

## **Atividade da Enzima Peroxidase do Ascorbato em Plântulas de Diferentes Ciclos de Seleção do Milho ‘Saracura’ sob Encharcamento Contínuo**

Marcus J. C. Lopes<sup>1</sup>, Isabel R. P. Souza<sup>2</sup>, Paulo C. Magalhães<sup>2</sup>, Elto E. G. Gama<sup>2</sup>, José D. Alves<sup>3</sup>, Marcelo M. Murad<sup>3</sup> e Mina T. Villafort<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Estudante de Doutorado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal pela UFLA, Lavras, MG <sup>2</sup> Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. <sup>3</sup> UFLA, Dep. de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal. <sup>4</sup> Estudante de Ciências Biológicas, UFLA.

Palavras-chave: hipoxia, seleção massal, ápice radicular, BRS-4154 e BR107.

### **INTRODUÇÃO**

A variedade Saracura “BRS-4154”, tolerante ao encharcamento intermitente, vem sendo melhorada através da seleção massal estratificada, em solos de várzea, desde o seu desenvolvimento. Diversos trabalhos tem sido realizados na Embrapa Milho e Sorgo e Universidade Federal de Lavras para determinar os possíveis mecanismos de tolerância do milho ‘Saracura’ ao encharcamento. Dentre as enzimas antioxidantes, envolvidas em resposta a diversos estresses abióticos, como ozônio e salinidade, tem sido mencionada a peroxidase do ascorbato (APX), que utiliza o ascorbato como doador específico de elétron na redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) à água (Asada, 1997, Shigeoka et al., 2002) e cujas isoformas são encontradas nos cloroplastos, mitocôndria, perixossomos e no citosol (Cakmak et al., 1993). Além disso, a APX é indispensável para a proteção de cloroplastos e outros constituintes celulares dos danos do  $H_2O_2$  e do radical hidroxila (Asada, 1992). Nas células das plantas, o ciclo ascorbato/glutathiona representa um mecanismo de detoxificação alternativo e mais eficiente contra  $H_2O_2$  gerado no cloroplasto e citosol (Cakmak et al., 1993). O  $H_2O_2$  é removido em série de reações enzimáticas que envolvem, dentre outras enzimas, a redutase da glutathiona (GR) e APX. O presente trabalho teve como objetivo analisar a atividade da APX na cultivar Saracura, sob encharcamento contínuo.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Sementes dos ciclos de seleção do ‘Saracura’: C1, C8 e C16 e da testemunha ‘BR 107’ foram plantadas segundo metodologia descrita por Porto (1997). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com três repetições e utilizadas dez plântulas por repetição. A primeira coleta foi realizada nas plântulas no estágio de V3, o que nestas condições correspondeu a 6 dias após o plantio e a 2 dias após a germinação. No final do experimento as plântulas encontravam-se no estágio de V5. Os tratamentos constituíram-se de diferentes períodos: 0 h (sem encharcamento) e 8, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h de encharcamento contínuo, utilizando-se água destilada até a superfície do solo, sempre mantendo a altura da lâmina de água nos copos. Para se obter o extrato protéico, foram utilizados 300 mg de ápices de raiz, macerados em  $N_2$  líquido e adiconados de 900  $\mu$ L de tampão de extração contendo: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7.0, EDTA, 100 mM, pH 7.0, DTT, 0,5 M, PMSF, 0,1M, L-ácido

ascórbico, 1mM e 1,5 % de polivinilpolipirrolidona (PVPP). O teor protéico foi analisado pelo método de Bradford (1976). Foram utilizados 20 µL do extrato protéico, 200 µL do reagente e leitura da absorbância a 595 nm. A curva padrão foi preparada utilizando-se albumina do serum bovino (BSA). A análise da atividade da APX (EC 1.11.1.11) baseou-se no método de Nakano & Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O meio de reação incubado a 28°C, foi composto de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 0,03 M, L-ácido ascórbico, 0,1 M, água destilada e 20 µL do extrato protéico. Para cálculo da atividade da APX utilizou-se o coeficiente de extinção de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a atividade da APX, na variedade BR107 e no C1, houve um decréscimo contínuo no período de 0 (zero) a 72 h, com posterior aumento na atividade até 144 h (**Figura 1**). Para o C8, também houve uma elevação na atividade da APX até 72 h, entretanto, sem diferença significativa na atividade após este período (**Figura 2**). No ciclo C16 a atividade da APX apresentou aumento linear no período de 0 a 144 h com a exposição das plântulas ao encharcamento contínuo. Em diferentes estudos envolvendo estresses abióticos, aumento na atividade da APX tem sido verificado em milho sob toxidez de alumínio (Al) (Souza, 2003) e em arroz sob toxidez de chumbo (Verma & Dubey, 2003). Em contrapartida, decréscimos na atividade da APX foi verificado em estresse por seca em milho (Viana, 2002) e frio em café (Queiroz et al., 1998). Peixoto et al. (1999) sugerem que, em cultivar de sorgo sensível ao Al, o maior acúmulo de peróxidos e compostos fenólicos é que estaria causando um aumento na atividade da APX. Entretanto, em nossos dados verifica-se que o C16, ciclo mais avançado de seleção sob encharcamento, apresentou aumento progressivo da atividade da APX, indicando que houve sucesso do programa de melhoramento genético no ‘Saracura’ para essa característica. Portanto, neste caso, sugere-se que este aumento verificado na atividade da APX, sob encharcamento contínuo, pode estar relacionado à detoxificação através da redução de peróxidos.

## LITERATURA CITADA

ASADA, K. Minireview: Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 235-241, June 1992.

ASADA, K. The role of peroxidase do ascorbato and monodehidroascorbato reductase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in plants. In: SCANDALIOS, J. G. **Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. p. 715-735.

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

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide- scavenging enzymes in germination wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 260, p. 127-132, Mar. 1993.

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

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 137-143, set./dez. 1999.

PORTO, M.P. Método de seleção de plantas de milho para tolerância ao encharcamento do solo. **Pesq. Agrop. Gaúcha**, v.3,n.2,p.187-190, 1997.

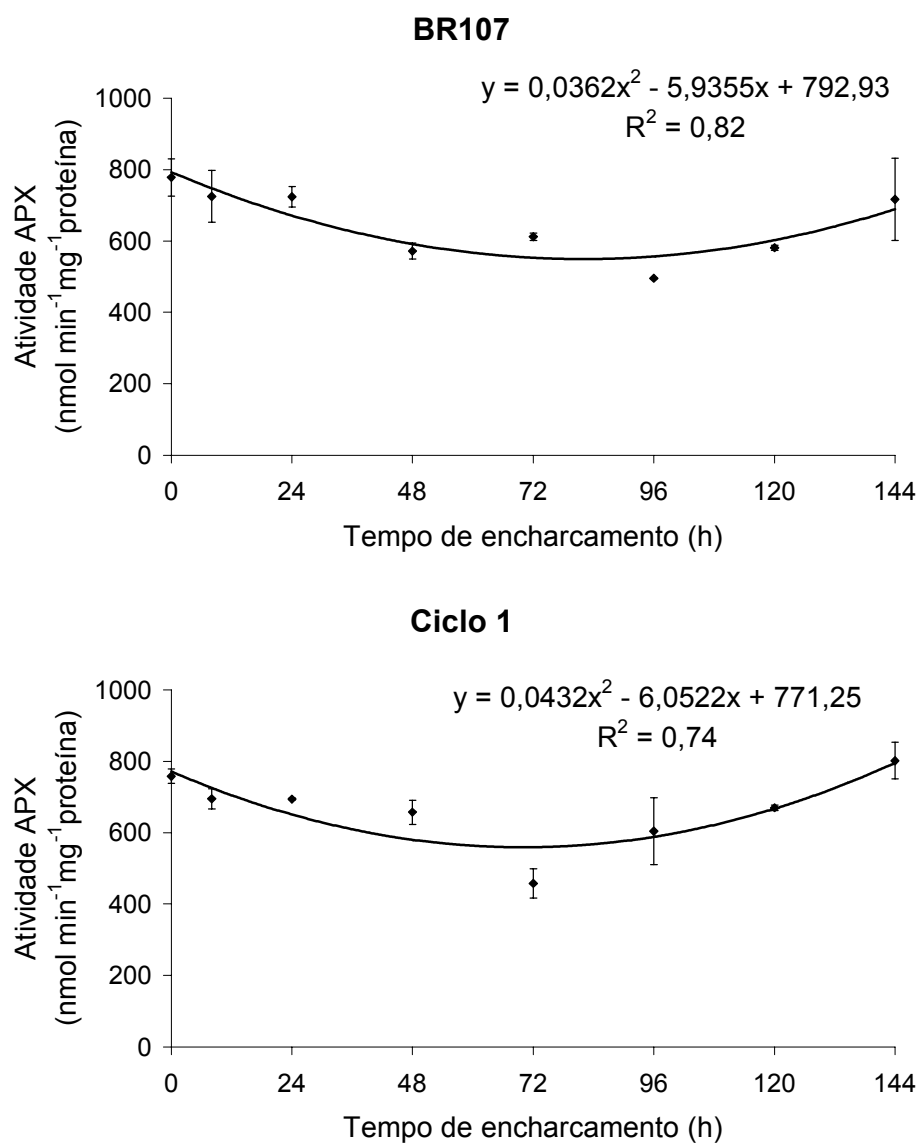
QUEIROZ, C. G. S.; ALONSO, A.; MARES-GUIA, M.; MAGALHÃES, A. C. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. **Biology Plantarum**, Prague, v. 41, n. 3, p. 403- 413, 1998.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.;MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, May 2002.

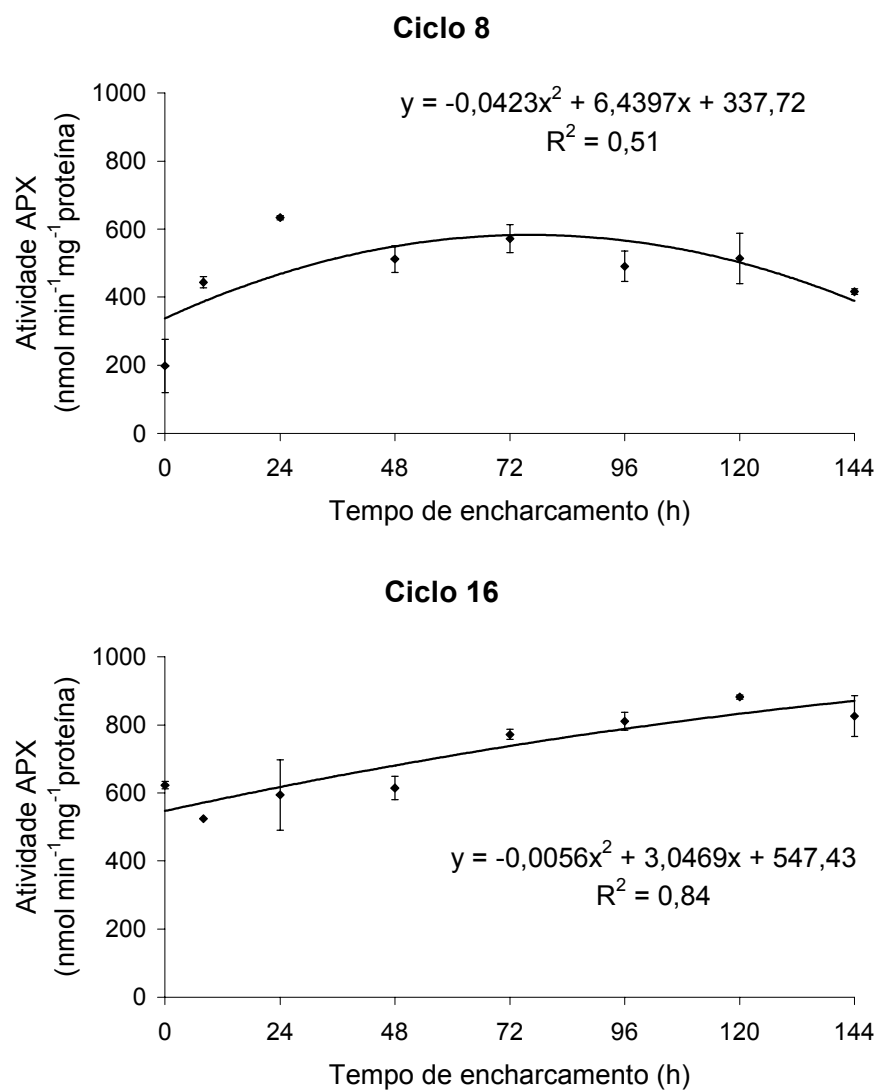
SOUZA, J. B. **Caracterização Fisiológica e Bioquímica de Linhagens de milho visando tolerância ao alumínio**. 2003. 70 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Clare, v. 164, n. 4, p. 645-655, Apr. 2003.

VIANA, M. C. M. **Déficit hídrico em genótipos de milho com tolerância diferencial à seca**. 2002. 75 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.



**FIGURA 1.** Efeito do encharcamento contínuo na atividade da peroxidase do ascorbato (APX), em raízes de plântulas da cv. BR107 e do ciclo 1 de seleção do ‘Saracura’. Os valores de cada cultivar representam a média de 3 repetições  $\pm$  erro padrão da análise de variância,  $p < 0,01$ .



**FIGURA 2.** Efeito do encharcamento contínuo na atividade da peroxidase do ascorbato (APX), em raízes de plântulas dos ciclos 8 e 16 de seleção do ‘Saracura’. Os valores de cada cultivar representam a média de 3 repetições  $\pm$  erro padrão da análise de variância,  $p < 0,01$ .