



## Respostas do pinhão manso ao estresse oxidativo induzido por salinidade crescente da solução nutritiva <sup>(1)</sup>.

**Camila Figueiredo da Silva<sup>(2)</sup>; Maicon Wandermaz dos Santos<sup>(3)</sup>; Fabiano Barbosa de Souza Prates<sup>(4)</sup>; Everaldo Zonta<sup>(5)</sup>; Roberto Oscar Pereyra Rossiello<sup>(5)</sup>**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos da Petrobras

<sup>(2)</sup> Estudante de Graduação em Agronomia; UFRRJ; Seropédica-RJ; camilaf2004@hotmail.com, <sup>(3)</sup> Mestre em Ciência do Solo; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, <sup>(4)</sup> Professor do Instituto Federal de Alagoas; fbprates@gmail.com,

<sup>(5)</sup> Professor; Departamento de Solos; Instituto de Agronomia; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; ezonta@ufrj.br; <sup>(5)</sup> Professor; Departamento de Solos; Instituto de Agronomia; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; rossiello@terra.com.br.

**RESUMO:** O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie oleaginosa que pela sua rusticidade, tem potencial para ser cultivada em ambientes semiáridos, visando a sua utilização como matéria prima para a produção de biodiesel. Para tal, precisa-se de mais informações sobre o potencial adaptativo dos genótipos disponíveis a cenários edafoclimáticos adversos. Assim, o crescimento em solos salino-sódicos, implica na capacidade de atenuar ou tolerar efeitos conjuntos dos estresses osmótico e oxidativo, causados pela toxicidade dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , dominantes. Em atenção ao exposto, foi conduzido um experimento, no Departamento de Solos da UFRRJ, utilizando os acessos nº 356 e 345. Após um período inicial em areia lavada, as plântulas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland & Arnon, suplementada com cinco doses de  $\text{NaCl}$  (0, 50, 75, 100 e 150  $\text{mmol L}^{-1}$ ), segundo um desenho inteiramente casualizado, com cinco repetições. Após quinze dias de crescimento, sob condições ambientais controladas, as plantas foram colhidas, determinando-se, em folhas novas, os seguintes parâmetros: teor de  $\text{Na}^+$ ; Teor Relativo de Água, clorofila total, malondialdeído e percentual de extravasamento de eletrólitos, assim como a biomassa total acumulada em folhas, caules e raízes. Em conjunto, os indicadores evidenciaram a maior tolerância do acesso 345 em relação ao 356. O grau de tolerância, nos acessos estudados, guarda relação inversa com os teores de  $\text{Na}^+$  e os indicadores de estresse oxidativo nas folhas.

**Termos de indexação:** *Jatropha curcas* L.; estresse osmótico; toxidez iônica.

### INTRODUÇÃO

Dentre as oleaginosas cultivadas para fins energéticos, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), espécie arbustiva da família das Euforbiáceas, tem sido objeto de atenção considerável como matéria prima para a produção de biodiesel. Sua utilização esta embasada no alto potencial de produção de

óleo das suas sementes, e de ser espécie perene de uso não alimentar (Alves, 2013).

Como uma suculenta que perde as suas folhas durante a estação seca, o pinhão manso é uma planta bem adaptada a condições de semi-aridez, sendo considerada uma opção de uso agrícola em solos salino-sódicos, característicos dos trópicos semi-áridos (Atchen et al, 2008). De acordo com Munns & Tester (2008), nesses ecossistemas, as plantas devem responder a uma dupla limitação, devida ao aumento na concentração salina externa às raízes, a qual se manifesta de forma rápida (fase osmótica) seguida de outra mais lenta, devida à acumulação de  $\text{Na}^+$  nas folhas (fase iônica).

O metabolismo aeróbico, o qual utiliza o  $\text{O}_2$  comoceptor final de elétrons, produz, inevitavelmente, espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido ou o peróxido de hidrogênio. Sob condições normais, as EROs são produzidas em baixos níveis, em organelas como mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Miller et al, 2010). Entretanto, sob condições de ocorrência de estresses bióticos ou abióticos, os níveis de EROs elevam-se de forma drástica, configurando um quadro de estresse oxidativo, caracterizado por processos que danificam DNA, proteínas, lipídios, carboidratos, levando à perda da homeostase celular (Miller et al, 2010). Tanto o estresse osmótico quanto o estresse iônico são fortes promotores das EROs, de forma tal que o nível de defesas antioxidativas que uma determinada espécie ou cultivar possui, tem forte influencia na expressão da sua tolerância à salinidade (Munns & Tester, 2008).

Em atenção às considerações precedentes, o propósito do presente trabalho foi caracterizar as respostas de acessos de pinhão manso à salinidade da solução induzida por  $\text{NaCl}$ , avaliando a conveniência de inclusão de indicadores de estresse oxidativo para estabelecer o grau de tolerância à salinidade.



## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Departamento de Solos da UFRRJ, em condições de ambiente controlado. Sementes, previamente desinfetadas (NaClO, 2%), dos acessos de pinhão manso N<sup>o</sup> 356 (coletado no Estado de Maranhão) e 345 (coletado em Lavras, MG), provenientes do Banco de Germoplasma da UFRRJ, 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 (1950) diluída a 10%. Após a completa germinação e emergência, as plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 2,0 dm<sup>3</sup> (duas plantas/vaso), contendo solução de Hoagland, diluída a 0,25 da concentração original, na primeira semana e à metade, na segunda semana. Após este período de adaptação às condições ambientais da câmara de crescimento (irradiância: 450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; fotoperíodo: 12 h e temperatura do ar: 28°C/24°C), as plântulas receberam solução à concentração plena, tendo início o período experimental. Os tratamentos consistiram em cinco doses de NaCl (0, 50, 75, 100 e 150 mM, em aplicação única), com cinco repetições. Com auxílio de condutivímetro, mediu-se a condutividade elétrica das soluções experimentais, após a aplicação dos tratamentos, obtendo-se valores de 1,75; 6,33; 8,62; 10,90 e 15,5 dS m<sup>-1</sup>, respectivamente. Ao final de um período experimental de 15 dias, as plantas foram coletadas e fracionadas em folhas, pecíolo, caule e raízes.

Para a determinação das clorofilas *a*, *b* e total, discos foliares com 10 mm de diâmetro, obtidos de limbos foliares frescos, foram incubados, por 72 h., no escuro, com 10 mL de DMSO (Hiscox & Israelstam, 1979), seguido de leituras de absorbância em 480, 649 e 665 nm (Wellburn, 1994). No mesmo tipo de material, foi determinado o Teor Relativo de Água (TRA), de acordo com Barrs & Weatherley (1962), assim como a estabilidade das membranas celulares, pelo método de Bajji et al. (2002). Para a estimativa do grau de peroxidação de lipídeos membranares, foi dosado o nível de malondialdeído (MDA), de acordo com Health & Packer (1968).

As frações constituintes da biomassa fresca foram postas a secar (65 °C), até peso constante, para obtenção da massa seca total (MST). Amostras moídas (Willey, 20 mesh) de cada fração vegetativa foram submetidas à digestão nítrico-perclórica. Subsequentemente, os teores de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foram determinados por fotometria de chama.

Os dados de MST foram expressos como o quociente entre o rendimento em dado nível "x" de NaCl (MST<sub>NaCl(x)</sub>) e o rendimento máximo, ou seja:

Rendimento relativo (R.R.) =  $\text{MST}_{\text{NaCl}(x)} / \text{MST}_{\text{NaCl}(0)}$ . Inicialmente, os dados foram analisados por meio de análise bivariada para separar os efeitos de acesso e doses de N, assim como da sua interação, por médio do teste "F" ( $p \leq 0,05$ ). Os efeitos das doses de NaCl foram tratadas por procedimentos de regressão linear e não linear. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism v. 5.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do ponto de vista da produção vegetal, salinidade refere-se à presença de sais solúveis em níveis que possam prejudicar significativamente o rendimento das plantas cultivadas (Munns & Tester, 2008). Nesse sentido, ao final do período experimental, a produção de MST nos tratamentos não salinizados (MST<sub>NaCl(0)</sub>) foi de 9,11  $\pm$  0,77 e 3,58  $\pm$  0,15 g/planta, para os acessos 356 e 345, respectivamente. Essa diferença em biomassa total guardou correspondência com o desempenho dos acessos testados em condições de campo, com grande superioridade do 356 sobre o 345, em termos de porte da planta, precocidade de produção e rendimento agrícola (Alves, 2013). Ao normatizar as diferenças absolutas, sob a forma de R.R., foi possível comparar os acessos em termos de tolerância à salinidade. Assim, valores de R.R. = 0,5, foram atingidos com [NaCl] de 92 e 117 mM, para os genótipos 356 e 345, respectivamente (**Figura 1A**), indicando portanto uma maior tolerância relativa no último acesso.

O componente osmótico do estresse salino ao que foram expostas as plântulas afetou os níveis de hidratação foliar em ambos os acessos (**Figura 1B**). Não houve diferenças significativas em TRA entre acessos, sendo ambos foram afetados pelos níveis de salinidade de acordo a um mesmo padrão. Houve uma significativa queda inicial em TRA, em resposta à menor dose de NaCl ( $p < 0,05$ ), seguida de uma estabilização até 100 mM NaCl, e uma elevação final na maior dose aplicada, a qual atingiu significação estatística apenas para o 356. Este último resultado sugere que nesse acesso, a maior capacitância de seu caule suculento (dados não apresentados) tenha operado como um tampão hídrico, favorecendo uma melhor conservação do TRA nas suas folhas.

Na **figura 1C** são apresentados os teores de clorofila total observados em ambos os acessos, sendo notória a existência de padrões diferenciados de resposta. Constitutivamente, o acesso 356 apresentou teores de clorofila 50 % superiores aos do 345. Todavia, na presença de níveis crescentes de NaCl, mostrou uma tendência à redução até 75



mM NaCl seguida de uma queda brusca entre 100-150 mM, implicando em uma redução final de 38 % em relação ao controle não salinizado. Em oposição, no acesso 345, salvo por uma redução (não significativa) na dose 75 mM, os teores de clorofila total resultaram praticamente não afetados pelos níveis de salinidade da solução. Reduções nos teores de clorofilas em resposta à salinidade podem decorrer da inibição da sua biossíntese ou do aumento da sua taxa de degradação.

O padrão de acumulação foliar de Na<sup>+</sup> seguiu um mesmo padrão curvilíneo em ambos os acessos (**Figura 1D**), o qual estabilizou-se num patamar estatisticamente superior no 356 (≈ 800 mmol/kg MSF) em relação ao 345 (≈ 600 mmol/kg MSF), a uma [NaCl] externa de 75 mM. Razões para essa resposta envolvem, por um lado, reduções nas taxas de transpiração em decorrência do fechamento estomático, o qual impôs um “plateau” nas taxas de transporte xilemático à parte aérea, e por outro a efetiva operação de mecanismos de exclusão de Na por parte do acesso 345, o qual tipifica sua maior tolerância à salinidade, já evidenciada em termos de produção relativa de biomassa (**Figura 1A**). Todavia, a consideração dos resultados dos testes mais diretamente ligados aos danos oxidativos ligados à produção de EROs (**Figuras 1E e 1F**), válida apenas parcialmente a conclusão relativa ao acesso 345. Assim, o teste de extravasamento de eletrólitos, um estimador indireto da estabilidade de membranas (Miller et al., 2010) mostrou valores superiores (porém estabilizados) para o acesso 345 até a dose de 100 mmol/L NaCl, enquanto que no 356, este índice aumentou quase linearmente até a maior dose aplicada (**Figura 1E**). Por outro lado, ao se considerar os teores foliares de MDA, um muito utilizado marcador de peroxidação de lipídeos membranares, verificou-se que, em 100 mM de sal adicionado, o seu nível foi 60 % inferior ao mostrado pelo 356, diferença que foi mantida mesmo no nível de maior estresse salino imposto.

## CONCLUSÕES

A tolerância diferencial dos acessos de pinhão manso à salinidade induzida por níveis crescentes de NaCl na solução, está relacionada, de forma direta com a produção relativa de biomassa sob estresse, e indiretamente, com o teor foliar de Na<sup>+</sup>.

A consideração de testes bioquímicos relacionados com o estresse oxidativo constitui subsídio importante na caracterização dos graus de tolerância entre genótipos.

## AGRADECIMENTOS

A UFRRJ, CPGA-CS/UFRRJ e FAPERJ pelo apoio financeiro e infraestrutura que possibilitaram à obtenção dos resultados.

## REFERÊNCIAS

ALVES, R. E. A. Divergência fenotípica entre acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) utilizando caracteres morfoagronômicos [tese]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2013.

BAJJI, M.; KINET, J. M.; LUTTS, S. The use of electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regul.*, 36: 61–70, 2002.

BARRS, H.D.; WEATHERLEY, P.E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.*, 15:413-428, 1962.

HEALTH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast, I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125: 189-198, 1968.

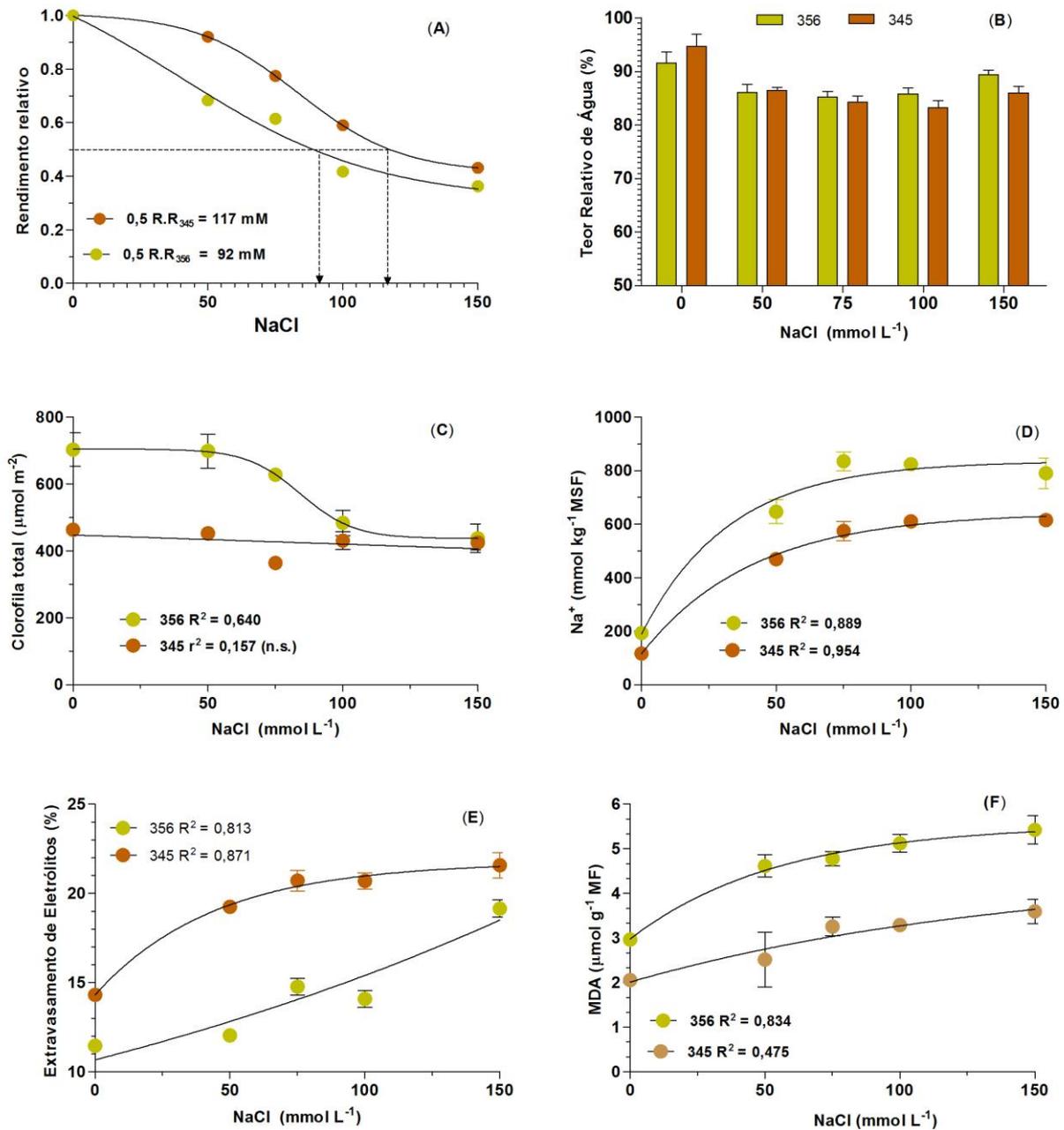
HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.*, 57:1332-1334, 1979.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. *Circ.* 347. Berkeley: University of California, 1950.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environ.*, 33: 453- 467, 2010.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu.Rev. Plant Biol.*, 59: 651-681, 2008.

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



**Figura 1.** A) Relação entre o rendimento relativo (R.R.) de plântulas de pinhão manso (acessos 356 e 345) e as doses de NaCl adicionadas à solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950), após 15 dias de crescimento, sob condições controladas. A linha pontilhada indica a concentração de NaCl que reduz à metade (0,5 R.R.) o rendimento dos acessos sob condições livres de salinidade. B) Teores Relativos de Água (TRA, %) em limbos foliares de ambos os acessos, em resposta às concentrações crescentes de NaCl; C) Teores de Clorofila total (*a + b*); D) teores de sódio em lâminas foliares; E) Percentagem de extravasamento de eletrólitos em membranas celulares e F) teores de malondialdeído (MDA) em folhas, nas mesmas condições.