalhos (Fleck et al., 2011; Zhang et al., 2013; Guo et al., 2016). Em concordância com os resultados apresentados, principalmente em nível de transcritos de genes como *PAL*, *HD* e *AT* relacionados com a via de biossíntese de parede celular e lignificação, foi observado aumento na lignificação e suberização de raízes de arroz tratadas com silício, de modo a reduzir a perda radial de O₂ pelos tecidos radiculares sob condição de alagamento (Fleck et al., 2015). Ademais, conforme aqui evidenciado, a suplementação com silício permitiria sustentar maiores níveis de O₂ para a respiração oxidativa e, com isso, aumentaria a respiração no órgão vegetal, favorecendo o desenvolvimento da planta em condições de alagamento.

Conclusão

O presente trabalho demonstra um novo papel do silício como eliciador na formação do aerênquima, aumentando a porosidade da raiz, por intermédio do hormônio vegetal etileno, como evidenciado por análises anatômicas, de quantificação da produção do fitormônio e de transcritos relacionados com altos níveis de etileno. Além disso, mostrou-se aqui novas evidências de que o silício modulou metabólitos primários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e de rotas de fermentação. O presente estudo também ilustra a importância dos transportadores de silício, em especial *lsi1*, já que mutantes defectivos não apresentaram quaisquer respostas ao silício. Dessa forma, o silício aparece novamente como importante fator na aclimação de plantas de arroz, em relação ao alagamento, já que aumentou a área das lacunas do aerênquimas em plantas suplementadas com o nutriente e, por consequência, possibilitou o aumento da aeração nos tecidos radiculares, garantindo a continuidade de processos vitais no órgão vegetal.

Referências

- Armstrong W, Drew MC** (2002) Root growth and metabolism under oxygen deficiency. *Plant Roots: The Hidden Half*, 729–761
- Bologa KL, Fernie AR, Leisse A, Loureiro ME, Geigenberger P** (2003) A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiol* **132**: 2058–2072
- Broeckling CD, Broz AK, Bergelson J, Manter DK, Vivanco JM** (2008) Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Appl Environ Microbiol* **74**: 738–744
- Catling D** (1992) *Rice in deep water*. London. MacMillan Press.
- Chain F, Côté-Beaulieu C, Belzile F, Menzies JG, Bélanger RR, Cote-Beaulieu C, Belzile F, Menzies JG, Belanger RR** (2009) A comprehensive transcriptomic analysis of the effect of silicon on wheat plants under control and pathogen stress conditions. *Mol Plant-Microbe Interact* **22**: 1323–1330
- Colmer TD, Voesenek LACJ** (2009) Flooding tolerance: Suites of plant traits in variable environments. *Funct Plant Biol* **36**: 665–681
- Conrath U, Beckers GJM, Langenbach CJG, Jaskiewicz MR** (2015) Priming for enhanced defense. *Annu Rev Phytopathol* **53**: 97–119
- Cuadros-Inostroza A, Caldana C, Redestig H, Kusano M, Lisec J, Peña-Cortés H, Willmitzer L, Hannah MA** (2009) A bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics* **10**: 1–12
- Detmann KC, Araújo WL, Martins SCV, Sanglard LMVP, Reis JV, Detmann E, Rodrigues FÁ, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Damatta FM** (2012) Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice. *New Phytol* **196**: 752–762
- Dixon RA** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843–847
- Drew MC, He CJ, Morgan PW** (2000) Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci* **5**: 123–127
- Elmore S** (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**: 495–516
- Epstein E** (2009) Silicon : its manifold roles in plants. *Ann Appl Biol* **155**: 155-160
- Evans DE** (2003) Aerenchyma formation. *New Phytol* **161**: 35–49
- Fait A, Fromm H, Walter D, Galili G, Fernie AR** (2008) Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends Plant Sci* **13**: 14–19
- Fauteux F, Chain F, Menzies JG, Bélanger RR** (2006) The protective role of silicon in the Arabidopsis – powdery mildew pathosystem. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 17554–17559
- Fleck AT, Nye T, Repenning C, Stahl F, Zahn M, Schenk MK** (2011) Silicon enhances suberization and lignification in roots of rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot* **62**: 2001–2011

- Fleck AT, Schulze S, Hinrichs M, Specht A, Waßmann F, Schreiber L, Schenk MK** (2015) Silicon promotes exodermal casparian band formation in Si-accumulating and Si-excluding species by forming phenol complexes. *PLoS One* **10**: 1-18
- Fomicheva AS, Tuzhikov AI, Beloshistov RE, Trusova S V, Galiullina RA, Mochalova L V, Chichkova N V, Vartapetian AB** (2012) Programmed cell death in plants. *Biochemistry* **77**: 1452–64
- Geigenberger P, Fernie AR, Gibon Y, Christ M, Stitt M** (2000) Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol Chem* **381**: 723–740
- Ghareeb H, Bozsó Z, Ott PG, Repenning C, Stahl F, Wydra K** (2011) Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates priming effect. *Physiol Mol Plant Pathol* **75**: 83–89
- Giavalisco P, Li Y, Matthes A, Eckhardt A, Hubberten HM, Hesse H, Segu S, Hummel J, Köhl K, Willmitzer L** (2011) Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using ¹³C, ¹⁵N and ³⁴S isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry. *Plant J* **68**: 364–376
- Greenberg JT** (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 12094–12097.
- Guo B, Liu C, Ding N, Fu Q, Lin Y, Li H, Li N** (2016) Silicon alleviates cadmium toxicity in two cypress varieties by strengthening the exodermis tissues and stimulating phenolic exudation of roots. *J Plant Growth Regul* **35**: 420–429
- He CJ, Morgan PW, Drew MC** (1992) Enhanced sensitivity to ethylene in nitrogen- or phosphate-starved roots of *Zea mays* L. during aerenchyma formation. *Plant Physiol* **98**: 137–142
- Heckman BJ** (2013) Silicon: A beneficial substance. *Better Crop* **97**: 14–16
- Hilker M, Schwachtje J, Baier M, Balazadeh S, Isabel B, Geiselhardt S, Hinch DK, Kunze R, Mueller-roeber B, Rillig MC, et al** (2016) Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biol Rev* **49**: 1118–1133
- Johansen DA** (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York, NY, USA.
- Jones LHP, Handreck, KA** (1967) Silica in soils, plants and animals. *Adv Agron*, **19**: 107-149
- Justin SHFW, Armstrong W** (1991) Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol* **118**: 49–62
- Kreuzwieser J, Rennenberg H** (2014) Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress. *Plant Cell Environ* **37**: 2245–2259
- Lavinsky AO** (2013) Efeito do silício na anatomia radicular e na produção de grãos de arroz. Tese de doutorado. UFV. Brasil

- Limami AM, Glévarec G, Ricoult C, Cliquet JB, Planchet E** (2008) Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. *J Exp Bot* **59**: 2325–2335
- Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, Yano M** (2006) A silicon transporter in rice. *Nature* **440**: 688–691
- Ma JF, Yamaji N, Mitani-Ueno N** (2011) Transport of silicon from roots to panicles in plants. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **87**: 377–385
- Mehta ML** (2004) Preface to the third edition. *Pure Appl Math* **142**: 729–761
- Müller M, Munné-Bosch S** (2011) Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* **7**: 1–11
- Nishiuchi S, Yamauchi T, Takahashi H, Kotula L, Nakazono M** (2012) Mechanisms for coping with submergence and waterlogging in rice. *Rice (N Y)* **5**: 1–2
- Pennell R, Lamb C** (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* **9**: 1157–1168
- Rajhi I, Yamauchi T, Takahashi H, Nishiuchi S, Shiono K, Watanabe R, Mliki A, Nagamura Y, Tsutsumi N, Nishizawa NK, et al** (2011) Identification of genes expressed in maize root cortical cells during lysigenous aerenchyma formation using laser microdissection and microarray analyses. *New Phytol* **190**: 351–68
- Rocha M, Licausi F, Araújo WL, Nunes-Nesi A, Sodek L, Fernie AR, van Dongen JT** (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **152**: 1501–1513
- Roessner U** (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell Online* **13**: 11–29
- Setter TL, Waters I** (2003) Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats. *Plant Soil* **253**: 1–34
- Shiono K, Takahashi H, Colmer TD, Nakazono M** (2008) Role of ethylene in acclimations to promote oxygen transport in roots of plants in waterlogged soils. *Plant Sci* **175**: 52–58
- Torres MA, Dangl JL** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 397–403
- Van Bockhaven J, De Vleeschauwer D, Höfte M** (2012) Towards establishing broad-spectrum disease resistance in methylation and chromatin p. *J Exp Bot* **63**: 695–709
- Van Hautegeem T, Waters AJ, Goodrich J, Nowack MK** (2015) Only in dying, life: Programmed cell death during plant development. *Trends Plant Sci* **20**: 102–113
- Voesenek ACJL, Bailey-serres J** (2015) Flood adaptive traits and processes: An overview. *New Phytol* **206** 57–73
- Voesenek ACJL, Bailey-Serres J** (2009) Plant biology: Genetics of high-rise rice. *Nature* **460**: 959–960

- Watanabe H, Saigusa M, Hase S, Hayakawa T, Satoh S** (2004) Cloning of a cDNA encoding an ETR2-like protein (Os-ERL1) from deep water rice (*Oryza sativa* L.) and increase in its mRNA level by submergence, ethylene, and gibberellin treatments. *J Exp Bot* **55**: 1145–1148
- Weckwerth W, Wenzel K, Fiehn O** (2004) Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics* **4**: 78–83
- Woolston C** (2014) Rice. *Nature* **514**: S49–S50
- Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ** (2006) Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* **442**: 705–708
- Xue T, Li X, Zhu W, Wu C, Yang G, Zheng C** (2009) Cotton metallothionein GhMT3a , a reactive oxygen species scavenger , increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. **60**: 339–349
- Yamamoto T, Nakamura A, Iwai H, Ishii T, Ma JF, Yokoyama R, Nishitani K, Satoh S, Furukawa J** (2012) Effect of silicon deficiency on secondary cell wall synthesis in rice leaf. *J Plant Res* **125**: 771–779
- Yamauchi T, Rajhi I, Nakazono M** (2011) Lysigenous aerenchyma formation in maize root is confined to cortical cells by regulation of genes related to generation and scavenging of reactive oxygen species. *Plant Signal Behav* **6**: 759–761
- Yamauchi T, Yoshioka M, Fukazawa A, Mori H, Nishizawa NK, Tsutsumi N, Yoshioka H, Nakazono M** (2017) An NADPH oxidase RBOH Functions in rice roots during lysigenous aerenchyma formation under oxygen-deficient conditions. *Plant Cell*.
- Yang C, Lu X, Ma B, Chen SY, Zhang JS** (2015) Ethylene signaling in rice and arabidopsis: Conserved and diverged aspects. *Mol Plant* **8**: 495–505
- Yang CY** (2014) Hydrogen peroxide controls transcriptional responses of ERF73/HRE1 and ADH1 via modulation of ethylene signaling during hypoxic stress. *Planta* **239**: 877–885
- Zhang Q, Yan C, Liu J, Lu H, Wang W, Du J, Duan H** (2013) Silicon alleviates cadmium toxicity in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. seedlings in relation to root anatomy and radial oxygen loss. *Mar Pollut Bull* **76**: 187–193
- Zhang X, Zhou G, Shabala S, Koutoulis A** (2016) Identification of aerenchyma formation - related QTL in barley that can be effective in breeding for waterlogging tolerance. *Theor Appl Genet* **129**: 1167–1177

Tabelas

Tabela 1. Lista de genes analisados com seus respectivos códigos de acesso.

Gene	Acesso	Nome do gene
<i>4CLL6</i>	LOC_Os01g67540	4-coumarate-CoA ligase
<i>4CLL8</i>	LOC_Os07g44560	4-coumarate-CoA ligase
<i>ABC</i>	Os01g0342700	ABC Transporter
<i>ABC1</i>	LOC_Os01g24010	PDR5 like ABC transporter
<i>ABC2</i>	LOC_Os01g42410	PDR5 like ABC transporter
<i>ABC3</i>	LOC_Os01g24010.1	ABC-2-type transporter family protein
<i>ACC</i>	LOC_Os04g48850.1	Homolog ACC synthase
<i>ACO</i>	LOC_Os09g27820	ACC oxidase
<i>ADH1</i>	LOC_11g10480.1	Alcohol dehydrogenase 1
<i>ADH2</i>	LOC_Os11g10510	Alcohol dehydrogenase 2
<i>ADH3</i>	Os11g0210300	Alcohol dehydrogenase 3
<i>ADH4</i>	Os11g0210500	Alcohol dehydrogenase 4
<i>APX1</i>	LOC_Os03g17690	Ascorbate peroxidase 1
<i>AT</i>	LOC_Os06g22080	Diacylglycerol O acyltransferase
<i>cME</i>	LOC_Os01g52500.1	Cytosolic NADP-malic enzyme
<i>cPDK</i>	LOC_Os03g31750	Cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase
<i>Cyt</i>	LOC-Os03g55240.1	Cytochrome P450
<i>ETOL 1</i>	LOC_Os03g18360	Ethylene overproducer 1
<i>ETOL 2</i>	LOC_Os07g08120	Ethylene overproducer 2
<i>ETOL 3</i>	LOC_Os11g37520	Ethylene overproducer 3
<i>G3PDH</i>	LOC_Os08g03290	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Tabela 2. Lista de genes analisados com seus respectivos códigos de acesso.

Gene	Acesso	Nome do gene
<i>GPAT1</i>	LOC_Os05g38350.1	Glycerol-3-phosphate acyl transferase 1
<i>GPAT2</i>	LOC_Os01g21560.1	Glycerol-3-phosphate acyl transferase 2
<i>GPAT3</i>	LOC_Os05g20100	Glycerol-3-phosphate acyl transferase 3
<i>GPAT4</i>	Os09g0132900	Glycerol-3-phosphate acyl transferase 4
<i>GST1</i>	LOC-Os10g38470.1	Glutathione transferase 1
<i>GST2</i>	LOC-Os10g38360.1	Glutathione transferase 2
<i>HD</i>	LOC_Os06g16350.1	α,β -hydrolase
<i>KCS1</i>	LOC_Os03g12030.1	β -ketoacyl-coa synthase 1
<i>KCS2</i>	Os10g0158100	β -ketoacyl-coa synthase 2
<i>LEA3</i>	LOC_Os05g46480	OsLEA3rtF
<i>Lsi 1</i>	LOC_ Os02g0745100	Aquaporin NIP2-1
<i>Lsi 2</i>	LOC_Os03g0107300	Aquaporin NIP2-2
<i>Lsi 6</i>	LOC_ Os06g0228200	Aquaporin NIP2-6
<i>mPDH</i>	LOC_Os09g33500	Mitochondrial pyruvate dehydrogenase
<i>My</i>	LOC_Os06g39520	Myristosyl-acyl carrier protein thioesterase
<i>NADP ME</i>	LOC_Os01g09320	Plastidic NADP-malic enzyme
<i>PAL</i>	LOC_Os02g41680.1	Phenylalanine ammonia-lyase
<i>PDC1</i>	LOC_Os05g39310	Pyruvate decarboxylase 1
<i>PDC2</i>	Os05g0469800	Pyruvate decarboxylase 2
<i>PDC3</i>	Os05g0469800	Pyruvate decarboxylase 3
<i>PDC4</i>	Os05g0471100	Pyruvate decarboxylase 4
<i>PDC5</i>	Os07g0693100	Pyruvate decarboxylase 5

Tabela 3. Lista de genes analisados com seus respectivos códigos de acesso.

Gene	Acesso	Nome do gene
<i>PEPC1</i>	Os02g0244850	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1
<i>PEPC2</i>	Os08g0366000	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2
<i>pGDT</i>	LOC_Os09g29430.1	Plastidic general dicarboxylate transporter
<i>POD1</i>	Os06g0274800	Peroxidase
<i>POD2</i>	LOC_Os01g22230	Class III peroxidase 2
<i>POD3</i>	LOC_Os06g16350	Class III peroxidase 3
<i>POD4</i>	LOC_Os06g32990	Class III peroxidase 4
<i>POD5</i>	LOC_Os09g32964	Class III peroxidase 5
<i>POD6</i>	LOC_Os09g32964	Class III peroxidase 6
<i>pME</i>	Os01g0188400	NADP-dependent malic enzyme, chloroplast precursor
<i>pPDH</i>	LOC_Os04g02900	Plastidic pyruvate dehydrogenase
<i>pPDK</i>	LOC_Os05g33570	Plastidic pyruvate othophosphate dikinase
<i>pPK</i>	LOC_Os07g0181000	Plastidic pyruvate kinase
<i>RAB16</i>	LOC_Os11g26790	RAB16ArtF
<i>SK1</i>	AB510478	Snorkel 1
<i>SK2</i>	AB510479	Snorkel 2
<i>SUB1B</i>	LOC_09g11480	Submergence 1B
<i>SUB1C</i>	LOC_09g11460	Submergence1C
<i>SUS1</i>	LOC_Os03g28330	Sucrose synthase
<i>TRAB</i>	LOC Os08g43230	OsTRAB1rtF

Tabela 4. Lista de primers de transcritos de genes analisados para plataforma RT-PCR.

Gene	Foward (5' 3')	Reverse (5' 3')
<i>4CLL6</i>	TGAGGCAACCGGGTGCATACCTTA	AAGCCACACGGCGCACTTTCTT
<i>4CLL8</i>	TGCAGCACAACGACAACGGCAT	GCTGCAACAGCGACGAACGTCATA
<i>ABC1</i>	CCTTGCTACAGCCGGCACCT	ACATGTTTCGCGGGCACCCTG
<i>ABC2</i>	GGACGCATTGAAAGAGAAGC	TTGGTCAGCAATATGGGACA
<i>ABC3</i>	ATCATCTAATGAGGCACGGC	TCATTGTCTGGCTGCAGAAC
<i>ACC</i>	CTGCTAATGCTGCGCCTTACT	CGACGATGCGATCGAGAAA
<i>ACO</i>	GGATGATGCTTGCGAGAACTG	TCCATCAGCTCCGTCGAGAT
<i>ADH1</i>	GCAAATTTCTGGCTTTGTCAATCAGTA	CGCCAAAAGATCACTGATTCTTAACAA
<i>ADH2</i>	CCCTCCTTTCATGGCTTGATCTT	AGGGTAAAACTGGTGAAAATCTGCTA
<i>APX1</i>	GTTCGGGACGATGAAGACC	AGCTGGTAGAAATCGGCGTA
<i>AT</i>	GATCGCCAGGAACGTCGCCC	TGCCCTGTTGGGATCGAAGCAC
<i>cME</i>	GCTGCATGTACAGCCCACT	CATCAGAATTACAGCGTGCAG
<i>cPDK</i>	CACCACACTTCACCAGCTTC	AAGTGCAGTGAGGCACTGAG
<i>Cyt</i>	GCTAGCAATCGCTCTTTGAGA	GAAATTGAAATACCTGGCGTGT
<i>ETOL 1</i>	GCTGTTCTGATGGACGAAAGC	AGGTCTGCCCTGAAAGCTATTG
<i>ETOL 2</i>	AGTACTGATGGATAGTCACAAGGAGAAA	AATAGGTGGAGGTCAGCTTTGAAT
<i>ETOL 3</i>	CGTGCACAAGACTTCTAAGGAAAG	CGGTAAAGGCGGCATTGA
<i>GAPC1</i>	AGAATAAAACGTGGACGGTGTTCA	TGCAACTCATTATCCCAACTAGCATT
<i>GPAT1</i>	CATTCGAGCTGACAGAGCAG	TTTACAAGAAGTTTCGCACACAA
<i>GPAT2</i>	GAGGTGACCTTCCTCAACCA	TGGCCACGAAAGTATTGTGA
<i>GPAT3</i>	GCGACGGAGCTGTTGGGCTT	GGCACC GGCTGCCATTTCCTT
<i>GST1</i>	CAGCGCACAAGTGATTGACT	CTGGACACGTAACGTACACGA
<i>GST2</i>	GCTGCCACCAACTGAAGATA	CCACCCCTTCATTCAACATT
<i>HD</i>	AATTCATGGCGGATTCAAAG	TTTTGGCATTCAATTCATGG

Tabela 5. Lista de primers de transcritos de genes analisados para plataforma RT-PCR.

Gene	Foward (5' 3')	Reverse (5' 3')
<i>KCS1</i>	GACGAGCTGCAGAAGAACCT	CGATCACAGCTTGACGACCT
<i>LEA3</i>	GGTGATGTGTACTGATGATGTT	ACAAATGCGGGCTTTAGG
<i>Lsi 1</i>	CGGTGGATGTCATCGGAACCA	CGTCGAACTTGTTGCTCGCCA
<i>Lsi 2</i>	ATCTGGGACTTCATGGCCC	ACGTTTGATGCGAGGTTCC
<i>Lsi 6</i>	GAGTTCGACAAACGTCTAATCGC	AGTACACGGTACATGTATACACG
<i>mPDH</i>	GAAGCGAGCCTGCTACAGAG	GCCATTGGGAAGAAGACAAG
<i>My</i>	TGTGAAGAGCGCTGGGCTGCTA	TCACCCCAGCACGGATAACGCT
<i>NADP ME</i>	CTGGAGAAATACGCAGAGAGC	CCCCTACTGCATTGGTAGGT
<i>PALL</i>	TCACAAGCTCAAGCACCATC	CTCACCAAGCTTCTTGGCAT
<i>PDC1</i>	ATCCTATGATAATGTATGTAATTCAAATG	CTCTTCTCCTTCAAATCGTCCATGT
<i>PDC2</i>	CGGGTACGAGTTCCAGATG	AGAAGCTCTTTGCTCGTGTC
<i>pGDT</i>	TGGAACCTTCTGGTGGAAAC	GCTCCAATGGAAAACCTTTGG
<i>POD2</i>	CGGCCGTTGGATGCGAGTGATTT	GATCGACACGACACGACGACACT
<i>POD3</i>	CAGCGCCATGGACAGCCACA	ACGGTGTCGGCCGTGGAGTA
<i>POD4</i>	CGGCGAGCTTGTGCTGACCT	GAGTCCAAGGGTCCGGGCGT
<i>POD5</i>	TCCTGAATTGCCCCGCCTTAGCTCT	TCACAAAGACGCGGCCACGAAA
<i>pPDH</i>	GGAAGTACCGGTGTGAGGAT	TGATAAGCGTGCTCGTTGAG
<i>pPDK</i>	CTCCAGCTTCGTTGGAATC	ATCGATCTCCCCTCCAATC
<i>pPK</i>	TGCAGTCCATCCAGGTCAT	TTGGGCAGAACAAACAAACA
<i>RAB21</i>	TCGTCTGAGGATGATGGAAT	TTCTCCTTGATCTTCTCCTTGAT
<i>SK1</i>	ACGGTATCCCTGAACTACTG	TCGTAGCGACAGCCGTACTG
<i>SK2</i>	CACTGGAGGCAACGAATG	TAAAAGGACCAGAGGCAGC
<i>SUB1B</i>	TTTCCATGTTCCCTTCTGGTG	GCTGCTAATTAACCATTTCCAAAAC
<i>SUB1C</i>	CGTGGTAGTGACAAGTGCGTC	CGTTTATGTTGTCCTGAATCTGC
<i>SUS1</i>	GTTGGTTCAAAGCCATGGATGA	GGGCCTACTATCACAACCTTTAAAGG
<i>TRAB</i>	TCGTCTGAGGATGATGGAAT	TTCTCCTTGATCTTCTCCTTGAT

Figuras

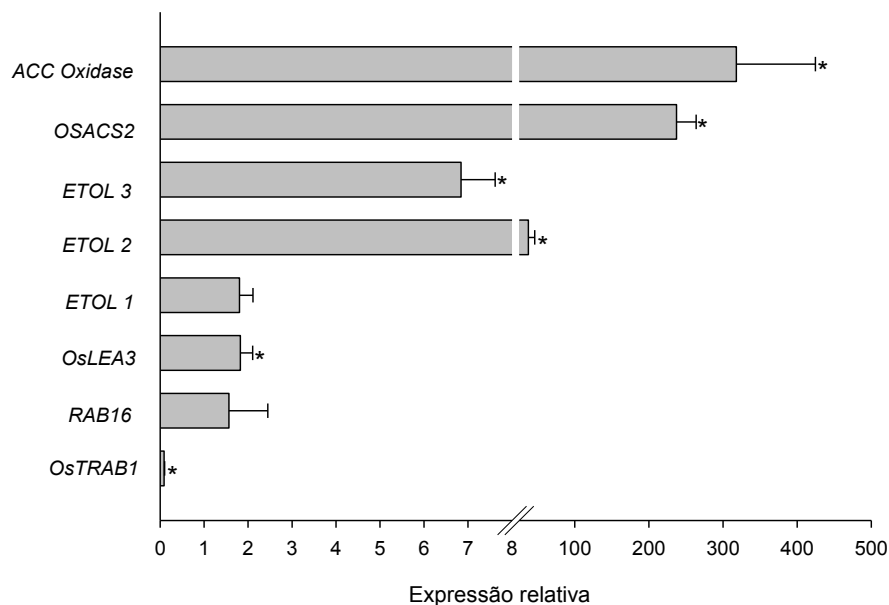


Figura 1. Nível de transcritos de genes relacionados com a biossíntese de etileno e resposta ao ABA. Valores relativos ao grupo controle (-Si) em experimento realizado com plantas de 30 dias de idade. Asteriscos indicam diferenças significativas entre plantas +Si e -Si ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

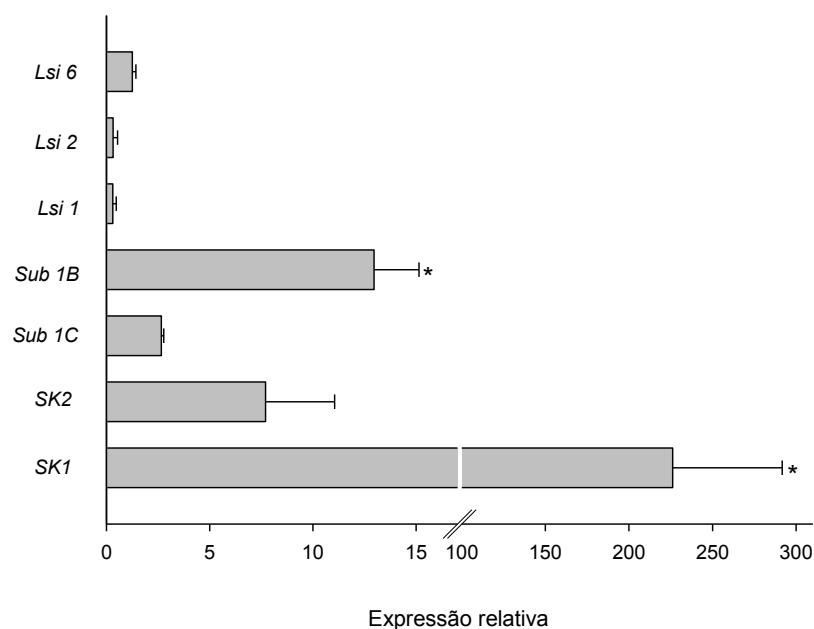


Figura 2. Nível de transcritos de genes relacionados com transportadores de silício e escape e/ou tolerância ao alagamento. Valores relativos ao grupo controle (-Si) em experimento realizado com plantas de 30 dias de idade. Asteriscos indicam diferenças significativas entre plantas +Si e -Si ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

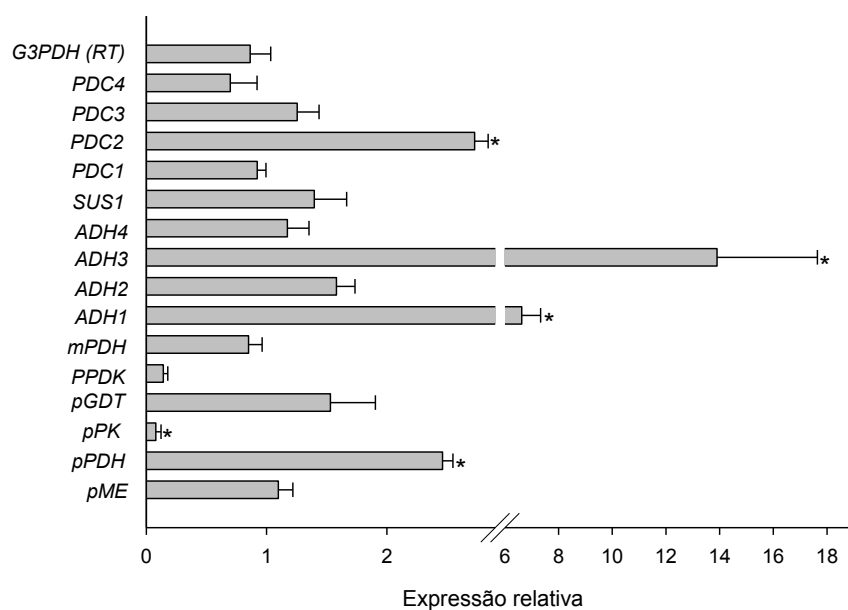


Figura 3. Nível de transcritos de genes relacionados com o metabolismo aeróbio, anaeróbio, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e biossíntese de ácidos gráxos. Valores relativos ao grupo controle (-Si) em experimento realizado contendo plantas de 30 dias de idade. Asteriscos indicam diferenças significativas entre plantas +Si e -Si ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

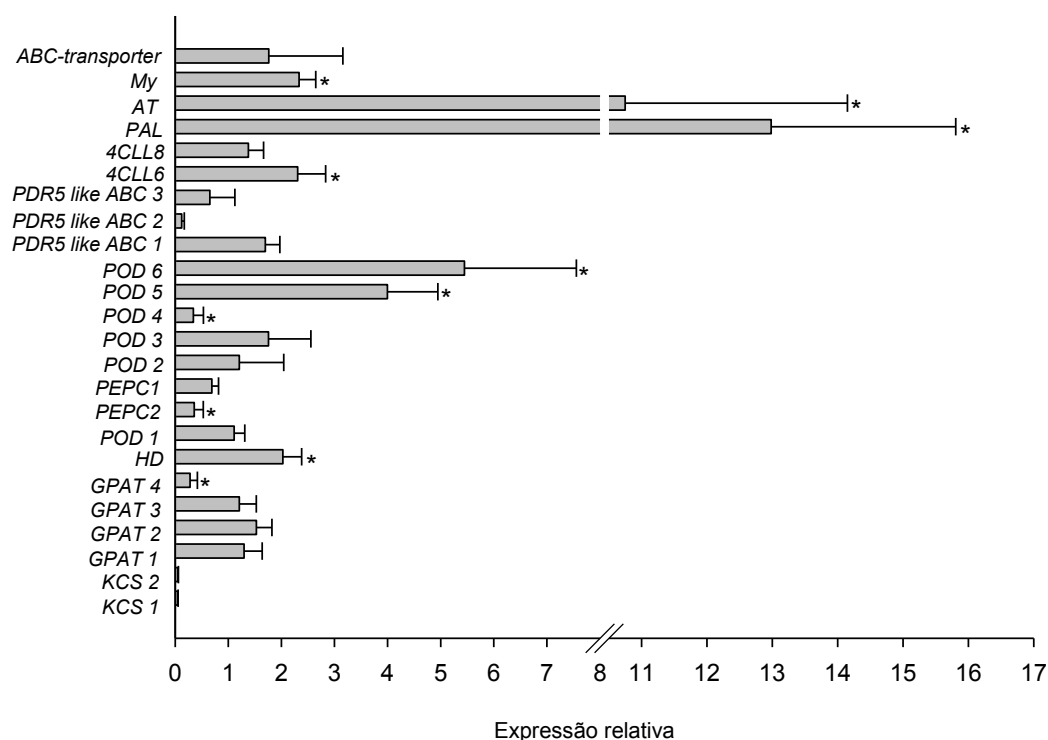


Figura 4. Nível de transcritos de genes relacionados com a biossíntese de parede celular. Valores relativos ao grupo controle (-Si) em experimento realizado com plantas de 30 dias de idade. Asteriscos indicam diferenças significativas entre plantas +Si e -Si ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

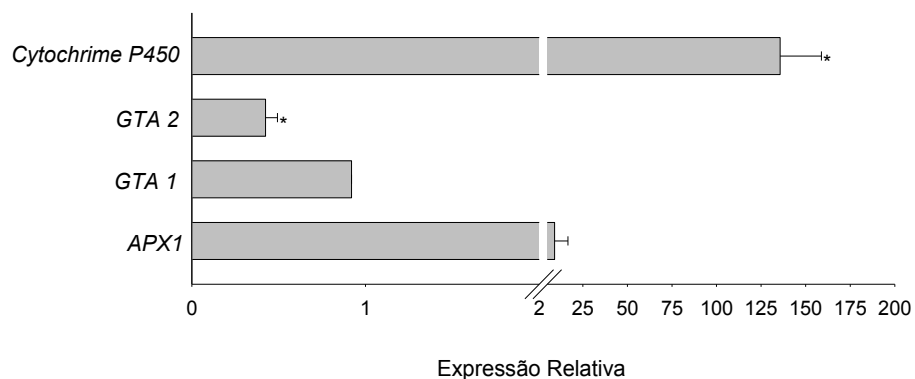


Figura 5. Nível de transcritos de genes relacionados com a cadeia transportadora de elétrons. Valores relativos ao grupo controle (-Si) em experimento realizado com plantas de 30 dias de idade. Asteriscos indicam diferenças significativas entre plantas +Si e -Si ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

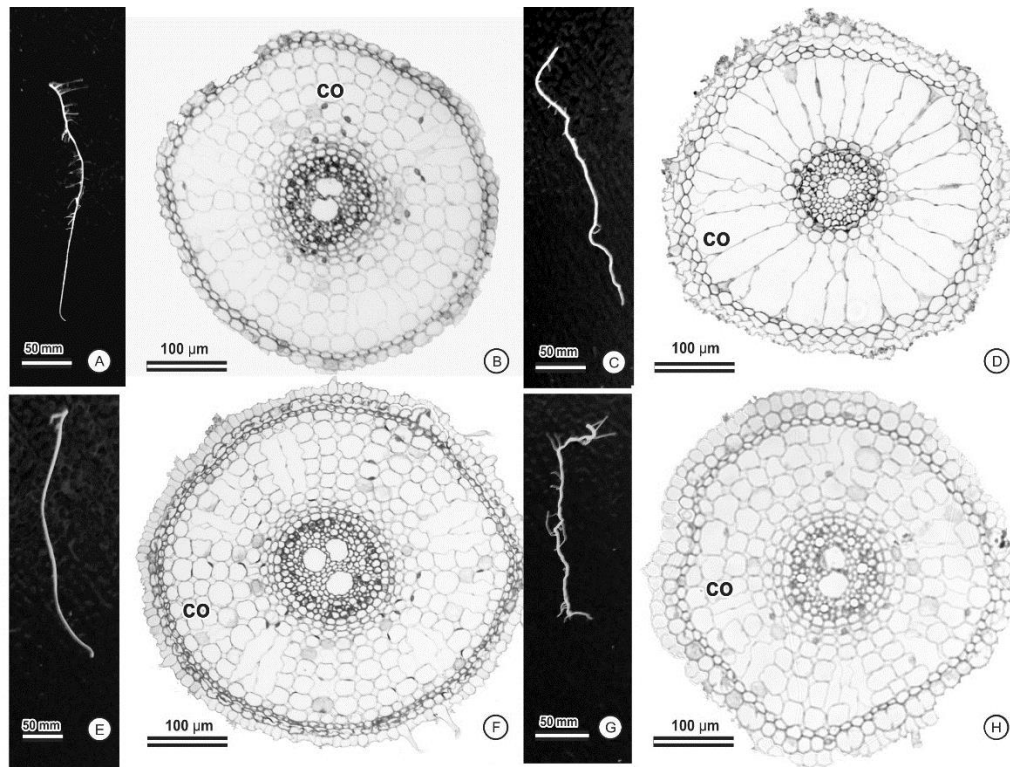


Figura 6. Raiz adventícia (e seu corte transversal) de plântulas de arroz cultivadas com (+Si) ou sem (-Si) silício. **A, B.** Genótipo selvagem (wt), -Si. **C, D.** Genótipo selvagem (wt), +Si. **E, F.** Genótipo mutante (*lsi1*), -Si. **G, H.** Genótipo mutante (*lsi1*), +Si. Legenda: CO: Córtex radicular.

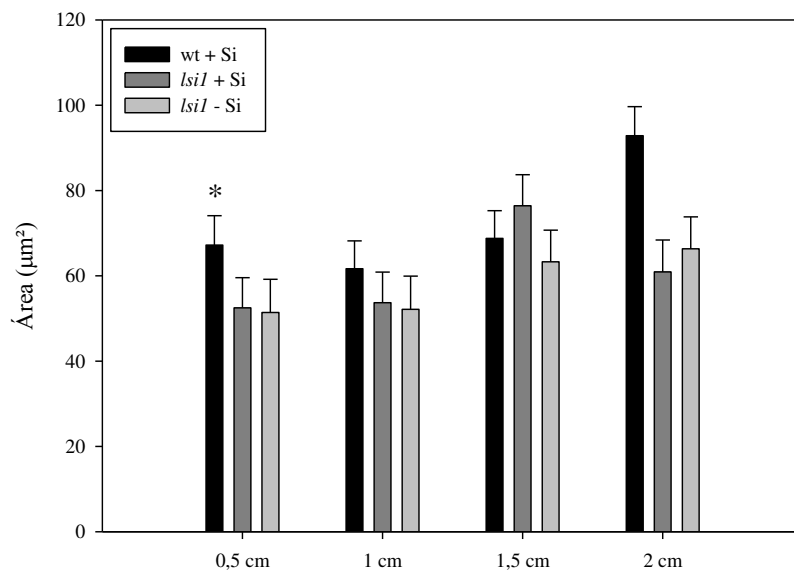


Figura 7. Área de cortes transversais de raízes de plantas de arroz (cv. Oochikara, tipo selvagem, wt, e seu respectivo mutante *lsi1* defeitivo para o transportador de silício), aos 10 dias de idade. As plantas foram cultivadas com (+Si) ou sem (-Si). Plantas wt -Si não estão presentes no gráfico, pois demonstraram área de raiz semelhante a plantas *lsi1* -Si. As áreas foram mensuradas a 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 cm, a partir da ponta das raízes. Diferenças significativas entre tratamentos estão marcadas com asterisco ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

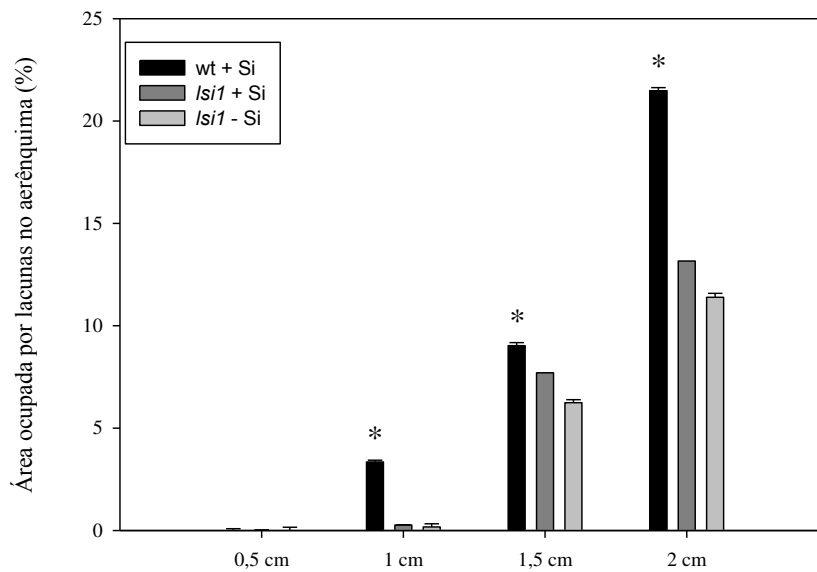


Figura 8. Área ocupada por lacunas no aerênquima (%) de raízes de plântulas de arroz (cv. Oochikara, tipo selvagem, wt, e seu respectivo mutante *lsi1* defectivo para o transportador de silício), aos 10 dias de idade. As plantas foram cultivadas com (+Si) ou sem (-Si). Plantas wt -Si não estão presentes no gráfico, pois demonstraram área de lacunas do aerênquima semelhante a plantas *lsi1* -Si. As áreas foram mensuradas a 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 cm, a partir da ponta das raízes. Diferenças significativas entre tratamentos estão marcadas com asterisco ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

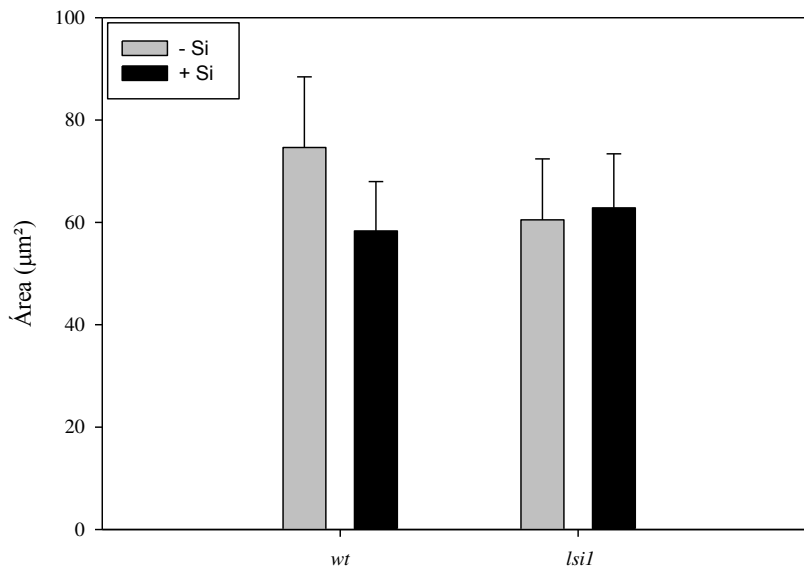


Figura 9. Área de cortes transversais de raízes de plantas de arroz (cv. Oochikara, tipo selvagem, wt, e seu respectivo mutante *lsi1* defectivo para o transportador de silício), aos 10 dias de idade. As plantas foram cultivadas com (+Si) ou sem (-Si). As áreas foram mensuradas a 1,5 cm, a partir da ponta das raízes. Diferenças significativas entre tratamentos estão marcadas com asterisco ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

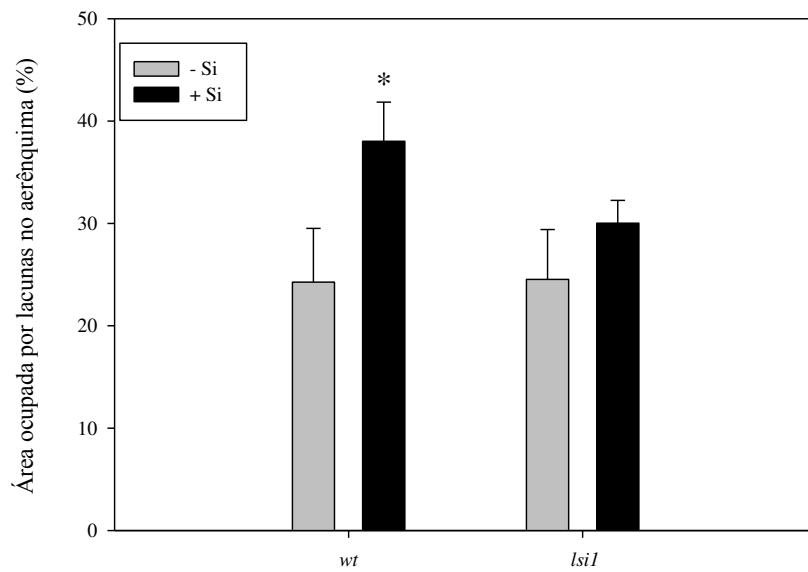


Figura 10. Área ocupada por lacunas no aerênquima (%) de raízes de plantas de arroz (cv. Oochikara, tipo selvagem, wt, e seu respectivo mutante *lsi1* defectivo para o transportador de silício), aos 10 dias de idade. As plantas foram cultivadas com (+Si) ou sem (-Si). As áreas foram mensuradas a 1,5 cm, a partir da ponta das raízes. Diferenças significativas entre tratamentos estão marcadas com asterisco ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

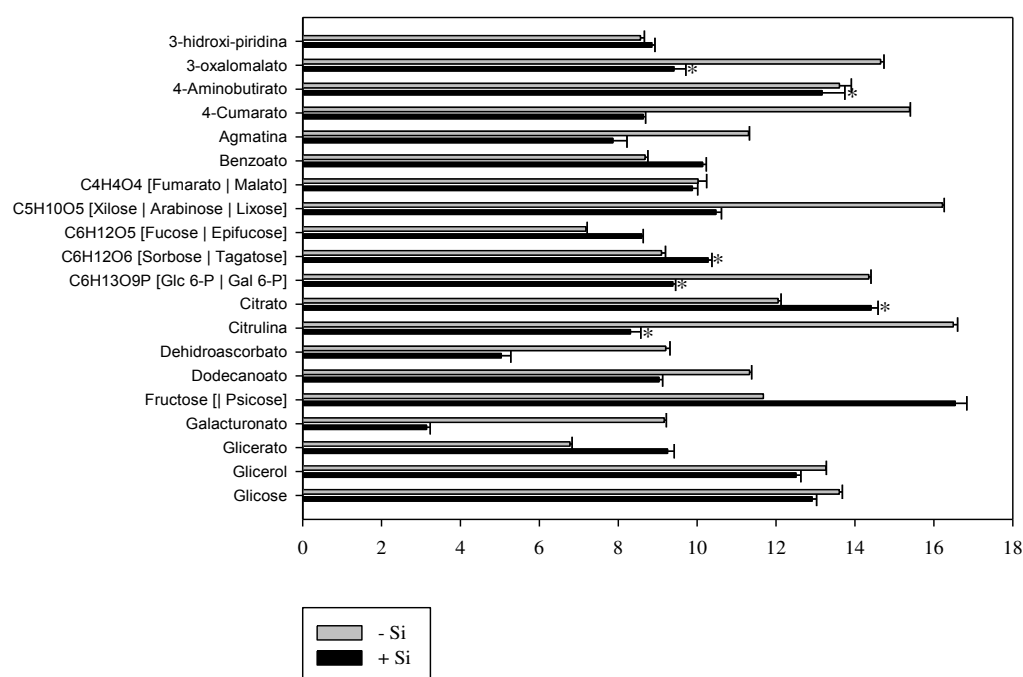


Figura 11. Quantidade relativa dos principais açúcares e ácidos orgânicos associados ao metabolismo primário de plantas –Si e +Si do genótipo wt. Diferenças significativas entre tratamentos estão marcadas com asterisco ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

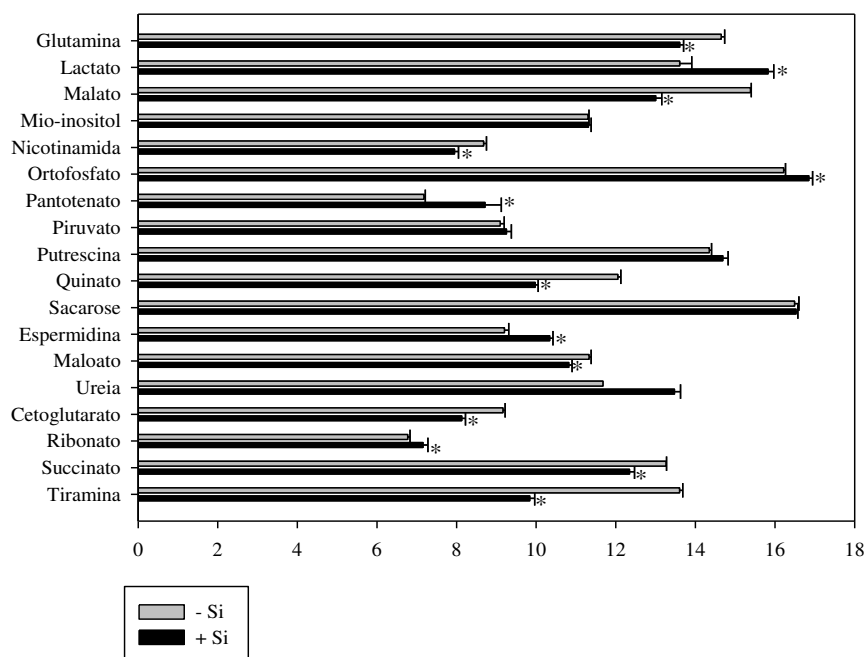


Figura 12. Quantidade relativa dos principais açúcares e ácidos orgânicos associados ao metabolismo primário de plantas –Si e +Si do genótipo wt. Diferenças significativas entre tratamentos estão marcadas com asterisco ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

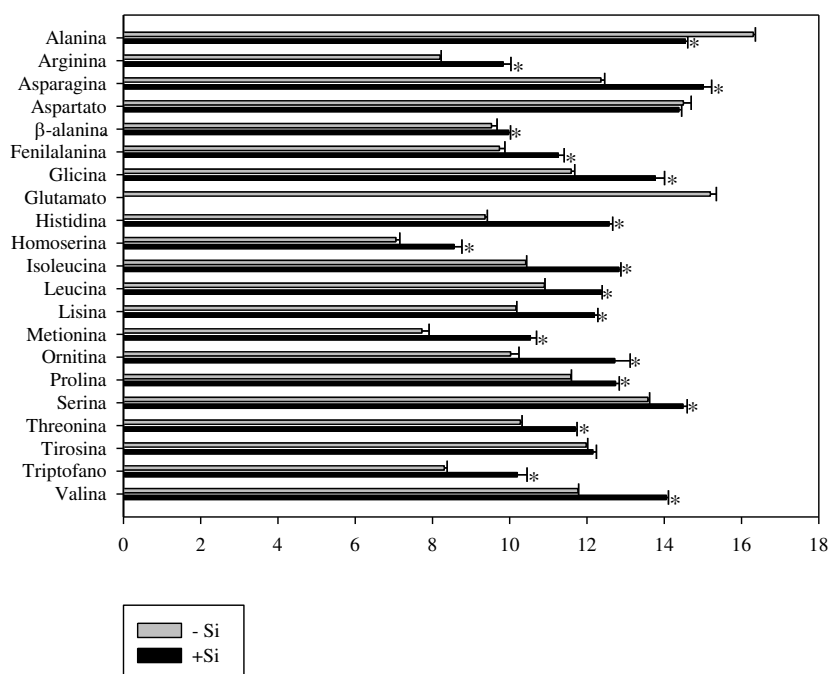


Figura 13 Quantidade relativa dos principais aminoácidos associados ao metabolismo primário de plantas –Si e +Si do genótipo wt. Diferenças significativas entre tratamentos estão marcadas com asterisco ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

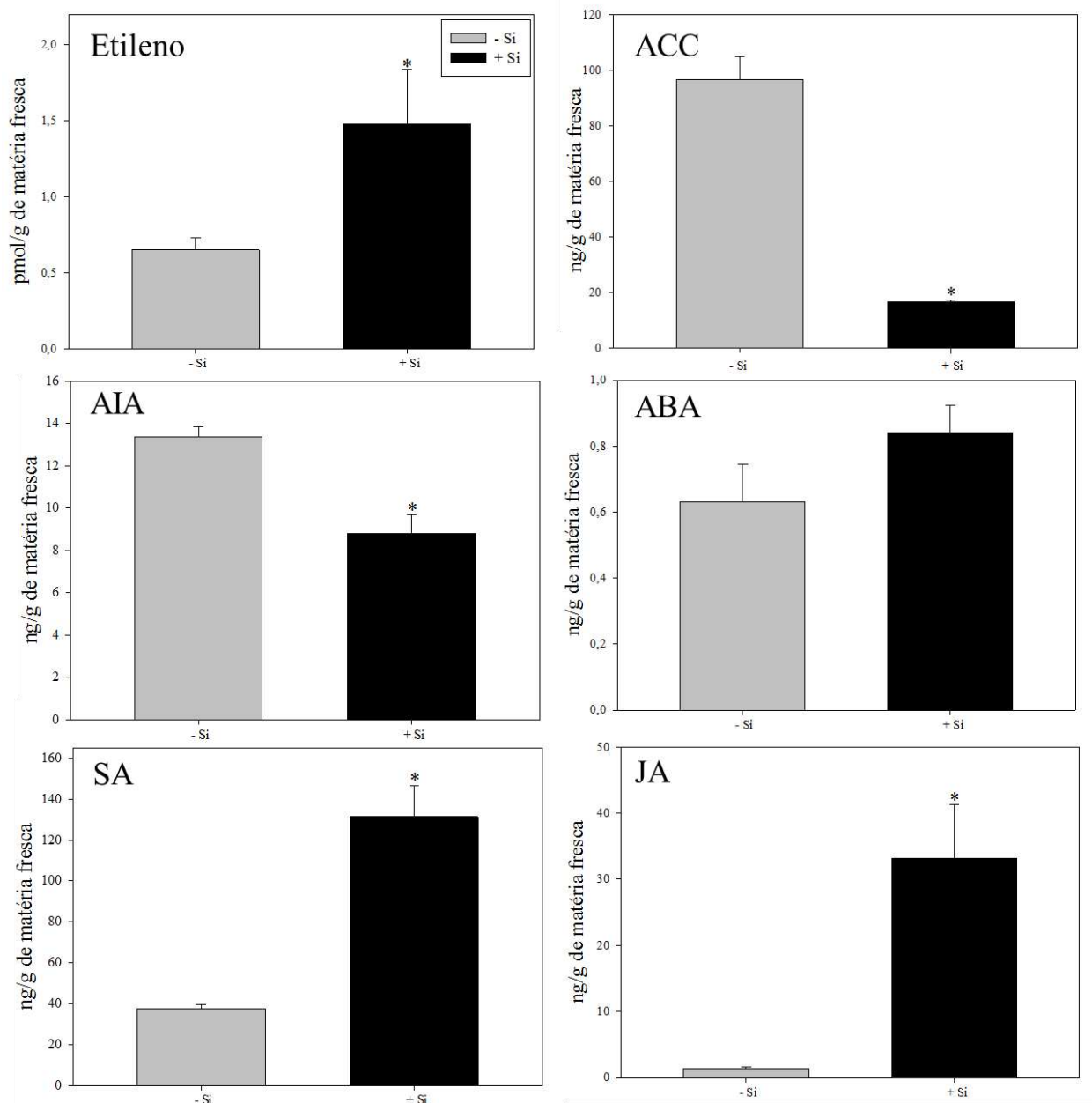


Figura 14. Níveis de fitormônios e ACC em raízes de plântulas de arroz de 10 dias de idade do genótipo selvagem cultivados em meio de cultura sem (- Si) ou com (+Si) acréscimo de silício. Diferenças significativas entre tratamentos estão marcadas com asterisco ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média. ACC = Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; ABA: Ácido abscísico; SA: Ácido salicílico; AIA: Ácido indo-acético; JA: Ácido jasmônico.

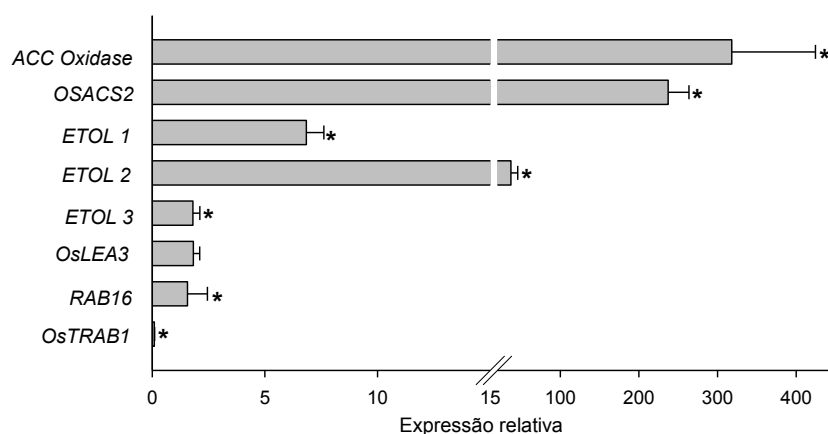


Figura 15. Nível de transcritos de genes relacionados com a biossíntese de etileno e resposta ao ABA. Valores relativos ao grupo controle (-Si) em experimento realizado com plantas de 10 dias de idade. Asteriscos indicam diferenças significativas entre plantas +Si e -Si ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

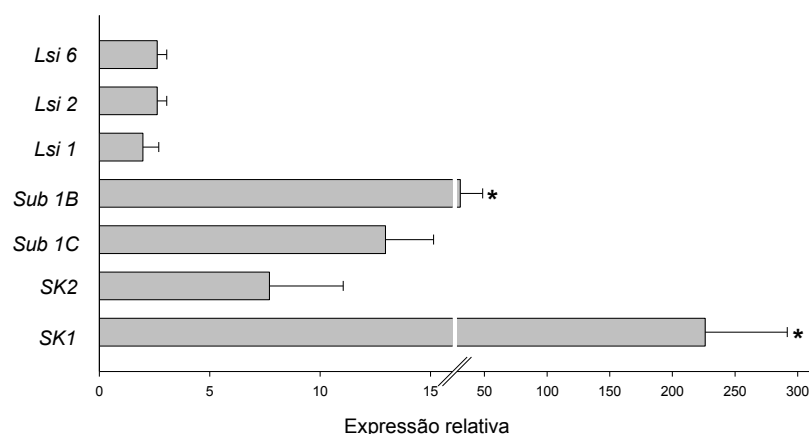


Figura 16. Nível de transcritos de genes relacionados com o transportadores de silício e escape e/ou tolerância ao alagamento. Valores relativos ao grupo controle (-Si) em experimento realizado com plantas de 10 dias de idade. Asteriscos indicam diferenças significativas entre plantas +Si e -Si ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

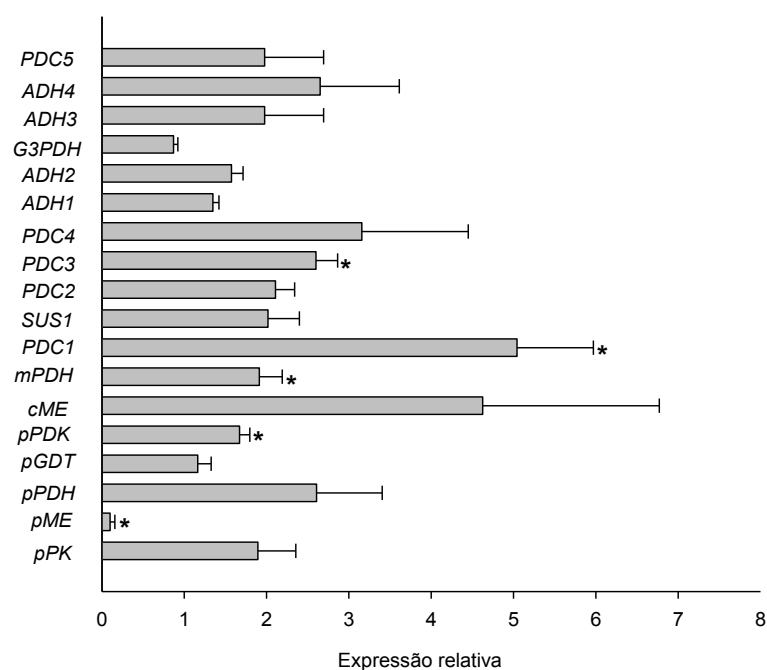


Figura 17. Nível de transcritos de genes relacionados com o metabolismo aeróbio, anaeróbio, ciclo do ácidos tricarboxílicos e biossíntese de ácidos gráxos. Valores relativos ao grupo controle (-Si) em experimento realizado com plantas de 10 dias de idade. Asteriscos indicam diferenças significativas entre plantas +Si e -Si ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

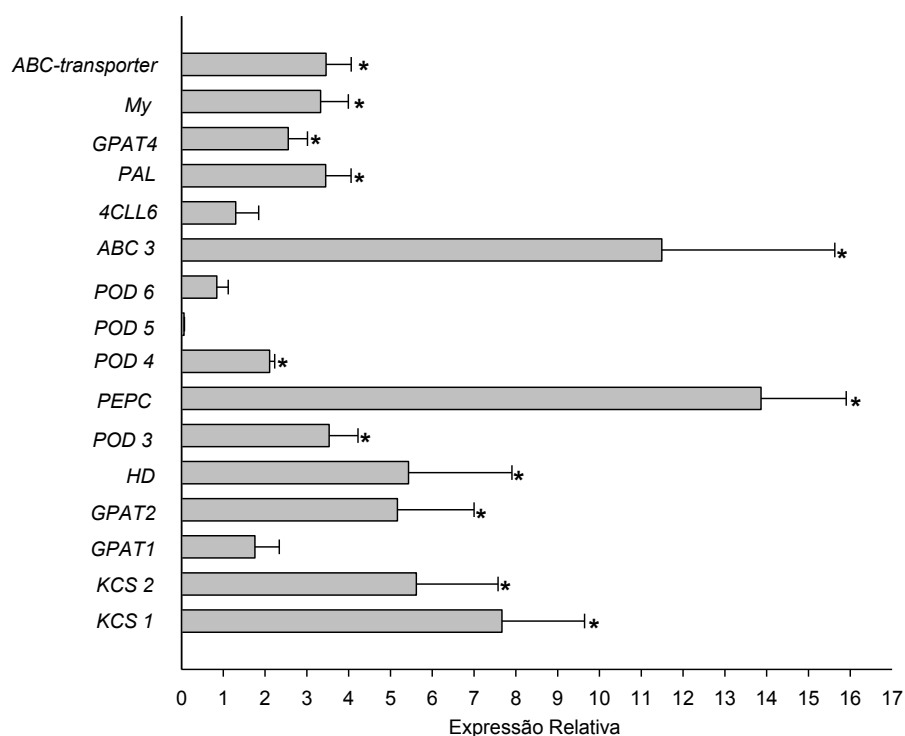


Figura 18. Nível de transcritos de genes relacionados com a biossíntese de parede celular. Valores relativos ao grupo controle (-Si) em experimento realizado com plantas de 10 dias de idade. Asteriscos indicam diferenças significativas entre plantas +Si e -Si ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

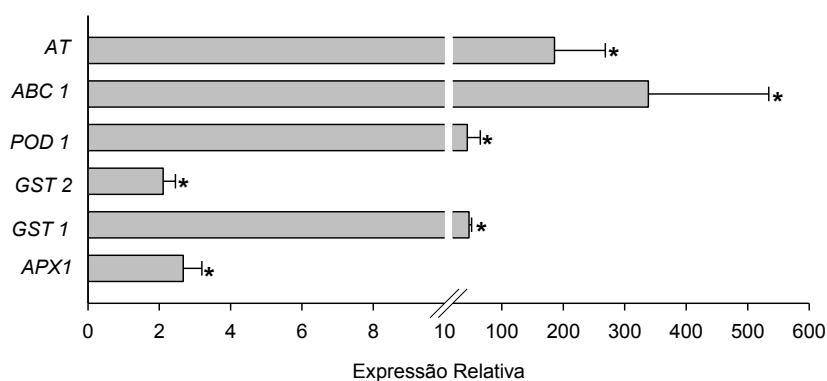


Figura 19. Nível de transcritos de genes relacionados com a biossíntese de parede celular e cadeia transportadora de elétrons. Valores relativos ao grupo controle (-Si) em experimento realizado com plantas de 10 dias de idade. Asteriscos indicam diferenças significativas entre plantas +Si e -Si ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

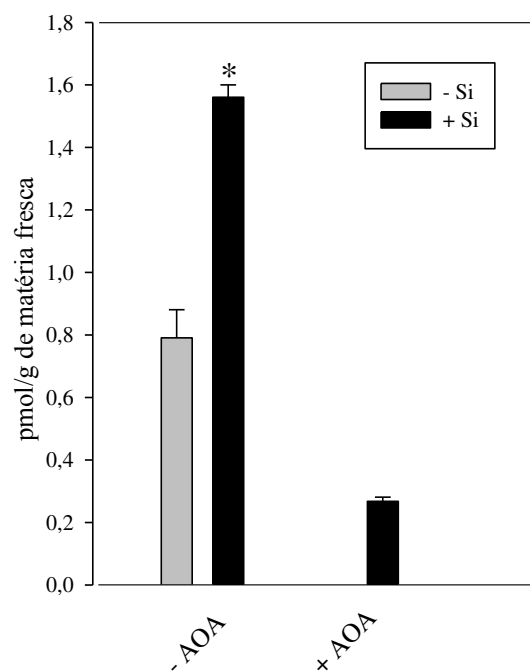


Figura 20. Produção de etileno em raízes de arroz do genótipo selvagem incubadas por seis horas em câmara germinadora tratadas, ou não, com AOA (ácido aminooxiacético) e com ou sem silício. Asteriscos indicam diferenças significativas entre plantas +Si e –Si ($p \leq 0,05$). N = 5 $\pm$ erro-padrão da média.

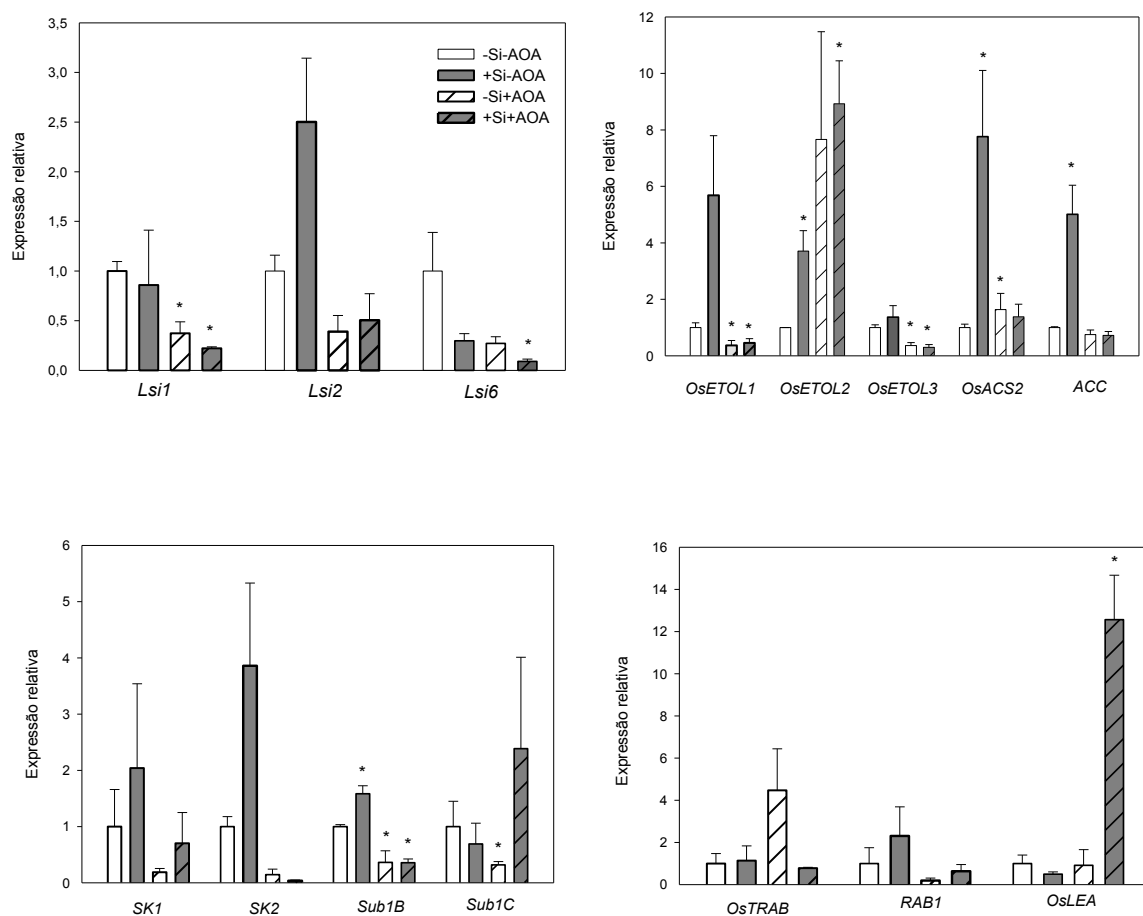


Figura 21. Níveis de transcritos em raízes de arroz de genótipo selvagem tratadas, ou não, com AOA (ácido aminoxiacético) e com ou sem silício. Asteriscos indicam diferenças significativas entre plantas +Si e -Si ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

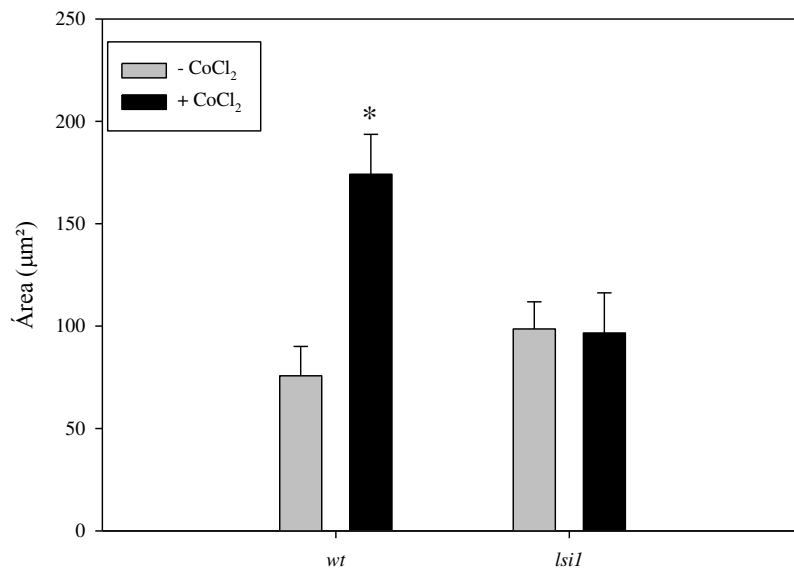


Figura 22. Área de cortes transversais de raízes de plantas de arroz (cv. Oochikara, genótipo selvagem, wt, e seu respectivo mutante *lsi1* defeitivo para o transportador de silício), aos 10 dias de idade. As plantas foram cultivadas sem (- CoCl₂) ou com (+ CoCl₂) cloreto de cobalto, um inibidor da biossíntese de etileno. As áreas foram mensuradas a 1,5 cm, a partir da ponta das raízes. Diferenças significativas entre tratamentos estão marcadas com asterisco ($p \leq 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

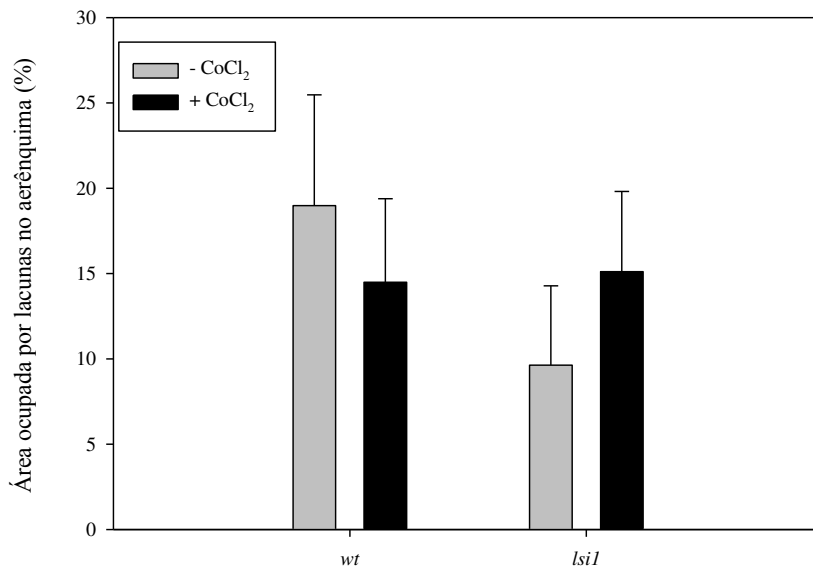


Figura 23. Área ocupada por lacunas no aerênquima (%) de raízes de plantas de arroz (cv. Oochikara, tipo selvagem, wt, e seu respectivo mutante *lsi1* defeitivo para o transportador de silício), aos 10 dias de idade. As plantas foram cultivadas sem (-CoCl₂) ou com (+CoCl₂) cloreto de cobalto, um inibidor da biossíntese de etileno. As áreas foram mensuradas a 1,5 cm, a partir da ponta das raízes. Não houveram diferenças significativas entre tratamentos ($p > 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.

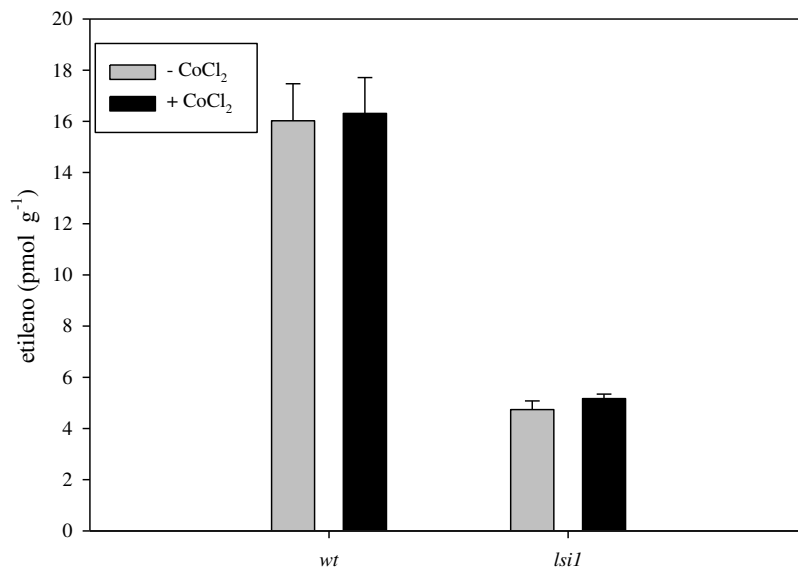


Figura 24. Produção de etileno em raízes de arroz (cv. Oochikara, genótipo selvagem, wt, e seu respectivo mutante *lsi1* defeitivo para o transportador de silício) aos 10 dias de idade. As raízes incubadas por seis horas em câmara germinadora. As plantas foram cultivadas sem (-CoCl₂) ou com (+CoCl₂) cloreto de cobalto, um inibidor da biossíntese de etileno. Não houveram diferenças significativas entre tratamentos ($p > 0,05$). $n = 5 \pm$ erro-padrão da média.