

JUSSIARA DE LIMA OLIVEIRA ARAÚJO

**MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE O
CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO EM GIRASSOL
SOB ESTRESSE SALINO E OSMÓTICO APLICADOS DE
FORMA ISOLADA E COMBINADA**

MOSSORÓ – RN
2013

**Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e
catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFRSA**

A658m Araújo, Jussira de Lima Oliveira.

Mobilização de reservas durante o crescimento pós-germinativo em girassol sob estresse salino e osmótico aplicados de forma isolada e combinada. / Jussira de Lima Oliveira Araújo -- Mossoró-RN: 2013.

73f.: il.

Dissertação (Pós-Graduação em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação.

Orientador: Prof^a. Dra. Sc. Cristina Elizabeth C. de Macedo
Coorientador: Prof^o. Dr. Sc. Eduardo Luiz Voigt

1.Déficit hídrico. 2. *Helinthus annuus* L.3.Mobilização de reservas. 4. Salinidade. I.Título.

CDD: 633.85

Bibliotecária: Marilene Santos de Araújo
CRB-5/1033

JUSSIARA DE LIMA OLIVEIRA ARAÚJO

**MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE O
CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO EM GIRASSOL
SOB ESTRESSE SALINO E OSMÓTICO APLICADOS DE
FORMA ISOLADA E COMBINADA**

Dissertação apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-árido, como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre em Agronomia: Fitotecnia.

ORIENTADORA: PROF.^aDSc.CRISTIANE ELIZABETHCOSTA DE
MACÊDO

COORIENTADOR: PROF. D.Sc. EDUARDO LUIZ VOIGT

**MOSSORÓ – RN
2013**

JUSSIARA DE LIMA OLIVEIRA ARAÚJO

**MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE O CRESCIMENTO
PÓS-GERMINATIVO EM GIRASSOL SOB ESTRESSE SALINO
E OSMÓTICO APLICADOS DE FORMA ISOLADA E
COMBINADA**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal Rural do Semi-
árido, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Agronomia: Fitotecnia.

Aprovada em 28 / 02 / 2013

Prof.^a D.Sc. Cristiane Elizabeth Costa de Macêdo
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN
Orientadora

Prof. D.Sc. Eduardo Luiz Voigt
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN
Coorientador

Prof. D.Sc. Salvador Barros Torres
Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte – EMPARN
Universidade Federal Rural do Semiárido – UFRSA
Conselheiro

À minha filha Raíssa, maior presente de Deus na minha vida.

À minha mãe Maria Neusa e minha irmã Jussara pelas orações e por todo amor e carinho.

Ao meu pai, Josué pelo amor e incentivo.

E ao meu marido Afrânio pelo amor e apoio.

DEDICO

Ao grande Mestre Eduardo Luiz Voigt, por tudo que me ensinou como pessoa e como profissional. Você é exemplo. Todo seu cuidado, carinho e atenção serão lembrados sempre.

OFEREÇO

A Deus, que sempre está comigo em todos os momentos, pelo seu amor e cuidado incondicional. Paizinho, a você todo meu carinho, amor e reverência;

Ao meu professor Dr. Eduardo Luiz Voigt pelo incentivo, pelas orientações, pela paciência, amizade e confiança;

À Profa. Dra. Cristiane Macêdo pelo apoio, por ter disponibilizado o Labiotec para realização deste trabalho e por ter me incentivado nesse sonho junto a UFERSA;

À Universidade Federal Rural do Semi-árido e ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

À UFRN pelas instalações e aos funcionários do Departamento de Genética e Biologia Celular, em especial a Fran, Silvana, Joyce, Mayara, e Naldo pela colaboração;

Aos meus amigos Lisiane, Cibelle, Thiago, Danilo, Hudson, Ana Paula, Leyanes, Maria Isabel, Emerson, Demétrios, Paula, Ciro, Hanieri, Lorena, Mônica, Juliana, Yuri, Yugo, a vocês todo o meu carinho por todos os momentos de aprendizado, ajuda e também de descontração;

Aos amigos Thiago Galvão e Danilo pela atenção, paciência e por toda ajuda nas análises bioquímicas;

As amigas Christiane Cassimiro, Dalila, Joyce e Gabi por terem me acolhido na “casa 10” e pelos maravilhosos momentos compartilhados;

A CibelleVanúcia por ter me acolhido no seu apartamento em Mossoró no primeiro semestre do curso e principalmente pela sua amizade e companheirismo de sempre;

A Maria Isabel por toda ajuda na dissertação e também por toda sua amizade, presteza e acolhimento, uma amiga maravilhosa que o Senhor colocou na minha vida;

Ao meu Pequeno grupo da Igreja Batista Vida Nova, Maria, Ronaldo, Cleo, Espíndola, Vanusa, Cris, Sônia, Jeane, Victor por todas as vezes que sorriram, choraram e oraram comigo.

Muito obrigada!

RESUMO

ARAÚJO, Jussara de Lima Oliveira. **Mobilização de reservas durante o crescimento pós-germinativo em girassol sob estresse salino e osmótico aplicados de forma isolada e combinada.** 2013. 73f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2013.

Este trabalho teve como objetivo investigar as alterações no padrão de mobilização das reservas e partição dos produtos de mobilização em girassol durante o estabelecimento da plântula sob estresse salino e osmótico aplicados de forma isolada e combinada. Para tanto, sementes germinadas do híbrido Helio 253 foram cultivadas em meio ágar-água 4 g/L sem adições (controle) ou suplementado com agentes estressores sob condições controladas durante 72 h. Foram realizados três experimentos, verificando-se os efeitos de tratamentos salinos isolados (NaCl 0, 50 e 100 mM), tratamentos osmóticos isolados (D-manitol 0, 100 e 200 mM) ou tratamento controle, salino (NaCl 100 mM), osmótico (D-manitol 200 mM) e isosmótico combinado (NaCl 50 mM e D-manitol 100 mM). O estresse salino e o estresse osmótico aplicados de forma isolada afetaram diferencialmente a mobilização das diversas reservas. Tanto o estresse salino quanto o estresse osmótico retardou a mobilização dos lipídios e do amido, mas apenas o estresse osmótico acelerou a degradação das proteínas. O retardo da mobilização do amido e dos lipídios é acompanhado pela acumulação de açúcares não redutores nos cotilédones, os quais podem estar implicados em um mecanismo de regulação que envolve a relação fonte-dreno. A diminuição do conteúdo de proteínas e o aumento do conteúdo de aminoácidos livres no eixo em crescimento pode indicar a ocorrência de distúrbios no metabolismo das proteínas nas plântulas expostas ao estresse salino ou osmótico isolado. A exposição das plântulas ao estresse salino combinado ao estresse osmótico, sob condição isosmótica em comparação com os estresses isolados, não afetou a mobilização das reservas de carbono e de proteínas. Os tratamentos salino isolado e o isosmótico combinado não afetaram o estado hídrico dos cotilédones e do eixo em crescimento, nem a distribuição do K^+ entre estas partes. No entanto, o tratamento osmótico isolado afetou o estado hídrico dos cotilédones. Tomando os resultados em conjunto, é possível concluir que as respostas apresentadas pelas plântulas de girassol, em termos de mobilização de reservas, são características para o estresse salino combinado ao estresse osmótico e não podem ser extrapoladas a partir das respostas apresentadas para estes estresses aplicados de forma isolada.

Palavras-chave: déficit hídrico, *Helianthus annuus* L., mobilização de reservas, salinidade

ABSTRACT

ARAÚJO, Jussara de Lima Oliveira. **Reserve mobilization during post-germinative growth in sunflower under salt and osmotic stress applied individually or in combination.** 2013. 73f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2013.

The aim of this work was to investigate changes in the pattern of reserve mobilization and resulting metabolite partitioning in sunflower during seedling establishment under salt and osmotic stress applied individually or in combination. In this order, germinated seeds from the Helio 253 hybrid were cultivated in 4 g/L agar-water medium without additions (control) or supplemented with stressing agents under controlled conditions during 72 h. Three different experiments were carried out, verifying the effects of isolated salt treatments (0, 50 e 100 mM NaCl), isolated osmotic treatments (0, 100 e 200 mM D-manitol) or control, salt (100 mM NaCl), osmotic (200 mM D-manitol) and isosmotic combined treatment (50 mM NaCl and 100 mM D-manitol). Isolated salt and osmotic stress affected differentially reserve mobilization in sunflower seedlings. Both stresses retarded lipid and starch mobilization, but only osmotic stress accelerated protein degradation. The delay in lipid and starch mobilization was accompanied by non-reducing sugar accumulation in the cotyledons, which could be implicated in regulation mechanisms involving source-sink relations. The decrease in the protein content and the increase in the free amino acid content in the growing axis could indicate disturbances in the protein metabolism in the sunflower seedlings exposed to isolated salt and osmotic stresses. Curiously, the exposition of sunflower seedlings to salt stress combined with osmotic stress under isosmotic condition with regard to these stresses applied individually did not affect reserve mobilization. The salt treatment and the combined treatment did not alter the water status neither K^+ partitioning in the different seedling parts. However, the osmotic treatment affected the water status of the cotyledons. Taking these results together, it is possible to conclude that the responses showed by the sunflower seedlings, in terms of reserve mobilization, are unique to combined stresses and could not be extrapolated from the responses obtained under salt and osmotic stress applied individually.

Keywords: water deficit, *Helianthus annuus* L., reserve mobilization, salinity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto morfológico do capítulo e dos de aquênios de girassol.....	17
Figura 2: Mobilização dos triacilgliceróis (TAGs) envolvendo os Corpos Lipídicos (CLs), os glioxissomos e as mitocôndrias.....	26
Figura 3 - Modelo que representa a condução dos experimentos em sistema de cultivo <i>in vitro</i> . Esquema com os principais procedimentos e o momento de coleta (A). Ilustração do modo de seção da plântula em cotilédones e eixo em crescimento (B).....	30
Figura 4 - Aspecto morfológico de plântulas de girassol submetidas ao estresse salino induzido por cloreto de sódio (NaCl).....	37
Figura 5 - Conteúdo de massa seca (MS) em plântulas de girassol submetidas ao estresse salino.....	39
Figura 6 – Conteúdo de lipídios neutros (LN), proteínas solúveis (PS) e amido em plântulas de girassol submetidas ao estresse salino.....	41
Figura 7 – Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST), açúcares não-redutores (ANR) e aminoácidos livres totais (AALT) em plântulas de girassol submetidas ao estresse salino.....	43
Figura 8 - Aspecto morfológico de plântulas de girassol submetidas ao estresse osmótico induzido por D - Manitol.....	44
Figura 9 - Conteúdo de massa seca (MS) e porcentagem de umidade em plântulas de girassol submetidas ao estresse osmótico.....	46
Figura 10 – Conteúdo lipídios neutros (LN), proteínas solúveis (PS) e amido em plântulas de girassol submetidas ao estresse osmótico.....	48
Figura 11 – Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST), açúcares não-redutores (ANR) e aminoácidos livres totais (AALT) em plântulas de girassol submetidas ao estresse osmótico.....	50
Figura 12 - Aspecto morfológico de plântulas de girassol submetidas aos estresses salino e osmótico aplicados de modo isolado e combinado.....	52

Figura 13 - Conteúdo de massa seca (MS) e porcentagem de umidade em plântulas de girassol submetidas aos estresses salino e osmótico de modo isolado e combinado..... 54

Figura 14 – Conteúdo de LN, PS e amido em plântulas de girassol submetidas aos estresses salino e osmótico de modo isolado e combinado.....58

Figura 15 - Conteúdo de AST, ANR e AALT em plântulas de girassol submetidas aos estresses salino e osmótico de modo isolado e combinado..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdo de Na^+ e K^+ e relação K^+/Na^+ em plântulas de girassol submetidas aos estresses salino e osmótico de modo isolado e combinado.....	56
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

AALT Aminoácidos livres totais

ABA Ácidoabscísico, do inglês *abscisicacid*

ANR Açúcares não redutores

AST Açúcares solúveis totais

ATP Trifosfato de adenosina, do inglês *adenosinetriphosphate*

BSA Albumina Sérica Bovina

Cl⁻ Cloreto

CL Corpos lipídicos

Conab Companhia Nacional de Abastecimento

DAE Dias após a embebição

K⁺ Potássio

LN Lipídios neutros

MS Massa Seca

Na⁺ Sódio

NaClO Hipoclorito de Sódio

OFRs Oligossacarídeos da família da rafinose

PRS Proteínas de reserva de sementes

PS Proteínas solúveis

TAG Triacilgliceróis

VEP Vacúolos de estocagem de proteína

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Características botânicas e agronômicas do girassol.....	16
2.2 Aspectos gerais e importância econômica do girassol.....	19
2.3 Estresses ambientais.....	21
2.4 Mobilização das reservas.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	29
3.2 Tratamentos e coletas.....	30
3.2.1 Efeito do estresse salino.....	30
3.2.2 Efeito do estresse osmótico.....	31
3.2.3 Efeito isolado e combinado dos estresses salino e osmótico.....	31
3.3 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	32
3.3.1 Lipídios neutros (LN).....	32
3.3.2 Proteínas solúveis (PS).....	32
3.3.3 Aminoácidos livres totais (AALT), açúcares solúveis totais (AST) e açúcares não redutores (ANR).....	33
3.3.4 Amido.....	35
3.3.5 Na^+ e K.....	35
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 Efeito do estresse salino.....	37
4.2 Efeito do estresse osmótico.....	44
4.3 Efeito isolado e combinado dos estresses salino e osmótico.....	51
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	67
7. REFERENCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

Dentre os grãos cultivados no Brasil, o girassol (*Helianthus annuus* L.) vem se destacando como a quarta oleaginosa mais produzida. Em 2012, a produção nacional esteve em torno de 95 mil toneladas (CONAB, 2012). O interesse pelo plantio de girassol no Brasil vem crescendo devido à busca por novas alternativas para a agricultura familiar e diversificação de culturas, juntamente ao aumento da demanda por óleo vegetal para produção de biodiesel (LEITE et al., 2005).

O produtor da região Nordeste muitas vezes encontra dificuldades para produzir de forma eficiente, principalmente porque esta região está inserida no que se chama de Polígono das Secas. Esta área abrange 1.640.000 km², correspondentes a 1.348 municípios, distribuídos pelos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2005).

O Polígono das Secas se caracteriza por áreas predominantemente semiáridas com precipitação pluviométrica média anual inferior a 800 milímetros, índice de aridez de até 0,5, calculado pelo balanço hídrico, o qual relaciona as precipitações e a evapotranspiração potencial, com risco de seca maior que 60%. Tais características constituem fatores limitantes para o desenvolvimento urbano, industrial e agropecuário, comprometendo significativamente o rendimento das culturas e dificultando a instalação de sistemas eficientes para o armazenamento da água, o que intensifica ainda mais os efeitos da seca na sociedade (SANTOS JÚNIOR et al., 2011).

Além da seca, o Nordeste brasileiro apresenta em torno de 20 a 25% de solos salinizados. Em termos gerais, a salinidade pode ser distinguida em primária, devido às características naturais do solo, e secundária, decorrente

das atividades humanas. Em muitas áreas, a salinização decorre da natureza física e química dos solos, do regime pluvial e da alta evaporação. A drenagem restrita também pode contribuir, podendo influenciar na altura do lençol freático (ESTEVES e SUZUKI, 2008). A salinização progride quando a quantidade de sais acumulados é maior que a quantidade removida pela água de drenagem. De fato, a principal causa da expansão das áreas salinizadas nos campos agrícolas tem sido a irrigação mal conduzida e o manejo inadequado da adubação (PIZARRO, 1985).

Tanto o déficit hídrico quanto o estresse salino afetam diversas etapas do ciclo de vida das plantas cultivadas. Dentre estas etapas, a germinação da semente e o estabelecimento da plântula podem ser destacados como os momentos de maior vulnerabilidade, intimamente relacionados com o sucesso inicial das lavouras (BUCKERIDGE et al., 2004). Levando em conta que as condições ambientais e a utilização das reservas nutritivas são os fatores preponderantes para o estabelecimento da plântula, é imperativo esclarecer como o déficit hídrico e o estresse salino afetam a mobilização das reservas.

Embora muitos trabalhos demonstrem os efeitos danosos do déficit hídrico e do estresse salino sobre a germinação e o estabelecimento da plântula (ASHRAF et al., 2003; MISRA e DWIVEDI, 2004), pouco se sabe sobre os mecanismos utilizados pelas plântulas para regular a mobilização das reservas sob estes estresses. De fato, as principais iniciativas encontradas na literatura até o momento procuram caracterizar as mudanças que ocorrem nos padrões de degradação das diferentes reservas sob salinidade. Neste sentido, alguns trabalhos mostram que o estresse salino pode atrasar a mobilização do amido (PRISCO et al., 1981), dos lipídios (KAYANI et al., 1990; VOIGT et al., 2009) e das proteínas de reserva (PRISCO e VIEIRA, 1976; VOIGT et al., 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo investigar as alterações no padrão de mobilização de reservas e partição de produtos de mobilização em girassol durante o estabelecimento da plântula sob estresse salino e osmótico aplicados de forma isolada e combinada.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS E AGRONÔMICAS DO GIRASSOL

O girassol (*Helianthus annuus*L.), planta originária da América do Norte, é uma dicotiledônea anual pertencente à família Asteraceae. Apresenta grande adaptação a diferentes condições ambientais, ocupando diversos habitats como regiões tropicais, subtropicais e temperadas. O girassol também é conhecido como “flor do sol”, devido à sua rotação sempre voltada para o sol (heliotropismo). Etiologicamente, o gênero deriva do grego helios, que significa sol, e de anthus, que significa flor (LEITE et al., 2005).

A planta de girassol apresenta caule robusto e ereto, com ou sem pêlos, geralmente sem ramificações, com diâmetro variando entre 15 e 90 mm. Quanto à altura, são observadas variações de 0,5 a 4,0 m (CASTIGLIONI et al., 1994). Suas folhas podem apresentar diversos formatos e tamanhos, são pecioladas, alternadas, com comprimento de 8 a 50 cm e número de folhas por caule variando em torno de oito (FRANK e SZABO, 1989).

A inflorescência desta espécie é do tipo capítulo (Figura 1) com formação plana, convexa ou côncava com diâmetros de 6 a 50 cm, com número de flores variando de 100 a 8000 por capítulo (CASTRO et al., 1996b). As flores do disco produzem os frutos, denominados aquênios (grãos) (Figura 1). As flores do raio, que são estéreis, servem para atrair insetos polinizadores, particularmente abelhas que propiciam a fecundação

cruzada (CASTRO et al., 1996a). Em lavouras comerciais, durante a floração, as abelhas propiciam aumento da produção pela polinização de um maior número de flores, além de possibilitar completa fecundação das mesmas. Assim, junto à produção de aquênios, a produção de mel pode ser outra fonte de renda, visto que chega a produzir de 30 a 40 kg de mel por hectare (LEITE et al., 2005).



Figura 1: Aspecto morfológico do capítulo e dos de aquênios de girassol (*Helianthus annuus* L.)

Os aquênios têm formas oblongas, geralmente achatada, composto de pericarpo, mesocarpo e endocarpo de tamanho, cor e teor de óleo variável conforme as características de cada cultivar. As amêndoas contêm baixo teor de fibras, mas são ricas em óleo e proteínas. Dentre os óleos vegetais, o óleo de girassol destaca-se por suas excelentes características físico-químicas e nutricionais. Possui alta relação de ácidos graxos poliinsaturados (65,3%) e saturados (11,6%), sendo que o teor de poliinsaturados é constituído, em grande parte, pelo ácido linoleico (65%). Por estas características, é um dos óleos vegetais de melhor qualidade nutricional e organoléptica (CASTRO et al., 1997).

De acordo com Lira et al., (2011) apesar de se adaptar muito bem a diversos tipos de solo, o cultivo do girassol é indicado para solos de textura média, profundos, com boa drenagem, razoável fertilidade e pH variável de ácido a neutro (superior a 5,2). O sistema radicular se desenvolve de modo profundo, do tipo pivotante, proporcionando grandes melhoras na fertilidade do solo. Deficiências de nitrogênio, potássio e boro no solo provocam diminuição gradativa na taxa de crescimento das plantas, limitando a produção.

As plantas se desenvolvem bem entre as temperaturas de 27°C e 28°C, obtidas em condições controladas. Entretanto, não há redução significativa de produção na faixa de 8 a 34°C, com precipitação em torno de 600 mm. Possuem ciclo vegetativo relativamente curto, variando entre 90 e 130 dias. Em média, 60 dias após a semeadura ocorre o florescimento, possibilitando a fecundação cruzada, sendo basicamente realizada por insetos, particularmente as abelhas (LEITE et al., 2005).

De acordo com Lira et al., (2011), o girassol é muito sensível à competição com plantas daninhas, mas apesar de não ser muito suscetível a doenças, algumas pragas podem ser encontradas. Dentre as pragas mais comuns no Rio Grande do Norte, estão a “vaquinha” (*Diabrotica speciosa*) e “lagarta preta” (*Chlosyne lacinia*).

2.2 ASPECTOS GERAIS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO GIRASSOL

Os desafios que o girassol enfrenta no Brasil são basicamente três: oferecer ao produtor uma alternativa, que em caráter complementar, possibilite uma segunda colheita, sobre a mesma área e no mesmo ano agrícola; oferecer mais uma matéria-prima oleaginosa às indústrias de processamento de outros grãos, reduzindo sua ociosidade; finalmente, oferecer ao mercado um óleo comestível de alto valor nutricional (PELEGRINI, 1985).

O girassol pode ser utilizado em diversas finalidades, como flor ornamental, adubação verde, girassol de confeitiro em substituição as amêndoas em geral, grãos *in natura* e farelo (ração) para alimentação de aves, suínos e bovinos, forragem e silagem. Também pode ser consumido na alimentação humana *in natura*, principalmente na forma de óleo, na culinária. O óleo de girassol possui ácidos graxos essenciais que contribuem para redução dos níveis do “mau colesterol” (LDL) e na prevenção de doenças vasculares (LIRA et al., 2011).

O cultivo de girassol tem hoje abrangência mundial, colocando a espécie atualmente (safra 2010/2011) na quinta colocação dentre as oleaginosas mais produzidas no mundo e a quarta em produção de óleo. O constante avanço de áreas semeadas com girassol vem ganhando números relevantes também no cenário nacional (LIRA et al., 2011)

Além de maior tolerância à seca, ao frio e ao calor, o girassol foi classificado como espécie de tolerância moderada à salinidade, quando comparada com a maioria das culturas no Brasil (KATERJI et al., 2000; LEITE et al., 2005). Aliado a essas características, o seu rendimento parece

ser pouco influenciado pela latitude, altitude e pelo fotoperíodo, o que confere ao girassol grande potencialidade de cultivo em diferentes regiões do país, fazendo dela uma boa opção aos produtores brasileiros (LAZZAROTTO et al., 2005).

A lei 11.097/2005 estabelece que, a partir deste ano, o percentual de biodiesel misturado ao diesel mineral passa a ser de 5%, o que requer a produção de 2,2 bilhões de litros de biodiesel (RODRIGUES et al., 2006). Neste contexto, a oferta de matéria-prima parece ser uma das principais dificuldades que restringe a implementação de um programa de produção extensiva de biodiesel (CARGININ, 2007). O uso do biodiesel em substituição ao óleo diesel mineral, além da possível mitigação das emissões de dióxido de carbono, proporciona redução da emissão de gases e partículas pelos veículos que são diretamente prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente, como o monóxido de carbono, o enxofre e os hidrocarboneto aromáticos policíclicos (compostos cancerígenos) (BELTRÃO e OLIVEIRA, 2007).

Desde o ano de 2005, os dados da exploração do girassol no Nordeste do Brasil têm sido levantados pelo IBGE. Estudos realizados pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN) demonstram que o girassol, dentre as espécies alternativas com potencial para produção de biodiesel, tem boa adaptação ao clima do Rio Grande do Norte (RN), podendo inclusive ser cultivado em regiões semiáridas e tropicais de praticamente todo o estado. Ensaio realizados nos municípios Norte-Riograndeses de Apodi, Ipanguaçu e Canguaretama, em duas redes experimentais nos anos agrícolas de 2006 e 2007, registraram médias de produção que variam de 1300 a 2700 kg/ha⁻¹, superiores à média nacional de 1.500 kg/ha⁻¹, o que evidencia condições edafoclimáticas propícias ao

desenvolvimento da cultura do girassol no Rio Grande do Norte (LIRA et al., 2011).

2.3 ESTRESSES AMBIENTAIS

Os estresses ambientais consistem em condições desfavoráveis para o crescimento, o desenvolvimento e/ou a produção das plantas (BRAY et al., 2000). De acordo com a natureza do agente causador, os estresses ambientais podem ser classificados em estresses bióticos e abióticos. Os principais estresses bióticos incluem os patógenos, os parasitas e as pragas, enquanto que a seca, o alagamento, a salinidade, o calor, o frio e a luminosidade são estresses abióticos amplamente distribuídos (MAHAJAN e TUTEJA, 2005). Em regiões áridas e semiáridas, como o Nordeste do Brasil, o estresse hídrico e o estresse salino se destacam como condições limitantes da produção agrícola (DANTAS et al., 2002).

O estresse hídrico, no sentido mais amplo, envolve tanto o excesso quanto a falta de água no solo. O excesso de água acarreta o alagamento, limitando o suprimento de oxigênio e a respiração, especialmente nas raízes (MAHAJAN e TUTEJA, 2005). Plantas que habitam locais alagados normalmente desenvolvem aerênquimas para garantir o suprimento de oxigênio e também podem utilizar a fermentação como via metabólica alternativa para a produção de ATP (BRAY et al., 2000). Em oposição, a falta de água ocasiona a seca, que geralmente se deve à baixa pluviosidade associada à elevada evapotranspiração (MAHAJAN e TUTEJA, 2005). Além disso, a chamada seca fisiológica consiste em uma condição na qual a água está presente no ambiente, mas não está disponível para as plantas, devido ao congelamento ou à hiperosmolaridade da solução do solo (SMITH et al., 2010).

Nas plantas expostas à seca, o fechamento dos estômatos consiste em uma das respostas mais imediatas para a economia de água. No entanto, o fechamento dos estômatos também limita o crescimento e a produção das plantas porque restringe o suprimento de dióxido de carbono para a fotossíntese (MAHAJAN e TUTEJA, 2005). Além disso, as plantas também podem manter a absorção de água pelas raízes por intermédio do ajustamento osmótico. Este mecanismo envolve a biossíntese e a acumulação de solutos compatíveis no citosol e no vacúolo das células, garantindo a diminuição do potencial hídrico dos tecidos em relação ao da solução do solo. Dentre os solutos compatíveis acumulados, destacam-se os açúcares, os aminoácidos e os compostos quaternários de nitrogênio (SAIRAM e TIAGY, 2004).

O estresse salino, ocasionado pelo excesso de sais no solo, compartilha alguns efeitos em comum com a seca. Como já mencionado, a hiperosmolaridade da solução do solo induz a seca fisiológica, restringindo a absorção de água pelas raízes (BRAY et al., 2000). Desta forma, o estresse salino também pode reduzir o crescimento devido ao fechamento dos estômatos, limitando a fixação do carbono (MUNNS, 2005). Além disso, o ajustamento osmótico também pode ser utilizado como mecanismo para lidar com a seca fisiológica (SAIRAM e TIAGY, 2004).

Em adição aos efeitos osmóticos, o estresse salino pode provocar efeitos específicos devido aos íons (MUNNS, 2005). A elevada concentração de íons na solução do solo, geralmente Na^+ e Cl^- , pode prejudicar a absorção de nutrientes minerais, acarretando desbalanços nutricionais. De forma complementar, o excesso de íons absorvidos pode interferir na distribuição e na utilização de nutrientes minerais, ocasionando toxicidade iônica (MAATHUIS e AMTMANN, 1999). Para lidar com a toxicidade iônica, as plantas comumente utilizam mecanismos de

compartimentalização e exclusão. A compartimentalização dos íons absorvidos nos vacúolos, especialmente nas células das raízes e do caule, evita a transferência destes íons para corrente transpiratória. Assim sendo, o excesso de íons é excluído das folhas maduras, preservando a atividade fotossintética (MUNNS, 2005).

O estudo dos estresses ambientais em plantas têm se intensificado recentemente, em virtude dos distúrbios climáticos decorrentes do uso não sustentado dos recursos naturais. Os efeitos dos diferentes agentes estressores são geralmente testados de forma isolada. No entanto, as plantas estão geralmente expostas a diferentes combinações de estresses nas condições naturais. Além disso, as respostas desencadeadas para uma combinação específica de dois agentes estressores é característica e não pode ser diretamente extrapolada a partir das respostas apresentadas para cada um dos agentes aplicados de forma isolada. Desta maneira, a investigação das respostas fornecidas aos estresses combinados é indispensável para o entendimento dos mecanismos utilizados pelas plantas para superar estes estresses em condições mais aproximadas daquelas encontradas na natureza (MITLER, 2006).

2.4 MOBILIZAÇÃO DAS RESERVAS

A germinação da semente e o crescimento da plântula consistem nas fases de maior vulnerabilidade para o estabelecimento das culturas nas condições de campo. Tendo em vista que o crescimento da plântula é sustentado pela utilização das reservas armazenadas durante a maturação da semente, é indispensável que o aparato fotossintético tenha sido

desenvolvido antes que as reservas tenham sido exauridas (EASTMOND e GRAHAM, 2001).

As reservas nutritivas armazenadas em sementes compreendem grupos específicos de carboidratos, lipídios e proteínas (BEWLEY et al., 2013). Os carboidratos de reserva mais comuns são a sacarose, os oligossacarídeos da família da rafinose (OFRs) e o amido. A sacarose e os OFRs são açúcares não redutores largamente distribuídos entre as angiospermas (BUCKERIDGE et al., 2004a). A sacarose é constituída por uma unidade de D-glicose unida a uma unidade de D-frutose, enquanto que os OFRs são derivados da sacarose pela união de unidades de D-galactose (HELDT e PIECHULLA, 2011).

Assume-se que a sacarose e os OFRs são estocados no citosol, sobretudo nas células do eixo embrionário. Desta maneira, estes açúcares podem atuar na estabilização das membranas celulares durante a fase de dessecação e o processo de embebição nas sementes ortodoxas (BLACK et al., 2006). De forma adicional, sugere-se que a sacarose e os OFRs são as principais fontes de energia nos momentos iniciais da germinação (BUCKERIDGE et al., 2004b). A hidrólise dos OFRs é catalisada por α -galactosidases, produzindo D-galactose e sacarose. Em seguida, a sacarose é clivada por invertases, gerando D-glicose e D-frutose (BLACK et al., 2006).

Dentre os polissacarídeos de reserva encontrados em sementes, o amido é o principal depósito de carbono em cereais e algumas leguminosas, mas também pode ser encontrado em sementes oleaginosas (BLACK et al., 2006). O amido é constituído pelo polissacarídeo linear amilose e o polissacarídeo ramificado amilopectina, ambos formado por unidades de D-glicose (HELDT e PIECHULLA, 2011). Estes polissacarídeos se entrelaçam em camadas semicristalinas dentro dos plastídeos, constituindo os grânulos de amido (BEWLEY et al., 2013).

A degradação do amido é iniciada pelas α -amilases, gerando oligossacarídeos e dextrinas. Este processo é continuado pelas β -amilases, produzindo maltose. Finalmente, as dextrinas são clivadas pelas enzimas desramificadoras e a maltose é hidrolisada pelas maltases, possibilitando a degradação completa dos grânulos de amido (BLACK et al., 2006; HELDT e PIECHULLA, 2011).

Nas sementes oleaginosas, os lipídios de reserva são os estoques majoritários de carbono. Estes lipídios geralmente correspondem aos óleos, misturas complexas de triacilgliceróis (TAGs) contendo preferencialmente cadeias de ácidos graxos insaturados (BLACK et al., 2006). Os TAGs são armazenados em corpos lipídicos (CLs) constituídos por uma monocamada de fosfolipídios associada a proteínas estruturais que encerra uma cavidade preenchida por TAGs (FRANDSEN et al., 2001).

A mobilização dos TAGs envolve interações inter-organelares entre os CLs, os glioxissomos e as mitocôndrias (Figura 2). Os TAGs são hidrolisados nos CLs e os ácidos graxos liberados são transferidos para os glioxissomos. Nos glioxissomos, os ácidos graxos são degradados a acetil-CoA pela β -oxidação e os grupos acetil são consumidos pelo ciclo do glioxilato para a produção de succinato. O succinato produzido é transferido para as mitocôndrias, onde é interconvertido a malato e exportado para o citosol. No citosol, o malato é utilizado para a síntese de sacarose (EASTMOND e GRAHAM, 2001).

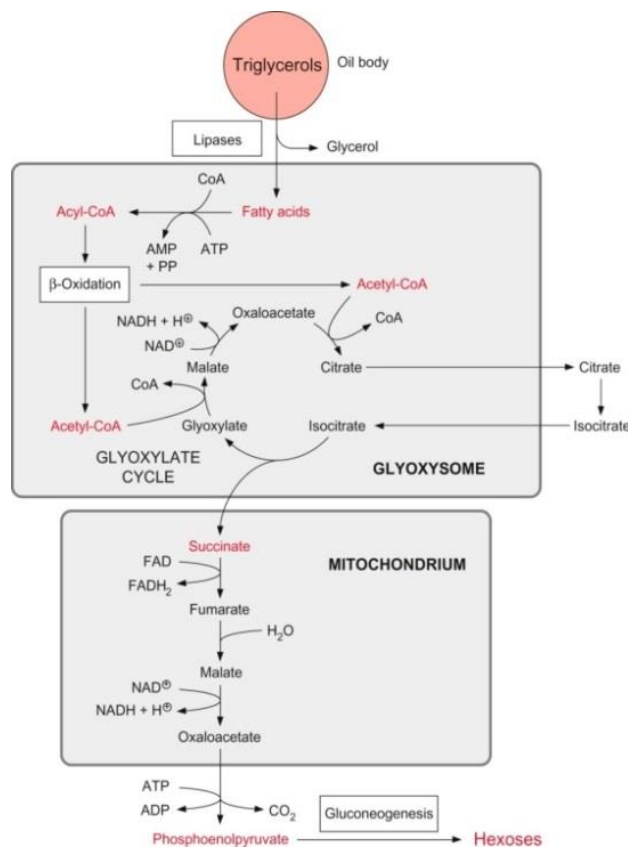


Figura 2. Mobilização dos triacilgliceróis (TAGs) envolvendo os corpos lipídicos (CLs), os glioxissomos e as mitocôndrias.

Em dicotiledôneas, as proteínas de reserva de sementes (PRS) incluem as albuminas e as globulinas. Segundo o trabalho clássico de Osborne (1924), as albuminas são as PRS solúveis em água ou tampões diluídos com pH neutro, enquanto que as globulinas são aquelas solúveis em soluções salinas. Durante a maturação das sementes, as albuminas e as globulinas são produzidas pela via secretora e são depositadas nos vacúolos de estocagem de proteínas (VEPs) (HERMAN e LARKINGS, 1999).

A mobilização das PRS envolve a ação coordenada de diversas enzimas proteolíticas, as quais são ativadas ou sintetizadas *de novo* a partir

da germinação (MUNTZ et al., 2001). Dentre estas enzimas, as proteinases hidrolisam as ligações peptídicas localizadas em regiões internas das PRS, ao passo que as aminopeptidases e carboxipeptidases clivam os resíduos de aminoácidos dispostos nas regiões N-terminal e C-terminal, respectivamente (BEWLEY et al., 2013).

Embora a mobilização das reservas e as condições ambientais apresentem elevada importância durante o estabelecimento das culturas no campo, poucos trabalhos têm caracterizado o efeito dos estresses ambientais sobre a mobilização das reservas em espécies cultivadas. As principais iniciativas encontradas na literatura até o momento enfocam as alterações causadas pelo estresse salino nos padrões de degradação de diferentes reservas.

Em plântulas de feijão caupi (*Vigna unguiculata*), a mobilização das PRS (PRISCO e VIEIRA, 1976) e do amido (PRISCO et al., 1981) nos cotilédones é fortemente retardada pela salinidade induzida por NaCl. Tendo em vista que a atividade proteolítica nos cotilédones é brandamente afetada pela salinidade, sugere-se que a mobilização das PRS deve ser restringida pela diminuição do transporte de aminoácidos para o eixo em crescimento (PRISCO e VIEIRA, 1976). De forma complementar, a mobilização do amido pode ser atrasada pela salinidade devido à diminuição da atividade amilolítica nos cotilédones (PRISCO et al., 1981).

Em plântulas de jojoba (*Simmondsia chinensis*) tratadas com NaCl, o atraso da mobilização dos lipídios é acompanhado pela acumulação de açúcares solúveis nos cotilédones (KAYANI et al., 1990). Além disso, o retardo da mobilização dos lipídios induzido pela salinidade nos cotilédones de duas espécies de alfafa (*Medicago* sp.) pode ser atribuído à diminuição da atividade de enzimas glioxissomais

envolvidas na conversão de ácidos graxos em açúcares durante o estabelecimento da plântula (MILED-DAUOD e CHERIF, 1991).

Após a germinação de aquênios de girassol a mobilização das PRS nos cotilédones, bem como a acumulação de aminoácidos no hipocótilo não são afetadas por tratamentos salinos. No entanto, a salinidade retarda a mobilização dos lipídios nos cotilédones e induz a acumulação de açúcares solúveis nos cotilédones e no hipocótilo. Assim sendo, presume-se que a salinidade diminui a utilização dos açúcares solúveis no eixo em crescimento, limitando a mobilização dos lipídios nos cotilédones (ASHRAF et al., 2003).

Durante o estabelecimento da plântula de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), o estresse salino atrasa fortemente a mobilização dos lipídios e proteínas de reserva e do amido nos cotilédones. Considerando que o conteúdo de açúcares solúveis não é alterado, mas ocorre acumulação de aminoácidos, especialmente L-glutamina, nos cotilédones, é possível que os aminoácidos atuem como sinais que induzem o atraso da mobilização das reservas em plântulas de cajueiro sob estresse salino (VOIGT et al., 2009).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Neste trabalho, foram utilizadas sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) híbrido Helio 253 oriundas da Empresa Heliagro Agricultura e Pecuária Ltda, Morumbi, SP. Para a germinação, as sementes foram lavadas com detergente comercial diluído e desinfetadas em câmara de fluxo laminar com etanol 70% (v/v) por 30 segundos, seguido de NaClO 0,5% (m/v) por cinco minutos sob agitação eventual. Logo após, as sementes foram lavadas três vezes e embebidas por três horas em água destilada estéril. Em seguida, o semeio foi realizado em placas de Petri, entre folhas de papel Germitest® (100 mm de diâmetro) umedecidas com água destilada estéril na proporção de duas vezes e meia a massa do papel, distribuindo-se 20 sementes por placa. As sementes foram incubadas em câmara de crescimento sob condições controladas (radiação fotossinteticamente ativa de 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 28 ± 2 °C) por 48 horas.

Para o desenvolvimento das plântulas em sistema de cultura *in vitro*, cinco sementes germinadas foram transferidas para cada frasco de vidro com tampa de plástico contendo meio ágar-água 4 g/L para o tratamento controle e ágar-água 4 g/L suplementado com os agentes estressores para os demais tratamentos. As plântulas foram mantidas sob as mesmas condições de crescimento durante 72 horas. O material coletado foi congelado e armazenado a 20 °C até a realização das determinações bioquímicas.

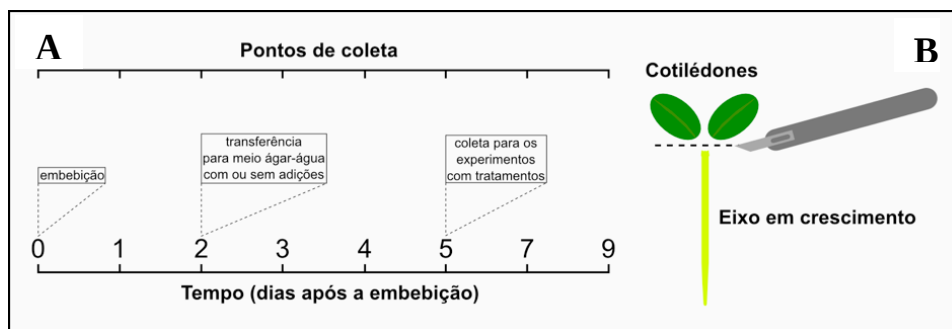


Figura 3 - Modelo que representa a condução dos experimentos em sistema de cultivo *in vitro*. Esquema com os principais procedimentos e o momento de coleta (A). Ilustração do modo de seção da plântula em cotilédones e eixo em crescimento (B). Fonte: Galvão (2012).

3.2 TRATAMENTOS E COLETAS

3.2.1 Efeito do estresse salino

Para investigar o efeito do estresse salino sobre a mobilização das reservas e a partição dos produtos de hidrólise, as sementes germinadas foram transferidas para o meio ágar-água 4 g/L suplementado com 0 (controle), 50 ou 100 mM de cloreto de sódio (NaCl) por 72 horas. Assim sendo, as plântulas foram coletadas no 5º dia após a embebição (DAE), separando os cotilédones do eixo embrionário.

3.2.2 Efeito do estresse osmótico

Quando o efeito do estresse osmótico foi testado, as sementes germinadas foram transferidas para o meio ágar-água 4 g/L suplementado com 0 (controle), 100 ou 200 mM de D-manitol por 72 h. No 5º DAE, as plântulas foram coletadas e divididas em cotilédones e eixo embrionário.

3.2.3 Efeito isolado e combinado dos estresses salino e osmótico

No intuito de testar o efeito isolado e combinado dos estresses salino e osmótico, as sementes germinadas foram transferidas para o meio ágar-água 4 g/L sem adições (controle) ou suplementado com NaCl 100 mM (tratamento salino), D-manitol 200 mM (tratamento osmótico) ou NaCl 50 mM e D-manitol 100 mM (tratamento isosmótico combinado) por 72 horas. Desta maneira, as plântulas foram coletadas no 5º DAE e divididas em cotilédones e eixo embrionário.

3.3 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

3.3.1 Lipídios neutros (LN)

A quantificação dos LN foi realizada pelo método gravimétrico. Para tanto, amostras de cotilédones com aproximadamente 100 mg de massa seca foram pulverizadas em gral e pistilo e os LN foram extraídos com 8 mL de n-hexano a 60°C, durante cinco horas, sob agitação eventual. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para tubos de plástico de massa conhecida. Após a evaporação do n-hexano a 80°C, a massa de lipídios foi calculada a partir da diferença entre a massa inicial e a final dos tubos e expressa em mg de LN/cotilédone.

3.3.2 Proteínas solúveis (PS)

Para a extração das PS a partir dos cotilédones, amostras com cerca de 200 mg de massa fresca foram maceradas durante cinco minutos com 1,5 mL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 7 contendo NaCl 500 mM e 2-mercaptoetanol 2 mM. Após centrifugação a 10.000 xg por 10 minutos, os sobrenadantes foram coletados e os precipitados foram reextraídos com 1 mL do tampão de extração por mais duas vezes. Ao final dos procedimentos, os sobrenadantes foram reunidos, perfazendo 3,5 mL de extrato total por amostra. As PS do eixo em crescimento, por sua vez, foram extraídas com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7 seguindo os procedimentos

supracitados. A determinação das PS foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. O conteúdo de PS dos cotilédones foi expresso em mg de PS/cotilédone e mg de PS/eixo em crescimento.

3.3.3 Aminoácidos livres totais (AALT), açúcares solúveis totais (AST) e açúcares não redutores (ANR)

Para a extração de AALT, AST e ANR, amostras com cerca de 200 mg de massa fresca foram cortadas com bisturi em fragmentos de aproximadamente 2 x 2 mm e foram transferidas para tubos de vidro com tampa rosqueável contendo 5 mL de etanol 80% (v/v). Os tubos foram fechados hermeticamente e a extração foi realizada a 60 °C por 30 minutos. Após a coleta dos sobrenadantes, os resíduos foram reextraídos com 5 mL de etanol 80% (v/v) sob as mesmas condições. Em seguida, os sobrenadantes foram reunidos, perfazendo 10 mL de extrato total por amostra, enquanto que os resíduos foram utilizados para a extração e a determinação de amido.

A dosagem de AALT foi realizada pelo método de Peoples (1989), com a utilização do reagente de ninidrina. Para cada determinação, foram adicionados 100 µL da amostra; 400 µL de água destilada; 250 µL de tampão citrato 200 mM pH 5; e 250 µL do reagente de ninidrina (1 mL de cianeto de potássio 10 mM, 59 mL de metóxi-etanol e 0,5 g de ninidrina). Os tubos foram vedados e incubados a 100 °C, durante 15 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 4 mL de etanol 50% (v/v) em cada amostra. As leituras foram realizadas a 570 nm e a quantidade de AALT foi

calculada de acordo com uma curva padrão de L-glutamina, sendo expressa em μmol de AALT/g de MS.

Para a dosagem de AST, foi utilizado o método de Dubois (1956) com algumas modificações. Em cada determinação, foram adicionados 100 μL da amostra; 400 μL de água destilada; 500 μL de fenol 5% (m/v); e 2,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 90% (v/v). A leitura foi realizada a 490 nm, e o cálculo da quantidade de AST foi baseado em uma curva padrão de D-glicose, sendo expressa em μmol de AST/g de MS.

A dosagem de ANR foi realizada pelo método de Morris (1948) com algumas modificações, utilizando o reagente de antrona (MORRIS 1948; YEMM e WILLIS 1954). Em cada determinação, 100 μL da amostra; 800 μL de água destilada; e 100 μL de KOH 30% (m/v) foram pré-incubados a 100 °C, durante 10 minutos. Após resfriamento, 2,5 mL do reagente de antrona foram adicionados em cada amostra e foi realizada incubação a 40°C, durante 15 minutos. A leitura foi realizada a 620 nm e a quantidade de ANR das amostras foi calculada a partir de uma curva padrão de sacarose, sendo expressa em μmol de ANR/g de MS.

3.3.4 Amido

A extração de amido foi realizada utilizando os resíduos da extração dos compostos solúveis de baixa massa molecular (AALT, AST e ANR). Para tanto, os resíduos foram macerados durante 5 minutos com 1,5 mL de ácido perclórico 30% (v/v). Após centrifugação a 10.000 xg durante 10 minutos, os sobrenadantes foram coletados e os precipitados foram reextraídos com 1 mL de ácido perclórico 30% (v/v) por mais duas vezes. Ao final, os sobrenadantes foram reunidos, perfazendo 3,5 mL de extrato total por amostra.

A dosagem de amido foi realizada com a utilização do reagente de antrona (MORRIS 1948; YEMM e WILLIS, 1954). Para cada determinação, foram utilizados 100 µL da amostra; 900 µL de água destilada; e 2,5 mL do reagente de antrona. A leitura foi realizada a 620 nm, utilizando uma curva padrão de D-glicose. Os valores obtidos foram multiplicados pelo fator 0,9 para conversão em amido, segundo McCready et al. (1950), sendo expressos em mg de amido/parte.

3.3.5 Na^+ e K^+

A determinação dos conteúdos de Na^+ e K^+ foi realizada segundo Viégas et al., (2009). Para tanto, amostras de 200 mg de massa seca foram pulverizadas e submetidas à extração com 10 mL de água destilada em banho-maria a 100 °C por uma hora. O extrato obtido foi filtrado e seu sobrenadante analisado em fotômetro de chama (Shimadzu AA-6200).

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Nos três experimentos utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. No primeiro e no segundo experimento foram utilizados três tratamentos. Para simular o estresse salino, foram empregados controle, 50 ou 100 mM de NaCl e, para simular o estresse osmótico, foram utilizados controle, 100 ou 200 mM de D-Manitol. O terceiro experimento foi realizado com quatro tratamentos (controle, NaCl 100 mM, D-manitol 200 mM e NaCl 50 mM com D-manitol 100 mM). Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de confiança de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DO ESTRESSE SALINO

O estresse salino induzido por cloreto de sódio (NaCl) alterou o padrão de crescimento das plântulas de girassol, híbrido Helio 253, no decorrer de 72 h de tratamento (Figura 4). Com base em aspectos visuais, a expansão dos cotilédones foi estimulada, enquanto que o comprimento do eixo hipocótilo-raiz foi diminuído conforme o aumento da concentração externa de NaCl.

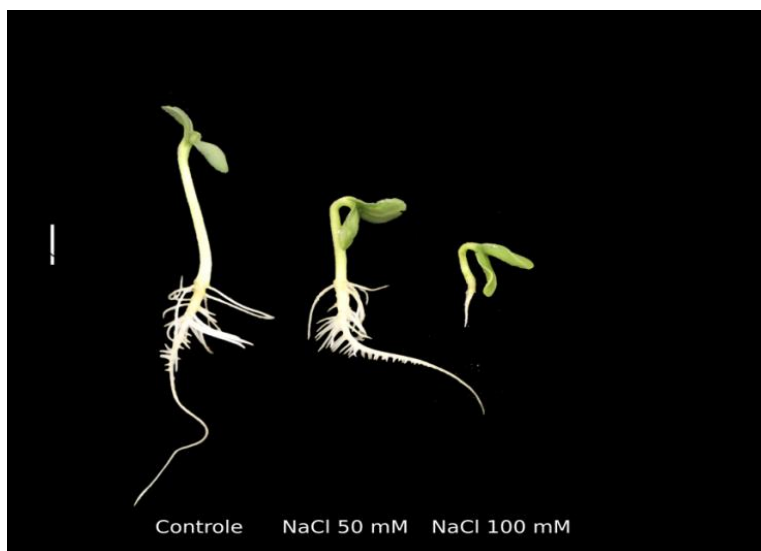


Figura 4. Aspecto morfológico de plântulas de girassol submetidas ao estresse salino induzido por cloreto de sódio (NaCl). As Plântulas do híbrido Helio 253 foram cultivadas durante 72 horas em meio ágar água 4 g/L sem adições (controle) ou suplementado com NaCl 50, ou 100mM. A barra vertical representa a escala de 10 mm.

Os tratamentos salinos ocasionaram o incremento significativo de conteúdo de massa seca (MS) nos cotilédones e, paralelamente, provocaram a diminuição significativa do conteúdo de MS no eixo em crescimento (Figura 5). De fato, o tratamento com NaCl 100 mM aumentou a MS dos cotilédones em cerca de 33% (Figura 5A) e diminuiu a MS do eixo em aproximadamente 53% (figura 5B), quando comparado ao controle. No entanto, no que se refere à porcentagem de umidade, não foram verificados efeitos significativos dos tratamentos salinos em ambas as partes das plântulas.

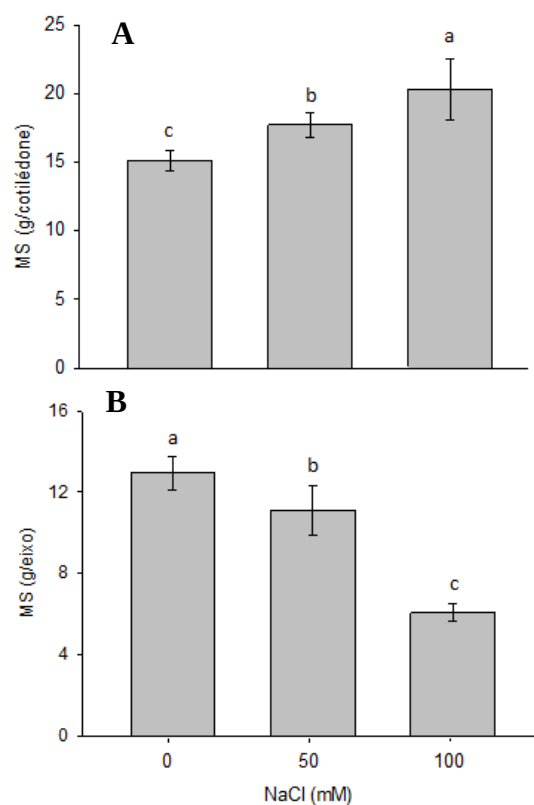


Figura 5. Conteúdo de massa seca (MS) em plântulas de girassol submetidas estresse salino. Conteúdo de MS dos cotilédones (A) e do eixo em crescimento (B) em plântulas do híbrido Helio 253 cultivadas durante 72 h em meio ágar-água 4g/L sem adições (controle) ou suplementado com 50 ou 100 mM. As barras representam as médias, enquanto que as linhas verticais representam os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

O estresse salino afetou diferencialmente a mobilização de reservas de carbono e nitrogênio nos cotilédones (Figura 6). De fato, nas plântulas tratadas com NaCl 100 mM, o conteúdo de lipídios neutros (LN) (Figura 6A) e de amido (Figura 6D) aumentou significativamente em 60 e 21%, respectivamente, em relação as plântulas não tratadas. De modo contrastante, o conteúdo de proteínas solúveis (PS) reduziu significativamente em torno de 23% para as plântulas tratadas com NaCl 50 mM, quando comparadas ao controle (Figura 6B).

No eixo em hipocótilo-raiz, o tratamento com NaCl 100 mM causou diminuição significativa de cerca de 44% no conteúdo de PS (Figura 6C), em referencia ao controle. No entanto, o conteúdo de amido do eixo não foi significativamente modificado (Figura 6E), mesmo sob tratamento nas plântulas tratadas com NaCl 100 mM.

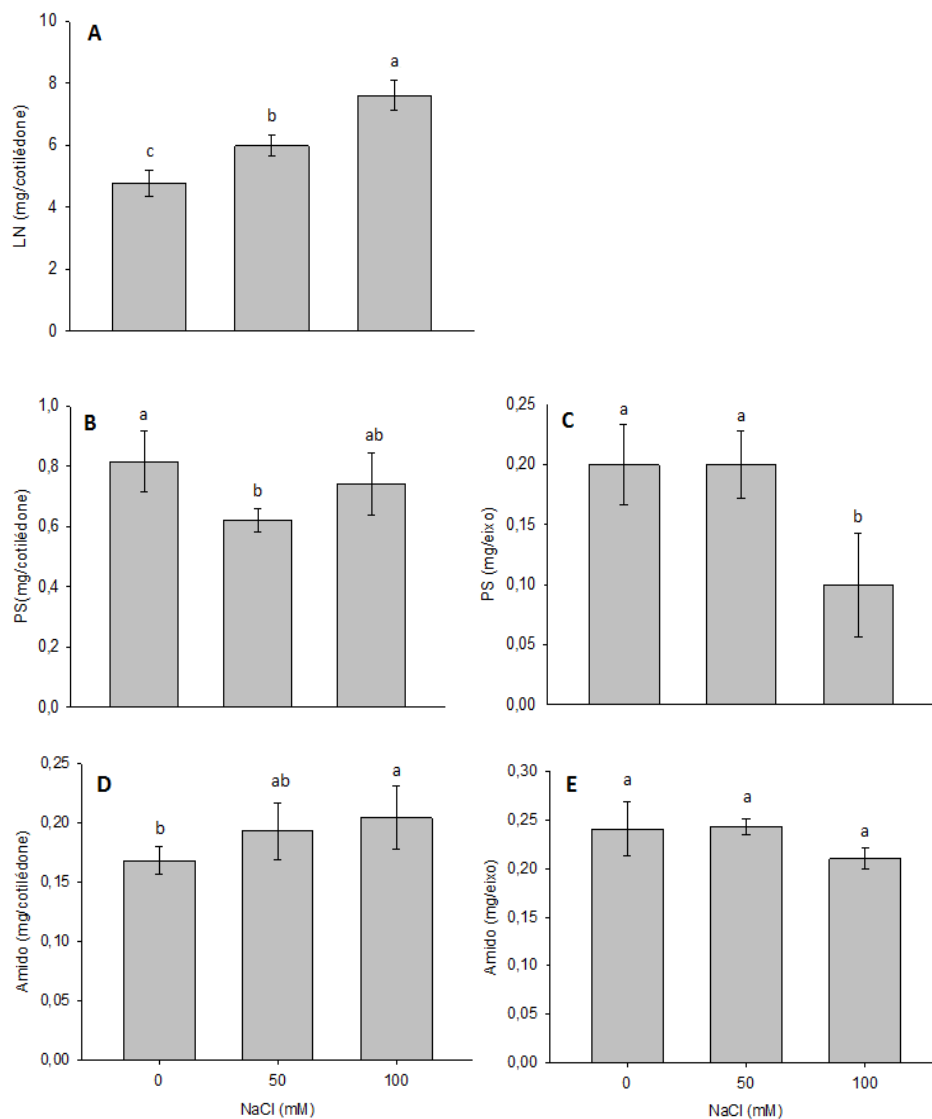


Figura 6. Conteúdo de lipídios neutros (LN), proteínas solúveis (PS) e amido em plântulas de girassol submetidas ao estresse salino. Conteúdo de LN nos cotilédones (A), de PS nos cotilédones (B) e no eixo em crescimento (C) e de amido nos cotilédones (D) e no eixo em crescimento (E) em plântulas do híbrido Hélio 253 cultivadas durante 72 h em meio ágar-água 4 g/L sem adições (controle) ou suplementado com 50 ou 100 mM. As barras representam as médias, enquanto que as linhas verticais representam os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Os tratamentos salinos provocaram mudanças significativas no conteúdo de açúcares solúveis totais (AST), açúcares não redutores (ANR) e aminoácidos livres totais (AALT) tanto nos cotilédones quanto nos eixos em crescimento (Figura 7). Nas plântulas tratadas com NaCl 100 mM, o conteúdo de AST foi diminuído em aproximadamente 24% nos cotilédones (Figura 7A) e 40% no eixo (Figura 7B), em relação as plântulas não tratadas. Além disso, o tratamento com NaCl 100 mM aumentou o conteúdo de açúcares não redutores (ANR) em cerca de 34% nos cotilédones (Figura 7C), mas reduziu o conteúdo de ANR em aproximadamente 19% no eixo (Figura 7D), quando comparado ao controle. De maneira oposta, o tratamento com NaCl 100 mM diminuiu o conteúdo de aminoácidos livres totais (AALT) em cerca de 13% nos cotilédones (Figura 7E) e aumentou o conteúdo de AALT em aproximadamente 39% no eixo (Figura 7F), em relação ao controle.

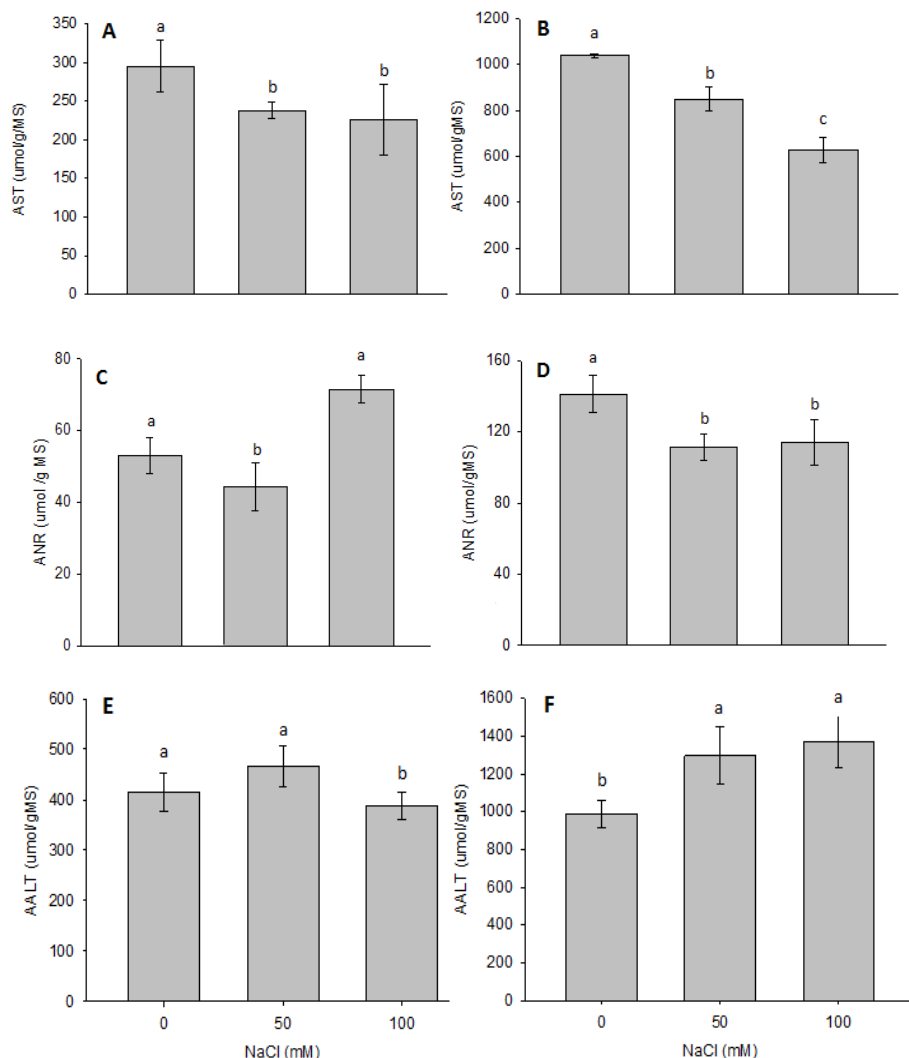


Figura 7. Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST), açúcares não-redutores (ANR) e aminoácidos livres totais (AALT) em plântulas de girassol submetidas ao estresse salino. Conteúdo de AST nos cotilédones (A) e no eixo em crescimento (B), de ANR nos cotilédones (C) e no eixo em crescimento (D) e de AALT nos cotilédones (E) e no eixo em crescimento (F) em plântulas do híbrido Helio 253 cultivadas durante 72 h em meio ágar-água 4 g/L sem adição (controle) ou suplementado com 50 ou 100 mM. As barras representam as médias, enquanto que as linhas verticais representam os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

4.2 EFEITO DO ESTRESSE OSMÓTICO

O estresse osmótico induzido por D-manitol reduziu visualmente o crescimento das plântulas de girassol, híbrido Helio 253, ao longo de 72 h de tratamento (Figura 8). Com efeito, o aumento da concentração externa de D-manitol diminuiu gradativamente o comprimento do eixo hipocótilo-raiz e agravou a aparência murcha dos cotilédones.



Figura 8. Aspecto morfológico de plântulas de girassol submetidas ao estresse osmótico induzido por D - Manitol. Plântulas híbrido Helio 253 foram cultivadas durante 72 horas em meio ágar água 4 g/L sem adições (controle) ou suplementado com 100 ou 200 mM de D-Manitol. A barra vertical representa a escala de 10 mm.

O aumento da concentração externa de D-manitol acarretou o incremento significativo do conteúdo de massa seca (MS) nos cotilédones e, simultaneamente, a diminuição significativa do conteúdo de MS no eixo em crescimento (Figura 8). Nas plântulas tratadas com D-Manitol 200 mM, houve aumento significativo de 39% na MS dos cotilédones (Figura 9A) e diminuição de aproximadamente 87% na MS do eixo (Figura 9B) em relação às plântulas controle. A porcentagem de umidade foi significativamente reduzida pelos tratamentos osmóticos apenas nos cotilédones (Figura 9). De fato, o tratamento com D-Manitol 200 mM reduziu a porcentagem de umidade nestes órgãos em cerca de 12%, quando comparando ao controle (Figura 9C).

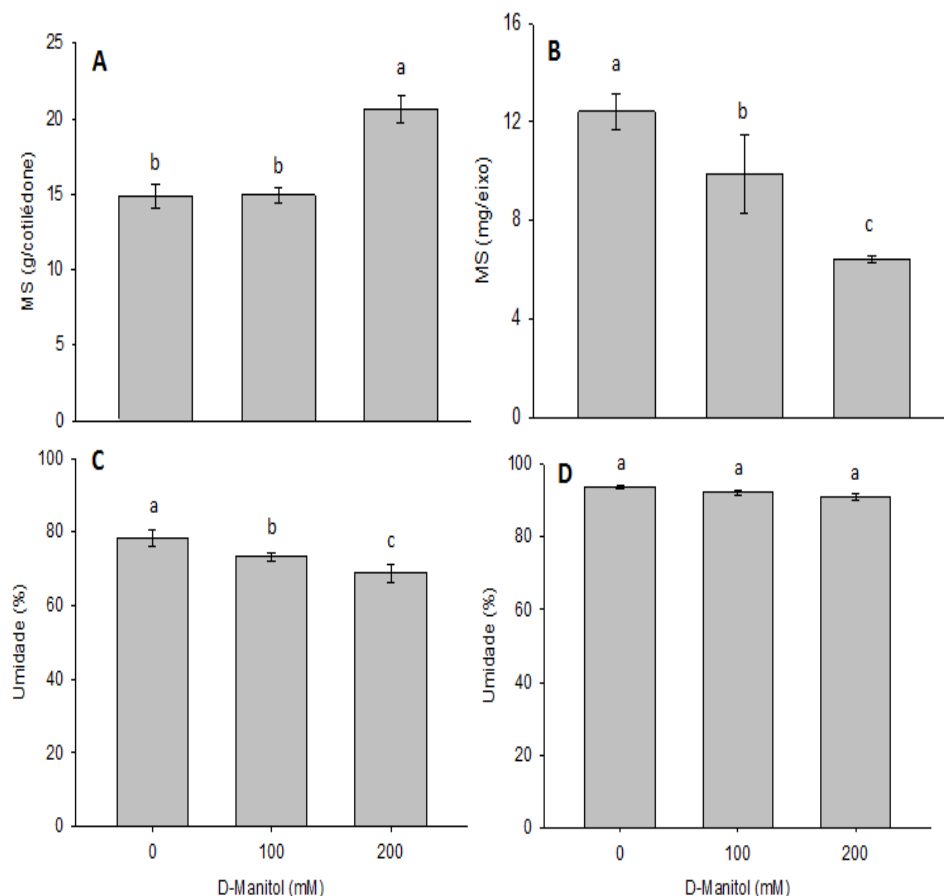


Figura 9. Conteúdo de massa seca (MS) e porcentagem de umidade em plântulas de girassol submetidas ao estresse osmótico. Conteúdo de MS nos cotilédones (A) e no eixo em crescimento (B) porcentagem de umidade nos cotilédones (C) e no eixo (D) em plântulas do híbrido Helio 253 cultivadas durante 72 h em meio ágar-água 4 g/L sem adições (controle) ou suplementado com 100 ou 200 mM. As barras representam as médias, enquanto que as linhas verticais representam os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

O estresse osmótico afetou simultaneamente a mobilização das reservas de carbono e nitrogênio nos cotilédones (Figura 10). Apenas nas plântulas tratadas com D-manitol 200 mM houve aumento significativo do conteúdo de LN (Figura 10A) e PS (Figura 10B), da ordem de 60 e 21%, respectivamente, em referência às plântulas não tratadas. Entretanto, somente o tratamento com D-manitol 100 mM modificou significativamente o conteúdo de amido nos cotilédones, o qual foi aumentado em cerca de 56%, quando comparado com controle (Figura 10D). O aumento da concentração externa de D-manitol causou a diminuição significativa do conteúdo de PS e amido no eixo em crescimento (Figura 10). Com efeito, nas plântulas tratadas com D-manitol 200 mM, o conteúdo de PS (Figura 10C) e amido (Figura 10E) foi diminuído em aproximadamente 33 e 46%, nessa ordem, em relação às plântulas não tratadas.

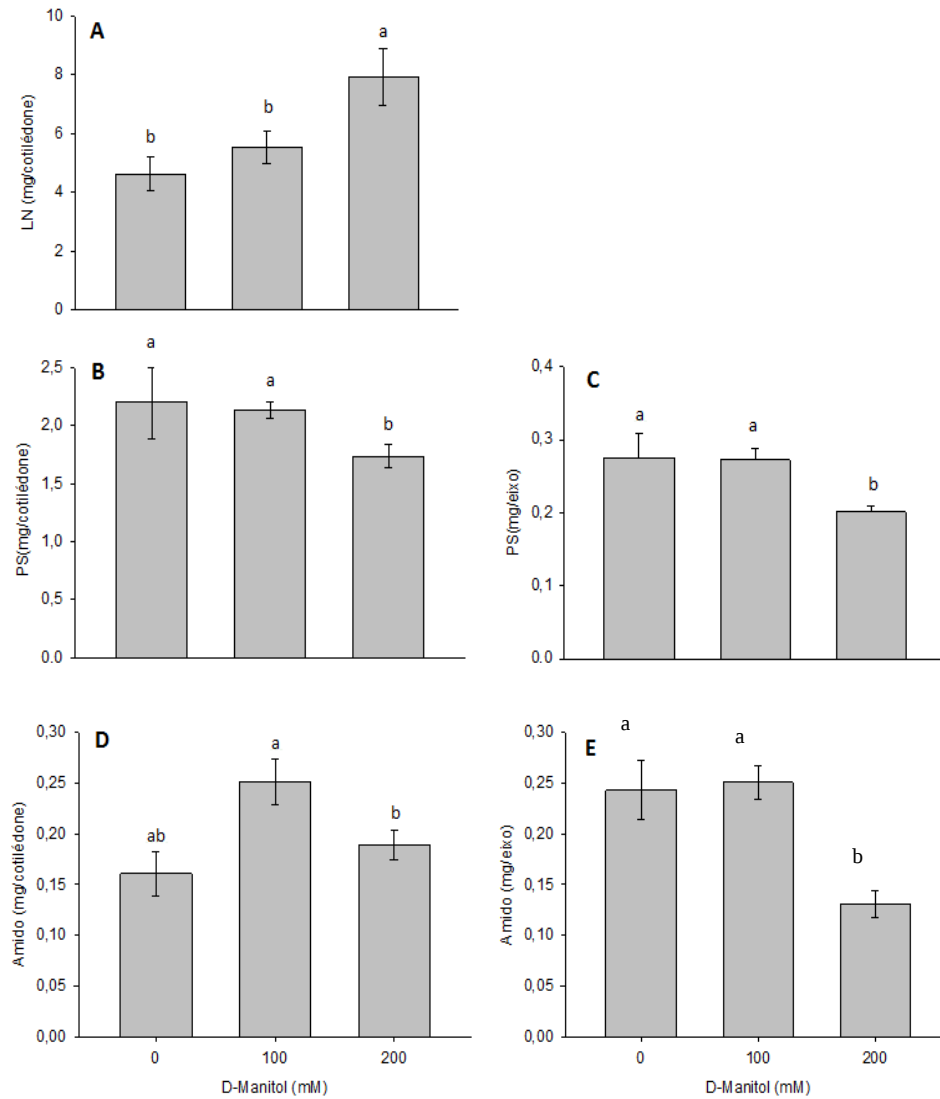


Figura 10. Conteúdo lipídios neutros (LN), proteínas solúveis (PS) e amido em plântulas de girassol submetidas ao estresse osmótico. Conteúdo de LN nos cotilédones (A), de PS nos cotilédones (B) e no eixo em crescimento (C) e de amido nos cotilédones (D) e no eixo (E) em plântulas do híbrido Helio 253 cultivadas durante 72 h em meio ágar-água 4 g/L sem adições (controle) ou suplementado com 100 ou 200 mM. As barras representam as médias, enquanto que as linhas verticais representam os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Os tratamentos osmóticos ocasionaram modificações significativas nos conteúdos de AST, ANR e AALT nos cotilédones e no eixo hipocótilo-raiz (Figura 11). O tratamento com D-manitol 200 mM reduziu o conteúdo de AST em cerca de 42% nos cotilédones (Figura 11A) e em aproximadamente 11% no eixo (Figura 11B), em referência ao controle. De maneira inversa, o tratamento com D-manitol 100 mM aumentou o conteúdo de ANR nos cotilédones (Figura 11C) e no eixo (Figura 11D) em cerca de 82 e 25%, respectivamente, em comparação com o controle. O conteúdo de AALT nos cotilédones foi reduzido gradativamente com o aumento da concentração externa de D-manitol (Figura 11E). Nas plântulas tratadas com D-manitol 200 mM, o conteúdo de AALT nos cotilédones foi diminuído em aproximadamente 26%, em relação às plântulas não tratadas. No entanto, o tratamento com D-manitol 100 mM provocou o aumento do conteúdo de AALT no eixo em cerca de 18%, em comparação com controle (Figura 11F).

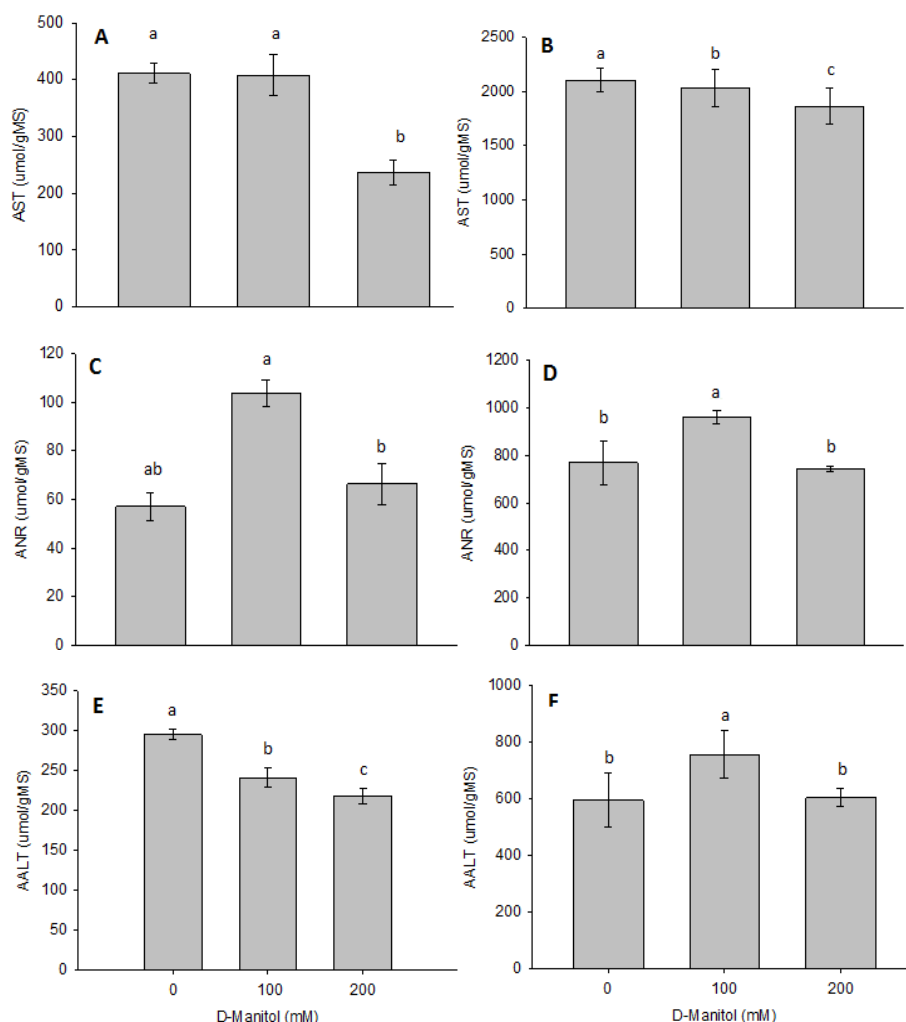


Figura 11. Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST), açúcares não-redutores (ANR) e aminoácidos livres totais (AALT) em plântulas de girassol submetidas ao estresse osmótico. Conteúdo de AST nos cotilédones (A) e no eixo em crescimento (B), de ANR nos cotilédones (C) e no eixo em crescimento (D) e de AALT nos cotilédones (E) e no eixo (F) em plântulas do híbrido Helio 253 cultivadas durante 72 h em meio ágar-água 4 g/L sem adições (controle) ou suplementado com 100 ou 200 mM. As barras representam as médias, enquanto que as linhas verticais representam os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

4.3 EFEITO ISOLADO E COMBINADO DOS ESTRESSES SALINO E OSMÓTICO

Os estresses isolados e combinados induzidos por NaCl e D-manitol diminuíram o crescimento das plântulas de girassol, híbrido Helio 253, no decorrer de 72 h de tratamento (Figura 12). Levando em conta aspectos visuais, o tratamento com NaCl 100 mM (estresse salino isolado) ou D-manitol 200 mM (estresse osmótico isolado) reduziu de forma mais drástica o comprimento do eixo hipocótilo-raiz em relação ao tratamento com NaCl 50 mM e D-manitol 100 mM (estresse isosmótico combinado). Nas plântulas submetidas ao estresse salino isolado, foi observada expansão dos cotilédones e naquelas expostas ao estresse osmótico isolado, houve murcha aparente dos cotilédones. Sob estresse combinado, ambas as alterações morfológicas foram verificadas.



Figura 12. Aspecto morfológico de plântulas de girassol submetidas aos estresses salino e osmótico aplicados de modo isolado e combinado. Plântulas do híbrido Helio 253 foram cultivadas durante 72 h em meio ágar água 4 g/L sem adições (controle) ou suplementado com NaCl 100 mM (tratamento salino isolado), D-manitol 200 mM (tratamento osmótico isolado) ou NaCl 50 mM e D-manitol 100 mM (tratamento isosmótico combinado). A barra vertical representa a escala de 10 mm.

Os tratamentos salino e osmótico isolados ocasionaram mudanças significativas no conteúdo de MS dos cotilédones e do eixo em crescimento, mas o tratamento isosmótico combinado não foi capaz de causar alterações nesta variável (Figura 13). Na presença de NaCl 100 mM e D-manitol 200 mM, houve aumento de cerca de 16% na MS dos cotilédones (Figura 13A) e diminuição de aproximadamente 35 e 33% na MS do eixo (Figura 13B), respectivamente, em relação controle. A porcentagem de umidade foi reduzida significativamente apenas nos cotilédones das plântulas expostas ao D-manitol 200 mM, em cerca de 10%, em comparação com as plântulas não tratadas (Figura 13C).

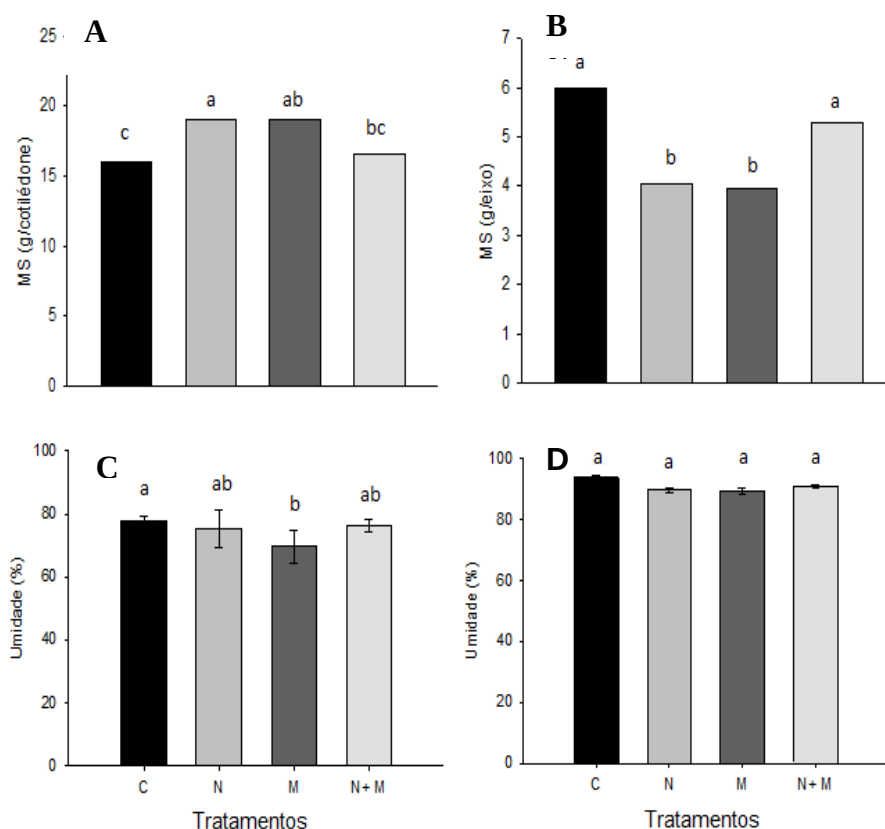


Figura 13. Conteúdo de massa seca (MS) e porcentagem de umidade em plântulas de girassol submetidas aos estresses salino e osmótico de modo isolado e combinado. Conteúdo MS nos cotilédones (A) e no eixo em crescimento (B) e porcentagem de umidade nos cotilédones (C) e no eixo (D) em plântulas do híbrido Hélio 253 cultivadas durante 72 h em meio ágar-água 4 g/L sem adições (controle, C) ou suplementado com NaCl 100 mM (N), D-manitol 200 mM (M) ou NaCl 50 mM e D-manitol 100 mM (N+M). As barras representam as médias, enquanto que as linhas verticais representam os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Como esperado, somente o tratamento salino isolado e o isosmótico combinado ocasionaram o aumento significativo do conteúdo de Na^+ e uma diminuição significativa no conteúdo de K^+ para os mesmos tratamentos. Nos cotilédones, houve aumento de aproximadamente 13 vezes no conteúdo de Na^+ na presença de NaCl 50 mM e D-manitol 100 mM em relação ao controle. No eixo em crescimento, o conteúdo Na^+ teve um aumento superior a 6 vezes, nas plântulas tratadas com NaCl 100 mM, em comparação com controle (Tabela 1).

Foi observada uma diminuição no conteúdo de K^+ em torno de 18% nas plântulas tratadas com NaCl 100 mM tanto nos cotilédones como no eixo em crescimento, quando comparados aos seus respectivos controles (Tabela 1).

A relação K^+/Na^+ das plântulas com os tratamentos salino isolado e o isosmótico combinado apresentaram decréscimo em relação às plântulas do tratamento controle e D-manitol isolado, tanto nos eixos quanto nos cotilédones, cuja relação foi inferior a 1 (Tabela 1). Na adição externa de NaCl 100 mM, o decréscimo na relação K^+/Na^+ foi de 93% nos cotilédones e 90% nos eixos em crescimento (Tabela 1).

Tabela 1. Conteúdo de Na^+ e K^+ e relação K^+/Na^+ em plântulas de girassol submetidas aos estresses salino e osmótico de modo isolado e combinado. Plântulas do híbrido Hélio 253 foram cultivadas durante 72 h em meio ágar-água 4 g/L sem adições (controle, C) ou suplementado com NaCl 100 mM (N), D-manitol 200 mM (M) ou NaCl 50 mM e D-manitol 100 mM (N+M). Os valores representam as médias $\pm$ os desvios padrões de cinco repetições. Os valores assinalados com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tratamento	Na^+ ($\mu\text{mol/g MS}$)		K^+ ($\mu\text{mol/g MS}$)		Relação K^+/Na^+	
	cotilédones	eixo	Cotilédones	Eixo	cotilédones	Eixo
C	15,5 b	321,6 b	161,7 b	893,3 b	10,4	2,8
N	185,1 a	2109,8 a	133,0 c	729,6 b	0,7	0,3
M	20,0 b	395,2 b	198,7 a	1660,6 a	12,8	3,1
N + M	206,8 a	1892,1 a	137,1 c	752,7 b	0,7	0,4

O estresse salino e o estresse osmótico afetaram diferencialmente a mobilização das reservas nos cotilédones e a acumulação de PS e amido no eixo hipocótilo-raiz, quando foram aplicados de modo isolado ou combinado (Figura 14). O conteúdo de LN nos cotilédones foi significativamente aumentado em 30 e 39% pelos tratamentos com NaCl 100 mM e D-manitol 200 mM, nesta ordem, em referência ao controle (Figura 14A). No entanto, o tratamento com NaCl 50 mM e D-manitol 100 mM não causou alteração significativa no conteúdo de LN nos cotilédones. O estresse salino isolado ou combinado com o estresse osmótico não induziu mudança significativa no conteúdo de PS dos cotilédones (Figura 14B). Porém, o estresse osmótico isolado aumentou significativamente o conteúdo de PS nos cotilédones em 83%, em comparação com o controle. O conteúdo de amido nos cotilédones não apresentou alteração significativa devido aos estresses aplicados de forma isolada ou combinada (Figura 14D).

A acumulação de PS no eixo em crescimento foi afetada de modo sinérgico pelo estresse salino combinado com o estresse osmótico. De fato, o conteúdo de PS no eixo foi diminuído em 28, 36 e 52% pelos tratamentos com NaCl 100 mM, D-manitol 200 mM e NaCl 50 mM associado a D-manitol 100 mM, respectivamente, em relação ao controle (Figura 14C). No entanto, somente o tratamento com D-manitol 200 mM reduziu significativamente em 45% o conteúdo de amido no eixo em crescimento, quando comparado ao controle (Figura 14E).

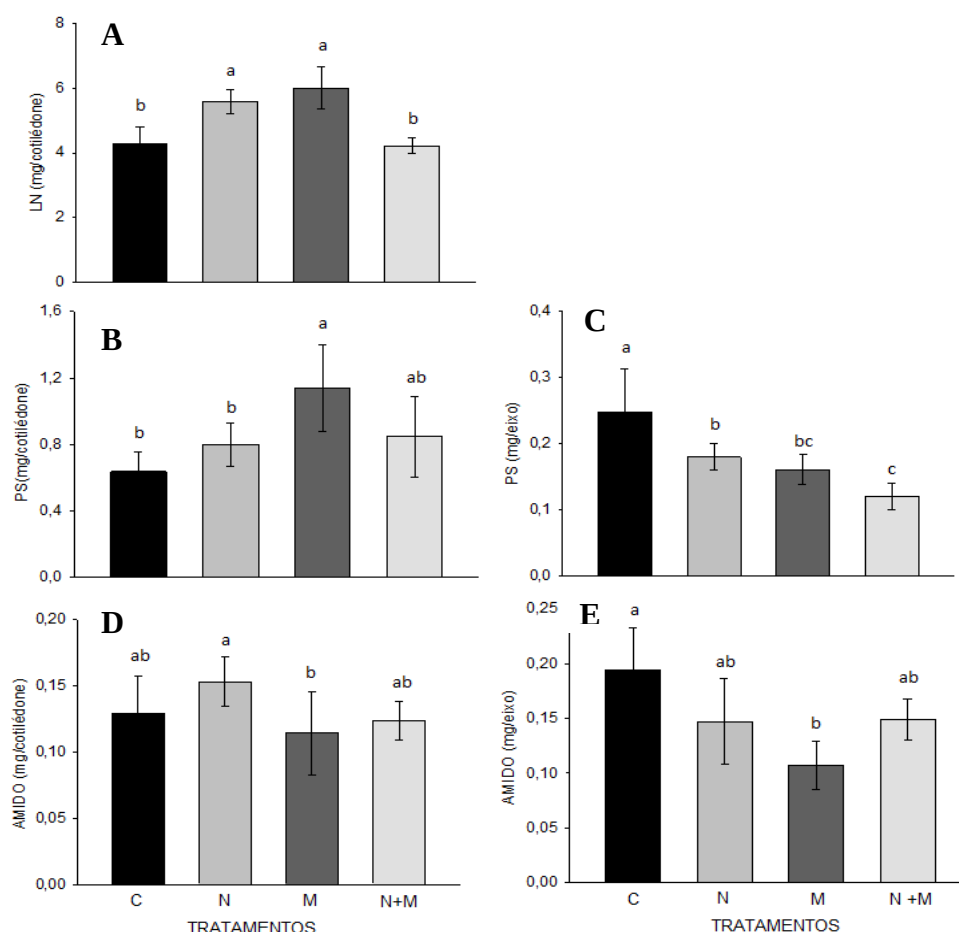


Figura 14. Conteúdo de LN, PS e amido em plântulas de girassol submetidas aos estresses salino e osmótico de modo isolado e combinado. Conteúdo de LN nos cotilédones (A), de PS nos cotilédones (B) e no eixo em crescimento (C) e de amido nos cotilédones (D) e no eixo (E) em plântulas do híbrido Hélio 253 cultivadas durante 72 h em meio ágar-água 4 g/L sem adições (controle, C) ou suplementado com NaCl 100 mM (N), D-manitol 200 mM (M) ou NaCl 50 mM e D-manitol 100 mM (N+M). As barras representam as médias, enquanto que as linhas verticais representam os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Os tratamentos salino, osmótico e isosmótico combinado causaram alterações características no conteúdo de AST, ANR e AALT dos cotilédones e do eixo em crescimento (Figura 15). Nas plântulas tratadas com NaCl 100 mM, D-manitol 200 mM e NaCl 50 mM combinado com D-manitol 100 mM, o conteúdo de AST nos cotilédones foi significativamente diminuído em 43, 6,2 e 20%, nesta ordem, em relação às plântulas não tratadas (Figura 15A). No entanto, nas plântulas tratadas com D-manitol 200 mM, o conteúdo de AST nos cotilédones permaneceu inalterado. No eixo em crescimento, o tratamento osmótico aumentou de forma significativa o conteúdo de AST em 42%, em referência ao controle (Figura 15B). Entretanto, o conteúdo de AST foi diminuído significativamente em 42 e 25% pelos tratamentos salino e isosmótico combinado, respectivamente, em comparação com o controle.

O conteúdo de ANR nos cotilédones não foi alterado sob estresse salino, mas foi aumentado de modo significativo em 60 e 33% sob estresse osmótico e isosmótico combinado, nesta ordem, em relação ao controle (Figura 14C). No eixo em crescimento, apenas o estresse salino ocasionou mudança significativa no conteúdo de ANR, da ordem de 43%, em referência ao controle (Figura 14D).

O tratamento salino não alterou significativamente o conteúdo de AALT nos cotilédones, mas os tratamentos osmótico e isosmótico combinado aumentaram o conteúdo destes compostos em aproximadamente 84 e 15%, nesta ordem, em relação ao controle (Figura 14E). Além disso, o conteúdo de AALT no eixo em crescimento foi aumentado de modo significativo em 49% pelo tratamento osmótico, mas foi diminuído em cerca de 27 e 47% pelos tratamentos salino e isosmótico combinado, respectivamente, em comparação com o controle (Figura 14F).

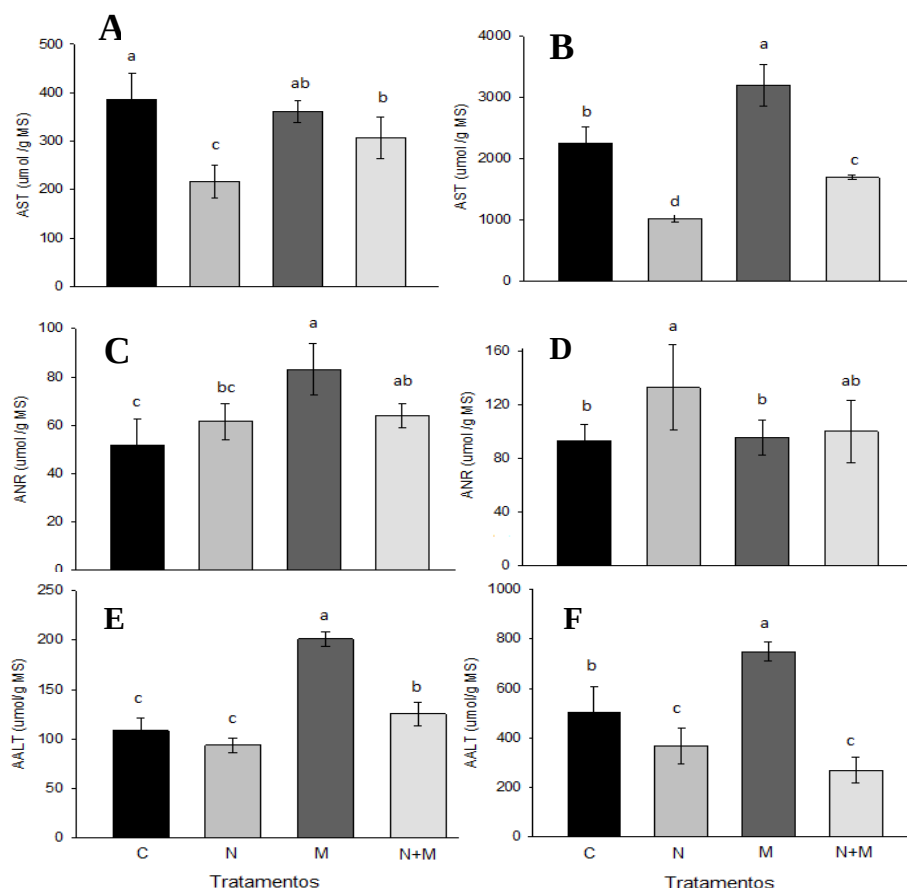


Figura 15. Conteúdo de AST, ANR e AALT em plântulas de girassol submetidas aos estresses salino e osmótico de modo isolado e combinado. Conteúdo de AST nos cotilédones (A) e no eixo em crescimento (B), de ANR nos cotilédones (C) e no eixo (D) e de amido nos cotilédones (E) e no eixo (F) em plântulas do híbrido Helio 253 cultivadas durante 72 h em meio ágar-água 4 g/L sem adições (controle, C) ou suplementado com NaCl 100 mM (N), D-manitol 200 mM (M) ou NaCl 50 mM e D-manitol 100 mM (N+M). As barras representam as médias, enquanto que as linhas verticais representam os desvios padrões de cinco repetições. As barras assinaladas com as mesmas letras não diferem significativamente conforme o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

5. DISCUSSÃO

Os resultados demonstram claramente que o estresse salino e o estresse osmótico, aplicados de forma isolada e combinada, afetam diferencialmente a mobilização das reservas nutritivas durante o estabelecimento da plântula de girassol. Tanto o estresse salino (Figura 5A e B) quanto estresse osmótico (Figura 9A e B), quando aplicados isoladamente, restringe a transferência de MS dos cotilédones para o eixo em crescimento, evidenciando o retardo da mobilização das reservas. É amplamente aceito que a relação fonte-dreno desempenha um papel importante na mobilização das reservas, regulando a degradação nos tecidos de armazenamento de acordo com a demanda pelos produtos de mobilização nos tecidos em crescimento (BEWLEY e BLACK, 2013). Assim sendo, é possível que a restrição do crescimento do eixo, devido ao contato direto com o agente estressor, tenha diminuído a força do dreno e, conseqüentemente, a degradação das reservas nas fontes. Esta hipótese tem sido sugerida em outros trabalhos envolvendo o efeito do estresse salino sobre a mobilização das reservas em espécies cultivadas (PRISCO e VIEIRA, 1976; VOIGT et al., 2009). Apesar disso, não é possível desconsiderar o efeito direto do estresse osmótico, uma vez que a exposição das plântulas ao D-manitol causa a diminuição da porcentagem de umidade nos cotilédones (Figura 9C).

De acordo com os resultados, a adição do NaCl ou do D-manitol ao meio de cultura de modo isolado atrasa a mobilização dos LN (Figura 6A e 10A) e do amido (Figura 6D e 10D) nos cotilédones das plântulas de girassol. Porém, o conteúdo de PS não é alterado na presença de NaCl (Figura 6B) e é diminuído na presença de D-manitol (Figura 10B). Este

atraso verificado para a mobilização das reservas de carbono pode ser explicado pela relação fonte-dreno. De fato, alguns trabalhos têm evidenciado que os açúcares podem atuar como sinais da relação fonte-dreno (ROITSCH, 1999), regulando o metabolismo do carbono em plantas (JYAN-CHYUN e SHEEN, 1994; GRAHAM et al., 1994). Oligossacarídeos e hexoses aplicados externamente podem inibir a degradação do amido no endosperma de cereais (KARRER e RODRIGUEZ, 1992; LORETTI et al., 2000) e retardar a degradação dos lipídios nos cotilédones de espécies oleaginosas (GRAHAM et al., 1994; BOREK et al. 2006; BOREK e NUC, 2011). Assim sendo, a acumulação de ANR nos cotilédones das plântulas de girassol tratadas com NaCl 100 mM (Figura 7C) ou D-manitol 100 mM (Figura 11C) pode estar envolvida em um mecanismo de retroalimentação negativa.

Outros trabalhos têm demonstrado que o estresse salino pode atrasar a mobilização do amido devido à diminuição da atividade de α - e β -amilases (PRISCO et al., 1981) e restringir a mobilização dos lipídios pela redução da atividade de enzimas glioxissomais (MILED-DAUOD e CHERIF, 1991). Neste sentido, é possível que a mobilização das reservas de carbono em plântulas de girassol expostas ao NaCl ou ao D-manitol, aplicados isoladamente, tenha sido atrasada devido à regulação da atividade de enzimas hidrolíticas. Tendo em vista que vários trabalhos demonstram o papel do ácido abscísico (ABA) na sinalização do estresse salino e osmótico em plantas (ZHU, 2002), assim como na modulação negativa da atividade de enzimas hidrolíticas durante o crescimento pós-germinativo (BEWLEY e BLACK, 2013), mais estudos se fazem necessários para desvendar os mecanismos pelos quais a mobilização das reservas de carbono é regulada sob estes estresses em plântulas de girassol.

A despeito de que alguns trabalhos evidenciam o retardo da mobilização das reservas como um efeito característico do estresse salino durante o estabelecimento da plântula (PRISCO e VIEIRA, 1976; PRISCO et al., 1981; KAYANI et al., 1990; VOIGT et al., 2009), os nossos resultados mostram que a hidrólise das PRS pode não ser afetada pelo estresse salino (Figura 6B) ou mesmo pode ser acelerada pelo estresse osmótico (Figura 10B). Estes resultados corroboram aqueles encontrados em trabalhos anteriores, uma vez que concentrações externas crescentes de NaCl não alteram o conteúdo de PS nos cotilédones de plântulas de girassol (ASHRAF et al., 2003) ou aumentam a mobilização das PRS em plântulas de linhaça (SEBEI et al., 2007). Levando em conta que os tratamentos com NaCl e D-manitol, aplicados de forma isolada, acarretam a diminuição do conteúdo de PS (Figura 6C e 10C) e a concomitante acumulação de AALT no eixo em crescimento (Figura 7F e 11F), é possível que estes estresses tenham causado distúrbios no metabolismo das proteínas nas plântulas de girassol. Já está demonstrado que a redução do conteúdo de PS e o aumento do conteúdo de aminoácidos nas folhas de cajueiro sob estresse salino estão relacionados a distúrbios no metabolismo do nitrogênio, incluindo o aumento da atividade proteolítica e a acumulação de amônio (SILVEIRA et al., 2003). Assim sendo, a investigação do metabolismo do nitrogênio em plântulas de girassol expostas ao estresse salino ou ao estresse osmótico podem propiciar a identificação de mecanismos de ação destes estresses.

O tratamento com estresses combinados (NaCl 50 mM e D-manitol 100 mM), em condição isosmótica ao tratamento salino (NaCl 100 mM) e ao tratamento osmótico (D-manitol 200 mM) aplicados isoladamente, não interfere na transferência de MS dos cotilédones para o eixo em crescimento nas plântulas de girassol (Figura 13). Além disso, o tratamento isosmótico combinado não afeta a mobilização dos LN (Figura 14A), das PS (Figura

14B) e do amido (Figura 14D) nos cotilédones destas plântulas. Estas respostas podem ser compreendidas como um antagonismo entre o estresse salino e o estresse osmótico, isto é, a aplicação combinada destes estresses na condição isosmótica ameniza os efeitos sobre o crescimento da plântula e a mobilização das diferentes reservas em comparação com os estresses aplicados individualmente. Estes achados reforçam a premissa de que a resposta aos estresses combinados é típica e não pode ser simplesmente extrapolada a partir da resposta para cada um dos estresses aplicados de forma isolada (MITLER, 2006).

É notável que, mesmo sob uma concentração de NaCl 50% menor no tratamento isosmótico combinado (NaCl 50 mM adicionado de D-manitol 100 mM) em relação ao tratamento salino isolado (NaCl 100 mM), a acumulação de Na^+ tenha sido similar tanto nos cotilédones quanto no eixo em crescimento nas plântulas de girassol (Tabela 1). Considerando que a absorção do D-manitol pelas raízes das plantas é restrita (SLATYER, 1961), é possível que a acumulação de Na^+ nas plântulas expostas ao tratamento isosmótico combinado tenha contrabalançado, pelo menos em parte, a hiperosmolaridade propiciada pela presença de D-manitol no meio externo. Em complementação, o conteúdo de Na^+ acumulado no eixo é cerca de 5 vezes maior que aquele verificado nos cotilédones das plântulas expostas tanto ao tratamento salino isolado quanto ao tratamento isosmótico combinado (Tabela 1). Esta diferença de magnitude na acumulação de Na^+ entre as diferentes partes provavelmente se deve ao fato de que o eixo se encontra em contato direto com o Na^+ externo, por intermédio do sistema radicular. Além disso, levando em conta que as plântulas apresentam apenas cotilédones como folhas, a taxa de transpiração deve ser baixa, contribuindo pouco para o transporte de Na^+ pela corrente transpiratória.

O conteúdo de K^+ nos cotilédones e no eixo em crescimento permanece inalterado sob tratamento salino isolado ou tratamento isosmótico combinado nas plântulas de girassol (Tabela 1), indicando que a distribuição do K^+ não é afetada pelo Na^+ absorvido. Uma vez que o meio de cultura é isento de K^+ , o conteúdo deste nutriente nas diferentes partes das plântulas deve ser oriundo do K^+ acumulado nos tecidos de armazenamento durante a maturação da semente sob a forma de complexo com fitina (mio-inositolhexafosfato) (BEWLEY e BLACK, 1994). De maneira adicional, o conteúdo de K^+ nos cotilédones e no eixo é aumentado nas plântulas de girassol submetidas ao tratamento osmótico isolado, em comparação com o controle (Tabela 1). Segundo estes resultados, parece que há efluxo de K^+ das raízes para o meio externo durante o estabelecimento da plântula e que este efluxo é evitado quando as plântulas estão expostas ao estresse osmótico causado por um agente que é absorvido de forma restrita (SLATYER, 1961). Desta forma, pode ser que a retenção do K^+ nos tecidos contrabalance a hiperosmolaridade do meio de cultura.

Os nossos resultados mostram que a relação K^+/Na^+ se torna inferior a 1,0 tanto nos cotilédones quanto no eixo em crescimento das plântulas de girassol tratadas com NaCl 100 mM ou NaCl 50 mM adicionado de D-manitol 100 mM (Tabela 1), indicando que estas partes podem estar expostas à toxicidade iônica. A relação K^+/Na^+ tem sido utilizada como um indicador indireto da toxicidade iônica sob estresse salino com base na competição entre K^+ e Na^+ pelos sítios de ligação em transportadores de membrana e enzimas. Valores inferiores a 1,0 podem indicar que a concentração de Na^+ nos tecidos seria suficientemente alta para evitar a ligação do K^+ nestas proteínas, afetando funções celulares primordiais como a fotossíntese e a biossíntese de proteínas (MAATHUIS e AMTMANM, 1999). Embora relação K^+/Na^+ seja similar nos cotilédones e no eixo para as

plântulas de girassol submetidas ao tratamento salino isolado e ao isosmótico combinado (Tabela 1), o efeito destes tratamentos sobre a mobilização das reservas é diverso, reforçando a importância da natureza do agente estressor, mesmo que as plântulas estejam expostas a condições isosmóticas.

6. CONCLUSÃO

Tomando os nossos resultados em conjunto, é possível concluir que o estresse salino e o estresse osmótico afetam diferencialmente a mobilização das reservas nutritivas durante o estabelecimento da plântula em girassol, quando são aplicados de forma isolada ou combinada. Aparentemente, o estresse osmótico isolado propicia efeitos mais marcantes, porque retarda a degradação do amido e dos lipídios e acelera a mobilização das proteínas, enquanto que o estresse salino isolado atrasa a utilização das reservas de carbono, mas não afeta o conteúdo de proteínas. Inesperadamente, a aplicação combinada do estresse salino e do estresse osmótico, sob condição isosmótica em relação aos estresses isolados, não afeta a mobilização das diferentes reservas nutritivas em girassol.

7. REFERÊNCIAS

ASHRAF, M.; ZAFAR, R.; ASHRAF, M.Y. Time-course changes in the inorganic and organic components of germinating sunflower achenes under salt (NaCl) stress. **Flora**, v. 198, p. 26-36, 2003.

BELTRÃO, N.E.M.; OLIVEIRA, M.I.P. **Oleaginosas potenciais do Nordeste para a produção de biodiesel**. Campina Grande: EMBRAPA. (Embrapa Algodão. Documentos, 177). 53p. 2007.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013.

BLACK, M.; BEWLEY, J.D.; HALMER, P. **The encyclopedia of seeds: science, technology and uses**. Wallingford: CAB International, 2006. 828 p.

BOREK, S.; NUC, K. Sucrose controls storage lipid breakdown on gene expression level in germinating yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) seeds. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.1795-1803, 2011.

BOREK, S.; RATAJCZAK, W.; RATAJCZAK, L. Ultra structural and enzymatic research on the role of sucrose in mobilization of storage lipids in germinating yellow lupine seeds. **Plant Science**, v. 170, p. 441-452, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. **Responses to abiotic stresses**. In Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. eds, *Biochemistry and Molecular Biology of plant Physiologists*. Cap. 22. p.1158-1253. 2000.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; AIDAR, M. P. M. Mobilização de Reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**, Porto Alegre: Artmed, p.163-185. 2004a.

BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, H.P., TINÉ, M.A.; & AIDAR, M.P.M. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação. do básico ao aplicado**. Alfredo Gui Ferreira e Fabian Borgheti (Eds.). Porto Alegre: Artmed, p.163-185, 2004b.

CARGININ, A. **Seleção recorrente no melhoramento genético de plantas autógamas**. Planaltina- EMBRAPA- Cerrado. 24p. (Documento/Embrapa-cerrado ISSN 1517-5111, 184). 2007.

CASTIGLIONI, V.B.R.; BALLA, A.; CASTRO, C.; SILVEIRA, J.M. **Fases do desenvolvimento da planta de girassol**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 24p. (Documentos, 58). 1994.

CASTRO, C.; CASTIGLIONI, V.B.R.; BALLA, A. **A cultura do girassol: tecnologia de produção**. Documentos, EMBRAPA-CNPSo, Londrina n. 67, 20p.,1996a.

CASTRO, C.; CASTIGLIONI, V.B.R.; BALLA, A. **A cultura do girassol**. Circular Técnica, EMBRAPA-CNPSo, Londrina n. 13, 38p.,1996b.

CONAB, (2012). **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos** (Safra 2011/2012) – **Décimo Segundo Levantamento – Março/2012**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

DANTAS, J.P.; MARINHO, F.J.L.; FERREIRA, M.M.M.; AMORIM, M. DO S.N.; ANDRADE, S.I. DE O.; SALES, A.L. Avaliação de genótipos de feijão-de-corda sob salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.6, n.3, p.425-430, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.248-254, 1956.

EASTMOND, P.J.; GRAHAM, I.A. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. **Plant Science**, v.6, p.72-77, 2001.

FRANDSEN, G.I.; MUNDY, J.; TZEN, J.T.C. Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. **Physiology Plantarum**, v.112, p.301-307, 2001.

FRANK, J.; SZABO, L. **A napraforgo *Helianthus annuus* L.** Budapest: Akadémiai Kiadó. 178p. 1989.

GRAHAM, I.A.; DENBY, K.J.; LEAVER, C.J. Carbon Catabolite Repression Regulates Glyoxylate Cycle Gene Expression in Cucumber. **Plant Cell**, v.6, n.5, p.761–772. 1994.

HELDT, H.-W.; PIECHULLA, B. **Plant Biochemistry**. 4th ed. Londres: Academic Press, 2011.630 p.

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. **The Plant Cell**, v. 11, p. 601-613, 1999.

JYANG, J.C.; ANSHEEN, J. Sugar sensing in higher plants. **Plant Cell** v. 6, p.1665-1679. 1994.

KARRER, E. E.; RODRIGUEZ, R.L. Metabolic regulation of rice alpha-amylase and sucrose synthase genes in planta. **Plant Journal**, v.2, n.4, p.517-523, 1992.

KATERJI, N.; van HOORN, J.W.; HAMDY, A.; MASTRORILLI, M. Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. **Agricultural Water Management**, v. 43, p. 99–109, 2000.

KAYANI SA, NAKVI HH, TING IP, KUMAMOTO J. Effect of Salinity on Fatty Acid and Fatty Alcohol Composition during the Germination of Jojoba (*Simmondsia chinensis*) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1269-1271. 1990.

LAZZAROTTO, J. J.; ROESSING, A. C.; MELLO, H. C. **O agronegócio do girassol no mundo e no Brasil**. In: LEITE, R.M.V.B. de C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. Girassol no Brasil. Londrina: Embrapa Soja, p.16-42, 2005.

LEITE, R.M.V.B. de C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. de. (Ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja. 641p. 2005

LIRA, M.A.; CARVALHO, H.W.L. de; CHAGAS, M.C.M. das; BRISTOT, G.; DANTAS, J.A.; LIMA, J.M.P. de. **Avaliação das potencialidades da cultura do girassol como alternativa de cultivo no semiárido nordestino**. Natal: ENPARN, Documentos, n 40, 43p. 2011.

LORETI, E.; ALPI, A.; PERATA, P. Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of α -amylase in barley embryos. **Plant Physiology**, v. 123, p. 939–948. 2000.

MAATHUIS, F.J.M.; AMTMANN, A. K^+ nutrition and Na^+ toxicity: the basis of cellular K^+/Na^+ ratios. **Annals of Botany**, v. 84, p. 123-133, 1999.

MAHAJAN, S.; TUTEJA N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n.444, p.139-158, 2005

MCCREADY, R.; M.; GUGGOLZ, J.; SILVIERA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical Chemistry**, v.22, p.1156-1158, 1950.

MILED-DAUOD, D.; B, CHERIF, A. Effet du NaCl sur l'utilisation des lipides et l'activité enzymatique des glyoxysomes au cours de la germination de deux espèces de Medicago. **Canadian Journal of Botany**, v.70 p.876-883, 1991.

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. **Nova Delimitação do Semi-árido brasileiro**, pág. 34, 2005.

MISRA, N.; DWIVEDI, U.N. Genotypic difference in salinity tolerance of Green gram cultivars. **Plant Science**, v.166, p.1135-1142, 2004.

MITTLER R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends Plant Science**, v. 11, p.15-19, 2006

MORRIS, D.L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. **Science**, v.107, p.111-114, 1948.

MUNNS, R. Genes and Salt Tolerance: Bringing Them Together. **New Phytologist**, v. 167, p. 645-663, 2005.

OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**. London: Longmans green and company publisher, 1924. 125 p.

PELEGRINI, B. **Girassol: uma planta solar que das Américas conquistou o mundo**. São Paulo: Ícone, 1985. p. 117,

PEOPLES, M.B.; FAIZAH, A.W.; REAKASEM, B.E.; HERRIDGE, D.F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the**

field. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1989.

PIZARRO, F. **Drenaje agrícola y recuperacion de suelos salinos.** 2.ed. Madrid: Agrícola Espanola, 1985. p.521,

PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; GOMES-FILHO, E. Effects of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, p. 63-71, 1981.

PRISCO, J.T.; VIEIRA, G.H.F. Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination in *Vigna sinensis* seeds. **Physiology Plantarum**, v. 36, p. 317-320, 1976.

RIBEIRO, M.C.C.; MARQUES, M.B.; AMARO FILHO, J. Efeito da salinidade na germinação de sementes de quatro cultivares de girassol. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.1, p.281-284, 2001.

RODRIGUES, A.P.R.; COSTA S.H.F.; SANTOS R.R., AMORIM C.A. LUCCHI C.M.; BÃO S. N.; NUNES J.F; RONDIA D; FIGUEREDO J.R. *In vitro* culture of cryopreserved caprine ovarian tissue pieces and isolated follicles. **Cell Press Techniques**, v.4, p. 290-298, 2006.

ROITSCH, T. Source-sink regulation by sugars and stress. **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 2, p.198–206, 1999.

SAIRAM, R.; A. TYAGI. Physiology and molecular biology of salinity stress. **Current Science**, v. 86, n. 3, 2004.

SANTOS JÚNIOR , J.A.; GHEYI, H.R.; DIAS, N. da S.; SOARES, F.A.L.; NOBRE, R.G. Doses de boro e água residuária na produção do girassol. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.4, p.857-864, 2011.

SEBEL, K.A.; DEBEZ, W.; HERCHI, S.; BOUKHCHINA, H.; KALLEL. Germination kinetics and seed Reserve mobilization in two flax (*Linum usitatissimum*.L.) cultivars under moderate salt stress. **Journal of Plant Biology**, v.50, p.447–454, 2007b

SILVEIRA, J.A.G.; VIEGAS, R.A.; ROCHA, I.M.A.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity

are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.115–123, 2003.

SLATYER, R. O. Methodology of a water balance study conducted on a desert woodland (*Acacia aneura* F. Muell.) community in central Australia. **Arid Zone Research**, v.16, p.15-26, 1961.

SMITH, S.L.; ROMANOVSKY, V.E.; LEWKOWICZ, A.G.; BURN, C.R.; ALLARD, M.; CLOW, G. D.; YOSHIKAWA, K.; THROOP, J. Thermal State of Permafrost in North America: A Contribution to the International Polar Year. **Permafrost and Periglacial Processes**, v. 21, n.2, p.117–135, 2010.

VIÉGAS, R.A.; SILVA, L.M.M.; VIÉGAS, P.R.A; QUEIROZ, J.E.; ROCHA, I.M.A. Redução assimilatória de NO_3^- em plantas de cajueiros cultivados em meio salinizado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.8, n.2/3, p.189-195, 2009.

VOIGT, E.L.; ALMEIDA, T.D.; CHAGASA, R.M.; PONTE, L.F.A. Source-sink regulation of cotyledonary reserve mobilization during cashew (*Anacardium occidentale*) seedling establishment under NaCl salinity. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.80-89, 2009.

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

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review. **Plant Biology**, v.53, p.247-273, 2002.