

Tolerância ao NaCl e acúmulo de solutos orgânicos em acessos de pinhão-manso.

Roberto Oscar Pereyra Rossiello⁽¹⁾; Maicon Valdemaz dos Santos⁽²⁾; Sílvia Aparecida Martim⁽³⁾; Camila Figueiredo da Silva⁽⁴⁾; Giselle Souza da Silva⁽⁵⁾; Ádria Pamplona Miranda Freire⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Professor, Departamento de Solos, Instituto de Agronomia; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Seropédica, RJ; ropr@ufrj.br ; ⁽²⁾ Estudante de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; ⁽³⁾ Professora, Departamento de Ciências Fisiológicas; Instituto de Biologia; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; ⁽⁴⁾ Aluna do curso de Engenharia Agrônômica; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; ⁽⁵⁾ Aluna do curso de Engenharia Agrônômica; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; ⁽⁶⁾ Aluna do curso de Engenharia Agrônômica; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO: O propósito deste trabalho foi o de determinar, entre vários indicadores metabólicos, aqueles que melhor se relacionem com o grau de sensibilidade/tolerância de acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) à presença de teores elevados de NaCl no meio de cultivo. Para tal, foram conduzidos dois experimentos, sob condições ambientais controladas, estudando-se as respostas dos acessos nº 356 e 345, cultivados em solução nutritiva de Hoagland, à força iônica plena. Os tratamentos consistiram de cinco concentrações de NaCl: 0, 50, 75, 100 e 150 mM, arranjadas em um desenho experimental completamente casualizado com cinco repetições. Ao final de um período de crescimento de 15 dias, as plantas foram colhidas, fracionadas em seus componentes vegetativos, e determinadas as massas frescas e secas de cada fração. Em amostras frescas de limbos foliares, foram determinados os teores de clorofila total, aminoácidos livres totais, prolina livre e carboidratos solúveis. Com base na redução relativa da massa seca total, o acesso 356 foi julgado mais sensível ao estresse salino do que o 345. Foi concluído que a utilidade dos indicadores usados, principalmente os ligados à osmorregulação celular, só é importante no caso de genótipos sensíveis. O aumento da tolerância à salinidade nesta espécie exclui o acúmulo de compostos orgânicos com finalidade de regulação das suas propriedades hídricas.

Termos de indexação: *Jatropha curcas* L.; prolina, carboidratos solúveis.

INTRODUÇÃO

Dentre outras oleaginosas, o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), tem despertado o interesse de produtores, governos e instituições de pesquisa, como uma fonte potencial de biocombustível, em função de sua rusticidade e facilidade de propagação (Sapeta et al., 2013). Nesse contexto, abrem-se perspectivas para o aumento das áreas de plantio desta espécie, especialmente nas regiões

semiáridas do país. Todavia, há muito trabalho a ser feito antes que possa se pensar na exploração econômica desta espécie em solos salino-sódicos. Além de pesquisas básicas, o trabalho edafológico de seleção de genótipos adaptados, pode ser facilitado com a disponibilidade de indicadores metabólicos de tolerância e/ou sensibilidade a esse tipo de estresse ambiental (Kanawapee et al., 2012). Dentro de tais indicadores destacam-se compostos orgânicos sintetizados pelas plantas, visando ajustar o seu potencial osmótico interno às variações do potencial hídrico externo. Em atenção a esses aspectos, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a importância da produção de biomassa, e os teores foliares de clorofila, aminoácidos livres totais, prolina livre e açúcares solúveis como indicadores do grau de tolerância/sensibilidade dos acessos de *J. curcas* estudados, a níveis crescentes de NaCl na solução externa.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Departamento de Solos da UFRRJ, em condições de ambiente controlado. Devido a limitações de espaço disponível, foram realizados dois experimentos separados, utilizando os acessos nº 356 e 345 provenientes do Banco de Germoplasma da UFRRJ. Sementes, previamente desinfetadas (NaClO, 2%), foram postas a germinar em casa de vegetação, utilizando areia autoclavada como substrato. Inicialmente, as sementes foram embebidas com água destilada, e, após 10 dias, com solução de Hoagland & Arnon (H&A, 1950) diluída a 10%. Após a completa germinação e emergência, as plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 2,0 dm³ (duas plantas/vaso), contendo solução de H&A, diluída a 0,25 da concentração original, na primeira semana e à metade, na segunda semana. Após este período de adaptação ao ambiente da câmara de crescimento (irradiância: 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; fotoperíodo: 12 h e temperatura do ar (dia/noite):

28°C/24°C), ao início da terceira semana, as plântulas receberam solução de H&A à concentração plena. Em ambos os experimentos foram aplicados cinco níveis de NaCl: 0, 50, 75, 100 e 150 mM, segundo um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Em relação ao tempo de exposição ao sal, nos dois estudos, foram 15 dias.

Ao final do período experimental, as plantas foram coletadas e fracionadas em limbo foliar + pecíolo, caules e raízes. Para a determinação das clorofilas, discos foliares com 10 mm de diâmetro, foram incubados, por 72 h, no escuro, com 10 mL de dimetilsulfóxido (Hiscox & Israelstam, 1979) Subseqüentemente, os extratos foram submetidos à determinação espectrofotométrica (Wellburn, 1994). Para a determinação dos teores de aminoácidos livres e carboidratos solúveis totais foi preparado um extrato alcoólico (Etanol 80 %), a partir de 0,5 g de limbos foliares frescos, o qual foi, a seguir, submetido à partição de fases em clorofórmio. Na fase hidrossolúvel, os teores de α -amino foram determinados segundo Yemm & Cocking (1955) enquanto os teores de carboidratos solúveis segundo Yemm & Willis (1954). Prolina livre foi quantificada pelo método de Bates et al. (1973). A massa seca total foi determinada com base na relação massa fresca (MF)/ massa seca (MS, 65 °C, em estufa ventilada) de cada fração vegetativa.

As análises estatísticas foram feitas dentro de cada experimento individualmente, e consistiram em análise de variância unifatorial para discriminação do efeito dos tratamentos (teste "F"). Devido à necessidade de se estabelecer patamares quantitativos de resposta, optou-se pela discriminação de médias por meio do teste de Tukey ao nível de $p \leq 0,05$. De forma complementar, as tendências de resposta foram parametrizadas por análise de regressão, linear e não linear, segundo os modelos existentes no *software* GraphPad Prism, v. 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O nível de tolerância de uma espécie vegetal pode ser expresso em termos da porcentagem de biomassa produzida em condições salinas vs. a produção em condições controle (Díaz-López et al., 2012). Utilizando tal critério, verificou-se que ao final do período experimental, a MS total do acesso 356 sofreu uma redução global de 64 %, enquanto que, no acesso 345 tal redução foi de 57 %. Na presença de 50 mM NaCl na solução nutritiva, a MS foliar do acesso 356 sofreu uma redução significativa de 53 %, enquanto que, no 345, a redução resultou não

significativa (31,5 %). Então, em termos relativos, o acesso 356 evidenciou uma maior sensibilidade à presença de íons Na^+ e Cl^- na solução, do que o acesso 345.

A maior tolerância do acesso 345 evidenciou-se também na estabilidade dos seus teores foliares de clorofila total os quais variaram, não significativamente (teste F, $p = 0,089$), em torno de $427 \pm 46 \mu\text{mol m}^{-2}$ folha, independentemente de dose de NaCl. No acesso 356, seu teor inicial de clorofila resultou superior ao do 345, seguida de uma queda brusca entre 100-150 mM, implicando em reduções de 31 a 38 % em relação ao teor do controle não salinizado.

Na ausência de NaCl na solução, os acessos apresentaram teores diferenciados de carboidratos solúveis nas suas folhas (**Tabela 1**), o que pode refletir diferenças intrínsecas em atividade fotossintética, sob as condições ambientais vigentes na câmara de crescimento. No acesso 356, em níveis moderados de sal (75 mM), houve uma depressão significativa nos teores de açúcares solúveis, seguida de uma recuperação nos maiores níveis de aplicação de NaCl, com valores estatisticamente similares aos do controle. Em oposição, no acesso 345, o padrão de resposta incluiu aumentos significativos entre 50-75 mM NaCl, declinando posteriormente, sendo que, na maior dose de NaCl, o teor de carboidratos solúveis resultou estatisticamente igual ao controle. Todavia, os aumentos observados foram moderados, no máximo de 32 % em 50 mM NaCl.

Tabela 1 – Teores de carboidratos solúveis totais em limbos foliares de dois acessos de pinhão manso, cultivados em solução nutritiva com cinco concentrações de NaCl, entre 0-150 mM

| Acesso nº | mmol g MF ⁻¹ | | | | |
|--------------|-------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| | 0 | 50 | 75 | 100 | 150 |
| 356 | 68,3 ^a | 54,0 ^b | 48,9 ^b | 57,4 ^{ab} | 60,5 ^{ab} |
| 345 | 28,0 ^a | 37,0 ^b | 36,4 ^b | 32,8 ^{bc} | 31,0 ^{ac} |

^a Valores médios de cinco repetições por tratamento. Dentro de cada linha, médias seguidas de letras comuns não diferem significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

Em relação aos teores foliares de aminoácidos livres totais (ALT) no acesso 356, até 100 mM NaCl (**Figura 1A**). Houve um padrão de acúmulo exponencial bem definido, seguido de uma estabilização até 150 mM NaCl. Dessa forma, os teores de aminoácidos livres foram entre 2,9 e 3,2 vezes superiores ao valor do controle. No acesso 356 a adição de doses crescentes de NaCl à solução não afetou significativamente os teores de

ALT (**Figura 1B**). Os acúmulos de ALT refletem contribuições de aminoácidos oriundos de aumentos na hidrólise de proteínas e/ou de redução da sua síntese (Hsiao, 1973). A ausência de acumulação de ALT no acesso 305 evidencia a sua melhor adequação metabólica ao estresse salino. Em relação aos teores da prolina livre foliar, no acesso 356, houve uma tendência definida de acumulação, a partir da dose de 75 mM, registrando-se aumentos significativos nas duas doses superiores. No caso do acesso 345, os efeitos sobre esse indicador bioquímico resultaram muito modestos, evidenciados por uma pequena, porém significativa redução de teor nas doses intermediárias de NaCl (**Figuras 1C e D**).

A pequena magnitude do acúmulo de prolina no acesso 356 torna duvidosa a sua participação como soluto osmorregulatório sob estresse salino, mas a sua importância pode advir de outros papéis. É interessante observar que no acesso 356, o Teor Relativo de Água foliar permaneceu inalterado entre 0-150 mM NaCl (dados não apresentados). Essa situação não conferiu a este acesso uma tolerância à salinidade superior, o que parece justificar a opinião de que, em *J. Curcas*, as respostas à salinidade são determinadas, principalmente, pela toxicidade direta ou indireta dos íons Na^+ e Cl^- (Díaz-López et al. 2012) No acesso 345, o possível papel osmorregulatório da prolina fica negado dada a ausência de acumulação (**Figura 1D**) Da mesma forma, neste acesso, aparentemente, nem os teores de aminoácidos livres (**Figura 1B**) nem os de carboidratos solúveis totais (**Tabela 1**) fazem uma contribuição efetiva aos mecanismos que conferem tolerância ao estresse salino, constituindo, em consequência, indicadores bioquímicos ineficientes desses processos.

Nesse sentido, os acessos mais tolerantes podem exibir um comportamento mais típico de certas espécies halofíticas, onde os ajustes osmóticos necessários são realizados exclusivamente com íons Na^+ e Cl^- , (abundantes no seu meio de crescimento), dispensando a síntese de solutos orgânicos compatíveis, energeticamente muito mais custosos.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir, preliminarmente, que:

- 1) O acúmulo de solutos orgânicos compatíveis, tem significância apenas no acesso de pinhão manso com maior sensibilidade ao estresse salino;
- 2) O aumento da tolerância à salinidade nesta espécie, exclui a síntese de compostos orgânicos

com finalidade de regulação das suas propriedades hídrica.

REFERÊNCIAS

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207, 1973.

CHEN, T.N.N.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stresses by metabolic engineering of solutes. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 250-257, 2002.

DÍAZ-LÓPEZ, L.; GIMENO, V.; LIDÓN, V.; et al. The tolerance of *Jatropha curcas* seedlings to NaCl: an ecophysiological analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.54, p.34-42, 2012.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57: 1332-1334, 1979.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: University of California, 1950.

KANAWAPEE, N.; SANITCHON, J.; LONTOM, W. et al. Evaluation of salt tolerance at the seedling stage in rice genotypes by growth performance, ion accumulation, proline and chlorophyll content. *Plant and Soil*, 358: 235-249, 2012.

SAPETA, H.; COSTA, J.M.; LOURENÇO, T. et al. Drought stress response in *Jatropha curcas*: growth and physiology. *Environmental and Experimental Botany*, 85: 76-84, 2013.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144: 307-313, 1994.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, 80: 209-214, 1955.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, v.57: 508-514, 1954.

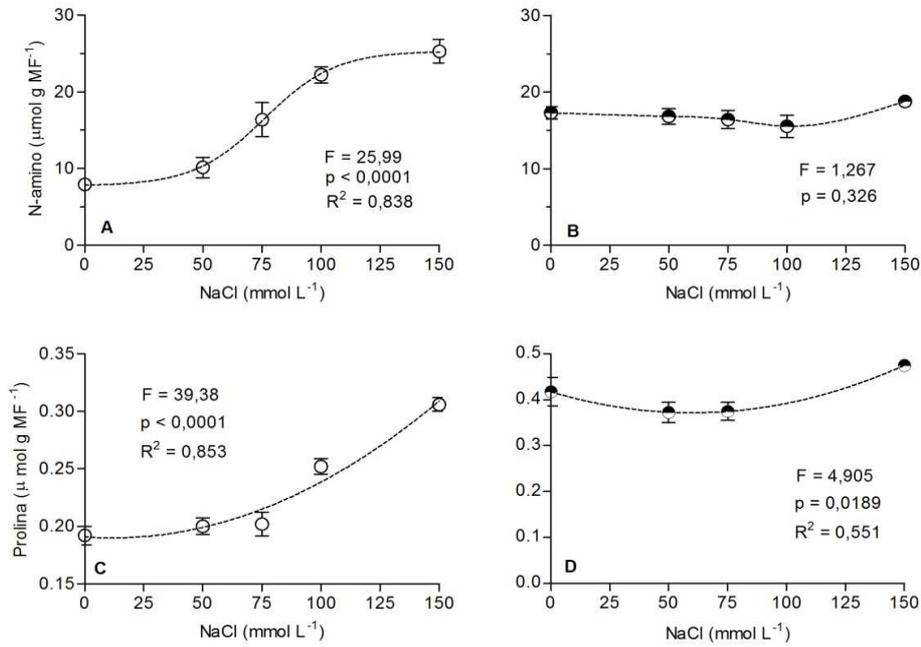


Figura 1 – Teores de N- aminoácidos livres (A e B) e de prolina livre (C e D), em folhas de dois acessos de pinhão manso cultivados em solução nutritiva com doses crescentes de NaCl. A-C: acesso 356; B-D: acesso 345