



EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DE SEMENTES DE GIRASSOL COM H₂O₂ NO CRESCIMENTO E NA RELAÇÃO K⁺/Na⁺ SOB ESTRESSE SALINO

P. C. C. Silva¹, H. Gondim Filho¹, C. R. R. Silva², C. B. de Abreu³, H. R. Gheyi⁴,
A. D. Azevedo Neto⁴

RESUMO – Alguns estudos mostram que o pré-tratamento de H₂O₂ em baixa concentração pode aliviar os efeitos negativos causados pelo estresse salino, aumentando a atividade do sistema antioxidante e solutos orgânicos. Assim, este estudo visou identificar as concentrações e os períodos de exposição necessários como pré-tratamento de H₂O₂ para reduzir os efeitos negativos do estresse salino. Este ensaio foi realizado em esquema fatorial 5 × 3 + 2, com quatro repetições. Foram testados cinco níveis de peróxido de hidrogênio (0,1; 1; 10; 100; 1000 mM H₂O₂) combinados com diferentes períodos de exposição de pré-tratamento (12; 24; 36 horas) juntamente com dois tratamentos adicionais: controle 1 (água deionizada); controle salino (NaCl 100 mM). Após o pré-tratamento com H₂O₂, as mudas foram colocadas em ambientes contendo solução nutritiva salina (100 mM NaCl, exceto o controle). No final do experimento, (35 dias) as plântulas sob tratamento controle salino apresentaram maior redução no crescimento da planta em relação ao controle. Plântulas provenientes das sementes pré-tratadas com H₂O₂ apresentaram maior acúmulo de massa em relação ao controle salino. Os efeitos mais representativos foram verificados com a aplicação dos níveis mais elevados e período de exposição de 12 horas e nos níveis baixos com 36 e 24 horas de exposição.

PALAVRAS-CHAVE: Peróxido de hidrogênio, aclimação, salinidade.

EFFECT OF PRETREATMENT WITH H₂O₂ APPLIED IN SUNFLOWER SEEDS IN GROWTH AND K⁺/Na⁺ RATIO UNDER SALT STRESS

ABSTRACT – Some studies show that H₂O₂ pretreatment in low concentration can alleviate the negative effects caused by salt stress by increasing the activity of the antioxidant system and organic solutes. Thus, this study aimed to identify the concentrations and exposure periods

¹ Estudante de Doutorado e Mestrado, PPGEA/NEAS/UFRB, Cruz das Almas, BA. Email:petter.ufrb@gmail.com

² Estudante de Pós-Graduação em Gestão de Segurança Alimentar, SENAC/SP Cruz das Almas, BA

³ Estudante de Doutorado, PPGCA/UFRB, Cruz das Almas, BA

⁴ Prof. Doutor, PPGEA/NEAS/UFRB, Cruz das Almas, BA

required for H₂O₂ pretreatment to reduce the negative effects of salt stress. The assay was carried out in factorial arrangement 5 × 3 + 2, with four replications. Five levels of hydrogen peroxide as pretreatments of the seeds (0.1; 1; 10; 100; 1000 mM H₂O₂) were tested combined with three different exposure periods (12; 24; 36 hours) along with two additional treatments: control (deionized water); control salt (100 mM NaCl). After the pretreatment with H₂O₂, the seedlings of sunflower were placed in environments containing saline nutrient solution (100 mM NaCl, except control). At the end of the experiment (35 days) the seedlings in salt control showed stronger reduction in plant growth compared to control. Seedlings of pretreated seeds with H₂O₂ showed greater mass accumulation compared to the salt control treatment. The most representative effects were verified with the application of the higher levels and period of exposure of 12 hours and in the low levels with 36 and 24 hours of exposure.

KEYWORD: Hydrogen peroxide, acclimatation, salinity.

INTRODUÇÃO

No Brasil, solos salinos e sódicos ocorrem no Rio Grande do Sul, Pantanal Mato-Grossense e, predominantemente, na região semiárida do Nordeste. Estes solos afetados por sais são em torno de 25% das terras agricultáveis (Ribeiro et al., 2003). O processo natural de salinização do solo envolve o acúmulo de íons, principalmente, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻ e HCO₃⁻, nas camadas agricultáveis (Oliveira, 1997). No caso dos solos sódicos, o excesso do Na⁺ provoca alterações nas propriedades físicas do solo, reduzindo a flocculação das argilas e a estabilidade dos agregados, provocando como consequências, reduções na porosidade e capacidade de retenção de água (Lima, 1997).

Para a produção de culturas agrícolas principalmente na região nordeste do Brasil é fundamental o conhecimento sobre os efeitos que os sais provocam nas plantas.

O excesso de sais no solo pode provocar diversos efeitos negativos sobre o crescimento das plantas. O solo contém normalmente uma concentração diluída de sais, porém quando em excesso, a presença destes sais provoca uma redução no potencial osmótico da solução do solo, proporcionando um decréscimo da energia livre da água, trazendo como consequência, uma diminuição do influxo de água pelas raízes e do fluxo transpiratório das plantas (Salisbury e Ross, 1992). Em condições salinas a absorção de Na⁺ pela raiz é mediada por canais transportadores de K⁺. Com isso, altas concentrações de Na⁺ podem promover um aumento na absorção de Na⁺ e consequentemente reduzir a absorção de K⁺ (Rodrigues et al., 2013).

O peróxido de hidrogênio é uma molécula bem conhecida pelo seu efeito tóxico. Entretanto, atualmente diversas funções do H₂O₂ na fisiologia e bioquímica das plantas têm sido descritas nos artigos científicos (Huang et al., 2005).

As plantas e os demais organismos aeróbios têm evoluído diferentes sistemas antioxidantes e as EROs são utilizados como moléculas de sinalização em processos celulares básicos. A partir deste contexto, é muito interessante para analisar o H₂O₂ como a mais estável ERO pode regular aclimação, processo de defesa e desenvolvimento das plantas (Ślesak et al., 2007).

Está bem documentado que o H₂O₂ pode atuar com papel central nas respostas de estresses bióticos e abióticos. Ele tem sido visto como “hormônio-mestre” que controla uma variedade de respostas ao estresse e ajustamento fisiológico (Ślesak et al., 2007). Os mecanismos de ajustamento osmótico e a acumulação de solutos compatíveis em plantas têm chamado a atenção durante muitos anos. Vários trabalhos têm discutido a osmoproteção em plantas e sua potencial aplicação na tolerância à salinidade (Silveira et al, 2010).

Assim, este estudo visou identificar as concentrações associada aos períodos de exposição ao pré-tratamento de H₂O₂ necessários para reduzir os efeitos negativos do estresse salino em plantas de girassol.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado sob em casa de vegetação no campus da Universidade do Recôncavo da Bahia. Foram utilizadas sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.), genótipo AG 975, escolhido através de resultados de experimentos anteriores devido sua sensibilidade à presença de salinidade.

As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri (20 sementes/placa), acondicionadas em folhas de papel filtro contendo o volume (10 mL) da solução de peróxido de hidrogênio, nas concentrações (0,1; 1; 10; 100; 1000 mM de H₂O₂). As placas contendo as sementes foram mantidas em câmara de germinação do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand), com temperaturas de 25°C. As sementes de girassol foram mantidas sob os pré-tratamentos com H₂O₂ em diferentes intervalos de tempo (12; 24; 36 horas).

Juntamente com os pré-tratamentos com H₂O₂ foram inseridos 2 tratamentos adicionais: controle (Ausência de NaCl) e controle salino (Presença de 100 mM NaCl), o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições.

Após a etapa de germinação das sementes obtidas (2 dias), as plântulas foram transferidas para copos descartáveis contendo areia lavada, por pelo menos 7 dias e irrigadas com a presença de 100 mM de NaCl, com exceção do tratamento controle mantido na ausência de sal. Posteriormente as plantas foram levadas para vasos de polietileno com capacidade para 15 L, contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) e 100 mM de NaCl (exceto no controle), aeradas por 15 minutos com auxílio de compressor de ar a cada 3 horas.

As plantas permaneceram nestas condições por um período de 45 dias e ao final deste período foram realizadas leituras da altura das plantas com a utilização de régua graduada e logo após as plantas foram coletadas para determinação da massa fresca das folhas. Posteriormente foram particionadas em folhas caule e raízes e levadas à estufa de circulação forçada de ar (65°C) até obterem massa constante. As massas foram determinadas utilizando balança analítica de precisão.

Foram também determinados os teores de Na⁺ e K⁺ nas folhas a partir da extração em banho-maria a 100°C por 1 hora com água deionizada, e a leitura dos extratos foram realizadas em fotômetro de chama.

Todos os dados foram submetidos a ANOVA e ao teste F (5%). Para as variáveis significativas foi realizado o teste de médias Skott Knott (5%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra as variáveis de crescimento e rendimento de massa seca das plantas de girassol nas condições experimentais analisadas. A altura das plantas respondeu de forma significativa aos tratamentos aplicados. Quando comparados com o tratamento controle (ausência de sal) o controle salino teve uma redução próxima de 56 % na altura das plantas. Entretanto, mesmo na presença do sal as plantas que receberam pré-tratamento com peróxido de hidrogênio nas doses 10 mM H₂O₂ (12 horas) e 0,1 mM H₂O₂ (36 horas) conseguiram reduzir em quase 15 % as perdas provocadas pela salinidade nas plantas de girassol. Os demais pré-tratamentos também apresentaram resultados positivos na redução dos efeitos negativos da salinidade na altura das plantas, porém com menor intensidade, com exceção dos tratamentos 0,1 e 1 mM H₂O₂ (12 horas), 0,1 mM H₂O₂ (24 horas) e 100 mM H₂O₂ independente do período de exposição. Para esta variável ela não apresentou nenhuma diferença significativa do tratamento controle salino.

O estresse salino nas plantas não pré-tratadas promoveu uma redução de aproximadamente 78, 74, 77, 71 e 74 % para as variáveis massa fresca das folhas, massa seca

das folhas, do caule, da raiz e total, respectivamente, quando comparadas ao tratamento controle (ausência de sal). Já quando as sementes foram pré-tratadas com H₂O₂, em alguns tratamentos houve uma redução do efeito negativo do sal de aproximadamente 20, 14, 8, 21 e 12 %, para as mesmas variáveis citadas acima na sua respectiva ordem.

O estresse salino promoveu um aumento significativo no teor de Na⁺ nas folhas do girassol, foi verificado que o pré-tratamento com H₂O₂ não promoveu uma redução significativa nos teores de Na⁺, indicando possivelmente uma rota de compartimentalização do sódio nas plantas pré-tratadas, reduzindo significativamente o potencial tóxico do sódio no crescimento vegetal. Em contrapartida, os dados obtidos também demonstraram que as plantas pré-tratadas com H₂O₂ obtiveram uma melhor capacidade de acumular K⁺ nas folhas quando comparadas com o tratamento controle salino. Este por sua vez, reduziu o teor de K⁺ pela metade quando comparadas com o controle (ausência de sal).

O estresse salino reduziu o crescimento e a produtividade das plantas, alterando diversos processos fisiológicos e bioquímicos, como a fotossíntese, a homeostase iônica e as atividades enzimáticas (Gomes-Filho et al. 2008, Hasegawa 2013).

Diversos autores verificaram que o pré-tratamento com H₂O₂ diminuiu os efeitos deletérios do estresse salino no crescimento de plantas. Os dados obtidos por Azevedo Neto et al. (2005) sugerem que o H₂O₂ adicionado à solução de crescimento por 2 dias antes das adições de sal, levou a um processo de aclimação do estresse salino. Em trabalho com pulverização de H₂O₂ a aplicação de 1 mM proporcionou aumento da eficiência fotossintética, das relações hídricas e reduziu os conteúdos de aminoácidos livre, prolina e açúcares solúveis (Semida, 2016).

Em trabalho com trigo Wahid et al., (2007) verificaram que a manutenção da integridade da membrana e a expressão de proteínas de estresse foram aumentadas com o pré-tratamento de sementes com H₂O₂ em condições de salinidade. Tais respostas podem ter um valor considerável no desenvolvimento de um método melhorado para proteção de culturas contra estresses ambientais.

CONCLUSÕES

Nossos resultados indicaram que a aplicação prévia de um estresse oxidativo (aplicação de H₂O₂) leve pode ser responsável por reduzir os efeitos deletérios da salinidade no crescimento das plantas.

Foi constatado que de modo geral, quando realizada uma análise percentual em relação ao controle, as melhores respostas para todas as variáveis foram obtidas nas concentrações mais elevadas com menos tempo de exposição 10 e 100 mM de H₂O₂ por 12 horas, e nas concentrações menos elevadas com maior período de exposição aos pré-tratamentos 0,1 mM H₂O₂ por 36 horas e 1 mM H₂O₂ por 24 horas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO-NETO, A. D. PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E.; MEDEIROS J. V. R. et al. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 10, p. 1114-1122, 2005.

GOMES-FILHO, E.; LIMA, C. R. F. M. COSTA, J. H.; SILVA, A. C. M.; LIMA, M. G. S.; LACERDA, C. F.; PRISCO, J. T. Cowpea ribonuclease: properties and effect of NaCl-salinity on its activation during seed germination and seedling establishment. **Plant Cell Reports**, v.27 p.147-157, 2008.

HASEGAWA, P. M.; Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.92, p.19-31, 2013.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**, Berkeley, Circ. n.347, p.1-37, 1950.

HUANG, C.; HE, W.; GUO, J.; CHANG, X.; SU, P.; ZHANG, L. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient Arabidopsis mutant. **Journal of Experimental Botany**, v.5, p.3041-3049, 2005.

LIMA, L. A. Efeitos dos sais no solo e na planta. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 1997, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande, 1997. 35p.

OLIVEIRA, M. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais. 1997. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 1997, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande, 1997. 35p.

RIBEIRO, M. R.; FREIRE, F. J.; MONTENEGRO, A. A. A. Solos halomórficos no Brasil: Ocorrência, gênese, classificação, uso e manejo sustentável. In: CURI, N.; MARQUES, J. J.; GUILHERME, L. R. G.; LIMA, J. M.; LOPES, A. S; ALVAREZ, V. H. (eds.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.3, p.165-20, 2003.

RODRIGUES, C. R. F.; SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. High K⁺ supply avoids Na⁺ toxicity and improves photosynthesis by allowing favorable K⁺:Na⁺ ratios through the inhibition of Na⁺ uptake and transport to the shoots of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, p.157-164, 2013.

SALISBURY, F. B; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4^a Ed. California: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682 p.

SEMIDA, W. M. Hydrogen Peroxide Alleviates Salt-Stress in Two Onion (*Allium cepa* L .) Cultivars. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environtal Science, v. 16, p. 294-301, 2016.

SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N.; VIEGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura**. Fortaleza, INCT Sal, 2010. p. 162-180.

ŚLESIAK, I.; LIBIK, M.; KARPINSKA, B.; KARPINSKI, S.; MISZALSKI, Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. **Acta Biochimica Polonica**, v.54, p.39-50, 2007.

WAHID, A.; PERVEEN, M.; GELANI, S.; BASRA, S. M. A. Pretreatment of seed with H₂O₂ improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.283-294, 2007.

Tabela 1. Efeito do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio na altura, massa fresca da folha (MFF), massa seca das folhas (MSF), massa seca do caule (MSC) massa seca das raízes (MSR) e massa seca total (MST) de plantas de girassol cultivadas em condições de salinidade, Cruz das Almas, 2017.

Tratamentos	Altura (cm)	MFF	MSF	MSC	MSR	MST
Control	16,38 a	30,40 a	4,12 a	2,61 a	2,49 a	9,22 a
0,1 mM H ₂ O ₂ (12 hours)	7,13 d	8,20 d	1,20 d	0,67 c	0,73 d	2,60 d
1 mM H ₂ O ₂ (12 hours)	7,88 d	8,86 d	1,31 c	0,72 b	0,81 d	2,83 c
10 mM H ₂ O ₂ (12 hours)	9,38 b	11,28 b	1,45 b	0,82 b	1,25 b	3,52 b
100 mM H ₂ O ₂ (12 hours)	8,00 d	10,16 c	1,53 b	0,74 b	1,21 b	3,47 b
0,1 mM H ₂ O ₂ (24 hours)	8,13 d	10,11 c	1,48 b	0,70 c	0,81 d	2,99 c
1 mM H ₂ O ₂ (24 hours)	8,25 c	11,81 b	1,68 b	0,82 b	1,01 c	3,51 b
10 mM H ₂ O ₂ (24 hours)	8,38 c	10,15 c	1,46 b	0,79 b	1,03 c	3,28 b
100 mM H ₂ O ₂ (24 hours)	7,38 d	11,23 b	1,21 d	0,61 c	0,83 d	2,65 c
0,1 mM H ₂ O ₂ (36 hours)	9,50 b	9,86 c	1,53 b	0,78 b	1,06 c	3,37 b
1 mM H ₂ O ₂ (36 hours)	8,63 c	11,98 b	1,52 b	0,79 b	0,98 c	3,29 b
10 mM H ₂ O ₂ (36 hours)	8,63 c	10,53 c	1,34 c	0,74 b	1,03 c	3,10 b
100 mM H ₂ O ₂ (36 hours)	7,50 d	9,26 d	1,16 d	0,62 c	0,73 d	2,50 c
Salt Control	7,13 d	6,78 e	1,10 d	0,62 c	0,73 d	2,45 d
CV(%)	8,14	8,96	7,06	9,31	9,12	5,75

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de médias de Scott Knott a 5% probabilidade.

Tabela 1. Efeito do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio nos teores de Na⁺ e K⁺ das folhas de girassol cultivados em condições de salinidade, Cruz das Almas, 2017.

Tratamentos	Teor de Na ⁺	Teor de K ⁺	Relação K ⁺ /Na ⁺
	-----mmol kg ⁻¹ -----		
Control	54,38 a	844,03 a	15,93 a
0,1 mM H ₂ O ₂ (12 hours)	222,94 b	530,72 c	2,41 b
1 mM H ₂ O ₂ (12 hours)	206,63 b	540,31 c	2,65 b
10 mM H ₂ O ₂ (12 hours)	217,50 b	591,46 b	2,77 b
100 mM H ₂ O ₂ (12 hours)	217,50 b	591,46 b	2,74 b
0,1 mM H ₂ O ₂ (24 hours)	244,68 b	530,72 c	2,18 b
1 mM H ₂ O ₂ (24 hours)	244,68 b	527,52 c	2,16 b
10 mM H ₂ O ₂ (24 hours)	217,50 b	565,89 c	2,62 b
100 mM H ₂ O ₂ (24 hours)	228,37 b	565,89 c	2,48 b
0,1 mM H ₂ O ₂ (36 hours)	222,94 b	607,45 b	2,76 b
1 mM H ₂ O ₂ (36 hours)	239,24 b	645,82 b	2,70 b
10 mM H ₂ O ₂ (36 hours)	228,37 b	453,99 d	1,99 b
100 mM H ₂ O ₂ (36 hours)	271,87 c	447,59 d	1,67 b
Salt Control	282,74 c	444,40 d	1,58 b
CV(%)	9,63	6,92	22,32

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de médias de Scott Knott a 5% probabilidade.