

METIL JASMONATO EXÓGENO AUMENTA A TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE MILHO À SALINIDADE¹

D. G. Coelho², E. Gomes-Filho³, H. H. Carvalho³, J. T. Prisco³, L. S. Lopes⁴, R. S. Miranda⁵

RESUMO: Várias moléculas podem ativar mecanismos de defesa que permitem às plantas resistir ao estresse salino, como cálcio, etileno, ácido abscísico, peróxido de hidrogênio e, recentemente, estudos têm associado o jasmonato às rotas de sinalização em condições de salinidade. Nossa hipótese foi que o *priming* com metil-jasmonato (MeJA) atenua os efeitos nocivos do sal em plantas de milho. Plântulas com 12 dias de idade, mantidas em solução nutritiva, foram submetidas à aspersão foliar, com solução contendo 15 mL de MeJA a 0 (controle negativo), 50, 100, 150 e 200 μM e Tween 20 a 0,05%. Após dois dias, as plantas foram submetidas ao estresse salino com NaCl a 100 mM. Um grupo de plantas sem *priming* foi mantido em solução nutritiva sem NaCl (controle). As colheitas foram feitas após 10 dias de imposição de salinidade. Em geral, o estresse salino diminuiu severamente a área foliar (AF), a massa fresca (MF) e a massa seca (MS) das plantas de todos os tratamentos. Por outro lado, sob estresse salino, as plantas de milho tratadas com 150 μM mostraram valores de AF, MF e MS mais elevados do que os das plantas de outros tratamentos. Concluindo, o *priming* com MeJA aumenta a tolerância à salinidade em plantas de milho.

PALAVRAS-CHAVE: priming, estresse salino, *Zea mays*.

EXOGENOUS METHYL JASMONATE IMPROVES SALT TOLERANCE IN MAIZE PLANTS

SUMMARY: Several molecules may activate defense mechanisms enabling plants to withstand saline stress, such as calcium, ethylene, abscisic acid, hydrogen peroxide and recently, studies have associated jasmonate with signaling pathways in salinity conditions. Our working hypothesis was that priming with methyl jasmonate (MeJA) mitigates the salt harmful

¹ Parte do trabalho de dissertação do primeiro autor.

² Mestrando, Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, UFC, CEP 60455-760, Fortaleza, CE.
Email: danielcoelho.ea@gmail.com.

³ Professor Doutor, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza, CE.

⁴ Doutorando, DBBM, UFC, Fortaleza - CE.

⁵ Doutor, Pesquisador PNPd, DBBM, UFC, Fortaleza, CE.

effects in maize plants. Twelve-day-old seedlings kept in nutrient solution were submitted to foliar spraying with solution containing 15 mL of MeJA at 0 (negative control), 50, 100, 150 and 200 μM and Tween 20 at 0.05%. After two days, the plants were subjected to salt stress with 100 mM NaCl. A group of not-primed plants was maintained in nutrient solution without NaCl (control). Harvests were done after 10 days of salinity imposition. In general, salt stress severely decreased the leaf area (LA) and fresh (FM) and dry mass (DM) of plants from all treatments. Nonetheless, MeJA priming alleviates the salinity deleterious effects. Under salt stress, 150 μM -primed maize plants showed values of LA, FM and DM higher than those of plants from other treatments. In conclusion, MeJA priming enhances tolerance to salinity in maize plants.

KEYWORDS: priming, salinity, *Zea mays*.

INTRODUÇÃO

A salinidade afeta negativamente os principais processos metabólicos das plantas, como a germinação, a fotossíntese, as relações hídricas, o balanço nutricional e, por consequência, o crescimento e a produtividade de inúmeras culturas (Alencar et al., 2015; Gomes-Filho et al., 2008; Miranda et al., 2016). Os efeitos negativos da salinidade se devem a dois fatores principais: o osmótico e o iônico. O primeiro ocorre porque a alta concentração de sais reduz o gradiente de potencial hídrico entre a planta e a solução do substrato, dificultando a entrada de água nas células. O segundo ocorre devido à toxicidade específica de íons, principalmente Na^+ e Cl^- , que, em excesso, perturbam os processos metabólicos, causando desbalanço nutricional e alterando relação K^+/Na^+ nas células (Parida & Das, 2005).

Os estudos sobre os mecanismos de defesa das plantas à salinidade destacam a importância do papel de sinalização celular dos hormônios ou reguladores de crescimento, tais como o ácido abscísico (ABA), o etileno (ET) e o ácido salicílico; do íon cálcio (Ca^{2+}) e das cascatas de reações das MAP quinases (MAPK), bem como as desenvolvidas por certas espécies reativas de oxigênio (EROs), como o H_2O_2 (Fahad et al., 2015).

Mais recentemente, tem sido estudado o papel do jasmonato (JA) nas rotas de sinalização (Wasternack & Hause, 2013). Alguns estudos apontam para o envolvimento do jasmonato no aumento da atividade de enzimas antioxidantes, o que poderia auxiliar na redução dos danos causados pelos mais variados estresses (Jiang et al., 2016; Salimi et al., 2016). Além disso, Ding et al. (2016) verificaram que a atividade da lipoxigenase3 (LOX3), uma enzima envolvida na

síntese de JA teve sua atividade induzida pelo estresse salino e que o mutante *lox3*, deficiente nessa enzima, apresentou hipersensibilidade à condição de salinidade. Isso evidenciou a associação entre o jasmonato e a tolerância à salinidade. Entretanto, ainda são controversos os processos desencadeados por meio da sinalização via jasmonato, bem como sua aplicabilidade exógena para mitigar os efeitos deletérios do estresse salino.

O milho é uma cultura de grande importância no mundo para a alimentação humana e animal e na indústria, considerado uma *commoditie* agrícola. Azevedo Neto et al. (2004) verificaram redução em torno de 35% para a área foliar e 40% para a massa seca de diferentes genótipos de milho submetidos a 100 mM de NaCl. Dessa forma, o estresse salino pode constituir um fator alarmante e comprometer substancialmente o estabelecimento e a produtividade dessa cultura.

Diante disso, estudos utilizando aplicação exógena (*priming*) de jasmonato em plantas de milho tornam-se relevantes, no sentido de possibilitar o desenvolvimento de uma alternativa prática para atenuar os efeitos da salinidade em campo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a aplicação foliar de metil-jasmonato, em diferentes dosagens, na aclimação de plantas de milho ao estresse salino.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na Casa de Vegetação e no Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará. As sementes de milho utilizadas foram da variedade BRS 5011, suscetível ao estresse salino (Azevedo Neto & Tabosa, 2000), adquiridas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), unidade Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

Após desinfestação por 5 min em hipoclorito de sódio a 0,7%, as sementes foram colocadas em rolos de papel germitest, os quais foram embebidos em água destilada (proporção de 2,5 vezes o peso do papel) e colocados em câmara BOD (30°C e 12 horas de fotoperíodo). Após sete dias da semeadura (DAS), as plântulas foram selecionadas por uniformidade e transferidas para bacias (dez plântulas por bacia) de 10 L contendo solução nutritiva Clark, onde permaneceram por cinco dias para um período de aclimação. Decorrido esse tempo, as plântulas foram novamente selecionadas pelo critério de uniformidade e transferidas para vasos de 5 L (uma planta por vaso) contendo solução nutritiva de Clark.

Os tratamentos com metil-jasmonato (MeJA) foram aplicados 12 DAS. Nessa ocasião, as folhas das plantas foram aspergidas com 15 mL de MeJA a 0 (controle negativo), 50, 100, 150

e 200 μM , contendo Tween 20 a 0,05%. Esse procedimento foi repetido após 24 horas. Decorridos dois dias da aplicação do MeJA, as plantas foram submetidas ao tratamento com NaCl a 100 mM, o qual foi aplicado de forma parcelada (50 mM por dia), com o intuito de evitar o choque osmótico. Um grupo de plantas sem MeJA foi mantido em solução nutritiva sem NaCl (controle). A solução nutritiva foi trocada a cada três dias e o pH foi monitorado diariamente, sendo mantido próximo a 6,0.

As análises foram realizadas após dez dias da aplicação dos tratamentos salinos. Foram avaliados: a área foliar (AF), determinada com um integrador de área foliar (LI-3100 Area meter, Li-Cor., Inc, Lincoln, Nebraska, USA); as massas frescas das raízes (MFR) e da parte aérea (MFPA); as massas secas das raízes (MSR) e da parte aérea (MSPA), sendo, para isso, o material seco em estufa com circulação de forçada de ar, a 60 °C, até obtenção de peso constante. De posse dos dados de MFPA, MFR, MSPA e MSR foram calculados os parâmetros de massa fresca total (MFT) e massa seca total (MST).

Os experimentos foram conduzidos utilizando um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema monofatorial (0, 50, 100, 150 e 200 μM , na presença de NaCl), mais um controle (ausência de NaCl), com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando houve diferença significativa, foi feita análise de regressão a 5% de probabilidade, testando a significância e o ajuste de modelos polinomiais e as médias foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Nos casos em que não houve significância e/ou ajuste dos modelos, optou-se por apresentar as médias e erros-padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudos, os efeitos da salinidade e do *priming* com MeJA foram avaliados no crescimento de plantas de milho, através do acúmulo de biomassa e da área foliar. De modo geral, as plantas submetidas à salinidade tiveram o crescimento reduzido, quando comparadas com o controle, principalmente as massas seca e fresca da parte aérea e a área foliar (Figs. 1A, 2A e 2D). Na ausência do *priming* com MeJA, a MSPA e a AF das plantas estressadas com NaCl a 100 mM foram reduzidas na ordem de 52% e 59,2%, respectivamente, em relação ao controle (Figs. 2A e 2D).

A redução do crescimento na parte aérea de plantas de milho pela salinidade tem sido amplamente reportada. Feijão et al. (2013) verificaram reduções de 33% da MSPA e 39% da AF em plantas de milho submetidas a 15 dias de estresse com 75 mM de NaCl, enquanto que Tuna et al. (2008) verificaram decréscimos de 40% da MST de plantas submetidas a 100 mM

de NaCl. No presente estudo, foram utilizadas sementes de uma cultivar sensível ao estresse salino, o que explica os valores mais elevados na redução do crescimento. Tais resultados estão em concordância com os estudos de Azevedo Neto et al. (2004), em que as cultivares classificadas como sensíveis apresentaram reduções massivas na massa seca e área foliar, variando de 50 a 66%, quando comparadas com os respectivos controles.

Com relação ao acúmulo de massa fresca e seca na raiz, o estresse salino também promoveu reduções significativas de 32% e 27%, respectivamente, quando comparado ao controle, na ausência do *priming* com MeJA (0 μM) (Figs. 1B e 2B). Entretanto, os resultados denotam menor redução do crescimento da raiz em detrimento ao crescimento da parte aérea, um conhecido mecanismo de aclimação ao estresse salino, no qual as plantas investem no crescimento radicular, a fim de aumentar a área de absorção de água e nutrientes (Munns & Tester, 2008).

A aplicação de MeJA na dose de 150 μM , por outro lado, parece ter mitigado, pelo menos parcialmente, os danos causados pela salinidade, tendo em vista o maior acúmulo de MFPA, MSPA e AF em relação aos demais *primings* (Figs. 1A, 2A, 2D). Sob estresse salino, plantas pré-tratadas com MeJA a 150 μM apresentaram valores de MST e AF, respectivamente, 1,46 e 1,35 vezes maiores que àqueles de plantas estressadas e não pré-tratadas com MeJA (controle negativo) (Fig. 3).

As variáveis relacionadas ao crescimento das raízes, por sua vez, demonstraram que os *primings* com MeJA a 50 e 150 μM reduziram os efeitos da salinidade, tendo em vista maior acúmulo das massas seca e fresca, superior inclusive ao controle, na ausência de NaCl (Figs. 1B e 2B). As demais doses, porém, não promoveram melhorias nas variáveis de crescimento, inclusive a dose de 200 μM .

Estudos recentes têm demonstrado que os estresses abióticos, incluindo a salinidade, induzem a síntese do jasmonato endógeno, o que leva a crer que esse regulador pode desempenhar funções sinalizadoras ou estar envolvido nas respostas de senescência e redução do crescimento, a depender da concentração (Kurotani et al., 2015; Shahzad et al., 2015). Jiang et al. (2015) verificaram que ocorre um leve aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), nos tecidos das plantas, após a aplicação exógena de MeJA; entretanto, sob estresse salino severo, o acúmulo de EROs em plantas pré-tratadas com MeJA é menos acentuado que àquele observado em plantas não pré-tratadas. Esses resultados sugerem a existência de uma tolerância cruzada, assim como ocorre com o *priming* com H_2O_2 , que constitui uma estratégia fundamental para ativar a aclimação de plantas de milho ao estresse salino (Gondim et al., 2013).

Desse modo, o *priming* com MeJA se mostrou promissor na mitigação dos efeitos na salinidade no crescimento de plantas de milho, sendo necessários estudos mais aprofundados no sentido de elucidar as respostas de defesa desencadeadas, além de aprimorar os aspectos práticos da sua aplicação.

CONCLUSÕES

A aplicação foliar de MeJA a 150 μ M reduz os efeitos deletérios da salinidade no crescimento e induz a aclimação de plantas de milho ao estresse salino.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, N.L.M.; GADELHA, C.G.; GALÃO, M.I.; DOLDER, M.A.H.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Ultrastructural and biochemical changes induced by salt stress in *Jatropha curcas* seeds during germination and seedling development. *Functional Plant Biology*, V.42, n.9, p. 865–874, 2015.

AZEVEDO NETO, A.D.; TABOSA, J.N. Salt stress in maize seedlings: part II distribution of cationic macronutrients and its relation with sodium. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, V.4, n.2, p. 165-171, 2000.

AZEVEDO NETO, A.D.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; LACERDA, C.F.; SILVA, J.V.; COSTA, P.H.A.; GOMES-FILHO, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, V.16, n.1, p. 31-38, 2004.

DING, H.; LAI, J.; WU, Q.; ZHANG, S.; CHEN, L.; DAI, Y.; WANG, C.; DU, J.; XIAO, S.; YANG, C. Jasmonate complements the function of Arabidopsis lipoxygenase3 in salinity stress response. *Plant Science*, V.244, n.1, p. 1–7, 2016.

FAHAD, S.; HUSSAIN, S.; MATLOOB, A.; KHAN, F. A.; KHALIQ, A.; SAUD, S.; HASSAN, S.; SHAN, D.; KHAN, F.; ULLAH, N.; FAIQ, M.; KHAN, M.R; TAREEN, A.K.;

KHAN, A.; ULLAH, A.; ULLAH, N.; HUANG, J. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*, V.75, n.2, p. 391–404, 2015.

FEIJÃO, A.R.; MARQUES, E.C.; SILVA, J.C.B.; LACERDA, C.F.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Nitrate modula os teores de cloreto e compostos nitrogenados em plantas de milho submetidas à salinidade. *Bragantia*, V.72, n.1, p. 10-19, 2013.

GOMES-FILHO, E.; LIMA, C.R.F.M.; COSA, 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, n.1, p. 147–157, 2008.

GONDIM, F.A. MIRANDA, R.S.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T. Enhanced salt tolerance in maize plants induced by H₂O₂ leaf spraying is associated with improved gas exchange rather than with non-enzymatic antioxidant system. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, V.25, n.4, p. 251-260, 2013.

JIANG, M.; XU, F.; PENG, M.; HUANG, F.; MENG, F. Methyl jasmonate regulated diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) tolerance to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, V.4, n.38, p. 1-13, 2016.

KUROTANI, K.; HAYASHI, K.; HATANAKA, S.; TODA, Y.; OGAWA, D.; ICHIKAWA, H.; ISHIMARU, Y.; TASHITA, R.; SUZUKI, T.; UEDA, M.; HATTORI, T.; TAKEDA, S. Elevated levels of CYP94 family gene expression alleviate the jasmonate response and enhance salt tolerance in rice. *Plant and Cell Physiology*, V.56, n.4, p. 779-789, 2015.

MIRANDA, R.S.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T.; ALVAREZ-PIZARRO, J.C. Ammonium improves tolerance to salinity stress in *Sorghum bicolor* plants. *Plant Growth Regulation*, V.78, n.1, p. 121–131, 2016.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology*, V.59, n.1, p. 651–81, 2008.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants : a review cytosol and organelle space. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, V.60, n.3, p. 324–349, 2005.

SALIMI, F.; SHEKARI, F.; HAMZEI, J. Methyl jasmonate improves salinity resistance in German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) by increasing activity of antioxidant enzymes. *Acta Physiologiae Plantarum*, V.38, n.1, p. 1–14, 2016.

SHAHZAD, A.N.; PITANN, B.; ALI, H.; QAYYUM, M.F.; FATIMA, A.; BAKHAT, H.F.

Maize genotypes differing in salt resistance vary in jasmonic acid accumulation during the first phase of salt stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, V.201, n.6, p. 443-451, 2015.

TUNA, A.L.; KAYA, C.; DIKILITAS, M.; HIGGS, D. The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environmental and Experimental Botany*, V.62, n.1, p. 1-9, 2008.

WASTERNAK, C.; HAUSE, B. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, V.111, n.6, p. 1021–1058, 2013.

FIGURAS

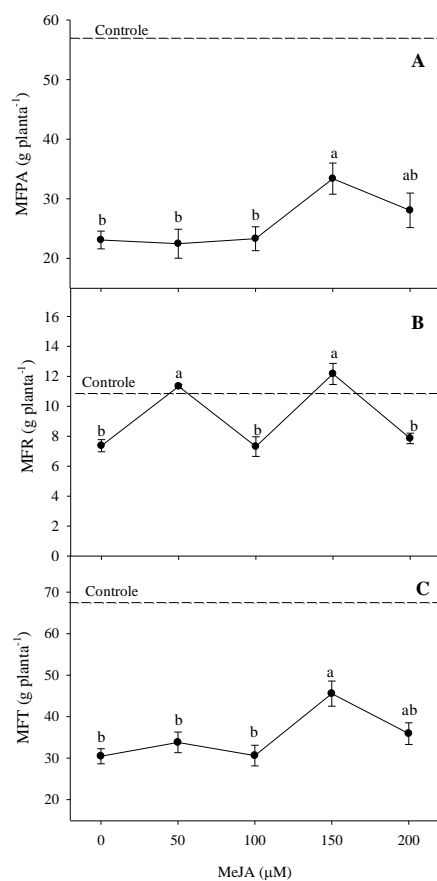


Figura 1. (A) Massa Fresca da Parte Aérea (MFPA), (B) Massa Fresca da Raiz (MFR) e (C) Massa Fresca Total (MFT) de plantas de milho submetidas ao *priming* com metil-jasmonato (MeJA) nas doses de 0, 50, 100, 150 e 200 μM e submetidas ao estresse salino com NaCl a 100 mM. As análises foram realizadas após dez dias de aplicação dos tratamentos salinos. As linhas tracejadas dizem respeito ao controle na ausência de NaCl e as barras verticais representam o erro-padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

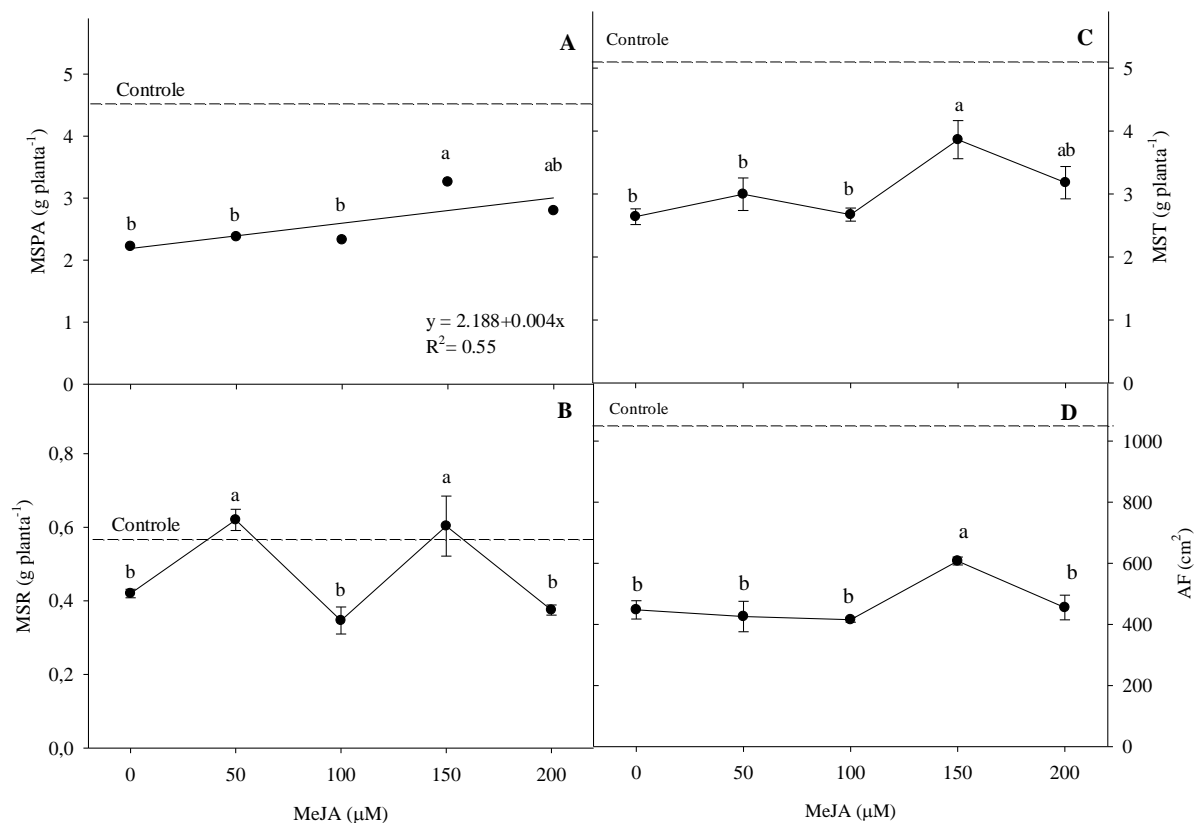


Figura 2. (A) Massa Seca da Parte Aérea (MSPA), (B) Massa Seca da Raiz (MSR), (C) Massa Seca Total (MST) e (D) Área Foliar (AF) de plantas de milho submetidas ao *priming* com metil-jasmonato (MeJA) nas doses de 0, 50, 100, 150 e 200 µM e submetidas ao estresse salino com NaCl a 100 mM. As análises foram realizadas após dez dias de aplicação dos tratamentos salinos. As linhas tracejadas dizem respeito ao controle na ausência de NaCl e as barras verticais representam o erro-padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

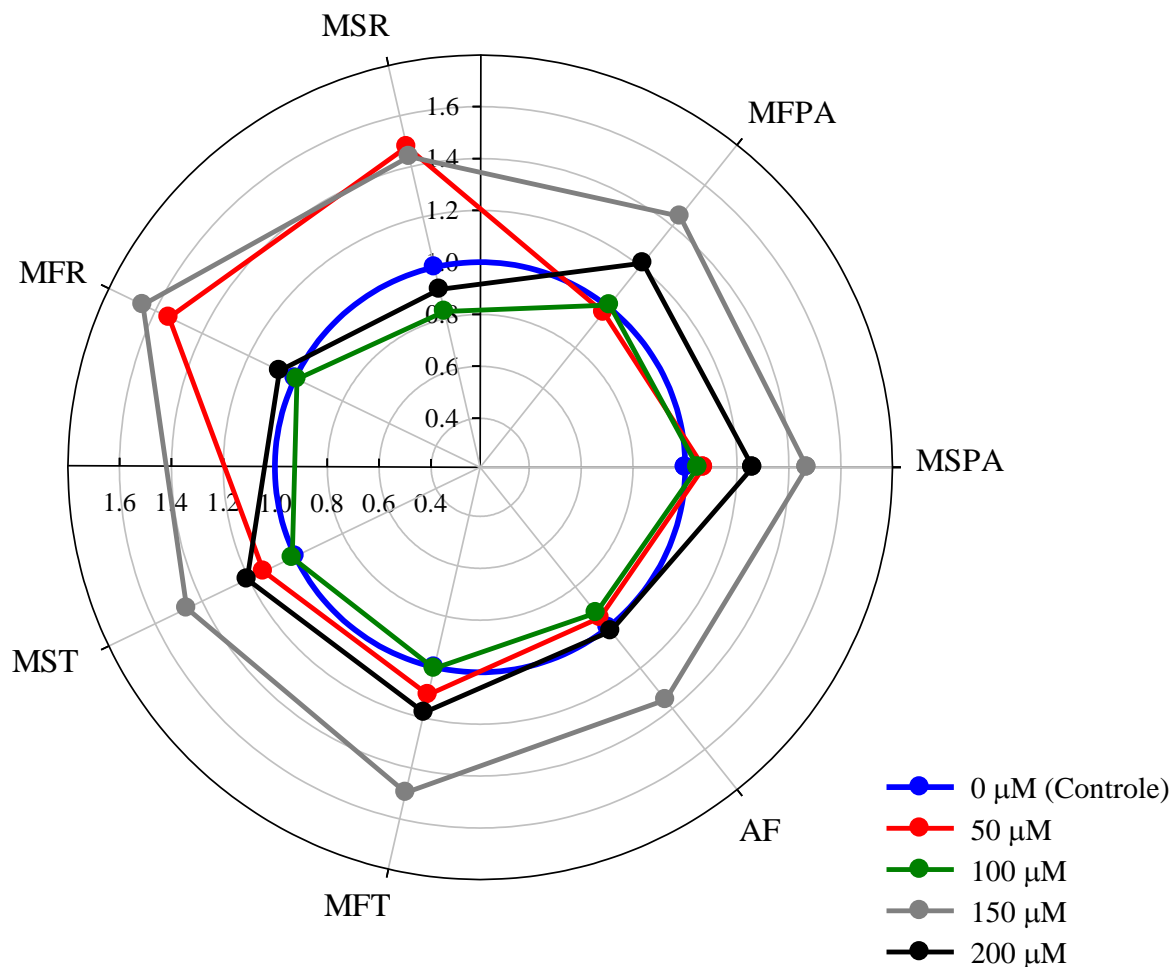


Figura 3. Representação geral das respostas de plantas de milho estressadas com NaCl ao *priming* com metil-jasmonato (MeJA) a 50 (linha vermelha), 100 (linha verde), 150 (linha cinza) e 200 µM (linha preta). Os dados foram normalizados tendo como referência os resultados de plantas submetidas ao estresse salino e não pré-tratadas com MeJA (linha azul). As variáveis representadas são Massa Seca da Parte Aérea (MSPA), Massa Fresca da Parte Aérea (MFPA), Massa Seca da Raiz (MSR), Massa Fresca da Raiz (MFR), Massa Seca Total (MST), Massa Fresca Total (MFT) e Área Foliar (AF).