



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**LEANDRO DIAS DA SILVA**

**METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO EM GENÓTIPOS DE *Jatropha*  
*curcas* L. INFLUENCIADOS PELO DÉFICIT HÍDRICO**

**ALEGRE – ESPÍRITO SANTO - BRASIL**  
**DEZEMBRO DE 2016**

**LEANDRO DIAS DA SILVA**

**METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO EM GENÓTIPOS DE *Jatropha curcas* L. INFLUENCIADOS PELO DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, como parte dos requisitos para a obtenção do título de *Doctor Science* em Produção Vegetal.

**Linha de Pesquisa:**

Fitotecnia

**Orientador:**

Prof. Dr. José Francisco Teixeira do Amaral

**Co-orientadores:**

Prof. Dr. Fábio Pinto Gomes

Prof. Dr. Marcelo Antonio Tomaz

**ALEGRE – ESPÍRITO SANTO  
DEZEMBRO DE 2016**

LEANDRO DIAS DA SILVA

**METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO EM GENÓTIPOS DE *Jatropha curcas* L. INFLUENCIADOS PELO DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de *Doctor Scientiae* em Produção Vegetal, na área de concentração em Fitotecnia.

Aprovada em 12 de dezembro de 2016.

---

Dr. José Francisco Teixeira do Amaral  
Orientador – UFES

---

Dr. Marcelo Antonio Tomaz  
Co-orientador – UFES

---

Dr. Paulo Cesar Cavatte  
Examinador interno – UFES

---

Dr. Fábio Pinto Gomes  
Examinador externo - UESC

*À minha mãe,*

***Graça Dias***

*Pela contribuição e dedicação constante em minha vida!*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me dar forças sempre!

À minha família, em especial à minha **mãe**, exemplo de mulher, que sempre foi o motivo de minha luta. À minha **avó** pelo incentivo e a minha irmã **Lilian** pelo carinho de sempre.

Às amigas: **Lidi, Piu e Roma**, saibam que são importantes para mim. Sem vocês, esse trabalho não seria possível.

Ao grupo *Jatropha*: **Crislane, Francinne, Janderson, João Paulo e Leandro** pelo convívio.

À **Graci, Marty, Paty, Tessio e Victor** pela amizade.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação: **Anatan, Darley, Edevaldo, Jadson, Joabe, Pedro Manhone, Rodolfo, Samuel e Víctor**. Em especial a **Lucas e Paty Alvarez** pela ajuda e convívio em Alegre.

Às amigas **Bel e Mai**, pela ajuda e amizade.

À **Deise**, pela força e contribuição constante em minha vida.

Aos amigos de longas datas: **Camila, Cris, Daiara, Elaine, Filipe, Flavia, Gogo, Joedson, Karine, Lica, Marcelo, Milene, Naiara, Pedro, Simara, Vítor e Viviane**.

Ao orientador **Dr. José Francisco Amaral** pela amizade, confiança, incentivo e apoio para a realização deste trabalho.

Ao **Dr. Fábio Gomes** que desde o mestrado depositou confiança em mim, um amigo acima de tudo. Obrigado pelos ensinamentos, amizade, dedicação e apoio profissional.

Aos colaboradores: **Dr. Marcelo Tomaz e Dr. Paulo Cezar Cavatte** pelas contribuições.

À EMBRAPA-Agroenergia na pessoa do **Dr. Bruno Laviola**, pelas sementes cedidas.

Aos professores: **Alex-Alan, Ândrea, Arlicélio, Carlos Priminho, Eduardo Gross e Marcelo Mielke** pela ajuda e, principalmente, pelas valiosas contribuições.

À **Universidade Federal do Espírito Santo**, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**, pela oportunidade.

A **FAPES** pela bolsa concedida.

À secretária **Madalena** e colaboradora **Alessandra** pelo auxílio.

À **Universidade Estadual de Santa Cruz**, por contribuir com este trabalho.

*Meus sinceros agradecimentos!*

## BIOGRAFIA

*Leandro Dias da Silva*, filho de Maria das Graças Cerqueira Dias e Leovegildo Santana da Silva, nasceu em 23 de janeiro de 1986, na cidade de São Felipe, estado da Bahia.

Concluiu o segundo grau no ano de 2003, no Colégio Estadual Sérgio Carneiro, no estado da Bahia.

Em 2005, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), obtendo o título de Engenheiro Agrônomo em agosto de 2010. Em março de 2011, iniciou o curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) na linha de pesquisa em cultivos em ambiente tropical úmido, sob a orientação do Prof. Dr. Fábio Pinto Gomes, submetendo-se à defesa em fevereiro de 2013.

Em março de 2013, iniciou o curso em nível de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal – PPGPV, na linha de pesquisa em Fitotecnia, submetendo-se à defesa em 12 de dezembro de 2016.

## EXTRATO

*Jatropha curcas* L. pertencente à família Euphorbiaceae, tem recebido atenção no cenário mundial pela sua aplicabilidade nos setores ambiental e econômico, por meio da utilização em programas de recuperação de áreas degradadas, como cerca-viva e na produção de biocombustível em substituição aos combustíveis fósseis. Parte do interesse pelo cultivo dessa espécie está relacionada ao uso de sua semente que apresenta teor de óleo entre 35 e 40%. Com o objetivo de compreender as alterações no metabolismo fotossintético de genótipos de *Jatropha curcas* L. submetidos ao déficit hídrico, realizou-se um experimento em casa de vegetação utilizando nove genótipos de distintas regiões do Brasil: CNPAE121 (Bom Jesus-RJ), 124 (Maranhão-MA), 148 (Candeias-BA), 168 (Minas Gerais-MG), 222 (Paraná-PR), 215 (São Francisco do Glória-MG), 226 (Água de Santa Bárbara-SP), 298 (Sidrolândia-MS) e 299 (Rio Grande do Sul-RS), oriundos do Banco de Germoplasma da Embrapa – Agroenergia. Sementes desses materiais foram colocadas para germinar em vasos com capacidade para 12 dm<sup>3</sup>, contendo solo classificado como latossolo amarelo distrófico. Após 20 dias da germinação realizou-se o desbaste, deixando apenas uma planta por vaso. Imediatamente os vasos foram cobertos com papel alumínio para evitar a evaporação e o aquecimento do solo, iniciando assim, o tratamento de deficiência hídrica por um período de 42 dias. Os tratamentos consistiram em dois regimes hídricos medidos em percentagem de capacidade de campo (CC): plantas controle (100% da CC) e deficiência hídrica (50% da CC). O primeiro capítulo aborda os estudos relacionados à amplitude da mudança C3-MAC induzida pela deficiência hídrica (DH) em *J. curcas* através de avaliações da acidificação durante a noite de tecidos foliar e caulinar, bem como da atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e composição isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ). A área foliar específica (AFE) diferiu significativamente ( $p < 0.05$ ) para os genótipos e entre os tratamentos de DH aos 42 DAT. A atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) nas folhas plantas sob DH aumentou significativamente em relação às plantas controle, tanto em amostras coletadas às 4 h (167%) quanto às 16 h (187%). O acúmulo de ácidos orgânicos (malato e citrato) diferenciou entre os genótipos e os tratamentos de DH para todas as quantificações. O acúmulo de malato ocorreu entre os regimes hídricos apenas para os genótipos 148, 222, 215 e 298. Entretanto, o acúmulo de citrato somente ocorreu para o genótipo 215, que se diferenciou dos demais, com valores médios entre 59 e 73  $\mu\text{mol H}^+/\text{g MF}$  para as plantas controle e sob DH, respectivamente. A DH levou a aumento significativo no teor de açúcares solúveis totais (AST) média de 62% quando comparadas às plantas controle. O teor de amido teve aumento nas plantas controle em 78% em média ao comparadas com as plantas sob DH. Houve diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos, bem como entre os tratamentos de DH, na composição isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ). Contudo, o 121 foi o único a diferenciar estatisticamente entre os regimes hídricos, com diminuição dos valores (-34.7‰) de  $\delta^{13}\text{C}$  sob DH. O segundo capítulo relata os resultados ao estresse oxidativo induzido por deficiência hídrica. Não foram verificadas diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos e entre os tratamentos de deficiência hídrica (DH) para o potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ). No entanto, diferenças significativas foram observadas entre os genótipos, bem como entre os tratamentos de DH para o potencial osmótico ( $\Psi_s$ ). Os genótipos 222 e 215 se destacaram em relação aos

demais, apresentando uma amplitude de -0.53 (plantas controle) e -0.73 MPa (plantas sob DH), respectivamente. Diferenças significativas foram encontradas para o conteúdo de prolina entre os genótipos e tratamentos de DH. As plantas submetidas à DH apresentaram um aumento de 56% quando comparadas às plantas controle. Aos 42 dias após tratamento (DAT) houve diferença significativa nas trocas gasosas foliares, tanto os genótipos quanto os tratamentos de DH. Nesse momento foram observadas reduções nos valores da taxa fotossintética ( $P_N$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), taxa transpiratória ( $E$ ) e relação  $C_i/C_a$  de 62, 112, 78 e 23% respectivamente, em relação às plantas controle. Em relação às eficiências intrínseca ( $P_N/g_s$ ) e instantânea ( $P_N/E$ ) do uso da água, verificou-se que os genótipos apresentaram diferenças significativas ( $p < 0.05$ ), bem como entre os regimes hídricos não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os tratamentos de DH para o teor de clorofila a ( $Chl a$ ), com exceção do genótipo 121, onde as plantas de DH apresentaram um aumento (24%) em relação as plantas controle. As enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do guaiacol (GPX) e catalase (CAT) apresentaram diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) para os genótipos e tratamentos de DH. Aumento da SOD foi de 35%, da GPX de 44% e da CAT de 35%, quando comparadas as plantas sob DH em relação às plantas controle.). Em geral, os genótipos apresentaram um eficiente mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo induzido pela seca. Tal estratégia, observado em todos os genótipos, é sugerido para ser um componente importante de tolerância à seca em *J. curcas*. Embora *J. curcas* seja considerada uma planta que tolera a seca, ela é capaz de aumentar a eficiência do uso da água mudando de  $C_3$  para metabolismo MAC sob baixa disponibilidade de água. Níveis primários dessa alteração foram encontrados nesta pesquisa, o que sugere ser esse um potencial mecanismo de tolerância a ser investigado futuramente.

**Palavras-chave:** ácidos orgânicos, enzimas antioxidantes, Euphorbiaceae, estresse abiótico, trocas gasosas



## ABSTRACT

*Jatropha curcas* L. belonging to Euphorbiaceae family, has received attention on the world stage for its applicability in environmental and economic sectors through the use of recovery programs of degraded areas such as hedge and biofuel production as an alternative to fossil fuels. Part of the interest in the cultivation of this species is related to the use of his seed for oil content of between 35 and 40%. In order to check the photosynthetic metabolism of *Jatropha curcas* L. genotypes subjected to drought, there was an experiment in a greenhouse using nine genotypes from different regions of Brazil: 121 (Bom Jesus-RJ), 124 (Maranhão-MA), 148 (Candeias-BA), 168 (Minas-Gerais Gerais), 222 (Paraná-PR), 215 (São Francisco do Glória-MG), 226 (Água de Santa Bárbara-SP), 298 (Sidrolândia-MS) and 299 (Rio Grande do Sul-RS). *J. curcas* seeds belonging to the Germplasm Bank of Embrapa - Agroenergy, were germinated in pots with a capacity of 12 dm<sup>3</sup> containing soil classified as yellow latosol dystrophic. After 20 days of germination was carried out thinning, leaving only one plant per pot. Immediately the vessels were covered with aluminum foil to prevent evaporation and heating of the soil, thus beginning the treatment water stress being maintained for a period of 42 days. The treatments consisted of two water systems measured in percentage of field capacity (FC): control plants (100% FC) and moderate drought stress (50% FC). The first chapter covers the range of C3-MAC-induced change in *J. curcas* through assessments acidification overnight leaf and stem tissues. Specific leaf area (SLA) differed significantly ( $p < 0.05$ ) for the genotypes and between WS treatments at 42 DAT. There was a significant difference ( $p < 0.05$ ) between genotypes and between water regimes. The activity of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in plants under certain WS sheets to 4 h increased by 167 and 187% at 16 h, respectively, compared to control plants. The accumulation of organic acids (citrate and malate) differed between genotypes and WS treatments for all measurements. It appears that there was an increase in average of 176% for the control plant and 270% for plants subjected to WS compared citrate to malate. For the soluble sugars total (TSS) in WS plants showed an increase on average 62% compared to control plants. As for the starch content was increased in the control plants by 78% on average compared to plants under WS. There were significant differences ( $p < 0.05$ ) between genotypes and between the WS treatments, the carbon isotope discrimination. In general, the genotypes showed an effective defense mechanism against oxidative stress induced by drought. Regarding the leaf water potential ( $\Psi_w$ ) no significant differences were observed ( $p < 0.05$ ) between genotypes and between water stress treatments (WS). It can be observed significant differences between genotypes and between the WS treatments for osmotic potential ( $\Psi_s$ ). Genotypes 222 and 215 stood out in relation to the other, thus presenting a range of -0.53 and -0.73 MPa, respectively. Significant differences were found for proline content between genotypes and WS treatments. Plants submitted to WS increased by 56% when compared to control plants. At 42 days after treatment (DAT) was no significant difference in leaf gas exchange, both genotypes as the WS treatments. At 42 DAT were observed reductions in the values of photosynthetic rate ( $P_N$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration rate ( $E$ ) and ratio  $C_i/C_a$  of 62, 112, 78 and 23% respectively, compared to control plants. In relation to the efficiency of use of the intrinsic water ( $P_N/g_s$ ) and instantaneous ( $P_N/E$ ) found that genotypes showed significant differences ( $p < 0.05$ ), and between water regimes. There was no significant difference ( $p < 0.05$ ) between

the WS treatments for the content of chlorophyll a (*Chl a*), with the exception of genotype 121, where the WS plants showed an increase (24%) than the control plants. The antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPX) and catalase (CAT) showed significant differences ( $p < 0.05$ ) for the genotypes and WS treatments, as well as among the collection times (4 and 16 h) and stem segments (base and apex). This strategy, observed in all genotypes, is suggested to be an important component of drought tolerance in *J. curcas*. Although *J. curcas* be considered a plant that tolerates drought, it is able to increase the efficiency of use of changing water C3 for MAC metabolism under low water availability. In the second chapter we analyzed the variables related to oxidative stress.

**Keywords:** Euphorbiaceae, abiotic stress, antioxidant enzymes, organic acids, gas exchange

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIACÕES .....</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO 1- INDUÇÃO AO METABOLISMO ÁCIDO DAS CRASSULÁCEAS (MAC) EM GENÓTIPOS DE <i>Jatropha curcas</i> SOB DEFICIT HÍDRICO</b>	
<b>EXTRATO. ....</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>18</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO 2- DIVERGÊNCIAS FISIOLÓGICAS E MECANISMOS DE DEFESA CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO EM GENÓTIPOS DE <i>Jatropha curcas</i> L. INFLUENCIADOS PELA DEFICIÊNCIA HÍDRICA</b>	
<b>EXTRATO. ....</b>	<b>54</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>55</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE ABREVIACOES

Abreviação	Variável/Parâmetro (unidade)
<b>AO</b>	Ajustamento osmótico ( $\Psi_s = (\Psi_{s \text{ (controle)}} - \Psi_{s \text{ (estressada)}})$ , MPa)
<b>AST</b>	Açúcares solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$ )
<b>CAT</b>	Catalase ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$ )
<b>CC</b>	Capacidade de campo
<b>Chl a</b>	Clorofila a ( $\text{mg g}^{-1}$ )
<b>Chl b</b>	Clorofila b ( $\text{mg g}^{-1}$ )
<b>Car</b>	Carotenoides ( $\text{mg g}^{-1}$ )
<b><math>C_i/C_a</math></b>	Razão entre as concentrações intercelular e atmosférica de $\text{CO}_2$
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>C3</b>	Metabolismo fotossintético C3
<b>C4</b>	Metabolismo fotossintético C4
<b>DAT</b>	Dias após imposição ao tratamento
<b>DH</b>	Deficiência hídrica
<b>E</b>	Taxa transpiratória ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
<b><math>F_v/F_m</math></b>	Rendimento quântico do PSII
<b>GPX</b>	Peroxidase do guaiacol ( $\text{mmol h}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$ )
<b><math>g_s</math></b>	Condutância estomática ao vapor de água ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
<b>K<sup>+</sup></b>	Potássio ( $\text{g kg}^{-1}$ )
<b>MAC</b>	Metabolismo cido das crassuláceas
<b><math>\Psi_{am}</math></b>	Potencial hídrico foliar "ante manhã" (-MPa)
<b><math>\Psi_{md}</math></b>	Potencial hídrico foliar ao meio-dia (-MPa)
<b><math>\Psi_s</math></b>	Potencial osmótico (-MPa)
<b><math>P_N</math></b>	Taxa fotossintética líquida ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
<b>PEPC</b>	Fosfoenolpiruvato carboxilase
<b>RFA</b>	Radiação fotossintticamente ativa ( $\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxignio
<b>RUBISCO</b>	Ribulose 1.5- bifosfato carboxilase/oxigenase
<b>SOD</b>	Dismutase do superóxido (U/kg MS)
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>TRA</b>	Teor relativo de água na planta (%)

## INTRODUÇÃO GERAL

Com a crescente preocupação com as questões ambientais, em especial o aquecimento global, os biocombustíveis surgem como uma alternativa de fontes renováveis, seguras e não poluentes, com vantagens em relação aos óleos petrolíferos, por apresentarem uma menor emissão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

O Brasil apresenta potencial para produção de biocombustíveis em grande parte de sua extensão territorial. Suas características edafoclimáticas, biodiversidade, disponibilidade de área e de mão-de-obra, bem como comprovadas competências técnicas no campo da ciência agrícola contribuem para esta condição (Dias et al., 2008). Dentre as espécies vegetais produtoras de sementes oleaginosas com grande potencial para a produção de biodiesel, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) vem se destacando nos últimos anos. É uma espécie que apresenta alto teor de óleo (Dias et al., 2007), desenvolvimento em áreas de baixa pluviosidade (Maes et al., 2009) e não apresenta competição com o setor alimentício (Pompelli et al., 2011).

*Jatropha curcas* L., pertencente à família Euphorbiaceae, com centro de diversidade presumível no México (Pecina-Quintero et al. 2014), presente em regiões tropicais é uma espécie perene de porte arbóreo-arbustivo, de crescimento rápido, apresenta frutos do tipo trilocular, carnudo, indeiscente, contendo uma semente em cada lóculo. O teor de óleo nas sementes, que é facilmente convertido em biocombustível, varia de 33 a 38% (Dias et al., 2007). Sabe-se que as sementes de pinhão-manso possuem alto teor de óleo. Além disso, *Jatropha curcas* L. tem elevado potencial econômico devido à qualidade do óleo da semente, que pode ser convertido em biodiesel (Kheira e Atta, 2009). No entanto, para que a plantas apresentem um bom desenvolvimento e rendimento, são necessárias condições edafoclimáticas favoráveis, concomitantemente à aplicação de tecnologias para aumentar a produtividade.

A viabilidade deste cultivo ainda depende do desenvolvimento de tecnologia agrônômica e do cultivo para obtenção de altas produtividades nas diferentes regiões do Brasil (Freitas et al., 2011; Laviola et al., 2012). A espécie tem sido caracterizada como, como tolerante à seca, mesmo demonstrando respostas negativas ao déficit hídrico, pois é capaz de sobreviver e mostrar boa capacidade de recuperação (Fini et al., 2013; Sapeta et al., 2013). Um estudo conduzido por Maes et al. (2009), demonstrou que a espécie ocorre naturalmente em áreas com precipitação anual acima de 900 mm, porém mesmo em regiões semiáridas, com disponibilidade hídrica bastante limitada, a produção alcança mais da metade do que é

esperado em locais úmidos. Apesar do grande interesse no cultivo de *Jatropha curcas*, embora existam algumas informações a respeito dos aspectos agrônômicos básicos da espécie, muito ainda se desconhece sobre a tolerância ao déficit hídrico, de modo que a planta ainda pode ser considerada não domesticada, com poucos conhecimentos sobre o desempenho de diferentes genótipos (Maes et al., 2009). Os estudos relacionados às respostas de genótipos, provenientes de diferentes regiões climáticas e geográficas, à deficiência hídrica ainda estão em fase de experiências básicas, necessitando de uma maior caracterização dos genótipos encontrados (Laviola et al., 2014).

O déficit hídrico é considerado o fator ambiental que mais influencia significativamente o crescimento e o rendimento da planta (Kramer e Boyer, 1995). Impactos de déficit hídrico nos processos fisiológicos em *J. curcas*, em geral, aumentam a resistência estomática, reduzindo a transpiração e, por conseguinte, o fornecimento de CO<sub>2</sub> para a realização do processo da fotossíntese (de Santana et al., 2015). Portanto, o conhecimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos com todo o nível de respostas de plantas ao déficit hídrico gera um grande interesse (Slama et al., 2007).

Além disso, a deficiência hídrica pode induzir o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas, o qual, em seguida, por sua vez, afeta negativamente as estruturas celulares do metabolismo pelo estresse oxidativo. As plantas superiores desenvolveram várias estratégias para lidar com o estresse oxidativo. Um dos mecanismos é o sistema de defesa antioxidante, incluindo enzimas como a dismutase do superóxido (SOD), as peroxidases (POD) e a catalase (CAT) (Foyer e Noctor 2009; Jaleel et al. 2009). Outro importante fator associado ao mecanismo de tolerância à deficiência hídrica é a capacidade de ajustamento osmótico no citosol, que é mediada pela síntese de solutos orgânicos como a prolina e açúcares totais e de solutos inorgânicos, principalmente o potássio (K<sup>+</sup>) (Silva et al. 2010b).

Um das respostas de tolerância ao déficit hídrico que vem sendo estudada é a capacidade de alteração do metabolismo fotossintético, onde plantas que apresentam fotossíntese C3 ou C4 podem modificar esse padrão para o metabolismo ácido das crassuláceas (MAC). As espécies que apresentam essa transição do metabolismo são conhecidas como MAC facultativas, e com aproximadamente uma semana de deficiência hídrica algumas delas já começam a manifestar alterações na captação de CO<sub>2</sub>, que passa a ser predominantemente interceptado durante a noite, ocasionando grandes flutuações no conteúdo de ácidos orgânicos

acumulados nos vacúolos no período noturno (Winter e Holtum, 2014; Herrera et al., 2015; Brilhaus et al., 2016).

Diante do exposto, esse trabalho objetivou verificar a ocorrência e quantificar características fisiológicas e bioquímicas relacionadas ao metabolismo fotossintético em genótipos de *J. curcas* cultivadas sob deficiência hídrica no solo.

## REVISÃO DE LITERATURA

### *A espécie Jatropha curcas L.*

*Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) é uma espécie oleaginosa, conhecida popularmente como pinhão manso. É originária da América Central, considerada como uma planta rústica e encontrada nas mais diversas condições edafoclimáticas (Dias et al., 2007; Tominaga et al. 2007). Assim como *Manihot esculentae* Crantz, *Ricinus communis* L. e a *Hevea brasiliensis* Willd ex Adr. de Juss. Muell. Arg., *J. curcas* é de porte arbóreo-arbustivo e tem sido apontada como uma das mais promissoras oleaginosas para a produção de Biodiesel (Kumar e Sharma, 2008). Segundo Maes et al. (2009) há duas grandes preocupações quanto ao cultivo do pinhão manso: primeiro, existem poucas informações sobre os aspectos agronômicos básicos da cultura, como os mecanismos de tolerância à seca e segundo, trata-se de uma espécie silvestre com nenhum grau de melhoramento.

O pinhão manso é um arbusto de crescimento rápido, cuja altura pode atingir até 6 metros, possuindo cinco raízes, sendo uma central e quatro periféricas, isto é, raízes laterais desenvolvem-se a partir da raiz central (Pompelli et al., 2010). Seu tronco é dividido desde a base, em compridos ramos, com numerosas cicatrizes produzidas pela queda das folhas na estação seca, que ressurgem após as primeiras chuvas (Dias et al., 2007; Saturnino et al., 2005). É uma planta anfiestomática, isto é, possui estômatos distribuídos na fase abaxial e adaxial, as folhas verdes, esparsas e brilhantes, largas e alternas, em forma de palma, apresentam floração monóica na mesma planta, onde as flores masculinas são em maior número, estando localizadas nas extremidades superiores das ramificações, enquanto que as flores femininas são menos numerosas, e se encontram nas ramificações, mas com sexo separado. O caule é liso, de lenho mole e medula desenvolvida, mas pouco resistente a ventos e com longos canais laticíferos que se estendem até as raízes, nos quais circulam o látex (Arruda et al., 2004).

Os frutos maduros apresentam o epicarpo com coloração externa marrom-escura e os frutos secos apresentam o epicarpo de coloração preta e em fase de deiscência, mesocarpo seco e sementes de coloração preta, com presença de estrias (Nunes et al., 2008). O fruto é capsular ovóide com diâmetro de 1.5 a 3.0 cm, é trilocular com uma semente em cada cavidade, formado por um pericarpo e lenhosa, indeiscente, inicialmente verde, passando a amarelo, castanho e por fim preto, quando atinge o estágio de maturação, contém de 53 a 62% de sementes e de 38 a 47% de casca (Dias et al., 2007; Maes et al., 2009).

*J. curcas* possui propriedades importantes, podendo ser utilizada toda a planta. O látex possui propriedades anticancerígenas, das raízes pode-se extrair um antídoto para picadas de cobra, o bagaço pode ser utilizado como fertilizante, o plantio pode melhorar a qualidade de áreas degradadas e diminuir o problema erosivo (Sharma et al., 2012). Além disso, *J. curcas* cresce e se desenvolve bem em solos de baixa fertilidade, mas deve preferencialmente ser cultivado em solos profundos, bem estruturados e pouco compactados, para que o sistema radicular possa se desenvolver adequadamente, explorando um maior volume de nutrientes no solo (Arruda et al., 2004).

As plantas levam em média de um a três anos para estabilizar sua produtividade, entretanto pode iniciar a produção de frutos já nos primeiros seis meses, podendo sua produção se estender por até 50 anos (Pradhan et al., 2011). A viabilidade de cultivo ainda depende do desenvolvimento de tecnologia agrônômica e do cultivo para obtenção de altas produtividades nas diferentes regiões do Brasil (Freitas et al., 2011; Laviola et al., 2012). Espera-se que a cultura deixe de ser um potencial e passe a ser efetivamente uma matéria-prima para o mercado de biodiesel brasileiro (Andréo-Souza et al., 2010).

### ***Alterações fisiológicas influenciadas pela deficiência hídrica***

A água deverá ser considerada como o mais importante recurso estratégico até o final da próxima década e como insumo chave para o desenvolvimento econômico. O requerimento hídrico na produção dos chamados cultivos energéticos, como nas demais culturas, e seus impactos em relação ao uso da água dependem de vários fatores, como, a espécie, a evapotranspiração nos vários estágios do crescimento, o método de cultivo e a intensidade de uso de produtos químicos e fertilizantes nas lavouras. A expansão da produção de cultivos energéticos em larga escala deverá aumentar a evapotranspiração e, em alguns países, potencializar uma situação de estresse hídrico existente (Yang et al., 2009). Nesse sentido,



práticas agrícolas modernas devem incluir aumento da eficiência de uso da água (EUA), por exemplo, por meio de melhoramento genético para tolerância à seca além de tecnologias de irrigação localizada e fornecimento econômico de água.

Da mesma forma, a compreensão dos mecanismos que garantem, sob deficiência hídrica, a manutenção da assimilação de carbono e da transpiração em níveis compatíveis com o crescimento e produção de biomassa é de suma importância para a produtividade em áreas sujeitas a deficiência hídrica periódica. Nesse contexto, resultados sobre as relações hídricas têm sido relatados, ressaltando, sobretudo, sua estreita relação com assimilação de carbono e crescimento (Kotowska et al., 2015). Existem relatos indicando necessidade de irrigação suplementar visando maximização do desempenho de *J. curcas* (Kheira e Atta, 2009; Behera et al., 2010), sobretudo em climas semiáridos. Adicionalmente, ajustamento osmótico (Silva et al., 2010a), alta capacidade de manutenção da integridade das membranas celulares (Gonçalves et al., 2011), estresse oxidativo (Silva et al., 2010b; Pompelli et al., 2010; da Silva et al., 2016) têm sido demonstrados nessa espécie como efeito do déficit hídrico.

A deficiência hídrica afeta praticamente todos os aspectos do crescimento da parte aérea e da raiz. O processo de desidratação sofrido pelas espécies durante essa condição pode ser caracterizado por mudanças nas relações hídricas, processos bioquímicos, fisiológicos e estrutura da membrana celular (Ashraf e Harris, 2013). As respostas fisiológicas e bioquímicas de *J. curcas* para a seca no solo e na atmosférica têm sido estudados e discutidos. A seca atmosférica, medida pelo maior déficit de pressão de vapor do ar (estação seca) foi mostrado por ser envolvida no fechamento dos estômatos em *J. curcas*, o que contribuiu para uma redução na assimilação de carbono (Santos et al., 2013).

O comportamento conservador de água através da regulação eficiente dos estômatos, como indicado por medições do teor relativo de água (TRA) na folha e o potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ), tem sido comumente observada em plantas jovens e adultas (Pompelli et al., 2010; Silva et al., 2010a; Díaz-López et al., 2012; Fini et al., 2013; Santos et al., 2013; Sapeta et al., 2013; da Silva et al., 2016; de Oliveira et al., 2016). Isso também foi verificado em outras espécies de Euphorbiaceae, como *Ricinus communis* (Sausen e Rosa, 2010) e *Manihot esculenta* (El-Sharkawy, 2007). Além disso, a deficiência hídrica induziu acumulação de ácido abscísico (ABA) nas folhas e raízes, a acumulação de solutos orgânicos, tais como prolina, açúcares e aminoácidos solúveis e, principalmente, o aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, POD e CAT, durante o período de déficit hídrico que

revelou importantes mecanismos de adaptação de *J. curcas* em resposta à seca (Pompelli et al., 2010; Santos et al., 2013; da Silva., 2016).

Alguns estudos apontam *J. curcas* como tolerante à seca por desenvolver estratégias morfológicas e fisiológicas de resistência ou tolerância a solos com baixo conteúdo de água disponível. Dentre estas estratégias encontram-se ajustamento osmótico (Silva et al., 2010b), aumento da suculência caular (Maes et al., 2009), redistribuição de fotoassimilados, (Díaz-Lopez et al., 2012) e outros fatores que envolvem alterações fotossintéticas. Este último vem sendo amplamente estudado, e se trata de uma forma de aclimação desenvolvida por algumas espécies, a fim de contornar situações de estresse ambientais relacionados à salinidade, temperatura, luminosidade e deficiência hídrica e/ou nutricional.

A fotossíntese é a principal fonte de produção das plantas e também está entre os processos primários a ser afetado pela seca (Kramer e Boyer, 1995; Chaves et al., 2009). Recentemente, um número crescente de estudos demonstrou a resposta fotossintética, como a redução da condutância estomática ( $g_s$ ) e da relação  $C_i/C_a$  ao déficit hídrico em *Jatropha curcas* (Silva et al., 2015; de Santana et al., 2015; da Silva et al., 2016; de Oliveira et al., 2016).

A regulação estomática rigorosa em *Jatropha* sob deficiência hídrica tem sido relatado (Pompelli et al., 2010; Sapeta et al., 2013; Silva et al., 2015; da Santana et al., 2015; da Silva et al., 2016, de Oliveira et al., 2016). Entretanto, as respostas dos estômatos às variações na hidratação foliar têm sido associadas à arquitetura hidráulica das plantas (Sperry et al., 2002), à capacidade hidráulica das folhas (Brodribb e Jordan, 2008) e, sob máxima taxa de transpiração, à condutividade hidráulica das raízes (Ocheltree et al., 2014). Além disso, importante avanço para o conhecimento sobre transporte de água nas plantas, bem como suas alterações frente à deficiência hídrica, pode ser atribuído aos estudos moleculares e funcionais sobre as aquaporinas (AQPs). Elas estão envolvidas em manter o transporte de água a partir das raízes para as folhas podendo proporcionar mudanças rápidas e reversíveis na condutividade hidráulica, modulando a permeabilidade da membrana (Surbanovski e Grant, 2014).

### ***Metabolismo ácido das crassuláceas (MAC)***

O MAC é uma adaptação fotossintética que surgiu, independentemente, várias vezes na evolução das plantas vasculares, possivelmente por meio da reorganização de vias metabólicas já existentes em plantas C3 (West-Eberhard et al., 2011). A fotossíntese MAC

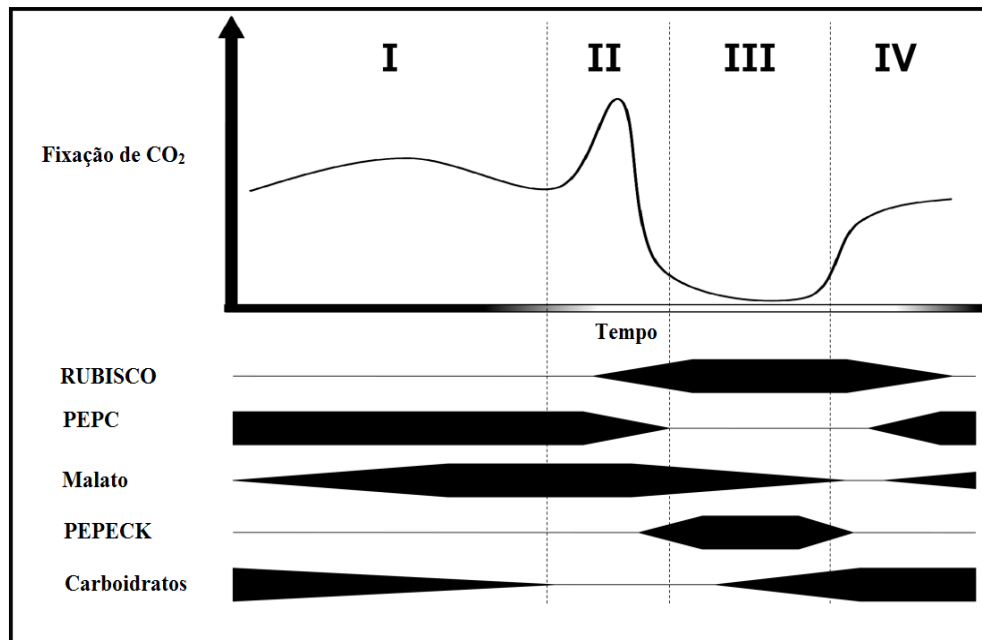
ocorre em aproximadamente 16.000 espécies de 328 gêneros pertencentes a 33 famílias (Herrera, 2009). As plantas MAC são adaptadas à escassez de água porque perdem pouca água por transpiração durante aquisição de CO<sub>2</sub>, uma vez que os estômatos se abrem no período noturno e permanecem fechados durante o dia (Winter et al., 2005).

O MAC é uma de três vias de assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> atmosférico, juntamente com as vias fotossintéticas C3 e C4 (Silvera et al., 2010a). O MAC caracteriza-se por a separação temporal entre a fixação de CO<sub>2</sub> e a sua assimilação em compostos orgânicos. Em plantas MAC, o CO<sub>2</sub> é fixado durante o período escuro através da ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), que utiliza CO<sub>2</sub> para carboxilação de fosfoenolpiruvato (PEP), dando origem a oxaloacetato (OAA). O OAA formado é convertido em malato pela ação da malato-desidrogenase (MDH). Em seguida, este ácido orgânico é transportado para o vacúolo, fazendo com que a acidificação noturna típica de plantas MAC. Durante o período de luz, a descarboxilação do malato e refixação do CO<sub>2</sub> pela enzima ribulose-1.5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RUBISCO) ocorre no citosol, causando uma diminuição da acidez nos tecidos (Herrera, 2009; Silvera et al., 2010b). Devido à fixação noturna do CO<sub>2</sub> atmosférico, plantas MAC apresentam maior eficiência no uso da água (EUA), quando comparado com as vias fotossintéticas C3 e C4 (Herrera, 2009). Além da EUA, outra vantagem do MAC é a compreensão de mecanismos para minimizar os danos causados por ROS (Sunagawa et al., 2010).

A mudança do metabolismo C3 para o MAC talvez seja uma das mudanças metabólicas mais complexas das plantas em resposta ao ambiente, já que é necessária uma integração da regulação nos níveis celular, tecidual e do organismo como um todo (Freschi e Mercier, 2012).

Tanto as plantas MAC como as C4 empregam a enzima PEPC para a captura de CO<sub>2</sub> atmosférico e respiratório, melhorando o desempenho da RUBISCO na via C3 e reduzindo a fotorrespiração no período luminoso. No entanto, enquanto a via C4 funciona através da separação espacial entre PEPC e RUBISCO, que ocorrem respectivamente no mesófilo e células da bainha, a fotossíntese MAC ocorre apenas nas células do mesófilo, dependendo estritamente da regulação temporal entre a via C4 e C3. Osmond et al. (1978), propôs que o ciclo de 24 h do MAC é composto por quatro fases. A fase I ocorre durante o período escuro, e é caracterizada pela abertura estomática para fixação de CO<sub>2</sub>, através da PEPC, levando ao acúmulo de ácido málico. A fase II acontece durante as primeiras horas do período de luz, com os estômatos ainda abertos, e ocorre a fixação simultânea de CO<sub>2</sub> tanto pela PEPC

quanto pela RUBISCO. Na fase III os estômatos se fecham, e ocorre a refixação do  $\text{CO}_2$  pela RUBISCO a partir da descarboxilação do malato, e a fase IV é caracterizada pela reabertura estomática, quando não há restrições hídricas, e fixação direta de  $\text{CO}_2$  atmosférico pela RUBISCO (Figura 1). A magnitude e duração dessas fases são variáveis e de grande plasticidade, dependendo da espécie, ambiente, e desenvolvimento da folha (Davies e Griffiths, 2012).



**Figura 1:** Quatro fases temporais do MAC (I, II, III e IV) demonstradas durante um fotoperíodo de 24 horas pelas principais características do MAC: a fixação de  $\text{CO}_2$ , RUBISCO, PEPC, atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), malato e acúmulo de carboidratos. As formas pretas abaixo do eixo x indicam quando os processos descritos acima foram acontecendo. As barras pretas e brancas no eixo x indicam noite e de dia, respectivamente (adaptado de Matiz et al., 2013).

O MAC pode ser dividido em três tipos considerando o comportamento estomático e a consequente assimilação de  $\text{CO}_2$  atmosférico. O *MAC constitutivo ou obrigatório* é expresso nos tecidos fotossintéticos dependendo único e exclusivamente da maturidade, enquanto o *C3-MAC facultativo*, também conhecido como *MAC induzível ou opcional*, ocorre em plantas que manifestam o MAC em respostas a estímulos ambientais (Silvera et al., 2010). Essa capacidade de indução parece ser mais importante para o balanço hídrico, a fotoproteção e a reprodução da planta do que para a aquisição de carbono, já que a maioria das plantas

induzíveis já estudadas apresentou, em média, uma assimilação noturna menor do que 30% da aquisição de carbono total da planta (Herrera et al., 2009). O *MAC cycling*, apresenta um padrão de trocas gasosas semelhantes ao da fotossíntese C<sub>3</sub>, assimilando carbono durante o dia pela Rubisco. Entretanto, durante a noite o CO<sub>2</sub> proveniente da respiração é refixado através da PEPC, resultando em flutuações na acidez nos tecidos fotossintéticos no ciclo dia/noite. Este padrão é considerado uma forma basal do MAC. Já o *MAC idling* é característico de condições de estresse hídrico severo, quando ocorrem pequenas flutuações na acidez dos tecidos fotossintéticos no ciclo dia/noite e todo o malato produzido é proveniente da reciclagem do CO<sub>2</sub> respiratório. Por fim, o *MAC latente* se caracteriza pela manutenção de altos níveis de acidez durante todo o ciclo. Tanto o CAM cycling, quanto o MC latente podem ser considerados passos evolutivos intermediários entre a fotossíntese C<sub>3</sub> e o MAC (Silvera et al., 2010).

A abundância relativa (medida em partes por mil, ‰) de isótopos estáveis de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) em tecidos vegetais tem sido bastante utilizada como um índice da contribuição relativa do MAC para o ganho fotossintético total (Pierce et al., 2002). A PEPC é a enzima primária na fixação de CO<sub>2</sub> em plantas C<sub>4</sub> e MAC, discrimina menos os isótopos mais pesados (<sup>13</sup>C) do que a RUBISCO, enzima primária da rota C<sub>3</sub>. Em plantas C<sub>3</sub>, os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  estão na faixa entre -35 e -23 ‰, enquanto em plantas MAC os valores estão entre -19 e -10 ‰ (Dodd et al., 2002).

É também importante ressaltar que vários estudos têm demonstrado que a expressão de MAC pode ser altamente flexível e dependente não só da espécie de planta, mas também sobre as características dos tecidos, a fase de desenvolvimento de órgãos e das condições ambientais (Herrera, 2009; Freschi et al., 2010a, b; Ping et al., 2010; Borland et al., 2011). Assim como em outras espécies de caule suculento e verde, sob condições de deficiência hídrica, *J. curcas* parece ser capaz de variar entre o metabolismo fotossintético foliar C<sub>3</sub> para o MAC, de forma mais marcante no caule (Maes et al., 2009; Rajaona et al., 2013; Silva et al., 2013; Winter e Holtum, 2015).

## REFERÊNCIAS

Andréo-Souza, Y., Pereira, A.L., Silva, F.F.S., Riebeiro-Reis, R.C., Evangelista, M.R.V., Castro, R.D. and Dantas, B.F. (2010). Effect of Salinity on Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Seed Germination and Seedling Initial Growth. **Revista Brasileira de Sementes** 32: 83-92.

Aroca, R., Porcel, R., Ruiz-Lozano, M.J. (2012). Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. **Journal of Experimental Botany** 63: 43-57.

Arruda, F.P., Beltrão, N.E.M., Andrade, A.P. de, Pereira, W.E., Severino L.S. (2004). Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas** 8: 789-799.

Ashraf, M., Harris, P.J.C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica** 51: 163-190.

Behera, S. K.; Srivastava, P.; Tripathi, R.; Singh, J. P.; Singh, N. (2010). Evaluation of plant performance of *Jatropha curcas* L. under different agro-practices for optimizing biomass – A case study. **Biomass & Bioenergy** 34:30-41.

Brilhaus, D., Brautigam, A., Mettler-Altmann, T., Winter, K., Weber, A.P.M. (2016). Reversible burst of transcriptional changes during induction of crassulacean acid metabolism in *Talinum triangulare*. **Plant Physiology** 170: 102-122.

Borland, A.M., Zambrano, V.A.B., Ceusters, J., Shorrocks, K. (2011). The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. **New Phytologist** 191: 619–633.

Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany** 103(4): 551-560.

Davies, B.N., Griffiths, H. (2012). Competing carboxylases: circadian and metabolic regulation of Rubisco in C3 and CAM *Mesembryanthemum crystallinum* L. **Plant, Cell and Environment** 35: 1211-1220.

da Silva, L.D., de Santana, T.A., de Oliveira, P.S., Laviola, B.G., da Costa, M.G.C., de Almeida, A.F., & Gomes, F.P. (2016). Abscisic acid-mediated stomatal closure and antioxidant defenses in *Jatropha curcas* L. seedlings submitted to moderate water deficit. **African Journal of Agricultural Research** 11(30): 2806-2816.

de Oliveira, P. S., da Silva, L. D., de Santana, T. A., Laviola, B. G., Paiva, A. Q., Mielke, M. S., & Gomes, F. P. (2016). Morphophysiological changes in young plants of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) subjected to water stress and recovery. **African Journal of Agricultural Research** 11(45): 4692-4703.

de Santana, T.A., Oliveira, P.S., Silva, L.D., Laviola, B.G., Almeida, A-A.F., Gomes, F.P. (2015). Water use efficiency and consumption in different Brazilian genotypes of *Jatropha curcas* L. subjected to soil water deficit. **Biomass & Bioenergy** 75: 119-125.

Dias, L.A.S., Leme, L.P., Laviola, B.G., Pallini, A., Pereira, O.L., Carvalho, M., Manfio, C.E., Santos, A.S., Sousa, L.C.A., Oliveira, T.S., Dias, D.C.F.S. (2007). **Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível**. Viçosa, MG, v.1. 40p.

Dias, L.A.S., Muller, M., Freire, E. (2008). Potencial do uso de oleaginosas arbóreas em sistemas silvipastoris. In: Fernandes, E.M., Paciullo, D.S.C., Castro, C.R.T., Muller, M.D., Arcuri, P.B., Carneiro, J.C. (Org.) **Sistemas agrossilvipastoris na América do Sul: desafios e potencialidades**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p.283-314.

Díaz-López, L., Gimeno, V., Simón, I., Martínez, V., Rodríguez-Ortega, W.M., García-Sánchez, F. (2012). *Jatropha curcas* seedlings show a water conservation strategy under drought conditions based on decreasing leaf growth and stomatal conductance. **Agricultural Water Management** 105:48-56.

Dodd, A.N., Borland, A.M., Haslam, R.P., Griffiths, H., Maxwell, K. (2002). Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. **Journal of Experimental Botany** 53:569-580.

Fini, A., Bellasio, C., Pollastri, S., Tattini, M., Ferrini, F. (2013). Water relations, growth, and leaf gas exchange as affected by water stress in *Jatropha curcas*. **Journal of Arid Environments** 89: 21-29.

Foyer, C.H., Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. **Antioxidants & Redox Signaling** 11(4): 861-905.

Freitas, R.G., Missio, R.F., Matos, F.S., Resende, M.D.V., Dias, L.A.S. (2011). Genetic evaluation of *Jatropha curcas*: an important oilseed for biodiesel production. **Genetics and Molecular Research** 10: 1490-1498.

Freschi, L., Rodrigues, M.A., Silva Domingues, D., Purgatto, E., Van Sluys, M.-A., Magalhaes, J.R., Kaiser, W.M., Mercier, H. (2010a) Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. **Plant Physiology** 152: 1971–1985.

Freschi, L., Takahashi, C.A., Cambuí, C.A., Semprebom, M.T.R., Cruz, A.B., Mito, P.T., Versieux, L.M., Calvente, A., Latansio-Aidar, S.R., Aidar, M.P.M. & Mercier, H. (2010b). Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. **Journal of Plant Physiology** 167(7): 526-533.

Freschi, L., Mercier, H. (2012). Connecting environmental stimuli and crassulacean acid metabolism expression: phytohormones and other signaling molecules. *Progress in Botany* 73: 231-255.

Gomes, F.P., Prado, C.H.B.A. (2007). Ecophysiology of coconut palm under water stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 19: 377-391.

Gonçalves, W.G., Costa, A.C., Lima, D.P., Silva, A.A., Megguer, C.A. (2011). Membrane permeability and relative water content in physic nuts plants submitted to fast water deficit. *Global Science and Technology* 4(1): 131-139.

Herrera, A. (2009). Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? **Annals of Botany** 103(4): 645-653.

Herrera, A., Ballestrini, C., Montes, E. (2015). What is the potential for dark CO<sub>2</sub> fixation in the facultative crassulacean acid metabolism species *Talinum triangulare*? **Journal Plant Physiology** 174: 55-61.



Jaleel, C.A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inès, J, Al-Juburi, H.J., Zhao, C.X., Shao, H.B., Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense response: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiology Plantarum** 31: 427-436.

Kheira, A.A.A., Atta, N.M.M. (2009). Response of *Jatropha curcas* L. to water deficit: Yield, water use efficiency and oilseed characteristics. **Biomass & Bioenergy**, 33: 1343-1350.

Kotowska, M.M., Hertel, D., Abou Rajab, Y., Barus, H., Schuldt, B. (2015). Patterns in hydraulic architecture from roots to branches in six tropical tree species from cacao agroforestry and their relation to wood density and stem growth. **Frontiers in Plant Science** 6:191.

Kramer, P.J., Boyer, J.S. (1995). **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic.

Kumar, A., Sharma, S. (2008). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **Industrial Crops and Products** 28: 1-10.

Laviola, B.G., Silva, S.D.A., Juhász, A.C.P., Rocha, R.B., Oliveira, R.J.P., Albrecht, J.C., Alves, A.A., Rosado, T.B. (2014). Desempenho agrônômico e ganho genético pela seleção de pinhão-mansão em três regiões do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 49(5): 356-363.

Laviola, B.G., Alves, A.A., Gurgel, F.D., Rosado, T.B., Rocha, R.B., Albrecht, J.C. (2012). Estimates of genetic parameters for physic nut traits based in the germplasm two years evaluation. **Ciência Rural** 42: 429-435.

Maes, W.H., Achten, W.M.J., Reubens, B., Raes, D., Samson, R., Muys, B. (2009). Plant–water relationships and growth strategies of *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. **Journal of Arid Environments** 73: 877-884.

Matiz, A., Mioto, P.T., Mayorga, A Y., Freschi, L., Mercier, H. (2013). CAM photosynthesis in bromeliads and agaves: what can we learn from these plants? In: **Photosynthesis**, Prof. Zvy Dubinsky (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/56219.

Osmond, C.B. (1978). Crassulacean acid metabolism - curiosity in context. **Annual Review of Plant Physiology** 29(29): 379-414.

Pecina-Quintero, V., Anaya-López, J.L., Zamarripa-Colmenero, A., Núñez-Colín, C.A., Montes-García, N., Solís-Bonilla, J.L., Jiménez-Becerril, M.F. (2014). Genetic structure of *Jatropha curcas* L. in Mexico and probable centre of origin. **Biomass & Bioenergy** 60: 147-155.

Pierce, S., Winter, K., Griffiths, H. (2002). Carbon isotope ratio and the extent of daily CAM use by Bromeliaceae. **New Phytologist** 156: 75-83.

Ping, C.Y., Lee, Y-I., Lin, T.S., Yang, W.J., Lee, G.C. (2010). Crassulacean acid metabolism in *Phalaenopsis aphrodite* var. *formosa* during different developmental stages. **Acta Horticulturae** 878: 71-77.

Pompelli, M.F., Barata-Luís, R., Vitorino, H.S., Gonçalves, E.R., Rolim, E.V., Santos, M.G., Almeida-Cortez, J.S., Ferreira, V.M., Lemos, E.E., Endres, L. (2010a). Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. **Biomass & Bioenergy** 34: 1207-1215.

Pompelli, M.F., Orozco, A.J.J., Oliveira, M.T., Rodrigues, B.R.M., Barbosa, M.O., Santos, M. G., Oliveira, A.F.M., Cortez, J.S.A. (2011). Crise energética mundial e o papel do Brasil na problemática de biocombustíveis. **Revista Agronomía Colombiana** 29(2): 231-240.

Rajaona, A.M., Brueck, H., Asch, F. (2013). Leaf gas exchange characteristics of *Jatropha* as affected by nitrogen supply, leaf age and atmospheric vapour pressure deficit. **Journal of Agronomy and Crop Science** 199: 144-153.

Sapeta, H., Costa, J.M., Louren, T., Maroco, J., Van der Linde, P., Oliveira, M.M. (2013) Drought stress response in *Jatropha curcas*: Growth and physiology. **Environmental and Experimental Botany** 85:76-84.

Saturnino, H.M., Pacheco, D.P., Kakida, J., Tominaga, N., Gonçalves, N. P. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

Sharma S, Dhamija HK, Parashar B. (2012). *Jatropha curcas*: A Review. **Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences** 2: 107-111.

Silva, E.N., Ferreira-Silva, S.L., Fontenele, A.V., Ribeiro, R.V., Viégas, R.A., Silveira, J.A.G. (2010a). Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. **Journal Plant Physiology** 167: 1157-1164.

Silva, E.N., Ferreira-Silva, S.L., Viégas, R.A., Silveira, J.A.G. (2010b). The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. **Environmental Experimental Botany** 69: 279-285.

Silva, E.N., Ribeiro, R.V., Ferreira-Silva, S.L., Vieira, A.S., Ponte, L.A.F., Silveira, J.A.G. (2012). Coordinate changes in photosynthesis, sugar accumulation and antioxidative enzymes improve the performance of *Jatropha curcas* plants under drought stress. **Biomass & Bioenergy** 45: 270-279.

Silva, M.N., Silva, L.D., Oliveira, P.S., Gomes, L.M.C., Mielke, M.S., Almeida, A-A.F., Laviola, B.G., Gomes, F.P. (2013). **First insights on drought-induced crassulassean acid metabolism (CAM) in physic nut leaves**. In: XIV Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Poços de Caldas, MG, Brasil, p.35.

Silva, E.N., Silveira, J.A.G., Ribeiro, R.V., Vieira, S.A. (2015a). Photoprotective function of energy dissipation by thermal processes and photorespiratory mechanisms in *Jatropha curcas* plants during different intensities of drought and after recovery. **Environmental and Experimental Botany** 110: 36-45.

Silvera, K., Neubig, K.M., Whitten, W.M., Williams, N.H., Winter, K., Cushman, J.C. (2010a). Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. **Functional Plant Biology** 37: 995-1010.

Silvera, K., Santiago, L.S. & Winter, K. (2010b). The incidence of Crassulacean acid metabolism in the Orchidaceae derived from carbon isotope ratios: a checklist of the flora of Panama and Costa Rica. **Botanical Journal of the Linnean Society** 163(2): 194-222.

Sunagawa, H., Cushman, J.C. & Agaric, S. (2010). Crassulacean acid metabolism may alleviate production of reactive oxygen species in a facultative CAM plant, the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. **Plant Production Science** 13(3): 256-260.

Tominaga, N., Kakida, J., Yasuda, E.K. (2007). **Cultivo de pinhão-manso para produção de biodiesel**. Viçosa: Centro de Produções Técnicas, 220p.

West-Eberhard, M., Smith, J.A., Winter, K. (2011). Photosynthesis, reorganized. **Science** 332: 311-312.

Winter, K., Holtum, J.A.M. (2014). Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) plants: powerful tools for unravelling the functional elements of CAM photosynthesis. **Journal Experimental Botany** 65: 3425-3441.

Winter, K., Holtum, J.A.M. (2015). Cryptic crassulacean acid metabolism (CAM) in *Jatropha curcas*. **Functional Plant Biology** 42: 711-717.

Yang, H., Zhou, Y., Liu, J.G. (2009) Land and water requirements of biofuel and implications for food supply and the environment in China. **Energy Policy** 37(5): 1876-1885.

## CAPÍTULO 1

### ALTERAÇÕES NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO INDUZIDAS PELA DEFICIÊNCIA HÍDRICA EM GENÓTIPOS DE *Jatropha curcas*

#### EXTRATO

No Brasil, com o advento do Programa Brasileiro de Biodiesel e o surgimento de grande demanda por óleos vegetais, *Jatropha curcas* L. tem sido divulgada como uma alternativa para fornecimento de matéria-prima. Sua produção tem crescido em regiões áridas e semi-áridas, principalmente pela sua rusticidade e produção em áreas de baixa pluviosidade. O objetivo desta pesquisa foi abordar a amplitude da mudança C3-MAC induzida pela seca em *J. curcas*. A área foliar específica (AFE) diferiu significativamente ( $p < 0.05$ ) para os genótipos e entre os regimes hídricos, onde, verificou-se aumento na AFE das plantas controle 124, 168, 226 e 298. O potencial hídrico foliar ao amanhecer ( $\Psi_{am}$ ) não foi alterado quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica (DH). Entretanto, o genótipo 222 foi o único a diferir entre os regimes hídricos para o potencial hídrico meio dia ( $\Psi_{md}$ ). Em relação à eficiência intrínseca ( $P_N/g_s$ ) e instântanea ( $P_N/E$ ) do uso da água, verificou-se que houve aumento significativo de 47 e 27% nas plantas sub DH em relação às plantas controle. A atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) nas plantas sob DH determinadas em folhas coletadas às 4 e 16 h apresentou aumento de 167 e 187%, respectivamente, em relação às plantas controle. O acúmulo de ácidos orgânicos (malato e citrato) diferenciou entre os genótipos e os tratamentos de DH para todas as quantificações. Verificou-se acréscimo em média de 176% para as plantas controle e 270% para as plantas submetidas à DH, quando comparados o citrato em relação ao malato. Observou-se aumento de 62% no teor de açúcares solúveis totais (AST) nas plantas sob DH quando comparadas aos seus controles. Já para o amido houve um maior conteúdo nas plantas controle de 78% em média quando comparadas às plantas sob DH. Aumentos significativos ( $p < 0.05$ ) na composição isotópica foram observados em folhas de plantas submetidas à DH. A análise multivariada demonstrou que das variáveis bioquímicas, o citrato foi o que mais contribuiu para a formação dos grupos, além disso, das variáveis de crescimento, a área total de radicular foi a que apresentou a maior contribuição. Embora *J. curcas* ser considerada uma planta que tolera a seca, ela é capaz de aumentar a eficiência do uso da água mudando de C3 para metabolismo MAC sob baixa disponibilidade de água.

**Palavras chave:** ácidos orgânicos, Euphorbiaceae, isótopos de carbono, metabolismo ácido das crassuláceas

## CHANGES IN METABOLISM PHOTOSYNTHETIC INDUCED BY WATER STRESS IN *Jatropha curcas* GENOTYPES

### ABSTRACT

In Brazil, with the advent of the Brazilian Biodiesel Program and the emergence of strong demand for vegetable oils, *Jatropha curcas* L. has been disclosed as an alternative to the supply of raw material. Its production has grown in arid and semi-arid regions, mainly because of its hardiness and production in low rainfall areas. The objective of this research was to address the range of C3-MAC change-induced drought in *J. curcas* through assessments acidification overnight leaf and stem tissues. Specific leaf area (SLA) differed significantly ( $p < 0.05$ ) for the genotypes and water regimes, where there was an increase in the SLA plant control 124, 168, 226 and 298. The leaf water potential at dawn ( $\Psi_{am}$ ) was not changed when the plants were subjected to water stress (WS). Regarding the intrinsic efficiency ( $P_N/g_s$ ) and instantaneous ( $P_N/E$ ) the use of water, there was a significant increase of 47% and 27 sub WS plants relative to control plants. The activity of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in plants under WS determined in leaves collected at 4 and 16 h increased by 167 and 187%, respectively, compared to control plants. The accumulation of organic acids (malate and citrate) difference between genotypes and WS treatments for all measurements. It appears that there was an increase in average of 176% for the control plant and 270% for plants subjected to WS compared citrate to malate There was an increase of 62% in total soluble sugar content (SST) in plants under DH when compared to their controls. As for the starch content was increased in the control plants by 78% on average compared to plants under WS. There were significant differences ( $p < 0.05$ ) between genotypes and between the WS treatments, the carbon isotope discrimination. Multivariate analysis showed that the biochemical variables, citrate was the largest contributor to the formation of groups, moreover, the growth variables, the total area of root was the one with the greatest contribution. Although *J. curcas* be considered a plant that tolerates drought, it is able to increase the efficiency of use of changing water C3 for MAC metabolism under low water availability.

**Keywords:** Euphorbiaceae, abiotic stress, organic acids, carbon isotopes

## 1. INTRODUÇÃO

*Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae), conhecida popularmente como pinhão manso, é amplamente cultivada em muitas regiões tropicais e subtropicais, vista como uma promissora cultura para a produção de biodiesel, devido a riqueza de óleos em suas sementes- (Berchmans e Hirata, 2008; Van Eijck et al., 2014). O teor de óleo nas sementes pode alcançar até 50% de óleo, o qual tem sido utilizado como purgativo além de inúmeros outros usos medicinais, na fabricação de tintas e sabões e como lubrificante e combustível para motores a diesel (Kumar e Sharma, 2008). Além da sua utilização como biodiesel, o pinhão-manso apresenta alto potencial industrial, sendo o resíduo da extração do óleo rico em proteína (60-65%), podendo ser transformado em um excelente alimento para aves, ruminantes e peixes (Jongschaap et al., 2007).

Além disso, *J. curcas* apresenta caule suculento como reserva hídrica, tamponando as variações do teor de água nas folhas (Maes et al., 2009; Kai e Ming, 2011) e tolera a seca sob condições áridas e semiáridas, que oferece as vantagens de não competir diretamente contra a produção de alimentos, bem como, para atenuar a degradação do solo e recuperar terras marginais ou abandonadas (Kumar e Sharma, 2008; Pandey et al., 2012). Apesar de ser amplamente divulgada como espécie tolerante à seca, resultados recentes têm demonstrando efeito negativo da falta de água sobre várias características fisiológicas e morfológicas de *J. curcas* (Fini et al., 2013; Tominaga et al., 2014; de Santana et al., 2015; da Silva et al., 2016; de Oliveira et al., 2016; Silva et al., 2015a).

Outra estratégia de tolerância à seca, e a diversos fatores ambientais, geralmente associados, tais como, salinidade, temperatura e luminosidade, que vem sendo estudada em espécies de caule suculento, é a transição do metabolismo fotossintético C<sub>3</sub> para Metabolismo Ácido das Crassuláceas (MAC) sob deficiência hídrica (Cushman e Borland, 2002; Dodd et al., 2002). Como outras espécies, *J. curcas*, provavelmente, apresenta o MAC no caule suculento, com folhas mudando do metabolismo C<sub>3</sub> para o MAC, sendo mais eficiente no uso da água sob seca (Maes et al., 2009). Esta mudança no metabolismo é uma estratégia de plasticidade que auxilia na conservação de água, principalmente em ambientes áridos, sendo estudado em diversos gêneros de Euphorbiaceae (Cushman e Borland, 2002; Dodd et al., 2002; Herrera, 2013). O MAC é caracterizado também por um fluxo intenso de carbono diário proveniente dos carboidratos, como amido e sacarose, para a síntese de ácidos orgânicos,

como malato e citrato, que são armazenados durante o período escuro para seu uso durante o período de luz (Freschi et al., 2010b).

A expressão do MAC em espécies facultativas é determinada principalmente pelo genótipo e pela intensidade do estresse por limitação de água, mas pode também ser influenciada por fatores ambientais ontogênicos e outros (Griffiths et al., 2008; Walter et al., 2008; Aragón et al., 2012). Entretanto, as plantas MAC mostram convergência evolutiva em termos de determinadas características anatômicas e metabólicas e algumas destas características (ou seja, suculência e do espaço intercelular) são reconhecidos como determinantes putativos para restringir a gama de plasticidade fotossintética realizada por tecidos vegetais específicos (Borland et al., 2011).

A análise da composição isotópica do carbono provou ser uma técnica valiosa para inferir em longo prazo (sazonal) e mudanças diárias em carbono adquiridos diretamente através das reações escuras do MAC. A baixa discriminação em relação ao  $^{13}\text{C}$  expressa pela PEPC distingue o carbono no material vegetal fixado pelas reações escuras do MAC do fixado diretamente do  $\text{CO}_2$  atmosférico através da RUBISCO (Griffiths, 1992).

Assim, o objetivo do presente estudo foi abordar a amplitude da mudança C3-MAC induzida pela seca nas folhas e caule de *J. curcas* através de avaliações da acidificação durante a noite de tecidos foliar e caulinar, bem como de alterações fisiológicas e de crescimento. Testaram-se as hipóteses de que (1) o metabolismo fotossintético de *J. curcas* é plástico e altera em direção ao MAC de acordo com a disponibilidade hídrica e (2) a plasticidade da alteração metabólica é variável entre os diferentes genótipos e está relacionada a ajustes anatômicos e fisiológicos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### ***2.1. Material vegetal e condições de crescimento***

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no campus da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), localizada em Ilhéus, BA (14°47'00" S, 39°02'00" W), realizado entre os meses de setembro e novembro de 2014. Durante o experimento, a radiação fotossinteticamente ativa (RFA) foi monitorada por meio de sensores quânticos S-LIA-M003, a temperatura e umidade relativa do ar foram monitoradas utilizando-se sensores microprocessados Hobo H8 Pro Series (Onset, USA). Essas variáveis foram medidas e



armazenadas permanentemente por coletores de dados Hobo Micro Station Data Logger (Onset, USA).

Sementes de *J. curcas*, oriundas do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia – Distrito Federal, foram germinadas em vasos, contendo 12 L de latossolo amarelo distrófico. Após 20 dias da germinação realizou-se o desbaste, deixando apenas uma planta por vaso. Imediatamente os vasos foram cobertos com papel alumínio para evitar a evaporação e o aquecimento do solo, iniciando assim, o tratamento de deficiência hídrica, sendo mantido por um período de 42 dias.

Os tratamentos consistiram em dois regimes hídricos medidos em percentagem de capacidade de campo (CC): plantas controle (100% da CC) e plantas submetidas à deficiência hídrica (50% da CC) e nove genótipos (121, 124, 148, 168, 222, 215, 226, 298 e 299). As plantas controle foram mantidas, todo o período experimental, irrigadas próximo à capacidade de campo (potencial mátrico do solo- variando de -33.1 a -15.2 kPa, as demais plantas foram mantidas sob deficiência hídrica, com faixa entre -207.0 e -89.9 kPa. A umidade no solo das plantas controle e de déficit hídrico (DH) foi determinada por meio do método gravimétrico e o potencial mátrico estimado utilizando uma curva de retenção de água.

## **2.1. CRESCIMENTO**

Todas as avaliações foram realizadas aos 42 dias após o tratamento (DAT). Foram avaliados a altura, o diâmetro do coleto, o número de folhas e a área foliar. Para a determinação da área foliar, realizou-se medições do comprimento da nervura principal (P) e largura máxima (L) das folhas e, com estes dados aplicou-se a equação ( $AF = (P \times L)^{0.966}$ ) sugerida por Pompelli et al. (2012). O volume de raiz (cm<sup>3</sup>), comprimento de raiz (cm), área total de raiz (cm<sup>2</sup>) e área de superfície de raiz (cm<sup>2</sup>) com o software *WinRHIZO* pacote comercial.

## **2.2. RELAÇÕES HÍDRICAS**

### ***2.2.1. Potencial hídrico***

Avaliou-se o potencial hídrico foliar ( $\Psi_{pd}$ ) antes do amanhecer (4:00 h), e ao meio dia ( $\Psi_{md}$ ). Utilizou-se uma câmara de pressão PMS1000 (PMS Instrument Company, EUA), segundo a metodologia de Scholander et al. (1965) (Figura 1).



**Figura 1:** Câmara de pressão 1000 (PMS Instrument Company, EUA).

### 2.2.2. Área foliar específica (AFE)

Para determinação da área foliar específica (AFE), que relaciona a superfície da folha com a massa da própria folha, utilizou-se a relação entre a área de 5 discos foliares coletados da terceira folha completamente madura e expandida e as suas respectivas massas secas.

## 2.3. DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS

Ao final do experimento (42 DAT), foram coletadas folhas em dois períodos (4 h e 16 h) e fragmentos do caule (base e ápice) e que foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e levados para freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A extração de proteínas foi realizada em amostras de folhas e caule maceradas usando um almofariz e um pistilo a frio. Após centrifugação a  $14.000g$  durante 30 min, o sobrenadante foi recolhido e utilizado nas atividades enzimáticas. A quantidade de proteína no extrato foi determinada pelo método de Bradford (1976). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro leitor de microplacas (SpectraMAX<sup>®</sup> Paradigm<sup>®</sup> - Multi-mode detection platform, Molecular Devices).

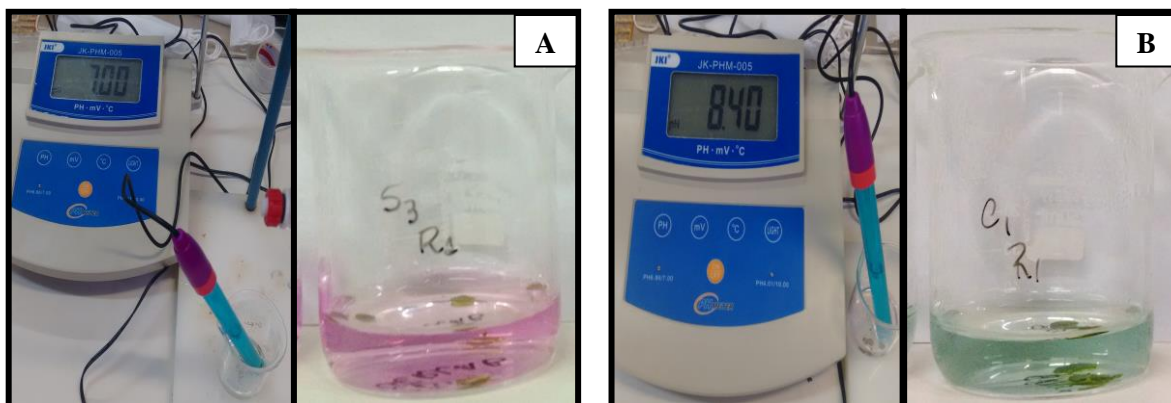
### 2.3.1. Atividade da PEPC (E.C. 4.1.1.31)

Aproximadamente 0.02 g de material liofilizado foi macerado em meio de extração contendo 400  $\mu\text{L}$  de tampão EDTA 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, PMSF 1 mM e PVP-40 1% dissolvidos em Tris-HCl 50 mM pH 7.8 e procedeu-se a ultrasonicação das amostras (Ultrasonic processor Gex 130, 130 W) em gelo até o rompimento total dos tecidos, com pulsos de 8 s, a intervalos de 10 s, e amplitude de 70%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 x g a 4 °C. Coletou-se o sobrenadante e a atividade de PEPC foi medida após a extinção de NADH pela diminuição da absorbância em 340 nm até 300 s (Degl'innocenti et al., 2002). A atividade foi realizada em uma mistura de reação contendo  $\text{NaHCO}_3$  10 mM, NADH 0.3 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM e MDH 33 nkat dissolvidos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.8 e extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de fosfoenolpiruvato (PEP) 20 mM.

## 2.4. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

### 2.4.1. Acidez titulável

Para a quantificação da acidez titulável, discos foliares frescos (5 mm) foram coletados, pesados e armazenados em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  até as posteriores análises. Três discos foliares fervidos em 10 mL de água deionizada por 15 minutos. Após este tempo, foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  de fenolftaleína para a estimativa de  $\text{H}^+$  correspondente a malato (pH 7.0) de acordo com Nobel, (1988), e 30  $\mu\text{L}$  de azul de bromotimol para citrato (pH 8.4) sendo tituladas com NaOH 0.01 N (Figura 2). A variação de acidez ( $\Delta\text{H}^+$ ) foi calculada como a diferença entre o entardecer (16 h) e ao amanhecer (4 h). As análises foram feitas em triplicatas, e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol H}^+ \text{g}^{-1}$  de massa fresca.



**Figura 2:** Titulação de acidez do malato pH 7.0 (A) e citrato pH 8.4 (B).

#### ***2.4.2. Teor de açúcares solúveis totais e amido***

A quantificação dos açúcares solúveis totais (AST) foi realizada de acordo com a metodologia de Clegg et al. (1956). Foram extraídos homogeneizando-se 100 mg do material liofilizado com 5 mL de etanol a 80% fervente, seguido de agitação e subsequente repouso por 5 minutos. Foram adicionados mais 5 mL do etanol, centrifugando por 10 minutos a 5.000 g. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico com capacidade para 50 mL e o resíduo lavado com soluções etanólica e centrifugado mais três vezes. Os sobrenadantes foram combinados e o volume completado para 25 mL com solução etanólica 80%. Posteriormente, os extratos foram despigmentados com clorofórmio e evaporados em placa de aquecimento a 60 °C. O resíduo resultante foi dissolvido em 5 mL de água destilada. Desse extrato alíquotas foram separadas para a quantificação dos açúcares solúveis totais, sendo feitas leituras de absorvância em 490 nm em espectrofotômetro, utilizando-se como padrão a glicose e água como branco, usando-se o mesmo volume que o extrato.

Para a determinação do amido, foram realizadas duas extrações consecutivas do material, utilizando o mesmo extrator, a 80 °C por 30 min. Em seguida, foi realizado um novo ciclo de duas extrações consecutivas com 6.5 mL de ácido perclórico a 52%, por 15 min, a 25°C, seguidas de centrifugações a 3.000 x g por 10 min onde o sobrenadante foi separado e a operação repetida mais uma vez. A quantificação do amido foi feita pela reação com antrona (0.2%), conforme método de McCready et al. (1950) e a leitura das amostras, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm, utilizando-se solução de glicose de 0 a 50 µg. mL<sup>-1</sup> como padrão.

#### ***2.4.3. Composição isotópica de carbono $\delta^{13}C$***

Amostras de folhas foram secas e trituradas e, aproximadamente 1 mg do pó fino foi acondicionado em cápsulas de estanho 3 mm x 35 mm (Experimental Microanalysis Ltd., Okehampton, United Kingdom). As amostras foram enviadas para análises no Laboratório Godwin da Universidade de Cambridge, Reino Unido. As leituras foram realizadas através de um analisador elementar Costech acoplado a um espectrômetro de massa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As medidas de espectrometria de massa foram realizadas através do software em escala linear de normalização de dois pontos <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C (Paul et al., 2007) e dois materiais de referências: IAEA-600 (Cafeína:  $\delta^{13}C$  -27.5 ‰, quando n = 4,

medida  $\delta^{13}\text{C}$  -27.52 ‰, sd = 0.04 ‰ e USGS 40 (ácido L-glutâmico:  $\delta^{13}\text{C}$  -26.2 ‰, quando n = 4,  $\delta^{13}\text{C}$  medida- 27.20 ‰, sd = 0.03 ‰). Referência padrão da AIEA em Viena ocorreu em intervalos ao longo da sequência e esses valores foram usados para calibrar os valores internacionais para  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$  de VPDB).

## 2.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 9, formado por dois níveis de disponibilidade hídrica e nove genótipos de *J. curcas*, com cinco repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos ao teste F a 5 % de significância, por ANOVA fatorial e, quando indicado, a comparações de médias pelo teste de Scott Knott no mesmo nível de significância.

Foram realizados o agrupamento e componentes principais, utilizando variáveis de crescimento (altura, diâmetro do colo, número de folhas, área foliar, volume radicular, comprimento radicular, área total de raiz e área de superfície de raiz), obtidos pela diferença ( $\Delta$ ) entre as plantas controle (100% da CC) e plantas submetidas à deficiência hídrica (50% da CC). Como medida de dissimilaridade calculou-se a distância euclidiana média e para a formação dos agrupamentos utilizou-se o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method) com a média aritmética (Sneath e Sokal, 1973), calculando-se as taxas de contribuição relativa para a dissimilaridade pelo método de Singh (1981), e o ponto de corte com base na distância Euclidiana. As análises foram realizadas com auxílio do Programa Genes 7.0 (Cruz, 2008) e o dendrograma foi obtido pelo programa STATISTICA 7.1 (Statsoft, 2005)

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Condições experimentais

Os valores mínimos e máximos de temperatura do ar (T) observados durante o período experimental foi de 20 e 29°C, respectivamente. A umidade relativa média do ar (UR) registrada foi de 75%. O valor médio da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) integrada ao longo do dia foi de 12.1 mol fótons  $\text{m}^{-2} \text{dia}^{-1}$  (Tabela 1.)

**Tabela 1:** Variação na radiação fotossinteticamente ativa (RFA -mol fótons m<sup>-2</sup>dia<sup>-1</sup>), temperatura do ar (T -°C) e umidade relativa (UR - %) dentro da casa de vegetação durante o período experimental. Os valores correspondem à média (erro padrão da média), máximo e o mínimo diário.

	<b>Média</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>
RFA	12.1 (0.00)	19.3	5.4
T	26.2 (0.01)	29.2	20.6
UR	74.8 (0.05)	92.4	60.6

### 3.2. Crescimento

Com exceção do diâmetro do coleto verificou-se que não houve diferenças significativas para as variáveis de crescimento entre os genótipos, onde o 148, 226 e 298 foram influenciados negativamente pela DH (Tabela 2).

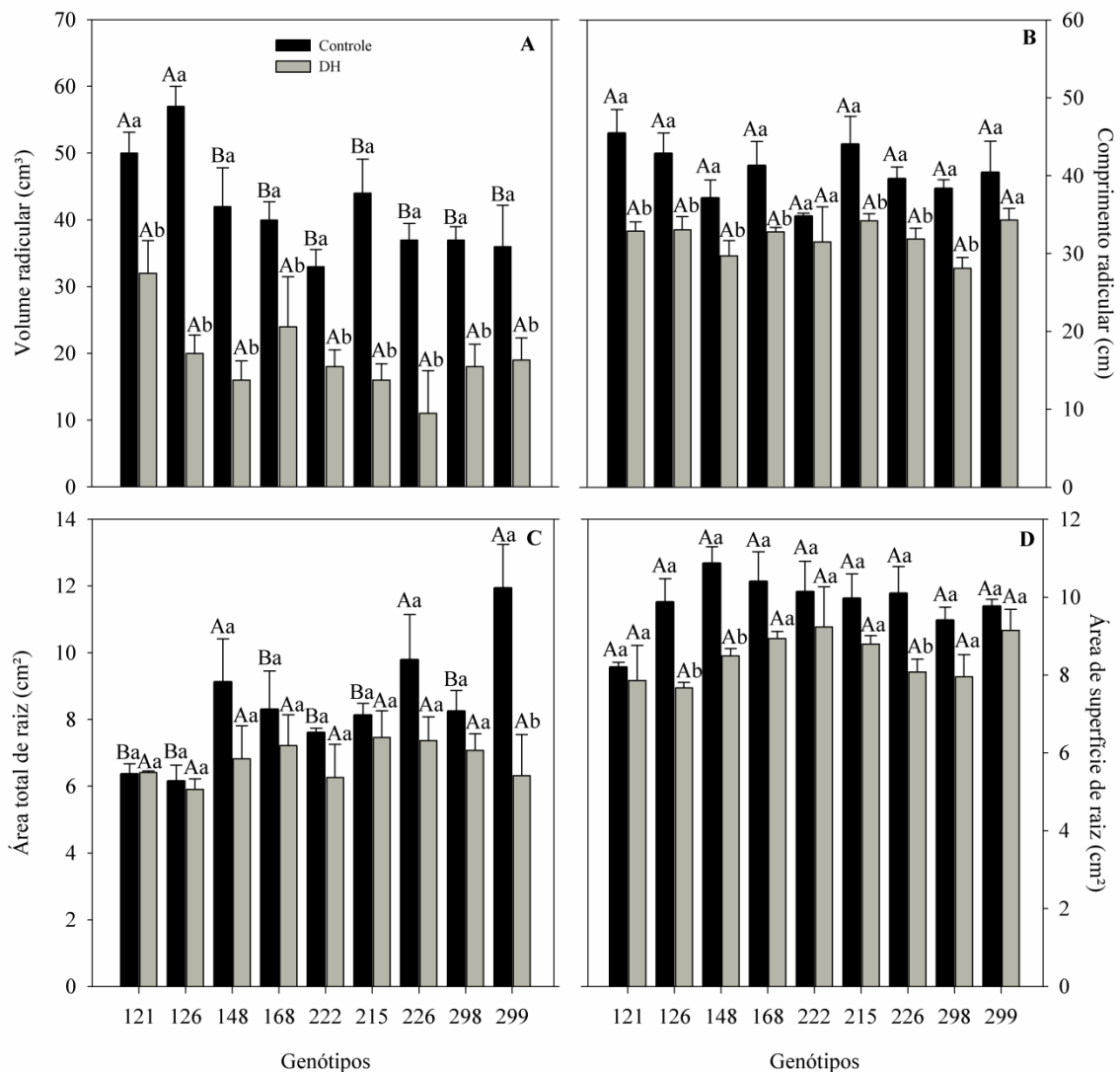
**Tabela 2:** Área foliar (AF), altura (A), diâmetro (D) e número de folhas (NF) de plantas jovens de *J. curcas* aos 42 DAT. Valores médios 5 repetições ( $\pm$  erro padrão, n = 5).

<b>Genótipos</b>		<b>AF (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>A (cm)</b>	<b>D (cm)</b>	<b>NF</b>
121	Controle	2515.8 $\pm$ 214.8 <sup>Aa</sup>	50.8 $\pm$ 2.2 <sup>Aa</sup>	2.44 $\pm$ 0.0 <sup>Aa</sup>	18.6 $\pm$ 0.8 <sup>Aa</sup>
	DH	1711.4 $\pm$ 144.3 <sup>Aa</sup>	39.6 $\pm$ 3.2 <sup>Ab</sup>	2.18 $\pm$ 0.0 <sup>Ab</sup>	17.0 $\pm$ 0.5 <sup>Aa</sup>
124	Controle	2814.9 $\pm$ 266.9 <sup>Aa</sup>	48.0 $\pm$ 1.7 <sup>Aa</sup>	2.44 $\pm$ 0.0 <sup>Aa</sup>	19.4 $\pm$ 1.2 <sup>Aa</sup>
	DH	1742.5 $\pm$ 160.3 <sup>Ab</sup>	33.8 $\pm$ 2.9 <sup>Ab</sup>	2.04 $\pm$ 0.1 <sup>Ab</sup>	14.8 $\pm$ 0.8 <sup>Aa</sup>
148	Controle	2723.4 $\pm$ 604.9 <sup>Aa</sup>	51.0 $\pm$ 4.6 <sup>Aa</sup>	2.32 $\pm$ 0.0 <sup>Aa</sup>	20.4 $\pm$ 1.1 <sup>Aa</sup>
	DH	1647.9 $\pm$ 215.3 <sup>Ab</sup>	36.2 $\pm$ 4.0 <sup>Ab</sup>	1.94 $\pm$ 0.1 <sup>Bb</sup>	15.4 $\pm$ 1.0 <sup>Aa</sup>
168	Controle	2701.8 $\pm$ 197.4 <sup>Aa</sup>	50.6 $\pm$ 2.9 <sup>Aa</sup>	2.50 $\pm$ 0.0 <sup>Aa</sup>	18.6 $\pm$ 0.6 <sup>Aa</sup>
	DH	2141.2 $\pm$ 188.3 <sup>Aa</sup>	40.4 $\pm$ 3.0 <sup>Ab</sup>	2.25 $\pm$ 0.0 <sup>Ab</sup>	16.0 $\pm$ 0.7 <sup>Aa</sup>
222	Controle	2621.4 $\pm$ 309.6 <sup>Aa</sup>	48.0 $\pm$ 2.3 <sup>Aa</sup>	2.41 $\pm$ 0.0 <sup>Aa</sup>	20.2 $\pm$ 2.7 <sup>Aa</sup>
	DH	1819.4 $\pm$ 132.3 <sup>Aa</sup>	37.4 $\pm$ 2.0 <sup>Ab</sup>	2.06 $\pm$ 0.0 <sup>Ab</sup>	16.2 $\pm$ 1.0 <sup>Aa</sup>
215	Controle	3313.8 $\pm$ 578.7 <sup>Aa</sup>	54.8 $\pm$ 3.9 <sup>Aa</sup>	2.44 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>	26.0 $\pm$ 5.1 <sup>Aa</sup>
	DH	1996.1 $\pm$ 90.4 <sup>Ab</sup>	42.0 $\pm$ 1.1 <sup>Ab</sup>	2.06 $\pm$ 0.0 <sup>Ab</sup>	17.6 $\pm$ 1.6 <sup>Ab</sup>
226	Controle	2504.1 $\pm$ 299.2 <sup>Aa</sup>	48.7 $\pm$ 4.5 <sup>Aa</sup>	2.33 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>	21.2 $\pm$ 3.3 <sup>Aa</sup>
	DH	1378.1 $\pm$ 139.0 <sup>Ab</sup>	31.4 $\pm$ 3.4 <sup>Ab</sup>	1.90 $\pm$ 0.0 <sup>Bb</sup>	15.8 $\pm$ 1.4 <sup>Aa</sup>
298	Controle	2255.6 $\pm$ 69.7 <sup>Aa</sup>	50.8 $\pm$ 1.2 <sup>Aa</sup>	2.29 $\pm$ 0.0 <sup>Aa</sup>	18. $\pm$ 0.4 <sup>Aa</sup>
	DH	1783.8 $\pm$ 228.4 <sup>Aa</sup>	34.5 $\pm$ 2.9 <sup>Ab</sup>	1.80 $\pm$ 0.0 <sup>Bb</sup>	16.4 $\pm$ 1.3 <sup>Aa</sup>
299	Controle	3422.5 $\pm$ 495.9 <sup>Aa</sup>	47.4 $\pm$ 2.3 <sup>Aa</sup>	2.24 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>	20.4 $\pm$ 2.7 <sup>Aa</sup>
	DH	1806.7 $\pm$ 226.1 <sup>Ab</sup>	38.6 $\pm$ 2.0 <sup>Ab</sup>	2.13 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>	17.4 $\pm$ 2.1 <sup>Aa</sup>

Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

Apenas os genótipos 124, 148, 215, 226 e 299 foram influenciados negativamente pela DH para a AF, com reduções de 62, 61, 60, 55 e 53%, respectivamente. Entretanto, a DH afetou a altura em todos os genótipos, reduções em média de 74% quando comparadas às plantas controle. Em relação ao diâmetro do coleto, todos os genótipos diferiram significativamente para os regimes hídricos aplicados, tendo o 299 como exceção. Já para o número de folhas, somente o genótipo 215 diferiu dos demais entre os tratamentos de DH.

O volume radicular diferenciou significativamente ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos, onde o 121 e 126 apresentaram maior volume em relação aos demais (Figura 3A). Não foram verificadas diferenças para o comprimento radicular os genótipos, entretanto, diferenças significativas foram verificadas nas plantas submetidas à DH (Figura 3B).



**Figura 3:** Volume radicular (A), comprimento radicular (B), área total de raiz (C) e área de superfície de raiz (D) de plantas jovens de *J. curcas* aos 42 DAT. As colunas são médias de 3-4 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

Verificou-se que os genótipos 148, 226 e 299 diferenciaram dos demais quando avaliada a área total de raiz (Figura 2C). Além disso, o genótipo 299 diferiu dos demais em relação ao tratamento de DH. Não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos para a área de superfície de raiz (Figura 2D). Entretanto, somente os genótipos 126, 148 e 226 diferiram entre os regimes hídricos.

### 3.3. Relações hídricas

Ao analisarmos os valores do potencial hídrico  $\Psi_{am}$  e  $\Psi_{md}$ , verificamos que não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos, entretanto, somente o 222 diferiu dos demais em relação ao tratamento de DH ao meio dia (Tabela 3).

**Tabela 3:** Valores de potencial hídrico antemanhã ( $\Psi_{am}$ ) e ao meio dia ( $\Psi_{md}$ ) medidos aos 42 DAT. Valores médios de 3 repetições ( $\pm$  erro padrão,  $n = 3$ ).

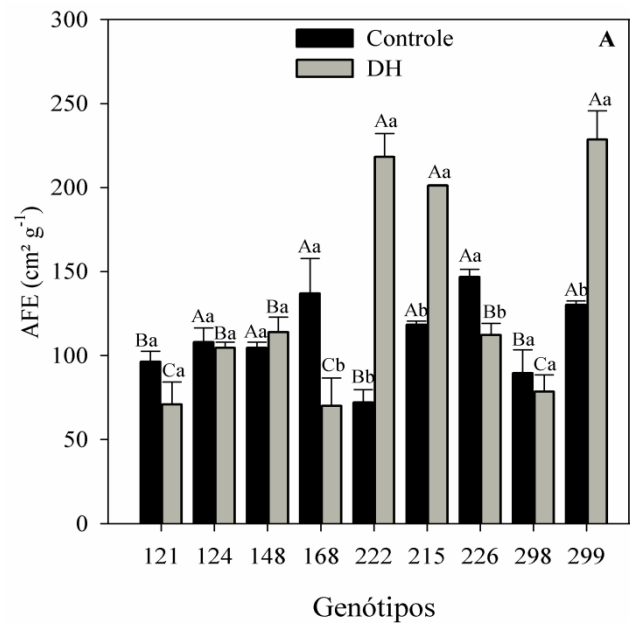
Genótipos	$\Psi_{am}$ (MPa)		$\Psi_{md}$ (MPa)	
	Controle	DH	Controle	DH
121	-0.47 $\pm$ 0.08 <sup>Aa</sup>	-0.57 $\pm$ 0.08 <sup>Aa</sup>	-1.00 $\pm$ 0.05 <sup>Aa</sup>	-1.33 $\pm$ 0.16 <sup>Aa</sup>
124	-0.43 $\pm$ 0.06 <sup>Aa</sup>	-0.48 $\pm$ 0.07 <sup>Aa</sup>	-1.03 $\pm$ 0.03 <sup>Aa</sup>	-1.13 $\pm$ 0.20 <sup>Aa</sup>
148	-0.32 $\pm$ 0.04 <sup>Aa</sup>	-0.33 $\pm$ 0.03 <sup>Aa</sup>	-1.07 $\pm$ 0.06 <sup>Aa</sup>	-1.17 $\pm$ 0.28 <sup>Aa</sup>
168	-0.32 $\pm$ 0.04 <sup>Aa</sup>	-0.43 $\pm$ 0.03 <sup>Aa</sup>	-0.87 $\pm$ 0.06 <sup>Aa</sup>	-1.27 $\pm$ 0.14 <sup>Aa</sup>
222	-0.33 $\pm$ 0.06 <sup>Aa</sup>	-0.40 $\pm$ 0.02 <sup>Aa</sup>	-0.83 $\pm$ 0.12 <sup>Aa</sup>	-1.37 $\pm$ 0.15 <sup>Ab</sup>
215	-0.33 $\pm$ 0.06 <sup>Aa</sup>	-0.42 $\pm$ 0.07 <sup>Aa</sup>	-1.27 $\pm$ 0.03 <sup>Aa</sup>	-1.27 $\pm$ 0.13 <sup>Aa</sup>
226	-0.27 $\pm$ 0.04 <sup>Aa</sup>	-0.42 $\pm$ 0.01 <sup>Aa</sup>	-0.75 $\pm$ 0.10 <sup>Aa</sup>	-0.97 $\pm$ 0.20 <sup>Aa</sup>
298	-0.35 $\pm$ 0.07 <sup>Aa</sup>	-0.42 $\pm$ 0.06 <sup>Aa</sup>	-0.78 $\pm$ 0.20 <sup>Aa</sup>	-1.03 $\pm$ 0.14 <sup>Aa</sup>
299	-0.35 $\pm$ 0.08 <sup>Aa</sup>	-0.52 $\pm$ 0.04 <sup>Aa</sup>	-0.87 $\pm$ 0.06 <sup>Aa</sup>	-1.00 $\pm$ 0.17 <sup>Aa</sup>

Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).



Os valores médios do  $\Psi_{md}$  para o genótipo 222 variaram entre  $-0.83 \pm 0.12$  e  $-1.37 \pm 0.15$  nas plantas controle e submetidas à DH, respectivamente. Esses valores representam uma diminuição de 58% do  $\Psi_{md}$  das plantas sob DH em relação ao controle.

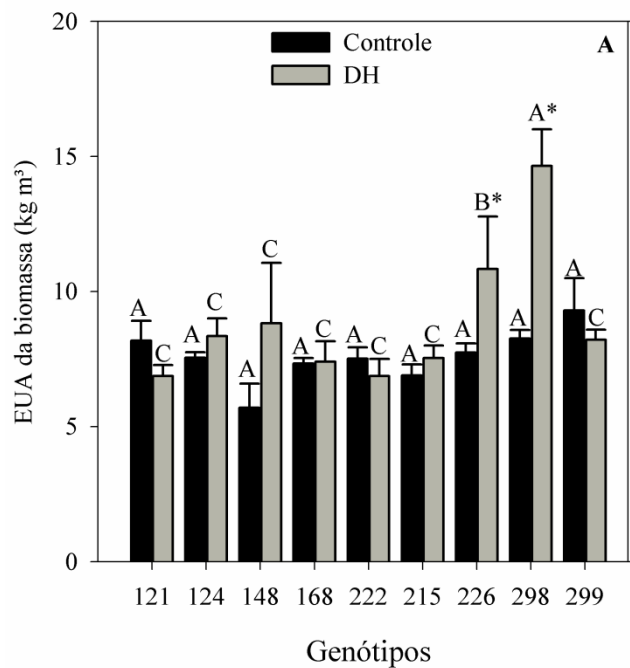
A área foliar específica (AFE) diferiu significativamente ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos e entre os tratamentos de DH. Observou-se efeito significativo do genótipo e do regime hídrico sobre a AFE, destacando-se os genótipos 226 e 222, que apresentaram o maior e menor valores, respectivamente, em plantas irrigadas (Figura 4A).



**Figura 4:** Área foliar específica (AFE, A) em *J. curcas* submetidas ao déficit hídrico aos 42 DAT. As colunas são médias de 4 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

Em relação ao efeito do tratamento de DH, destacam-se os genótipos 222, 215 e 299, onde se observou grandes aumentos de 302, 170 e 176 % na AFE, respectivamente, e 168 e 226, onde os valores em plantas sob DH foram significativamente menores.

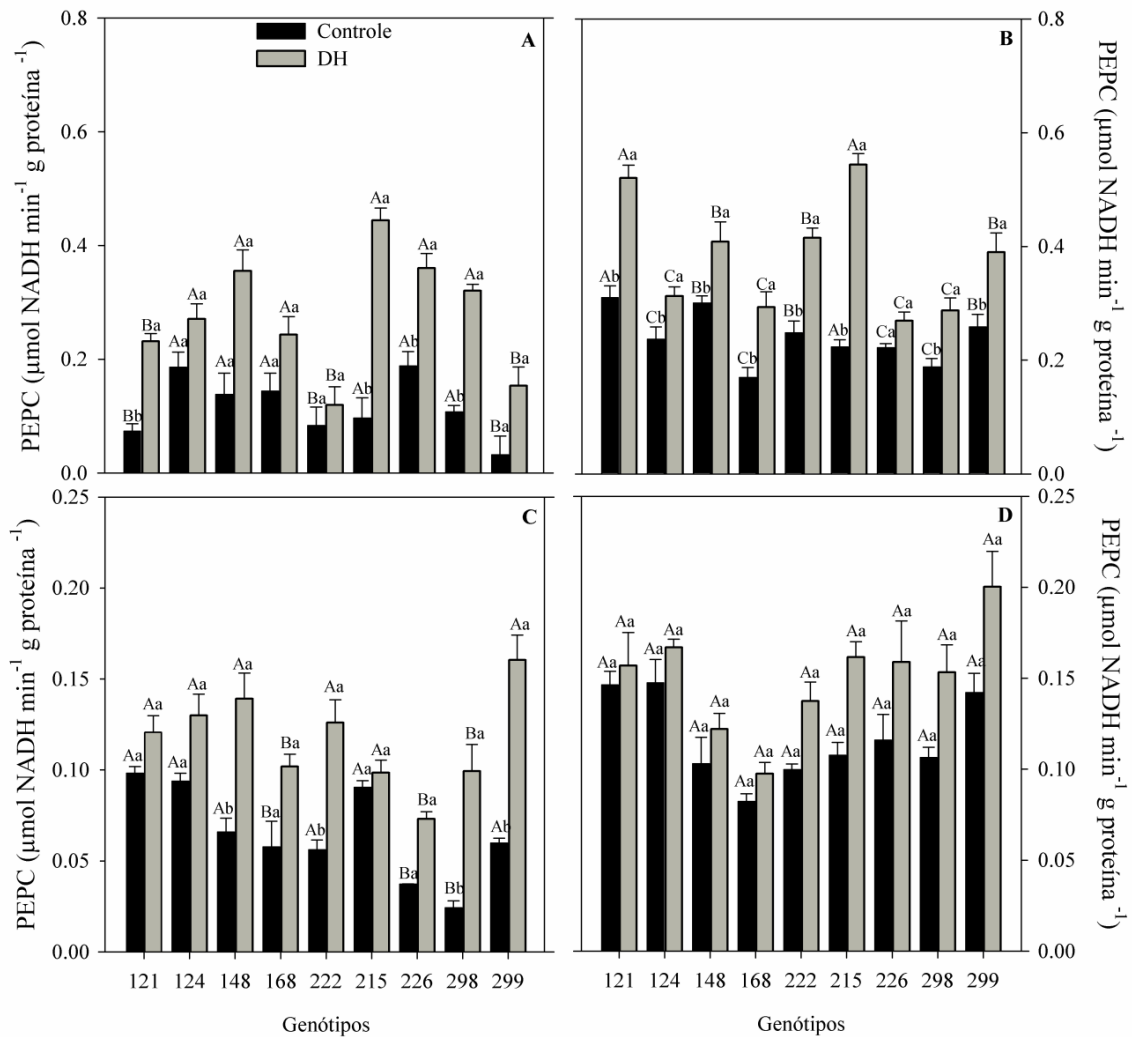
É possível verificar na figura 5A, que os genótipos diferiram entre si para a EUAb. Além disso, destacamos os genótipos 226 e 298, pois o tratamento de DH resultou em aumento de 72 e 55%, respectivamente, na EUAb.



**Figura 5:** Eficiência do uso da água da biomassa (EUAb, A) em *J. curcas* submetidas ao déficit hídrico aos 42 DAT. As colunas são médias de 3-5 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e asterisco (\*) comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Atividade da PEPC

Uma das ferramentas utilizadas para se verificar a expressão do MAC foi a determinação da atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) em material foliar colhido em dois horários. Houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos, bem como entre os regimes hídricos. Observou-se maior atividade da PEPC nas plantas submetidas à DH às 16 h quando comparadas às 4 h (Figura 6A, B). Destacamos os genótipos 121, 222 e 299 por reduções na atividade da PEPC às 4 h, diferindo assim, dos demais, quando comparadas às 16 h entre os regimes hídricos. Entretanto, aumentos significativos na atividade desta enzima foram observados nas amostras coletadas às 16 h dos genótipos 121 e 215. A atividade da PEPC nas plantas sob DH aumentou 167 e 187% em relação às plantas controle, nas amostras coletadas, respectivamente às 4 e 16 h.



**Figura 6:** Atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) em folhas às 4 h (A) e 16 h (B) e em segmentos de caule na base (C) e ápice (D) em *J. curcas* submetidas ao déficit hídrico aos 42 DAT. As colunas são médias de 4 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

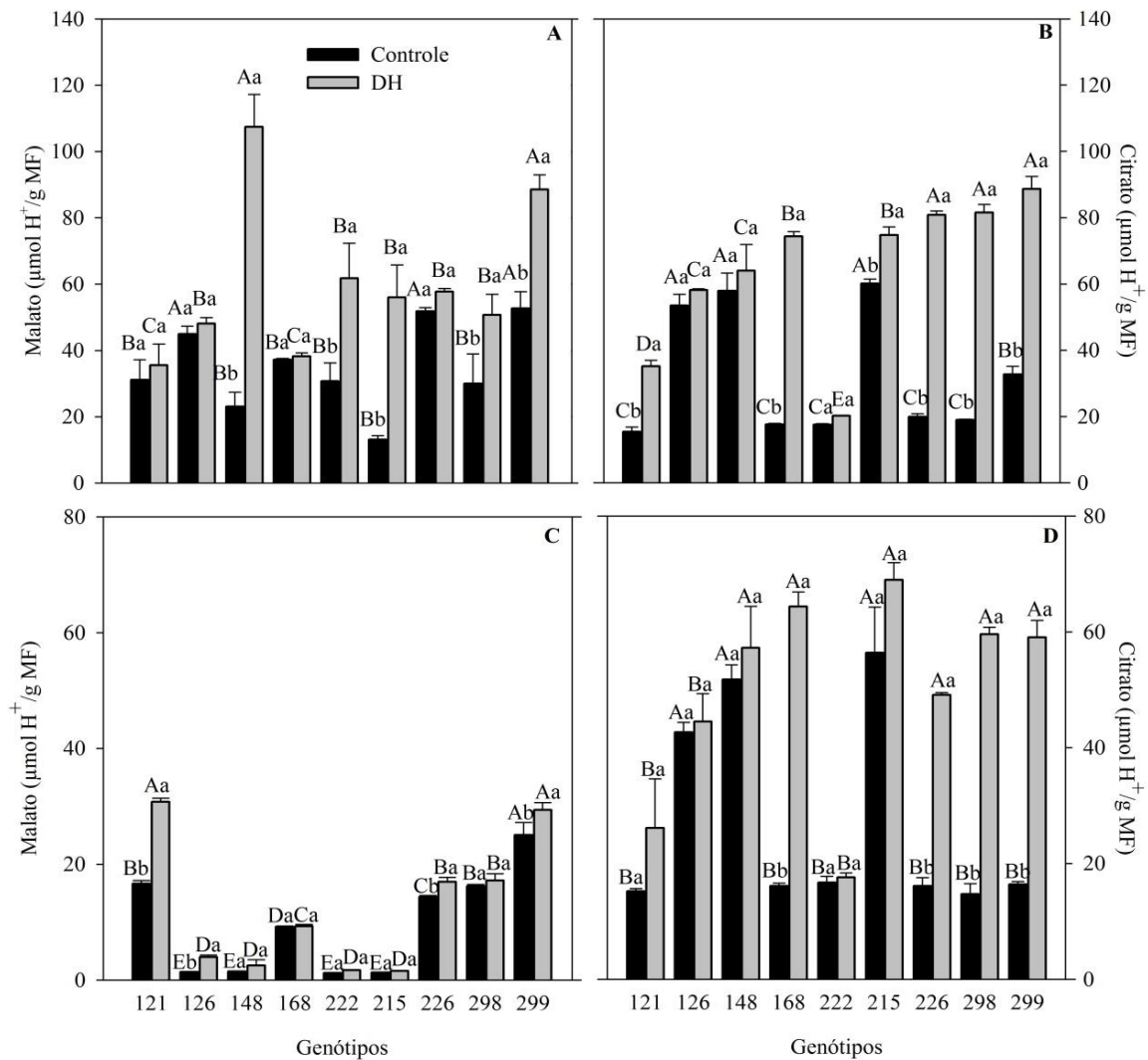
Verificamos ainda, um aumento de 29% na atividade da PEPC quando determinadas às 16 h em relação às 4 h para as plantas sob DH. Podemos observar que a atividade da PEPC foi menor nos segmentos de caule, quando comparadas às folhas (Figura 6C, D).

Quando se quantificou a atividade desta enzima para o segmento da base do caule, verificaram-se em alguns genótipos (148, 222, 298 e 299) diferenças entre os tratamentos de DH. Essas diferenças determinaram um aumento de 111, 124, 308 e 168% na atividade da PEPC, respectivamente. Entretanto, a atividade da PEPC no ápice do caule não diferenciou

entre os genótipos, bem como entre os regimes hídricos, mesmo apresentando um aumento na atividade das plantas sob DH.

### 3.4. Determinações bioquímicas

O acúmulo de ácidos orgânicos (malato e citrato) diferenciou entre os genótipos e os tratamentos de DH para todas as quantificações. Quando comparados os ácidos orgânicos, verificamos que houve um maior acúmulo de citrato em relação ao malato às 16 h (Figura 7A, B). Ao compararmos a coleta de 16 h e 4 h, verificou-se que houve um acréscimo em média de 176% para as plantas controle e 270% para as plantas submetidas à DH, quando reportados o citrato em relação ao malato.



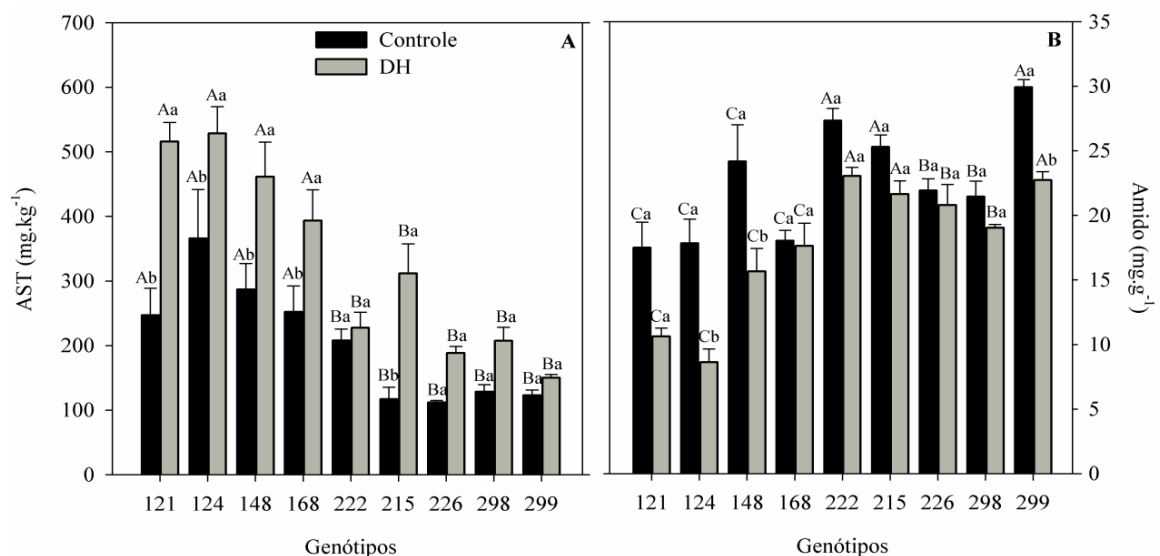
**Figura 7:** Determinação de ácidos orgânicos (A) Malato e (B) Citrato às 16 h, (C) Malato e (D) Citrato às 4 h, (E) e (F) Variação da acidez de malato e citrato em folhas,

respectivamente, em *J. curcas* submetidas ao déficit hídrico aos 42 DAT. As colunas são médias de 3-4 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

Tanto o acúmulo de malato quanto de citrato aumentou às 4 h (Figura 7C, D). Houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) para o acúmulo de malato entre os regimes hídricos apenas para os genótipos 148, 222, 215 e 298. Para o acúmulo de citrato somente o genótipo 215 se diferenciou dos demais, apresentando valores médios entre 59 e 73  $\mu\text{mol H}^+/\text{g MF}$  para as plantas controle e sob DH, respectivamente. O acúmulo de citrato às 4 h nas plantas submetidas à DH apresentou um aumento de 97% quando comparadas às plantas controle.

Observa-se uma maior variação da acidez do malato em relação ao citrato (Figura 8E, F). Além disso, as plantas sob DH apresentaram maiores valores, mesmo em alguns genótipos não sendo significativo.

Verificou-se diferença significativa ( $p < 0.05$ ) para os genótipos, bem como entre os regimes hídricos para o conteúdo de açúcares solúveis totais (AST) e amido (Figura 8A, B). Para os AST as plantas sob DH apresentaram um aumento em média de 62% quando comparadas às plantas controle. Já para o amido houve um maior conteúdo nas plantas controle de 78% em média quando comparadas às plantas sob DH.



**Figura 8:** (A) Conteúdo de açúcares solúveis totais (AST) e (B) amido em folhas de *Jatropha curcas* submetidas ao déficit hídrico aos 42 DAT. As colunas são médias de 4 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre

genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

### 3.5. Composição isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ )

Houve diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos, bem como entre os tratamentos de DH, na composição isotópica de carbono na biomassa foliar (Tabela 4).

**Tabela 4:** Composição isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) em folhas de *J. curcas* submetidas à 42 dias de deficiência hídrica. Valores médios de 3 repetições ( $\pm$  erro padrão,  $n = 3$ ).

Genótipos	Isótopos de Carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ -‰)	
	Controle	DH
121	- 31.4 $\pm$ 2.1 <sup>Ba</sup>	- 34.7 $\pm$ 1.5 <sup>Bb</sup>
124	- 34.1 $\pm$ 2.8 <sup>Ca</sup>	- 36.6 $\pm$ 0.1 <sup>Ca</sup>
148	- 35.9 $\pm$ 1.2 <sup>Ca</sup>	- 37.8 $\pm$ 0.8 <sup>Ca</sup>
168	- 34.7 $\pm$ 0.2 <sup>Ba</sup>	- 32.9 $\pm$ 0.7 <sup>Ba</sup>
222	- 30.1 $\pm$ 1.5 <sup>Aa</sup>	- 27.1 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>
215	- 26.7 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>	- 26.9 $\pm$ 0.0 <sup>Aa</sup>
226	- 26.6 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>	- 29.1 $\pm$ 0.6 <sup>Aa</sup>
298	- 26.7 $\pm$ 0.3 <sup>Aa</sup>	- 28.2 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>
299	- 27.5 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>	- 26.2 $\pm$ 0.2 <sup>Aa</sup>

Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

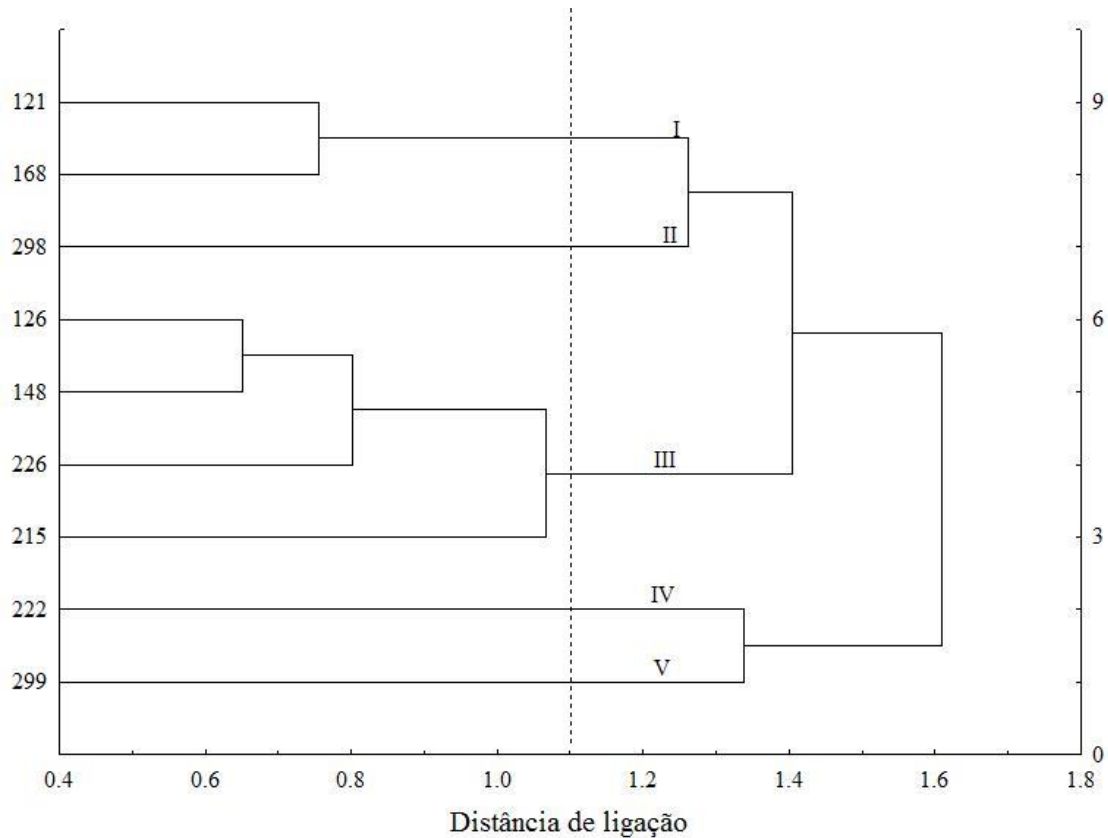
Verificaram-se menores valores de  $\delta^{13}\text{C}$  nos genótipos 124 e 148 em relação aos demais, nos dois regimes hídricos. Além disso, o 121 foi o único a diferenciar estatisticamente entre os regimes hídricos (Tabela 4), com diminuição dos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  sob DH.

## 4. Análise multivariada

Os resultados das análises do agrupamento e dispersão gráfica, considerando-se simultaneamente os parâmetros de crescimento avaliados, revelaram a existência de divergência entre os nove genótipos de *J. curcas*.

O dendrograma resultante da análise de agrupamento das variáveis utilizadas demonstrou, que houve a formação de cinco grupos de genótipos: O grupo I, constituído por: 121 e 168, o

grupo II, constituído por 298; e o grupo III, formado pelo 126, 148, 226 e 215, o grupo IV pelo 222 e o grupo V pelo genótipo 299 (Figura 9).



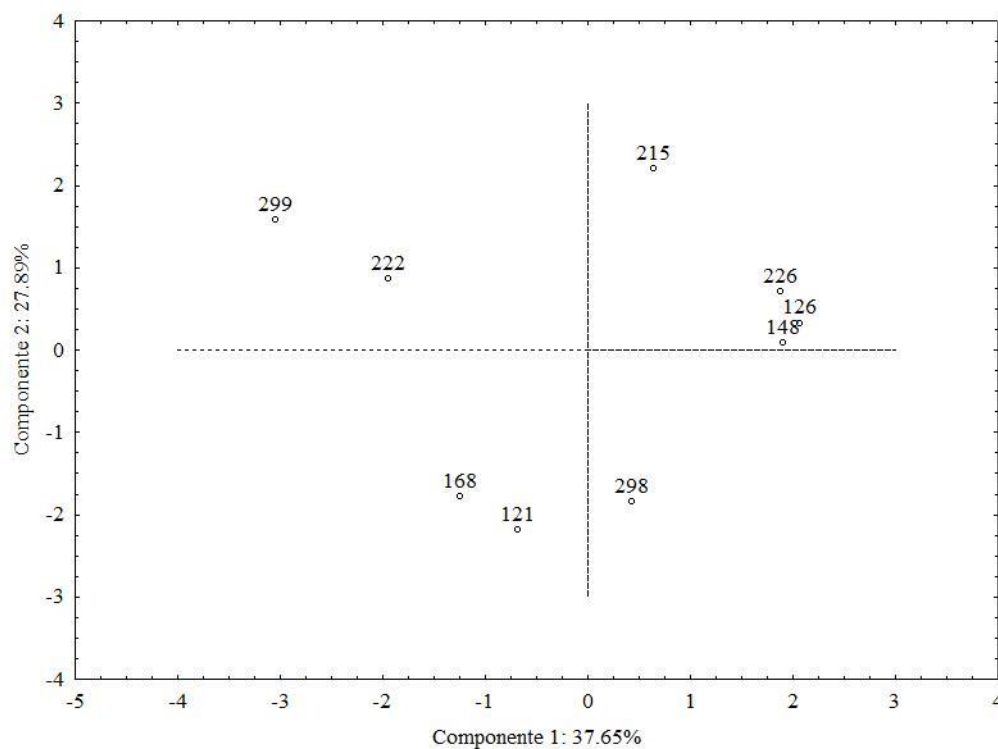
**Figura 9:** Análise de agrupamento de nove genótipos de *J. curcas* submetidos à deficiência hídrica no solo por 42 dias, com base na distância euclidiana a partir da diferença entre plantas controle e seca para as variáveis altura, diâmetro do colo, número de folhas, área foliar, volume radicular, comprimento radicular, área total de raiz e área de superfície de raiz.

A variável que mais contribuiu para a dissimilaridade genética e conseqüentemente para a formação dos grupos foi a área total radicular (18.9%), seguida da altura (17.9%) e número de folhas (17.6%) (Tabela 5). Entretanto, das oito variáveis analisadas, as que menos contribuíram para a divergência genética foi a área foliar (5.0%), comprimento radicular (5.6%) e diâmetro do colo (6.9%).

**Tabela 5:** Contribuição relativa (S.j) dos caracteres para divergência – Singh (1981), para os nove genótipos de *J. curcas* de acordo com parâmetros de crescimento.

Variáveis	S.j	Valor (%)
Altura	34.4	17.9
Diâmetro do colo	13.2	6.9
Número de folhas	33.9	17.6
Área foliar	9.7	5.0
Volume radicular	32.1	16.7
Comprimento radicular	10.8	5.6
Área total radicular	36.3	18.9
Área de superfície radicular	21.2	11.0

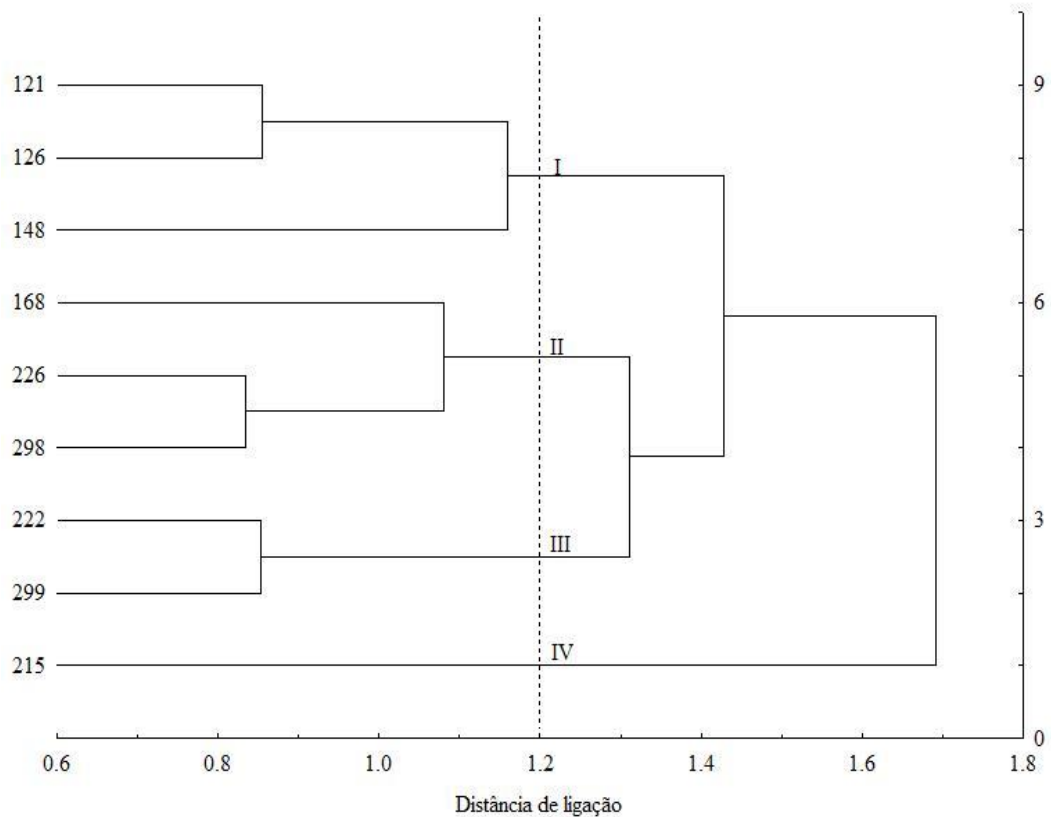
Os dois componentes principais explicaram 65.54% de toda a variação total disponível, sendo 37.65% para o primeiro e 27.89% para o segundo (Figura 10).



**Figura 10:** Análise de componentes principais de nove genótipos de *J. curcas* submetidos à deficiência hídrica no solo por 42 dias, com base nas diferenças entre plantas controle e seca para as variáveis altura, diâmetro do colo, número de folhas, área foliar, volume radicular, comprimento radicular, área total de raiz e área de superfície de raiz.



A análise de agrupamento das variáveis bioquímicas demonstra que houve a formação de quatro grupos distintos (Figura 11). O primeiro grupo (I) formado por três genótipos (121, 126 e 148); o segundo (II) por três (168, 226 e 298); o terceiro (III) por dois (222 e 299) e o quarto grupo (IV) por um (215).



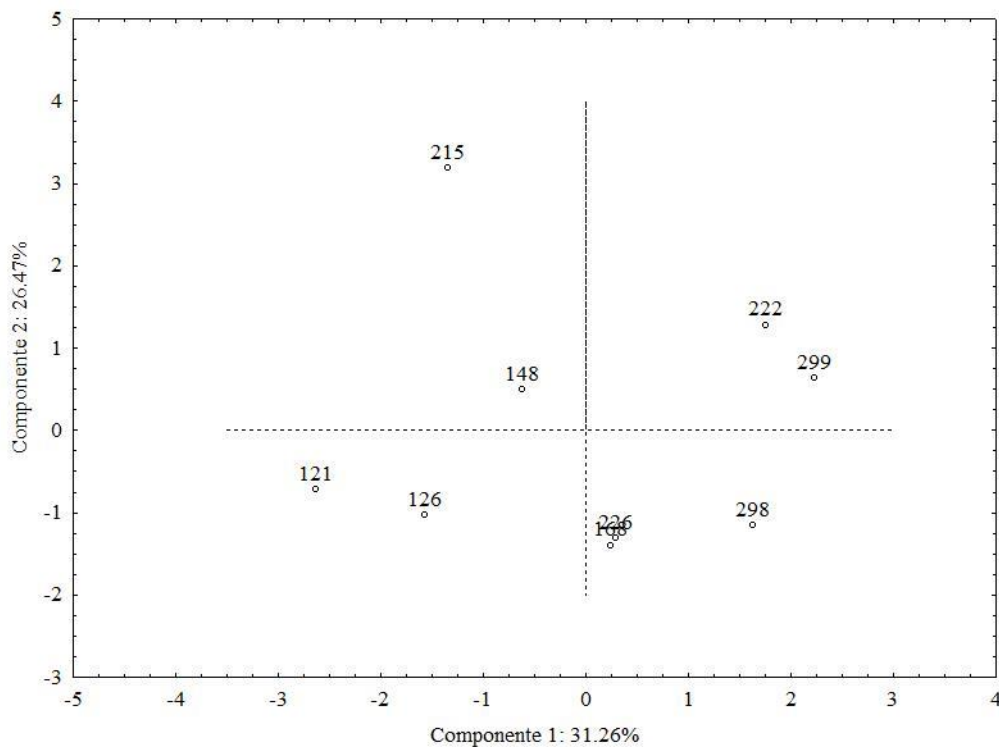
**Figura 11:** Análise de agrupamento de nove genótipos de *J. curcas* submetidos à deficiência hídrica no solo por 42 dias, com base na distância euclidiana a partir da diferença entre plantas controle e seca para as variáveis citrato, malato, discriminação isotópica de carbono, amido, AST, PEPC às 4 h, PEPC às 16 h, PEPC base e PEPC ápice.

A contribuição relativa das variáveis bioquímicas revela que o citrato (13.2%), PEPC ápice (13.1%) e PEPEC 4 h (12.9%) foram as que mais contribuíram para a formação dos grupos. Porém, a discriminação isotópica de carbono (8.2%), amido (9.1%) e PEPC base (9.8%) foram as que menos contribuíram para a formação dos grupos (Tabela 6).

**Tabela 6:** Contribuição relativa (S.j) dos caracteres para divergência – Singh (1981), para os nove genótipos de *J. curcas* de acordo com variáveis bioquímicas.

Variáveis	S.j	Valor (%)
Citrato	24.2	13.2
Malato	19.3	10.5
Discriminação Isotópica de carbono	15.0	8.2
Amido	16.7	9.1
AST	21.5	11.7
PEPC 4 h	23.7	12.9
PEPC 16 h	20.6	11.2
PEPC base	18.0	9.8
PEPC ápice	23.9	13.1

Os dois componentes principais elucidaram 57.73% da variação total disponível, sendo 31.26% para o primeiro e 26.47% para o segundo (Figura 12).



**Figura 12:** Análise de componentes principais de nove genótipos de *J. curcas* submetidos à deficiência hídrica no solo por 42 dias, com base nas diferenças entre plantas controle e seca para as variáveis citrato, malato, discriminação isotópica de carbono, amido, AST, PEPC às 4 h, PEPC às 16 h, PEPC base e PEPC ápice.

### 3. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigaram-se alterações nos diversos órgãos de *J. curcas* com o intuito de verificar possíveis mudanças induzidas pela DH, especialmente variações do metabolismo C3 para MAC, como mecanismo de tolerância à seca.

As plantas recorrem a diversos mecanismos para evitar a desidratação dos seus tecidos quando submetidas à escassez de água. Dentre esses a redução da área foliar (AF). A redução da AF nesta pesquisa explica o aumento da AFE em alguns genótipos (222, 215 e 299). Essa redução pode ser um mecanismo a fim de diminuir a superfície transpiratória e de manter os tecidos necessários à sua sobrevivência durante o período de escassez de água. O efeito negativo do déficit hídrico sobre área foliar tem sido relatado por diversos estudos (Díaz-Lopez et al., 2012; Verma et al., 2012; de Santana et al., 2015). Sabe-se que o déficit hídrico provoca efeitos negativos sobre a expansão celular e fotossíntese, o que ocasiona uma redução no crescimento das plantas (Zhu, 2001).

O diâmetro do coleto foi outra variável afetada pela DH. De Santana et al. (2015) ao estudar plantas jovens de *J. curcas* por 66 dias sob déficit hídrico, verificaram reduções na altura e diâmetro do coleto de 33.4 e 14.6% respectivamente. Já Achten et al. (2010b) encontraram reduções significativas na altura e no diâmetro de plantas de *J. curcas* submetidas a um déficit hídrico, considerado moderado pelos autores (40% da CC) por 42 dias, em torno de 20% e 10%, respectivamente. O número de folhas do genótipo 215 se diferenciou dos demais, com reduções de 68%, quando comparadas às plantas controle. Reduções significativas nas variáveis biométricas foram encontradas em outros estudos como os de Sapeta et al., (2013) que encontraram valores significativamente menores na altura e no número de folhas a partir do 7º dia da imposição do estresse hídrico severo. Fini et al., (2013) encontraram reduções de aproximadamente 50% no número de folhas para genótipos provenientes do Brasil e Tanzânia e de 90% para o genótipo do Suriname, após 18 dias de supressão da irrigação.

A redução da disponibilidade hídrica (50% da CC) não alterou os valores no potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) entre os tratamentos, com exceção do genótipo 222 para o  $\Psi_{md}$  (Tabela 3). Plantas de caules suculentos possuem elevado teor de água no caule, apresentando como principal característica a regulação do  $\Psi_w$ , que praticamente não varia, em contraposição à diminuição do potencial hídrico do solo (Maes et al., 2009; de Santana et al., 2015). Além disso, estratégias para ganho de carbono pelas plantas que apresentam esse aumento do

volume de água foliar, o que associa fortemente essa variável ao aumento da magnitude do MAC, através do acúmulo de ácidos orgânicos e atividade da PEPC, como pode ser verificado em alguns estudos (Cushman e Borland, 2002; Griffiths et al., 2008; Davies e Griffiths, 2012).

A redução da AFE em alguns genótipos foi verificada devida a diminuição da expansão foliar ocasionada pela DH. Entretanto, pode-se inferir que o aumento da AFE acarreta a um menor espaço interno para difusão de CO<sub>2</sub>. A AFE serve como um indicador útil da forma como as plantas investem carbono e nutrientes (biomassa seca) em uma determinada área da folha interceptada pela luz (Vendramini et al., 2002). Espécies com menor AFE podem recorrer a um custo mais alto para a interceptação de luz (Poorter, 2009), estratégia esta, comum em espécies que habitam ambientes onde a seca e/ou a limitação de nutrientes dificultam o crescimento.

A atividade de PEPC foi mais responsiva à DH no ápice do caule em relação às outras variáveis estudadas, mesmo não apresentando diferenças entre os genótipos e tratamentos de DH (Figura 8). Nesta pesquisa, houve grandes alterações na PEPC, uma das responsáveis pela captura e assimilação do CO<sub>2</sub> atmosférico para posterior utilização na síntese de carboidratos. Verificou-se um acréscimo da atividade da PEPC em folhas ao entardecer (16 h) em relação às 4 h. Diminuição da atividade no início do dia seria resultante da inibição do malato que estaria sendo descarboxilado no citosol. O aumento da PEPC em folhas às 16 h em relação às 4 h foi de 91% quando submetidas à DH em relação às plantas controle. Neste caso, o acúmulo dos ácidos pode ter iniciado depois da coleta (16 h) e terminado antes das 4 h. A manutenção da atividade da PEPC em plantas estressadas pode ser explicada pela perda da sensibilidade desta enzima para o malato, o seu principal inibidor (Foyer et al., 1998). Ao pesquisar plantas de *J. curcas* (Maes et al., 2009) sugeriram que a espécie não apresenta um metabolismo C3 puro, mas sim, o MAC no caule suculento e em folhas mudando de C3 para MAC quando sob deficit hídrico.

O MAC pode operar de quatro modos: *MAC obrigatório*, com acúmulo noturno de ácidos orgânicos e fixação do CO<sub>2</sub> durante o dia; *C3-MAC facultativo*, com a fixação do CO<sub>2</sub> característica do metabolismo C3 (RUBISCO) sob condições ambientais favoráveis ou com o comportamento MAC em condições ambientais desfavoráveis; “*MAC-cycling*”, com a fixação diurna do CO<sub>2</sub> (não ocorre a abertura dos estômatos durante a noite) e acúmulo noturno desse gás e de ácidos orgânicos e, finalmente o “*MAC-idling*” caracterizado por um pequeno acúmulo noturno de ácidos orgânicos e pelo fechamento dos estômatos durante todo o ciclo

diurno. Nesse último modo de operar o MAC, as espécies utilizam o CO<sub>2</sub> proveniente da respiração e da fotorrespiração, que é reciclado para a síntese de moléculas orgânicas e para a manutenção do aparato fotossintético (Cushman, 2001; Lüttge, 2004; Winter et al., 2008; Herrera, 2009; Freschi et al., 2010a; Borland et al., 2011).

Nas espécies facultativas, o MAC pode ser induzido por fatores ambientais como a seca (Borland e Griffiths, 1990; Herrera et al., 1991; Freschi et al., 2010a). Em nossa pesquisa, verificou-se que em ambos os seguimentos de caule apresentaram menores atividades da PEPC, quando relacionado com as folhas. Mesmo a PEPC maior em folhas, pode-se inferir que *J. curcas* exibe o MAC indutivo, pois além do aumento desta enzima, as plantas submetidas DH apresentaram aumento na EUAb em alguns genótipos, sinais estes de plantas de clima árido.

O grau de expressão do MAC em *J. curcas* foi avaliada também através da análise de mudanças na acidez titulável (H<sup>+</sup>) na folha (Figura 9). Os valores de acúmulo noturno de ácido podem diferir mais do que 100 vezes entre as espécies. Em plantas MAC facultativas, os valores podem variar de 1000-1500 μmol H<sup>+</sup> g<sup>-1</sup> MF em algumas espécies de *Clusia* no início da estação seca (Borland et al., 1992) a 5 μmol H<sup>+</sup> g<sup>-1</sup> MF em *Zamioculcas zamiifolia* (Holtum et al., 2007). Em espécies de MAC induzíveis tais como *M. crystallinum* apresentou em média 150 μmol H<sup>+</sup> g<sup>-1</sup> MF na variação da acidez titulável. Além de servir como um meio de armazenamento de CO<sub>2</sub>, os ácidos orgânicos acumulados à noite têm sido propostos para ser um componente de ajuste osmótico, procurando manter o estado da água da folha, facilitando a absorção de água ao amanhecer ou ajudando a remobilizar a água de folhas mais velhas (Smith e Lüttge 1985) ou do caule suculento como sugerido aqui para *J. curcas*. O ajuste osmótico induzido pela seca foi relatado em *J. curcas* como componente de mecanismo de tolerância à seca (Silva et al 2010b; da Silva et al., 2016).

Em nossa pesquisa, determinamos a acidez titulável de dois principais ácidos orgânicos (malato e citrato) para auxiliarmos na identificação de mudança no metabolismo de *J. curcas*. Verificamos valores médios de 49 e 17 μmol H<sup>+</sup> g<sup>-1</sup> MF na variação da acidez de malato e citrato, respectivamente, em plantas sob DH. Apesar dos valores de *J. curcas* serem menores em relação às outras espécies como *Mesembryanthemum crystallinum* L., *Sedum* e *Talinum*, podemos inferir que a espécie está situada entre o MAC induzível (Davies e Griffiths, 2012) e MAC cycling (Gravatt e Martin 1992).

O acúmulo de citrato foi maior às 4 h, de tal modo, pelos motivos os quais o papel da acumulação de citrato no equilíbrio de carbono ou água durante o MAC ainda não estão bem

claros em algumas espécies (Lüttge, 2007). O citrato não fornece ganho líquido de CO<sub>2</sub>, assim como o malato, mas deve ser mais eficaz do que o malato ao aumentar a concentração interna de carbono (C<sub>i</sub>) durante o dia, porque a descarboxilação de 1 mol de citrato gera 3 mols de CO<sub>2</sub> em relação a apenas 1 mol no caso do malato. O mecanismo fotoprotetor é conhecido quando acrescida a C<sub>i</sub> durante o dia em plantas MAC, como mostrado em uma espécie de MAC facultativa *Talinum triangulare* sob seca (Pieters et al., 2003). Assim, a formação de citrato durante a noite não resultaria em um ganho líquido de CO<sub>2</sub>, pois ele não é produzido a partir de uma carboxilação e, logo, seus precursores têm o mesmo número de carbonos que ele (Lüttge, 2006). Entretanto, o acúmulo noturno de citrato foram verificados em algumas espécies MAC, como *Kalanchoe daigremontiana*, *K. pinnata*, *M. crystallinum* e a bromélia *Tillandsia pohliana* (Chen et al., 2002; Freschi et al., 2010b; Gawronska e Niewiadomska, 2015). A indução do MAC (a quantidade de ácido málico acumulado durante o dia para o outro) tem sido relacionada com suculência da folha (Cushman e Borland, 2002; Griffiths et al., 2008). Em uma espécie *MAC-cycling* de Euphorbiaceae (*Euphorbia milii*), a média na variação da acidez ( $\Delta H^+$ ) e suculência foliar foi de 18  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF e 0.45 kg m<sup>-2</sup>, respectivamente. Além disso, as mudanças na H<sup>+</sup> não foram relacionadas a mudanças na suculência foliar, que se manteve relativamente constante durante o período de tratamento seca (Herrera, 2013).

Um estudo prévio de plantas de *Guzmania monostachia* mostrou a modulação da via MAC em resposta a alterações na disponibilidade de água (Freschi et al., 2010b). Níveis notáveis de acumulação de H<sup>+</sup> noturna na porção apical e foliar intermediária de plantas bem irrigadas desta bromélia foram observados, sugerindo que algum nível do CAM mesmo quando o suprimento de água foi abundante. De fato, o déficit hídrico induziu acréscimos de H<sup>+</sup> exclusivamente na porção foliar apical, onde a maioria das atividades de enzimas relacionadas ao MAC, como a PEPC também foram observadas.

O presente estudo mostrou maior atividade de PEPC no ápice das folhas mantidas sob a seca durante o período das 16 h. Curiosamente, Yuan et al. (2012) também mostraram que a proteína PEPC e a abundância de transcritos aumentaram durante o período escuro em *Camélia oleifera* (Theaceae). Como foi observado para *G. monostachia* em folhas separadas, um aumento na atividade de PEPC durante o período escuro. Assim, é provável que a transcrição, tradução e pós-tradução da PEPC mostrem variações durante um ciclo diurno.

Apesar do aumento significativo de acidez em plantas sob DH, a magnitude da expressão do MAC em *J. curcas* pode ser considerado baixo. Esses resultados, associados ao

crescimento, sugere que a indução ao MAC em *J. curcas* é mais importante para a conservação da água do que para a aquisição de carbono, tal como demonstrado para outra Euphorbiaceae (Herrera, 2013). Entretanto, os baixos níveis de MAC detectados em *J. curcas* por Winter e Holtum (2015), foram relacionados à manutenção do balanço de carbono. A imposição de déficit hídrico induziu alterações metabólicas em folhas de *J. curcas*, como indicado pela acidificação do extrato foliar, tanto as 4 h como 16 h, juntamente como o aumento da PEPC. Além disso, valores elevados de  $H^+$  encontrado em plantas controle sugerem que algum nível de MAC pode ocorrer mesmo sob irrigação constante.

No que diz respeito ao conteúdo de AST em folhas, verificou-se o aumento em todas as plantas sob DH, devido a uma hidrólise do amido sob a indução ao estresse, restringindo assim, na translocação de sacarose a partir de folhas e menor uso de assimilados para o crescimento da mesma (McCormick et al., 2009). Notavelmente, a seca levou a diminuição no teor de amido, e essa resposta é comum entre algumas espécies sujeitas ao deficit hídrico (Cruz et al., 2008; Pereira et al., 2012). Segundo Kramer e Boyer (1995), várias espécies quando são submetidas à seca apresentam redução na concentração de amido para formar açúcares solúveis, ou seja, a diminuição na concentração de amido é acompanhada pelo aumento da concentração de carboidratos. Pode-se inferir que o maior conteúdo de açúcares nas plantas controle contribuiu para a proteção contra a desidratação dos tecidos, funcionando como estabilizador de membrana celular e auxiliando na manutenção do turgor (Silva et al., 2009b)

A fim de demonstrar o funcionamento do MAC, outras determinações são realizadas para identificar o metabolismo em plantas, dentre elas temos as trocas gasosas, acidez titulável, atividade da PEPC e a discriminação isotópica de carbono ( $\delta^{13}C$ ). A quantificação da  $\delta^{13}C$  foi realizada em folhas, apresentando diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre genótipos, bem como entre os tratamentos de DH (Tabela 3). De acordo com essa variável, as evidências de MAC em *J. curcas* foram relativamente baixas, com variação entre os genótipos para a  $\delta^{13}C$ . Como verificado, a variação de acidez foi atribuída principalmente por malato e citrato. Em uma pesquisa com 23 espécies de MAC facultativas (Herrera, 2009), a média, máxima e mínima de  $\delta^{13}C$  foram -23,9, -14,0 e -30,0 ‰, respectivamente, indicando que a variabilidade nos valores de  $\delta^{13}C$  pode levar os investigadores a classificar uma espécie como um C3, MAC facultativo ou constitutivo. Ao pesquisar várias espécies de bromélias, Winter et al. (2015) as classificaram de acordo com  $\delta^{13}C$ , sendo assim, nossos dados revelam que houve uma variação na determinação da  $\delta^{13}C$ . Os valores variaram entre -26.2 e -37.8‰ para as plantas

de *J. curcas* submetidas à DH. De acordo com Winter et al. (2015), *J. curcas* se encontra em dois grupos, apresentando um metabolismo levemente C3-MAC para alguns genótipos e C3 puramente para os demais, onde o C3 continua sendo o principal mecanismo de ganho de carbono da espécie (Tabela 3). Além disso, esses autores revelaram através de uma distribuição de frequência bimodal, que o ponto de corte para a transição C3-MAC seria em -20‰, com valores maiores indicando MAC e valores menores o metabolismo C3. *J. curcas* é um arbusto perene amplamente introduzido e cultivado em regiões áreas áridas tropicais e subtropicais, onde são esperadas mudanças ambientais constantes e rápidas (Diaz-Lopez et al., 2012). Assim, um mecanismo mais versátil e eficaz das alterações C3-MAC-C3 parece ser mais adequado (Mattos e Lüttge 2001).

Os valores de distância genética variaram de 0.2 e 0.22, para os parâmetros de crescimento (Figura 10) e de 0.6 e 1.8 para os parâmetros bioquímicos (Figura 12), sugerindo uma base genética ampla. Observa-se que os parâmetros de crescimento que mais contribuíram foram a área total radicular, altura e número de folhas (Tabela 5). Além disso, para os parâmetros bioquímicos o citrato, a PEPC ápice e PEPC 4 h, foram as que se destacaram (Tabela 6). Laviola et al. (2011) constataram que os parâmetros diâmetro do caule e altura da planta contribuíram com 12 e 11%, respectivamente, para a diversidade genética em genótipos de *Jatropha curcas*. Entretanto, Shen et al. (2010) estudando 38 genótipos provenientes de diferentes regiões da China e Indonésia, também observaram que estes estão misturados entre os grupos do dendrograma gerado pelo método UPGMA, mesmo método que utilizamos em nossa pesquisa.

A análise de componentes principais é uma técnica utilizada para verificar quais dos caracteres avaliados mais contribuíram para a variabilidade genética dos genótipos estudados. Em nosso estudo, os valores foram de 65.54 e 57.73%, para os dois primeiros componentes principais dos parâmetros de crescimento e bioquímico, respectivamente. Entretanto, Cruz et al. (2004), relata que o ideal é a utilização dos primeiros componentes principais que envolvem pelo menos 80% da variação total. Além disso, há estudos mostrando que a análise tem se mostrado eficaz na avaliação da diversidade genética, mesmo quando esse limite não é atingido.



#### 4. CONCLUSÕES

Embora respostas semelhantes ao déficit hídrico, os genótipos 121, 148, 168 e 299 podem ser considerados mais tolerantes à seca em relação aos demais, principalmente por causa de maiores acúmulos de ácidos orgânicos, maiores atividades da PEPC, maior conteúdo de AST e maior crescimento de raiz.

*J. curcas* desenvolveu mecanismos de defesa ao déficit hídrico, conforme pode ser visto pela ausência do efeito da seca no potencial hídrico foliar e de mudanças metabólicas em baixos níveis de C3 para MAC, explicando assim, a manutenção da EUAb sob deficiência hídrica.

#### 5. REFERÊNCIAS

Achten, W.M.J., Maes, W.H., Reubens, B., Mathijs, E., Singh, V.P., Verchot, L., Muys, B. (2010b). Biomass production and allocation in *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. **Biomass & Bioenergy** 34 (5): 667-76.

Aragón, C., Carvalho, L., González, J., Escalona, M., Amancio, S. (2012). The physiology of ex vitro pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. **Plant Cell Report** 31: 757-769.

Berchmans, H.J., Hirata, S. (2008). Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresource Technology** 99: 1716-1721.

Borland, A.M., Zambrano, V.A.B., Ceusters, J., Shorrock, K. (2011). The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. **New Phytologist** 191: 619-633.

Borland, A., Dodd, A. (2002). Carbohydrate partitioning in crassulacean acid metabolism plants: reconciling potential conflicts of interest. **Journal Experimental Botany** 29: 707-716.

Borland, A.M., Griffiths, H., Maxwell, C., Broadmeadow, M.S.J., Griffiths, N.M., Barnes, J.D. (1992). On the ecophysiology of the Clusiaceae in Trinidad: expression of CAM in

*Clusia minor* L. during the transition from wet to dry season and characterization of three endemic species. **New Phytologist** 122: 349-357.

Borland, A.M., Griffiths, H. (1990). The regulation of CAM and respiratory recycling by water supply and light regime in the C3-CAM intermediate *Sedum telephium*. **Functional Ecology** 4: 33-39.

Bradford, M. (1976). Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals Biochemistry** 72: 284-252.

Castro, E.M., Pereira, F.J., Paiva, R. (2009). **Histologia Vegetal: Estrutura e Função de Órgãos Vegetativos**. Lavras: UFLA, 234 p.

Chen, L.S., Lin, Q., Nose, A. (2002). A comparative study on diurnal changes in metabolite levels in the leaves of three crassulacean acid metabolism (CAM) species, *Ananas comosus*, *Kalanchoe daigremontiana* and *K. pinnata*. **Journal Experimental Botany** 53: 341-350

Clegg, K.M. (1956). The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 3: 40-44.

Cruz, M.C.M., Siqueira, D.L., Salomão, L.C.C., Cecon, P.R., Santos, D. (2008). Teores de carboidratos em tangerineira ‘ponkan’ e Limeira ácida ‘tahiti’ submetidas ao estresse hídrico. **Revista Ceres** 55 (4): 305-309.

Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, v.2, p. 585, 2003.

Cushman, J.C., Borland, A.M. (2002). Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. **Plant, Cell and Environment** 25: 295-310.

Cushman, J.C. (2001). Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. **Plant Physiology** 127: 1439-1448.

Davies, B.N., Griffiths, H. (2012). Competing carboxylases: circadian and metabolic regulation of Rubisco in C3 and CAM *Mesembryanthemum crystallinum* L. **Plant, Cell and Environment** 35: 1211-1220.

Degl'innocenti, E., Guidi, L., Soldatini, G.F. (2002). Effect of chronic O<sub>3</sub> fumigation on the activity of some Calvin cycle enzymes in two poplar clones. **Photosynthetica** 40: 121-126.

de Santana, T.A., Oliveira, P.S., Silva, L.D., Laviola, B.G., Almeida, A-A.F., Gomes, F.P. 2015. Water use efficiency and consumption in different Brazilian genotypes of *Jatropha curcas* L. subjected to soil water deficit. **Biomass & Bioenergy** 75: 119-125.

Díaz-López, L., Gimeno, V., Simón, I., Martínez, V., Rodríguez-Ortega, W.M., García-Sánchez, F. (2012). *Jatropha curcas* seedlings show a water conservation strategy under drought conditions based on decreasing leaf growth and stomatal conductance. **Agricultural Water Management** 105: 48-56.

Dodd, A.N., Borland, A.M., Haslam, R.P., Griffiths, H., Maxwell, K. (2002). Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. **Journal of Experimental Botany** 53: 569-580.

Fini, A., Bellasio, C., Pollastri, S., Tattini, M., Ferrini, F. (2013). Water relations, growth, and leaf gas exchange as affected by water stress in *Jatropha curcas*. **Journal of Arid Environments** 89: 21-29.

Foyer, C.H., Valadier, M.H., Migge, A., Becker, T.W. (1998). Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. **Plant Physiology** 117: 283-292.

Freschi, L., Rodrigues, M.A., Silva Domingues, D., Purgatto, E., Van Sluys, M.-A., Magalhaes, J.R., Kaiser, W.M., Mercier, H. (2010a). Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. **Plant Physiology** 152: 1971-1985.

Freschi, L., Takahashi, C.A., Cambui, C.A., Semprebom, T.R., Cruz, A.B., Mioto, P.T., Versieux, L.M., Calvente, A., Latansio-Aidar, S.R., Aidar, M.P.M., Mercier, H. (2010b). Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. **Journal of Plant Physiology** 167: 526-533.

Gawronska, K., Niewiadomska, E. (2015). Participation of citric acid and isocitric acid in the diurnal cycle of carboxylation and decarboxylation in the common ice plant. **Acta Physiologiae Plantarum** 37: 60-68.

Gravatt, D.A., Martin, C.E. (1992) Comparative ecophysiology of five species of *Sedum* (Crassulaceae) under well-watered and drought-stressed conditions. **Oecologia** 92: 532–541.

Griffiths, H., Robe, W.E., Girnus, J., Maxwell, K. (2008). Leaf succulence determines the interplay between carboxylase systems and light use during crassulacean acid metabolism species. **Journal of Experimental Botany** 59: 1851-1861.

Griffiths H. (1992). Carbon isotope discrimination and the integration of carbon assimilation pathways in terrestrial CAM plants. **Plant, Cell & Environment** 15: 1051-1062.

Herrera, A. (2013). Crassulacean acid metabolism-cycling in *Euphorbia milii*. **AoB PLANTS** 5: 1-9.

Herrera A. (2009). Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? **Annals of Botany** 103: 645-653.

Herrera, A., Delgado, J., Paraguatey, I. (1991). Occurrence of facultative crassulacean acid metabolism in leaves of *Talinum triangulare* (Portulacaceae). **Journal of Experimental Botany** 42: 493-499.

Holtum, J.A.M., Winter, K., Weeks, M.A., Sexton, T.R. (2007). Crassulacean acid metabolism in the ZZ plant, *Zamioculcas zamiifolia* (Araceae). **American Journal of Botany** 94: 1670-1676.

Jongschaap, R.E.E., Corré, W.J., Bindraban, P.S., Brandenburg, W.A. (2007). Claims and facts on *Jatropha curcas* L.: Global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme. **Plant Research International** 158.

Kai, C., Ming, G. (2011). Changes of water status and different responses of osmoregulants in *Jatropha curcas* L. seedlings to air drought stress. **Agricultural Science & Technology** 12: 343-346.

Kramer, P.J., Boyer, J.S. (1995). **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic.

Laviola, B.G., Bhering, L.L., Mendonca, S., Rosado, T.B., Albrecht, J.C. (2011). Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhao manso na fase jovem. **Bioscience Journal** 27: 371-379.

Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A., Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Current Opinion in Plant Biology** 6: 280-287.

Lüttge, U. (2004). Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). **Annals of Botany** 93: 629-652.

Lüttge, U. (2006). Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. **New Phytologist** 171: 7-25.

Lüttge, U. (2007). *Clusia*. **A woody neotropical genus of remarkable plasticity and diversity**. Berlin: Springer, 167-169.

Macedo, A.F., Costa, M.V.L., Tavares, E.S., Lage, C.L.S., Esquibel, M.A. (2011). The effect of light quality on leaf production and development of in vitro-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany** 70: 43-50.

Maes, W.H., Achten, W.M.J., Reubens, B., Raes, D., Samson, R., Muys, B. (2009). Plant-water relationships and growth strategies of *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. **Journal of Arid Environments** 73: 877-884.

Mantovani, A. (1999). A method to improve leaf succulence quantification. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 42: 9-14.

Mattos, E.A., Lüttge, U. (2001). Chlorophyll fluorescence and organic acid oscillations during transition from CAM to C3-photosynthesis in *Clusia minor* L. (Clusiaceae). **Annals of Botany** 88: 457-463.

McCormick, A.J., Watt, D.A., Cramer, M.D. (2009). Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. **Journal Experimental Botany** 60: 357-364.

McCready, R.M., Guggolz, J., Silveira, V., Owens, H.S. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. **Analytical Chemistry** 22: 1156-1158.

Medrano, H., Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Gulías, J., (2010). Measuring water use efficiency in grapevines. In: Delrot, S., Medrano, H., Or, E., Bavaresco, L., Grando, S. **Methodologies and Results in Grapevine Research**. Springer, London, 124-156.

Melo, G.M., Cunha, P.C., Pereira, J.A.F., Willadino, L. Ulisses, C. (2011). Alterações anatômicas em folhas e raízes de *Jatropha curcas* L. cultivadas sob estresse salino. **Revista Ciência Agronômica** 42(3): 670-674.

Nobel, P.S. (1988). **Environmental biology of agaves and cacti**. Cambridge: Cambridge University Press.

Pandey, V.C., Singh, K., Singh, J.S., Kumar, A., Singh, B., Singh, R.P. (2012). *Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for sustainable environmental development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 16: 2870-2883.

Pereira, W.P., Melo Filho, P.A., Albuquerque, M.B., Nogueira, R.J.M.C., Santos, R.C. (2012). Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico moderado. **Revista Ciência Agronômica** 43: 766-773.

Pieters, A.J., Tezara, W., Herrera, A. (2003). Operation of the xanthophyll cycle and degradation of D1 protein in the facultative CAM plant, *Talinum triangulare*, under water deficit. **Annals of Botany** 92: 393-399.

Pompelli, M.F., Antunes, W.C., Ferreira, D.T.R.G., Cavalcante, P.P.G.S., Wanderley-Filho, H.C.L., Endres, L. (2012). Allometric models for non-destructive leaf area estimation of the *Jatropha curcas* L. **Biomass & Bioenerg** 36: 77-85.

Poorter, H.N.U., Poorter, L., Wright, I.J., Villar, R. (2009). Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. **New Phytologist** 182: 565-588.

Ramiro, D.A., Guerreiro-Filho, O., Voltan, R.B.Q., Matthiesen, S.C. (2004). Anatomical characterization of leaves from coffee plants resistant and susceptible to leaf miner. **Bragantia** 63(3): 363-367.

Sapeta, H., Costa, J.M., Louren, T., Maroco, J., van der Linde, P., Oliveira, M.M. (2013) Drought stress response in *Jatropha curcas*: Growth and physiology. **Environmental and Experimental Botany** 85: 76-84.

Scholander, P.F., Hammer, H.T., Bradstreet, E.D., Haningsen, E.A. (1956). Sap pressure in vascular plants. **Science** 148: 339-346.

Shen, J., Jia, X., Ni, H., Sun, P., Niu, S., Chen, X. (2010). AFLP analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* grown in Hainan. **Trees** 24: 455-462.

Silva, E.N., Silveira, J.A.G, Ribeiro, R.V., Vieira, S.A. (2015a). Photoprotective function of energy dissipation by thermal processes and photorespiratory mechanisms in *Jatropha curcas* plants during different intensities of drought and after recovery. **Environmental and Experimental Botany** 110: 36-45.

Smith, J.A.C., Lüttge, U. (1985). Day–night changes in leaf water relations associated with the rhythm of crassulacean acid metabolism in *Kalanchoë diargremontiana*. **Planta** 163: 272-282

Strasser, B., Sánchez-Lamas, M., Yanovsky, M.J., Casal, J.J., Cerdán, P.D. (2010). *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 107: 4776-4781.

Tominaga, J., Inafuku, S., Coetzee, T., Kawamitsu, Y. (2014). Diurnal regulation of photosynthesis in *Jatropha curcas* under drought during summer in a semi-arid region. **Biomass & Bioenergy** 67: 279-287.

Van Eijck J, Romijn H, Balkema A, Faaij A (2014) Global experience with *Jatropha* cultivation for bioenergy: an assessment of socioeconomic and environmental aspects. **Renewable & Sustainable Energy Reviews** 32: 869-889.

Vendramini, F., Díaz, S., Gurvich, D.E., Wilson, P.J., Thompson, K., Hodgson, J.G. (2002). Leaf traits as indicators of resource-use strategy in floras with succulent species. **New Phytologist** 154: 147-157.

Yuan, M., Xu, F., Wang, A.D., Zhang, D.W., Zhang, Z.W., Cao, Y., Xu, X.C., Luo, M.H., Yuan, S. (2012). A single leaf of *Cammelia oleifera* has two types of carbon assimilation pathway, C3 and crassulacean acid metabolism. **Tree Physiology** 32: 188-199.

Walter, A., Christ, M.M., Rascher, U., Schurr, U., Osmond, B. (2008). Diel leaf growth cycles in *Clusia* spp. are related to changes between C3 photosynthesis and crassulacean acid metabolism during development and during water stress. **Plant, Cell and Environment** 31: 484-491.

Winter, K., Holtum, J.A.M., Smith, J.A.C. (2015). Crassulacean acid metabolism: a continuous or discrete trait? **New Phytologist** 208: 73-78.

Winter, K., Garcia, M., Holtum, J.A.M. (2008). On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoë* and *Opuntia*. **Journal of Experimental Botany** 59: 1829-1840.



Zhu, J.K. (2001). Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Current Opinion in Plant Biology** 4:404-406.

## CAPÍTULO 2

### DIVERGÊNCIAS FISIOLÓGICAS E MECANISMOS DE DEFESA CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO EM GENÓTIPOS DE *Jatropha curcas* L. INFLUENCIADOS PELA DEFICIÊNCIA HÍDRICA

#### EXTRATO

*Jatropha curcas* L. pertencente à família Euphorbiaceae, é uma planta perene e encontra-se em processo de domesticação. Parte do interesse pelo cultivo dessa espécie está relacionada ao uso de sua semente que apresenta teor de óleo entre 17.5 e 41.6%. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de déficit hídrico sobre características fisiológicas, bioquímicas e anatômicas em genótipos de *J. curcas*, a fim de gerar informações sobre os mecanismos envolvidos na tolerância das plantas ao déficit hídrico. Aos 20 dias após a semeadura, plantas de nove genótipos (CNPAE-121, 124, 148, 168, 222, 215, 226, 298 e 299) foram submetidas, durante 42 dias, à dois regimes hídricos medidos em percentagem da capacidade de campo (CC): plantas controle (100% da CC) e plantas submetidas à deficiência hídrica (50% da CC). O potencial hídrico foliar de antemanhã ( $\Psi_w$ ) não sofreu influência significativa ( $p < 0.05$ ) dos genótipos nem dos tratamentos. Observou-se diferenças significativas entre os genótipos, bem como entre os tratamentos de DH para o potencial osmótico ( $\Psi_s$ ). Os genótipos 222 e 215 se destacaram em relação aos demais, apresentando assim, uma amplitude de -0.53 e -0.73 MPa, respectivamente. Diferenças significativas foram encontradas para o conteúdo de prolina entre os genótipos e tratamentos de DH. As plantas submetidas à DH apresentaram um aumento de 56% quando comparadas às plantas controle para o conteúdo de prolina. Aos 42 dias após tratamento (DAT) houve diferença significativa nas trocas gasosas foliares, tanto os genótipos quanto os tratamentos de DH. Aos 42 DAT foram observadas reduções nos valores da taxa fotossintética ( $P_N$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), taxa transpiratória ( $E$ ) e relação  $C_i/C_a$  de 62, 112, 78 e 23% respectivamente, em relação às plantas controle. Não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os tratamentos de DH para o teor de clorofila a ( $Chl a$ ), com exceção do genótipo 121, onde as plantas de DH apresentaram um aumento (24%) em relação as plantas controle. As enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do guaiacol (GPX) e catalase (CAT) apresentaram diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) para os genótipos e tratamentos de DH. A análise multivariada revelou que dentre as variáveis fisiológicas, a  $g_s$  e das variáveis de biomassa, a massa seca foliar (MSF) foram as que mais contribuíram na classificação dos genótipos candidatos a tolerância à seca. Nesta pesquisa, os genótipos apresentaram uma estratégia de conservação de água em seus tecidos, apresentando aumento na atividade de enzimas antioxidantes quando submetidos ao déficit hídrico.

**Palavras chave:** enzimas antioxidantes, estresse abiótico, Euphorbiaceae trocas gasosas

## DIFFERENCES PHYSIOLOGICAL AND DEFENSE MECHANISMS AGAINST OXIDATIVE STRESS IN *Jatropha curcas* L. GENOTYPES INFLUENCED BY WATER STRESS

### ABSTRACT

*Jatropha curcas* L. belonging to the Euphorbiaceae family, is a perennial plant and is in the process of domestication. Part of the interest in the cultivation of this species is related to the use of his seed for oil content of between 17.5 and 41.6%. The aim of this study was to evaluate the effect of moderate water deficit on physiological and biochemical features in *J. curcas* genotypes, in order to generate information on the mechanisms involved in plant tolerance to drought. At 20 days after sowing, plants of nine genotypes (121, 124, 148, 168, 222, 215, 226, 298 and 299) were submitted for 42 days, the two water systems measured in percentage of field capacity (FC): control plants (100% FC) and plants subjected to water stress (50% FC). The leaf water potential predawn ( $\Psi_{am}$ ) was not affected ( $p < 0.05$ ) of genotypes or treatments. There were statistically significant differences between genotypes and between the WS treatments for osmotic potential ( $\Psi_s$ ). Genotypes 222 and 215 stood out in relation to the other, thus presenting a range of -0.53 and -0.73 MPa, respectively. Significant differences were found for proline content between genotypes and WS treatments. Plants submitted to DH increased by 56% when compared to control plants for proline content. At 42 days after treatment (DAT) was no significant difference in leaf gas exchange, both genotypes as the WS treatments. At 42 DAT were observed reductions in the values of photosynthetic rate ( $P_N$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration rate ( $E$ ) and ratio  $C_i/C_a$  of 62, 112, 78 and 23% respectively, compared to control plants. There was no significant difference ( $p < 0.05$ ) between the WS treatments for the content of chlorophyll a (*Chl a*), with the exception of genotype 121, where the WS plants showed an increase (24%) than the control plants. The antioxidants enzyme superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPX) and catalase (CAT) showed significant differences ( $p < 0.05$ ) for genotypes and WS treatments. Multivariate analysis revealed that among the physiological variables,  $g_s$  and biomass variables, leaf dry weight (LDW) have contributed the most in the ranking of candidates genotypes tolerance to drought. In this study, the genotypes showed a water conservation strategy in their tissues, an increase in the activity of antioxidant enzymes when subjected to water deficit.

**Keywords:** Euphorbiaceae, antioxidant enzymes, abiotic stress, gas exchange

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Jatropha curcas* L., também conhecida vulgarmente como pinhão manso, é uma pequena árvore encontrada na região tropical é amplamente distribuído em regiões cultivadas na América Latina, África, Índia e Sudeste Asiático. Devido aos seus produtos e subprodutos de usos múltiplos, *J. curcas* tem sido relatada como fonte alternativa de energia sustentável e de sua cadeia produtiva muito diversificada (Pandey et al., 2012; Contran et al., 2013).

O teor de óleo nas sementes de *J. curcas* apresenta uma amplitude de 38.3%, que pode ser facilmente extraído e utilizado tanto para a produção de biodiesel como fonte para iluminação, medicina, bio-pesticida e para produção de sabão. Além disso, a torta de sementes, o sobreproduto da extração de óleo, pode ser utilizada como fertilizante orgânico, óleo combustível, ou para a produção de biogás (Pandey et al., 2012; Contran et al., 2013). Além disso, *J. curcas* é perene, apresenta caule suculento e evita a seca sob condições áridas e semiáridas, que oferece as vantagens de não competir diretamente contra as culturas alimentares, bem como, para mitigar a degradação do solo e recuperar terras marginais ou terras agrícolas abandonadas (Kumar e Sharma, 2008; Pandey et al., 2012).

Estudos apontam *J. curcas* como tolerante à seca por desenvolver estratégias morfológicas e fisiológicas de resistência ou tolerância a solos com baixo teor de água disponível. Dentre estas estratégias encontram-se ajustamento osmótico (Silva et al., 2010b), aumento da suculência caulinar (Maes et al., 2009), e redistribuição de fotoassimilados, (Díaz-López et al., 2012). O comportamento conservador de água através de uma regulação eficiente dos estômatos, como indicado por medições do teor relativo de água da folha (TRA) e o potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ), tem sido comumente observada em plantas jovens e adultas de *J. curcas* (Díaz-López et al., 2012; Fini et al., 2013; Santos et al., 2013; Sapeta et al., 2013; de Santana et al., 2015).

O mecanismo de ajuste osmótico em plantas tem sido considerado como uma estratégia importante fisiológica associada com tolerância à seca (Hessine et al., 2009). Isso leva a aumento da captação de água e ao aumento do crescimento celular das plantas durante estresse hídrico associado com a abertura parcial dos estômatos permitindo assimilação de CO<sub>2</sub> de baixo potencial de água (Alves e Setter, 2004). De acordo com Silva et al., (2010b), um mecanismo eficiente de ajuste osmótico foi demonstrado em *J. curcas* em resposta ao stress de seca, que envolveu osmolitos orgânicos e inorgânicos.

O controle estomático é comum às espécies de Euphorbiaceae, a fim de evitar a perda de água (El-Sharkawy, 2007), embora tal comportamento leva a uma redução de CO<sub>2</sub>, o que por sua vez altera a cadeia de transporte de elétrons (Chaves et al., 2009), que conduz a estresse oxidativo que pode causar a lesão das membranas devido a espécies reativas de oxigênio (ROS) (Pompelli et al., 2010a). No entanto, a superprodução de ROS nas células das plantas sob estresse pode danificar os componentes celulares, incluindo DNA, proteínas e membranas lipídicas (Mittler, 2002). Alguns genótipos desenvolveram mecanismos de defesa, tais como aqueles baseados na ação das enzimas antioxidantes, dentre elas a dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidase (POD, EC1.11.1.1) e catalase (CAT, EC 1.11.1.6) (Pompelli et al., 2010a; da Silva et al., 2016).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as respostas de genótipos de *J. curcas* à deficiência hídrica em termos de alterações dos processos fisiológicos e bioquímicos relacionados ao metabolismo fotossintético. Testou-se as hipóteses é que (1) *J. curcas* apresenta eficiente mecanismo de combate ao estresse oxidativo em condições de déficit hídrico, que contribui para a proteção do maquinário fotossintético e (2) as repostas ao déficit hídrico em termos de estresse oxidativo são variáveis entre os diferentes genótipos e guardam relação com o local de origem.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal e condições de crescimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no campus da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), localizada em Ilhéus, BA (14°47'00" S, 39°02'00" W), realizado entres os meses de setembro e novembro de 2014. Os valores médios de temperatura do ar (T), de umidade relativa média do ar (UR) e da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) foram de 26 °C, 75% e 12.1 mol fótons m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>, respectivamente.

Sementes de *J. curcas*, oriundas do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia – Distrito Federal, foram colocadas para germinar em vasos, contendo 12 dm<sup>3</sup> de um latossolo amarelo distrófico. Após 20 dias da germinação realizou-se o desbaste, deixando apenas uma planta por vaso. Imediatamente os vasos foram cobertos com papel alumínio para evitar a evaporação e o aquecimento do solo, iniciando assim, o tratamento de deficiência hídrica, sendo mantido por um período de 42 dias.

Os tratamentos consistiram em dois regimes hídricos medidos em percentagem de capacidade de campo (CC): plantas controle (100% da CC) e plantas submetidas à deficiência hídrica (50% da CC) e nove genótipos de distintas regiões do Brasil (Tabela 1). As plantas controle foram mantidas, todo o período experimental, irrigadas próximo à capacidade de campo (potencial mátrico do substrato variando de -33.1 a -15.2 kPa, as demais plantas foram mantidas sob deficiência hídrica, com faixa entre -207.0 e -89.9 kPa. A umidade no solo das plantas controle e de déficit hídrico (DH) foi determinada por meio do método gravimétrico e o potencial mátrico estimado utilizando uma curva de retenção de água.

**Tabela 1:** Identificação e origem dos genótipos pertencentes ao Banco de Germoplasma – Embrapa Agroenergia.

<b>Genótipos</b>	<b>Origem</b>
121	Bom Jesus-RJ
124	Maranhão-MA
148	Candeias-BA
168	Minas Gerais-MG
222	Paraná-PR
215	São Francisco do Glória-MG
226	Água de Santa Bárbara-SP
298	Sidrolândia-MS
299	Rio Grande do Sul-RS

## 2.1. RELAÇÕES HÍDRICAS

### 2.1.1. *Potencial hídrico foliar*

Avaliou-se o potencial hídrico foliar ( $\Psi_{pd}$ ) antes do amanhecer (4:00 h), e ao meio dia ( $\Psi_{md}$ ). Utilizou-se uma câmara de pressão PMS1000 (PMS Instrument Company, EUA), segundo a metodologia de Scholander et al. (1965).

### 2.1.2 *Teor relativo de água*

As medições do teor relativo de água (TRA) foram realizadas entre 6 e 7 h. Para tanto, foram retirados 5 discos em folhas maduras e imediatamente pesados para a obtenção da massa fresca (Mf), depois colocados para hidratar no escuro por 12 h, sendo pesados

novamente, obtendo a massa túrgida (Mt). Posteriormente, foram colocadas em estufa de ventilação forçada de ar a 75 °C por 48 h para obter a massa seca (Ms). A partir dessas variáveis, calculou-se o TRA com base na equação:  $[TRA = ((Mf - Ms) / (Mt - Ms)) \times 100]$ .

### 2.1.3 Potencial osmótico

Para a determinação do potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) foram coletados cinco discos foliares (5 mm de diâmetro) do terço médio da parte aérea da planta. Foi utilizado o psicrômetro de termopar (Câmara C-52, Wescor), conectados a um microvoltímetro de ponto de orvalho (Psy-PRO, Wescor, Logan, USA) (Figura 1). Os discos foliares foram congelados em nitrogênio líquido, e após descongelamento e estabilização da temperatura foram colocados na câmara para a obtenção das leituras do  $\Psi_s$ . Os valores de  $\Psi_s$  foram corrigidos pelo método de Wilson et al. (1979) e o ajustamento osmótico pela diferença no  $\Psi_s$  entre plantas com e sem estresse.



**Figura 1:** Psicrômetro (câmara C-52, Wescor) conectado ao microvoltímetro (Psy-PRO, Wescor, Logan, USA) utilizado para determinar o  $\Psi_s$ . Fonte: Arquivo pessoal.

## 2.2. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Ao final do experimento (42 DAT), folhas retiradas do terceiro par de folhas completamente expandida e madura foram colocadas para secar em estufa de ventilação forçada de ar ( $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}$ ). Logo em seguida, foram maceradas e armazenadas para as posteriores quantificações.

### ***2.2.1. Teor de prolina***

Foram analisados, nos tecidos foliares, os teores de prolina pelo método da ninhidrina ácida (Bates et al., 1973). Aproximadamente 50 mg de tecido foliar previamente macerados em nitrogênio líquido foram homogeneizados em 6 mL de ácido sulfossalicílico 3 % (p/v). Após centrifugação (8.000 g) por 10 min, coletou-se 2 mL do extrato, nos quais se adicionou mais 2 mL de solução ácida de ninhidrina (1.25 g de ninhidrina, 30 mL de ácido acético glacial, 20 mL de ácido fosfórico 6 M) e 2 mL de ácido acético glacial. As amostras foram incubadas a  $100^{\circ}\text{C}$  por 1 h e em seguida colocadas em gelo para finalizar a reação. Foram adicionados na solução 2 mL de tolueno, seguindo de agitação por 20 s para a completa extração da prolina. Após o repouso, o cromóforo foi aspirado com uma pipeta Pasteur para a leitura em espectrofotômetro a 520 nm, utilizando-se o tolueno como branco. As absorbâncias foram comparadas à curva-padrão de prolina (0 a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e as análises realizadas em quadruplicata, com os resultados obtidos expressos em micromol de prolina por grama de massa seca ( $\mu\text{mol g MS}^{-1}$ ).

### ***2.2.2. Teor de potássio***

O íon potássio ( $\text{K}^+$ ), foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Viégas et al. (2001). Utilizou-se 50 mg do material moído que foi submetido à digestão nitroperclórica aquecido gradualmente até  $250^{\circ}\text{C}$ . A determinação foi realizada por fotometria de chama (Fotômetro de chama B462 Micronal).

## **2.3. DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO**

### ***2.3.1. Trocas gasosas foliares***



Avaliaram-se as trocas gasosas em folhas completamente expandidas e maduras, com um sistema portátil de medição de fotossíntese Li-6400 XT (LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, USA). A taxa fotossintética líquida ( $P_N$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), razão entre as concentrações internas e externas de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ), foram medidas sempre das 08:30 às 11:30 h, sob luz saturante artificial de  $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e concentração atmosf\u00e9rica de  $\text{CO}_2$  ( $C_a$ ) de  $\pm 380 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . As efici\u00eancias intr\u00ednseca ( $P_N/g_s$ ) e instant\u00e2nea ( $P_N/E$ ) de uso da \u00e1gua foram calculadas a partir dos valores obtidos.

### **2.3.2. Pigmentos cloroplast\u00eddicos**

O teor de pigmentos cloroplast\u00eddicos foi determinado, em folhas completamente maduras. Foram coletados discos foliares (5 mm de di\u00e2metro) imediatamente incubados em tubos de vidro cobertos com papel alum\u00ednio, contendo 2 mL de dimetilsulf\u00f3xido (DMSO) saturado com  $\text{CaCO}_3$  (Hiscox e Israelstam, 1979), por 24 h em temperatura ambiente. Logo em seguida, foi determinada a absorb\u00e2ncia dos extratos em espectrofot\u00f4metro de microplacas (SpectraMax<sup>®</sup> Paradigm<sup>®</sup> - Multi-mode detection platform, Molecular Devices) de acordo a metodologia descrita por Wellburn (1994).

### **2.3.3. Rendimento qu\u00e2ntico do fotossistema II**

As medi\u00e7\u00f5es da emiss\u00e3o de fluoresc\u00eancia da clorofila a foram determinadas, atrav\u00e9s de um fluor\u00f4metro port\u00e1til n\u00e3o modulado (Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter - v 1.10 - Hansatech Instruments, Norfolk, UK), entre 08 e 12 h., nas mesmas folhas utilizadas para as medi\u00e7\u00f5es de trocas gasosas e para a estimativa do teor de clorofila. Ap\u00f3s a adapta\u00e7\u00e3o ao escuro, as folhas foram expostas a um pulso saturante de luz ( $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , comprimento de onda de 650 nm, por 1 s). O pulso de luz saturante foi de 0.3 s, sob frequ\u00eancia de 0.8 KHz. Com esses dados calculou-se a efici\u00eancia qu\u00e2ntica m\u00e1xima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ).

## **2.4. DETERMINA\u00c7\u00d5ES ENZIM\u00c1TICAS**

Foram coletadas amostras de caule (\u00e1pice e base) e folhas, retiradas do terceiro par folha completamente expandida e madura que, imediatamente, foram congeladas em nitrog\u00eânio l\u00edquido, liofilizadas e armazenadas em freezer ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). As leituras foram realizadas em

espectrofotômetro leitor de microplacas (SpectraMax<sup>®</sup> Paradigm<sup>®</sup> - Multi-mode detection platform, Molecular Devices).

#### ***2.4.1. Atividade de enzimas antioxidantes***

A atividade da peroxidase do guaiacol (GPX, EC 1.11.1.7) foi determinada de acordo com o método de Pirovani et al. (2008). Foram utilizadas microplacas com 96 poços com capacidade para 300 µL, contendo 140 µL de tampão de reação peroxidase 2x [40 mmol L<sup>-1</sup> de guaiacol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0.06% e fosfato de sódio (20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6.0) ], 139 µL de tampão fosfato (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6.0) e 1 µL de extrato enzimático, previamente diluído. A variação da absorbância a 470 nm foi monitorada durante 60 s de reação a 25 °C.

A dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada por medição da sua capacidade para inibir a redução fotoquímica do nitro azul de tetrazólio (NBT). Alíquotas de 100 µL da extração enzimática foram então transferidas para tubos de ensaios protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7.8, 0.1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75 µM de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2 µM de riboflavina e a concomitante transferência dos tubos para uma câmara iluminada por uma lâmpada fluorescente circular de 30 Watts, durante um período de 15 min. Em seguida, leituras de absorbância a 560 nm foram realizadas em espectrofotômetro. A atividade foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato que inibiu 50% da redução de NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971) e expressa em UA kg<sup>-1</sup> MS.

A atividade da enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Madhusudhan et al. (2003), cuja atividade é definida pela quantidade de enzima necessária para catalisar a decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para o ensaio, adicionou-se, em 20 µL do extrato enzimático, 0.98 mL de tampão fosfato de sódio 0.05 M pH 7.0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.0125 M suplementado com peróxido de hidrogênio a uma concentração final de 12.5 mM. A atividade de CAT foi determinada pela medição na redução da absorbância das amostras a 240 nm, consequência do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### ***2.4.2. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)***

A extração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada segundo a metodologia de Heath e Paker (1968). Aproximadamente 0.02 g das amostras liofilizadas de folhas foram trituradas em ácido tricloroacético (TCA) a 0.1% e homogeneizadas em 2 mL de solução aquosa de TCA a 0.1%. Os extratos obtidos foram centrifugados durante 6 min a 10.000 x g a 4°C. A partir do sobrenadante foram pipetados 0.5 mL de extrato em tubos para a reação. Nos tubos de reação foram adicionados 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0.5% (TBA) em TCA a 20%. Aos tubos do branco foram adicionados 1.5 mL de TCA a 20%. Os tubos permaneceram em banho maria a 95°C durante 30 min e, em seguida, as reações foram paralisadas imediatamente em gelo. Após o resfriamento, o conteúdo foi centrifugado durante 6 min a 10.000 x g. Logo após, a concentração de TBARS acumulada foi determinada por meio de leitura das absorvâncias das reações a 532 nm.

## **2.5. BIOMASSA**

Ao final do experimento, as plantas foram coletadas para a determinação da massa seca, seccionadas em raiz, caule e folhas, e, logo após, secas em estufa de ventilação forçada de ar (65°C ± 5°), até atingirem massa constante. A partir da massa seca dos diferentes órgãos, foram determinadas massa seca de raiz (MSR), massa seca do caule (MSC), massa seca foliar (MSF), razão de massa seca da raiz (RMSR), razão de massa seca do caule (RMSC), razão de massa seca foliar (RMSF) e razão raiz: parte aérea (R/PA).

## **2.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 9, formado por dois níveis de disponibilidade hídrica e nove genótipos de *J. curcas*, com cinco repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos ao teste F a 5 % de significância, por ANOVA fatorial e, quando indicado, a comparações de médias pelo teste de Scott Knott no mesmo nível de significância.

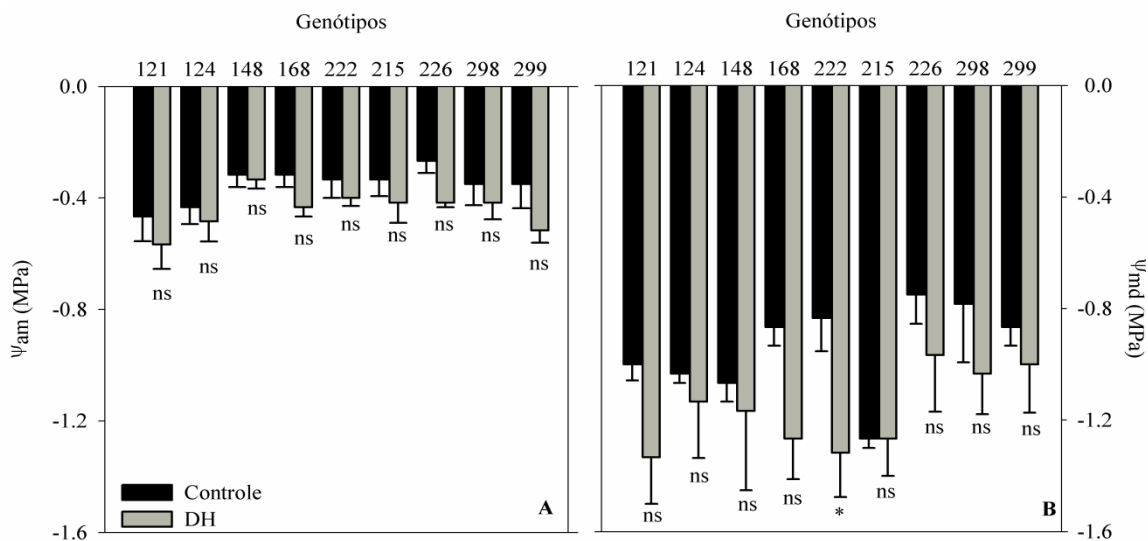
Foram realizadas análises de agrupamento e de componentes principais, utilizando variáveis fisiológicas ( $P_N$ ,  $g_s$ , prolina, SOD, GPX, CAT, AO e EUA) e de biomassa (MSR, MSC, MSF, RMSR, RMSC, RMSF e R/PA), obtidos pela diferença ( $\Delta$ ) entre as plantas controle (100% da CC) e plantas submetidas à deficiência hídrica (50% da CC). Como medida de dissimilaridade calculou-se a distância euclidiana média e para a formação dos

agrupamentos utilizou-se o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method) com média aritmética (Sneath e Sokal, 1973), calculando-se as taxas de contribuição relativa para a dissimilaridade pelo método de Singh, (1981), e o ponto de corte com base na distância Euclidiana. As análises foram realizadas com auxílio do Programa Genes 7.0 (Cruz, 2008) e o dendrograma foi obtido pelo programa STATISTICA 7.1 (Statsoft, 2005)

### 3. RESULTADOS

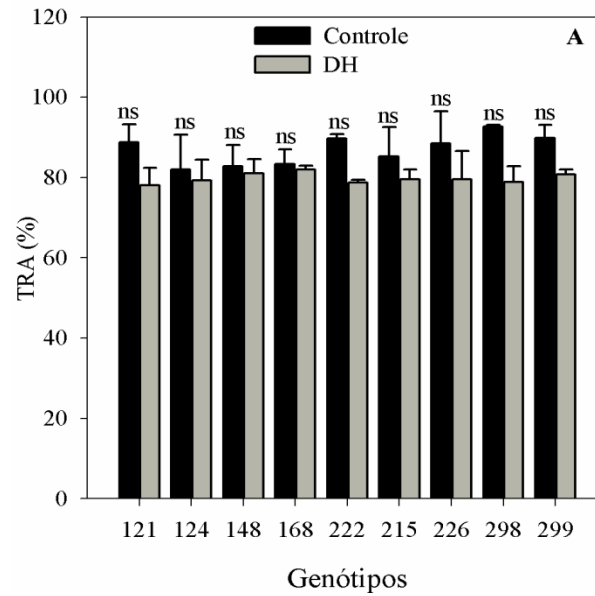
#### 3.1. Relações hídricas

Verificou-se que não houve diferença significativa entre os genótipos, bem como entre os tratamentos de deficiência hídrica (DH) para o potencial hídrico antemanhã ( $\Psi_{am}$ ) (Figura 1A). Em relação ao potencial hídrico meio dia ( $\Psi_{md}$ ), a DH levou a decréscimo significativo apenas no genótipo 222 (amplitude de -0.48 Mpa), não havendo diferenças significativas entre os genótipos estudados (Figura 1B).



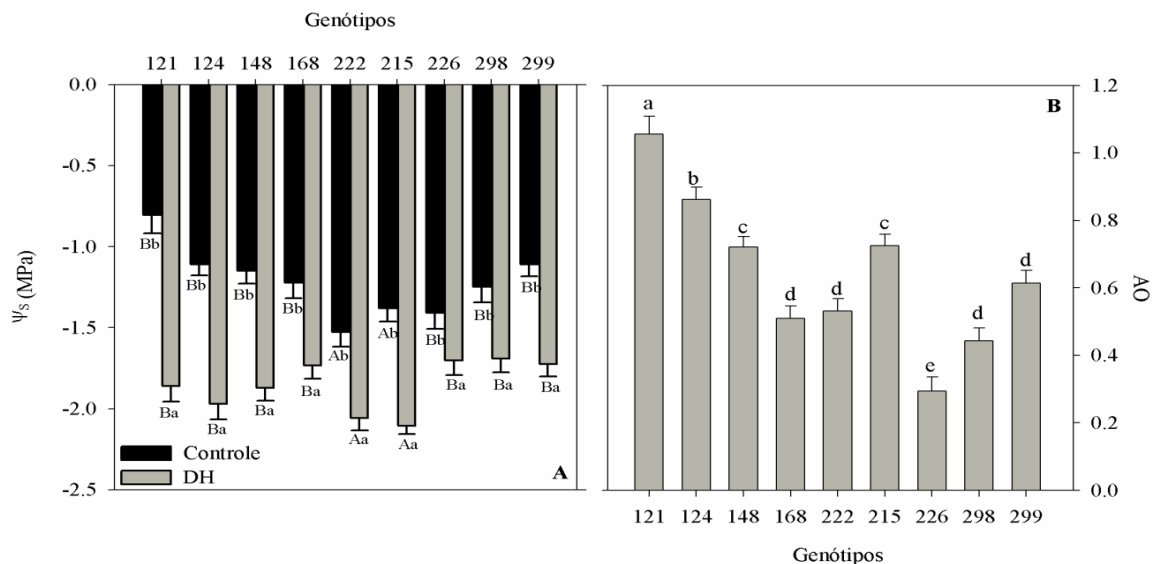
**Figura 2:** Valores de potencial hídrico antemanhã ( $\Psi_{am}$ , A) e ao meio dia ( $\Psi_{md}$ , B) medidos aos 42 DAT. As colunas são médias de 3 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Asterisco (\*) indica diferença, pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ) entre regimes hídricos. ns – não significativo.

Ao avaliarmos o status hídrico da planta aos 42 dias após o tratamento (DAT), através do teor relativo de água (TRA), observamos que não houve diferenças significativas entre os genótipos, bem como entre os tratamentos de DH (Figura 3A).



**Figura 3:** Teor relativo de água (TRA) em folhas de *Jatropha curcas* L. submetidas ao déficit hídrico aos 42 DAT. As colunas são médias de 4 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

Foram observadas diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos e o tratamento de DH para o potencial osmótico ( $\Psi_s$ ). Quando comparadas as plantas controle em relação às plantas de DH, verificamos que houve um aumento no  $\Psi_s$  de 52.5% (Figura 4A).



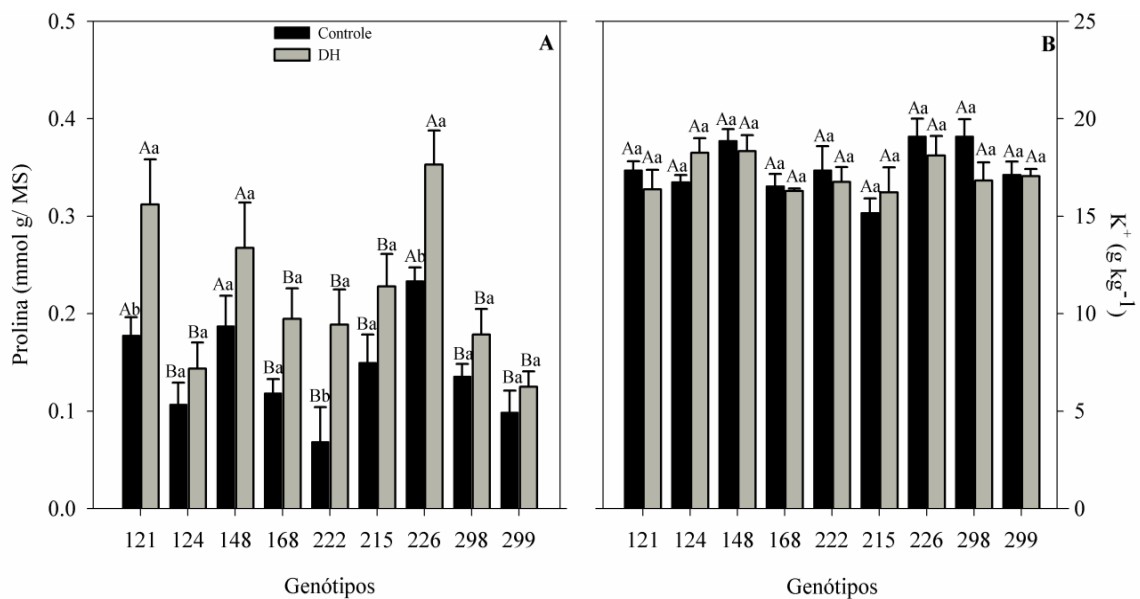
**Figura 4:** Valores do potencial osmótico ( $\Psi_s$ , A) e ajustamento osmótico (AO, B) de folhas de *J. curcas* submetidas ao déficit hídrico aos 42 DAT. As colunas são médias de 5 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre

genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

Com o aumento do  $\Psi_s$  nas plantas de DH quando comparadas com as plantas controle, verificou-se diferenças significativas entre os genótipos para o ajustamento osmótico (AO) (Figura 4B). Houve uma variação no AO para os genótipos 121 e 124, com valores de -1.86 e -1.97 MPa, respectivamente.

### 3.2. Conteúdo de prolina e potássio ( $K^+$ )

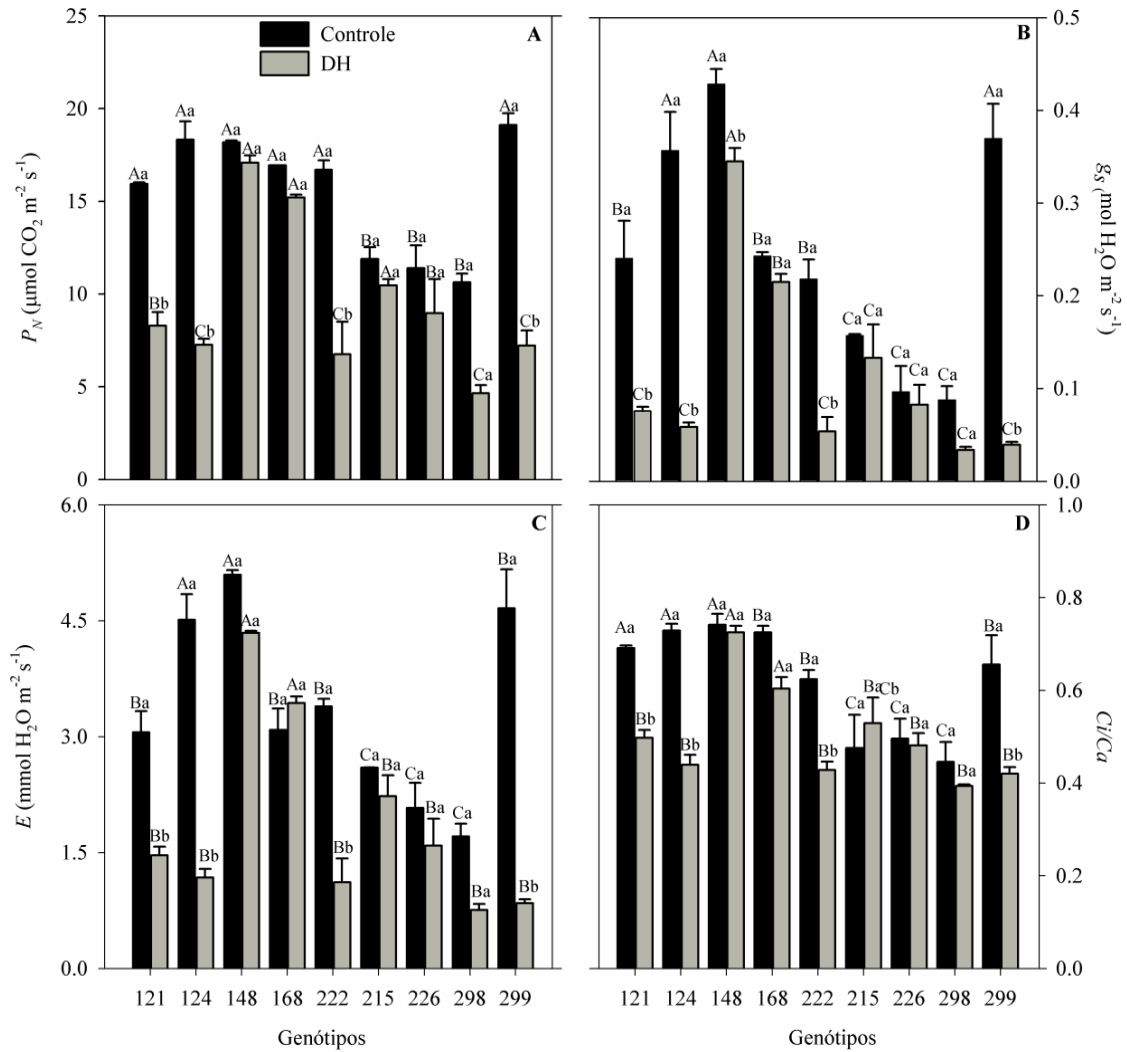
Verificou-se que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos de *J. curcas* e tratamentos de DH aos 42 DAT para o conteúdo de prolina (Figura 5A). As plantas submetidas à DH levaram a um aumento de 56% em relação às plantas controle. Em relação ao conteúdo de potássio ( $K^+$ ) não foram verificadas diferenças significativas entre os genótipos e tratamento de DH (Figura 5B).



**Figura 5:** Conteúdo de prolina (A) e potássio  $K^+$  (B) em folhas de *J. curcas* submetidas ao déficit hídrico aos 42 DAT. As colunas são médias de 5 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Trocas gasosas, teor de clorofila e rendimento quântico do fotossistema II

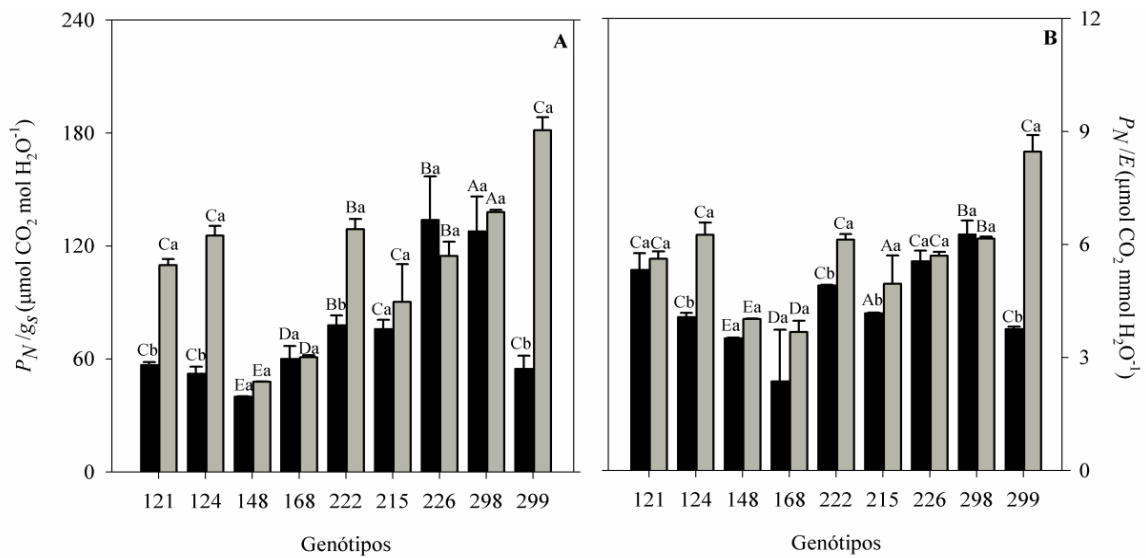
Os valores da taxa fotossintética ( $P_N$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), taxa transpiratória ( $E$ ) e relação  $C_i/C_a$  apresentaram reduções significativas ( $p < 0.05$ ) nas plantas de DH em relação às plantas controle (Figura 6A, B, C e D). Foram observadas diferenças entre os genótipos para as variáveis estudadas.



**Figura 6:** (A) Taxa fotossintética líquida ( $P_N$ ), (B) condutância estomática ( $g_s$ ), (C) taxa transpiratória ( $E$ ) e (D) relação  $C_i/C_a$  de *J. curcas* aos 42 DAT. As colunas são médias de 3 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

Aos 42 DAT foram observadas reduções nos valores da taxa fotossintética ( $P_N$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), taxa transpiratória ( $E$ ) e relação  $C_i/C_a$  de 62, 112, 78 e 23% respectivamente, em relação às plantas controle (Figura 6A, B, C e D).

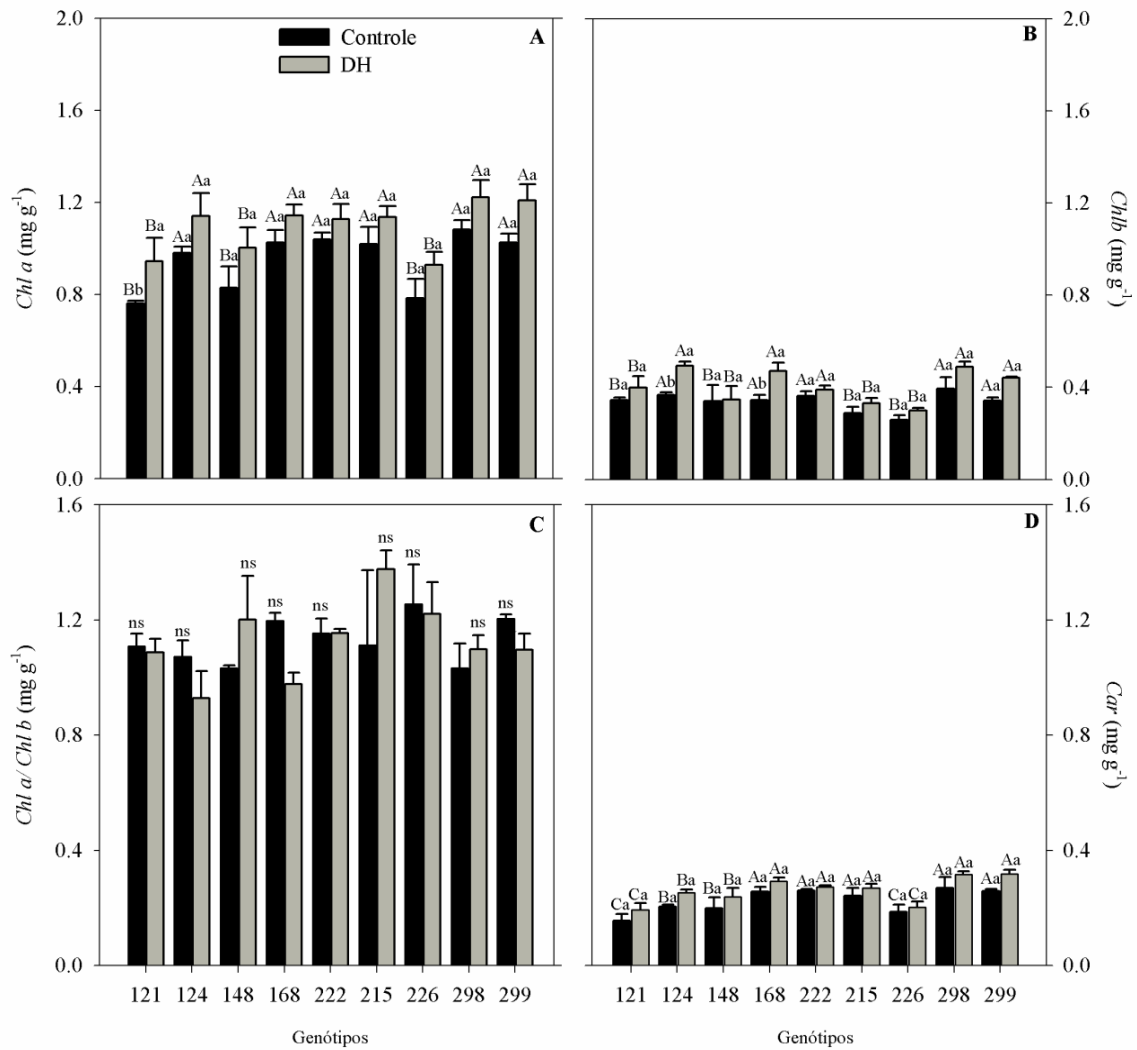
Em relação às eficiências do uso da água intrínseca ( $P_N/g_s$ ) e instantânea ( $P_N/E$ ), verificou que os genótipos apresentaram diferenças significativas ( $p < 0.05$ ), bem como entre os regimes hídricos (Figura 7A, B).



**Figura 7:** (A) Eficiência do uso da água intrínseca ( $P_N/g_s$ ) e (B) instantânea ( $P_N/E$ ) em folhas de *J. curcas* aos 42 DAT. As colunas são médias de 3 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

As  $P_N/g_s$  e  $P_N/E$  apresentaram maiores valores na maioria dos genótipos submetidos à DH em relação às plantas controle. Nas plantas controle,  $P_N/g_s$  variou entre 40 e 133  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ , enquanto no tratamento de DH a variação foi de 48 a 181  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ , mantendo uma média de aumento de aproximadamente 47% em relação ao controle. Ao mesmo tempo,  $P_N/E$  teve um acréscimo de 27% nas plantas estressadas com valores entre 3.6 e 8.4  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$  em relação ao controle (2.3 – 6.2  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ).



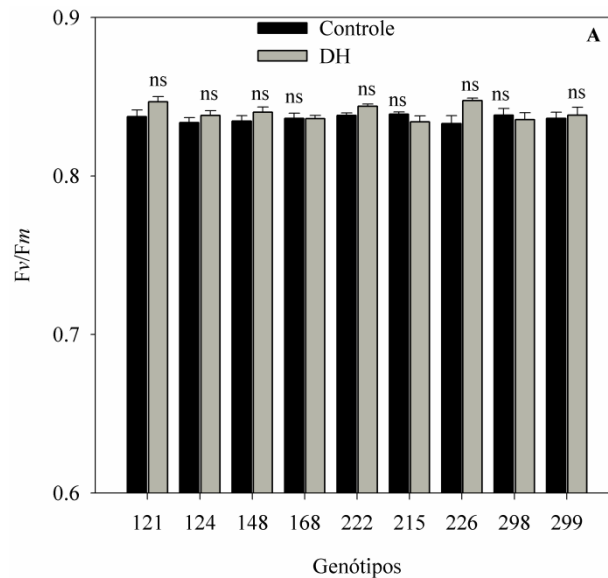


**Figura 8:** Clorofila a (*Chl a*, A), clorofila b (*Chl b*, B), relação *Chl a/Chl b* (C) e carotenóides (*Car*, D) em folhas de *J. curcas* submetidas ao déficit hídrico aos 42 DAT. As colunas são médias de 4 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ). ns - não significativo.

Não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os tratamentos de DH para o teor de clorofila a (*Chl a*), com exceção do genótipo 121, onde as plantas de DH apresentaram um aumento (24%) em relação às plantas controle. Entretanto, houve diferença entre os genótipos para *Chl a*, onde o 121, 148 e 226 diferiram dos demais, (Figura 8A). Para o teor de clorofila b (*Chl b*) houve diferença significativa entre os genótipos, sendo o 124, 168, 222 e 298 os que apresentaram moires teores em relação aos demais. A DH levou a aumento significativo no teor de *Chl b* em folhas dos genótipos 124 e 168. (Figura 8B). Ao analisar a relação entre o teor de *Chl a/Chl b*, observamos que não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) para os

genótipos, bem como para os tratamentos de DH (Figura 8C). O teor de carotenoides (*Car*) apresentou diferença significativa somente entre os genótipos (Figura 8D).

Não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) para o rendimento quântico do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) para os genótipos e entre os tratamentos (Figura 9A).



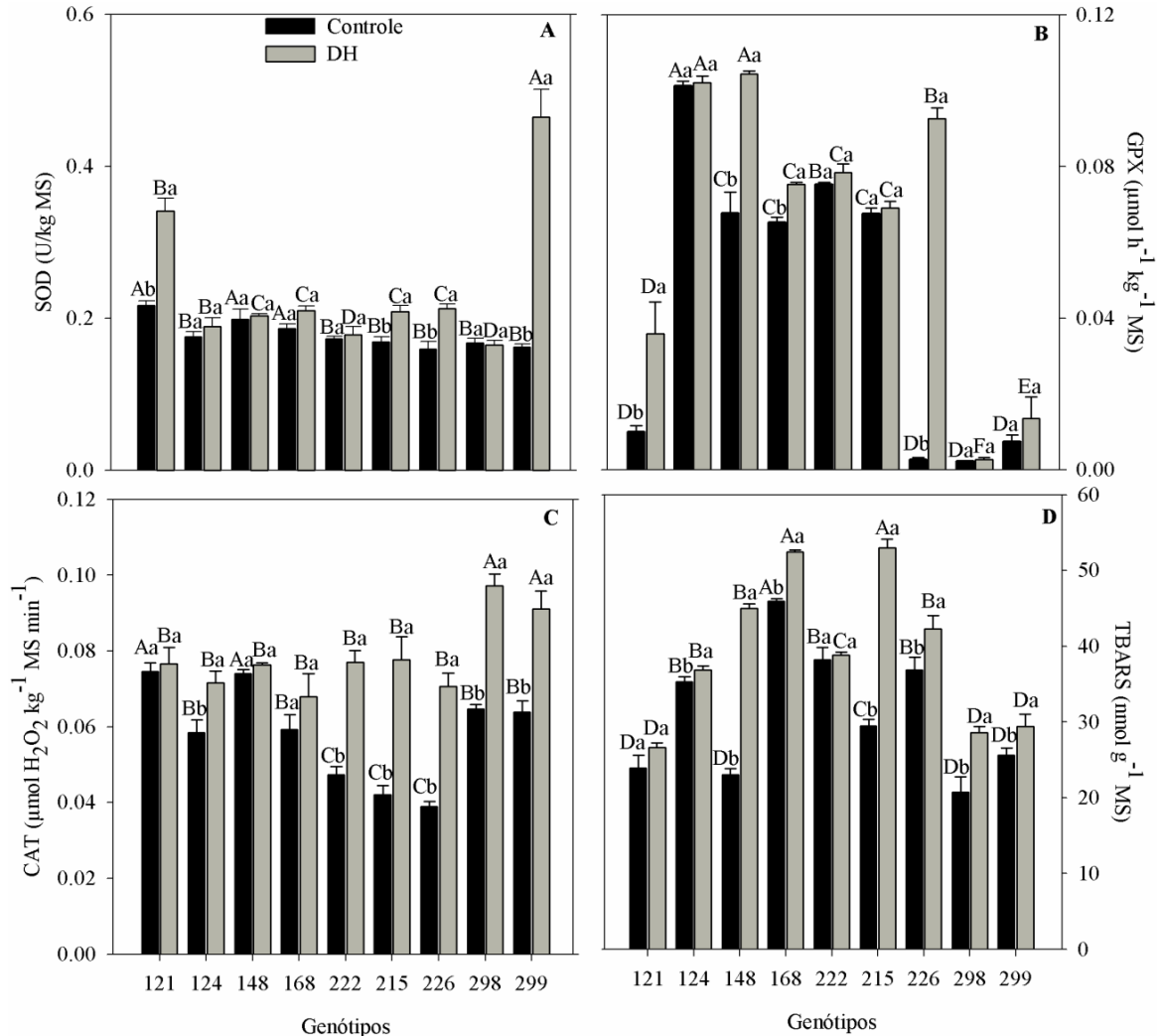
**Figura 9:** Rendimento quântico máximo de fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) em folhas de *J. curcas* submetidas ao déficit hídrico aos 42 DAT. As colunas são médias de 5 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

### 3.4. Enzimas antioxidantes e TBARS

Foram observadas diferenças significativas entre os genótipos bem como entre os tratamentos, em relação à dismutase do superóxido (SOD) (Figura 10A). O maior valor médio encontrado foi no genótipo 299 (0.465 U/kg MS) para o tratamento de DH e em seguida do 121 (0.341 U/kg MS), diferindo assim, dos demais.

Diferenças entre os genótipos e tratamentos foram encontradas também para a peroxidase do guaiacol (GPX). Quando comparados os tratamentos, verificamos que o 121, 148, 168 e 226 apresentaram acréscimos na atividade da GPX de 260, 54, 15 e 3395% respectivamente, nas plantas de DH em relação às plantas controle (Figura 10B).

Para a catalase (CAT), foram verificadas diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos e tratamentos (Figura 10C). O genótipo 226 apresentou uma menor atividade da quando comparado aos demais.



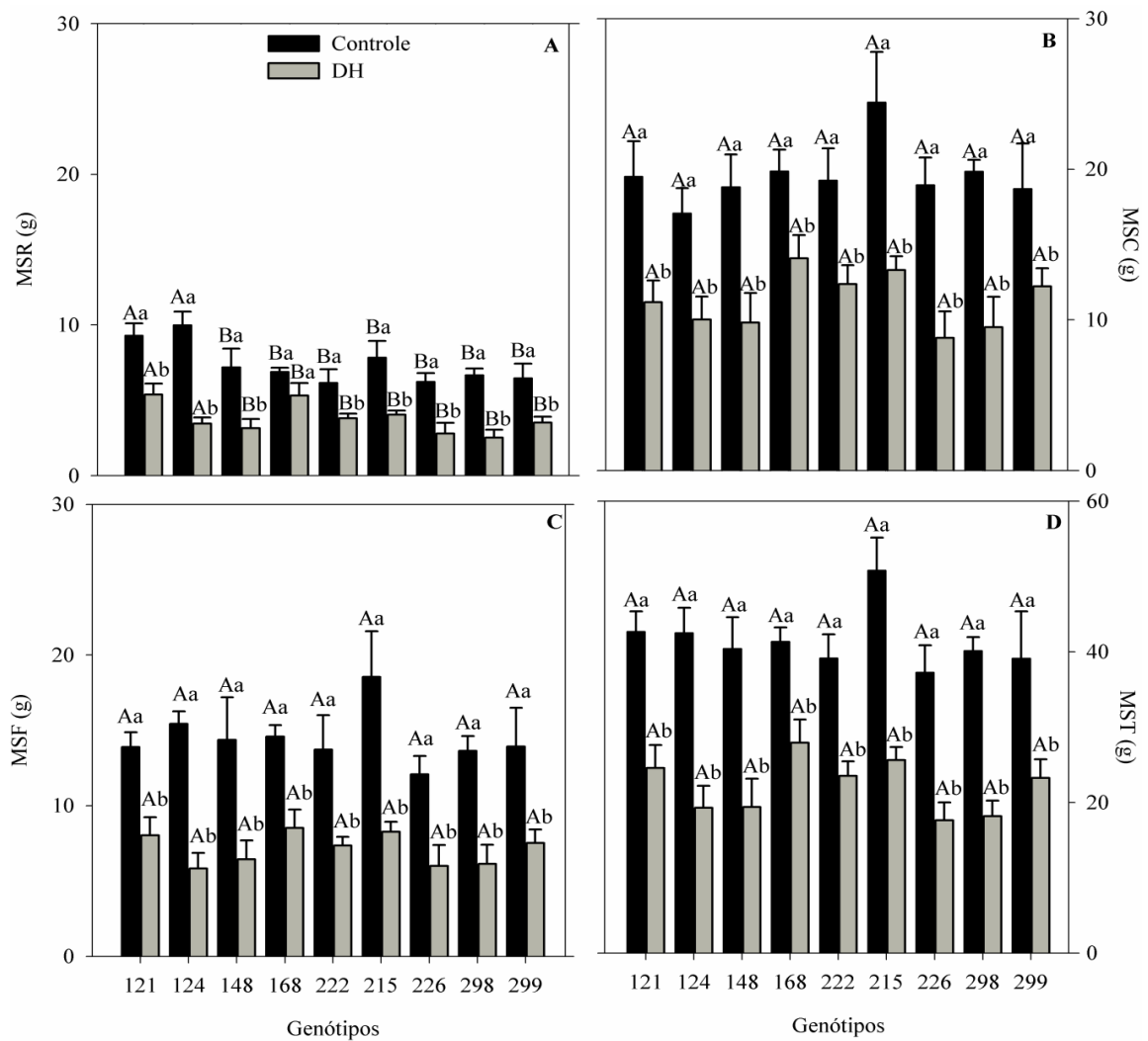
**Figura 10:** Atividade da dismutase do superóxido (SOD, A), peroxidase do guaiacol (GPX, B), catalase (CAT, C) e substâncias ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, D) em folhas de *J. curcas* submetidas ao déficit hídrico aos 42 DAT. As colunas são médias de 4 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

Em relação às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), verificamos que houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos, bem como entre os tratamentos de

DH. Na figura 10D, podemos observar que os genótipos 168 e 215 diferiram dos demais, e que o tratamento de DH teve um acréscimo de 26.4% em relação às plantas controle.

#### 4. Biomassa

Analisando a massa seca dos diversos órgãos, verificamos que a DH ocasionou reduções significativas em todas as variáveis (Figura 10). Além disso, para a massa seca de raiz (MSR) diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) foram observadas entre os genótipos (Figura 11A). Para a MSR houve reduções de 51% para as plantas submetidas à DH, quando comparadas às plantas controle. Já para a massa seca do caule (MSC), reduções de 57% foram verificadas nas plantas sob DH em relação às plantas controle (Figura 11B).



**Figura 11:** Massa seca de raiz (MSR, A), massa seca do caule (MSC, B), massa seca da folha (MSF, C) e massa seca total (MST, D) de plantas jovens de *J. curcas* aos 42 DAT. As colunas

são médias de 5 repetições e as barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos dentro de cada tratamento (controle ou DH) pelo teste de Scott-Knott e letras minúsculas comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

O tratamento de DH ocasionou reduções de 49% para a massa seca da folha (MSF) e 53% na massa seca total (MST) (Figura 11 C, D).

Quando reportadas as razões de massa seca da raiz (RMSR), do caule (RMSC) e da folha (RMSF), verificamos que não houve diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os genótipos (Tabela 1).

**Tabela 2:** Razão da massa seca de raiz (RMSR), razão da massa seca do caule (RMSC), razão da massa seca da folha (RMSF) de plantas jovens de *J. curcas* aos 42 DAT. Valores médios 5 repetições ( $\pm$  erro padrão,  $n = 5$ ).

Genótipos		RMSR ( $\text{g g}^{-1}$ )	RMSC ( $\text{g g}^{-1}$ )	RMSF ( $\text{g g}^{-1}$ )
121	Controle	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>	0.45 $\pm$ 0.03 <sup>A</sup>	0.33 $\pm$ 0.03 <sup>A</sup>
	DH	0.22 $\pm$ 0.02 <sup>A</sup>	0.45 $\pm$ 0.02 <sup>A</sup>	0.32 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>
126	Controle	0.23 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>	0.340 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>	0.36 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>
	DH	0.18 $\pm$ 0.00 <sup>A*</sup>	0.51 $\pm$ 0.00 <sup>A*</sup>	0.29 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>
148	Controle	0.17 $\pm$ 0.02 <sup>B</sup>	0.46 $\pm$ 0.04 <sup>A</sup>	0.35 $\pm$ 0.06 <sup>A</sup>
	DH	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>B</sup>	0.50 $\pm$ 0.0 <sup>A</sup>	0.33 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>
168	Controle	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>B</sup>	0.47 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>
	DH	0.19 $\pm$ 0.02 <sup>B</sup>	0.50 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>	0.30 $\pm$ 0.02 <sup>A</sup>
222	Controle	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>B</sup>	0.49 $\pm$ 0.03 <sup>A</sup>	0.34 $\pm$ 0.04 <sup>A</sup>
	DH	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>B</sup>	0.52 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>
215	Controle	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>B</sup>	0.47 $\pm$ 0.05 <sup>A</sup>	0.36 $\pm$ 0.06 <sup>A</sup>
	DH	0.15 $\pm$ 0.00 <sup>B</sup>	0.51 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>	0.32 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>
226	Controle	0.16 $\pm$ 0.00 <sup>B</sup>	0.50 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>	0.32 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>
	DH	0.15 $\pm$ 0.02 <sup>B</sup>	0.49 $\pm$ 0.04 <sup>A</sup>	0.35 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup>
298	Controle	0.16 $\pm$ 0.00 <sup>B</sup>	0.49 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>	0.33 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>
	DH	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>B</sup>	0.50 $\pm$ 0.06 <sup>A</sup>	0.35 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup>
299	Controle	0.16 $\pm$ 0.00 <sup>B</sup>	0.47 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>
	DH	0.15 $\pm$ 0.00 <sup>B</sup>	0.52 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>	0.32 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>

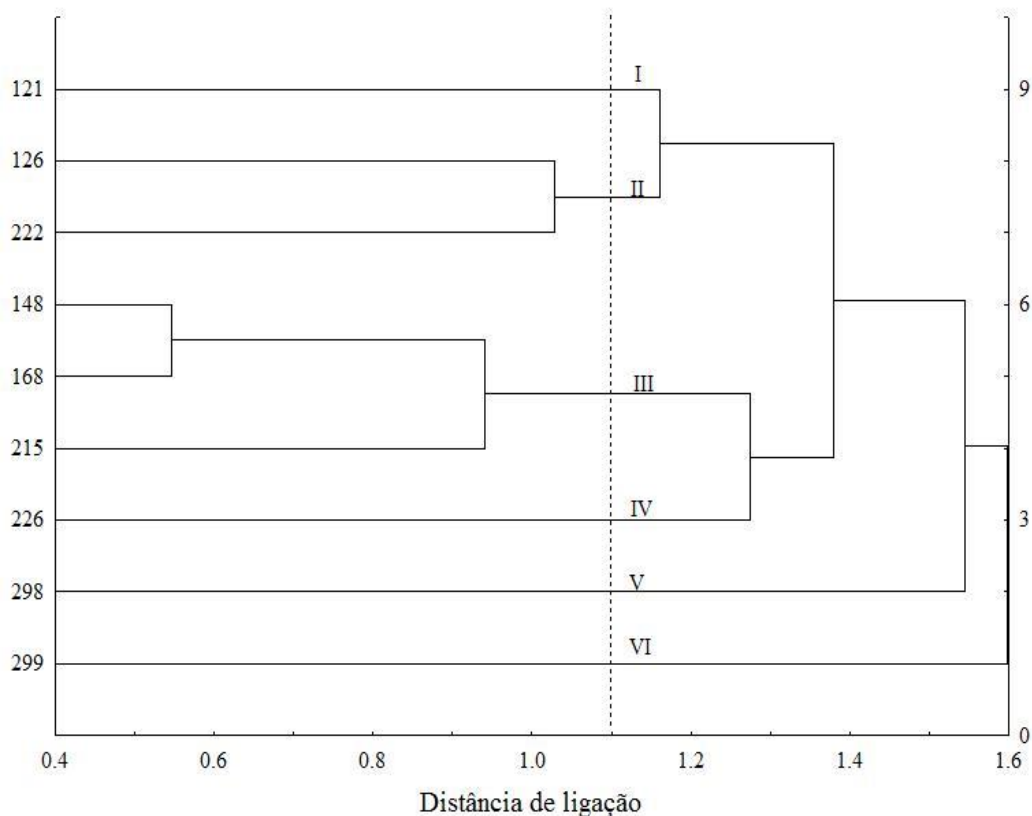
Letras maiúsculas indicam comparação entre genótipos pelo teste de Scott-Knott e asterisco (\*) comparação entre regimes hídricos pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

Apenas o genótipo 124 diferiu dos demais para a RMSR e RMSC entre os regimes hídricos (Tabela 2). A DH ocasionou reduções de 78% no genótipo 124 para a RMSR. Entretanto,

observou-se que a RMSC nas plantas sob DH foram maiores (30%), quando comparadas às plantas controle.

### 5. Análise Multivariada

A análise multivariada foi realizada para determinar se os parâmetros fisiológicos e de biomassa que poderão fornecer informações sobre a tolerância à seca em genótipos de *J. curcas*. Utilizou-se a diferença ( $\Delta$ ) entre as plantas controle e plantas submetidas à DH. Os valores da  $\Delta$  foram utilizadas para construir a matriz de semelhança e um dendrograma com dados de similaridade.



**Figura 12:** Análise de agrupamento de nove genótipos de *J. curcas* submetidos à deficiência hídrica no solo por 42 dias, com base na distância euclidiana a partir da diferença entre plantas controle e seca para as variáveis prolina, SOD, GPX, CAT, AO,  $P_N$ ,  $g_S$  e EUA.

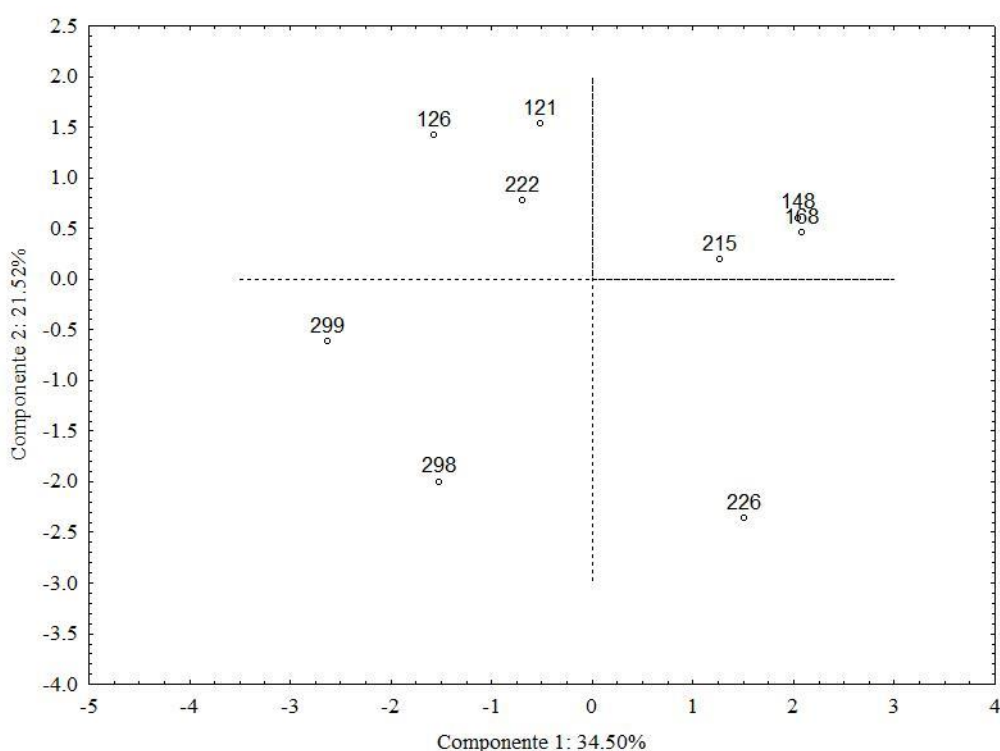
Ao analisarmos o dendrograma (Figura 12), podemos observar a formação de seis grupos. O primeiro grupo (I) formado pelo genótipo 121; o segundo (II) pelo 126 e 222; terceiro (III) formado por três (148, 168 e 215); quarto (IV) formado por um (226); quinto (V) formado por um (298) e o sexto (VI) formado por um (299).

A contribuição relativa foi analisada para destacar qual das variáveis que mais contribuíram para a formação dos grupos. Na tabela 3, podemos verificar que a  $g_s$  contribuiu com 24.9%, seguido da GPX com 20.9%. Entretanto, das variáveis fisiológicas a CAT foi a que menos contribuiu com 0.7%, seguida da EUA com 7.4% para a formação dos grupos.

**Tabela 3:** Contribuição relativa (S.j) dos caracteres para divergência – Singh (1981), para os nove genótipos de *J. curcas* de acordo com as variáveis fisiológicas.

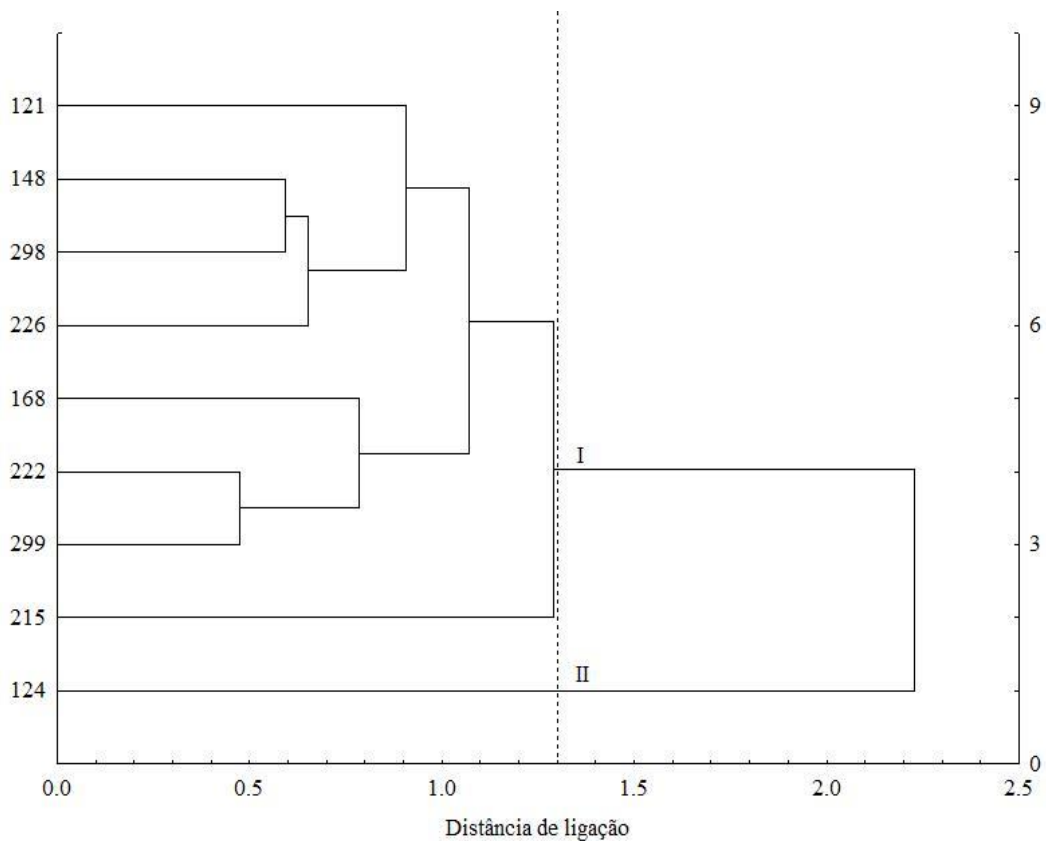
Variáveis	S.j	Valor (%)
Prolina	23.0	15.6
SOD	3.8	2.6
GPX	31.0	20.9
CAT	1.1	0.7
AO	25.9	17.5
$P_N$	15.1	10.2
$g_s$	37.0	24.9
EUA	10.9	7.4

O primeiro e segundo componentes principais representaram 34.50 e 21.52%, respectivamente, de variância total com um valor próprio total de 56.02% (Figura 13). A análise de componentes principais separou os genótipos de acordo com a tolerância à DH através das variáveis fisiológicas.



**Figura 13:** Análise de componentes principais de nove genótipos de *J. curcas* submetidos à deficiência hídrica no solo por 42 dias, segundo Singh (1981).

Na análise de agrupamento é possível observar a formação dos grupos distintos que apresentaram algum grau de similaridade. Os resultados mostraram a formação de dois grupos. O primeiro grupo (I) foi representado por oito genótipos (121, 148, 298, 226, 168, 222, 299 e 215) e o segundo (II) por um (124) (Figura 14).



**Figura 14:** Análise de agrupamento de nove genótipos de *J. curcas* submetidos à deficiência hídrica no solo por 42 dias, com base na distância euclidiana a partir da diferença entre plantas controle e seca para as variáveis MSR, MSC, MSF, RMSR, RMSC, RMSF e R/PA.

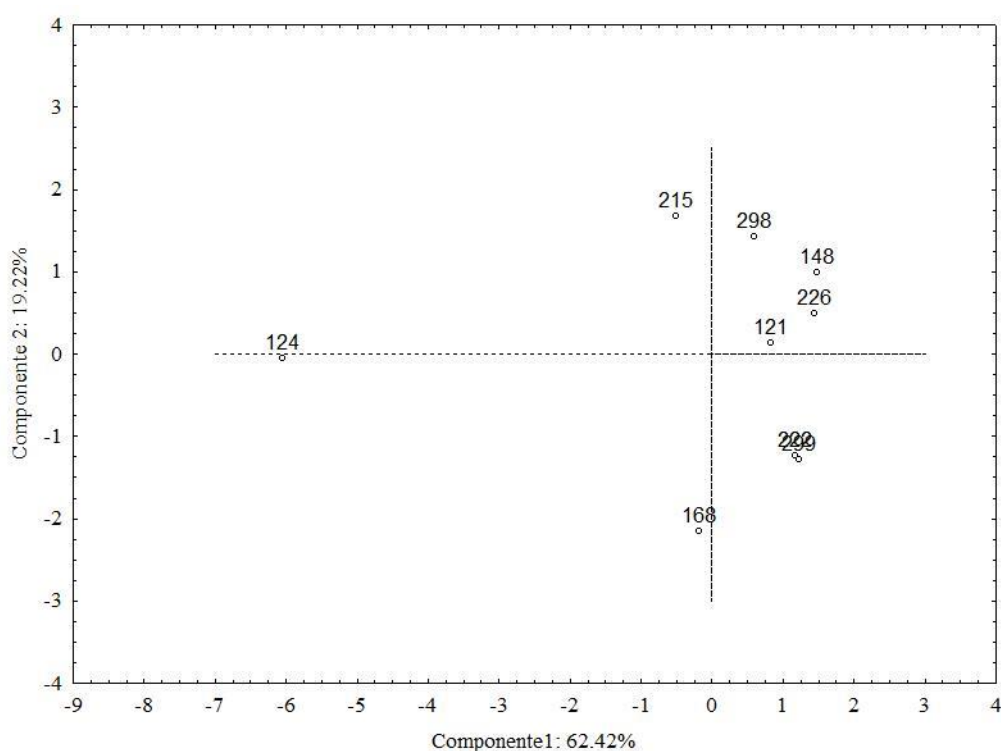
Dentre as variáveis analisadas as que mais contribuíram para a dissimilaridade genética e consequente formação dos grupos, foi a MSF (22.2%), seguida da MSC (16.5%) (Tabela 4).



**Tabela 4:** Contribuição relativa (S.j) dos caracteres para divergência – Singh (1981), para os nove genótipos de *J. curcas* de acordo com a biomassa.

Variáveis	S.j	Valor (%)
Massa Seca de Raiz	35.8	12.8
Massa Seca do Caule	45.9	16.5
Massa Seca Foliar	61.9	22.2
Razão da Massa Seca de Raiz	25.1	9.0
Razão da Massa Seca do Caule	34.9	12.5
Razão da Massa Seca Foliar	33.5	12.0
Razão Raiz/Parte aérea	41.1	14.7

O primeiro e segundo componentes principais representaram 62.42 e 19.22%, respectivamente, de variância total com um valor próprio total de 81.64% (Figura 15). De acordo com o componente 1, o 124 mostrou a maior divergência entre os genótipos estudados, apresentando assim, menor valor de  $\Delta$  para as combinações lineares das variáveis analisadas.



**Figura 15:** Análise de componentes principais de nove genótipos de *J. curcas* submetidos à deficiência hídrica no solo por 42 dias, segundo Singh (1981).

As diferenças encontradas na formação dos grupos estão relacionadas à distância entre os genótipos. Notavelmente, o 124 se diferenciou entre os demais para as variáveis de biomassa seca.

### 3. DISCUSSÃO

Nesse estudo, *J. curcas* pode ser considerada uma espécie tolerante à seca, porque foi capaz de manter uma boa condição hídrica nos tecidos foliares sob DH, como indicado pelos valores do potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) (Figura 2A, B) e TRA (Figura 3A). A equidade nos valores de  $\Psi_w$ , em especial nas horas mais quentes do dia, se dá principalmente pelo fechamento dos estômatos nas plantas controle, como necessidade de evitar a perda excessiva de água pelo processo de transpiração. Ao estudar plantas jovens de *J. curcas* (de Santana et al. 2015; da Silva et al. 2016; de Oliveira et al., 2016) verificaram que os valores de  $\Psi_w$  não foram alterados aos 66 dias após a imposição do deficit hídrico.

O TRA não variou nos genótipos de *J. curcas*, mesmo sob tensão máxima, o que sugere uma adaptação rápida das plantas para evitar a perda de água, como demonstrado por outros autores (Díaz-López et al., 2012; Silva et al., 2012; Fini et al., 2013; Meng et al., 2013; Sapeta et al., 2013). A conservação do teor de água nos tecidos vegetais de *J. curcas* pode ser considerada uma estratégia dessa espécie para tolerar períodos de deficiência hídrica no solo. A capacidade em se manter um alto valor de TRA pode ser explicada pela capacidade em se acumular osmolitos compatíveis, contribuindo para o ajustamento osmótico (Figura 4A, B).

Estudos de Silva et al. 2010b e da Silva et al. 2016 verificaram em plantas de *J. curcas* variações no ajustamento osmótico, sendo que as plantas submetidas à DH apresentaram maiores valores quando comparadas às plantas controle. A ocorrência ativa do AO pode ser estabelecida se houver um aumento significativo nas concentrações de solutos compatíveis (Silveira et al. 2009), como o aumento de prolina (Silva et al., 2015) e AST (da Silva et al., 2016)

Nas condições de deficit hídrico moderado a que foram submetidas as plantas de *J. curcas*, houve uma redução de  $P_N$  acompanhada da diminuição de  $g_s$ ,  $E$  e da relação  $C_i/C_a$ . (Figura 5A, B, C e D). Recentemente, de Santana et al. (2015) ao estudar três genótipos de *J. curcas* originários do Maranhão também verificaram reduções nas trocas gasosas foliares. A redução da  $P_N$  está relacionada à diminuição na aquisição de  $CO_2$  pelo fechamento estomático, e as limitações estomáticas podem estar ocorrendo, como indicado pela diminuição na relação

$C_i/C_a$ . Entretanto, essa capacidade de redução de  $g_s$ , não está associada à diminuição do  $\Psi_w$ , o que provavelmente pode estar ligado a outros fatores, como por exemplo, a sinalização hormonal, através do ácido abscísico (ABA), como foi demonstrado por da Silva et al. 2016.

Os valores das eficiências de uso da água aumentaram nas plantas submetidas ao deficit hídrico aplicado. Valores das  $P_N/g_s$  e  $P_N/E$  foram semelhantes entre os tratamentos de DH em relação às plantas controle, com exceção do genótipo 226. Dados semelhantes foram encontrados por Díaz-López et al. (2012), que após 27 dias sob irrigação deficitária (75% CC) *J. curcas* apresentou maior  $P_N/g_s$  nas plantas submetidas à DH. A alta EUA é uma consequência direta da redução em  $g_s$  primeiro que em  $P_N$ , sendo uma resposta observada em espécies que foram cultivadas sob DH moderada (Medrano et al., 2010). Porém, uma queda incomum para  $P_N/g_s$ , em condição de estresse hídrico severo pode indicar que em baixa  $g_s$ , a  $P_N$  diminui por limitações estomáticas e/ou mesofílicas, ou que a transpiração cuticular pode contribuir significativamente para a perda de água (Fini et al., 2013).

Na condição experimental presente, os teores de pigmentos cloroplastídicos aumentaram com a DH (Figura 6A, B, C e D). A ausência do efeito da seca nos teores dos pigmentos cloroplastídicos tem sido observado por outros autores, como Sapeta et al. (2013), que observaram valores de *Chl a* em torno de 3.5 e 2.2 mg g<sup>-1</sup> de MF para os tratamentos de seca e controle, respectivamente. Porém observa-se que danos na fotossíntese devido à redução do teor de clorofila são mais frequentes em estresse mais severo, como relatado por Kiani et al. (2008) em girassol, Massacci et al. (2008) em algodão e Pompelli et al. (2010a) em plantas de *J. curcas*, mantidas sem irrigação por dezoito dias.

A falta de efeito da DH sobre a máxima eficiência quântica do PS II ( $F_v/F_m$ ) no presente experimento revelam que o deficit hídrico imposto nesta pesquisa, não casou danos à maquinaria fotossintética, portanto, ausência de fotoinibição. Além disso, outros mecanismos como a prolina e AST podem explicar o efeito da seca e manutenção das membranas. Ao estudar a atividade fotoquímica de *J. curcas* sob condições de estresse hídrico, Silva et al. (2010c) observou que  $F_v/F_m$  não foi alterada, mantendo valores médios de 0.85 durante o período de estresse.

Alguns estudos relataram que o deficit hídrico produz estresse oxidativo como consequência do aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e também que muitas plantas são capazes de lidar com essa situação ativando as enzimas antioxidantes (Simova-Stoilova et al., 2009; Pompelli et al. 2010a; Silva et al. 2015a). As produções de ROS são controladas por diversos sistemas de defesa enzimáticos incluindo SOD, GPX e CAT (Gill e

Tuteja, 2010; Karuppanapandian et al. 2011) e não enzimáticos dentre os quais se destacam o ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona, prolina,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e flavonoides (Mittler et al., 2004).

A SOD é considerada a primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo, atuando na dismutação do radical superóxido, transformando em peróxido de hidrogênio e oxigênio ( $O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ) (Gratão et al., 2005). O produto da dismutação do superóxido pela SOD, o  $H_2O_2$ , deve ser removido da célula a fim de evitar sua conversão em radicais mais reativos, como o  $OH^{\bullet}$  (Perl-Treves e Perl, 2002). SOD são classificadas em 4 tipos, baseado no seu cofator metal: Fe-SOD (cloroplastídico), Mn-SOD (mitocondrial), Cu/Zn-SOD (cloroplastídico, peroxissomos e citosol) e Ni-SOD (cloroplasmático). A maior atividade da SOD em folhas foi encontrada em plantas submetidas à DH (Figura 10A). Da mesma forma, Silva et al. (2012), estudando plantas de *J. curcas* submetidas a diferentes regimes hídricos, relataram um ligeiro aumento (20%) na atividade da SOD em folhas. Isso pode indicar que SOD desempenhou um importante papel na regulação da remoção do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), quando as plantas são submetidas ao estresse hídrico. Entretanto, Gill e Tuteja, (2010) relataram que vários estresses abióticos conduzem frequentemente ao aumento da geração de ROS em que a SOD tem sido uma importante enzima na tolerância ao estresse de plantas, fornecendo a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados de ROS.

Peroxidases estão presentes na parede celular ou vacúolo. As peroxidases que estão presentes no apoplasto ligam-se com polímeros da parede celular. São enzimas que participam de diferentes processos fisiológicos, como na via de biossíntese de lignina e em mecanismos de defesa contra estresses bióticos e abióticos (Gill e Tuteja, 2010; Karuppanapandian et al., 2011). A atividade da GPX aumentou em média 44% nas plantas submetidas à DH quando comparadas às plantas controle (Figura 10B). Esse aumento da GPX em *J. curcas*, pode ser suficiente para proteger as proteínas, clorofila e lipídios contra o ataque das ROS. Isto significa que os genótipos estudados mantêm maior atividade de GPX em folhas e caule de plantas sob DH, ocasionando assim, uma maior retenção de água e tolerância ao déficit hídrico. Estudos tem relatado o aumento da atividade de peroxidases em *J. curcas*, sendo sensível ao deficit hídrico (Kumar e Sharma, 2008; Silva et al. 2015a; da Silva et al. 2016).

A enzima antioxidante CAT tem como função remover o  $H_2O_2$  gerado em peroxissomos por oxidases envolvidas na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, fotorrespiração, catabolismo da purina e durante o estresse oxidativo (Vellosillo et al., 2010). A CAT é uma enzima que catalisa reações de dismutação do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  e atua na eliminação das ROS durante

condições de estresse. Nossos dados revelaram que houve em média um aumento de 35% para a atividade da CAT quando comparados o tratamento de DH às plantas controle (Figura 10C). Vários autores também demonstraram o aumento da atividade da CAT sob condições de DH (Pompelli et al. 2010a; Santos et al. 2013; Silva et al. 2015a; da Silva et al. 2016). Portanto, as enzimas antioxidantes (SOD, GPX e CAT), podem ser consideradas indicadoras eficazes ao estresse fisiológico e estão envolvidas no mecanismo de defesa de *J. curcas* sob déficit hídrico.

Ao analisar a peroxidação lipídica nas folhas de *J. curcas*, verificamos um acréscimo de 26% nas plantas submetidas à DH, quando comparadas às plantas controle (Figura 10D). O teor de TBARS, um produto da peroxidação lipídica, tem sido considerado um indicador do dano oxidativo (Moller et al. 2007). Com isso, TBARS é um dos produtos finais, como resultado de danos de peroxidação lipídica por radicais livres. No presente trabalho, os níveis elevados de TBARS em plantas submetidas à DH revelam que houve um pequeno estresse oxidativo, o qual não foi suficiente para causar danos a membranas, causar danos celulares, o que sugere que esse estresse, é uma consequência da degradação lipídica. Apesar de poucas informações sobre a atividade de desintoxicação de ROS por compostos fenólicos e flavonoides, as antocianinas demonstraram potencial capacidade antioxidativa, tendo seu cátion flavílio oxidado pelo  $O_2^-$ , sugerindo sua ação de proteção generalizada às membranas celulares e organelas (Neil, 2002). Sendo assim, *J. curcas* apresenta um eficiente sistema enzimático de proteção oxidativa, pois em suas condições foi capaz de atenuar os efeitos de déficit hídrico, evitando assim, danos no aparato fotossintético (Yang et al. 2015)

Ao realizarmos a análise multivariada com valores da biomassa, verificamos pequena divergência entre os genótipos estudados, visto que, foram formados três grupos (Figura 13). Usando a  $\Delta$  das variáveis de biomassa estudadas foram identificadas quais delas indicam o melhor genótipo à tolerância ao déficit hídrico. A análise de agrupamento é uma ferramenta útil para selecionar genótipos com características desejáveis, pois ela agrupa genótipos de acordo com a semelhança ou distinção entre os mesmos, possibilitando um maior conhecimento do conjunto de dados em estudo, para futuros cruzamentos direcionados (Cruz et al., 2012).

Neste estudo, a MSF e MSC foram as variáveis mais eficientes para explicar a dissimilaridade entre os genótipos, devendo ser priorizada na escolha de genótipos em futuros estudos com a espécie. Já RMSR, foi a que menos explicou tal dissimilaridade (Tabela 2). Pode-se inferir que variáveis de menor contribuição são pouco informativas na caracterização

da variabilidade genética existente. A análise de componentes principais é outra maneira de estudar simultaneamente o conjunto das variáveis observadas para os genótipos de *J. curcas* (Figura 14). Assim, uma descrição da divergência genética dos genótipos pode ser feita utilizando-se apenas esses dois componentes, pois de acordo com Cruz e Regazzi, (2001), é desejável que a variância acumulada nos dois primeiros componentes principais exceda a 80% e no nosso estudo a variância foi de 81.64 e 56.02% para os parâmetros de biomassa e fisiológicos, respectivamente. Observa-se concordância entre a metodologia de Singh (1981) e a análise de componentes principais no que se refere à identificação das características que mais contribuíram para a divergência genética. A partir desses dados, esses genótipos podem servir como base para outros estudos de melhoramento genético da espécie.

#### 4. CONCLUSÕES

Apesar de apresentarem uma manutenção similar de água nos tecidos, os genótipos demonstraram possuir tanto características fisiológicas quanto bioquímicas diferenciadas.

Destacamos os genótipos 148, 168 e 222 como os mais tolerantes à seca por maiores atividades das enzimas antioxidantes, manutenção das trocas gasosas e biomassa.

Os resultados revelaram um sistema eficiente para a proteção contra o estresse oxidativo induzido pela seca, através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes e mecanismos não enzimáticos como a prolina e ajuste osmótico. Tal estratégia, observado em todos os genótipos, é sugerido para ser um componente importante de tolerância à seca em *J. curcas*.

#### 5. REFERÊNCIAS

Bates, L.S., Waldern, R.P., Teare, I.K. (1973). Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies. **Plant Soil** 39: 205-208.

Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochemical** 44: 276-287.

Chaves, M.M., Flexas, J.C., Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals Botany** 103: 551-560.

Contran, N., Chessa, L., Lubino, M., Bellavite, D., Roggero, P.P., Enne, G. (2013). State-of-the-art of the *Jatropha curcas* productive chain: From sowing to biodiesel and by-products. **Industrial Crops and Products** 42: 202-215.

Cruz, C.D., Regazzi, A.J. (2001). **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**, 2. ed. Viçosa, UFV 390 p.

Cruz, C.D. (2008). **Programa Genes (versão Windows)**: aplicativo computacional em genética e estatística.

Cruz, C.D., Regazzi, A.J., Carneiro, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2012. v. 1, 514 p.

de Oliveira, P. S., da Silva, L. D., de Santana, T. A., Laviola, B. G., Paiva, A. Q., Mielke, M. S., & Gomes, F. P. (2016). Morphophysiological changes in young plants of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) subjected to water stress and recovery. **African Journal of Agricultural Research** 11(45): 4692-4703.

de Santana, T.A., Oliveira, P.S., Silva, L.D., Laviola, B.G., Almeida, A-A.F., Gomes, F.P. (2015). Water use efficiency and consumption in different Brazilian genotypes of *Jatropha curcas* L. subjected to soil water deficit. **Biomass & Bioenergy** 75: 119-125.

Díaz-López, L., Gimeno, V., Simón, I., Martínez, V., Rodríguez-Ortega, W.M., García-Sánchez, F. (2012). *Jatropha curcas* seedlings show a water conservation strategy under drought conditions based on decreasing leaf growth and stomatal conductance. **Agricultural Water Management** 105: 48-56.

El-Sharkawy, M.A. (2007). Physiological characteristics of cassava tolerance to prolonged drought in the tropics: implications for breeding cultivars adapted to seasonally dry and semiarid environments. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 19: 257–286.

Fini, A., Bellasio, C., Pollastri, S., Tattini, M., Ferrini, F. (2013). Water relations, growth, and leaf gas exchange as affected by water stress in *Jatropha curcas*. **Journal of Arid Environments** 89: 21-29.

Gill, S.S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology Biochemical** 48: 909-930.

Heath R.L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics** 125: 189-198.

Hessine, K., Martínez, J.P., Gandour, M., Albouchi, A., Soltani, A., Abdelly, C. (2009). Effect of water stress on growth, osmotic adjustment, cell wall elasticity and water-use efficiency in *Spartina alterniflora*. **Environmental Experimental Botany** 67: 312-319.

Hiscox, J.D., Israelstam, G.F. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany** 57: 1332-1334.

Karuppanapandian, T., Wang, H.W., Prabakaran, N., Jeyalakshmi, K., Kwon, M., Manoharan, K., Kim, W. (2011). 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles. **Plant Physiology Biochemistry** 49: 168–177.

Kiani, S.P., Maury, P., Sarrafi, A.; Grieu, P. (2008). QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. **Plant Science** 175: 565–573.

Kumar, A., Sharma, S. (2008). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **Industrial Crops and Products** 28: 1-10.

Madhusudhan, R., Ishikawa, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., Shibata, H. (2003). Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. **Physiologia Plantarum** 117: 550-557.



Massacci, A., Nabiev, S.M., Pietrosanti, L., Nematov, S.K., Chernikova, T.N., Thor, K., Leipner, J. (2008). Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology Biochemistry** 46: 189–195.

Medrano, H., Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Gulías, J., (2010). Measuring water use efficiency in grapevines. In: Delrot, S., Medrano, H., Or, E., Bavaresco, L., Grando, S. **Methodologies and Results in Grapevine Research**. Springer, London, 124–156.

Meng, G.; Li, G.; He, L.; Chai, Y.; Kong, J.; Lei, Y. (2013). Combined Effects of CO<sub>2</sub> Enrichment and Drought Stress on Growth and Energetic Properties in the Seedlings of a Potential Bioenergy Crop *Jatropha curcas*. **Journal of Plant Growth Regulation** 32(3): 542-550.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 7: 405-410.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science** 9: 490-498.

Moller, I., Jensen, P., Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology** 58: 459.

Neill, S. J. R.; Desikan, A.; Clarke, R.D.; Hurst, J.T.; Hancock. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal Experimental Botany** 53: 1237-1247.

Pandey, V.C., Singh, K., Singh, J.S., Kumar, A., Singh, B., Singh, R.P. (2012). *Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for sustainable environmental development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 16: 2870-2883.

Pirovani, C.P., Carvalho, H.A.S., Machado, R.C.R., Gomes, D.S., Alvim, F.C., Pomella, A.W.V., Gramacho, K.P., Cascardo, J.C.M., Pereira, G.A.G., Micheli, F. (2008). Protein

extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis** 29 (11): 2391-2401.

Pompelli, M.F., Barata-Luís, R., Vitorino, H.S., Gonçalves, E.R., Rolim, E.V., Santos, M.G., Almeida-Cortez, J.S., Ferreira, V.M., Lemos, E.E., Endres, L. (2010a). Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. **Biomass & Bioenergy** 34:1207-1215.

Santos, C.M., Verissimo, V., Filho, H.C.L.W., Ferreira, V.M., Cavalcante, P.G.S., Rolim, E.V., Endres, L. (2013). Seasonal variations of photosynthesis, gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grown in semi-humid and semi-arid areas subject to water stress. **Industrial Crops and Products** 41:203-213.

Sapeta, H., Costa, J.M., Louren, T., Maroco, J., van der Linde, P., Oliveira, M.M. (2013) Drought stress response in *Jatropha curcas*: Growth and physiology. **Environmental and Experimental Botany** 85: 76-84.

Scholander, P.F., Hammer, H.T., Bradstreet, E.D., Haningsen, E.A. (1956). Sap pressure in vascular plants. **Science** 148: 339-346.

Silva, E.M., Ferreira-Silva, S.L., Viégas, R.A., Silveira, J.A.G. (2010b). The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. **Environmental Experimental Botany** 69: 279-285.

Silva, E.N., Ribeiro, R.V., Ferreira-Silva, S.L., Viégas, R.A., Silveira, J.A.G., (2010c). Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Arid Environments** 74: 1130-1137.

Silva, E.N., Silveira, J.A.G, Ribeiro, R.V., Vieira, S.A. (2015a). Photoprotective function of energy dissipation by thermal processes and photorespiratory mechanisms in *Jatropha curcas*

plants during different intensities of drought and after recovery. **Environmental and Experimental Botany** 110: 36-45.

Silva, E.N., Silveira, J.A.G., Rodrigues, C.R.F., Viégas, R.A. (2015). Physiological adjustment to salt stress in *Jatropha curcas* is associated with accumulation of salt ions, transport and selectivity of K<sup>+</sup>, osmotic adjustment and K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis. *Plant Biology* 17(5): 1023-1029.

Silva, E.N., Ribeiro, R.V., Ferreira-Silva, S.L., Vieira, A.S., Ponte, L.A.F., Silveira, J.A.G. (2012). Coordinate changes in photosynthesis, sugar accumulation and antioxidative enzymes improve the performance of *Jatropha curcas* plants under drought stress. **Biomass & Bioenergy** 45: 270-279.

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.

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. **Plant Growth Regulation** 58: 107-117.

Singh, D. (1981). The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding** 41: 237-245.

Statsoft, Inc. (2005). **Statistica for Windows (data analysis software system), version 7.1**. Statsoft, Tulsa, Oklahoma (USA).

Vellosillo, T., Vicente, J., Kulasekaran, S., Hamberg, M., Castresana, C. (2010). Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. **Plant Physiology** 154: 444-448.

Viégas, R.A., Silveira, J.A.G., Lima Júnior, A.R., Queiroz, J.E., Fausto, M.J.M. (2001). Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 5: 216-222.

Wilson, J.R., Fisher, M.J., Schulze, E.D., Dolby, G.R., Ludlow, M.M. (1979). Comparison between pressure–volume and dew point-hygrometry techniques for determining the water relations characteristics of grass and legume leaves. **Oecologia** 41: 77-88.

Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology** 144: 307-314.

Yang, S.L., Chen, K., Wang, S.S., Gong, M. (2015). Osmoregulation as a key factor in drought hardening-induced drought tolerance in *Jatropha curcas*. **Biologia Plantarum** 59: 529-536.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostraram que *J. curcas* apresenta grande adaptabilidade a reduções de água no solo. No entanto, não foi possível concluir se plantas de *J. curcas* apresentam alteração no metabolismo fotossintético. Apesar do aumento da atividade da PEPC, os valores encontrados de composição isotópica de  $\delta^{13}\text{C}$  não foram típicos de plantas MAC, ou de plantas que apresentam a transição entre o metabolismo C3 e o MAC, com acúmulo de ácidos orgânicos (malato e citrato) em plantas irrigadas e sob deficiência hídrica, baixa, juntamente com a redução do amido durante o período experimental. O acúmulo de amido pode indicar uma maior utilização deste hidrato de carbono para a síntese de ácidos orgânicos durante este período, além de ser usado para a respiração celular.

Os dados não permitem concluir se *J. curcas* pode apresentar as alterações do metabolismo C3 para o MAC, pois esperávamos que o acúmulo de citrato e principalmente malato fosse superior às 4 h, em relação às 16 h. Estes resultados podem estar relacionados com o horário das coletas, pois a indução do mecanismo MAC pode ter iniciado após às 16 h, e terminado após às 4 h. Assim, um mecanismo mais versátil e dinâmico de mudança C3-CAM-C3 parece mais adequado.

Quanto a tolerância genotípica, os genótipos 148, 168 e 222 mostraram ser os menos sensíveis e mais tolerantes à deficiência hídrica no solo, mantendo as trocas gasosas foliares, enzimas antioxidantes, variáveis de crescimento e biomassa.

O aumento no conteúdo da prolina e AST contribuíram para a hidratação das folhas. Esta manutenção de turgor em *J. curcas* influenciou na condutância estomática, resultando em melhor desempenho fotossintético e na eficiência do uso da água nestas plantas.

Pesquisas adicionais são necessárias para elucidar e refinar os achados relativos à mudança metabólica fotossintética induzida pela seca em *J. curcas*.