

Indução de estresse hídrico por meio de PEG8000 no azevém anual cv. BRS Ponteio¹

Lucas Prudêncio Eiterer², Jemima Gonçalves Pinto da Fonseca³, Isis Soares e Silva⁴, Maria de Paula Pimenta⁵, Júlio César José da Silva⁶, Andréa Mittelmann⁷, Leônidas Paixão Passos^{7,8}

¹Agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG. Parte do projeto "02.14.03.014.00.00 – Melhoramento de gramíneas forrageiras de clima temperado: azevém e capim-lanudo", liderado por Andréa Mittelmann

²Graduando em Ciências Biológicas – CES/JF, Juiz de Fora, MG. E-mail: lucaseiterer@gmail.com

³Doutoranda em Química – UFJF, Juiz de Fora, MG. E-mail: jemimagoncalves@yahoo.com.br

⁴Graduanda em Agroecologia – IF Sudeste MG, Rio Pomba, MG. E-mail: isis.silva@colaborador.embrapa.br

⁵Graduanda em Agronomia – UFV, Viçosa, MG. E-mail: maria.pimenta@colaborador.embrapa.br

⁶Professor – Departamento de Química, UFJF. E-mail: julio.silva@ufjf.edu.br

⁷Pesquisador – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. E-mail: andrea.mittelmann@embrapa.br

⁸Orientador – E-mail: leonidas.passos@embrapa.br

Resumo: Um estudo foi conduzido para avaliar as influências do estresse hídrico induzido pela adição de PEG8000 ao substrato de crescimento sobre indicadores fisiológicos plântulas de azevém anual provenientes de lotes de sementes com longo tempo de armazenagem, em ensaios simultâneos em duas câmaras de crescimento. Os resultados demonstraram que o azevém anual apresenta elevada sensibilidade ao choque osmótico, destacando-se as reduções na área foliar e no peso fresco de folhas. A estratégia de condução de ensaios pareados simultâneos produziu resultados similares somente nas plantas mantidas sem choque osmótico. Ao se induzir o déficit hídrico, as variações de resultados entre as duas câmaras de crescimento foram expressivas. Portanto, esse comportamento necessita ser futuramente investigado com mais detalhe, para viabilização de procedimentos rápidos de triagem fisiológica em sequência usando sementes provenientes do mesmo lote.

Palavras-chave: Azevém Anual, BRS Ponteio, choque osmótico, ensaios pareados, PEG 8000

Induction of water stress through PEG8000 in cultivar BRS Ponteio

Abstract: A study was carried out to evaluate the influences of PEG8000-induced osmotic shock on physiological indicators of Italian ryegrass seedlings grown in simultaneous trials using two growth chambers. Long term stored seeds were used in order to initially check the prospect of extended use of seed lots in sequential screening essays. Plants exhibited a remarkable sensitivity to osmotic stress, and the most conspicuous depressing effects were reductions in leaf area and leaf fresh weight. The strategy of conducting simultaneous paired trials using distinct biotrons produced similar results only when plants were kept unstressed. As osmotic stress was applied, responses were rather distinct between growth chambers. Therefore, such behavior needs to be further investigated with more detail towards making sequential rapid physiological screening procedures feasible when single seed lots are to be used.

Keywords: Italian ryegrass, BRS Ponteio, osmotic shock, paired trials, PEG 8000

Introdução

Em vista da importância do azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) para a bovinocultura no sul do Brasil, a Embrapa lançou, em 2007, a cv. BRS Ponteio, caracterizada pela qualidade superior e aumento de 7% na produtividade, em comparação aos materiais de cultivo tradicional. (EMBRAPA, 2017).

A expansão do cultivo desta cultivar em condições menos favoráveis requer, contudo, a avaliação de respostas a estresses bióticos de maior ocorrência na região Sudeste brasileira, destacando-se a seca. A ocorrência de déficit hídrico em plantas cultivadas afeta o crescimento e o desenvolvimento das culturas em todo o mundo. (SANTOS, 1998). O estudo deste fenômeno é extremamente relevante para a adaptação dos genótipos a condições adversas.

Uma alternativa eficaz para a verificação precoce dos efeitos do déficit hídrico sobre espécies vegetais é a indução de choque osmótico em condições controladas utilizando compostos de elevada massa molecular (PASSOS, 2003), como o polietileno glicol 8.000 (PEG 8000). Especificamente com relação ao azevém anual e outras gramíneas forrageiras, há interesse em verificar a variação da resposta ao estresse osmótico em ensaios pareados simultâneos em câmaras de crescimento distintas e usando lotes de sementes com longo período de armazenagem. O intuito é viabilizar a condução de ensaios de triagem fisiológica rápida sequencialmente, mesmo com limitação de espaço, abreviando assim a duração de abordagens tais como a seleção genotípica e reduzindo custos. Essa é uma estratégia constitui inédita.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos do choque osmótico sobre a fisiologia de plântulas de azevém anual provenientes de lotes de sementes com longo tempo de armazenagem em ensaios simultâneos em duas câmaras de crescimento distintas.

Material e Métodos

Sementes de azevém anual (*Lolium multiflorum*) cv. BRS Ponteio com 12 ou mais meses de armazenagem foram germinadas em vermiculita e, após seleção visual para padronização dos estandes, transferidas para recipientes *PGA* (*pot growing assembly*) e cultivadas em duas câmaras de crescimento Biotronette Mark III (LAB-LINE, Melrose Park, IL, EUA), respectivamente identificadas como experimento B1 e experimento B2. Em ambas, as condições de crescimento foram padronizadas durante todo o ensaio (25 ± 4 °C D/N, $65 \pm 5\%$ U.R., 14 h de fotoperíodo e $200 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ de radiação fotossinteticamente ativa - PAR, medida com sensor LI-190S e medidor quântico LI-189, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA).

Foram estudados os seguintes tratamentos, aplicados simultaneamente em B1 e B2 quando as plântulas atingiram 30 dias de cultivo após a transferência: 0 (testemunha), 100 e 200 g.L^{-1} de PEG 8000 adicionados à fração de solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ força presente em cada *PGA*. Esses tratamentos representaram potenciais osmóticos de, respectivamente, -0,04, -0,15 e -0,51 MPa. As soluções foram substituídas semanalmente e seus respectivos volumes ajustados com água destilada, sempre que necessário.

Após 30 dias, as plântulas foram colhidas e realizadas as seguintes avaliações: comprimento da parte aérea (CPA), área foliar, teor de clorofila SPAD, peso fresco da folha (PFF), peso seco da folha (PSF) e peso seco da raiz (PSR).

Os dois experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente ao acaso, com três tratamentos (níveis de PEG8000), sete repetições e sete plantas por parcela. Os dados foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene) e submetidos à ANOVA. Os contrastes entre médias foram comparados pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram feitas com o aplicativo Action.

Resultados e Discussão

No experimento B1 (Tabela 1), verifica-se que, em geral, níveis crescentes de PEG8000 inibiram a grandeza dos indicadores fisiológicos avaliados, praticamente em proporção à concentração aplicada desse agente osmótico. Notadamente, a área foliar (AF) e o peso fresco da folha (PFF) apresentaram grande sensibilidade ao choque osmótico, exibindo imediata e expressiva redução no menor nível do estresse. Já o teor de clorofila, o comprimento da parte aérea (CPA) e o peso seco da raiz (PSR) mostraram maior sensibilidade ao estresse mais intenso.

No experimento B2 (Tabela 2) foram verificadas respostas parcialmente diferenciadas, quando comparadas ao experimento B1. Ressalte-se, todavia, que os valores das variáveis na ausência de estresse foram muito similares, sugerindo que não houve influência ao se cultivar as plantas simultaneamente em *biotrons* diferentes sem a indução do estresse abiótico.

Tabela 1. Indicadores fisiológicos do azevém anual cv. BRS Ponteio em resposta a níveis crescentes de choque osmótico induzido pela adição de PEG8000 ao substrato de crescimento no experimento B1¹.

PEG 8000 (g.L^{-1})	CPA (cm)	AF (cm^2)	Clorofila (SPAD)	PFF (g)	PSF (g)	PSR (g)
0	41,21 A	157,76 A	78,07 A	7,995 A	0,8844 A	0,1302 AB
100	39,43 A	78,23 B	59,67 A	2,742 B	0,5897 B	0,1601 A
200	32,36 B	49,07 C	36,86 B	1,241 C	0,4373 C	0,1139 B

¹Para cada variável, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Verifica-se ainda que, no experimento B2, as variáveis CPA, AF, clorofila, peso fresco da folha (PFF) e PSF apresentaram redução significativa já no nível mais baixo de estresse, sem sofrer, contudo, reduções adicionais quando o nível de estresse foi intensificado. Na variável peso seco da raiz (PSR), os valores obtidos não foram estatisticamente diferentes. A variável AF, todavia, não apresentou resultados positivos nos testes de normalidade e homocedasticidade.

Tabela 2. Indicadores fisiológicos do azevém anual cv. BRS Ponteio em resposta a níveis crescentes de choque osmótico induzido pela adição de PEG8000 ao substrato de crescimento no experimento B2¹.

PEG 8000 (g.L^{-1})	CPA (cm)	AF ² (cm^2)	Clorofila (SPAD)	PFF (g)	PSF (g)	PSR (g)
0	43,93 A	138,03	81,93 A	7,370 A	0,8525 A	0,1151 A
100	34,71 B	65,53	55,77 B	2,174 B	0,5139 B	0,1631 A
200	33,86 B	61,81	59,66 B	1,327 B	0,4283 B	0,1572 A

¹Para cada variável, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

²Resultados negativos nos testes de normalidade e homocedasticidade.

Comparando-se as respostas obtidas em ambos os *biotrons*, observa-se que a sensibilidade do desenvolvimento da espécie pode ser alterada bruscamente em razão de condições adversas, tais como o choque osmótico. No experimento B1, a maioria das variáveis relacionadas à produtividade de matéria sofreu uma diminuição significativa apenas no tratamento PEG 200, sugerindo que o déficit hídrico pode ter ocorrido de forma gradual, o que pode ter promovido uma melhor adaptação na resposta fisiológica. Este comportamento não foi verificado no experimento B2, no qual essas reduções ocorreram logo com PEG 100, estabilizando-se no PEG 200, podendo indicar que na ocorrência rápida de déficit hídrico, os mecanismos fisiológicos são severamente afetados. Em relação ao crescimento radicular, houve também uma diferença de comportamento entre os dois *biotrons*. No experimento B1 o peso seco da raiz (PSR) apresentou comportamento similar às demais variáveis, no entanto, no experimento B2, não houve diferença na resposta para o aumento da concentração de PEG 8000, indicando que o crescimento radicular não é afetado em grandeza detectável, conforme verificado em outras variáveis.

Parte das variações encontradas, destacando-se a deficiência em homocedasticidade e normalidade dos dados de AF no experimento B2, pode ter sido afetada pela idade das sementes, em vista do longo período de armazenagem. Além da queda da taxa de germinação e maior heterogeneidade dos estandes obtidos, a simples seleção fenotípica para estudo de plantas uniformes pode não significar ausência de anormalidades metabólicas que possam se expressar diferencialmente em condições de estresse. A posição física das duas câmaras de crescimento pode ter influenciado as manipulações, pela questão de diferentes, embora mínimos, gradientes de temperatura, umidade relativa, intensidade da irradiação ou composição do espectro luminoso. Por último, ressalte-se que a cv. BRS Ponteio foi criada em procedimentos com pressão de seleção para outras variáveis quantitativas que não o déficit hídrico, podendo haver nos materiais substancial variabilidade genética individual para a resposta ao choque osmótico. Não obstante, verifica-se que o azevém anual apresenta tolerância relativamente baixa ao estresse hídrico.

Conclusões

Os resultados evidenciam que o azevém anual cv. BRS Ponteio apresenta grande sensibilidade ao estresse hídrico conforme induzido pelo choque osmótico.

Os efeitos ocorrem com estresse brando e se refletem imediatamente na perda de água pelas folhas e inibição da área foliar. Esses dois indicadores, portanto, apresentam-se como promissores para uso como indicadores fisiológicos em ensaios de triagem rápida para fins de seleção genotípica ou mesmo para a definição de fatores e cofatores em procedimentos operacionais inerentes à agricultura de precisão.

A estratégia de ensaios pareados em diferentes aparatos e uso de sementes com longo tempo de armazenagem necessita ser estudada com maior detalhe, para verificação das causas das variações encontradas no presente estudo.

Agradecimentos

Agradecemos a Sebastião de Castro Evaristo pelo auxílio nos trabalhos.

Referências

EMBRAPA, Gado de Leite . **Azevém - BRS Ponteio**. Disponível em: www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/610/azevem---brs-ponteio. Acessado em: 06 fev. 2017.

PASSOS, L. P. Effects of osmotic stress on the growth of etiolated mung bean seedlings. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v.189, p.105-112, 2003.

SANTOS, R.F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.2, n.3, p.287-294, 1998.