

TÁRIK GALVÃO NEVES

**IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA DO CATABOLISMO DE LISINA  
DURANTE ESTRESSE SALINO EM *Arabidopsis thaliana***

Dissertação apresentada 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  
2017

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

T

N518i  
2017      Neves, Tárík Galvão, 1991-  
            Importância fisiológica do catabolismo de lisina durante  
            estresse salino em *Arabidopsis thaliana* / Tárík Galvão Neves. –  
            Viçosa, MG, 2017.  
            vii, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.34-45.

1. *Arabidopsis thaliana*. 2. Fisiologia vegetal. 3. Plantas -  
Metabolismo. 4. Aminoácidos. 5. Solos - Salinidade. 6. Plantas -  
Efeito do sal. 7. Mitocôndria. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação  
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 583.64

TÁRIK GALVÃO NEVES

**IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA DO CATABOLISMO DE LISINA  
DURANTE ESTRESSE SALINO EM *Arabidopsis thaliana***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Master Scientiae*.

APROVADA: 15 de dezembro de 2017.

  
Dimas Mendes Ribeiro

  
Franklin M. de Oliveira Silva

  
Wagner Luiz Araújo  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por não me deixar fraquejar, mostrando que diante dos desafios é preciso tentar e que em muitas vezes estaremos diante de novos desafios, coisas que não saberemos por onde começar.

Aos meus pais, Rosinete e Nilton, por tudo e sempre me mostrarem que eu posso conseguir o que quero.

A CAPES (Coordenação de Apoio Científico para Formação de Pós-Graduação) pelo apoio financeiro. Graças à Universidade Federal de Viçosa (UFV), especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal na UFV, por fornecer todas as condições necessárias para desenvolver meu trabalho.

Quero agradecer também ao meu orientador, Prof. Wagner L. Araújo, pela orientação e por conceder a oportunidade de trabalhar em sua equipe.

Ao Doutor João Henrique Frota Cavalcanti pela ajuda neste trabalho em vários aspectos e boas sugestões.

Agradeço também ao comitê de avaliação por julgarem meu trabalho e por suas contribuições para o melhorar.

Gostaria também de agradecer a todos os meus amigos em Viçosa pela amizade e bons momentos que compartilhamos juntos, em especial ao meu irmão Nicholas.

Obrigado a todos os membros da UCP, especialmente a Dora, Franciele, Jéssica, Ítalo e Jaciara.

Finalmente, a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho e que me apoiaram durante toda a minha jornada, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigado.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
2.1 Material vegetal.....	9
2.2 Análise de fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	9
2.3 Análise de pigmentos fotossintéticos e bioquímicos.....	9
2.3.1 Processamento e extração.....	9
2.3.2 Determinação de pigmentos fotossintéticos.....	9
2.3.3 Conteúdo de aminoácidos totais .....	9
2.3.4 Determinação do teor de açúcares totais .....	10
2.3.5 Conteúdo de malato e fumarato .....	10
2.3.6 Determinação de amido .....	11
2.3.7 Determinação de proteínas totais .....	11
2.4 Análise de expressão gênica por RT-PCR quantitativa .....	11
2.5 Ensaio de germinação.....	12
2.6 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	13
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>13</b>
3.1 Ensaio de germinação.....	13
3.2 Crescimento de raiz.....	15
3.3 Determinação de pigmentos e parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	16
3.4 Alterações metabólicas em resposta ao estresse salino .....	18
3.5 Análise de expressão gênica .....	22
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>
<b>7. MATERIAL SUPLEMENTAR .....</b>	<b>46</b>

## RESUMO

NEVES, Tárík Galvão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2017. **Importância fisiológica do catabolismo de lisina durante estresse salino em *Arabidopsis thaliano*.** Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Solos salinos, aquele em que as concentrações de sal excedem à 10 mM de cloreto de sódio (NaCl), geram danos significativos que afetam o crescimento e desenvolvimento de cultivos agrícolas. A ocorrência de solos salinos é comum em regiões áridas e semi-áridas. No entanto, áreas agricultáveis podem sofrer com a salinização onde, em conjunto com um sistema de drenagem natural ou artificial ineficaz, a água de irrigação, ainda que de boa qualidade, pode gerar o acúmulo de sal na rizosfera. Os impactos em plantas causados pelo excesso de sal nos solos culminam em (i) estresse osmótico que reduz o potencial hídrico do solo, dificultando a absorção de água pelas raízes, e (ii) desbalanço iônico celular caso altas concentrações de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  forem absorvidos. Em conjunto, os danos causados pela presença de altas concentrações de NaCl na solução do solo diminuem a absorção de água e nutrientes, interferindo em processos metabólicos importantes como fotossíntese e respiração. Cumpre ressaltar que as mitocôndrias de plantas desempenham diversas funções importantes para o metabolismo vegetal e, em condições de estresse salino, a geração de energia mediada pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (mETC) são afetados pelo déficit de carboidratos provenientes da fotossíntese. Nesse contexto, vias alternativas da respiração são induzidas fornecendo elétrons para mETC e compostos intermediários para o ciclo do TCA. Estudos recentes mostram que a degradação de proteínas e catabolismo de aminoácidos podem gerar incrementos nas taxas respiratórias em condições de escassez de carbono. Tanto a biossíntese quanto o catabolismo de lisina apresentam uma estreita ligação com o metabolismo energético em especial com o ciclo do TCA. Dessa forma, o presente trabalho buscou investigar o papel da lisina nas respostas fisiológicas e metabólicas em resposta ao estresse salino. Para tanto, os impactos ocasionados ao crescimento e metabolismo foram analisados em mutantes na biossíntese de lisina fornecendo evidências fenotípicas e fisiológicas da importância de lisina para uma maior tolerância ao estresse salino em *Arabidopsis thaliana*. Plântulas de *Arabidopsis* com

redução da atividade da enzima *L,L-diaminopimelato aminotransferase (dapat)* mostraram uma maior sensibilidade ao estresse salino quando comparadas ao seu tipo selvagem, apresentando baixa germinação de sementes em todos tratamentos com estresse salino, enquanto mutantes para a *dihidropicolinato sintase (dhdps-2)* apresentaram maior tolerância ao estresse salino. Além disso, foi observado em todos genótipos reduções progressivas nos valores da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) ocorrendo de forma mais acelerada quando submetidas a 150 mM de NaCl. Concomitantemente, diminuições nos teores de clorofila total e na razão clorofila *a* / clorofila *b* foram observadas. Não obstante, o estresse salino induziu o acúmulo de aminoácidos totais, bem como diminuições nas concentrações de proteínas totais e amido. Assim, é plausível sugerir que outros compostos, que podem atuar como osmorreguladores, tiveram papel importante nas respostas aqui observadas. Os resultados apresentados demonstram a importância de lisina como um substrato alternativo para manutenção da homeostase celular em condições de estresse salino.

## ABSTRACT

NEVES, Tárík Galvão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2017. **Physiological importance of lysine catabolism during salt stress in *Arabidopsis thaliana***. Advisor: Wagner Luiz Araújo.

Saline soils, those in which salt concentrations exceed 10mM sodium chloride (NaCl), are common in arid and semi-arid regions and cause significant damage impacting growth and development of crops. The impacts caused in plants by soils salinity culminate in (i) osmotic stress that reduces soil water potential difficulting root water absorption; and (ii) cellular ionic unbalance when high concentrations of Na<sup>+</sup> or Cl<sup>-</sup> are absorbed. Taken together, the damage caused by the presence of high concentrations of NaCl in the soil solution decreases the absorption of water and nutrients, impacting important metabolic processes such as photosynthesis and respiration. It should be noted that plant mitochondria plays important roles in metabolism in general and that under salt stress energy generation mediated by the tricarboxylic acid (TCA) cycle and the mitochondrial electron transport chain (mETC) are affected by an insufficient carbohydrate production from photosynthesis. In this context, alternative respiration pathways are induced providing both electrons to the mETC and intermediate compounds to the TCA cycle. It has been recently shown that protein degradation and amino acid catabolism, mediated by alternative pathways of respiration, can enhance respiratory rates in plants submitted to carbon starvation conditions. Both biosynthesis and catabolism of lysine are close associated with energy metabolism, especially with the TCA cycle. Thus, the objective of this work was to investigate the role of lysine on the physiological and metabolic responses of plants submitted to salinity. To this end, the impact of salt stress on growth and metabolism of mutants in lysine biosynthesis were analyzed. The results obtained demonstrate the importance of lysine to increase salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Seedlings of *Arabidopsis* with reduced activity of the enzyme *L,L*-diaminopimelate aminotransferase (*dapat*) showed higher sensitivity to salt stress when compared to wild type presenting also lower seed germination in all salt treatments, whilst mutants of *dihydropicolinate synthase* (*dhps-2*) showed greater tolerance to salt stress. Moreover, all genotypes were characterized by progressive reductions in the

maximum photochemical efficiency values of photosystem II ( $F_v/F_m$ ) that occurs more rapidly in plants submitted to 150 mM NaCl. Concomitantly, decrease total chlorophyll content and chlorophyll a / chlorophyll b ratio were observed. Notwithstanding, saline stress induced not only total amino acid accumulation but also reduced total protein and starch concentrations. Thus, it seems reasonable to suggest that other compounds can act as osmoregulators and played an important role in the responses observed. The results presented demonstrate the importance of lysine as an alternative substrate for the maintenance of cellular homeostasis under salt stress conditions.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os inúmeros desafios da agricultura neste século, suprir a demanda de alimentos, tanto em quantidade como em qualidade, trata-se de uma questão fundamental para atender as necessidades da crescente população mundial. Segundo dados da FAO (2010) com o crescimento acelerado da população, estima-se que até 2030 a população mundial seja em torno de 8,3 bilhões de pessoas. Para que haja, portanto, segurança alimentar mundial, estima-se que a produção de alimentos deva aumentar em pelo menos 57% até 2050 (Witcombe et al., 2008). No entanto, uma das dificuldades para se alcançar tal aumento na produção das culturas agrícolas é o aquecimento global, pois estima-se que a temperatura global sofrerá um aumento de 1,1 ° a 6,4 °C durante o século (IPCC, 2007). Em conjunto, tais fatores afetarão a agricultura mundial, devido ao aumento das temperaturas e gerando prejuízos severos à produção agrícola. Estresses abióticos (e.g. seca, frio, altas temperaturas, solos salinos, dentre outros), de forma geral, afetam o crescimento vegetal, diminuindo a produtividade agrícola. Dentre os diversos estresses abióticos existentes, um dos principais fatores ambientais que afetam os cultivos agrícolas é a salinidade que está presente em cerca de 20% das terras irrigadas no mundo (Gao et al., 2007; Qadir et al., 2014; Mickelbart et al., 2015).

Solos salinos são bastante comuns em regiões áridas e semi-áridas, onde a precipitação é muito baixa ocasionando uma percolação irregular ao longo do perfil do solo, e nas áreas em que a irrigação é usualmente praticada sem sistemas de drenagem artificial ou natural. Tais práticas de irrigação sem manejo da drenagem desencadeiam um acúmulo de sais na região radicular (Kijne, 2006; Qadir et al., 2014), afetando, negativamente, propriedades físicas do solo e a produtividade agrícola. Excesso de sais nos solos podem culminar em dois estresses distintos: (i) osmótico, que reduz o potencial hídrico da rizosfera dificultando a absorção de água pelas raízes; e (ii) iônico, devido à absorção de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  que gera um desbalanço iônico intracelular. Em conjunto, essas situações diminuem a absorção de água e nutrientes interferindo também em distintas atividades metabólicas como na fotossíntese e respiração (Parida e Das, 2005). Atualmente busca-se alternativas que amenizem os impactos negativos causados pelo estresse salino em plantas,

buscando elucidar os mecanismos anatômicos, morfológicos e fisiológicos de tolerância ao estresse salino (Greenway e Munns, 1980; Forni et al., 2016).

Ao enfrentarem condições desfavoráveis (e.g. estresses abióticos vários), o crescimento e a produtividade das plantas são drasticamente alterados. Na maioria das condições de estresses abióticos, o metabolismo vegetal é perturbado quer seja devido à inibição enzimática, à escassez de substratos, à demanda excessiva de compostos específicos ou uma combinação destes fatores associadas a razões outras (Obata e Fernie, 2012; Choudhury et al., 2017). Nesse contexto, uma extensa reconfiguração metabólica faz-se, portanto, necessária para a manutenção do metabolismo possibilitando, assim, uma aclimação frente às condições de estresse prevalentes. Essa reprogramação metabólica é também necessária para satisfazer a demanda por agentes anti-estressantes incluindo solutos compatíveis, antioxidantes e proteínas sensíveis ou responsivas ao estresse (Hayat et al., 2012).

O aumento na síntese e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) em resposta a essas situações de estresse é também capaz de promover a oxidação e disfunção de componentes celulares e, no pior dos cenários, a morte celular. Assim, reprogramação celular em compartimentos subcelulares, tais como cloroplastos, peroxissomo e mitocôndrias devem ocorrer com o intuito de evitar a formação de EROs (Xu et al., 2011; Fiorani et al., 2005; Mignolet-Spruyt et al., 2016). As organelas citadas acima são os principais locais de formação de EROs na célula e contam com um aparato enzimático atuante para evitar sua produção excessiva. Segundo Maxwell et al., (1999) a otimização do fluxo metabólico através das cadeias de transporte de elétrons, via Oxidase Alternativa (AOX), é de grande importância em condições estressantes e isso é demonstrada no trabalho onde a superexpressão AOX resultou em uma redução significativa na formação de EROs, mesmo com a redução na atividade de outros aparatos enzimáticos de remoção de EROs, exemplificados pela Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT). Tais resultados demonstram assim que a manutenção do estado redox celular é sobretudo importante ao proporcionar poder redutor necessário para a eliminação de EROs. Apesar de tais papéis importantes associados à regulação metabólica sob condições de estresse, nossa compreensão atual deste processo encontra-se ainda

fragmentada e distante de ser completa, particularmente no que se respeita o entendimento da aclimação metabólica em resposta ao estresse salino.

A importância da mitocôndria para o metabolismo vegetal está em sua participação nos diversos processos celulares, tais como fotossíntese, fotorrespiração, metabolismo do nitrogênio, regulação do potencial redox e sinalização (Heazlewood et al., 2004; Sweetlove et al., 2006). É importante mencionar também que para que culturas de interesse econômico apresentem produtividade elevadas, um balanço adequado entre os processos fotossintéticos e respiratórios deve existir (Araújo et al., 2014). Assim, embora normalmente se observe uma redução nas taxas fotossintéticas em resposta ao estresse salino (Meloni et al., 2003; Sudhir e Murthy, 2004), Lundegardh (1939) descreveu um aumento da taxa respiratória em trigo imediatamente após a adição de sal, incremento esse denominado então como “respiração salina”. O conceito original associado à respiração salina foi mantido ao longo do tempo e atualmente é amplamente reconhecido que a salinidade pode aumentar a respiração (Eynard et al., 2005; Bothe 2012, Kosová et al., 2013; Rewald et al., 2013). Cabe mencionar, no entanto, que o efeito da salinidade é dependente da sua severidade bem como da duração e do grau de tolerância da planta ao sal, ao passo que incrementos na respiração parecem ser uma característica distintiva (Jacoby et al., 2011).

A mitocôndria é uma importante organela associada à produção de energia, na forma de ATP, possibilitando que as células eucarióticas realizem todas suas atividades e alcancem, assim, a homeostase celular. Para tanto, carboidratos oriundos do processo fotossintético são convertidos em energia no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), apresentando um rendimento de 30 mol de ATP por mol de glicose consumida / oxidada (Andersson et al., 2003). Ainda nesse contexto, processos respiratórios oxidam carboidratos gerando energia na forma de ATP bem como esqueletos de carbono para biossíntese de outros compostos (Ferne et al. 2011; Van Dongen et al. 2011; Araújo et al., 2012). Sob condições de estresse, biótico ou abiótico, ocorre uma diminuição na biossíntese de carboidratos e a utilização de substratos alternativos (e.g. lipídios, proteínas e clorofila) para produção de ATP passa a ser uma forma eficiente pela qual as células evitam um déficit energético severo (Araujo et al., 2011). Cumpre mencionar que diversas

linhas de evidências têm apontado que os aminoácidos sejam os principais substratos alternativo capazes de serem oxidados na mitocôndria para produção de poder redutor e, conseqüentemente síntese de ATP, por uma via alternativa de respiração denominada ETF/ETFQO (*Electron-Transfer Flavoprotein / Electron-Transfer Flavoprotein:Ubiquinone Oxidoreductase*) (Ishizaki et al., 2005; Ishizaki et al., 2006; Hildebrandt et al., 2015).

O catabolismo de aminoácidos, auxiliando a geração de energia, ocorre por uma via distinta do processo respiratório clássico composto pela glicólise e oxidação de ácidos orgânicos. De modo específico, a degradação de proteínas associada à produção de aminoácidos compreende a geração de energia através da doação de elétrons para a cadeia de transporte de elétrons mediada pelo sistema ETF/ETFQO (Ishizaki et al. 2005; Araújo et al. 2011). O complexo alternativo doador de elétrons (ETF/ETFQO) está presente também em mamíferos e oxida substratos alternativos para alimentar a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial em plantas (Heazlewood et al. 2004; Van Dongen et al. 2011). Associado a essa via, as enzimas *isovaleril-CoA desidrogenase* (IVDH) e *(D)-2-hidroxiglutarato desidrogenase* (D2HGDH) atuam na doação de elétrons para o sistema ETF/ETFQO a partir da oxidação de aminoácidos de cadeia ramificada e lisina, respectivamente (Engqvist et al., 2009; Araújo et al., 2010). Ademais, IVDH é ainda apontada como uma desidrogenase de papel central na oxidação de outras classes de aminoácidos (e.g. aminoácidos aromáticos) (Araújo et al., 2011; Peng et al., 2015).

A descoberta do envolvimento do complexo ETF/ETFQO, postulada inicialmente por Heazlewood et al. (2004) e posteriormente confirmada Buchanan-Wollaston et al. (2005), demonstrou que durante estresse oxidativo genes associados a via ETF/ETFQO são altamente expressos em plantas. Assim, é plausível sugerir que sob condições de estresse oxidativo, como comumente observado em resposta a inúmeros estresses, a degradação das proteínas gera aminoácidos vários que podem transferir elétrons para a cadeia transportadora de elétrons através do complexo ETF/ETFQO ou serem ainda convertidos em intermediários do ciclo TCA (e.g. 2-oxoglutarato) (Araújo et al., 2010). Cumpre ressaltar que o entendimento e importância da função dessa via de respiração

alternativa sob condições de estresse (Araújo et al., 2011) e ao longo do ciclo circadiano (Lee et al., 2010; Peng et al., 2015) tem sido parcialmente elucidado nos últimos anos. Salienta-se aqui que ambas respostas buscam, em última instância, a disponibilização de energia em quantidades suficientes para a manutenção dos processos celulares e manutenção das respostas de defesa possibilitando, assim, resguardo de energia metabólica já disponível ou pela angariação de energia adicional, respectivamente. No entanto, pouco ou nada se sabe acerca do modo pelo qual os sinais resultantes destes ajustes influenciam programas de expressão gênica e a reorganização do metabolismo em geral (Less e Galili, 2008; Galili, 2011), particularmente em resposta a estresses outros comumente enfrentados pelas plantas.

Tanto a biossíntese quanto o catabolismo de lisina apresentam uma estreita associação com o metabolismo energético, em especial com o ciclo TCA (Jander e Joshi, 2009; Angelovici et al., 2009). Ademais, um número crescente de estudos demonstra e/ou sugere o envolvimento da lisina a diversos processos associados com o fornecimento de energia (Araújo et al., 2010; Engqvist et al., 2011). Além do mais, a formação de 2-hidroxiglutarato (2HG), gerado pelo catabolismo de lisina, desempenha funções várias na fotorrespiração, assimilação de nitrogênio (Boex-Fontvieille et al., 2013; Kuhn et al., 2013) e na defesa contra patógenos (Rate e Greenberg, 2001; Song et al., 2004). A biossíntese de lisina é altamente regulada no interior de tecidos vegetais e em resposta aos estresses (Galili, 1995; Ferreira et al., 2005). Nesse contexto, a importância do catabolismo de lisina foi identificada mediante a caracterização de um complexo bifuncional mediado pelas enzimas *redutase do oxoglutarato-lisina/sacaropina desidrogenase* (LKR/SDH), que combina lisina e oxoglutarato formando sacaropina, que é subsequentemente oxidada a  $\alpha$ -aminoadipato e glutamato (Stepansky e Galili, 2003; Stepansky et al., 2006). Por ser um aminoácido essencial a alimentação humana, estudos buscam uma forma de se inibir ou minimizar o catabolismo de lisina em plantas (Zhu e Galili, 2003). Ademais, tem sido sugerido que lisina possa servir como um regulador efetivo do crescimento em plantas, além de interagir largamente com o ambiente, tendo uma regulação dos seus níveis, particularmente sob condições de estresse (Stepansky et al., 2006).

Lisina bem como outros aminoácidos (Metionina, Treonina e Isoleucina) são sintetizados a partir de uma via ramificada que utiliza o aspartato como precursor (Jander e Joshi, 2009). As duas primeiras etapas de síntese desses aminoácidos citados acima são compartilhadas sendo o último produto dessas reações enzimáticas o *L*-aspartato-4-semialdeído. Este por sua vez é substrato para *dihidropicolinato sintase* (DHDPS) ou *homoserina desidrogenase* (HSDH) para biossíntese de lisina e os demais aminoácidos derivados do aspartato, respectivamente. DHDPS é a enzima mais estudada dessa via metabólica sendo codificada por dois genes (DHDPS1: AT3G60880 e DHDPS2: AT2G45440) (Craciun et al., 2000; Sarrobert et al., 2000). Essa enzima, DHDPS, é ainda um ponto de regulação por feedback negativo em que a enzima apresenta um sítio alostérico no qual sua atividade é negativamente modulada por lisina. Assim, a lisina é, além do produto final da via, ainda um regulador alostérico de sua síntese. (Vauterin et al., 2000; Galili, 2002). Ademais, DHDPS2 tem importância maior do que DHDPS1, pois é encontrada em mais tecidos e apresenta maior atividade enzimática. Foi observado que mutantes para DHDPS2 apresentam redução na síntese de lisina concomitantemente com acúmulo de treonina, muito provavelmente devido à competição existente entre DHDPS e HSDH pelo substrato *L*-aspartato-semialdeído (Craciun et al., 2000; Sarrobert et al., 2000). Registra-se também que os demais genes da via biossintética de lisina tem sido menos extensivamente estudados e que *L,L*-diaminopimelato aminotransferase (dapAT) apresenta um importante envolvimento nos mecanismos de defesa contra patógenos em *Arabidopsis thaliana* (Rate e Greenberg, 2001; Song et al., 2004; Hudson et al., 2006).

Alguns cereais como milho, trigo e arroz possuem baixos níveis de lisina em suas sementes, o que gera consequências nutricionais e econômicas negativas. Com intuito de se aumentar a qualidade nutricional do milho, mutantes foram criados e um em particular, chamado de *opaque-2*, foi caracterizado por apresentar sementes com mais de 70% de lisina em seu conteúdo. De modo interessante, tais plantas mutantes produzem níveis maiores não apenas de lisina, mas também de triptofano, dois aminoácidos presentes em quantidades relativamente baixas em milho (Gibbon e Larkins 2005; Scrimshaw 2006). Cumpre mencionar também que

estudos em bactérias identificaram mutantes capazes de acumular lisina cuja capacidade de regulação alostérica via feedback negativo por lisina sobre DHDPS havia sido perdida (Sarrobot et al. 2000). Tal fenótipo foi ainda caracterizado, portanto, por níveis significativamente mais elevados de lisina.

A maior parte dos trabalhos envolvendo as vias metabólicas do aspartato em plantas buscaram aumentar o fluxo metabólico e/ou retardar o catabolismo. Não obstante, os impactos de uma reduzida biossíntese de aminoácidos da família do aspartato e suas funções no metabolismo primário e particularmente em condições onde a planta passa por déficit de carbono são ainda escassos. Cumpre mencionar que, dentre as poucas tentativas de se investigar o impacto de alterações na biossíntese desses aminoácidos, um mutante em *Arabidopsis*, com resistência à patógenos, foi caracterizado por uma mutação pontual em aminoácidos presentes nos genes da enzima (LL-dapat), enzima chave na biossíntese de lisina. Tal mutação promove reduções na atividade dessa enzima culminando com a obtenção de plantas que, embora tolerantes a patógenos, apresentavam alterações na morfologia foliar e grandes acúmulos de ácido salicílico (SA) (Rate e Greenberg 2001; Song et al. 2004).

Tomados em conjunto, as informações apresentadas acima demonstram a importância da lisina na regulação energética e em associação ao metabolismo respiratório. Cumpre mencionar também que, embora a participação de vias alternativas da respiração e conseqüentemente do catabolismo de lisina em resposta a limitação de carbono associados à senescência induzida por escuro (Araújo et al., 2010; Engqvist et al., 2009) e em resposta a limitação hídrica (Pires et al., 2016) tenha sido demonstrada, pouco ou nada se sabe acerca da participação desses complexos. Em particular, registre-se o nosso incipiente conhecimento acerca da via biossintética da lisina bem como da sua capacidade em suprir substratos para respiração resultante do seu catabolismo via LKR/SDH e D2HGDH em resposta a salinidade.

Assim, nesse trabalho utilizaram-se mutantes de *Arabidopsis thaliana* com redução na expressão de duas enzimas da rota de biossíntese de lisina mediante uso de T-DNA para (i) *dhps-2* (AT2G45440) e (ii) *dapat* (AT4G33680) buscando-se investigar como a redução e/ou deficiência de lisina pode afetar as respostas ao

estresse salino. Registre-se também que pouco se conhece a respeito de como estresses e em particular a presença de sal podem impactar vias biossintéticas de aminoácidos. Assim, investigou-se os impactos oriundos da alteração na biossíntese de lisina em *Arabidopsis thaliana*, e suas implicações sobre vias alternativas de respiração. Para tanto, os mutantes citados acima foram caracterizados no que respeita alterações fisiológicas, metabólicas e moleculares frente ao estresse salino.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

As plantas de *Arabidopsis thaliana* dos ecotipos Columbia-0 e Wallewinskyia e as linhagens mutantes correspondentes para biossíntese de lisina *dapat* (Rate e Greenberg, 2001) e *dhdps2* (Craciun et al., 2000), respectivamente, foram utilizadas. As sementes foram esterilizadas em etanol 70% por 2 minutos e, em seguida, hipoclorito de sódio 2,5% por 15 min. Todo o resíduo de hipoclorito de sódio foi removido por lavagens repetidas (6x) em água estéril. Após essas etapas as sementes foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultivo MS ½ força (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 1% de sacarose (m/v). As placas de Petri foram acondicionadas no escuro a 4° C por quatro dias. Após esse tempo, as placas foram transferidas para câmara de crescimento em condições controladas, fotoperíodo curto (8 horas luz / 16 horas escuro), temperatura de 22 °C e 20 °C (luz / escuro), umidade relativa de 60% e intensidade luminosa de 150  $\mu\text{mols m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Após 10 dias, plântulas foram transferidas para vasos de 0,08 dm<sup>3</sup> contendo substrato comercial Tropstrato HT<sup>®</sup> e mantidas nas condições de crescimento acima descritas até atingirem 4 semanas de idade.

Plantas com quatro semanas de idade, foram submetidos ao estresse salino com a aplicação, diretamente ao substrato, de 15 ml de solução salina, nas concentrações de 150 mM e 250 mM de NaCl, por um período de 10 dias. No decorrer desse período, a parte aérea foi coletada em nitrogênio líquido nos seguintes tempos: 0, 6, 24, 120 e 240 horas após a aplicação do estresse. O material foi armazenado em ultrafreezer a -80 °C para posteriores análises.

## **2.2 Análise de fluorescência da clorofila *a***

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram obtidos através do fluorômetro de amplitude de pulso modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido). Após serem adaptados ao escuro por 30 min, os tecidos foliares foram medidos para a determinação da fluorescência inicial ( $F_0$ ). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de  $6000 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e duração de 1 segundo foi aplicado para estimar-se a fluorescência máxima emitida ( $F_m$ ). A razão  $F_v/F_m$  correspondente a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) (Oh et al., 1996) foi obtida.

## **2.3 Análises de pigmentos fotossintéticos e bioquímicas**

### **2.3.1 Processamento e extração**

A extração foi realizada após completa moagem em nitrogênio líquido, utilizando uma série etanólica como descrito por Gibon et al. (2004). Os extratos etanólicos e os precipitados foram armazenados a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  para realização das quantificações dos metabólitos subsequentes.

### **2.3.2 Determinação de pigmentos fotossintéticos**

As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e razão clorofila *a/b* foram determinadas fotometricamente. A absorbância foi medida a 645 e 665 nm, utilizando o leitor de fluorescência em microplacas SpectraMax (Molecular Devices, USA). O conteúdo de clorofila foi determinado de acordo com equação proposta por Arnon (1949).

### **2.3.3 Conteúdo de aminoácidos totais**

De acordo com Cross et al. (2006) o teor total de aminoácidos foi determinado com uma mistura contendo tampão citrato 1 M, pH 5,2 com ácido ascórbico 0,2% (p / v)  $50 \mu\text{L}$ , o extrato de etanol  $25 \mu\text{L}$  e  $100 \mu\text{L}$  de solução de ninhidrina de 1% (p / v em etanol a 70%) foram adicionados a microplaca que foi

incubada durante 20 min a 95 °C. Após a incubação, as placas foram centrifugadas durante 10 segundos a 10000 g e subsequentemente as amostras foram transferidas para uma nova microplaca e as leituras foram feitas no comprimento de onda de 570 nm. A determinação do conteúdo de aminoácidos totais foi realizada utilizando-se uma curva padrão de Leucina.

#### 2.3.4 Determinação do teor de açúcares totais

Os níveis de glicose, frutose e sacarose foram determinados utilizando a fração solúvel em etanol como descrito por Fernie et al., (2001). 40  $\mu$  L do extrato bruto foram adicionados a um meio de reação contendo tampão HEPES / KOH 0,1 M pH 7, MgCl<sub>2</sub> (30 mM), ATP (60 mg mL<sup>-1</sup>), NADP (36 mg mL<sup>-1</sup>) e glicose -6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (70U mL<sup>-1</sup>). Determinou-se a absorvância a 340 nm em intervalos de um minuto. Uma vez que a absorvância foi estabilizada, adicionou-se hexoquinase (1,5 U / reação), fosfoglucose isomerase (0,7 U / reação) e invertase (5U / reação) para determinar a glicose, frutose e sacarose, respectivamente utilizando o programa SoftMax Pro, versão 4.8. Para calcular a concentração dos respectivos açúcares, utilizou-se a seguinte equação  $\mu$  mol NADPH =  $\Delta$  OD / (2,85 \* 6,22).

#### 2.3.5 Conteúdo de malato e fumarato

O teor de malato e fumarato foi determinado como descrito anteriormente por Nunes-Nesi et al. (2007). A mistura contendo tampão Tricina / KOH 0,4 M, pH 9; MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MTT (brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio) 10 mM, NAD<sup>+</sup> (60 mM), fenazinaetosulfato 20 mM, Triton X100 10% (v / v) e H<sub>2</sub>O foram adicionados a 25  $\mu$  L de extrato etanólicos num leitor de microplacas. As absorvâncias foram lidas a 570 nm em intervalos de um minuto. Uma vez estabilizada a absorvância, foi realizada uma adição sucessiva de malato desidrogenase (1U / reação) e fumarase (0,1U/reação). A concentração de malato e fumarato nas amostras foi calculada com base em curvas padrão.

### 2.3.6 Determinação de amido

O nível de amido foi determinado como descrito anteriormente segundo Fernie et al., (2001). O precipitado resultante da extração etanólica foi ressuspensão em NaOH 0,1 M e neutralizado com ácido acético 1 M. A mistura para a degradação de amido contendo as enzimas amiloglucosidase e  $\alpha$ -amilase diluída em acetato de sódio 0,5 M pH 4,0 foi adicionado 40  $\mu$  L de suspensão e incubada a 55 °C durante 60 min. As placas foram centrifugadas durante 10 segundos a 10 000 g e depois transferiram-se 50  $\mu$  L da suspensão para uma nova placa em que foi adicionado a cada poço 160  $\mu$  L de uma mistura contendo tampão HEPES/KOH 1M, pH 7,0, MgCl<sub>2</sub> (30 mM), ATP (60 mg/mL), NADP (36 mg/mL) e glucose-6-fosfato desidrogenase (0,7 U/  $\mu$  L). As absorvâncias foram lidas a 340 nm em intervalos de um minuto. Uma vez estabilizada a absorvância, a reação foi iniciada pela adição de hexoquinase (2U/poço). Para calcular a concentração de glicose, utilizou-se a seguinte equação:  $\mu$  mol NADPH =  $\Delta$  OD / (2,85 \* 6,22).

### 2.3.7 Determinação de proteínas totais

O teor de proteína foi determinado como em Cross et al. (2006). Inicialmente o precipitado resultante da extração etanólica, fração insolúvel em etanol, foi ressuspensão em NaOH 0,1 M, homogeneizado e incubado durante 1 hora a 95 °C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 16.000 g durante 5 minutos. Alíquota de 3  $\mu$  L de sobrenadante foi adicionada a uma microplaca contendo em cada poço 180  $\mu$  L de reagente Bradford (1/5). A absorvância foi determinada no comprimento de onda de 595 nm. O teor de proteína de cada amostra foi determinado utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

## 2.4 Análise de expressão gênica por RT-PCR quantitativa

Para extração de RNA total utilizou-se o reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante (Sigma). O RNA total extraído foi purificado usando DNase, eliminando contaminações por DNA (Q1 DNase RNase-free, Promega). A quantificação e pureza do RNA total extraído foram avaliadas por absorção de densidade óptica a 260 nm e 280 nm. A integridade do RNA total foi avaliada em gel de agarose 1% (p/v).

A síntese do cDNA foi realizada usando o kit ImpromII™ Transcriptase Reverse (Promega) e primer Oligo (dT)<sub>18</sub> como iniciador seguindo as recomendações do fabricante. PCR quantitativa foi realizada utilizando o kit Power Syber Green Master Mix. Para confirmar a especificidade e amplificação somente do gene de interesse, uma curva de desnaturação foi realizada imediatamente após a amplificação. As leituras foram realizadas por Applied Biosystem StepOnePlus™ Software v2.0. A expressão relativa foi normalizada utilizando dois genes de expressão constitutivos para normalização dos dados. A tabela abaixo resume os genes, e seus primers utilizados.

Gene	Locus	Primer Forward	Primer Reverse
IVDH	AT3G45300	CGGGTTCAGTTGCTTTGTCT	CCAGTGTTTCAGCAGATGGA
ETFQO	AT2G43400	AAAGCTATCTTCTTCTTCCACCA	GGTTGCAATCCCAACAACCTT
LKR/SDH	AT4G33150	TTCTCAGACAGTGTTCCCTCC	CTGCACCTTGTTTCAATGGTGC
TUB 09	AT4G20890	GATATCTGTTTCCGTACCTTGAAGC	CCGACTGTAGCATCTTGATATTGC

ETFQO-Electron-Transfer Flavoprotein; Ubiquinone Oxidoreductase; IVDH-Isovaleril-CoA; LKR/SDH-Lisina cetoglutaratato desidrogenase; TUB 09-Tubulina 09.

## 2.5. Ensaio de germinação

Para os ensaios de germinação, aproximadamente 125 sementes de cada genótipo foram esterilizadas (etanol a 70%, hipoclorito de sódio a 5%, Tween 20 e água destilada), embebidas em placas de Petri (n = 5) contendo meio MS (Murashige e Skoog, 1962), metade da força, pH 5,7, 1% de sacarose (controle), nos tratamento de estresse salino foram acrescentados as seguintes concentrações de sal ao meio MS: 50 mM, 150 mM e 250 mM de NaCl ao meio MS e todas as

placas de Petri foram mantidas no escuro durante 3 dias a 4 °C. Posteriormente as placas de foram transferidas para uma câmara de crescimento (150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 22 °C, 70% HR) em condições de dia longo (16 h luz / 8 h escuro). A avaliação da germinação das sementes começou um dia após a transferência das placas para a câmara de crescimento. As avaliações diárias ocorreram sempre ao meio dia e a germinação (emergência radicular) foi marcada até o sétimo dia após a estratificação.

## **2.6. Delineamento experimental e análises estatísticas**

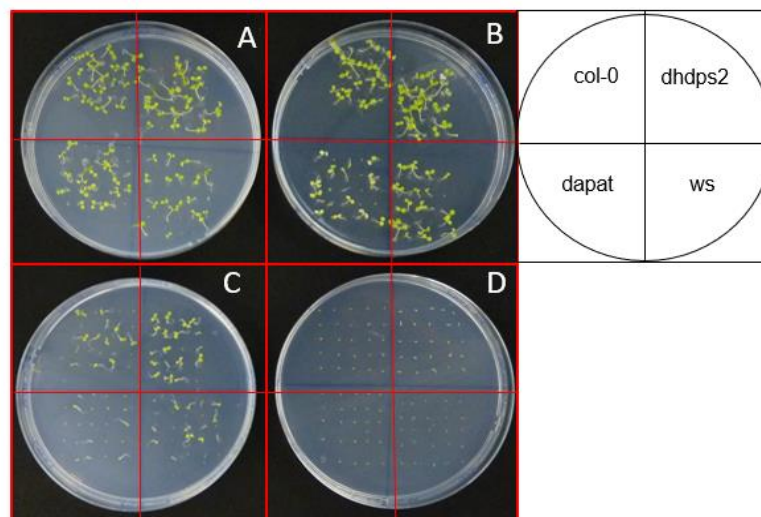
O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação entre médias realizado pelo teste t de Student a 5% de probabilidade (P<0,05), comparando sempre as linhagens mutantes ao tipo selvagem (WT), com auxílio dos algoritmos presentes no programa Microsoft Excel® (Microsoft, Seattle). Os gráficos foram produzidos utilizando o software SigmaPlot 12.0.

## **3. RESULTADOS**

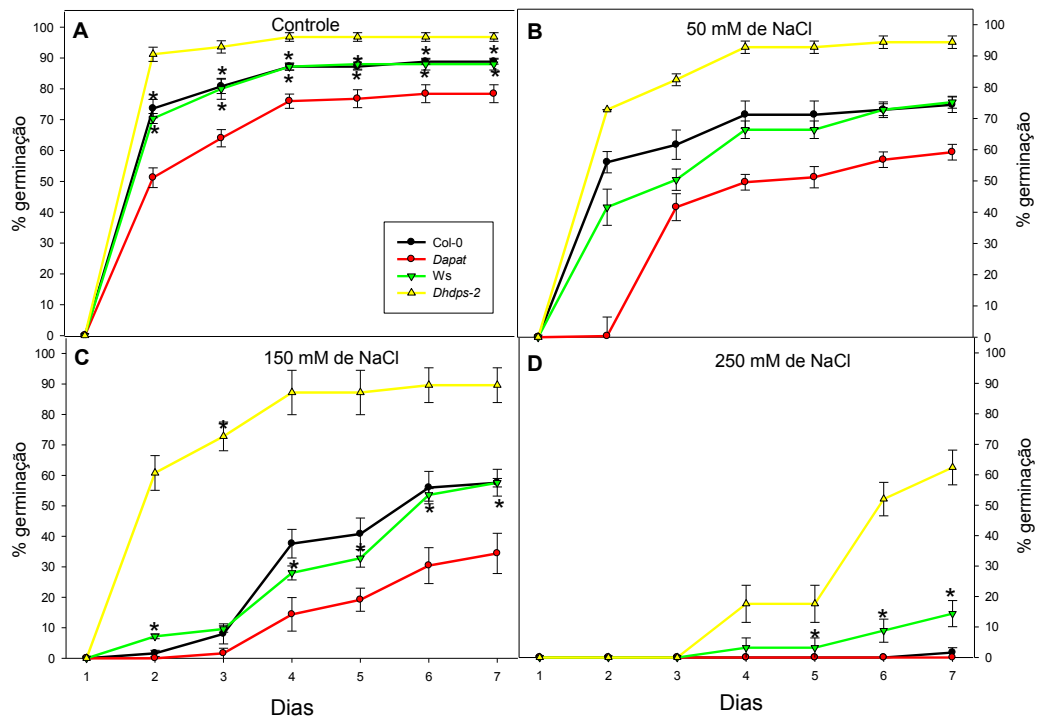
### **3.1 Ensaio de germinação**

Para análise dos efeitos do estresse salino na germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana*, três concentrações de NaCl (50, 150 e 250 mM) foram utilizadas. Os mutantes (i) *dapat*, (ii) *dhdps-2* foram analisados e comparados com seus respectivos tipos selvagens Columbia-0 (Col-0) e Wassilewskija (Ws), respectivamente. Uma simples inspeção visual dos genótipos mutantes comparando-os com seus respectivos WT, revela um padrão de crescimento diferenciado (Figura 1). Assim, à medida que as concentrações de NaCl aumentam, observou-se maiores reduções na germinação em plantas *dapat* confirmando, assim, que o aminoácido lisina tem estreita ligação com o crescimento e desenvolvimento em condições de estresse salino. Em condições controle ou seja, na ausência de sal, plantas *dapat* apresentam uma menor porcentagem de germinação quando comparado com WT (Figura 2). Nota-se também que as plantas *dapat* apresentam menor germinação que as plantas WT na presença de sal. De modo oposto, *dhdps-*

2 apresentou maior percentual de sementes germinadas em todos tratamentos (Figura 2), destacando-se no tratamento com 150 mM de NaCl (Figura 2C) onde foi obtido aproximadamente 90 % de sementes germinadas. Nesse contexto, diferentes padrões de germinação entre *dapat* e *dhdps-2* quando comparados com seus respectivos WT foram, portanto, observados, mostrando que mutações em diferentes enzimas da via de biossíntese de lisina, promovem respostas metabólicas divergentes e afetam a germinação de plântulas de *Arabidopsis thaliana*, particularmente em resposta ao estresse salino. É importante mencionar também que aumentos nas concentrações de NaCl (Figura 1, 2) promoveram um decréscimo significativo no número de sementes germinadas na linhagem mutante *dapat*, sem afetar grandemente plantas *dhdps-2*. Ademais, apenas o genótipo *dhdps-2* foi capaz de emitir radícula em presença de NaCl na concentração de 250 mM (Figura 2D).



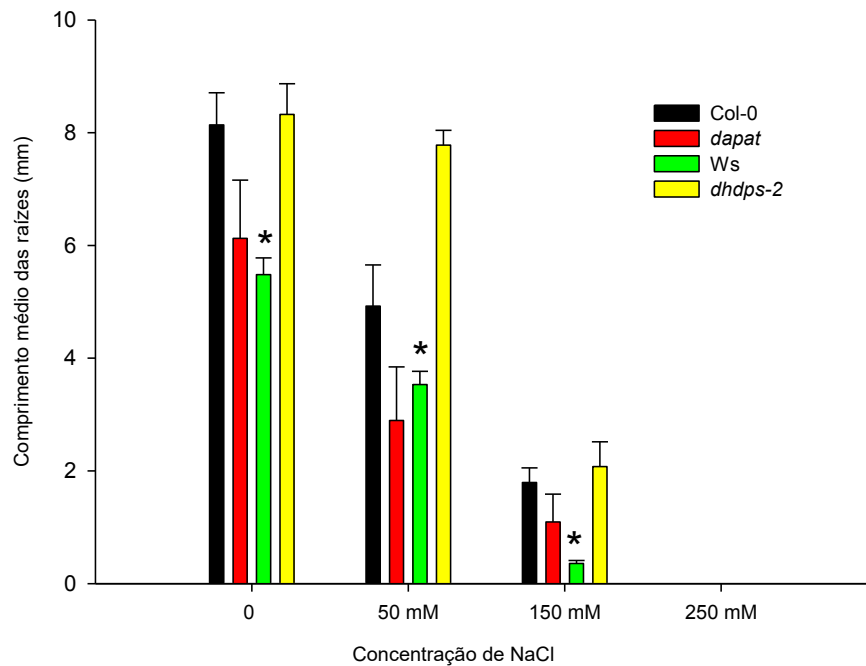
**Figura 1:** Imagens representativas do efeito do estresse salino nos ensaios de germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana* mutantes e plantas de tipo selvagem (WT), sob estresse salino. Imagens obtidas no sétimo dia após a germinação (final). (A) Controle, meio MS com ausência de NaCl; (B) 50 mM de NaCl; (C) 150 mM de NaCl; e (D) 250 mM de NaCl. Sementes dos tipos selvagens dos ecótipos Col-0 (Columbia-0) e Ws (Wallewinsky) e as linhagens mutantes correspondentes para biossíntese de lisina *dapat* e *dhdps2*, respectivamente, foram utilizadas.



**Figura 2.** Ensaio de germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana* cultivadas sob estresse salino. Tratamentos com NaCl, gráfico (A) 0 mM de NaCl (controle), (B) 50 mM de NaCl, (C) 150 mM de NaCl, (D) 250 mM de NaCl. Sementes dos tipos selvagens dos ecótipos Col-0 (Columbia-0) e Ws (Wallewinsky) e as linhagens mutantes correspondentes para biossíntese de lisina *dapat* e *dhdps2*, respectivamente, foram utilizadas. Asterisco (\*) indicam diferença significativa pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ) entre genótipos dentro da mesma concentração de NaCl em relação ao seu respectivo tipo selvagem (WT).

### 3.2 Crescimento de raiz

As reduções na atividade das enzimas na via de biossíntese de lisina, *dapat* e *dhdps-2*, influenciam no crescimento radicular em condições de estresse salino (Figura 3). De forma semelhante à cinética de germinação (Figura 1 e 2), *dhdps-2* apresentou um maior crescimento radicular quando comparado ao seu respectivo WT (Figura 3). Assim, concentrações crescentes de sal promoveram maiores inibições no crescimento radicular do mutante *dapat* sem, no entanto, observarem-se diferenças entre *dapat* e Col-0 nos tratamentos aqui avaliados (Figura 3).



**Figura 3.** Crescimento radicular de plântulas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas sob estresse salino. Tratamentos com NaCl, 0 mM, 50 mM, 150 mM, 250 mM de NaCl. Plântulas dos tipos selvagens dos ecótipos Col-0 (Columbia-0) e Ws (Wallewinskya) e as linhagens mutantes correspondentes para biossíntese de lisina *dapat* e *dhcps-2*, respectivamente, foram utilizadas. Asterisco (\*) indicam diferença significativa pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ) entre genótipos dentro da mesma concentração de NaCl em relação ao seu respectivo tipo selvagem (WT).

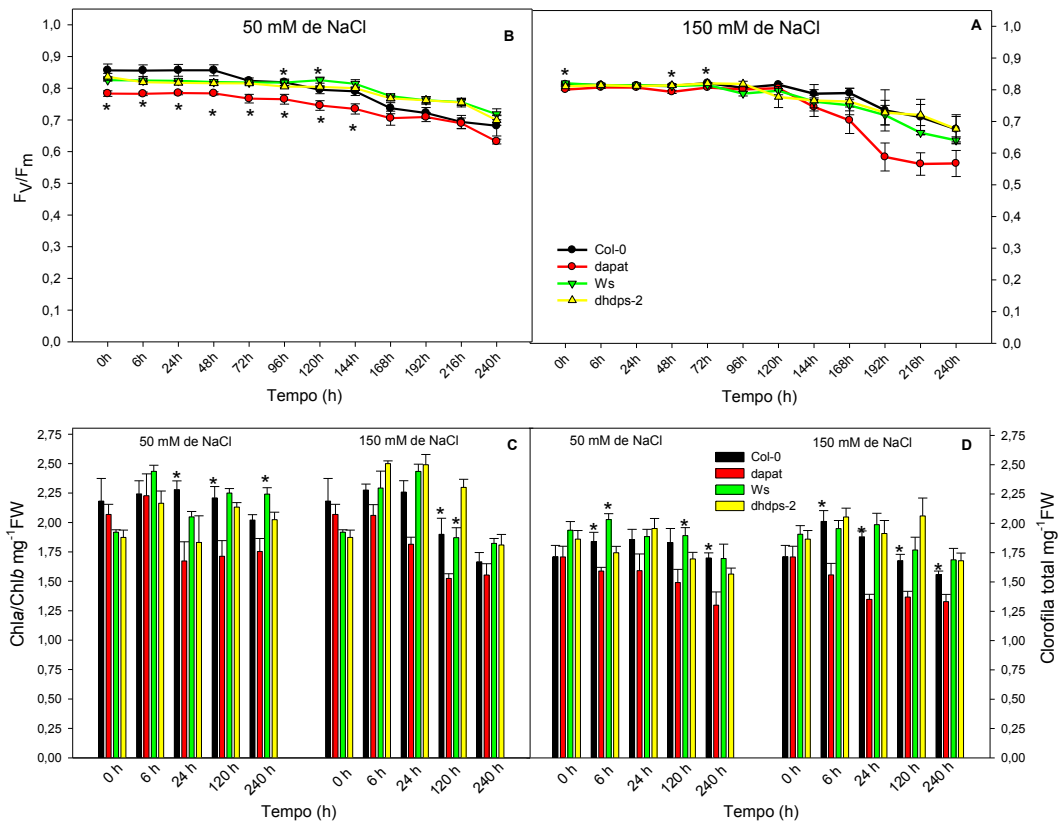
### 3.3 Determinação de pigmentos e parâmetros de fluorescência da clorofila *a*

Tendo em vista os impactos gerados pelo estresse salino ao aparato fotossintético, parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e determinação da eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) foram avaliados. Plantas do tipo selvagem e a linhagem mutante *dhcps-2* na ausência de sal (tratamento controle), mantiveram a razão  $F_v/F_m$  próxima aos valores padrões encontrados em plantas não estressadas ( $\sim 0,83$ ) (Björkman e Demmig, 1987), diferentemente, o mutante *dapat* apresentou uma baixa razão  $F_v/F_m$  ( $< 0,83$ ), sendo essa, características de plantas sob estresse (Figura 4A, B).

De forma geral, o estresse salino promoveu alterações na eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) em todos os genótipos analisados. Plantas *dapat* quando submetidas a estresse salino severo (150 mM de NaCl)

obtiveram uma significativa redução nos valores de  $F_v/F_m$  se diferindo estatisticamente de Col-0 (WT) nos tempos 48 h e 72h após ser submetida ao estresse salino (Figura 4B). Por outro lado, plantas *dhdps-2* mostraram-se mais tolerantes as condições estressantes geradas por diferentes concentrações de NaCl, apresentando valores de  $F_v/F_m$  semelhantes ao seu respectivo tipo selvagem (Figura 4B). Registre-se que ambos genótipos mutantes aqui estudados apresentaram diferenças significativas em  $F_v/F_m$  (Figura 4A) quando o estresse foi gerado por 50 mM de NaCl, sendo *dapat*, o mutante com maior sensibilidade ao sal como observado pelos baixos valores de  $F_v/F_m$  (Figura 4A). Plantas *dhdps-2* quando submetida ao estresse salino de 50 mM de NaCl apresentaram um comportamento semelhante ao seu respectivo WT (Figura 5B) observando-se diferenças significativas apenas após 96 h e 120 h em presença de estresse salino.

As concentrações de clorofila total bem como a razão clorofila *a/b* diferiram entre os respectivos WT e as plantas mutantes deficientes na biossíntese de lisina. No tratamento contendo 50 mM de NaCl, após 24 horas de exposição ao estresse salino, o teor de clorofila total e razão clorofila *a/b* (Figura 4C), foram significativamente reduzidos nos mutantes *dapat*, o que também pode ser observado às 120 horas (5 dias). No entanto, mutantes *dhdps-2* sob a presença de 50 mM de NaCl apresentaram um comportamento semelhante ao WT, mostrando reduções significativas na razão clorofila *a/b* apenas após 240 h (10 dias - Figura 4C). No entanto, quando o estresse salino aplicado foi de 150 mM de NaCl ambos genótipos mutantes diferiram significativamente de seus respectivos WT após 120 h (5 dias). Em relação aos teores de clorofilas totais (Figura 4D) apenas o mutante *dapat* diferiu significativamente de seu WT no tratamento com 150 mM de NaCl; no entanto, *dhdps-2* apresenta menores valores de clorofilas totais apenas 6 h e 120 h após exposição ao estresse salino moderado (Figura 4D). No tratamento com 50 mM de NaCl, *dapat* apresentou uma diminuição no teor de clorofilas totais após 6 e 240 h de exposição ao estresse salino, resultados significativos quando comparados à Col-0, seu respectivo WT (Figura 4D). Tomados em conjunto, tais resultados indicam que o estresse salino foi capaz de afetar o metabolismo fotossintético promovendo reduções significativas nos teores de clorofilas totais e na razão clorofila *a/b* em ambos mutantes aqui investigados.

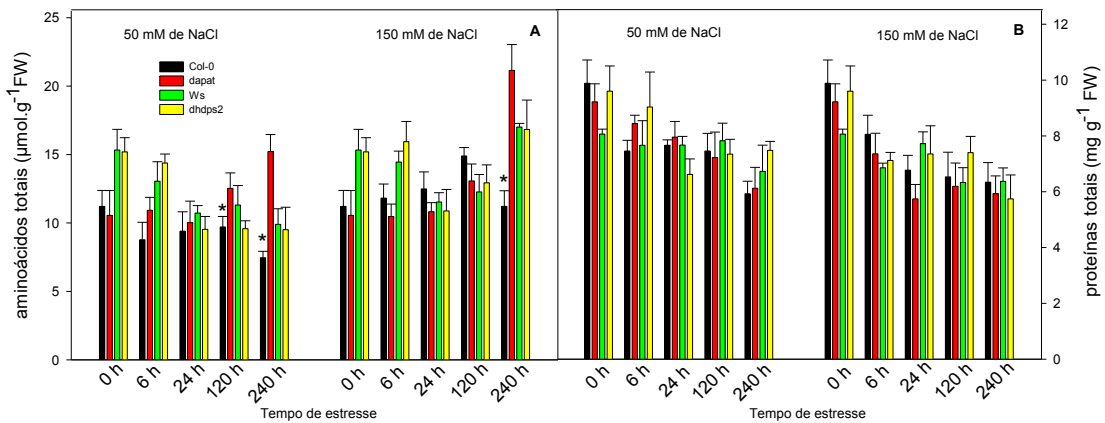


**Figura 4.** Variação na eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) em *Arabidopsis thaliana* cultivadas sob estresse salino. Tratamentos com NaCl, gráfico (A) 150 mM de NaCl, (B) 50 mM de NaCl, (C); Razão entre Chl *a* e Chl *b*. (D); Teor de clorofila total. Plantas dos tipos selvagens dos ecótipos Col-0 (Columbia-0) e Ws (Wallewinsky) e as linhagens mutantes correspondentes para biossíntese de lisina *dapt* e *dhps2*, respectivamente, foram utilizadas. Asterisco (\*) indicam diferença significativa pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ) entre genótipos dentro da mesma concentração de NaCl em relação ao seu respectivo tipo selvagem (WT).

### 3.4 Alterações metabólicas em resposta ao estresse salino

Em função das diferenças acima descritas uma análise metabólica foi realizada. Os níveis de aminoácidos e proteínas foram alterados nas folhas das plantas tratadas com diferentes concentrações de NaCl (Figura 5). No tratamento com 50 mM de NaCl (Figura 5A) foi observado aumento nos níveis de aminoácidos em plantas *dapt*, em relação ao seu respectivo WT, diferindo significativamente ao quinto e décimo dia (120 e 240 h, respectivamente). Por outro lado, nos outros genótipos os níveis de aminoácidos permaneceram praticamente estáveis. Padrão semelhante de aumento nos níveis de aminoácidos foi também observado no mutante *dapt*, ao décimo dia sob estresse com 150 mM de NaCl (Figura 5A).

Dentro do mesmo tratamento, plantas *dhdps-2* apresentaram um padrão de aumento do conteúdo de aminoácidos totais semelhantes ao seu respectivo WT (Figura 5A). Cabe ressaltar ainda que o estresse salino não promoveu nenhuma diferença estatística nos níveis de proteínas totais ao se comparar os mutantes com seus respectivos tipos selvagens. Não obstante, observa-se um padrão de reduções nos níveis de proteínas, comumente observado em plantas estressadas, no decorrer do tempo e em ambos tratamentos de estresse salino (Figura 5B).



**Figura 5:** Variação no conteúdo de proteínas totais e aminoácidos totais em *Arabidopsis thaliana* cultivadas sob estresse salino. Foram analisados: gráfico (A) teor de aminoácidos totais. (B) teor de proteínas totais. Plantas dos tipos selvagens dos ecótipos Col-0 (Columbia-0) e Ws (Wallewinsky) e as linhagens mutantes correspondentes para biossíntese de lisina *dapat* e *dhdps2*, respectivamente, foram utilizadas. Asterisco (\*) indicam diferença significativa pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ) entre genótipos dentro da mesma concentração de NaCl em relação ao seu respectivo tipo selvagem (WT).

Mutantes *dapat* e *dhdps-2* ao serem submetidos ao estresse salino apresentaram diferentes níveis de glicose e frutose (Figura 6A, B). Assim, o estresse salino na concentração de 50 mM de NaCl promoveu uma considerável redução no conteúdo de glicose (Figura 6A) no mutante *dapat* ao ser comparado ao seu respectivo WT (significativos após 0, 120 e 240 h). De modo similar, o tratamento com 150 mM de NaCl promoveu reduções significativas nos teores de glicose no ponto inicial (0 h) até as 24 horas. Nos demais intervalos de tempo aqui avaliados os níveis de glicose aumentam, mas o estresse não está associado às diferenças entre *dapat* e seu respectivo WT. Cabe mencionar também que plantas *dhdps2*

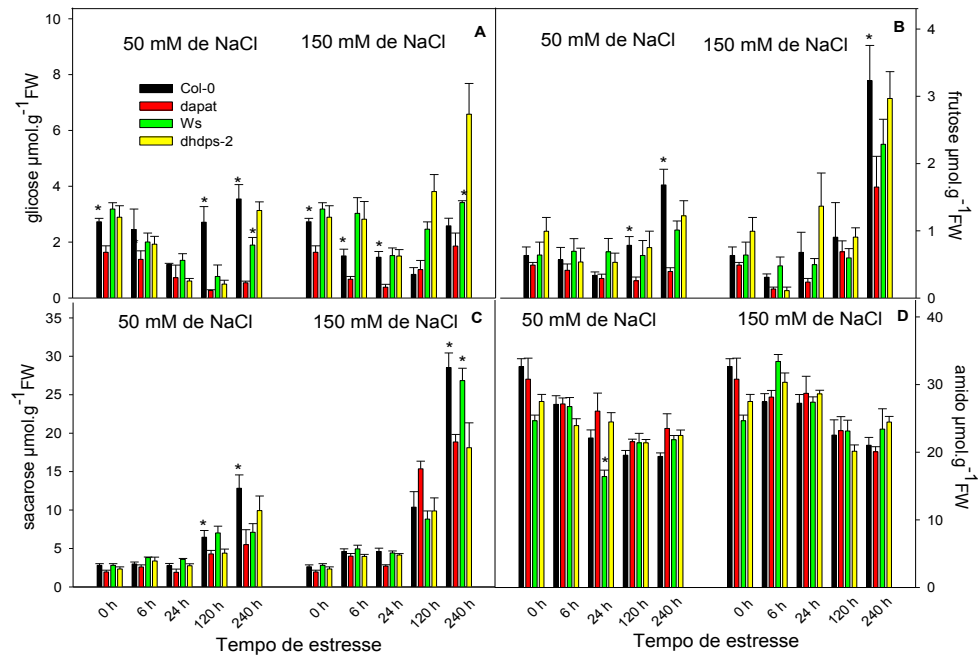
apresentaram aumento significativo nos teores de glicose ao décimo dia nas duas concentrações de sal aqui utilizadas.

Os genótipos mutantes (*dapat* e *dhdps-2*) apresentaram diferenças significativas no conteúdo de glicose quando comparados com seus respectivos tipos selvagens (Figura 6A). Foi observado reduções nos níveis de glicose dos mutantes *dapat* quando submetidos à estresse salino de 50 mM de NaCl, diferindo assim estatisticamente de WT nas condições controle (0 h), 120 e 240 horas após serem submetidas aos tratamentos com solução salina. No tratamento de 150 mM de NaCl, apenas *dapat* diferiu estatisticamente de WT nos tempos de 0; 6 e 24 h submetidos ao estresse salino, apresentando assim os menores níveis de acúmulo de glicose (Figura 6A). Plantas mutantes *dhdps-2* obtiveram aumentos significativos ao décimo dia em ambos tratamentos (50 e 150 mM de NaCl).

Observa-se diferenças significativas nos níveis de frutose apenas em plantas mutantes *dapat*, quando comparadas com WT, no quinto e décimo dia (120 e 240 h, respectivamente) no tratamento de 50 mM de NaCl e ao décimo dia no tratamento com 150 mM de NaCl (Figura 6B).

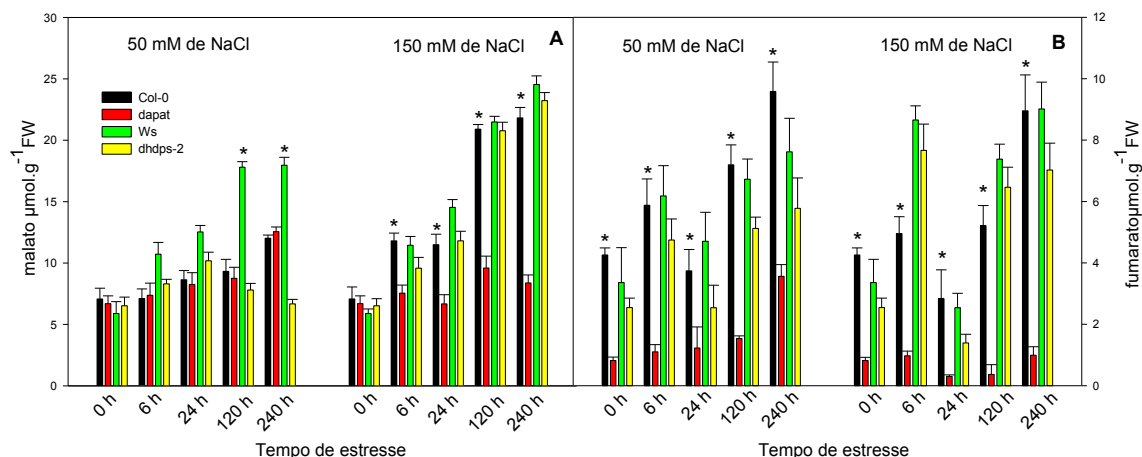
O tratamento de 150 mM de NaCl implicou em um acúmulo de sacarose nos mutantes *dapat* e *dhdps-2* ao final do décimo dia de exposição ao estresse salino e ambos genótipos mutantes diferiram estatisticamente de seus respectivos WT (Figura 6C). Entretanto, sob condições de estresse moderado (50 Mm de NaCl), apenas o mutante *dapat* apresenta-se diferente do seu respectivo WT, apresentando menores níveis de sacarose ao final do quinto e décimo dia sob estresse salino (Figura 6C).

Ao se analisar a Figura 6D, observa-se que as reduções nos níveis de amido são semelhantes entre os mutantes e seus respectivos tipos selvagens. Cabe mencionar, no entanto, que apenas o mutante *dhdps-2* após 24 h sob estresse salino moderado, apresentou maior conteúdo de amido quando comparado ao seu respectivo WT.



**Figura 6:** Variação no conteúdo de metabólitos em *Arabidopsis thaliana* cultivadas sob estresse salino. Foram analisados: gráfico (A) glicose; (B) frutose; (C) sacarose; (D) amido. Plantas dos tipos selvagens dos ecótipos Col-0 (Columbia-0) e Ws (Wallewinsky) e as linhagens mutantes correspondentes para biossíntese de lisina *dapt* e *dhgps-2*, respectivamente, foram utilizadas. Asterisco (\*) indicam diferença significativa pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ) entre genótipos dentro da mesma concentração de NaCl em relação ao seu respectivo tipo selvagem (WT).

Aumentos significativos nos níveis de ácidos orgânicos (Figura 7) foram observados em plantas selvagens ao longo da exposição ao estresse salino, aumento esse ainda mais pronunciado em plantas Ws. Por outro lado, mutantes *dapt* na presença de 150 mM de NaCl foram caracterizados por baixos níveis de malato (Figura 7A) e fumarato (Figura 7B) diferindo-se estatisticamente do seu respectivo tipo selvagem (Col-0) em todos os tempos aqui investigados na presença de estresse salino. Em relação ao mutante *dhgps-2*, observa-se os maiores teores de malato (Figura 7A) ao quinto e décimo dia sob estresse salino de 50 mM de NaCl.



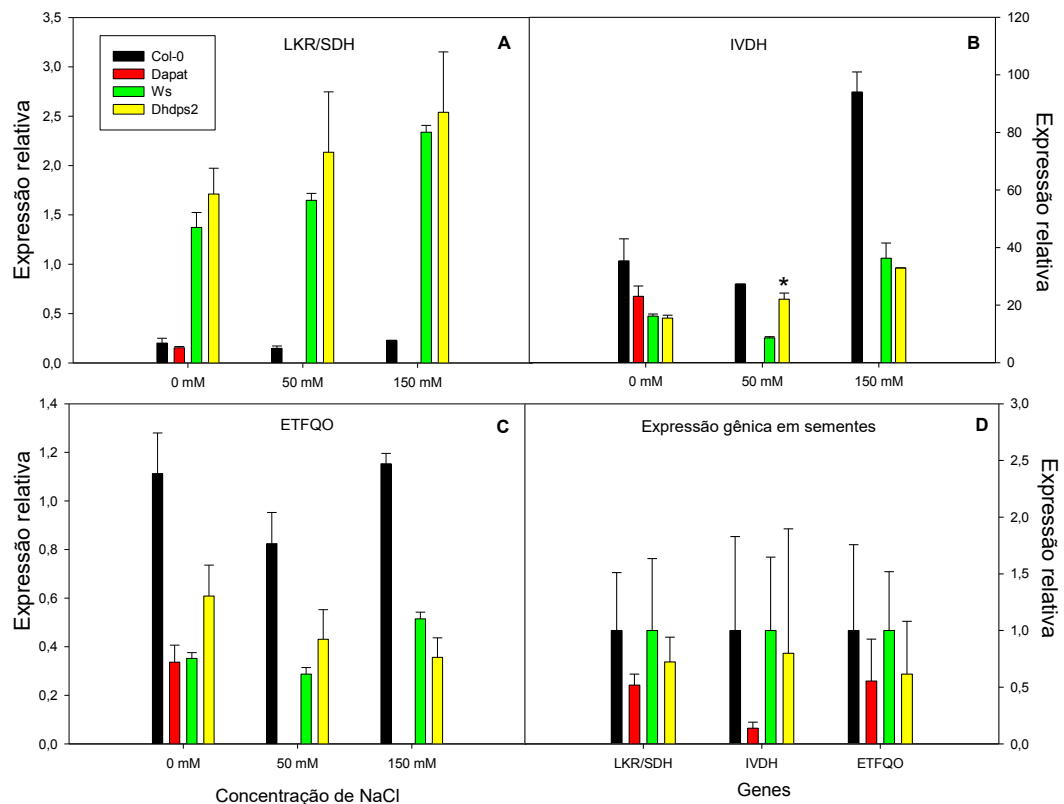
**Figura 7:** Variação no conteúdo de ácidos orgânicos em *Arabidopsis thaliana* cultivadas sob estresse salino. Foram analisados: gráfico (A) malato (B); fumarato. Plantas dos tipos selvagens dos ecótipos Col-0 (Columbia-0) e Ws (Wallewinsky) e as linhagens mutantes correspondentes para biossíntese de lisina *dpat* e *dhds2*, respectivamente, foram utilizadas. Asterisco (\*) indicam diferença significativa pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ) entre genótipos dentro da mesma concentração de NaCl em relação ao seu respectivo tipo selvagem (WT).

### 3.5 Análise de expressão gênica

A expressão dos genes LKR/SDH, IVDH e ETFQO foi analisada via RT-PCR quantitativo (Figura 8). Registre-se também que o estresse salino afetou, de forma extrema, a germinação em *dpat* (Figura 1 e 2) e, assim, não foi possível obter material vegetal suficiente para análises de expressão nos tratamentos com 150 e 250 mM de NaCl, mostrando assim que a via de biossíntese de lisina possui um papel importante na germinação de sementes em condições de estresse salino. A expressão dos genes LKR/SDH em Col-0 e *dpat* foi relativamente baixa e similar entre tais genótipos e em Col-0 não se observaram variações independentemente da presença de sal (Figura 8A). Por outro lado, *Ws* e *dhds2* mostraram uma alta e crescente expressão de LKR/SDH em resposta a incrementos nas concentrações de sal (Figura 8A). No entanto, a expressão de LKR/SDH em plântulas não foi significativamente diferente para nenhuma das concentrações testadas nesses genótipos. Nota-se que na ausência de sal os níveis de transcrição de IVDH difere entre os genótipos Col-0 e *dpat*, sendo menor no mutante com nenhuma diferença entre *Ws* e *dhds2* (Figura 8B). Na concentração de 50 mM de

NaCl foi observado que a expressão de IVDH se manteve praticamente similar aos níveis observados na ausência de sal em Col-0 e Ws ao passo que *dhdps-2* incrementos na expressão de IVDH em presença de sal, diferindo significativamente do seu respectivo tipo selvagem, Ws (Figura 8B). Em presença de 150 mM de NaCl, grandes incrementos na expressão de IVDH foram observados em plantas Col-0 ao passo que *dhdps-2* obteve maiores níveis de transcrição de IVDH mas os valores não diferiram do seu respectivo tipo selvagem, Ws. Ao se avaliar os níveis de transcrição de ETFQO (Figura 8C), verificou-se que na ausência de sal a expressão é significativamente maior em Col-0 que em *dapat* ao passo que entre *dhdps-2* e Ws não se observaram diferenças em nenhum tratamento (Figura 8C). Foi observado expressão de LKR/SDH em sementes secas (Figura 8D), mas os mutantes analisados não diferiram estatisticamente de WT.

Em função dos impactos gerados pelo estresse salino na cinética de germinação das sementes e no crescimento radicular de plântulas *Arabidopsis thaliana* mutantes, foram realizadas análises dos níveis de transcrição de IVDH, ETFQO e LKR/SDH em sementes secas (Figura 8D). Embora os mutantes analisados não diferem de seus respectivos tipos selvagens no que respeita a expressão desses genes, novamente o mutante *dapat* apresentou valores inferiores nos níveis de transcrição de enzimas relacionadas ao catabolismo de lisina.



**Figura 8:** Níveis de transcrição de genes relacionados ao catabolismo de lisina em plântulas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas sob estresse salino. Plântulas dos tipos selvagens dos ecótipos Col-0 (Columbia-0) e Ws (Wallewinsky) e as linhagens mutantes correspondentes para biossíntese de lisina *dapat* e *dhbps2*, respectivamente, foram utilizadas. Asterisco (\*) indicam diferença significativa pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ) entre genótipos dentro da mesma concentração de NaCl em relação ao seu respectivo tipo selvagem (WT).

#### 4. DISCUSSÃO

Além de serem os principais constituintes das proteínas, os aminoácidos desempenham também diversas funções necessárias para a manutenção da homeostase celular (Galili et al., 2014; Häusler et al., 2014; Pratelli e Pilot, 2014). É importante mencionar também que, através de seu catabolismo, aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) e lisina podem minimizar os efeitos negativos causados pelo déficit de carbono. Isso ocorre, principalmente, através do direcionamento dos elétrons oriundos do seu catabolismo para a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e/ou mediante a formação de compostos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), (Hildebrandt et al., 2015). Neste contexto, lisina, um

aminoácido essencial muito requerido na dieta de humanos e animais e que apresenta uma relativamente baixa concentração nos endospermas de sementes de cereais, tem sido alvo recorrente de estudos que buscam minimizar e/ou evitar seu catabolismo (Zhu e Galili, 2003). Registre-se também que a degradação de aminoácidos não tem como função apenas regular os seus níveis nas células, mas também apresenta uma estreita ligação com processos ligados ao crescimento, desenvolvimento e respostas a mudanças ambientais (Fornazier et al., 2003). Assim, o presente trabalho buscou investigar a importância da degradação de lisina como uma forma de tolerar situações de estresse salino. Registre-se também que pouco, ou nada, se sabe acerca das implicações ocasionadas pelo estresse salino ao metabolismo e crescimento, de forma geral, em plantas com reduzida biossíntese de lisina. Nesse contexto, mutantes *dhdps-2* e *dapat* que possuem baixa atividade das enzimas *dihidropicolinato sintase* (DHDPS), *L,L-diaminopimelate aminotransferase* (LL-DAPAT), respectivamente, apresentam-se como ferramentas adequadas para se entender o papel desse importante aminoácido, lisina, nas respostas ao estresse salino. A redução na expressão dessas enzimas mostrou que as crescentes concentrações de NaCl reduziram a porcentagem de sementes germinadas (Figura 1, 2).

Os resultados de cinética de germinação mostram que *dhdps-2* sofreu menos com as crescentes concentrações de NaCl, com isso teve uma pequena redução no número de sementes germinadas nos meios controles (sem NaCl), 50 e 150 mM (Figura 1, 2). No ensaio de germinação de sementes utilizando a concentração de 250 mM de NaCl, o mutante *dhdps-2* obteve uma alta porcentagem de sementes com emissão radícula (Figura 2D). Tal redução na formação de parte aérea em todos os genótipos em presença de 250 mM de NaCl se deve, muito provavelmente, pelo fato de que o estresse salino afeta todos os estágios de crescimento das plantas, sendo a germinação e o estágio de plântula os mais sensíveis a esse estresse (Cuatero et al., 2006). Assim, a salinidade do meio onde as sementes foram cultivadas gerou um potencial osmótico menor que o endosperma das sementes impedindo, assim, a absorção de água e reduzindo a utilização das reservas. Em conjunto, tais fatores promovem estresse iônico pelo excesso de sódio

e cloreto que, ao se acumularem nas células, tornam-se sobremodo tóxicos (Bouaziz e Hicks, 1990; Begum e Venudevan, 2013).

Em plântulas além dos efeitos anteriormente citados,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  causam um desequilíbrio na absorção de nutrientes (Tester e Davenport, 2003). Os resultados aqui obtidos demonstram que o genótipo *dapat* apresenta uma reduzida cinética de germinação, o que se observa inclusive quando cultivados em meio sem a adição de sal (Figura 2A). Cumpre mencionar que isso, provavelmente, acontece pelo fato que plantas *dapat* simulam uma condição de estresse constante (Rate et al., 2001). Assim, plantas *dapat* possuem baixa biossíntese de lisina devido a atividade reduzida da enzima LL-DAPAT, uma das enzimas presentes na rota de biossíntese de lisina (Rate e Greenberg, 2001; Song et al., 2004). Resultados anteriores demonstram que tanto o perfil metabólico, protéico e transcricional de plantas *dapat* sob condições ótimas de cultivo estariam intimamente associados a aqueles observados em plantas sob condições de estresse (Cavalcanti, 2015). Não obstante, o mecanismo preciso associado a esse fenótipo não se apresenta claramente definido estando, muito possivelmente, ligado a limitações energéticas.

Ao final do experimento plantas *dhdps-2* apresentam uma maior porcentagem de sementes germinadas e isso pode ser observado em todas as tratamentos com diferentes concentrações de NaCl (Figura 1, 2). Uma possível explicação para esse fenótipo pode estar associada ao acúmulo de compostos provenientes da via do aspartato, sendo a treonina, o aminoácido mais acumulado em plantas mutantes *dhdps-2* (Sarrobot et al., 2000). Neste contexto, metionina e treonina são aminoácidos importantes para a biossíntese de isoleucina, sendo a isoleucina um dos substratos alternativos que podem ser utilizados para otimização de processos respiratórios em condições de déficit de carbono (Hildebrandt et al., 2015). A importância da treonina, um aminoácido importante para biossíntese de maior parte da isoleucina presente em tecidos vegetais, foi comprovada reduzindo-se a sua biossíntese através herbicidas letais à enzima *treonina desaminase*. Tais estudos comprovaram que a metionina desempenha um papel menos importante na via de biossíntese de isoleucina, ao passo que treonina é o aminoácido responsável pela geração de maior parte da isoleucina presente em células vegetais (Szamosi et al., 1994; Mourad et al., 1995). Assim, é plausível sugerir que plântulas *dhdps-2* se

aclimataram melhor em condições de estresse salino devido ao maior conteúdo de treonina livre (Sarrobot et al., 2000). Para tanto, treonina pode ser direcionada para biossíntese de isoleucina que atuaria como substrato alternativo para processos respiratórios via ETF/ETFQO, mitigando assim os efeitos causados pelo estresse salino (Hildebrandt et al., 2015). Lisina é um importante substrato para respiração alternativa ao fornecer elétrons para o complexo ETF/ETFQO através de seu catabolismo via LKR/SDH (Araújo et al., 2010). Cabe mencionar que a respiração alternativa tem sido extensivamente associada a homeostase celular em condições de déficit de carbono (Barros et al., 2017a). Os resultados aqui obtidos permitem sugerir também um papel dessa via alternativa em condições de estresse salino.

Solos com concentrações em torno de 40 mM de NaCl geram uma pressão osmótica de aproximadamente 0,2 MPA, o que culmina em um estresse osmótico capaz de inibir a germinação de sementes e promover largas alterações na fisiologia e anatomia não apenas das raízes, mas também da parte aérea (Munns e Tester, 2008). Nesse contexto, o estresse salino atua semelhante ao déficit hídrico ao interferir no crescimento das raízes, inibindo a divisão celular (Galvan-Ampudia e Testerink, 2011). Pode-se observar que o sistema radicular dos mutante *dhdps-2* sofreram menos com os efeitos do estresse salino na medida que as concentrações de NaCl aumentaram (Figura 3). Nas maiores concentrações de NaCl observou-se também uma maior inibição do crescimento radicular das plântulas dos mutantes *dapat* (Figura S1C), ao passo que sob condições de estresse severo (250 mM de NaCl) a germinação em todos genótipos é comprometida, sendo *dhdps-2* o menos afetado (Figura 3). Tomados em conjunto, os resultados aqui obtidos sugerem um papel preponderante do metabolismo de lisina associado à tolerância ao estresse salino. Considerando a importância da degradação de lisina como uma forma de tolerar estresse salino, uma análise dos níveis de transcrição foi realizada nas enzimas relacionados ao catabolismo de lisina utilizando plântulas mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Plântulas *dapat* e *dhdps-2* divergiram quanto aos valores de expressão da enzima *Lisina-oxoglutarato redutase / sacaropina desidrogenase* (LKR/SDH) em comparação com seus respectivos tipos selvagens (Figura 8A). Sementes do mutante *dapat* apresentaram uma maior sensibilidade ao estresse salino, tendo assim uma baixa porcentagem de sementes germinadas quando postas

em meio contendo NaCl (Figura 1, 2), impossibilitando assim a análise de expressão gênica devido a baixa quantidade de material vegetal para coleta. Em conjunto, isso mostra a importância de degradação lisina via LKR/SDH para germinação de sementes e estabelecimento das plântulas em condições de estresse osmótico (Moulin et al., 2006; Battur et al., 2009). LKR/SDH atuam nas primeiras reações associadas ao processo de degradação de lisina (Hildebrandt et al., 2015), trabalhos mostram que plantas onde os genes que codificam LKR/SDH foram reprimidos apresentaram uma baixa germinação de suas sementes e crescimento anormal das plântulas (Zhu e Galili, 2003). Resumidamente, a mutação das plantas *dapat*, gera uma alteração na atividade da enzima LL-DAPAT, em consequência disso, há uma redução na biossíntese de lisina, levando assim, a uma menor disponibilidade de substrato (lisina) para induzir a atividade de LKR/SDH, culminando em um decréscimo na formação de compostos osmorreguladores como ácido piperídico e glutamato. Salienta-se que o ácido piperídico, proveniente do  $\alpha$ -aminoácido, tem reconhecida função osmorreguladora e está presente em grandes concentrações nas plantas halófitas sob estresse hiperosmótico (Fukutoku e Yamada, 1981; Návarvá et al., 2012). Por outro lado, glutamato é o principal precursor da biossíntese de prolina, que é um soluto compatível e induz a uma maior tolerância a estresses osmóticos (Hare e Cress, 1997; Fornazier et al., 2003). Portanto, as baixas concentrações de lisina, que são características inerentes aos mutantes *dapat*, tornaram tais plantas mais sensíveis ao estresse salino (Figura 8A). Ademais, a reduzida disponibilidade de lisina parece não ter sido suficiente para induzir a expressão de LKR/SDH e, conseqüentemente, gerou uma redução na biossíntese de ácido piperídico e glutamato diminuindo assim a capacidade de germinação em meio salino

Diferente dos mutantes *dapat*, *dhdps-2* apresentou maior atividade de LKR/SDH (Figura 8A). É plausível sugerir que devido a existência de DHDPS1, que é um gene ortólogo à DHDPS2 (Craciun et al., 2000), responsável por 30% da atividade total da enzima DHDPS, tenha sido responsável pela biossíntese de uma quantidade de lisina suficientemente capaz de induzir a atividade de LKR/SDH, enzima envolvida na degradação de lisina (Jones-Held et al., 2012). Tal fato pode

ser observado em sementes *dhdps-2*, onde a atividade de LKR/SDH não diferiu de seu tipo selvagem *Ws* (Figura 8A).

A expressão da enzima *isovaleriu-CoA desidrogenase* (IVDH) em plântulas e sementes *dapat* tende a serem maior que em seu respectivo tipo selvagem (Figura 8B). Cabe mencionar novamente que IVDH é uma desidrogenase envolvida na degradação de lisina, BCAAs e fitol, atuando na doação de elétrons para o *pool* de ubiquinona via complexo ETF/ETFQO (Araújo et al., 2010). A expressão dessa desidrogenase foi observado em plântulas e sementes Col-0 e mutantes *dhdps-2* (Figura 8C, D). Uma característica dos mutantes *dhdps-2* é um maior acúmulo de treonina (Craciun et al., 2000), um composto intermediário na via de biossíntese de isoleucina, que também pode atuar como substrato alternativo para processos respiratórios em condições de estresse salino, via IVDH e ETF/ETFQO fornecendo elétrons para cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (mETC) (Singh et al., 1995; Barros et al., 2017b). Por outro lado, sementes secas *dhdps-2* e *Ws* apresentam atividade de IVDH semelhantes, sendo assim, é possível que mesmo produzindo quantidades relativamente pequenas de aminoácidos, a degradação de proteínas, que comumente ocorre em plantas estressadas, é capaz de induzir a atividade de IVDH (Weigelt et al., 2008).

Ambos genótipos mutantes apresentaram expressão de ETFQO em plântulas e sementes (Figura 8C). ETFQO é uma proteína mitocondrial que recebe elétrons de *flavoproteína de transferência de elétrons* (ETF) localizado na matriz mitocondrial. Assim, ao receber os elétrons de ETF presente na matriz mitocondrial, ETFQO reduz ubiquinona (Beckmann e Frerman 1985; Ishizaki et al., 2005). Em plantas, o complexo ETF-ETFQO é abastecido com elétrons provenientes de duas desidrogenases doadoras de elétrons, IVDH e 2-hidroxiglutarato desidrogenase (D2HGDH). Em condições de reduzida biossíntese de sacarose, ETFQO é essencial para sobrevivência de plantas submetidas a senescência induzida pelo escuro (Buchanan, 2005; Araújo et al., 2010). O envolvimento do sistema ETF-ETFQO está associado à degradação de aminoácidos de cadeia ramificada e lisina, mantendo o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial em condições de déficit de carbono, déficit esse que no

caso foi gerado pelo estresse salino (Flowers, 2004; Rasmusson et al., 2008; Araujo et al., 2010).

Após as análises realizadas com plântulas e sementes, as implicações causadas ao metabolismo pelo estresse salino moderado e severo (50 e 150 mM de NaCl, respectivamente) foram estudadas em plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* mutantes *dapat* e *dhdps-2* comparando-os com seus respectivos tipos selvagens. Ao final de 240 horas (10 dias) de estresse salino, ambos genótipos mutantes e seus respectivos tipos selvagens apresentaram reduções na razão  $F_v/F_m$ , teor total de clorofilas e na razão clorofila *a* / clorofila *b*. Em conjunto, tais resultados indicam que o estresse salino afetou os processos fotossintéticos. Todos genótipos cultivados em condições normais (0 h) mostraram uma boa conversão da energia luminosa a nível de fotossistema II (PSII), apresentando uma razão  $F_v/F_m$  adequada, variando entre 0,75 e 0,85; (Figura 4A, B). Entretanto, em condições de estresse biótico ou abiótico é comum reduções nos valores de  $F_v/F_m$  (Baker, 2008). Os resultados aqui obtidos demonstram que, no decorrer do tempo, o estresse salino moderado e severo geraram fotoinibição crônica em todos genótipos analisados (Figura 4A, B). Devido a não recuperação dos danos fotoinibitórios causados pelo estresse, ocorreram assim declínios progressivos nos valores de  $F_v/F_m$  que parecem estar relacionados com o aumento em  $F_0$  (fluorescência inicial) ou diminuição em  $F_m$  (fluorescência máxima), mostrando assim a ocorrência de danos à proteína D1 presente no PSII. (Thiele e Krause, 1996; Xu e Wu, 1996). Plantas mutantes *dapat* apresentaram um declínio mais rápido nos valores de  $F_v/F_m$  no decorrer do tempo, juntamente com maior degradação de pigmentos (Figura 4A, B). Tal redução no teor de clorofilas está possivelmente ligada aos danos fotooxidativos gerados pelo excesso de sal e isso explica, ao menos em parte, as reduções nas concentrações de amido aqui observada (Figura 6D) (Krause, 1988; Ottander et al., 1995; Kranner et al., 2002).

Curiosamente, plantas *dhdps-2* parecem ser mais tolerantes aos danos causados pelo estresse salino (Figura 4). Como citado anteriormente uma possível explicação para isso seria que a atividade de DHDPS1 esteja suprimindo as necessidades de lisina requeridas para os processos metabólicos e contribuindo assim, para a homeostase celular dos mutantes *dhdps-2*. Registre-se também que

lisina pode atuar como substrato alternativo, através de seu catabolismo, fornecendo elétrons para cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (mETC) e/ou compostos intermediários para o ciclo do TCA, sendo que esses processos ocorrem principalmente devido ao desbalanço entre processos fotossintéticos e respiratórios gerados por estresses vários (Jones-Held et al., 2012; Araújo et al., 2015; Vanlerberghe, 2013).

Sabe-se que o estresse salino leva a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e que os danos causados por EROs culminam na inibição de diversos processos bioquímicos, moleculares e fisiológicos (Monteiro et al., 2011). Assim, caso os mecanismos de defesa não eliminem EROs, reações fitotóxicas ocorrem, causando peroxidação de lipídios, mutações no DNA e degradação de proteínas (Hefny e Abdel-Kader, 2009; Tanou et al., 2009; Ahmad et al., 2010; Ahmad et al., 2012). Como pode-se observar na Figura 5 o estresse salino culminou na degradação de proteínas e acúmulo de aminoácidos, muito provavelmente associados a estresse oxidativo existente em todos genótipos. Cabe mencionar também que alguns aminoácidos acumulados durante situações de estresse, podem atuar como osmorreguladores (Lugan et al., 2010). O estresse salino severo gerou um aumento progressivo de aminoácidos (Figura 5A), principalmente nos mutantes *dapat*, mesmo esse genótipo tendo baixos níveis de lisina, devido a uma mutação na enzima LL-DAPAT (Craciun et al., 2000). Tais plantas apresentaram um alto acúmulo de aminoácidos totais (Figura 5A), principalmente ao décimo dia em condições de estresse salino severo. Embora as causas desse acúmulo não sejam evidentes com os resultados aqui apresentados, trabalhos posteriores devem investigar em detalhes tais respostas. Não obstante, é plausível que a ocorrência desse fenômeno se deva ao fato da maior sensibilidade de *dapat* ao estresse salino, provocando assim uma maior degradação de proteínas (Widodo et al., 2009).

Em condições de estresse salino as plantas realizam um ajustamento osmótico para evitar uma maior perda de água e assim, manter sua turgescência das células. Para tanto, diversas classes de açúcares são acumuladas para atuarem como moléculas osmorreguladoras (e.g. glicose, rafinose, manitol) (Yang et al., 2010). Neste sentido, resultados semelhantes puderam ser observados nos mutantes *dhdps-2* cujo acúmulo progressivo de glicose foi observado (Figura 6A). De forma

diferente, o mutante *dapat* apresentou-se mais sensível ao estresse salino associado a níveis relativamente baixos de glicose quando comparado à Col-0 (Figura 6A). Tais resultados podem estar associados as maiores reduções nos valores de  $F_v/F_m$  (Figura 4A, B) e aos menores teores de clorofilas totais (Figura 4D). Segundo Rizhsky et al., (2004) sacarose, em determinadas condições, pode substituir prolina, desempenhando o papel de uma molécula osmorreguladora. Assim, aumentos progressivos foram observados nos teores de sacarose, em todos genótipos, principalmente ao quinto e décimo dia de estresse (Figura 6C), sendo assim, explicando, ao menos parcialmente, os fenótipos observados aqui.

O estresse salino também causou um acúmulo de ácidos orgânicos nos mutantes *dhdps-2* ao longo do tempo e nos mutantes *dapat* esse acúmulo é pode ser observado apenas nos tratamentos com 50 mM de NaCl (Figura 7). Dado os papéis desses ácidos orgânicos em condições de estresse, mantendo o metabolismo respiratório em níveis basais (Venekamp et al., 1989; Pracharoenwattana et al., 2010) é possível também que a maior tolerância ao sal observada em *dhdps-2* se deva, ao menos parcialmente, a um acúmulo de malato e fumarato em resposta ao estresse salino. Em síntese, muitas são ainda as dúvidas acerca da maior tolerância ao estresse salino observada nos mutantes *dhdps-2*. Contudo, com os estudos apresentados nesse trabalho permite inferir que o desequilíbrio na via de biossíntese de lisina existente nos mutantes *dapat*, gerados pela mutação na enzima *L,L-diaminopimelato aminotransferase*, faz com que o crescimento das plantas esteja em constante condição de estresse (estado de alerta), mesmo em condições favoráveis para o bom desenvolvimento (Finkmeier e Sweetlove, 2009). Ademais, o padrão dos metabólitos analisados nesse trabalho mostraram significativas alterações causadas pelo estresse salino. Os danos observados ao processo fotossintético foram bastante severos em presença de sal ocasionando uma reprogramação metabólica e acúmulo de alguns metabólitos com funções osmoprotetoras.

## 5. CONCLUSÃO

Plântulas *dhdps-2* apresentaram uma maior tolerância ao estresse salino muito provavelmente associada a um metabolismo energético eficiente, como observado junto as análises de expressão gênica de ETFQO, IVDH e LKR/SDH e a reprogramação metabólica observada pelo acúmulo de alguns metabólitos com funções osmoprotetoras. Os dados aqui obtidos demonstram a importância dos substratos alternativos, além de lisina, na promoção e manutenção da homeostase celular em condições de estresse, mantendo o fluxo de elétrons pela mETC e suportando a geração de energia. Estudos futuros serão ainda necessários para se elucidar o mecanismo exato pelo qual os mutantes *dapat* e *dhdps-2* e por consequência, o metabolismo de lisina e de aminoácidos em geral, parece influenciar o comportamento vegetal em resposta a salinidade. Embora os resultados apresentados possibilitaram a identificação parcial de alguns dos mecanismos de tolerância ao sal, uma caracterização molecular detalhada faz-se ainda necessária para compreender melhor a importância da lisina nessa tolerância diferencial. Em longo prazo, espera-se ainda que tais estudos avançados possam contribuir para o desenvolvimento de plantas tolerantes a salinidade através da engenharia genética.

## 6. REFERÊNCIAS

- Ahmad P, Hakeem KR, Kumar A, Ashraf M, Akram NA** (2012) Salt-induced changes in photosynthetic activity and oxidative defense system of three cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.). *African Journal of Biotechnology* **11**: 2694–2703
- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S** (2010) Roles of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* **30**: 161–175
- Andersson SGE, Karlberg O, Canbäck B, Kurland CG** (2003) On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **358**: 165–179
- Angelovici R, Fait A, Zhu X, Szymanski J, Feldmesser E, Fernie AR, Galili G** (2009) Deciphering transcriptional and metabolic networks associated with lysine metabolism during Arabidopsis seed development. *Plant Physiology* **151**: 2058-2072
- Araújo WL, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2014) On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions. *Photosynthesis Research* **119**: 141–156
- Araújo WL, Nunes AN, Williams TCR** (2012) Functional genomics tools applied to plant metabolism: a survey on plant respiration, its connections and the annotation of complex gene functions. *Frontiers in Plant Science* **3**: 210
- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR** (2011) Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in Plant Science* **16**: 489–498
- Araújo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, Larson TR, Tohge T, Krahnert I, Witt S, Obata T, Schauer N, Graham IA, Leaver CJ, Fernie AR** (2010) Identification of the 2- hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. *The Plant Cell* **22**: 1549-1563
- Arnon DI** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology* **24**:1-15
- Baker NR** (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo.

Annual Review of Plant Biology **59**: 89-113

**Barros JAS, Cavalcanti JHF, Medeiros DB, Nunes-Nesi A, Avin-Wittenberg T, Fernie, AR, Araujo WL** (2017a) Autophagy deficiency compromises alternative pathways of respiration following energy deprivation. *Plant Physiology* **175**: 62-76

**Barros JAS, Cavalcanti JHF, Medeiros DB, Nunes-Nesi A, Avin-Wittenberg T, Fernie, AR, Araujo WL** (2017b) Commonalities and differences in plants deficient in autophagy and alternative pathways of respiration on response to extended darkness. *Plant Signaling & Behavior* **12**: e1377877

**Battur B, Boldbaatar D, Umemiya-Shirafuji R, Liao M, Battsetseg B, Taylor D, Baymbaa B, Fujisaki K** (2009) LKR/SDH plays important roles throughout the tick life cycle including a long starvation period. *PLoS ONE* **4**: e7136

**Beckmann JD e Frerman FE** (1985) Electron-transfer flavoproteinubiquinone oxidoreductase from pig liver: Purification and molecular, redox, and catalytic properties. *Biochemistry* **24**: 3913–3921.

**Begum MAJ, Selvaraju P, Venudevan B** (2013) Saline stress on seed germination. *Scientific Research and Essays* **8**: 1420-1423

**Björkman O, Demmig B** (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**: 489-504

**Boex-Fontvieille ERA, Gauthier PPG, Gilard F, Hodges M, Tcherkez GGB** (2013) A new anaplerotic respiratory pathway involving lysine biosynthesis in isocitrate dehydrogenase-deficient *Arabidopsis* mutants. *New Phytologist* **199**: 73–682

**Bothe H** (2012) *Arbuscular mycorrhiza* and salt tolerance of plants. *Symbiosis* **58**: 7–16.

**Bouaziz A, Souty N, Hicks D** (1990) Emergence force exerted by wheat seedlings. *Soil & Tillage Research* **17**: 211-219

**Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Pyung OL, Hong GN, Leaver C J** (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between

- developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **42**: 567–585
- Cavalcanti JHF** (2015) Energy metabolism in *Arabidopsis thaliana*: tca cycle evolution, amino acids degradation and alternative pathways. Universidade Federal de Viçosa **87p**
- Choudhury, F.K., Rivero, R.M., Blumwald, E. and Mittler, R** (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*. **90**: 856–867
- Craciun A, Jacobs M, Vauterin M** (2000) *Arabidopsis* loss-of-function mutant in the lysine pathway points out complex regulation mechanism. Federation of European Biochemical Societies. **487**: 234-238
- Cross JM, von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M** (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology* **142**: 1574–1588
- Cuartero J, Bolarin MC, Asins MJ, Moreno V** (2006). Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany* **57**:1045-1058
- Eynard A, Lal R, Wiebe K** (2005) Crop response in salt-affected soils. *Journal of Sustainable Agriculture* **27**: 5–50
- Engqvist MKM, Kuhn A, Wienstroer J, Weber K, Jansen EEW, Jakobs C, Maurino VG** (2011). Plant D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase participates in the catabolism of lysine especially during senescence. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 11382–11390
- Engqvist M, Drincovich, MF, Flügge UI, Maurino VG** (2009) Two D-2-hydroxy-acid dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* with catalytic capacities to participate in the last reactions of the methylglyoxal and  $\beta$ -oxidation pathways. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 25026–25037
- FAO** (2010) FAO Land and plant nutrition management service. In: <http://www.fao.org>
- Fernie AR, Nunes-nesi A, Araujo WL, Pflanzenphysiologie M** (2011) Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis I. *Plant Physiology* **155**:101–107

- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ** (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250-263
- Ferreira, RR, Varisi VA, Meinhardt LW, Lea PJ, Azevedo RA** (2005) Are high lysine cereal crops still a challenge? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**: 985-994
- Finkemeier I, Sweetlove LJ** (2009). The role of malate in plant homeostasis. *Molecular Biology Reports* **1**: 1-3
- Fiorani F, Umbach AL, Siedow JN** (2005). The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis* AOX1a transgenic plants. *Plant Physiology* **139**: 1795-1805
- Flowers TJ** (2004) Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **55**: 307–319
- Fornazier RF, Azevedo RA, Ferreira RR, Varisi VA** (2003) Lysine catabolism: flow, metabolic role and regulation. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **15**: 9-18
- Forni C, Duca D, Glick BR** (2016) Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant Soil* **410**: 335-356
- Fukutoku Y, Yamada Y** (1981) Sources of proline-nitrogen in water stressed soybean (*Glycine max* L.). Protein metabolism and proline accumulation, *Plant Cell Physiology* **22**: 1397-1404
- Galili G, Amir R, Fernie AR** (2015) The Regulation of Essential Amino Acid Synthesis and Accumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **67**: 153-178
- Galili G, Avin-Wittenberg T, Angelovici R, Fernie AR** (2014) The role of photosynthesis and amino acid metabolism in the energy status during seed development. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1-6
- Galili G** (2011). The aspartate-family pathway of plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 192–195
- Galili G** (2002) New insights into the regulation and functional significance of

- lysine metabolism in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 27-43
- Galili G, Tang G, Zhu X, Gakiere B** (2001) Lysine catabolism: a stress and development super-regulated metabolic pathway. *Current Opinion in Plant Biology*. **4**: 261–266
- Galili G** (1995) Regulation of Lysine and Threonine Synthesis. *The Plant Cell* **7**: 899-906
- Galvan-Ampudia CS, Testerink C** (2011). Salt stress signals shape the plant root. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 296-302
- Gao JP, Chao DY, Lin HX** (2007) Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: recent studies on stress response in rice. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**: 742–750
- Gibbon BC, Larkins BA** (2005) Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends in Genetics* **21**: 227–233
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Hohne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M** (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: Comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* **16**: 3304-3325
- Greenway H, Munns R** (1980) Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review Plant Physiology* **31**:149 19
- Hare PD, Cress WA** (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **21**: 79–102
- Hausler RE, Ludewig F, Krueger S,** (2014) Amino acids a life between metabolism and signaling. *Plant Science* **229**: 225-237
- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A** (2012) Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior* **7**:11, 1456–1466
- Heazlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Harvey Millar A** (2004) Experimental Analysis of the *Arabidopsis* Mitochondrial Proteome Highlights Signaling and Regulatory Components, Provides Assessment of Targeting Prediction Programs, and Indicates Plant-Specific Mitochondrial Proteins. *The Plant Cell* **16**: 241–256

- Hefny M, Abdel-Kader DZ** (2009) Antioxidant enzyme system as selection criteria for salt tolerance in forage sorghum genotypes (*Sorghum bicolor* L. Moench). In: Ashraf M, Ozturk M, Athar HR (eds) Salinity and water stress. Springer **44**: 25–36
- Hildebrandt TM, Nesi AN, Araújo WL, Braun H** (2015) Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant* **8**: 1563-1579
- Hudson AO, Singh BK, Leustek T, Gilvarg C** (2006) An LL-diaminopimelate aminotransferase defines a novel variant of the lysine biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiol* **140**: 292–301
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change)** (2007) Climate change 2007: the physical science basis (Summary for policy makers). IPCC Secretariat, WMO, Geneva, Switzerland, p 21
- Ishizaki K, Schauer N, Larson TR, Graham IA, Fernie AR, Leaver CJ** (2006) The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of Arabidopsis in extended darkness. *The Plant Journal* **47**: 751-760
- Ishizaki K, Larson TR, Schauer N, Fernie AR, Graham IA, Leaver CJ** (2005) The critical role of Arabidopsis electron-transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase during darkinduced starvation. *The Plant Cell* **17**: 2587-2600
- Jacoby RP, Taylor NL, Millar AH** (2011) The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. *Trends in Plant Science* **16**, 614–623
- Jander G, Joshi V** (2009) Aspartate-derived amino acid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *The Arabidopsis Book* e0121
- Jones-Held S, Ambrozevicius LP, Campbell M, Drumheller B, Harrington E, Leustek T** (2012) Two Arabidopsis thaliana dihydrodipicolinate synthases, DHDPS1 and DHDPS2, are unequally redundant. *Functional Plant Biology* **39**:1058–1067
- Kijne JW** (2006) Abiotic stress and water scarcity: identifying and resolving conflicts from plant level to global level. *Field Crops Research* **97**:3–18
- Kosová K, Prášil IT, Vítámvás P** (2013) Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 6757–6789
- Kranner I, Beckett RP, Wornik S, Zorn M, Pfeifhofer HW** (2002) Revival of a

- resurrection plant correlates with its antioxidant status. *Plant Journal* **31**: 13-24
- Krause GH** (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiologia Plantarum* **74**: 566-574
- Kuhn A, Engqvist MKM, Jasen EEW, Weber APM, Jakobs C, Maurino VG** (2013) D-2-hydroxyglutarate metabolism is linked to photorespiration in the *shm1-1* mutant. *Plant Biology* **15**: 776-784
- Lee CP, Eubel H, Millar AH** (2010) Diurnal changes in mitochondrial function reveal daily optimization of light and dark respiratory metabolism in *Arabidopsis*. *Molecular & Cellular Proteomics* **9**: 2125-2139
- Less H, Galili G** (2008) Principal transcriptional programs regulating plant amino acid metabolism in response to abiotic stresses. *Plant Physiol.* **147**: 316-330
- Lugan R, Niogret MF, Lepout L, Guegan JP, Larher FR, Savouire A, Kopka J, Bouchereau A** (2010) Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *Plant Journal* **64**: 215-229
- Lundegardh H** (1939) An electro-chemical theory of salt absorption and respiration. *Nature* **143**:203-204
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L** (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **96**: 8271-8276
- Meloni DA, Oliva MA, Martinez CA, Cambraia J** (2003) Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* **49**: 69-76
- Millar AH, Whelan J, Soole KL, Day DA** (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annual Review Plant Biology.* **62**: 79-104
- Mittler, R.** (2017) ROS are good!. *Trends in Plant Science.* **22**: 11-19
- Mickelbart MV, Hasegawa PM, Bailey-Serres J** (2015) Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics* **16**: 237-251
- Mignolet-Spruyt L, Xu EJ, Idanheimo N, Hoerberichts FA, Muhlenbock P, Brosche M, Van Breusegem F, Kangasjarvi J** (2016) Spreading the news:

subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany* **67**: 3831 – 3844

**Monteiro CC, Carvalho RF, Gratão PL, Carvalho G, Tezotto T, Medici LO, Peres LEP, Azevedo RA** (2011) Biochemical responses of the ethylene-insensitive never ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. *Environmental and Experimental Botany* **71**: 306-320

**Moulin M, Deleu C, Larher, F, Bouchereau A** (2006) The lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase is involved in the osmo-induced synthesis of pipercolic acid in rapeseed leaf tissues. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**: 474–482

**Mourad G, King J** (1995) l-O-Methylthreonine-resistant mutant of *Arabidopsis* defective in isoleucine feedback-regulation. *Plant Physiology* **107**: 43–52.

**Munns R, Tester M** (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 651– 681

**Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiology* **15**: 473-497

**Návarová, H, Bernsdorf F, Döring AC, Zeier J** (2012) Pipercolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *The Plant Cell* **24**: 5123-5141

**Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal* **50**: 1093-1106

**Obata T, Fernie AR** (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**: 3225-3243

**Oh SA, Lee SY, Chung IK, Lee CH, Nam HG** (1996) A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **30**: 739-754

**Ottander C, Campbell D, Öquist G** (1995) Seasonal changes in photosystem II organization and pigment composition in *Pinus sylvestris*. *Planta* **197**: 176-183

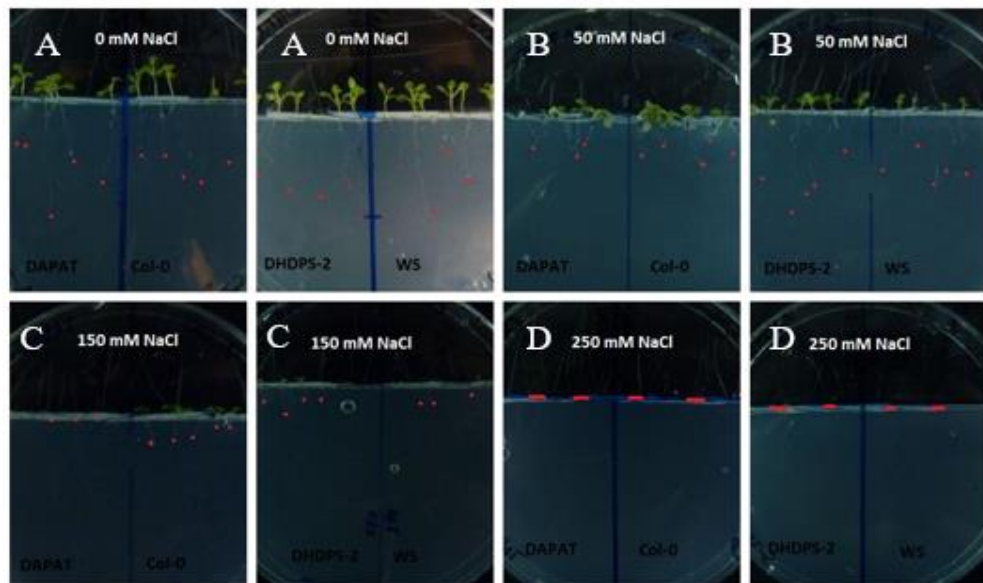
- Parida AK, Das AB** (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60**: 324–49
- Peng C, Uygun S, Shiu SH, Last RL** (2015) The impact of the branched-chain ketoacid dehydrogenase complex on amino acid homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **169**: 1807-1820
- Pires MV, Pereira Júnior AA, Medeiros DB, Daloso DM, Pham PANH, Barros KA, Engqvist MKM, Florian A, Krahnert I, Maurino VG, Araújo WL, Fernie AR** (2016) The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched-chain amino acids following water shortage in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* **39**: 1304-1319
- Pracharoenwattana I, Zhou W, Keech O, Francisco PB, Udomchalothorn T, Tschoep H, Stitt M, Gibon Y, Smith SM** (2010) *Arabidopsis* has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *Plant Journal* **62**: 785-795
- Pratelli R, Pilot, G** (2014) Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* **65**: 5535–5556
- Qadir M, Quillérrou E, Nangia V, Murtaza G, Singh M, Thomas RJ, Noble AD** (2014) Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Natural Resources Forum* **38**: 282–295
- Rasmusson AG, Geisler DA, Møller IM** (2008) The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion* **8**: 47-60
- Rate DN, Greenberg JT** (2001) The *Arabidopsis* aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *Plant Journal* **27**: 203–211
- Rewald B, Shelef O, Ephrath J.E, Rachmilevitch S** (2013) Adaptive plasticity of salt-stressed root systems. *Ecophysiology and Responses of Plants Under Salt Stress* (eds Ahmad P., Azooz M.M. & Prasad M.N.V.) Springer **6**: 169–202
- Rizhsky L, Liang HJ, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R** (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* **134**: 1683–1696

- Sarrobert C, Thibaud MC, Contard-David P, Gineste S, Bechtold N, Robaglia C, Nussaume L** (2000) Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating threonine resulting from mutation in a new dihydrodipicolinate synthase gene. *Plant Journal* **24**: 357–367
- Scrimshaw NS** (2006) Quality protein maize. *Food and Nutrition Bulletin*, **27**: 65–266
- Singh BK, Shaner DL** (1995) Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field. *The Plant Cell* **7**: 935–944
- Song JT, Lu H, Greenberg JT** (2004) Divergent roles in *Arabidopsis thaliana* development and defense of two homologous genes, aberrant growth and death2 and agd2-like defense response protein1, encoding novel aminotransferases. *The Plant Cell* **16**: 353–366
- Stepansky A, Galili G** (2003). Synthesis of the *Arabidopsis* bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase enzyme of lysine catabolism is concertedly regulated by metabolic and stress-associated signals. *Plant Physiology* **133**: 1407–1415.
- Stepansky A, Less H, Angelovici R, Aharon R, Zhu X, Galili G** (2006) Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. *Amino Acids* **30**:121–25
- Sudhir P, Murthy SDS** (2004) Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* **42**: 481–486
- Sweetlove LJ, Lytovchenko A, Morgan M, Nunes-Nesi A, Taylor NL, Baxter CJ, Farnie AR** (2006) Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 19587–19592
- Szamosi IT, Shaner DL, Singh BK** (1994) Inhibition of threonine dehydratase is herbicidal. *Plant Physiology* **106**: 1257–1260
- Tanou G, Molassiotis A, Diamantidis G** (2009) Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environmental Experimental Botany* **65**: 270–281
- Tester M, Davenport R** (2003) Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of Botany* **91**:503–527

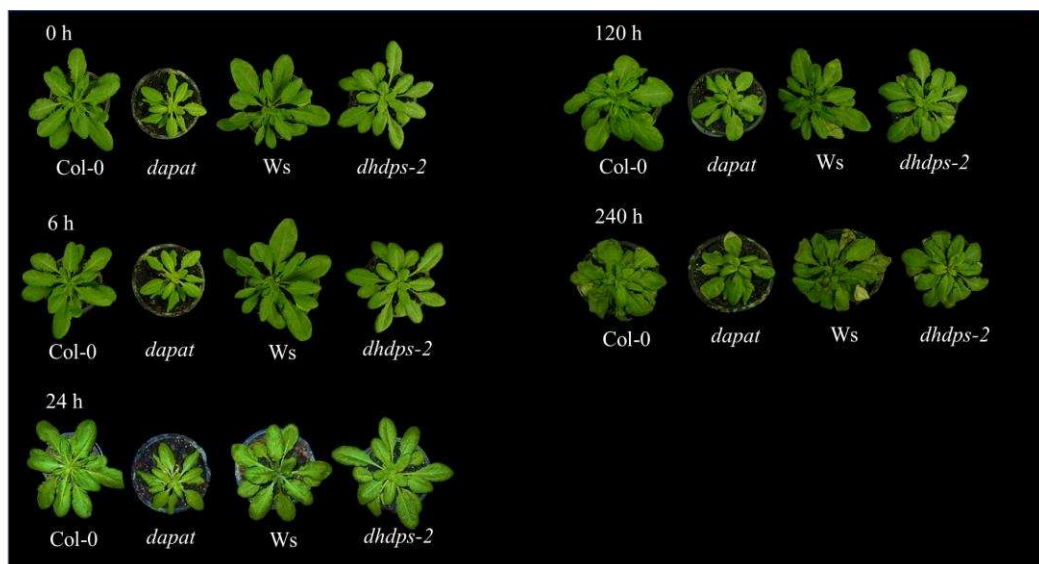
- Thiele A, Krause GH** (1996) Xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in photosystem II: relation between zeaxanthin formation, energy-dependent fluorescence quenching and photoinhibition. *Journal of Plant Physiology* **144**: 324- 332
- Van Dongen JT, Gupta KJ, Ramírez-aguilar SJ, Araújo WL, Nunes-nesi A, Fernie AR.** (2011) Regulation of respiration in plants : A role for alternative metabolic pathways. *Journal of Plant Physiology* **168**: 1434–1443
- Vauterin M, Frankard V, Jacobs M** (2000) Functional rescue of a bacterial dapA auxotroph with a plant cDNA library selects for mutant clones encoding a feedback-insensitive dihydrodipicolinate synthase. *The Plant Journal* **21**: 239-248
- Vanlerberghe GC** (2013) Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 6805–6847
- Venekamp JH, Lampe JEM, Koot JT** (1989) Organic acids as sources for droughtinduced proline synthesis in field bean plants, *Vicia faba* L. *Journal of Plant Physiology* **133**: 654–659
- Weigelt K, Küster H, Radchuk R, Müller M, Weichert H, Fait A, Fernie AR, Saalbach I, Weber H** (2008) Increasing amino acid supply in pea embryos reveals specific interactions of N and C metabolism and highlights the importance of mitochondrial metabolism. *The Plant Journal* **55**: 909-926
- Widodo JJ, Patterson JH, Newbiggin E, Tester M, Bacic A, Roessner U** (2009) Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *Journal Experimental Botany* **60**: 4089-4103
- Witcombe JR, Hollington PA, Howarth CJ, Reader S, Steele KA** (2008) Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* **363**: 703–716
- Xu DQ, Wu S** (1996) Three fases of dark recovery course from photoinhibition resolved by the chlorophyll fluorescence analysis in soybean leaves under field conditions. *Photosynthetica* **32**: 417-423

- Xu F, Yuan S, Lin HH** (2011). Response of mitochondrial alternative oxidase (AOX) to light signals. *Plant signaling & behavior*, **6**: 55-58
- Yang S, Vanderbeld B, Wan J, Huang Y** (2010) Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Molecular Plant* **3**: 469-490
- Zeier J** (2013) New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant, Cell & Environment* **36**: 2085–103
- Zhu X, Galili G** (2003) Increased lysine synthesis coupled with a knockout of its catabolism synergistically boosts lysine content and also transregulates the metabolism of other amino acids in Arabidopsis seeds. *The Plant Cell* **15**: 845–853

## 7. MATERIAL SUPLEMENTAR



**FIGURA S1:** Imagens representativas do efeito do estresse salino no crescimento radicular de plantas de *Arabidopsis* mutantes para via de biossíntese de lisina, imagens do décimo dia (final). (A) Controle, meio MS com ausência de NaCl. (B) 50 mM de NaCl. (C) 150 mM de NaCl. (D) 250 mM de NaCl.



**FIGURA S2:** Fenótipo de mutantes de *Arabidopsis thaliana* *dapat* e *dhgps-2* sob tratamento com 150 mM de NaCl. Imagens de plantas de *Arabidopsis* mutantes e WT, com 4 semanas de idade (0 h) e após 10 dias sob estresse salino (240 h). As folhas das plantas *dapat*, apresentem sinais de estresse em comparação com Col-0.