



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**



**Ana Paula de Faria**

**AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA TOLERÂNCIA DE  
CULTIVARES DE MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.)  
AO DÉFICIT HÍDRICO**

**Dissertação apresentada ao  
Departamento de Botânica para obtenção  
do Título de Mestre em Biologia Vegetal  
na área de Fisiologia Vegetal**

**Orientadora: Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo**

**Co-orientador: Prof. Dr. Marcel Giovanni Costa França**

**Belo Horizonte, Fevereiro de 2010**

Faria, Ana Paula de  
Avaliação *ex vivo* da tolerância de cultivares de mamoneira (*Ricinus  
Communis* L.) ao déficit hídrico. [manuscrito] / Ana Paula de Faria. – 2010.  
84 f. : . ; 29,5 cm.

Orientadora: Luzia Valentina Modolo. Co-orientador: Marcel Giovanni  
Costa França.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Botânica.

1. Mamona – Cultivares – Teses. 2. Plantas – Desidratação – Teses. 3.  
Fisiologia vegetal – Teses. 4. Plantas – Bioquímica – Teses. 5. Botânica –  
Teses. I. Modolo, Luiza Valentina. II. França, Marcel Giovanni Costa. III.  
Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Botânica. IV.  
Título.

CDU: 581.19

Dissertação defendida e aprovada, em 19 de fevereiro de 2010, pela banca examinadora constituída pelos professores:



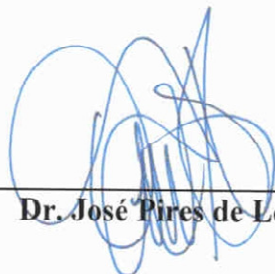
---

**Dra. Luzia Valentina Modolo - Orientadora**



---

**Dra. Márcia Regina Braga**



---

**Dr. José Pires de Lemos Filho**

“... O valor das coisas não está no tempo em que  
elas duram, mas na intensidade com que acontecem.  
Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas  
inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

A todos que eu amo e a todos que me amam.  
Este trabalho só foi possível por causa da existência do amor...

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por me dar força e coragem para superar os desafios e por estar sempre comigo, iluminando todos os meus passos hoje e sempre.

À Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo pela orientação, paciência, incentivo, confiança e, acima de tudo, por acreditar nas minhas capacidades.

Ao Prof. Dr. Marcel Giovanni Costa França pela co-orientação, por me receber de braços abertos na instituição, pela confiança, pela paciência e, acima de tudo, por me fazer acreditar que no final tudo dá certo.

À EMBRAPA Algodão e ao IAC pelo gentil fornecimento das sementes de mamoneira.

À UFMG pela estrutura fornecida, e à FAPEMIG pela bolsa concedida.

Aos professores do Departamento de Botânica, Prof. Dr. José Pires de Lemos Filho, Profa. Dra. Queila Souza Garcia, Profa. Dra. Alessandra Gianni, Prof. Dra. Maria Rita Scotti Muzzi, Prof. Dr. Eduardo Leite Borba e ao professor do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Dr. Miguel José Lopes, que contribuíram indiretamente com este trabalho emprestando equipamentos e material laboratorial.

À Socorro que sempre esteve pronta a atender aos pedidos de ajuda – meus e de todos os membros do Laboratório de Fisiologia Vegetal.

Aos professores e funcionários do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo incentivo e auxílios técnico-científicos.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal e do Departamento de Botânica, Terezinha, Sônia, Márcia e Marina, pela paciência e auxílio nos processos burocráticos.

À Marina Neiva Alvim, peça fundamental na execução deste trabalho. Nina, obrigada pelas doações de material de laboratório, pelo apoio, pela paciência em ensinar como as coisas funcionam, pelas caronas tarde da noite em dias de experimentos longos, pelas conversas agradáveis em assuntos triviais, pelas conversas produtivas em discussões sobre metodologias e resultados, pela amizade e, por último, mas não menos importante, por me apresentar à dança.

À Janaína Guernica Silva, outra peça fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Jana, obrigada pelo apoio inicial com o cultivo de plantas quando ainda eram batatas, pelo empréstimo de material, pelo carinho dispensado sempre, pela atenção, pelos toques de grande utilidade na execução de alguns experimentos, pelas caronas quando eu ainda morava em Nova Lima, pelas conversas produtivas na discussão de alguns tópicos abordados, pelas conversas agradáveis sobre temas triviais, pelo apoio psicológico em momentos difíceis, enfim, pela amizade.

Ao Giovanni Eustáquio Alves Silva, mais uma peça de grande importância para a conclusão deste trabalho. Gigio, obrigada pelo apoio ao longo de toda essa jornada, pelo companheirismo, pelas indispensáveis ajudas em informática, pelas conversas agradáveis sobre temas úteis e fúteis, pelas discussões metodológicas sobre a melhor maneira de se trabalhar com *Ricinus communis*, pelas trocas de artigos, pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal – Priscila, do Laboratório de Interação Microorganismo-Planta – Mateus, do Laboratório de Ficologia – Ana Helena, Leonora e Daniel, do Laboratório de Sistemática Vegetal – Ana Paula Vimieiro e Ariane, e do

Laboratório de Eletrofisiologia Celular – Eder, pela ajuda fundamental na operação de equipamentos.

À Camila e à Alice, pelas indispensáveis ajudas na condução dos experimentos.

À Dani, Paola, Flávia e Pati pelas conversas sempre agradáveis, pela companhia nas horas de almoço e por ajudar a tornar mais agradável o tempo passado no laboratório.

A todos os atuais e ex-membros do laboratório de Fisiologia Vegetal pelos momentos de descontração dentro e fora da universidade e por fazer esse tempo na UFMG ser tão agradável. Com certeza sentirei saudades.

À FUMP, pelo apoio dispensado a mim e a todos os estudantes carentes da UFMG. Sem essa ajuda, creio que minha caminhada seria mais difícil.

Aos amigos Rubens, Agnaldo e Andréa por se disponibilizarem a me ajudar a cuidar das minhas plantinhas em momentos de ausência.

À Bárbara e ao Vicente pelas ajudas com fórmulas e planilhas.

Ao Alessandro, por todo o apoio inicial na minha vinda para Belo Horizonte.

Ao Thiago Sarkis, por todo o apoio psicológico na etapa final de conclusão desse trabalho e por me ajudar a enxergar a vida de outro modo.

A meus irmãos, Fernando Jr., Juliana e Mariana, pela amizade e pelo apoio de perto e de longe.

A meus pais, Fernando e Ana, pelo amor incondicional e incentivo desde o início da minha carreira acadêmica, e em todos os aspectos da vida.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Pág
Abreviaturas.....	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. Revisão de literatura.....	5
3.1. Respostas das plantas ao déficit hídrico.....	6
3.2. Estabilidade e os danos de membrana.....	9
3.3. Alterações estruturais em membranas.....	15
4. Materiais e métodos.....	20
4.1. Material vegetal.....	20
4.2. Condições de cultivo.....	22
4.3. Imposição do estresse.....	22
4.4. Avaliação do conteúdo hídrico relativo.....	23
4.5. Determinação do tempo ótimo de lavagem dos discos foliares.....	23
4.6. Determinação da liberação de eletrólitos decorrente do estresse hídrico.....	24
4.7. Determinação do índice de dano de membranas.....	25
4.8. Avaliação da peroxidação lipídica.....	26
4.9. Avaliação da oxidação de proteínas.....	29
4.10. Determinação de proteínas totais.....	31



4.11. Análise estatística.....	31
5. Resultados.....	32
5.1. Avaliação do status hídrico das plantas.....	32
5.2. Avaliação da liberação de eletrólitos e determinação do índice de dano de membrana.....	36
5.3. Análise dos efeitos do déficit hídrico sobre macromoléculas.....	40
5.3.1. Peroxidação lipídica.....	40
5.3.2. Oxidação de proteínas.....	41
6. Discussão.....	43
7. Referências bibliográficas.....	52
Lista de figuras e tabelas.....	67
<i>Curriculum Vitae</i> .....	69

## ABREVIATURAS

atm – atmosfera

BHT – Hidroxitolueno butilado

BSA – albumina de soro bovino

CAT – Catalase

CE<sub>0</sub> – Condutividade elétrica inicial

CE<sub>f</sub> – Condutividade elétrica final

CE<sub>i</sub> – Condutividade elétrica imediatamente após o início da reidratação

CE<sub>t</sub> – Condutividade Elétrica após autoclavagem

CHR – Conteúdo hídrico relativo

DAP – Dias após o plantio

2,4-DNPH – 2,4-dinitrofenilidrazina

ε – Coeficiente de absorvidade molar

FOX – Ferroso-alaranjado de xilenol

GPx – Glutationa peroxidase

GR – Glutationa redutase

GST – Glutationa S-transferase

•H – Radical Hidrogênio

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

HClO<sub>4</sub> – Ácido perclórico

IDM – Índice de dano de membrana

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de potássio monobásico

LE – Liberação de eletrólitos

LOOH – Hidroperóxido de lipídio

MDA – Malondialdeído

MF – Massa fresca

MPa – Mega Pascal

MS – Massa seca

MT – Massa túrgida

•NO – Radical óxido nítrico

•NO<sub>2</sub> – Radical dióxido de nitrogênio

•O<sub>2</sub><sup>-</sup> – Radical ânion superóxido

<sup>1</sup>O<sub>2</sub>\* - Oxigênio singleto

•OH – Radical hidroxil

ONOO<sup>-</sup> – Peroxinitrito

•OOH – Radical peroxil

PEG – Polietileno glicol

Φ - Diâmetro

POD – Peroxidase

Ψ<sub>H</sub> – Potencial hídrico

Ψ<sub>M</sub> – Potencial mátrico

Ψ<sub>P</sub> – Potencial de pressão

Ψ<sub>S</sub> – Potencial de soluto

Ψ<sub>π</sub> – Potencial osmótico

PVPP – Polivinilpolipirrolidona

RNSs – Espécies reativas de nitrogênio

ROSs – Espécies reativas de oxigênio

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

TPP – Trifenilfosfina

## RESUMO

O déficit hídrico é um dos fatores que mais afeta o desenvolvimento e a produtividade de vegetais. O óleo de mamona (*Ricinus communis* L.) é rico em ácido ricinoléico (ômega 9), um ácido graxo de inúmeras aplicações na medicina, além de ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel. O presente estudo objetivou classificar bioquímica e fisiologicamente cinco cultivares de mamoneira quanto ao grau de tolerância ao déficit hídrico. Para isso, foram avaliados o conteúdo hídrico relativo (CHR), a liberação de eletrólitos (LE), o índice de dano de membranas (IDM), a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas em discos foliares incubados com soluções de PEG-6000 ( $\Psi_H$  de 0 a -2,4 MPa). Verificou-se que todas as cultivares se recuperaram, em diferentes extensões, do estresse quando os discos foliares foram reidratados por 24 h. A cultivar BRS-Energia foi a que melhor recuperou seu CHR inicial enquanto que BRS-Paraguaçu apresentou os menores percentuais de recuperação. BRS-Paraguaçu apresentou um máximo IDM a  $\Psi_H$  de -1,8 MPa, condição esta que pouco afetou as cultivares BRS-Energia e IAC-80. As análises bioquímicas revelaram que a cultivar IAC-80 apresentou os menores níveis de hidroperóxido de lipídios (LOOH) que permaneceram constantes independentemente da intensidade do estresse. Em contraste, os níveis de LOOH em folhas de BRS-Paraguaçu diminuíram com o aumento da severidade do déficit hídrico. O nível de oxidação de proteínas na cultivar BRS-Energia foi 50% menor que os valores observados para as cultivares IAC-80 e BRS-Paraguaçu quando submetidas a um  $\Psi_H$  de -1,8 MPa. O conjunto de resultados sugere que, sob as condições experimentais estudadas, a cultivar BRS-Energia é a mais tolerante ao déficit hídrico enquanto que IAC-80 é moderadamente tolerante e BRS-Paraguaçu é a mais sensível.

**Palavras-chave:** *mamoneira, déficit hídrico, conteúdo hídrico relativo, índice de dano de membrana, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas.*

## ABSTRACT

Water deficit is critical for plant development and productivity. Castor (*Ricinus communis* L.) oil is rich in ricinoleic acid (omega 9), a fatty acid widely used for medicinal purposes, besides its great potential as a raw material for biodiesel production. This study focused on the biochemical and physiological screening of five castor bean cultivars regarding the tolerance degree toward water deficit conditions. The relative water content (RWC), electrolyte leakage (EL), membrane damage index (MDI), lipid peroxidation and protein oxidation were then investigated in leaf disks treated with PEG-6000 solutions at  $\Psi_w$  in the range of 0 to -2.4 MPa. All cultivars recovered at different extents from water deficit stress. BRS-Energia reached the best recovery percentage while BRS-Paraguaçu had poorly recovered. Maximum MDI was observed for BRS-Paraguaçu at  $\Psi_w$  of -1,8 MPa, a condition that slightly affected BRS-Energia and IAC-80 cultivars. Biochemical analyses showed that cultivar IAC-80 exhibited the lowest levels of lipid hydroperoxides (LOOH), that remained unaffected regardless the stress intensity. In contrast, LOOH levels BRS-Paraguaçu leaves decreased when under severe water deficit. The protein oxidation levels in BRS-Energia was 50% lower than those for the cultivars IAC-80 and BRS-Paraguaçu under  $\Psi_w$  of -1,8 MPa. Overall, these results indicate that, under our experimental conditions, BRS-Energia is the most tolerant genotype to water deprivation; BRS-Paraguaçu is the most sensitive and IAC-80 fits as an intermediate genotype.

**Keywords:** *castor bean, water deficit, relative water content, membrane damage index, lipid peroxidation, protein oxidation.*

## 1. Introdução

O crescimento e a produtividade dos vegetais são adversamente afetados por estresses bióticos e abióticos e várias atividades antropogênicas contribuem para a intensificação destes estresses (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998; Watkinson *et al.*, 2006). Os estresses ambientais são os mais importantes fatores limitantes da produtividade vegetal. Entre os fatores mais prejudiciais destaca-se a deprivação de água. As mudanças no clima global afetam dramaticamente o suprimento de água para as plantas (Farooq e Azan, 2001; Watkinson *et al.*, 2006; Germ *et al.*, 2007; Jaleel *et al.*, 2007). De fato, a água é um dos recursos naturais que se torna mais escasso a cada dia, devido a um aumento no consumo, na má distribuição, no desperdício e na poluição. A agricultura contribui para tal cenário já que os processos de irrigação correspondem à 2/3 do total de água destinado ao consumo humano (Fereris e Evans, 2006).

O aumento na demanda por recursos hídricos e a crescente limitação de disponibilidade de tal recurso natural faz da água um bem cada vez mais valioso, principalmente em regiões de crescimento urbano aumentado onde a agricultura irrigada coexiste com setores tais como turismo e indústria (Costa *et al.*, 2007). Diante disto, vários pesquisadores concentram seus esforços nas pesquisas que objetivam melhorar a eficiência do uso de água pelas plantas cultivadas. Apesar de muitos trabalhos trazerem uma abordagem mais clássica ao problema do déficit hídrico (experimentos de campo), um grande número de publicações enfatiza a importância de estudos abordando a fisiologia, a bioquímica e os aspectos moleculares envolvidos na resposta da planta a tal estresse abiótico (Bewley, 1979; El Hafid *et al.*, 1989; Bartels *et al.*, 1996; Jensen *et al.*, 1996; Vartanin, 1996; Quarrie, 1996; Bray, 1997; Bandurska, 2000; França *et al.*, 2000; Bajji *et al.*, 2002; Serrano e Montesinos, 2003; Bernacchia e Furini, 2004; Redy *et al.*,

2004; Sharma e Dubey, 2005; Costa *et al.*, 2007; Pérez-Pérez *et al.*, 2007; Sayar *et al.*, 2008). Estudos da fisiologia de vegetais sob déficit hídrico são conduzidos para se determinar, de maneira rápida, parâmetros eficientes de seleção de plantas tolerantes (Pimentel *et al.*, 2002). Com tais resultados é possível estabelecer estratégias confiáveis para o melhoramento genético (Bajji *et al.*, 2002; Farooq e Azan, 2001; Watkinson *et al.*, 2006).

A mamoneira (*Ricinus communis*, L.), objeto de estudo desta dissertação, apresenta características interessantes que a tornam candidata natural ao posto de uma das principais culturas agrícolas do Brasil. Entre os derivados de sua produção se destaca o ácido graxo ricinoléico, que possui características singulares e versáteis, possibilitando uma ampla gama de utilização industrial. Sua utilidade é comparável à do petróleo visto que é utilizado na produção de biodiesel (Azevêdo *et al.*, 1997; Freire, 2001). Por se tratar de uma fonte renovável e de obtenção em baixo custo, o ácido graxo ricinoléico torna a cultura de mamoneira muito importante para a economia do Brasil (Azevêdo *et al.*, 1997; Freire, 2001). As folhas da mamona podem servir de alimento para o bicho da seda; a haste, além da celulose para a fabricação do papel, pode fornecer matéria-prima para tecidos grosseiros; já a torta, proveniente do esmagamento das sementes, é utilizada como adubo orgânico possuindo, também, efeito nematicida. Não menos importante são os remanescentes de cultura que podem devolver ao solo até 20 toneladas de biomassa.ha<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup> (EMBRAPA, 1997). A mamoneira é de fácil cultivo e baixo custo de produção. Tem ampla variação de cultivares e de híbridos capazes de se adequarem a diferentes condições edafoclimáticas, podendo ser cultivada em várias regiões do país, incluindo o semi-árido (cultivares de porte médio/alto) e no cerrado (cultivares de porte menor e híbridos) (Beltrão *et al.*, 2006, Ferreira *et al.*, 2006, Milani *et al.*, 2006). Mesmo tendo sua produtividade diminuída sob déficit hídrico, a

mamoneira é considerada resistente a condições de baixa precipitação, apresentando-se como uma alternativa de geração de renda para a população do semi-árido (Azevêdo e Lima, 2001; Barros-Jr. *et al.*, 2008).

A mamoneira é atualmente produzida em 30 países, totalizando uma produção de mais de 1.580.000 toneladas em 2008 (FAO, 2008). Até o início da década de 1980, o Brasil era o maior produtor mundial de mamoneira. Ao contrário dos demais países produtores, o Brasil reduziu a cada ano sua área plantada em 1,5%, prática esta que fez o país perder a primeira posição quanto à produção desta cultura (Ferreira *et al.*, 2006). Segundo os registros da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (do inglês FAO), o cultivo de mamoneira no Brasil ocupou em 2008 uma área superior a 156.000 hectares alcançando uma produtividade em torno de 120.500 toneladas (<http://faostat.fao.org>). Atualmente, o Brasil ocupa o terceiro lugar em área plantada e em produção, ficando atrás apenas da Índia e China, respectivamente. No que se refere à produção de sementes, o Brasil ocupa o segundo lugar (FAO, 2008).

Algumas cultivares de mamoneira, tais como BRS-Nordestina e BRS-Paraguaçu, lançados pela EMBRAPA Algodão, podem produzir 1200 Kg.ha<sup>-1</sup> de bagas sob precipitações pluviométricas anuais tão baixas quanto 500 mm (Beltrão *et al.*, 2006; Barros-Jr. *et al.*, 2008). Porém, a maioria dos trabalhos que investigam o comportamento de tais cultivares sob o déficit hídrico é conduzida em condições de campo (Heckenberger *et al.*, 1998; Beltrão *et al.*, 2006; Barros-Jr. *et al.*, 2008). Ainda se sabe muito pouco sobre como as demais cultivares se comportam sob o déficit hídrico, bem como de que forma tal estresse afeta os principais parâmetros fisiológicos e bioquímicos dessa espécie.

A diminuição da disponibilidade dos recursos hídricos, o elevado custo da irrigação e a relevância econômica de culturas de mamoneira tornam mandatória a



compreensão dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos de resposta desta espécie vegetal ao déficit hídrico. Como as respostas ao déficit hídrico em praticamente todas as plantas dependem da cultivar, evidências de variabilidade genética na mamoneira sugerem um potencial para a descoberta de novos mecanismos fisiológicos e bioquímicos de tolerância ao déficit hídrico.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o grau de tolerância de discos foliares das cultivares de *Ricinus communis* L. BRS-Energia BRS-Nordestina, BRS-Paraguaçu, IAC-Guarani e IAC-80 ao déficit hídrico imposto por soluções de PEG-6000 a diferentes concentrações.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar o conteúdo hídrico relativo (CHR) de discos foliares de mamoneiras sob déficit hídrico de variadas intensidades;
- Avaliar a liberação de eletrólitos (LE) a partir de discos foliares sob estresse;
- Determinar o índice de dano de membrana (IDM) celular decorrente do estresse;
- Quantificar os hidroperóxidos de lipídios (LOOH) originados a partir do déficit hídrico;
- Quantificar as proteínas solúveis oxidadas em decorrência do estresse imposto;

### 3. Revisão de literatura

O conceito de déficit hídrico é confuso e a quantificação deste parâmetro é difícil por se tratar de um tipo de estresse multidimensional (Blum, 1996). Definir o déficit hídrico como suspensão da irrigação pode não ser apropriado (embora seja freqüente na literatura), uma vez que a redução do potencial hídrico do solo depende de uma variedade de fatores, tais como demanda evaporativa, área foliar e características do solo (Tardieu, 1996). O déficit hídrico pode ocorrer devido a muitos fenômenos, tais como choque térmico, choque osmótico, seca, excesso de luminosidade, aumento na velocidade do vento, excesso de salinidade entre outros. A combinação destes fenômenos leva a um déficit hídrico de variadas proporções (Monneveux e Belhassen, 1996). O déficit hídrico, em primeira instância, poderia ser definido como a condição onde ocorre um desequilíbrio entre o suprimento de água (potencial hídrico do solo) e a sua demanda, determinada pelo clima (Tardieu, 1996). Já em nível celular, o déficit hídrico poderia ser definido como o resultado de um desequilíbrio entre a quantidade de água e de solutos no simplasto (espaço intracelular), apoplasto (intercelular) e no espaço extracelular (Kocheva *et al.*, 2005). Este desequilíbrio seria caracterizado pelo baixo conteúdo de água em um tecido ou célula quando comparado ao estado de máxima hidratação dos mesmos (Taiz e Zeiger, 2006). A diversidade de tipos de déficits hídricos leva também à existência de numerosos tipos de respostas vegetais e mecanismos de tolerância (Monneveux e Belhassen, 1996). Compreender tais mecanismos é de fundamental importância do ponto de vista agrônomo, ecológico e bioquímico.

### **3.1. Respostas das plantas ao déficit hídrico**

As plantas são organismos sésseis e sua sobrevivência em um ambiente em constantes mudanças requer respostas rápidas. Ao longo de seus ciclos de vida, os vegetais estão sujeitos a várias condições de estresse influenciadas por fatores bióticos e abióticos que afetam negativamente seu metabolismo, comprometendo a produção (Boyer, 1982). O déficit hídrico está entre os fatores que mais limita amplamente a produtividade vegetal (Boyer, 1982; Jensen *et al.*, 1996). Segundo Boyer (1982), uma grande porcentagem de todos os vegetais do mundo é exposta a períodos crônicos ou esporádicos de seca. E, mesmo na ausência de seca efetiva, como em regiões relativamente úmidas, a distribuição irregular das chuvas e outros fatores ambientais limitam o desenvolvimento e a produtividade de vegetais em alguma fase de seu ciclo ou em algum período do dia (Boyer, 1982).

Em condições de campo, as plantas podem sofrer o déficit hídrico quando o suprimento de água para as raízes se torna difícil ou quando a taxa de transpiração se torna muito alta (Bray, 1997; Reddy *et al.*, 2004). As condições citadas são observadas em regiões áridas e semi-áridas.

O déficit hídrico afeta, em grau variado, todos os estágios ontogenéticos das plantas, induzindo modificações morfológicas, fisiológicas e metabólicas em todos os órgãos. Em ambientes naturais, tais modificações são graduais, afetando primariamente os processos mais sensíveis. Em conjunto, tais processos podem levar a alterações metabólicas que culminarão no fim do desenvolvimento (Tardieu, 1996). Para garantir sua sobrevivência, as plantas necessitam manifestar respostas rápidas que lhes permitam lidar com tal situação, evitando a desidratação, tolerando a desidratação ou maximizando a eficiência do uso de água (Mullet e Whitsitt, 1996).

Quase todas as espécies vegetais parecem apresentar mecanismos de tolerância ao déficit hídrico. Porém, a extensão dessas respostas varia de acordo com a espécie vegetal, a cultivar estudada, a duração e a intensidade do estresse e a fase ontogenética em que ocorre (Bray, 1997; Reddy *et al.*, 2004). Além disso, respostas celulares específicas podem variar dependendo do órgão, do tipo e do desenvolvimento celular, bem como o compartimento subcelular em que ocorrem (Mullet e Whitsitt, 1996; Bray, 1997).

A resistência ocorre quando a planta enfrenta o estresse imposto, o que pode ser alcançado por meio de tolerância, ou mecanismos que permitam a fuga à situação (Bray, 1997). Os mecanismos de fuga dependem primariamente de adaptações na arquitetura e morfologia dos sistemas radicular e caulinar. Quanto à tolerância, esta parece envolver processos bioquímicos e moleculares, como o acúmulo de chaperoninas, inibidores de protease, ATPases etc, com o objetivo de proteger as células de danos causados por baixos potenciais hídricos (Bray, 1997; Hellmann *et al.*, 2000).

Uma vez que o déficit hídrico impõe grande restrição ao desenvolvimento e à produtividade de vegetais, conhecer o status hídrico das plantas é o primeiro passo para uma maior compreensão dos mecanismos fisiológicos de resposta a este tipo de estresse (Hsiao, 1973). Os parâmetros utilizados para avaliar o status hídrico das plantas são o conteúdo hídrico relativo (CHR) e o potencial hídrico ( $\Psi_H$ ) (Hsiao, 1973; Zhao *et al.*, 2008; Ko e Piccinni, 2009; Seelig *et al.*, 2009). O CHR é o conteúdo de água do órgão relativo ao conteúdo de água quando este se encontra em pleno turgor (Hsiao, 1973). Essa técnica de medida foi originalmente descrita por Weatherley (1950) e constitui uma maneira confiável de se avaliar os variados graus de déficit hídrico sofridos, de fato, pelas plantas (Zhao *et al.*, 2008; Seelig *et al.*, 2009). Adicionalmente, a determinação do CHR pode indicar o momento em que as plantas começam a desidratar

(Seelig *et al.*, 2009). O  $\Psi_H$  reflete o estado termodinâmico da água na célula vegetal, ou seja, a energia livre necessária para que moléculas de água realizem trabalho (Hsiao, 1973; Taiz e Zeiger, 2006). O  $\Psi_H$  nas plantas é afetado pela pressão hidrostática ou tensão, pelos efeitos coligativos dos solutos, e também pela interação da água com matrizes de sólidos (parede celular) e de macromoléculas (Hsiao, 1973). Assim, o  $\Psi_H$  é a soma algébrica dos componentes de potencial vindos dos efeitos da pressão ( $\Psi_P$ ), dos solutos ( $\Psi_S$  ou  $\Psi_\pi$ ) e da matriz ( $\Psi_M$ ) (Hsiao, 1973). O  $\Psi_H$  compreende um indicador geral da saúde da planta, fornecendo um índice relativo do estresse hídrico ao qual a planta está submetida (Hsiao, 1973; Taiz e Zeiger, 2006). Devido à perda de água para a atmosfera através da transpiração, as plantas raramente estão plenamente hidratadas. A manutenção do potencial hídrico durante tais períodos ocorre a partir de respostas imediatas (fechamento estomático) ou respostas que levam semanas (alterações no crescimento da folhagem, senescência etc) ou até meses (redução da biomassa total ou produtividade vegetal) para se manifestarem (Tardieu, 1996). O processo mais afetado pelo déficit hídrico é o crescimento celular (Taiz e Zeiger, 2006). Quando o déficit hídrico se desenvolve, o ajustamento osmótico pode prevenir a desidratação iminente das células foliares por algum tempo. Tal ajuste influenciará o potencial osmótico e o potencial hídrico sem necessariamente afetar a pressão de turgor ou o CHR da célula, prevenindo possíveis reduções ou impedimentos no crescimento celular.

O ajustamento osmótico é definido por Morgan (1984) como um acúmulo de solutos osmoticamente ativos de baixo peso molecular em órgãos vegetais tais como caule, folha ou raiz. Tal condição leva a uma redução no potencial osmótico celular permitindo a manutenção de um gradiente de potencial hídrico favorável que, por sua vez, garante a proteção da célula contra eventuais perdas de turgor (Bray, 1997; Silva *et al.*, 2009; Silveira *et al.*, 2009). Além disso, o ajustamento osmótico pode permitir que a

capacidade fotossintética das plantas sob déficit hídrico sofra pequenas alterações (Blum, 1996). Assim, plantas capazes de realizar ajustamento osmótico conseguem manter o CHR e suas atividades metabólicas normais por mais tempo quando sob déficit hídrico (Blum, 1996; Monneveux e Belhassen, 1996; Silva *et al.*, 2009; Silveira *et al.*, 2009).

O acúmulo de compostos decorrente do ajustamento osmótico difere entre as espécies e varia de acordo com a intensidade do estresse e o tempo de estímulo. Alterações súbitas no status hídrico da planta não permitem ajustamento (Blum, 1996; Monneveux e Belhassen, 1996; Jaleel *et al.*, 2007). O ajustamento osmótico pode ocorrer através da utilização de produtos diretos da fotossíntese (carboidratos solúveis) ou da hidrólise de compostos de reserva (amido ou proteínas) (Mullet e Whitsitt, 1996). Entre os solutos acumulados podem-se incluir o pinitol, o sorbitol, frutanos, prolina e compostos quaternários de amônio (glicina-betaína) (Mullet e Whitsitt, 1996; Bray, 1997; Garcia-Mata e Lamattina, 2001). A prolina é um dos solutos osmoticamente ativos mais estudados, cuja síntese e metabolismo são influenciados pelo déficit hídrico (Bray, 1997; Jefferies, 1993; Bandurska, 2000; Knipp e Honermeier, 2006; Mohamed e Tawfik, 2006, Jaleel *et al.*, 2007). Assim, em condições adequadas de suprimento de água, as plantas apresentam quantidade reduzida de prolina que aumenta à medida que as plantas são privadas de água (Teixeira e Pereira, 2007).

### **3.2. Estabilidade e os danos de membrana**

O déficit hídrico diminui o potencial hídrico das células levando a uma redução no turgor (Sayar *et al.*, 2008). Uma estratégia de tolerância a este tipo de estresse baseia-se na habilidade das células vegetais em manter a atividade fisiológica mesmo

durante a redução do potencial hídrico (resistência protoplasmática) (Levitt, 1980). Esta habilidade é uma propriedade inerente das próprias células (Bewley, 1979).

As membranas biológicas são um dos primeiros alvos em condições de estresse (Levitt, 1980; Bajji *et al.*, 2002) e a manutenção de sua integridade e estabilidade pode ser considerada um dos melhores indicadores fisiológicos de tolerância ao déficit hídrico (Bandurska, 2000; Bajji *et al.*, 2002; Kocheva *et al.*, 2004).

O efeito da perda de água através das membranas celulares é um assunto que há tempos desperta grande interesse científico. Os primeiros estudos foram realizados por Iljin (1957), que observou a ocorrência de alterações na estrutura das membranas sob condições de déficit hídrico. De fato, a perda da tolerância e os danos causados pela desidratação estão associados a alterações bioquímicas ou biofísicas na estrutura das membranas (McKersie e Stinson, 1980; Senaratna e McKersie, 1983; Tatteroo *et al.*, 1996). Estudos ultra-estruturais indicam que tais alterações podem ser substanciais (Senaratna e McKersie, 1983; Tatteroo *et al.*, 1996), sendo causadas por modificações na compartimentalização celular associadas a um aumento da atividade de enzimas hidrolíticas (El Hafid *et al.*, 1989).

Um sintoma típico da injúria por desidratação é um aumento na permeabilidade da membrana celular (McKersie e Stinson, 1980; Senaratna e McKersie, 1983), o que leva a um aumento na saída de íons e outros solutos citoplasmáticos (Levitt, 1980; McKersie e Stinson, 1980; Senaratna e McKersie, 1983; Tatteroo *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1997; Prášil e Zámečník, 1998; Bandurska, 2000; França *et al.*, 2000; Bajji *et al.*, 2002; Kocheva *et al.*, 2004; Kocheva *et al.*, 2005; Sayar *et al.*, 2008; Faisal e Anis, 2009). A desidratação aumenta a liberação de eletrólitos e solutos citoplasmáticos induzindo um de dois possíveis tipos de danos de membrana. A primeira hipótese baseia-a no rompimento da membrana promovendo a formação de uma bicamada

lipídica descontínua (Senaratna e McKersie, 1983). A segunda hipótese trata da alteração na membrana intacta sem provocar fragmentação (Senaratna e McKersie, 1983). A natureza da lesão metabólica induzida pela desidratação é que determinará as alterações na membrana (Senaratna e McKersie, 1983).

Órgãos danificados liberam mais rapidamente solutos devido ao rompimento mecânico da plasmalema e/ou do tonoplasto durante o processo de desidratação (Senaratna e McKersie, 1983). Na maioria das vezes, os danos ocasionados pela desidratação não são tão severos a ponto de se verificar a ruptura das membranas (McKersie e Stinson, 1980; Vasquez-Tello *et al.*, 1990; Tatteroo *et al.*, 1996).

McKersie e Stinson (1980), estudando os efeitos da desidratação sobre as membranas de *Lotus corniculatus* L., verificaram que a amostra com dano por desidratação ainda apresentava evidências de uma permeabilidade seletiva durante a reidratação. Segundo esses autores, se o colapso celular tivesse induzido uma ruptura na plasmalema com conseqüente destruição de sua continuidade, a quantidade de soluto liberada refletiria as suas concentrações citoplasmáticas no órgão afetado. Porém, tal correlação não foi observada (McKersie e Stinson, 1980). Os autores também observaram que o aumento da permeabilidade pode ser o resultado de uma reorganização dos componentes das membranas decorrentes dos baixos níveis de hidratação (McKersie e Stinson, 1980).

Um modelo alternativo é que a desidratação induz uma alteração na hidrofobicidade das membranas, ou seja, membranas celulares hidratadas ou desidratadas são estruturalmente diferentes (McKersie e Stinson, 1980). O status conformacional das membranas é predominantemente determinado pela prevalência dos fosfolípídios. Em condições de hidratação, as membranas dos organismos vivos se encontram na fase líquido-cristalina. Durante a remoção de água (desidratação), a



distância entre os grupos fosfolipídicos outrora solvatados diminui, levando a um aumento das interações de van der Waals entre as cadeias acilas dos ácidos graxos (Crowe *et al.*, 1992). Formação de imperfeições na bicamada fosfolipídica é observada durante a transição de fases, o que torna as membranas mais permeáveis a solutos (Hammoudah *et al.*, 1981). Nesse caso, o estresse por desidratação pode aumentar a permeabilidade das membranas, aumentando a taxa de difusão passiva através da bicamada fosfolipídica (Senaratna e McKersie, 1983). Isso frequentemente resulta em dano extensivo, podendo inclusive, levar à morte celular por alteração do equilíbrio osmótico celular (Tatteroo *et al.*, 1996).

A transição de fases das membranas durante a reidratação compromete a sobrevivência das plantas sob déficit hídrico (Crowe *et al.*, 1992). Este fenômeno pode ser prevenido por meio de um ajuste do metabolismo celular com um aumento do número de ácidos graxos insaturados que constituem a membrana celular (Lynch e Steponkus, 1989). Este mecanismo bioquímico garante a tolerância de grãos de pólen e embriões à desidratação (estado vítreo). Contudo, o aumento do conteúdo de ácidos graxos insaturados na membrana torna esta estrutura celular mais suscetível ao ataque de radicais livres. Como um resultado, os lipídios são peroxidados o que causa alterações na membrana que levam a uma extensiva liberação de eletrólitos (Tatteroo *et al.*, 1996).

Alterações na conformação de proteínas de membrana também podem desencadear uma liberação extensiva de solutos e eletrólitos a partir de órgãos vegetais sensíveis à desidratação. Nesse caso, o estresse por desidratação pode aumentar a permeabilidade das membranas diminuindo a taxa de recaptção ativa, o que pode ocorrer se a atividade ou eficiência dos sistemas membranares de transporte for alterada (Senaratna e McKersie, 1983). Tais alterações podem ser uma consequência da

mudança de fase dos fosfolipídios, que faz com que essas proteínas se tornem irreversivelmente agregadas (Tatteroo *et al.*, 1996). Em seus estudos, Tatteroo *et al.* (1996) encontraram evidências das duas hipóteses, demonstrando que tanto os lipídios em fase gel quanto a agregação de proteínas de membrana ocorrem durante a desidratação rápida de embriões somáticos de cenoura. Esses autores verificaram a ocorrência de separação de fase lateral de fosfolipídios e proteínas de membrana. A alteração de fase pareceu ser oriunda do processo de desidratação celular. As membranas dos embriões que sofreram desidratação rápida permaneceram em fases separadas e duas hipóteses foram levantadas (Tatteroo *et al.*, 1996). Por um lado, os fosfolipídios na membrana podem permanecer na fase gel após a reidratação devido ao acúmulo de ácidos graxos livres e lipídios peroxidados ambos originados pela ação de radicais livres (Senaratna e McKersie, 1983; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 2004; Teixeira e Pereira, 2007; Veljovic-Jvanovic *et al.*, 2008).

Indivíduos tolerantes à desidratação são capazes de restabelecer a estrutura original das membranas celulares reabsorvendo água durante um determinado período de reidratação enquanto que indivíduos sensíveis são incapazes de se restabelecer completamente (McKersie e Stinson, 1980). Sendo assim, testes baseados na avaliação da resistência das membranas costumam ser usados para a seleção de cultivares parentais para programas de melhoramento (Vasquez-Tello *et al.*, 1990; Stevanović *et al.*, 1997; Kocheva *et al.*, 2004).

O grau de dano às membranas celulares induzido por estresse pode ser facilmente estimado através da medida da liberação de eletrólitos (LE) dos tecidos vegetais (Prášil e Zámečník, 1998; Bandurska, 2000; Bajji *et al.*, 2002; Kocheva *et al.*, 2004; Kocheva *et al.*, 2005; Sayar *et al.*, 2008; Faisal e Anis, 2009). Em muitos casos, esse efluxo é determinado pela análise da condutividade da solução em que o tecido foi

incubado. Assim, a condutividade da água desionizada que contém certo material vegetal aumenta gradualmente com a liberação de íons a partir do citoplasma de células com permeabilidade de membrana alterada (Kocheva *et al.*, 2005). Este método foi descrito pela primeira vez por Dexter *et al.* (1930) para estimar o dano de membrana em plantas causado por estresse por congelamento. O método se baseia na medida da quantidade de eletrólitos liberados em água desionizada a partir de órgãos danificados (Prášil e Zámečník, 1998). O uso de técnicas condutimétricas para esse tipo de propósito não perdeu a credibilidade a despeito do tempo em que surgiam os primeiros relatos de trabalhos (Dexter *et al.*, 1930; Dexter *et al.*, 1932). Tal fato é notado na literatura, onde uma permanente tendência para o aperfeiçoamento da técnica é observada (Vasquez-Tello *et al.*, 1990; Prášil e Zámečník, 1998; Bajji *et al.*, 2002; Kocheva *et al.*, 2005).

A LE é amplamente empregada como forma de avaliar a integridade das membranas submetidas a estresses ambientais de vários tipos, como o de temperatura (Prášil e Zámečník, 1998; Li *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009), o salino (Chen *et al.*, 1999), o choque osmótico (Vasquez-Tello *et al.*, 1990; Stevanović *et al.*, 1997; Bandurska, 2000; França *et al.*, 2000; Bajji *et al.*, 2002; Kocheva *et al.*, 2004; Kocheva *et al.*, 2005; Sayar *et al.*, 2008;), além de estresses bióticos (Nyochembeng *et al.*, 2007). A LE também pode ser empregada para a determinação da evolução de processos naturais como a desidratação de sementes (McKersie e Stinson, 1980; Senaratna e McKersie, 1983; Tatteroo *et al.*, 1996).

Como a maioria dos métodos eletroquímicos, esta técnica é acurada e sensível o bastante, possibilitando uma alta reprodutibilidade dos resultados (Kocheva *et al.*, 2005). Além disso, é um método que requer pequena quantidade de material vegetal cuja praticidade permite a análise de um grande número de amostras em laboratório,

além de análises de rotina em condições de campo (Bajji *et al.*, 2002; Kocheva *et al.*, 2005). Adicionalmente à estimativa da extensão do dano causado às membranas biológicas, a LE permite avaliar as variações genotípicas entre as espécies de plantas no que se refere ao grau de integridade de membrana das mesmas (Stevanović *et al.*, 1997; Bandurska, 2000; Bajji *et al.*, 2002; Kocheva *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Também foi demonstrado que a LE correlaciona-se com muitos parâmetros fisiológicos e bioquímicos indicadores das respostas das plantas aos estresses ambientais. Esses parâmetros incluem a integridade do aparato fotossintético (Kocheva *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009), a peroxidação de lipídios (Wang *et al.*, 2009), o acúmulo de prolina (Bandurska, 2000) e a eficiência do uso de água (França *et al.*, 2000). Por tudo isso, essa metodologia é recomendada como critério valioso para a identificação de cultivares tolerantes ao estresse em muitas espécies (Vasquez-Tello *et al.*, 1990; Stevanović *et al.*, 1997; Kocheva *et al.*, 2004).

### **3.3. Alterações estruturais em membranas**

Uma das respostas primárias da planta aos estresses bióticos e abióticos é a produção massiva de espécies reativas de oxigênio (ROSs) e de nitrogênio (RNSs), respostas estas que levam ao estresse oxidativo celular (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998; Apel e Hirt, 2004; Reddy *et al.*, 2004; Teixeira e Pereira, 2007; Veljovic-Jvanovic *et al.*, 2008; Modolo, 2010). A produção de ROSs e RNSs durante a interação planta-patógeno compreende um mecanismo de defesa da planta para o controle da disseminação do agente invasor (Modolo, 2010). No entanto, a produção descontrolada de agentes oxidantes em órgãos vegetais sob estresse abiótico é algo crítico para o metabolismo da planta (Dat *et al.*, 2000). O acúmulo de ROSs é potencialmente perigoso sob condições de déficit hídrico porque pode levar à peroxidação de lipídios e à oxidação de grupos

tióis críticos à função de certas proteínas (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 2004; Zgallai *et al.*, 2006). De igual relevância é o dano celular causado por ROSs no que se refere à liberação de íons (McKersie e Stinson, 1980; Senaratna e McKersie, 1983; Tatteroo *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1997; Prášil e Zámečník, 1998; Bandurska, 2000; França *et al.*, 2000; Bajji *et al.*, 2002; Kocheva *et al.*, 2004; Kocheva *et al.*, 2005; Sayar *et al.*, 2008; Faisal e Anis, 2009).

São exemplos de ROSs, o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2^*$ ), o radical peridroxil ( $^{\bullet}\text{OOH}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o ânion superóxido ( $^{\bullet}\text{O}_2^-$ ) e o radical hidroxil ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) enquanto que o óxido nítrico ( $^{\bullet}\text{NO}$ ), o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e o dióxido de nitrogênio ( $^{\bullet}\text{NO}_2$ ) são considerados RNSs. O símbolo  $\bullet$  indica um elétron desemparelhado e o asterisco (\*) indica que esta espécie referenciada está em um estado energético excitado. Todas as espécies exemplificadas são altamente reativas levando à formação de espécies ainda mais oxidantes. As ROSs e RNSs estão presentes em todas as plantas e em vários níveis como resultado do metabolismo aeróbico normal. Tais espécies são produzidas nos cloroplastos e em outros componentes subcelulares tais como mitocôndrias e peroxissomos (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 2004; Zgallai *et al.*, 2006).

Quando as ROSs acumulam nas células, fosfolipídios insaturados, proteínas de membrana e proteínas solúveis (citossólicas) são oxidados, processo este que afeta severamente as funções metabólicas destas macromoléculas (Eltner, 1982; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998; Jaleel *et al.*, 2007). Outras macromoléculas como carboidratos e ácidos nucleicos também são suscetíveis a danos causados pela ação das ROSs e RNSs (Blokina *et al.*, 2003).

A peroxidação lipídica é um processo metabólico que ocorre naturalmente sob condições aeróbicas normais e é um dos fenômenos afetados pelas ROSs mais estudado (Griffiths *et al.*, 2000; DeLong *et al.*, 2002; Gigon *et al.*, 2004; Sattler *et al.*, 2004; Li *et*

*al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2007). Os fosfolipídios poliinsaturados, principais componentes de membrana, são suscetíveis à peroxidação (Blokhina *et al.*, 2003). O grau de insaturação, a composição e organização dos lipídios nos sistemas membranares, bem como a existência de um sistema antioxidante efetivo são quesitos imprescindíveis para garantir o controle da oxidação destas macromoléculas tão importantes (Blokhina *et al.*, 2003; Gigon *et al.*, 2004).

A concepção de que a peroxidação lipídica é um processo unicamente destrutivo passou por um processo de mudança durante a última década. Hoje já se sabe que os hidroperóxidos de ácidos graxos, os produtos oxigenados da degradação de lipídios, bem como os agentes oxidantes (ROs, por exemplo) podem atuar como sinalizadores (Griffiths *et al.*, 2000). Os hidroperóxidos de ácidos graxos desempenham um papel importante na sinalização para a produção de compostos de defesa em plantas (Griffiths *et al.*, 2000). No entanto, pouco se sabe sobre os níveis de hidroperóxidos de ácidos graxos necessários para regular as respostas de defesa das plantas (Griffiths *et al.*, 2000). Os testes de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que estimam a quantidade de malondialdeído (MDA), um produto secundário da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, são muito utilizados para determinar a oxidação global de lipídios num sistema (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998; Hodges *et al.*, 1999; Loggini *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2007; Faisal e Anis, 2009; Simova-Stoilova *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Porém, esta técnica apresenta sensibilidade muito limitada no que diz respeito à hidroperóxidos de lipídios (LOOH), que são mais relevantes fisiologicamente (Griffiths *et al.*, 2000). Em função disso, novas metodologias foram criadas, melhoradas e/ou adaptadas a modelos em plantas visando à quantificação direta dos níveis de LOOH. Dentre tais metodologias, destaca-se aquela que utiliza o reagente FOX (do inglês *ferrous oxidation-xilenol orange*) (Griffiths *et al.*, 2000; DeLong *et al.*,

2002; Pinto *et al.*, 2007). Esta técnica é bastante sensível e permite a discriminação de lipídios peroxidados daqueles decorrentes de outros processos de oxidação.

A oxidação de proteínas solúveis ou de membranas é definida como a modificação covalente na estrutura de tais macromoléculas, um processo desencadeado por ROSs e/ou outros produtos do estresse oxidativo (Møller e Kristensem, 2004). As proteínas podem ser oxidadas por uma variedade de vias, algumas essencialmente irreversíveis, outras reversíveis (Møller e Kristensem, 2004). A oxidação de grupos às pontes dissulfeto é um mecanismo importante na regulação da função de certas enzimas (Møller e Kristensem, 2004). Uma grande variedade de modificações oxidativas ocorre nas proteínas em tecidos vivos. O número de sítios de modificação, porém, frequentemente aumenta marcadamente sob condições de estresse (Møller e Kristensem, 2004). Uma das modificações mais comuns é a transformação que dá origem a grupos carbonilas na cadeia lateral de alguns resíduos de aminoácidos que constituem as proteínas (Halliwell e Gutteridge, 1999). As proteínas carboniladas são encontradas normalmente nos tecidos, aumentando seus níveis em condições de estresse. Assim, em tecidos estressados, uma proporção significativa de todas as proteínas está carbonilada, o que pode comprometer o metabolismo normal do organismo (Møller e Kristensem, 2004). Sabe-se que os ácidos graxos poliinsaturados são capazes de proteger as proteínas contra danos provocados pela reação com as ROSs. Por outro lado, os aldeídos formados a partir da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados podem reagir com as proteínas tornando-as carboniladas (Møller e Kristensem, 2004).

As consequências do estresse oxidativo dependem da organização das membranas, do conteúdo antioxidante endógeno e da habilidade de resposta das plantas (Blokhina *et al.*, 2003). As plantas apresentam um sistema antioxidante que é altamente

eficiente na captura de radicais livres oriundos da atividade fotossintetizante e da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, quando a planta se encontra em condições metabólicas normais (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998; Loggini *et al.*, 1999; Blokhina *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2004). As proteínas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), entre outras, constituem o sistema antioxidante enzimático celular. Substâncias do metabolismo primário (ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol) e do secundário (flavonóides, carotenóides, cumarinas, etc) fazem parte do sistema antioxidante não-enzimático (Foyer *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 2004).

A extensão da atividade dos sistemas antioxidantes de plantas em resposta ao déficit hídrico depende não somente da intensidade e duração do estímulo como também da do tecido, da espécie vegetal, de seu estágio de desenvolvimento e de seu estado metabólico (Reddy *et al.*, 2004). A resposta da planta, neste contexto, pode inclusive diferir entre cultivares de uma mesma espécie (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998; Loggini *et al.*, 1999; Blokhina *et al.*, 2003).



## **4. Materiais e métodos**

### **4.1. Material vegetal**

Foram utilizadas cinco cultivares de mamoneira, sendo estas BRS-Energia, BRS-Nordestina, BRS-Paraguaçu, IAC-Guarani e IAC-80 (Figura 1). As sementes foram gentilmente cedidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Algodão). A cultivar IAC-Guarani foi desenvolvida pelo cruzamento das variedades Campinas e Preta, se destacando pela produtividade e adaptabilidade e ciclo de 180 dias. A IAC-80 é uma cultivar produtiva, de grande porte e ciclo de 240 dias, sendo recomendada para agricultura familiar e pequenos produtores que disponham de colheita manual. A BRS-Nordestina é uma cultivar de porte médio que apresenta um ciclo médio de 250 dias. É recomendada para plantio no semi-árido brasileiro, sendo desenvolvida para o uso na agricultura familiar. Possui exigência moderada da fertilidade do solo, apresentando um conteúdo de óleo nas sementes de 49%. A BRS-Paraguaçu é uma cultivar que apresenta caule de coloração roxa, é de porte médio e apresenta ciclo médio de 250 dias. Esta cultivar foi desenvolvido para o uso na agricultura familiar em regiões semi-áridas. A cultivar BRS-Energia apresenta pequeno porte, ciclo de 120 a 150 dias, sendo bem adaptada à região nordeste do país. Estudos avaliando sua adaptabilidade em outros locais encontram-se em andamento ([www.iac.sp.gov.br/Centros/Graos\\_Fibras/Cultivares/Mamona.htm](http://www.iac.sp.gov.br/Centros/Graos_Fibras/Cultivares/Mamona.htm); [www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/cultivares.html](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/cultivares.html)).



**Figura 1.** Fotos de *Ricinus communis* L., objetos deste estudo. A, BRS-Energia; B, BRS-Nordestina; C, BRS-Paraguaçu; D, IAC-Guarani; e E, IAC-80.

## 4.2. Condições de cultivo

As sementes foram desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio 0,3% por 5 min e lavadas abundantemente com água desionizada. Três dias após a germinação, as sementes foram transferidas para potes plásticos de 8 L contendo substrato composto por solo (fertilidade corrigida por adubação) e areia na proporção de 2:1. Cada pote contendo quatro plântulas foi mantido em casa de vegetação à umidade relativa média de 61,8 %, temperatura máxima em torno de 27,6 °C e mínima em torno de 18,2 °C e intensidade luminosa diária em torno de 1270,3  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (intensidade máxima) e 17,3  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (intensidade mínima). As plântulas foram irrigadas à capacidade de campo utilizando solução de Hoagland e Arnon (1950) três vezes por semana. Folhas de plantas de 45 dias de idade foram utilizadas nos experimentos *ex vivo*.

## 4.3. Imposição do estresse

Quarenta e cinco dias após o plantio (DAP), folhas jovens intactas e completamente expandidas foram coletadas para a condução dos experimentos. Discos foliares de cada cultivar (1 cm de diâmetro) foram submetidos ao estresse hídrico por imersão em soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG-6000), preparadas de acordo com Money (1989), proporcionando os seguintes potenciais hídricos ( $\Psi_H$ ): -1,2, -1,8, e -2,4 MPa. Água desionizada foi empregada como tratamento controle ( $\Psi_H = 0$  MPa). O potencial hídrico de cada solução de PEG-6000 foi confirmado por análises ao osmômetro de déficit de pressão de vapor Wescor 5100C (Wescor Inc., Logan, UT). Os discos foliares sob tais tratamentos foram então mantidos na ausência de luz e temperatura ambiente por um período de 15 h. Após o período de imposição do estresse, foram realizados testes de liberação de eletrólitos (LE) e consequente índice de dano de

membranas (IDM). Os dados obtidos em tais testes foram empregados como um dos critérios para a seleção das cultivares quanto à tolerância ao déficit hídrico.

#### **4.4. Avaliação do conteúdo hídrico relativo**

O conteúdo hídrico relativo (CHR) dos discos foliares foi estimado antes e após a submissão do material vegetal ao estresse como outro dos critérios para a seleção das cultivares quanto à tolerância ao déficit hídrico. A estimativa do CHR foi efetuada segundo a expressão:

$$CHR = \frac{(MF - MS)}{(MT - MS)} \times 100$$

onde, MF é a massa fresca dos discos foliares; MT é a massa túrgida dos discos foliares, determinada 24 h após a imersão do material vegetal em 10 mL de água desionizada à temperatura ambiente; e MS é a massa seca dos discos foliares, obtida após secagem completa do material vegetal em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C.

Neste trabalho, o conteúdo hídrico relativo (CHR) das cultivares estudadas foi avaliado em duas situações distintas: (1) estresse imposto pela exposição do tecido foliar a soluções de PEG-6000 (10 mL) por 15 h em concentrações que simulem os potenciais hídricos de 0 (controle), -1,2, -1,8 e -2,4 MPa; e (2) recuperação do estresse após reidratação dos tecidos foliares por 24 h em 10 mL de água desionizada.

#### **4.5. Determinação do tempo ótimo de imersão em água dos discos foliares**

Foi realizado um teste para avaliar o melhor tempo necessário para a remoção dos eletrólitos provenientes do dano mecânico em decorrência do corte dos discos foliares das cinco cultivares de mamoneira antes que tais materiais vegetais fossem submetidos à análise de liberação de eletrólitos e à determinação do índice de dano de

membrana celular como função da privação de água. Foram obtidos 10 discos foliares de 1 cm de diâmetro a partir de folhas jovens totalmente expandidas e não-estressadas de cada cultivar. As amostras foram acondicionadas em tubos seguindo-se à adição de 20 mL de água desionizada de acordo com Bajji *et al.* (2002). A condutividade elétrica inicial ( $CE_0$ ) de cada sistema foi determinada através do uso de um condutivímetro digital (Digimed DM-3 – Digicron Analítica). Com o auxílio de um agitador orbital (Orbit Shaker – Lab-Line) à velocidade de 100 rpm, os tubos contendo as amostras foram agitados a cada 15 min até os 180 min decorridos da medida de  $CE_0$ . Nova medida de condutividade elétrica ( $CE_f$ ) foi realizada para cada amostra após cada período de agitação. A liberação de eletrólitos (LE) foi determinada levando-se em conta a massa fresca (MF) do material vegetal de acordo com a expressão:

$$LE = \frac{(CE_f - CE_0)}{MF}$$

Para estimar a quantidade de eletrólitos liberados durante cada intervalo de 15 min, foram considerados apenas os eletrólitos recém-liberados, subtraindo-se a condutividade elétrica (CE) do intervalo anterior daquela do intervalo atual. Estes experimentos foram realizados com 10 replicatas biológicas.

#### **4.6. Determinação da liberação de eletrólitos decorrente do estresse hídrico**

Após a determinação do melhor tempo para remoção dos eletrólitos decorrentes do dano mecânico dos discos foliares, foi realizado um experimento para determinar a liberação de eletrólitos desencadeada pelos diferentes níveis de déficit hídrico. Este experimento foi realizado em quintuplicata onde cada uma das replicatas era constituída de 10 discos foliares (1 cm de diâmetro) obtidos a partir de folhas jovens totalmente

expandidas. Amostras deste mesmo lote de plantas foram reservadas para a determinação do índice de dano de membranas a ser detalhado no próximo item. Os materiais vegetais foram incubados em água desionizada por um período de tempo de 15 min, determinado nos experimentos do item 3.5 para garantir a total liberação de eletrólitos desencadeada pelo dano mecânico ao obter os discos foliares. Os discos foliares foram então acondicionados em tubos contendo 10 mL de solução de PEG-6000 em diferentes concentrações de maneira a proporcionar os seguintes  $\Psi_H$ : 0 (controle), -1,2, -1,8 e -2,4 MPa. As amostras foram mantidas na ausência de luz e à temperatura ambiente por um período de 15 h seguindo o procedimento de Bajji *et al.* (2002). Decorridas as 15 h de incubação, os discos foram lavados abundantemente com água desionizada e submetidos à reidratação em 6 mL de água desionizada. A CE de cada amostra foi medida imediatamente após o início da reidratação ( $CE_i$ ) e em intervalos de tempo de reidratação ( $CE_f$ ) que variaram de 0,5 a 22,5 h. Após 22,5 h de reidratação, os discos foliares foram autoclavados (1 atm, 121 °C em 20 min) para se determinar a CE referente à liberação completa de eletrólitos a partir do material vegetal ( $CE_t$ ). O percentual de liberação de eletrólitos (LE) ocasionado pelo déficit hídrico foi determinado segundo a expressão:

$$LE = \frac{(CE_f - CE_i)}{(CE_t - CE_i)} \times 100$$

#### **4.7. Determinação do índice de dano de membranas**

O índice de dano de membranas (IDM) ocasionado pelo déficit hídrico foi determinado em quintuplicata em amostragens constituídas de 10 discos foliares (1 cm de diâmetro) obtidos como descrito no item 3.6. O cálculo do IDM foi realizado de acordo com Bajji *et al.* (2002) a partir da expressão:

$$IDM = \frac{(CE_f - CE_i) - (CE_t - CE_i)}{[1 - (CE_t - CE_i)]} \times 100$$

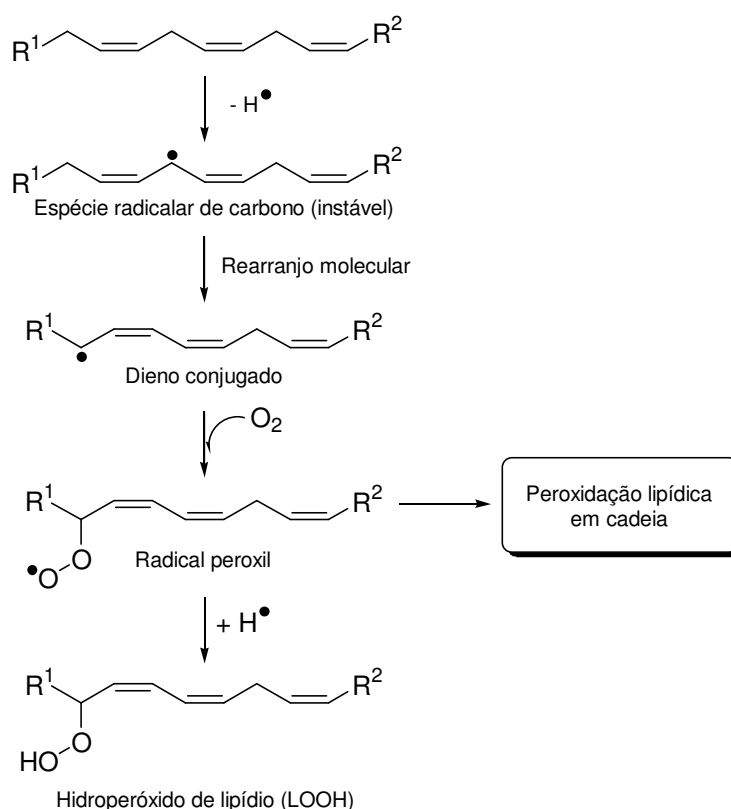
onde  $CE_i$  é a CE medida logo no início da reidratação;  $CE_f$  é a CE medida no intervalo de tempo de reidratação igual a 8 h, definido no experimento anterior (item 4.6 – LE) como intervalo de tempo onde a LE começa a estabilizar; e  $CE_t$  é a CE medida após autoclavagem.

#### 4.8. Avaliação da peroxidação lipídica

Os estresses abióticos induzem, nas plantas, um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROSs) e de nitrogênio (RNSs). O aumento descontrolado de tais espécies pode acarretar a oxidação de macromoléculas. A peroxidação de lipídios é um processo bioquímico que pode ocasionar efeitos deletérios às células por alterar a permeabilidade de membranas. A Figura 2 mostra uma representação esquemática do processo de peroxidação lipídica em células vegetais. Lipídios insaturados, como aqueles constituintes de membranas biológicas são os alvos primários de espécies radicalares. Os radicais livres promovem a formação de uma espécie radicalar de carbono a partir do esqueleto carbônico lipídico. A instabilidade da espécie formada leva a um rearranjo molecular com conseqüente formação de um dieno conjugado radicalar. O oxigênio do meio celular leva à formação do radical peroxil ( $LOO^\bullet$ ), que na presença de  $H^\bullet$  dá origem ao correspondente hidroperóxido de lipídio (LOOH).

O grau de peroxidação lipídica em discos foliares de *Ricinus communis* L. sob déficit hídrico foi determinado a partir do uso do reagente FOX (do inglês *Ferrous Oxidation-Xylenol orange*). Esta técnica é amplamente empregada na determinação de LOOH em sistemas de membranas reconstruídas, tecidos de mamíferos e extratos de soro. Ela foi recentemente adaptada para a utilização de extratos brutos de tecidos vegetais e para a determinação da atividade lipoxigenase de animais e vegetais, uma

enzima que catalisa a dioxigenação de ácidos graxos poli-insaturados (DeLong *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2007). Em plantas, essa enzima está envolvida no metabolismo de lipídios de armazenamento e na produção do ácido jasmônico. Além da atividade dioxigenase, as lipoxigenases de plantas também podem dar origem a hidroperóxidos de lipídios (Pinto *et al.*, 2007).



**Figura 2** – Modelo da reação de formação de hidroperóxidos de lipídios (LOOH) em células vegetais. Espécies radicalares, tais como o radical hidroxil ( $\bullet OH$ ), promovem a quebra homolítica da ligação C-H liberando o radical  $H^\bullet$  (oriundo do hidrogênio alílico). A espécie radicalar de carbono recém formada é muito instável, levando a um rearranjo molecular para a formação de um dieno conjugado (espécie radicalar mais estável). O oxigênio molecular ( $O_2$ ) reage com o dieno conjugado radicalar formando o radical peróxido ( $LOO^\bullet$ ), que pode proporcionar a peroxidação em cadeia de outros lipídios ou então abstrair um  $H^\bullet$  do meio para formar o hidroperóxido de lipídio correspondente (LOOH). Os grupos  $R^1$  e  $R^2$  foram utilizados para indicar que a cadeia carbônica dos ácidos graxos que constituem os lipídios apresenta tamanho variável.



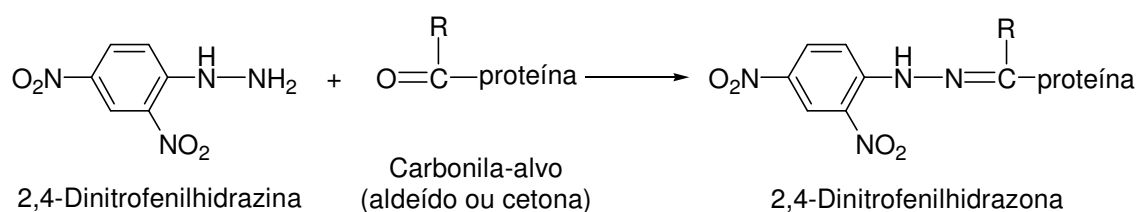
O FOX constitui um método sensível (detecta LOOH na ordem de nmols) e de baixo custo, que não sofre interferências do oxigênio do meio. Além disso, o método possui uma alta linearidade e os resultados obtidos são altamente reproduzíveis (DeLong *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2007). Este método de determinação de LOOH é uma técnica de colorimetria baseada na oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  presente na formulação do reagente FOX por peróxidos de lipídios existentes na amostra biológica. O  $\text{Fe}^{3+}$  oriundo desta reação de oxirredução reage com o alaranjado de xilenol, em meio ácido, formando um complexo de coloração que varia de alaranjada à púrpura, com máxima absorção em 560 nm (Pinto *et al.*, 2007).

Discos foliares (0,2 a 0,4 mg) submetidos a diferentes  $\Psi_H$  (0 a -2,4 MPa), como descrito nos itens anteriores, foram avaliados para o grau de peroxidação lipídica utilizando o reagente FOX de acordo com DeLong *et al.* (2002) e Gay e Gebicki (2002), com algumas modificações. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido juntamente com 30 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Os homogenatos foliares foram obtidos a partir da adição de 1,5 mL de uma solução aquosa de etanol 80% contendo hidroxitolueno butilado (BHT) 0,01% (m/v). Os homogenatos foram então centrifugados a 9000 x g por 5 min. Foram adicionados a 25  $\mu\text{L}$  do sobrenadante resultante 25  $\mu\text{L}$  de uma solução metanólica de trifetilfosfina (TEP) 10 mM ou 25  $\mu\text{L}$  de metanol. O sistema foi incubado por 30 min a temperatura ambiente seguido da adição de 500  $\mu\text{L}$  de uma solução recém-preparada de reagente FOX, constituída de metanol 90%, ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 110 mM, BHT 4 mM, sulfato ferroso amoniacal 250  $\mu\text{M}$  e alaranjado de xilenol 100  $\mu\text{M}$ . As amostras foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente para a determinação da quantidade de lipídios peroxidados. A densidade ótica de cada amostra foi determinada a 560 nm em leitor de microplacas Thermo Scientific Multiskan Spectrum. O grau de peroxidação lipídica foi determinado

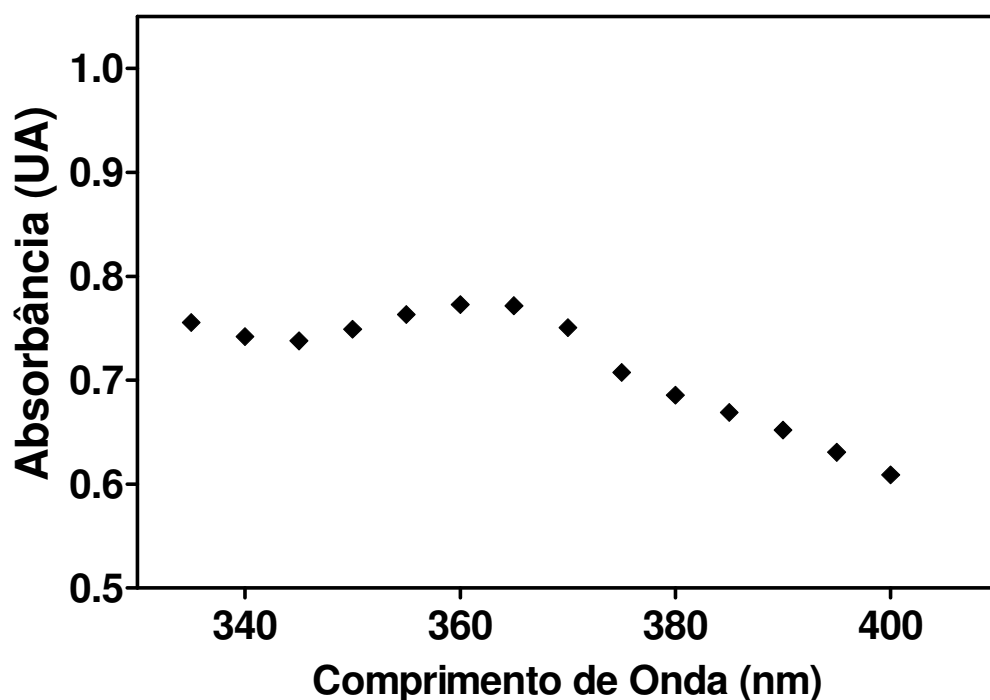
em termos de equivalentes de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a partir de uma curva padrão utilizando a substância comercial (Merck) nas concentrações de 0 a 320 μM. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em nmol de LOOH.g<sup>-1</sup> de massa seca.

#### 4.9. Avaliação da oxidação de proteínas

Um dos métodos de quantificação da oxidação de proteínas é a determinação da quantidade de carbonilas (de aldeídos ou cetonas) oriundas da reação entre ROSs e a cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos histidina e triptofano presentes na estrutura protéica (Halliwell e Gutteridge, 1999). Essa quantificação é baseada na reação da 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) com as carbonilas presentes nas proteínas, levando à formação de uma base de Schiff estável (2,4-dinitrofenilhidrazona) que é detectada na faixa de 360 a 390 nm (Reznick e Packer, 1994; Klebl *et al.*, 1998).



Para determinar o comprimento de onda de máxima absorção, as amostras foram submetidas à análise espectrofotométrica na faixa de 340 a 400 nm. A Figura 3 mostra que a absorção máxima ocorreu a 360 nm. Portanto, a determinação da quantidade de proteínas oxidadas foi realizada utilizando os valores de absorbância a 360 nm.



**Figura 3** – Espectro de absorção de 2,4-dinitrofenilhidrazona-proteína obtido de discos foliares de *Ricinus communis* L., cultivar IAC-80. Discos foliares foram submetidos à análise do teor de proteínas oxidadas através do método da 2,4-dinitrofenilhidrazina. A 2,4-dinitrofenilhidrazona-proteína oriunda do sistema de reação foi analisada espectrofotometricamente na faixa de 330 a 400 nm para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção. Este espectro é representativo das demais cultivares avaliadas (BRS-Energia e BRS-Paraguaçu).

A determinação do grau de oxidação de proteínas foi realizada de acordo com o descrito por Levine *et al.* (1990) e Reznick e Packer (1994), com algumas modificações. O material vegetal (0,2 a 0,4 g) sob déficit hídrico foi macerado com 30 mg de PVPP em nitrogênio líquido e homogeneizado com 1,5 mL de tampão Hepes 50 mM a pH 7,0. Os homogenatos foram centrifugados a 8000 x g por 5 min. A 375 µL do sobrenadante foram adicionados 250 µL de uma solução 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) 8 mM contendo HCl 2 M. O sistema foi incubado por 1 h a 150 rpm, na ausência de luz e a temperatura ambiente. Duzentos e cinquenta microlitros de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 30% (m/v) foram adicionados ao meio para proporcionar a

precipitação das proteínas. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 10000 x g por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado 3 vezes com 1,5 mL de uma solução de etanol/acetato de etila (1:1) para completa remoção de 2,4-DNPH livre. Foram utilizados 500 µL de uma solução de guanidina 6 M preparada em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 2,3 para ressuspender as proteínas. As amostras foram submetidas à análise espectrofotométrica nos comprimentos de onda na faixa de 300 a 400 nm. A determinação da quantidade de proteínas oxidadas foi realizada utilizando os valores de absorvância a 360 nm e um coeficiente de absorvância molar ( $\epsilon$ ) de 22000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> segundo Klebl *et al.* (1998). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em nmol de carbonila.mg<sup>-1</sup> de proteína total.

#### **4.10. Determinação de proteínas totais**

A quantificação de proteínas totais nas amostras foi realizada, quando conveniente, através do método de ligação com *Coomassie blue* utilizando o reagente de determinação de proteína (Pierce, Rockford, IL) e albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Bradford, 1976).

#### **4.11. Análise estatística**

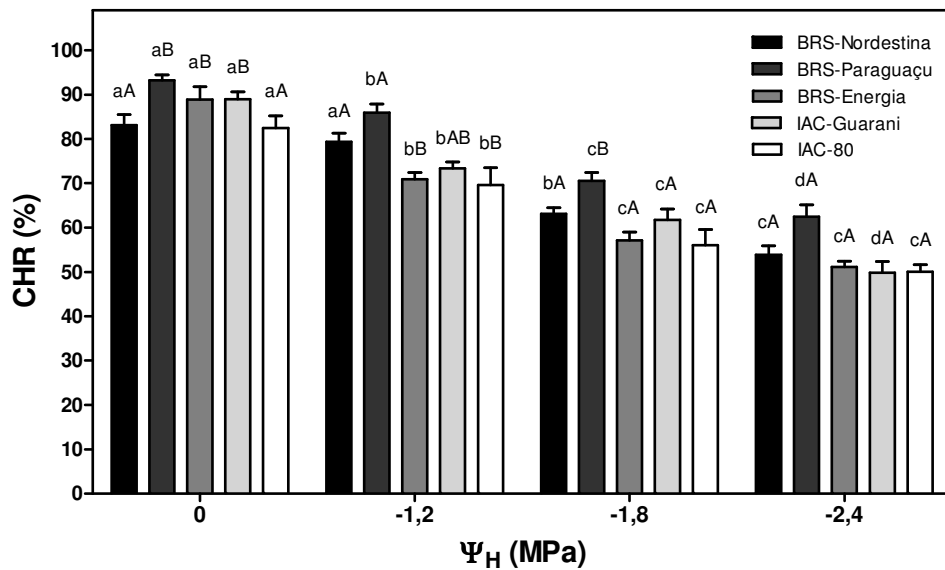
Os dados primários, após verificação de distribuição normal e variância homocedástica, foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA) para dados paramétricos e *Kruskal Wallis* para dados não-paramétricos em cada parâmetro estudado. As médias foram comparadas através dos testes *t Student* e *Tukey* a 5% de probabilidade. As análises foram efetuadas utilizando o programa BioEstat v. 5.0.

## 5. Resultados

### 5.1. Avaliação do status hídrico das plantas

Os resultados decorrentes do tratamento controle mostram que existem diferenças constitutivas no CHR entre as cinco cultivares (Figura 4). A cultivar BRS-Paraguaçu apresentou o maior valor de CHR (93,2%), seguida de BRS-Energia e IAC-Guarani com valores de CHRs de ~ 89,0%. Em um outro grupo, cujas plantas diferiram significativamente ( $P < 0,01$ ) do primeiro, encontram-se BRS-Nordestina e IAC-80, que apresentaram valores de CHR de aproximadamente 83,1 e 82,4%, respectivamente. O CHR diminuiu em todas as cinco cultivares à medida que o estresse se tornava mais severo (Figura 4). As plantas da cultivar BRS-Nordestina, contudo, não apresentaram redução significativa no CHR em relação ao tratamento controle quando as plantas foram submetidas a um estresse moderado ( $\Psi_H = -1,2$  MPa). O  $\Psi_H$  de -1,8 MPa foi considerado a condição crítica, uma vez que no potencial de -2,4 MPa (estresse severo) não foram observadas diferenças significativas entre as cultivares estudadas (Figura 4).

As cultivares que apresentaram maior decréscimo no CHR no potencial de -1,2 MPa foram IAC-Guarani e IAC-80 (17,4 e 15,4%, respectivamente). As demais cultivares – BRS-Paraguaçu, BRS-Energia e BRS-Nordestina – apresentaram diminuições discretas no CHR (7,7%, 6,4% e 4,4%, respectivamente). Como esperado, a diminuição do CHR em relação ao tratamento controle foi mais drástica quando as plantas foram submetidas a  $\Psi_H \leq -1,8$  MPa. Essa condição de estresse refletiu em um decréscimo no CHR na faixa de 24 - 32% para um  $\Psi_H = -1,8$  MPa e na faixa de 31 - 44% para um  $\Psi_H = -2,4$  MPa (Figura 4). Diferenças significativas foram observadas entre as cultivares e entre os tratamentos ( $P < 0,001$ ) (Figura 4).



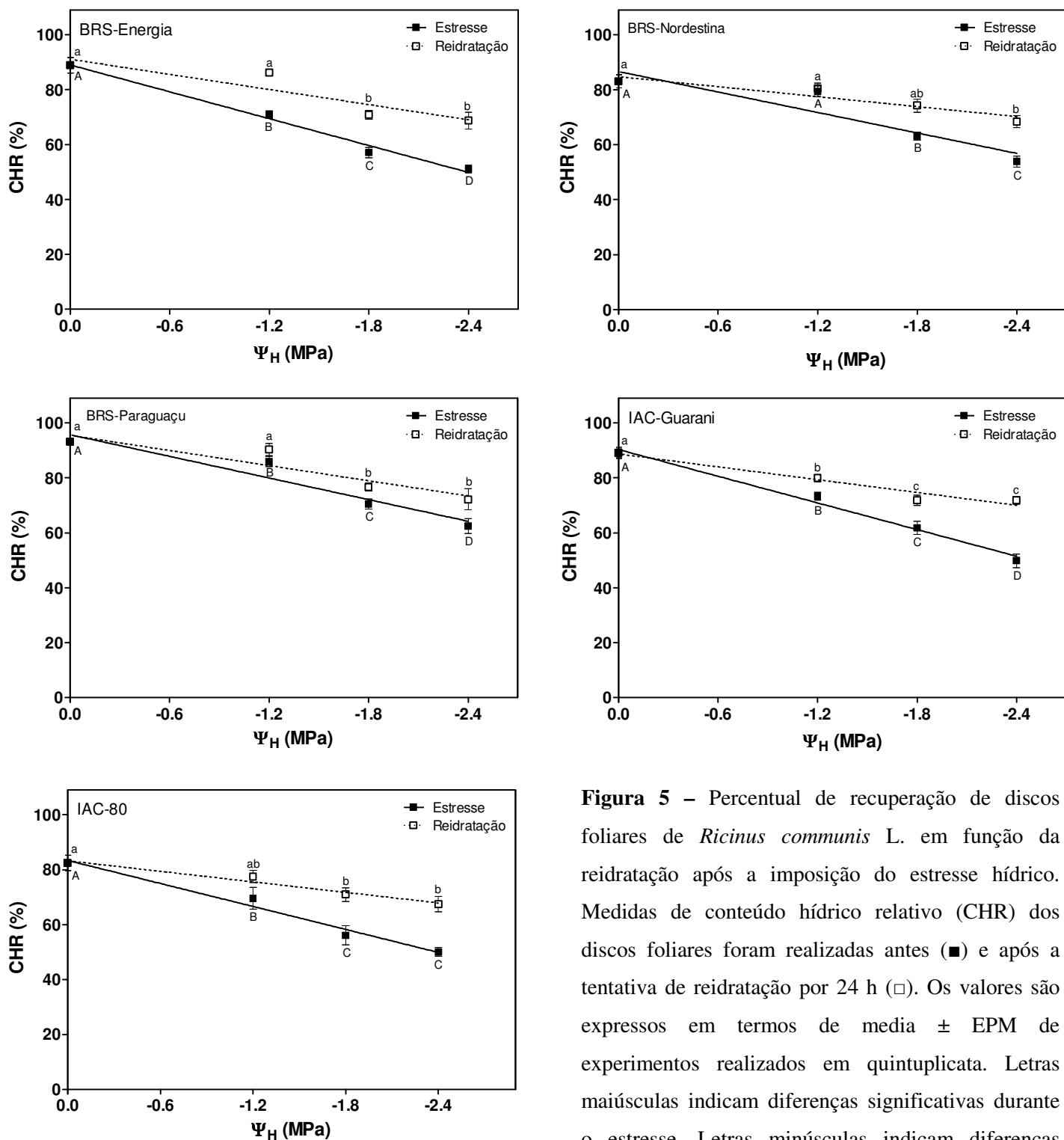
**Figura 4** – Conteúdo hídrico relativo (CHR) de folhas de *Ricinus communis* L. como função de diferentes níveis de déficit hídrico. Discos foliares de mamoneiras foram incubados com soluções de PEG-6000 ( $\Psi_H$  de 0, -1,2, -1,8 ou -2,4 MPa) por 15 h na ausência de luz. O CHR de cada amostra foi determinado e os valores expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de experimentos realizados em quintuplicata. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos aplicados a uma mesma cultivar (BRS-paraguaçu e IAC-80,  $P < 0,05$ ; BRS-nordestina  $P < 0,01$ ; e BRS-energia e IAC-guarani,  $P < 0,001$ ). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares em um referido tratamento (controle,  $P < 0,01$ ; e demais tratamentos,  $P < 0,05$ ).

O padrão de decréscimo no CHR dos discos foliares de todas as cultivares apresentou comportamento similar, sendo este proporcional ao aumento do estresse imposto (Figura 5).

Para o processo de reidratação a partir do tratamento a  $\Psi_H = -1,2$  MPa, verificou-se que a maioria das cultivares recuperou de 82,6 a 97,5% o seu CHR em relação ao controle (Figura 5). Diferentemente das demais cultivares, BRS-Nordestina apresentou-se indiferente a condições moderadas de déficit hídrico ( $\Psi_H = -1,2$  MPa) exibindo valores de CHR similares aos daqueles observados para o tratamento controle (Figura 5) e apresentando recuperação de 97% de seu CHR após o período de reidratação. Em compensação, o menor percentual de recuperação no potencial de -1,2

MPa foi apresentada pela cultivar IAC-Guarani (Tabela 1) . No potencial de -1,8 MPa, observa-se uma continuidade na tendência de recuperação do CHR. A única cultivar a recuperar menos de 80% de seu CHR original neste tratamento foi IAC-Guarani (79,5%). Apenas BRS-Nordestina e IAC-80 conseguiram obter uma recuperação superior a 80% de seu CHR original quando submetidas a um déficit hídrico severo ( $\Psi_H = -2,4$  MPa) (82,6 e 82,7% respectivamente). As demais cultivares recuperaram em torno de 78% de seu CHR. A cultivar BRS-Energia apresentou uma capacidade surpreendente de recuperação do estresse imposto no que refere ao CHR. A recuperação desta cultivar a partir dos diferentes graus de déficit hídrico foi em torno de 80% para condições mais severas de estresse (Figura 5). Por outro lado, a cultivar que aparentemente mais sofreu os efeitos do déficit hídrico quanto ao CHR foi a BRS-Paraguaçu, uma vez que tal cultivar, embora tenha sofrido decréscimos mais baixos do CHR, também foi a que apresentou menores percentuais de recuperação (Figura 5).

A avaliação do status hídrico durante o estresse e após a reidratação dos discos foliares foi empregada com um dos critérios para determinar o grau de tolerância das cultivares estudadas quanto ao déficit hídrico, a fim de selecionar três cultivares: uma mais tolerante (BRS-Energia), uma mais sensível (BRS-Paraguaçu) e uma com comportamento intermediário (IAC-80).

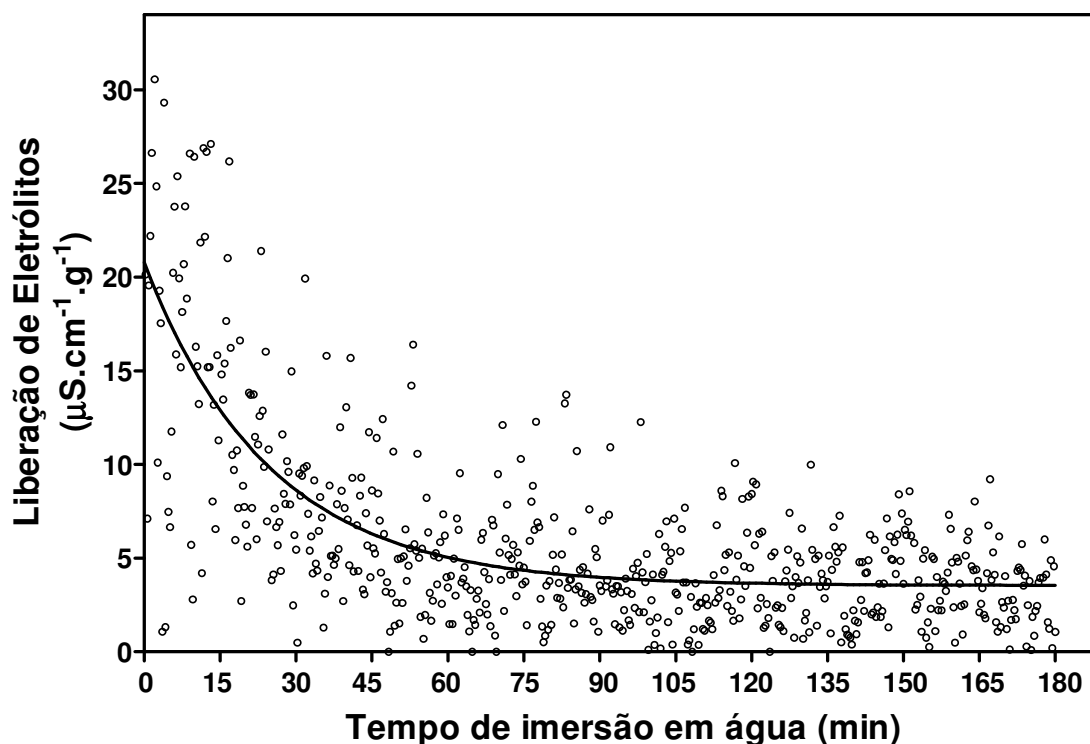


**Figura 5** – Percentual de recuperação de discos foliares de *Ricinus communis* L. em função da reidratação após a imposição do estresse hídrico. Medidas de conteúdo hídrico relativo (CHR) dos discos foliares foram realizadas antes (■) e após a tentativa de reidratação por 24 h (□). Os valores são expressos em termos de média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em quintuplicata. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas durante o estresse. Letras minúsculas indicam diferenças significativas durante a reidratação ( $P < 0,05$ ).



## 5.2. Avaliação da liberação de eletrólitos e determinação do índice de dano de membrana

Como observado na Figura 6, a maioria dos eletrólitos liberados em decorrência do dano mecânico nos discos foliares foi removida nos primeiros 15 min de imersão em água independente da cultivar avaliada.



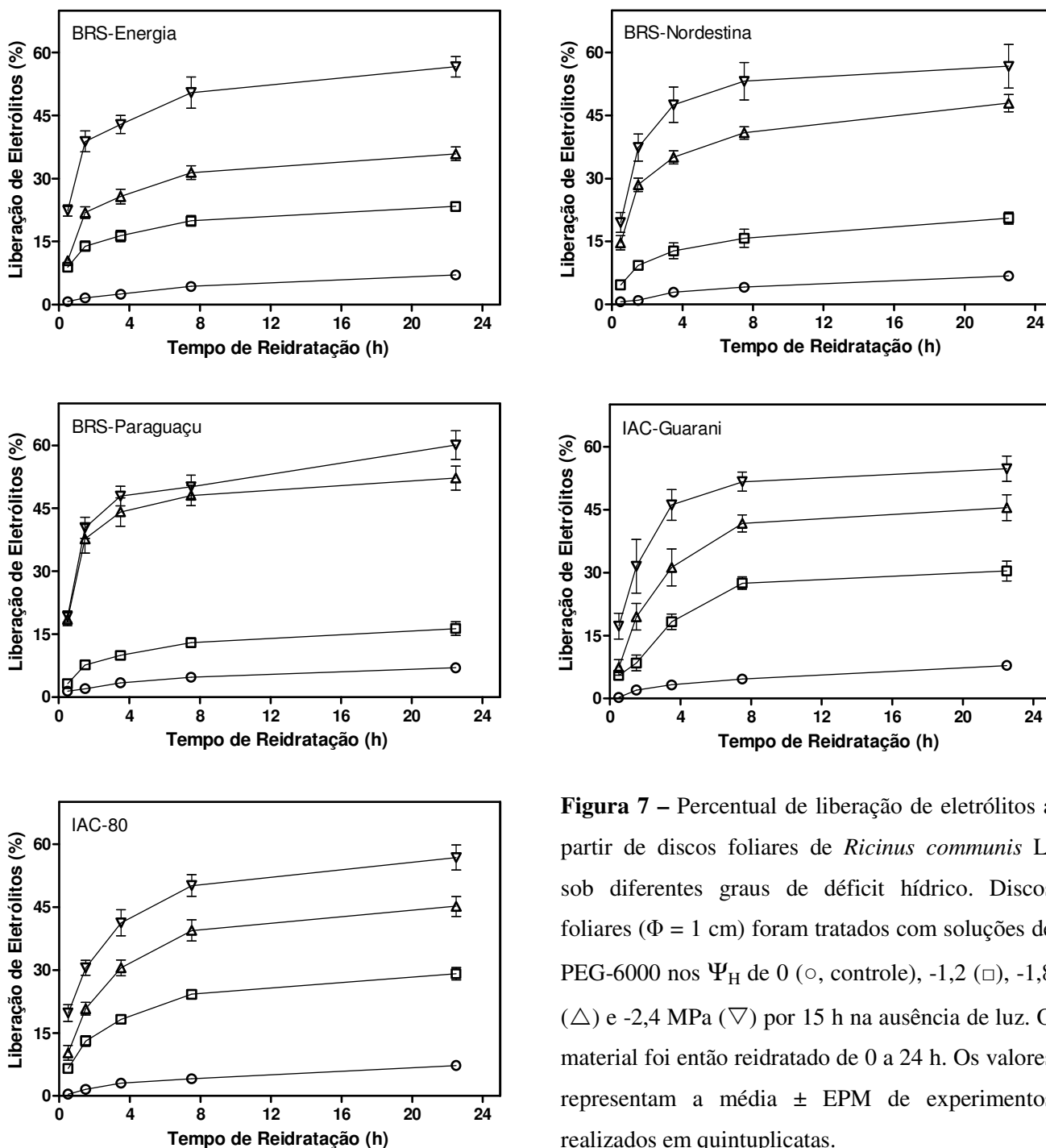
**Figura 6** – Tempo ótimo de imersão dos discos foliares de *Ricinus communis* L em água. Discos foliares de mamoneiras ( $\Phi = 1$  cm) das cultivares BRS-Nordestina, BRS-Paraguaçu, BRS-Energia, IAC-Guarani e IAC-80 foram acondicionados em tubos com 20 mL de água desionizada e agitados em intervalos de 15 min imediatamente após a delimitação da área foliar a ser analisada. O tempo ótimo foi determinado como sendo aquele onde a liberação de eletrólitos (LE).g<sup>-1</sup> de massa fresca decorrente da injúria tecidual fora praticamente nula. Os dados representam a regressão não-linear com os dados obtidos a partir de todas as cultivares em experimento realizado com 10 repetições.

Determinando-se 15 min como o tempo ótimo para remoção dos eletrólitos provenientes do dano mecânico, realizou-se a avaliação da LE a partir de discos foliares submetidos ao déficit hídrico. Observou-se que as curvas de LE apresentaram um modelo bifásico ao longo do tempo, que foi similar em todas as cultivares e tratamentos (exceto o tratamento controle, com LE quase linear). Inicialmente, houve um efluxo rápido de eletrólitos a partir dos discos foliares (Figura 7). Após 4,5 h, o efluxo de eletrólitos se apresenta moderado, chegando a se tornar constante após 7,5 h (Figura 7).

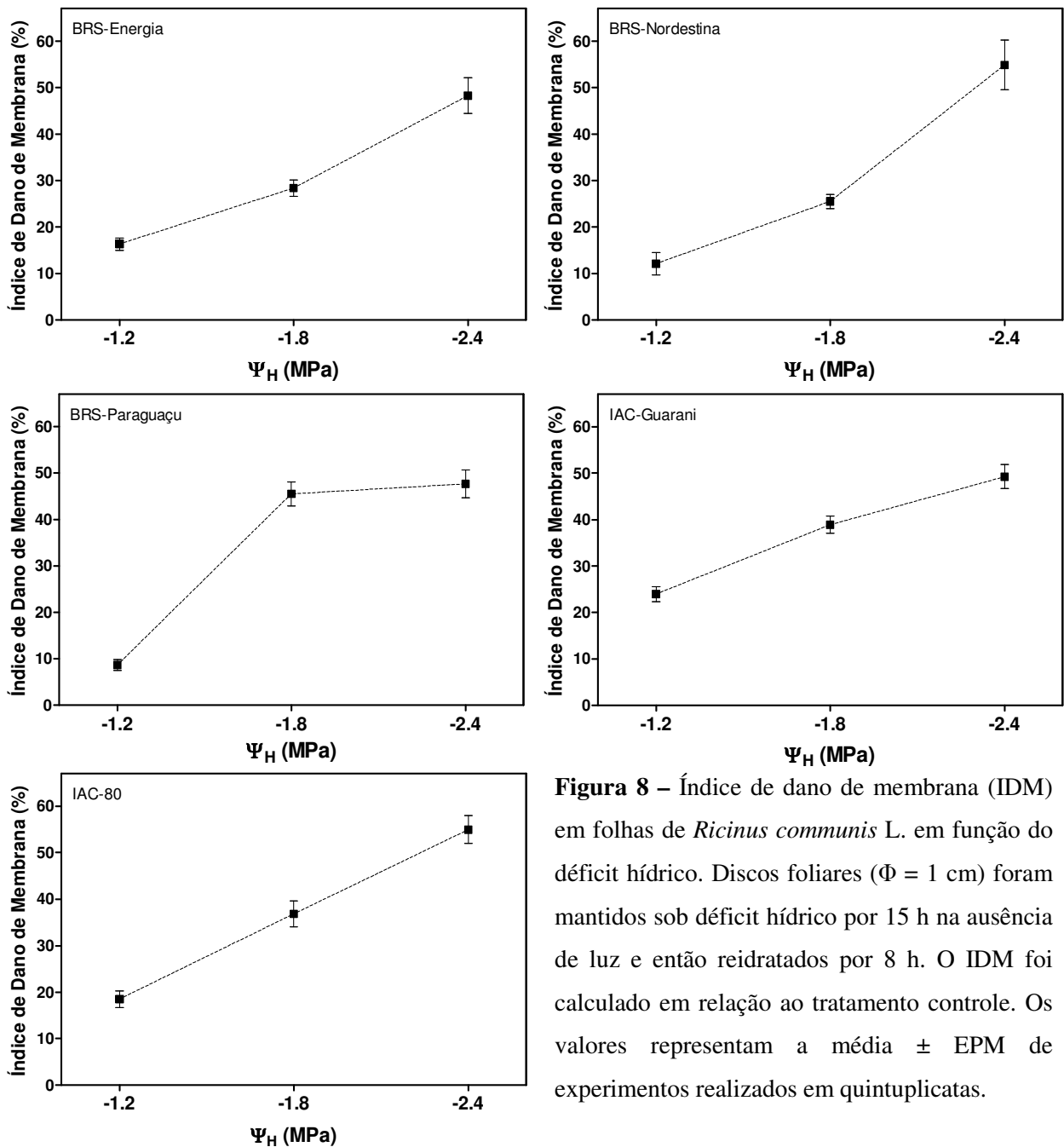
A distância entre as curvas de LE em cada tratamento mostra que, na maioria das cultivares, a LE ocorreu de forma gradativa à medida que o estresse aumentava. Para a cultivar BRS-Paraguaçu, a LE foi baixa no potencial de -1,2 MPa, aumentou cerca de 10 vezes (em relação ao controle) no potencial de -1,8 MPa e atingiu certa estabilidade no potencial de -2,4 MPa (Figura 7). O potencial de -2,4 MPa, considerado severo na avaliação de CHR pelo fato de os percentuais de recuperação não terem apresentado diferenças significativas entre as cultivares, aqui também apresentou a mesma característica, pois neste potencial todas as cultivares apresentaram LE superior a 50% após de 7,5 h de reidratação (Figura 7).

O índice de dano de membrana (IDM) aumentou gradualmente com o déficit hídrico na maioria das cultivares, apresentando comportamento quase linear para as cultivares BRS-Energia, BRS-Nordestina, IAC-Guarani e IAC-80 (Figura 8). O estresse hídrico moderado ( $\Psi_H = -1,2$  MPa) pouco afetou a membrana celular das cultivares estudadas. No  $\Psi_H = -1,2$  MPa, os discos foliares de BRS-Paraguaçu foram os menos afetados, apresentando um IDM em torno de 9% (Figura 8). Os IDMs para as cultivares BRS-Energia, BRS-Nordestina, IAC-Guarani e IAC-80 sob  $\Psi_H$  de -1,8 MPa foram de 28,4; 25,5; 38,9 e 36,8%, respectivamente (Figura 8). A cultivar BRS-Paraguaçu exibiu máximo IDM (45,5%) quando submetido a este mesmo grau de déficit hídrico (Figura

8). Condição mais drástica de déficit hídrico, representada pelo tratamento a um  $\Psi_H$  de -2,4 MPa, proporcionou um IDM em torno de 50% para todas as cultivares avaliadas.



**Figura 7** – Percentual de liberação de eletrólitos a partir de discos foliares de *Ricinus communis* L. sob diferentes graus de déficit hídrico. Discos foliares ( $\Phi = 1$  cm) foram tratados com soluções de PEG-6000 nos  $\Psi_H$  de 0 (○, controle), -1,2 (□), -1,8 (△) e -2,4 MPa (▽) por 15 h na ausência de luz. O material foi então reidratado de 0 a 24 h. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em quintuplicatas.



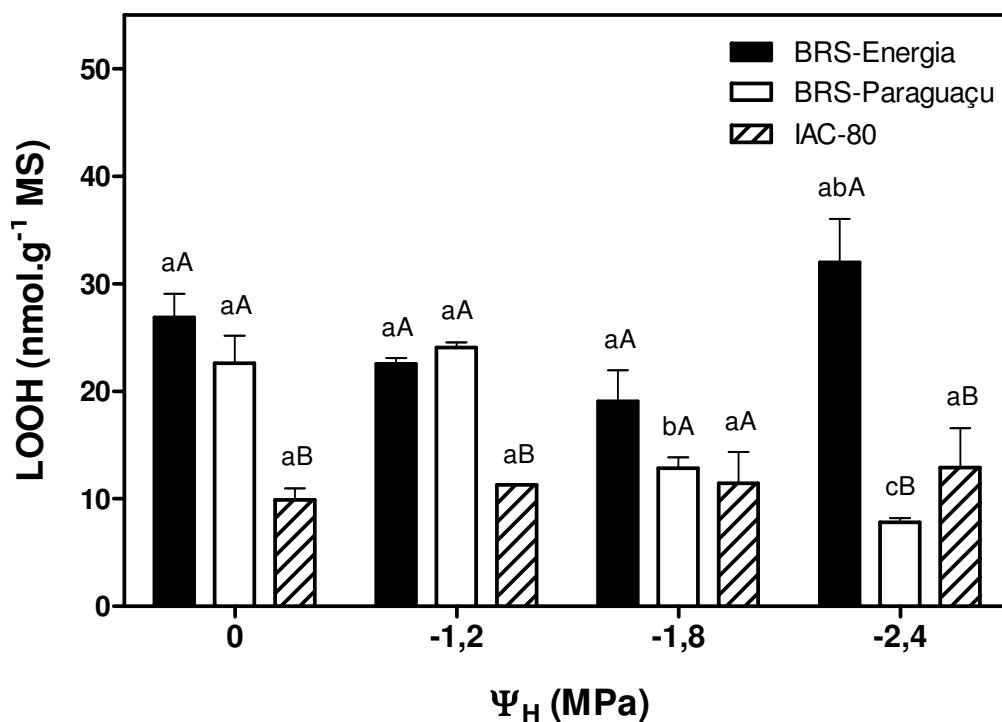
**Figura 8** – Índice de dano de membrana (IDM) em folhas de *Ricinus communis* L. em função do déficit hídrico. Discos foliares ( $\Phi = 1$  cm) foram mantidos sob déficit hídrico por 15 h na ausência de luz e então reidratados por 8 h. O IDM foi calculado em relação ao tratamento controle. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em quintuplicatas.

### 5.3. Análise dos efeitos do déficit hídrico sobre macromoléculas

#### 5.3.1. Peroxidação lipídica

O grau de peroxidação lipídica de discos foliares das cultivares BRS-Energia, BRS-Paraguaçu e IAC-80 sob déficit hídrico foi determinado e expresso em termos de número de mols de hidroperóxidos de lipídios (LOOH).g<sup>-1</sup> de massa seca.

Verificou-se que as cultivares BRS-Energia e BRS-Paraguaçu apresentaram graus semelhantes de peroxidação lipídica. A diferença entre essas duas cultivares só é marcante sob estresse severo ( $\Psi_H$  de -2,4 MPa), quando BRS-Paraguaçu exibiu 7,8 nmols de LOOH.g<sup>-1</sup> massa seca e BRS-Energia apresentou 31,9 nmols de LOOH.g<sup>-1</sup> massa seca (Figura 9). Ainda, o conteúdo de LOOH em discos foliares de BRS-Paraguaçu diminuiu de maneira significativa com o aumento da severidade do estresse (Figura 9). A cultivar IAC-80 mostrou-se a menos afetada pelo déficit hídrico no que se refere à formação de hidroperóxidos de lipídios. A formação de LOOH nas amostras controle e sob estresse variaram entre 10 e 12 nmols.g<sup>-1</sup> massa seca. Cabe ressaltar que a massa seca de discos foliares desta cultivar é aproximadamente 35% maior que a massa seca de discos foliares, de mesmo diâmetro, das cultivares BRS-Energia e BRS-Paraguaçu. Por isso, é necessário cautela ao se analisar tais resultados.

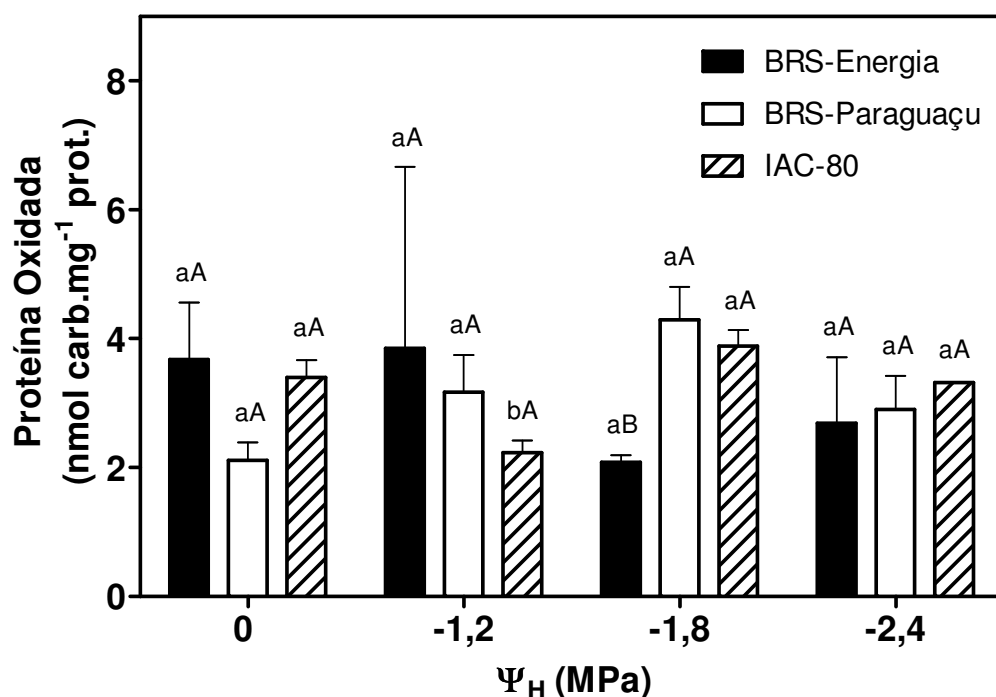


**Figura 9** – Quantificação de hidroperóxidos de lipídios formados em discos foliares sob déficit hídrico. Discos foliares ( $\Phi = 2$  cm) foram submetidos aos  $\Psi_H$  indicados por 15 h na ausência de luz. Após lavagem exaustiva com água desionizada, os materiais vegetais foram submetidos à análise do conteúdo de lipídios peroxidados (LOOH) utilizando o reagente FOX. Os valores representam a média de LOOH formado  $\pm$  EPM de experimento realizado triplicata. MS, massa seca. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos aplicados a uma mesma cultivar ( $P < 0,01$ ). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares em um referido tratamento ( $P < 0,05$ ).

### 5.3.2. Oxidação de proteínas

Os resultados da quantificação de proteínas solúveis oxidadas são apresentados na Figura 10. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao grau de oxidação de proteínas na interação entre cultivares e tratamentos (Figura 10). A cultivar BRS-Energia apresentou um grau de oxidação de proteínas significativamente menor (2,1 nmol carbonilas.mg<sup>-1</sup> proteína;  $P < 0,01$ ) que as demais cultivares quando submetido ao  $\Psi_H$  de -1,8 MPa. (Figura 10). Neste potencial hídrico, a cultivar BRS-Paraguaçu apresentou 4,3 nmol carbonilas.mg<sup>-1</sup> proteína enquanto que a cultivar IAC-80

apresentou 3,9 nmol carbonila.mg<sup>-1</sup>de proteína). Já na comparação entre tratamentos para uma mesma cultivar, verificou-se que, embora não houvesse diferença significativa nos valores, BRS-Paraguaçu apresentou uma tendência a elevar o grau de oxidação de proteínas até um  $\Psi_H$  tão baixo quanto -1,8 MPa (Figura 10). A única cultivar a apresentar diferenças significativas para os tratamentos ( $P < 0,01$ ) foi o IAC-80 cujo grau de oxidação protéica foi de 2,2 nmol carbonilas.mg<sup>-1</sup> proteína para um valor de  $\Psi_H$  igual a -1,2 MPa (Figura 10).



**Figura 10** – Quantificação de proteínas oxidadas em discos foliares de *Ricinus communis* L. sob déficit hídrico. Discos foliares ( $\Phi = 2$  cm) foram submetidos aos  $\Psi_H$  indicados por 15 h na ausência de luz. Após lavagem exaustiva com água desionizada, os materiais vegetais foram submetidos à análise do conteúdo de proteínas oxidadas utilizando o método da guanidina. Os valores representam a média de carbonilas formadas.mg<sup>-1</sup> de proteínas totais  $\pm$  EPM de experimento realizado triplicata. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos aplicados a uma mesma cultivar ( $P < 0,01$ ). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares em um referido tratamento ( $P < 0,01$ ).

## 6. Discussão

Neste trabalho foram realizados experimentos *ex-vivo* com várias cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) com o objetivo de se determinar, através de análises físico-químicas e bioquímicas, o grau de tolerância do tecido foliar dessas plantas ao déficit hídrico. Foi visada à análise de alguns parâmetros bioquímicos, comumente alterados em função de estresses. Adicionalmente, medidas da liberação celular de eletrólitos foram conduzidas para se determinar a ocorrência ou não de tolerância diferencial ao déficit hídrico de cinco cultivares de mamoneiras empregando técnicas inéditas para *Ricinus communis* L.

A mamoneira é uma espécie ainda muito pouco estudada quanto aos efeitos da deprivação de água. Os trabalhos sobre esta temática até então publicados concentram-se em análises em condições de campo. Neste contexto, enfoque é dado ao impacto ecofisiológico no que se refere à eficiência do uso de água, manejo de irrigação, fotossíntese, movimento estomático e crescimento e produção (Dai *et al.*, 1992; Vijaya-Kumar *et al.*, 1996 e 1999; Schurr *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2006; Barbour e Buckley, 2007; Barros-Jr. *et al.*, 2008; Miranda-Pinto *et al.*, 2008; Montenegro *et al.*, 2009). Os únicos trabalhos que relacionam parâmetros bioquímicos e moleculares tratam da expressão gênica de aquaporinas e de proteínas semelhantes à deidrinas (Han e Kermode, 1996; Eisenbarth e Weig, 2005).

Uma vez que o déficit hídrico é responsável por restringir o desenvolvimento e a produtividade, conhecer o status hídrico das plantas é fundamental para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos fisiológicos de resposta a este tipo de estresse (Hsiao, 1973). A literatura relata que reduções de potencial hídrico geralmente são acompanhadas por alterações no CHR (Hsiao, 1973). A redução no CHR apresentada pelas cinco cultivares à medida que o déficit hídrico se tornava mais severo



(Figura 4) corrobora os resultados obtidos para outras espécies vegetais (Zhao *et al.*, 2008; Seelig *et al.*, 2009). Segundo Hsiao (1973), a planta sofre um estresse suave quando seu CHR apresentar-se reduzido em cerca de 8 a 10% em relação ao CHR da mesma planta sob condições ideais de hidratação e demanda evaporativa leve. O estresse moderado refere-se às reduções do CHR entre 10 e 20% enquanto que o estresse severo é acompanhado de reduções no CHR superiores a 20%. Dessecação seria o estado em que a redução do CHR da planta supera os 50%.

Utilizando-se da classificação criada por Hsiao (1973), o potencial de -1,2 MPa foi considerado uma condição moderada de déficit hídrico uma vez que duas das cultivares estudadas (IAC-Guarani e IAC-80) apresentaram redução de 17,4 e 15,4% no seu CHR, respectivamente (Figura 5). O potencial de -1,8 MPa foi considerado crítico pelo fato de todas as cultivares terem apresentado redução no CHR superior a 30% (Figura 5). Já o potencial de -2,4 MPa foi considerado severo porque três das cinco cultivares (BRS-Energia, BRS-Paraguaçu e IAC-Guarani) recuperaram menos de 80% de seu CHR original (Figura 5).

Uma vez que a avaliação do CHR constitui um parâmetro confiável no entendimento de como o déficit hídrico está de fato afetando os processos fisiológicos das plantas, a capacidade de recuperação do CHR após o estresse pode ser um indicador de possíveis mecanismos de tolerância ou adaptação ao estresse (Selote e Khanna-Chopra, 2006). Os dados obtidos na avaliação do CHR durante os três níveis de déficit hídrico e posterior reidratação mostraram que as células de todas as cultivares recuperaram pelo menos 80% de seu CHR quando submetidos a potenciais hídricos tão baixos quanto -1,8 e 2,4 MPa (Figura 5). Outros estudos também relatam recuperação do CHR após um período de reidratação. Pérez-Pérez *et al.* (2007) observaram uma recuperação total do CHR quando plantas de *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* foram

expostas a um  $\Psi_H$  de -2,0 MPa e reidratadas por 8 dias. Selote e Khanna-Chopra (2006), por sua vez, mostraram uma recuperação total do CHR após 48 h de reidratação em plantas de trigo previamente privadas de irrigação. Gigon *et al.* (2004) relataram a recuperação de CHR em *Arabidopsis* a valores próximos do controle, 24 h após reidratação.

A determinação do CHR após os três níveis de estresse e posterior reidratação foi um dos critérios utilizados na classificação das cultivares de mamoneira quanto à tolerância ao déficit hídrico. O potencial que se mostrou mais efetivo para discriminar as cultivares foi o de -1,8 MPa, condição esta onde todas as cultivares sofreram redução de mais de 30% no CHR, seguida de uma recuperação do CHR superior a 80%. A recuperação inferior a 80% no  $\Psi_H$  de -2,4 MPa sugere a ocorrência de morte celular devido à severidade da deficiência de água.

A variação no CHR deve ser cuidadosamente avaliada uma vez que este parâmetro, por si só, não é suficiente para determinar o grau de tolerância das cultivares. Assim, se faz necessária a investigação de outros parâmetros físico-químicos e bioquímicos para que correlações mais precisas sejam obtidas (Selote e Khanna-Chopra, 2006; Pérez-Pérez *et al.*, 2007; Seelig *et al.*, 2009). Por esse motivo, também foram avaliadas a extensão da LE bem como a de dano de membrana.

Inúmeras variáveis podem interferir na determinação da LE, a citar, o tempo de lavagem das amostras antes da exposição ao PEG (Vasquez-Tello *et al.*, 1990), o número, tamanho e a forma dos segmentos vegetais, bem como a duração do tempo de reidratação (Prášil e Zámečník, 1998). Segundo Prášil e Zámečník (1998), o número de amostras não influencia significativamente a determinação da LE, enquanto que variações na LE são observadas em função do tamanho do disco foliar. Quanto menor o segmento, maior a condutividade relativa devido ao fato de que os eletrólitos têm mais

facilidade em difundir através do interior do tecido até alcançar a superfície do segmento. O diâmetro de disco foliar utilizado no presente estudo para a determinação da LE foi de 1 cm, medida esta previamente determinada como a mais adequada para a medida de condutividade elétrica (Prášil e Zámečník, 1998). Como a mamoneira é uma espécie em que ainda não se estudou a LE, um teste de determinação do tempo ótimo de lavagem do material vegetal foi empregado para evitar superestimções causadas por eletrólitos liberados em função do dano mecânico causado pela delimitação de área da amostra. O padrão de remoção da maioria dos eletrólitos a partir de discos foliares de mamoneiras foi semelhante àqueles obtidos em estudos com cultivares de trigo por Bajji *et al.* (2002), que também determinaram o intervalo de 15 min como o mais adequado para a imersão dos discos foliares em água.

A LE exibida pelas cinco cultivares de mamoneira (Figura 5) apresentou um perfil bifásico ao longo do tempo, uma observação similar à encontrada para outros sistemas biológicos vegetais (McKersie e Stinson, 1980; Senaratna e Mckersie, 1983; Tatteroo *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1997; Prášil e Zámečník, 1998; Bandurska, 2000; França *et al.*, 2000; Bajji *et al.*, 2002; Kocheva *et al.*, 2004; Kocheva *et al.*, 2005; Sayar *et al.*, 2008; Faisal e Anis, 2009). Durante as 3-4 h iniciais de reidratação houve um aumento praticamente linear da condutividade elétrica (Figura 5). Após 4 h a LE diminui até atingir a estabilidade em torno de 8 h pós-reidratação. Este comportamento cinético sugere a contribuição de processos distintos para liberação total de eletrólitos. Durante as primeiras horas de reidratação, os eletrólitos liberados seriam provenientes do espaço apoplástico e após este período de tempo, a liberação seria oriunda do citoplasma celular devido a um desmantelamento da plasmalema (McKersie e Stinson, 1980; Senaratna e McKersie, 1983; Vasquez-tello *et al.*, 1990). A LE constante após 8 h de reidratação compreende um melhor indicador da permeabilidade das membranas

visto que os eletrólitos provenientes do apoplasto não contribuiriam para superestimação dos resultados (McKersie e Stinson, 1983). Por esse motivo o tempo de incubação em água por 8 h foi considerado o ideal para a condução da análise de IDM.

O aumento no IDM em função do estresse (Figura 6) relacionou-se com as reduções no CHR observadas para a maioria das cultivares (Figura 5). Relações semelhantes entre IDM e CHR foram também observadas em plantas de cevada (Bandurska, 2000; Kocheva *et al.*, 2004). O estresse por desidratação causa um aumento na permeabilidade das membranas, que pode eventualmente dificultar o processo de recuperação dos tecidos após a tentativa de reidratação (Kocheva *et al.* 2004). Ainda, grandes perdas de água com baixos percentuais de recuperação correspondem a danos de membrana severos (Kocheva *et al.* 2004). Isso explica a relação observada entre CHR e IDM.

O conjunto de resultados obtidos (CHR, LE e IDM) possibilitou a determinação do grau de tolerância do tecido foliar das cultivares de mamoneira estudadas. A Tabela 1 resume a classificação específica das cultivares segundo cada parâmetro avaliado. Baseando-se nestes critérios aplicados às condições experimentais aqui apresentadas, conclui-se que os tecidos foliares das cultivares BRS-Energia e BRS-Nordestina são tolerantes ao déficit, as cultivares IAC-80 e IAC-Guarani apresentam tecidos foliares com tolerância intermediária e BRS-Paraguaçu é a cultivar com tecido foliar mais sensível.

Para fins de análise bioquímica, foram escolhidas as cultivares BRS-Energia, IAC-80 e BRS-Paraguaçu para avaliar o quanto o estresse ocasionado pelo déficit hídrico afetou lipídios poliinsaturados e proteínas solúveis.

É comum na literatura a apresentação do grau de peroxidação lipídica em termos de quantidade de LOOH por unidade de massa fresca (Sattler *et al.*, 2004). Devido à

natureza do estudo aqui apresentado, optou-se por expressar os valores de hidroperóxidos de lipídios em termos de massa seca (Martins *et al.*, 2008). A IAC-80 foi a cultivar que apresentou os menores níveis de hidroperóxidos de lipídios, valores estes que não variaram com a intensidade do estresse (Figura 9). Embora os valores de massa seca para discos foliares desta cultivar sejam 35% maiores que aqueles apresentados pela BRS-Energia ou BRS-Paraguaçu, ainda assim seus conteúdos de LOOH não foram menores. Resultados semelhantes foram obtidos por Simova-Stoilova *et al.* (2009) para plantas de trigo sob déficit hídrico. Esses autores observaram que os níveis mais baixos de peroxidação lipídica foram apresentados pela cultivar mais tolerante. Nenhuma variação significativa foi observada para os níveis de LOOH em amostras de BRS-Energia sob diferentes intensidades de déficit hídrico. Em contraste, a cultivar BRS-Paraguaçu apresentou redução nos níveis de LOOH em condições de estresse severo (Figura 9). Isso se deve possivelmente a um aumento da degradação de ácidos graxos polares em função do aumento do déficit hídrico. A diminuição da oferta de substrato (ácidos graxos poliinsaturados) contribuiria para uma diminuição na formação de hidroperóxidos de lípidios. É descrito na literatura que o déficit hídrico, além de afetar a estrutura e composição dos lipídios de membrana, induz a degradação de lipídios polares (Sahsah *et al.*, 1998; Gigon *et al.*, 2004). Gigon *et al.* (2004) relataram uma redução progressiva no conteúdo total de lipídios do estresse moderado para o estresse severo em *Arabidopsis thaliana*. Os autores também observaram que o conteúdo de lipídios em folhas extremamente desidratadas aumentou rapidamente após reidratação, caracterizando nessa espécie uma forte capacidade de tolerar o déficit hídrico. Fato semelhante também foi observado por Martins *et al.*, (2008) em estudos com plantas de feijão, porém, sem a recuperação completa das plantas após a reidratação. Os resultados obtidos para BRS-Paraguaçu quanto à capacidade de

recuperação pós-estresse (Figura 5) e quanto ao teor de hidroperóxidos de lipídios sob severo déficit hídrico (Figura 9) estão de acordo com as observações relatadas para *A. thaliana* e plantas de feijão (Gigon *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2008). É válido ressaltar que a síntese *de novo* de lipídios demanda gasto de energia, uma alternativa pouco viável quando a planta precisa reagir ao estresse. Assim, a preservação dos lipídios durante o estresse pode não ser alcançada, impossibilitando também a preservação da estrutura de membranas (Blokina *et al.*, 2003).

Quanto aos efeitos do déficit hídrico sobre proteínas solúveis, observa-se que BRS-Energia foi a cultivar que apresentou um menor grau de oxidação dessas macromoléculas quando submetido ao potencial de -1,8 MPa (Figura 10). Na comparação entre tratamentos em uma mesma cultivar, mais uma vez verificou-se uma tendência da cultivar BRS-Paraguaçu em elevar o grau de oxidação de proteínas com a redução do potencial hídrico até o  $\Psi_H$  de -1,8 MPa (Figura 10). A provável degradação de lipídios poliinsaturados verificada para essa cultivar neste mesmo potencial juntamente com estes resultados de oxidação de proteínas, sugere que o metabolismo foliar foi mais comprometido em BRS-Paraguaçu do que nas demais cultivares.

A única cultivar a apresentar diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) para os tratamentos foi IAC-80 (Figura 10;  $\Psi_H$  de -1,2 MPa). A redução dos níveis de proteínas oxidadas em condições moderadas de déficit hídrico em relação ao controle pode compreender uma tentativa da planta de controlar o *turnover* dessas macromoléculas (Voet e Voet, 2004). Além disso, a suavidade do estresse pode desencadear oxidações protéicas reversíveis, passíveis de sofrerem novamente redução (Møller e Kristensem, 2004). O fato de o  $\Psi_H$  de -2,4 MPa não induzir um aumento significativo na oxidação de proteínas (Figura 10) em nenhuma das três cultivares sugere que essas macromoléculas são menos sensíveis ao déficit hídrico que os lipídios para o sistema

biológico *Ricinus communis* L. Estes resultados são esperados visto que o alvo primário do déficit hídrico é a membrana celular e as proteínas avaliadas para a oxidação são as solúveis, presentes no citoplasma celular.

De uma maneira geral, os resultados obtidos neste estudo permitiram determinar que *Ricinus communis* L., cultivar BRS-Energia, é a que apresenta um tecido foliar mais tolerante ao déficit hídrico sob as condições experimentais estabelecidas apresentando características interessantes para programas de melhoramento genético. A cultivar IAC-80 apresenta tecido foliar categorizado como intermediário quanto ao grau de tolerância, enquanto que BRS-Paraguaçu é a cultivar que apresenta tecido foliar mais sensível. Tais resultados contradizem dados apresentados pela literatura que indicam a cultivar BRS-Paraguaçu como tolerante ao déficit hídrico em condições de campo. Nesse contexto, uma comparação dos resultados aqui apresentados com aqueles advindos de experimentos *ex-vivo* com raízes e experimentos *in vivo* se faz necessária para a indicação regional da cultivar adequada. Uma vez confirmada tal correlação evidencia-se que a utilização do modelo experimental aqui descrito, associado às análises empregadas, compreende uma ferramenta interessante para a triagem rápida de cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico.

**Tabela 2** – Classificação das cultivares de *Ricinus communis* L. quanto ao grau de tolerância ao déficit hídrico. Foram utilizados como critério de classificação o status hídrico (CHR), a liberação de eletrólitos (LE), o índice de dano de membrana (IDM), o conteúdo de hidroperóxidos de lipídios (LOOH), indicativo de peroxidação lipídica, e o nível de oxidação de proteínas.

<b>Parâmetro avaliado</b>	<b>Grau de tolerância</b>
Redução do conteúdo hídrico relativo (CHR)	BRS-Nordestina > BRS-Energia > BRS-Paraguaçu > IAC-80 = IAC-Guarani
Recuperação do CHR após reidratação	BRS-Nordestina = IAC-80 = BRS-Energia > BRS-Paraguaçu > IAC-Guarani
Liberação de eletrólitos (LE)	BRS-Energia > BRS-Nordestina > IAC-80 = IAC-Guarani > BRS-Paraguaçu
Índice de dano de membrana (IDM)	BRS-Energia > IAC-80 > BRS-Nordestina > IAC-Guarani > BRS-Paraguaçu
Peroxidação lipídica	IAC-80 < BRS-Energia < BRS-Paraguaçu
Oxidação de proteínas	BRS-Energia < IAC-80 < BRS-Paraguaçu



## 7. Referências bibliográficas

- Alonso, A.; Queiroz, C.G.S.; Magalhães, A. C. (1997). Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica*, L.) seedlings. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1323: 75-84.
- Apel, K.; Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399.
- Azevêdo, D. M. P. de; Lima, E. F. (2001). O Agronegócio da mamona no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão, 350pp.
- Azevêdo, D. M. P. de; Lima, E. F.; Batista, F. A. S. (1997). Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Brasil. Campina Grande: CNPA. 52pp.
- Bajji, M.; Kinet, J-M.; Lutts, S. (2002). The use of electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as water stress tolerance test in durum wheat. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 61-70.
- Bandurska, H. (2000). Does proline accumulated in leaves of water deficits stressed barley plants confine cell membrane injury? I. Free proline accumulation and membrane injury index in drought and osmotically stressed plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22 (4): 409-415.
- Barbour, M. M.; Buckley, T. N. (2007). The stomatal response to evaporative demand persists at night in *Ricinus communis* plants with high nocturnal conductance. *Plant, Cell and Environment*, 30 (6): 711-21.
- Barros-Jr., G. B.; Guerra, H. O. C.; Cavalcanti, M. L. F.; Lacerda, R. D. de (2008). Consumo de água e eficiência do uso para duas cultivares de mamona submetidas a

- estresse hídrico. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 12 (4): 350-355.
- Bartels, D.; Furini, A.; Ingram, J.; Salamini, F. (1996). Responses of plant to dehydration stress: a molecular analysis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20 (2): 111-118.
- Bernacchia, G.; Furini, A. (2004). Biochemical and molecular responses to water stress in resurrection plants. *Physiologia Plantarum*, 121: 175-181.
- Beltrão, N. E. M.; Vale, L. S.; Costa, S. G. (2006). Bioenergia, mamona e o biodiesel no Brasil e no mundo: atualidades e perspectivas. Campina Grande: EMBRAPA Algodão. Documentos, 158. 18p.
- Bewley, J. D. (1979). Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*, 30: 195-238.
- Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91: 179-194.
- Blum, A. (1996). Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20 (2): 135-148.
- Boyer, S. J. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218: 444-448.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2: 48-54.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

- Chen, Q.; Zhang, W. H.; Liu, Y. L. (1999). Effect of NaCl, glutathione and ascorbic acid on function of tonoplast vesicles isolated from barley leaves. *Journal of Plant Physiology*, 155: 685-690.
- Costa, J. M.; Ortuño, M. F.; Chaves, M. M. (2007). Déficit irrigation as a strategy to save water: Physiology and potential application to horticulture. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49 (10): 1421-1434.
- Crowe, J. H.; Hoekstra, F. A.; Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54: 570-599.
- Dai, Z.; Edwards, G. E.; Ku, M. S. B. (1992). Control of photosynthesis and stomatal conductance in *Ricinus communis* L. (castor bean) by leaf to air vapor pressure deficit. *Plant Physiology*, 99 (4): 1426-34.
- Dat, J.; Vandenabeele, S.; Vranová, E.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science*, 57: 779-795.
- DeLong, J. M.; Prange, R. K.; Hodges, D. M.; Forney, C. F.; Bishop, M. C.; Quillian, M. (2002). Using a modified ferrous oxidation-xilenol orange (FOX) assay for detection of lipid hydroperoxides in plant tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 248-254.
- Dexter, S. T.; Tottingham, W. E.; Graber, L. F. (1930). Preliminary results in measuring the hardness of plants. *Plant Physiology*, 5: 215-223.
- Dexter, S. T.; Tottingham, W. E.; Graber, L. F. (1932). Investigation of hardness of plants by measurement of electrical conductivity. *Plant Physiology*, 7: 63-78.

- Eisenbarth, D. A.; Weig, A. R. (2005). Dynamics of aquaporins and water relations during hypocotyls elongation in *Ricinus communis* L. seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 417 (56): 1831-1842.
- El Hafid, L. Phan Thi, A. T.; Zuily-Fodil, Y.; Vieira da Silva, J. B. (1989). Enzymatic breakdown of polar lipids in cotton leaves under water stress. I. Degradation of monogalactosyl-diacylglycerol. *Plant Physiology and Biochemistry*, 27: 495-502.
- Elstner, E. F. (1982). Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annual Review of Plant Physiology*, 33: 73-96.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (1997). Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no nordeste do Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão. Circular, 25. 52pp.
- Faisal, M.; Anis, M. (2009). Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during ex vitro establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. *Plant Cell, Tissues and Organ Culture*, 99: 125-132.
- FAO. (2008). FAO. FAOSTAT. Agriculture. Rome. (<http://faostat.fao.org/>).
- Farooq, S.; Azam, F.-E. (2001). Co-existence of salt and drought tolerance in *Triticeae*. *Hereditas*, 135 (2-3): 205-210.
- Fereres, E.; Evans, R. G. (2006). Irrigation of fruit trees and vines. *Irrigation Science*, 24: 55-57.
- Ferreira, G. B.; Beltrão, N. E. M.; Severino, L. S.; Gondim, T. M. S.; Pedrosa, M. B. (2006). A cultura da mamona no Cerrado: riscos e oportunidades. Campina Grande: EMBRAPA Algodão. Documentos, 149. 70p.

- Foyer, C. H.; Descouvières, P.; Kunert, K. J. (1994). Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell and Environment*, 17: 507-523.
- França, M. G. C.; Phan Thi, A. T.; Pimentel, C.; Rossiello, R. O. P.; Zuily-Fodil, Y.; Laffray, D. (2000). Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 43: 227-237.
- Freire, R. M. M. (2001). Ricinoquímica. In: Azevedo, D. M. P. de Lima, E. F. (e.). *O Agronegócio da no Brasil*. Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, cap. XIII, p.295-335.
- Garcia-Mata, C.; Lamattina, L. (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptative plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126: 1196-1204.
- Gay, C. A.; Gebicki, J. M. (2002). Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xilenol orange peroxide assay. *Analytical Biochemistry*, 304: 42-46.
- Germ, M.; Kreft, I.; Stibilj, V.; Urbanc-Berčič, O. (2007). Combined effects of selenium and drought on photosynthesis and mitochondrial respiration in potato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 162-167.
- Gigon, A.; Matos, A-R.; Laffray, D.; Zuily-Fodil, Y.; Phan Thi, A. T. (2004). Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of Botany*, 95: 345-351.

- Griffiths, G.; Leverentz, M.; Silkowski, H.; Gill, N.; Sánchez-Serrano, J. J. (2000). Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *Journal of Experimental Botany*, 349 (51): 1363-1370.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> Edition. Oxford Science Publications, New York, pp: 31-33; 92-94.
- Hammoudah, M. M.; Nir, S.; Bentz, J.; Mayhew, E.; Stewart, T. P.; Hui, S. W.; Kurland, R. J. (1981). Interactions of  $\text{La}^{3+}$  with phosphatidyl serine vesicles: binding, phase transition, leakage,  $^{31}\text{P}$ -NMR and fusion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 645: 102-114.
- Han, B.; Kermode, A. R. (1996). Dehydrin-like proteins in castor bean seeds and seedlings are differentially produced in response to ABA and water-deficit-related stresses. *Journal of Experimental Botany*, 47 (300):933-9.
- Heckenberger, U.; Roggatz, U.; Schurr, U. (1998). Effect of drought stress on the cytological status in *Ricinus communis*. *Journal of Experimental Botany*, 319 (49): 181-189.
- Hellmann, H.; Funk, D.; Rentsch, D.; Frommer, W. B. (2000). Hypersensitivity of *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiology*, 123: 779-790.
- Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. (1950). *The Water Culture Method for Growing Plants without Soils*. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p.
- Hodges, D. M.; DeLong, J. M.; Forney, C. F.; Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207: 604-611.

- Hsiao, T. C. (1973). Plant responses to water stress. *Annual Reviews of Plant Physiology and Molecular Biology*, 24: 519-570.
- Iljin, W. S. (1957). Drought resistance in plants and physiological process. *Annual Review of Plant Physiology*, 8: 257-254.
- Iturbe-Ormaetxe, I.; Escuredo, P.; Arrese-Igor, C.; Becana, M. (1998). Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or Paraquat. *Plant Physiology*, 116: 173-181.
- Jaleel, C. A.; Manivannan, P.; Sankar, B.; Kishorekumar, A.; Gopi, R.; Somasundaram, R.; Panneerselvan, R. (2007). Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60: 110-116.
- Jefferies, R. A. (1993). Responses of potato genotypes to drought. I. Expansion of individual leaves and osmotic adjustment. *Annals of Applied Biology*, 122: 93-104.
- Jensen, A. B.; Busk, P. K.; Figueras, M.; Albà, M. M.; Peracchia, G.; Messeguer, R.; Goday, A.; Pagès, M. (1996). Drought signal transduction in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20 (2): 105-110.
- Klebl, B. M., Ayoub, A. T., Pette, D. (1998). Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Letters*, 42, 381-384
- Knipp, G.; Honermeier, B. (2006). Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans. *Journal of Plant Physiology*, 163: 392-397.
- Ko, J.; Piccinni, G. (2009). Corn yield responses under crop evapotranspiration-based irrigation management. *Agricultural Water Managements*, 96: 799-808.

- Kocheva, K. V.; Geogiev, G. I.; Kochev, V. K. (2005). A diffusion approach to the electrolyte leakage from plant tissues. *Physiologia Plantarum*, 125: 1-9.
- Kocheva, K.; Lambrev, P.; Georgiev, G.; Goltsev, V.; Karabaliev, M. (2004). Evaluation of chlorophyll fluorescence and membrane injury in the leaves of barley cultivars under osmotic stress. *Bioelectrochemistry*, 63: 121-124.
- Lai, Q.; Bao, Z.; Zhu, Z.; Qian, Q.; Mao, B. (2007). Effects of osmotic stress on antioxidant enzymes activities in leaf discs of P<sub>SAG12</sub>-IPT modified gerbera. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8 (7): 458-464.
- Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C. N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A. G.; Ahn, B. W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186: 464-478.
- Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. Vol. II. Water, radiation, salt and other stresses. Academic Press, New York. ISBN 0 12-44 5502-6 (V.2).
- Li, G-W.; Zhang, M-H.; Cai, W-M.; Sun, W-N.; Su, W-A. (2008). Characterization of OsPIP2;7, a water channel protein in rice. *Plant Cell Physiology*, 49 (12): 1851-1858.
- Loggini, B.; Scartazza, A.; Brugnoli, E.; Navari-Izzo, F. (1999). Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology*, 119:1091-1099.
- Lynch, D. V.; Steponkus, P. L. (1989). Lyotropic phase behavior of unsaturated phosphatidylcholine species: relevance to the mechanism of plasma membrane destabilization and freezing injury. *Biochimica et Biophysica Acta*, 984: 267-272.



- Martins, R. R.; Oliveira, M. S. C.; Baccache, M. A.; de Paula, F. M. (2008). Effects of water deficit and rehydration on the polar lipid and membranes resistance leaves of *Phaseolus vulgaris* L. Cv. Pérola. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(2): 361-367.
- McKersie, B. D.; Stinson, R. H. (1980). Effect of dehydration on leakage and membrane structure in *Lotus corniculatus* L. seeds. *Plant Physiology*, 66: 316-320.
- Milani, M.; Miguel Jr., S.R.; Oliveira, E.C.S.; Nóbrega, M.B.M.; Costa, M.N. (2006). Caracterização Taxonômica de Acessos de Mamona (*Ricinus communis* L.) do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão. Campina Grande: EMBRAPA Algodão. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 67. 17p.
- Miranda-Pinto, C. D.; Fernandes Alves Távora, F. J.; Bezerra, M. A.; Medeiros Corrêa, M. C. D. (2008). Growth and root system distribution in peanut, sesame and castorbean under water deficit cycles. *Revista Ciencia Agronomica*, 39 (3): 429-36.
- Modolo, L. V. (2010). Effective plant protection weapons against pathogens require NO bullets. In: S. Hayat; M. Mori; J. Pichtel; A. Ahmad. (Orgs.). *Nitric Oxide in Plant Physiology*. Berlin: Wiley-Vch, pp. 103-111.
- Mohamed, M. F.; Tawfik, A. A. (2006). Dehydration-induced alterations in growth and osmotic potential of callus from six tepary bean lines varying in drought resistance. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 87: 255-262.
- Money, N. P. (1989). Osmotic Pressure of Aqueous Polyethylene Glycols. Relationship between Molecular Weight and Vapor Pressure Deficit. *Plant Physiology*, 91: 766-769.
- Monneveux, P.; Belhassen, E. (1996). The diversity of drought adaptation in the wide. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20 (2): 85-92.

- Montenegro, S. G.; Montenegro, A.; Ragab, R. (2009). Improving agricultural water management in the semi-arid region of Brazil: Experimental and modelling study. *Irrigation Science*:1-16.
- Morgan, J. M. (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35: 299-319.
- Møller, I. M.; Kristensen, B. K. (2004). Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical and Photobiological Science*, 3: 730-735.
- Mullet, J. E.; Whitsitt, M. S. (1996). Plant cellular responses to water deficit. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20 (2): 119-124.
- Nyochembeng, L. M.; Beyl, C. A.; Pacumbaba, R. P. (2007). Peroxidase activity, isozyme patterns and electrolyte leakage in roots of cocoyam infected with *Pythium myriotylum*. *Journal of Phytopathology*, 155: 454-461.
- Pérez-Pérez, J. G.; Syvertsen, J. P.; Botía, P.; García-Sánchez, F. (2007). Leaf water relations and net gas exchange responses of salinized carrizo citrange seedlings during drought stress and recovery. *Annals of Botany*, 100: 335-345.
- Pimentel, C.; Sarr, B.; Diouf, O.; Abboud, A. C. de S.; Roy-Macauley, H. (2002). Tolerância protoplasmática foliar à seca em dois genótipos de caupi cultivados em campo. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, 22 (1): 7-14.
- Pinto, M. C.; Tejada, A.; Duque, A. L.; Macías, P. (2007). Determination of lipoxygenase activity in plant extracts using a modified ferrous oxidation–xylenol orange assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5956-5959.
- Prášil, I.; Zámečník, J. (1998). The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury. I. Influence of leakage time, segment number, size and

- shape in a sample on evaluation of the degree of injury. *Environmental and Experimental Botany*, 40: 1-10.
- Quarrie, S.A. (1996). New molecular tools to improve the efficiency of breeding for increased drought resistance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20 (2): 167-178.
- Reddy, A. R.; Chaitanya, K. V.; Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161: 1189-1202.
- Reznick, A. Z.; Packer, L. (1994). Oxidative damage proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233: 357-363.
- Sahsah, Y.; Campos, P.; Gareil, M.; Zuily-Fodil, Y.; Pham-Thi, A. T. (1998). Enzymatic degradation of polar lipids in *Vigna unguiculata* leaves and influence of drought stress. *Physiologia Plantarum*, 104: 577-586.
- Sattler, S. E.; Gilliland, L. U.; Magallanes-Lundback, M.; Pollard, M.; DellaPenna, D. (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *The Plant Cell*, 16: 1419-1432.
- Sayar, R.; Khemira, H.; Kameli, A.; Mosbahi, M. (2008). Physiological tests as predictive appreciation for drought tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Agronomy Research*, 6 (1): 79-90.
- Schurr, U.; Heckenberger, U.; Herdel, K.; Walter, A.; Feil, R. (2000). Leaf development in *Ricinus communis* during drought stress: dynamics of growth process, of cellular structures and of sink-source transition. *Journal of Experimental Botany*, 350 (51): 1515-1529.
- Seelig, H-D.; Hoehn, A.; Stodieck, L. S.; Klaus, D. M.; Adams, W. W. III; Emery, W. J. (2009). Plant water parameters and the remote sensing  $R_{1300}/R_{1450}$  leaf water index:

- controlled condition dynamics during the development of water deficits stress. *Irrigation Science*, 27: 357-365.
- Selote, D. S.; Khanna-Chopra, R. (2006). Drought acclimation confers oxidative stress tolerance by inducing co-ordinated antioxidant defense at cellular and subcellular level in leaves of wheat seedlings. *Physiologia Plantarum*, 127: 494-506.
- Senaratna, T.; McKersie, B. D. (1983). Characterization of solute efflux from dehydration injured soybean (*Glycine max* L. Merr) seeds. *Plant Physiology*, 72: 911-914.
- Serrano, R.; Montesinos, C. (2003). Molecular bases of desiccation tolerance in plant cells and potential applications in food dehydration. *Food Science and Technology International*, 9: 157-161.
- Sharma, P.; Dubey, R. S. (2005). Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 46: 209-221.
- Silva, E. N.; Silveira, J. A. G.; Rodrigues, C. R. F.; Lima, C. S.; Viégas, R. A. (2009). Contribuição de solutos orgânicos e inorgânicos no ajustamento osmótico de pinhão-mansão submetido à salinidade. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44 (5): 437-445.
- Silveira, J. A. G.; Araújo, S. A. M.; Lima, J. P. M. S.; Viégas, R. A. (2009). Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. *Environmental and Experimental Botany*, 66: 1-8.
- Silveira, J. A. G.; Viégas, R. A.; Rocha, I. M. A.; Moreira, A. C. O. M.; Moreira, R. A.; Oliveira, J. T. A. (2003). Proline accumulation and glutamine synthetase activity are

- increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160: 115-123.
- Simova-Stoilova, L.; Demirevska, K.; Petrova, T.; Tsenov, N.; Feller, U. (2009). Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long-term field drought. *Journal of Plant Growth Regulation*, 58: 107-117.
- Stevanović, B.; Šinžar, J.; Glišić, O. (1997). Electrolyte leakage differences between poikilohydrous and homoiohydrous species of *Gesneriaceae*. *Biologia Plantarum*, 40 (2): 299-303.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. 4<sup>th</sup> edition. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, 757 p.
- Tardieu, F. (1996). Drought perception by plants: Do cells of droughted plants experience water stress? *Journal of Plant Growth Regulation*, 20 (2): 93-104.
- Tatteroo, F. A. A.; de Bruijn, A. Y.; Henselmans, R. N. M.; Wolkers, W. F.; van Aelst, A. C.; Hoekstra, F. A. (1996). Characterization of membrane properties in desiccation-tolerant and -intolerant carrot somatic embryos. *Plant Physiology*, 111: 403-412.
- Teixeira, J.; Pereira, S. (2007). High salinity and drought act on an organ-dependent manner on potato glutamine synthetase expression and accumulation. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 121-126.
- Vartanin, N. (1996). Mutants as tools to understand cellular and molecular drought tolerance mechanisms. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20 (2): 125-134.
- Vasquez-Tello, A.; Zuily-Fodil, Y.; Phan Thi, A. T.; Vieira da Silva, J. B. (1990). Electrolyte and Pi leakage and soluble sugar content as physiological test for

- screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *Journal of Experimental Botany*, 41: 827-832.
- Veljovic-Jvanovic, S.; Kukavica, B.; Navari-Izzo, F. (2008). Characterization of polyphenol oxidase changes induced by desiccation of *Ramonda serbica* leaves. *Physiologia Plantarum*, 132: 407-416.
- Vijaya Kumar, P.; Ramakrishna, Y. S.; Ramana Rao, B. V.; Khandgonda, I. R.; Victor, U. S.; Srivastava, N. N.; Rao G. G. S. N. (1999). Assessment of plant-extractable soil water in castor beans (*Ricinus communis* L.) using infrared thermometry. *Agricultural Water Management*, 39 (1): 69-83.
- Vijaya Kumar P, Srivastava NN, Victor US, Gangadhar Rao D, Subba Rao AVM, Ramakrishna YS, Ramana Rao BV. (1996). Radiation and water use efficiencies of rainfed castor beans (*Ricinus communis* L.) in relation to different weather parameters. *Agriculture for Meteorology*, 81 (3-4): 241-53.
- Voet, D.; Voet, J. (2004). *Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> edition. Wiley: Pennsylvania, USA, 1616 p.
- Wang, J. Z.; Cui, L. J.; Wang, Y. (2009). Growth, lipid peroxidation and photosynthesis in two tall fescue cultivars differing in heat tolerance. *Biologia Plantarum*, 53 (2): 237-242.
- Watkinson, J. I.; Hendricks, L.; Soison, A. A.; Vasquez-Robinet, C.; Stromberg, V.; Heat, L. S.; Schuler, M.; Bohnert, H. J.; Bonerbale, M.; Grene, M. (2006). Accessions of *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* show differences in photosynthetic recovery after drought stress as reflected in gene expression profiles. *Plant Science*, 171: 745-758.
- Weatherley, P. E. (1950). Studies in water relation of cotton plants. I. The measurement of water deficits in leaves. *New Phytologist*, 49: 81-97.

- Zgallai, H.; Stepp, K.; Lemeur, R. (2006). Effects of different levels of water stress on leaf water potential, stomatal resistance, protein and chlorophyll content and certain anti-oxidative enzymes in tomato plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48 (6): 679-685.
- Zhao, L.; Liu, F.; Xu, W.; Di, C.; Zhou, S.; Xue, Y.; Yu, J.; Su, Z. (2009). Increased expression of OsSPX1 enhances cold/subfreezing tolerance in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal*, 7: 550-561.
- Zhao, Z.; Cai, Y.; Fu, M.; Bai, Z. (2008). Responses of the soils of different land use types to drought: Eco-physiological characteristics of plants grown on the soils by pot experiment. *Ecological Engineering*, 34: 215-222.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b>	Imagens representativas de plantas de <i>Ricinus communis</i> L., objetos deste estudo.....	21
<b>Figura 2</b>	Modelo da reação de formação de hidroperóxidos de lipídios (LOOH) em células vegetais.....	27
<b>Figura 3</b>	Espectro de absorção de 2,4-dinitrofenilhidrazona-proteína obtido de discos foliares de <i>Ricinus communis</i> L., cultivar IAC-80.....	30
<b>Figura 4</b>	Conteúdo hídrico relativo (CHR) de folhas de <i>Ricinus communis</i> L. como função de diferentes níveis de déficit hídrico.....	33
<b>Figura 5</b>	Percentual de recuperação de discos foliares de <i>Ricinus communis</i> L. em função da reidratação após a imposição do estresse hídrico.....	35
<b>Figura 6</b>	Tempo ótimo de imersão dos discos foliares de <i>Ricinus communis</i> L em água.....	36
<b>Figura 7</b>	Percentual de liberação de eletrólitos a partir de discos foliares de <i>Ricinus communis</i> L. sob diferentes graus de déficit hídrico.....	38
<b>Figura 8</b>	Índice de dano de membrana (IDM) em folhas de <i>Ricinus communis</i> L. em função do déficit hídrico.....	39



<b>Figura 9</b>	Quantificação de hidroperóxidos de lipídios formados em discos foliares sob déficit hídrico.....	41
<b>Figura 10</b>	Quantificação de proteínas oxidadas em discos foliares de <i>Ricinus communis</i> L. sob déficit hídrico.....	42
<b>Tabela 1</b>	Classificação das cultivares de <i>Ricinus communis</i> L. quanto ao grau de tolerância ao déficit hídrico.....	51

## *CURRICULUM VITAE*

### **Formação**

2008 – 2010 **Mestrado em Biologia Vegetal**

**Área:** Fisiologia Vegetal

**Título da Dissertação:** Avaliação *ex vivo* da tolerância de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) ao déficit hídrico.

**Instituição:** Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

2003 – 2006 **Licenciatura em Ciências Biológicas**

**Instituição:** Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ)

### **Publicações**

2010 **Faria, A. P.**; de Fátima, Â., Benedito, V. A.; Modolo, L. V. Plant cell culture and transgenic plants: the goldmines for the production of compounds of pharmacological interest. In.: G. Brahmachari, Ed., Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry. World Scientific Publishing (**No prelo**).

**Categoria:** Capítulo de livro

2009 **Faria, A. P.**; Souza, A. C.; Barbosa, C. K. R.; França, M. G. C. Avaliação da tolerância protoplasmática em genótipos de mamoneira submetidas ao déficit hídrico induzido por PEG. In: XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Fortaleza-CE. Anais do XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal.

**Categoria:** Resumo em anais de congresso

2008 Campos, W. G.; **Faria, A. P.**; Oliveira, M. G. A.; Santos, H. L.

Induced response against herbivory by chemical information transfer between plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 20: 257-266.

**Categoria:** Artigo

2004 **Faria, A. P.;** Campos, A. C. A. L.; Matosinhos, F. C. L.; Lima, L. C.; Lima, P. G.; Oliveira, J. E. Z. Plantas Medicinais no Bairro Matosinhos - São João del-Rei - MG. In: X Seminário Mineiro de Plantas Medicinais, São João del-Rei - MG.

Anais do X Seminário Mineiro de Palntas Medicinais.

**Categoria:** Resumo em anais de congresso

#### **Apresentação de trabalhos**

2009 **Faria, A. P.;** Souza, A. C.; Barbosa, C. K. R.; França, M. G. C. Avaliação da tolerância protoplasmática em genótipos de mamoneira submetidos ao déficit hídrico induzido por PEG.

**Categoria:** Apresentação oral

2006 **Faria, A. P.;** Ferreira, A. B.; Santos, A. C. P. Levantamento Florístico no Sítio Pasto do Coqueiro, Município de Coronel Xavier Chaves.

**Categoria:** Apresentação oral

2004 **Faria, A. P.;** Campos, A. C. A. L.; Matosinhos, F. C. L.; Lima, L. C.; Lima, P. G.; Oliveira, J. E. Z. Plantas Medicinais no Bairro Matosinhos - São João del-Rei - MG.

**Categoria:** Apresentação de pôster

## **Palestras e cursos ministrados**

2009 **Faria A. P.** Entendendo as respostas das plantas ao déficit hídrico.

Tópicos em Botânica – Disciplina do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

**Categoria:** Aula ministrada

2005 **Faria, A. P.;** Neves, M. C.; Spessoto, A. M.; Costa, M. L. Parque Estadual de Ibitipoca: geoambientes.

2ª SECINAT – Semana de Estudos em Ciências Naturais – Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ)

**Categoria:** Palestra ministrada

2005 **Faria, A. P.;** Neves, M. C.; Pinto, M. C.; Prado, A. S.; Costa, M. L. Dispersão de Poluentes na Água.

2ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia – Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ)

**Categoria:** Oficina ministrada