

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO-MIÚDO (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) SUBMETIDOS AO ESTRESSE SALINO

DEUNER, Cristiane¹; MAIA, Manoel de Souza²; ALMEIDA, Andréia da Silva³; DEUNER, Sidnei⁴

¹Bolsista PIBIC/CNPq, Depto. Fitotecnia, FAEM UFPel, ²Prof.º Associado/Orientador Depto. Fitotecnia, FAEM, UFPel, ³ Seed Care Institute – Syngenta, Holambra – SP; ⁴Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. cdeuner@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

O feijão-miúdo (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), importante leguminosa anual, é encontrado em todo território nacional. No Rio Grande do Sul (RS) a maior produção encontra-se nos municípios de São José do Norte, Tavares e Mostardas. Estima-se que estes genótipos tenham sido introduzidos na região com a chegada dos colonizadores açorianos, em 1725.

As plantas estão freqüentemente sujeitas a condições adversas, denominadas estresses ou distúrbios ambientais, que limitam sua produtividade (Ashraf e Harris, 2004). A salinidade é um dos mais importantes fatores de estresse abiótico, afetando diversos aspectos da fisiologia e bioquímica das plantas, reduzindo significativamente seus rendimentos. Condições de elevada salinidade podem ser causadas por diversos fatores, como práticas inadequadas de irrigação, inundação do solo pela água do mar em regiões costeiras, como também depósito de altas concentrações de cloreto de sódio (NaCl) em regiões com recente história geológica marinha (Tester e Davenport, 2003).

O feijão-miúdo é considerado moderadamente tolerante à salinidade, tolera a irrigação com água salina com condutividade elétrica de até 3,3 dS m⁻¹ e uma condutividade elétrica do solo de 4,9 dS m⁻¹ (Ayers e Westcot, 1999), sem redução na produtividade. No entanto, as concentrações de sais que restringem o crescimento do feijão variam amplamente entre as variedades, e dependem não só do tipo de sal, mas também do tempo de exposição e do seu estágio de desenvolvimento.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações salinas na atividade de enzimas antioxidantes em quatro genótipos de feijão-miúdo de uso comum na região de São José do Norte-RS.

2 METODOLOGIA

O experimento foi desenvolvido no Laboratório Didático de Análises de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas. O material estudado foram sementes de quatro genótipos de feijão-miúdo denominados popularmente de “Amendoim, Mosqueado, Baio e Preto”, produzidos na safra 2009 no município de São José do Norte-RS.

As sementes de cada genótipo foram semeadas em rolos de papel “germites” embebido na quantidade de 2,5 vezes o seu peso inicial com solução de cloreto de sódio (NaCl) para simular o estresse salino, nas concentrações de 50, 100, 150, 200 mM, além do tratamento controle, sem sal. Depois de estabelecidos

os diferentes tratamentos, as sementes foram colocadas para germinar em germinador com temperatura constante de 25°C e após oito dias foram retiradas amostras para avaliação da atividade enzimática.

Atividade enzimática – determinada a partir da maceração de 200 mg de tecido vegetal na presença de 50% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizado em 1,8 mL do tampão de extração composto por: fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Após centrifugação a 12.000g por 15 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi coletado. O extrato obtido pela centrifugação foi utilizado para a quantificação das proteínas em espectrofotômetro a 595 nm pelo método de Bradford (1976) e determinação da atividade específica das enzimas antioxidantes, descrita a seguir.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis e Ries, 1977), em um meio de reação composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μ M, NBT 75 μ M e riboflavina 2 μ M. As leituras foram realizadas a 560 nm. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições de ensaio. A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada segundo Nakano e Asada (1981), pela avaliação da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O meio de reação incubado a 28°C foi composto de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM. A atividade da catalase (CAT) foi determinada conforme Azevedo et al. (1998), estimada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 2 min em um meio de reação contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e H₂O₂ 12,5 mM.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x5, sendo o fator A os genótipos e o fator B as concentrações. As médias de três repetições, após análise de variância, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A SOD, primeira enzima a atuar no sistema antioxidante, realizando a dismutação do radical superóxido (O₂^{•-}) a peróxido de hidrogênio (H₂O₂), apresentou atividade significativamente superior ao controle em todas as doses de NaCl avaliadas (Figura 1A), caracterizando uma eficiente detoxificação do radical O₂^{•-}, principalmente até a concentração de 150 mM de NaCl, onde sua atividade foi máxima. Por outro lado, a atividade da SOD entre os genótipos em cada tratamento não diferiu.

Por outro lado, entre os quatro genótipos de feijão-miúdo estudados, foi observado comportamento distinto na atividade da APX e CAT. A atividade da APX (Figura 1B) foi significativamente superior ao controle no tratamento 50 mM de NaCl para os genótipos Baio e Preto, já em 100 mM de NaCl, todos os genótipos apresentaram aumento significativo, caracterizando uma efetiva eliminação do H₂O₂ originado pela atividade da SOD (Figura 1A). Por outro lado, no tratamento com 150 mM, onde houve máxima atividade da SOD, a APX já não atuou mais de forma eficiente, sendo mais evidente no tratamento com 200 mM de NaCl, com atividade inferior a observada no controle. Aumentos na expressão da APX tem sido relatados em plantas submetidas a tratamentos com NaCl por Kawasaki et al. (2001).

A atividade da CAT (Figura 1C), em geral, foi inferior a APX, o que é justificado pela sua menor afinidade pelo H_2O_2 , tendo assim, a APX sido mais eficaz na sua remoção. Desta forma, maiores atividades da CAT foram observadas no tratamento com 50 mM de NaCl para os genótipos Mosqueado e Baio e nos tratamentos com 100 e 150 mM de NaCl para o Amendoim, sendo que nestas concentrações, em comparação aos demais genótipos, foi o que expressou melhor atividade.

De maneira geral os resultados mostram que na concentração de 200 mM de NaCl houve significativa redução na atividade das enzimas antioxidantes, caracterizando um possível aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), intensificando o estresse oxidativo.

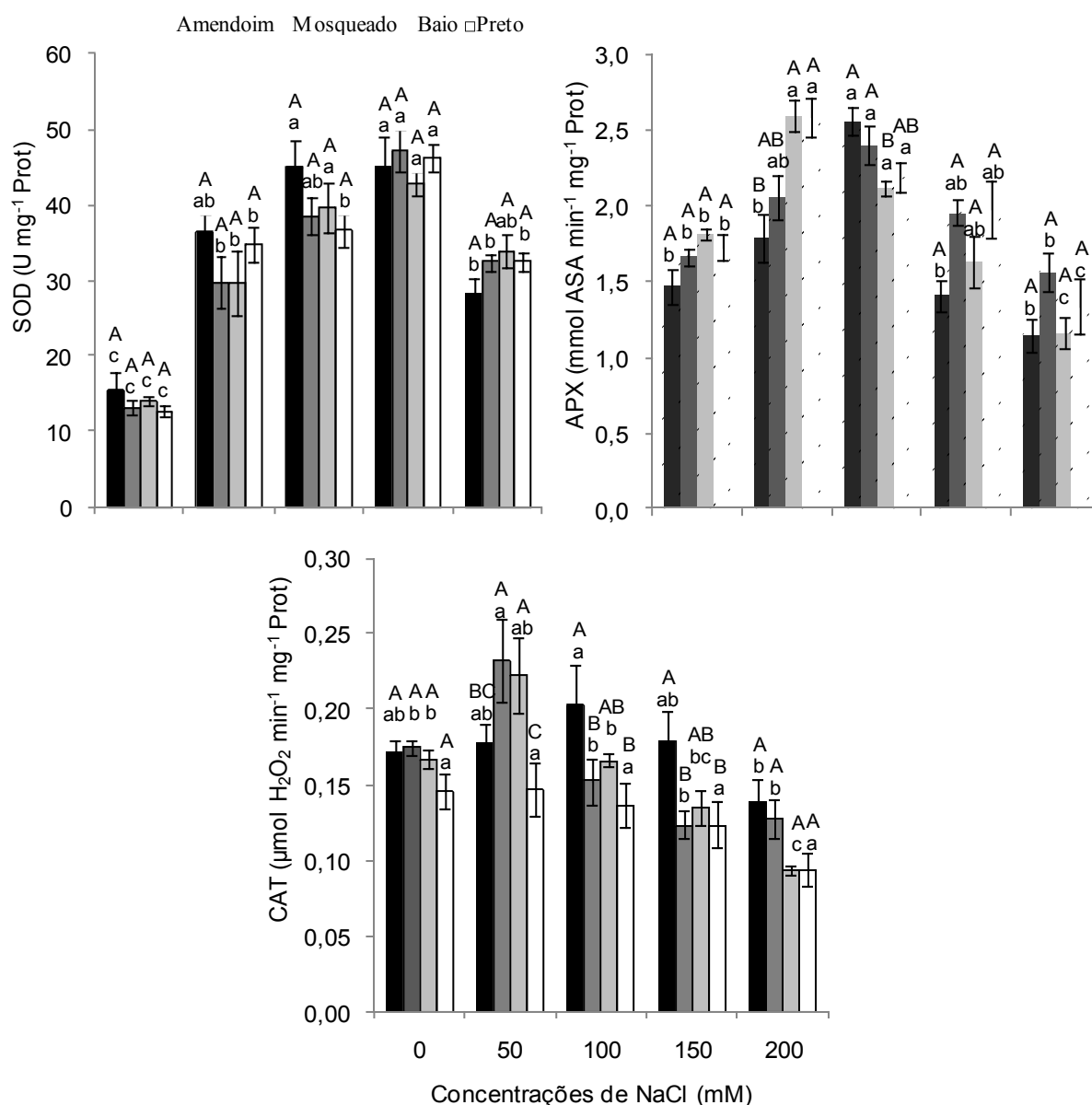


FIGURA 1 - Atividade específica das enzimas superóxido dismutase – SOD – (A), ascorbato peroxidase – APX (B) e catalase – CAT (C) em sementes de quatro genótipos de feijão-miúdo (Amendoim, Mosqueado, Baio e Preto) submetidas a diferentes concentrações de NaCl. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (entre genótipos) e minúscula (entre tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4 CONCLUSÃO

A maior ativação das enzimas antioxidantes SOD e APX, nas doses intermediárias de NaCl, gerou maior proteção dos genótipos de feijão-miúdo contra o estresse oxidativo até 150 mM.

5 REFERÊNCIAS

ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. **Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants**. *Plant Science*, v.166, p.3-16, 2004.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. ***Physiologia Plantarum***. v.104, p.280-292, 1998.

AYERS, R.S.; WESTCOT, D.W. **A qualidade da água na agricultura**. Trad. H. R. Gheyi et al., Campina grande: UFPB, 1999. 153p. (Estudos FAO: Irrigação e Drenagem, 29).

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Analytical Biochemistry***, v. 72, p. 248-254, 1976.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. ***Plant Physiology***, v. 59, p.309-314, 1977.

KAWASAKI, S.; BORCHERT, C.; DEYHOLOS, M.; WANG, H.; BRAZILLE, S.; KAWAI, K.; GALBRAITH, D.; BOHNERT, H. J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13, 889–905, 2001.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. ***Plant Cell Physiology***, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. **Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants**. *Annals of Botany*, Oxford, v.91, n.5, p.503- 527, 2003.