

Atividade da Enzima Redutase da Glutationa em Plântulas de Diferentes Ciclos de Seleção do Milho ‘Saracura’ sob Encharcamento Contínuo

Marcus J. C. Lopes¹, Isabel R. P. Souza², Paulo C. Magalhães², Elto E. G. Gama², José D. Alves³, Marcelo M. Murad³ e Mina T. Villafort⁴

¹ Estudante de Doutorado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal pela UFLA, Lavras, MG ² Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, e-mail: isabel@cnpms.embrapa.br ³ UFLA, Dep. de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal. ⁴ Estudante de Ciências Biológicas, UFLA.

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

INTRODUÇÃO

Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, por meio do programa de melhoramento, iniciaram em 1986, o desenvolvimento de um composto de milho de ampla base genética (mistura balanceada de 36 populações amarelas), denominado BRS-4154 (Saracura), para cultivo em área de várzea (Parentoni et al., 1995). Desde o seu desenvolvimento, a cultivar Saracura continua sendo melhorada por meio da seleção massal estratificada sob encharcamento intermitente e, desde então, foram realizados vários trabalhos visando identificar os diversos mecanismos que conferem a essa cultivar tolerância a este tipo de encharcamento. Em planta, dentre as enzimas envolvidas em resposta a estresses abióticos, o ciclo ascorbato/glutationa representa um mecanismo de detoxificação alternativo e mais eficiente contra o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) gerado no cloroplasto e citosol (Cakmak et al., 1993). O H₂O₂ é removido em uma série de reações enzimáticas que envolvem, dentre outras enzimas, a redutase da glutationa (GR). Estas reações são conhecidas como via de Halliwell-Asada ou ciclo da ascorbato/glutationa (Polle & Rennenberg, 1993). A glutationa é um tripeptídeo que têm importância na proteção celular (contra a formação de radicais livres), na manutenção do balanço redox da célula, no transporte de aminoácidos e participa da regulação alostérica enzimática, sendo utilizada pela GR (Henriques et al., 2001). Em razão de o estresse abiótico estar relacionado à oxidação celular, sugere que a glutationa e a GR possam desempenhar um papel importante nos mecanismos de tolerância ao encharcamento em plantas (Smith et al., 1989). O presente trabalho teve como objetivo analisar a atividade da GR 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 N₂ líquido e adiconados de 900 µL 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 GR (EC 1.6.4.2) baseou-se no método de Cakmak et al.(1993), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH, com decréscimo na absorbância a 340 nm. O meio de reação incubado a 28°C, era constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7.8, glutationa oxidada (GSSG), 15 mM, NADPH, 7,2 mM e 50 µL do extrato protéico. Para cálculo da atividade da GR, utilizou-se o coeficiente de extinção 6,2 mM⁻¹cm⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verfica-se na **Figura 1** que tanto para a cultivar BR107, como para o C1 a atividade da GR apresentou valores com pequenas variações não significativas ao longo do período de encharcamento contínuo. Nos ciclos mais avançados de seleção, C8 e C16 (**Figura 2**), a atividade da GR apresentou a mesma tendência em ambos os casos, com aumento contínuo até 72 h, sendo mais expressivo no C16, seguido de decréscimo na atividade até 144 h. Em plantas de arroz sob estresse de chumbo (Verma & Dubey, 2003), foi verificado aumento da atividade da enzima GR, tanto no sistema radicular quanto na parte aérea, quando comparado ao controle. A atividade dessa enzima foi diretamente proporcional à concentração empregada do metal, sugerindo que este induziu o estresse oxidativo em arroz e que a alta atividade da GR e outras enzimas antioxidantes representava um importante mecanismo de defesa contra a injúria ocasionada pelo chumbo. Em alguns trabalhos sob estresse abiótico, como: seca (Viana, 2002), alumínio (Souza, 2003) e encharcamento (Yan et al., 1996), embora tenha sido verificado decréscimo na atividade da GR, este foi muito menor quando se comparava ao controle. O aumento na atividade da GR até 72 h sob encharcamento contínuo, em ciclos mais avançados, C8 e C16, principalmente neste último, provavelmente, estaria contribuindo para a diminuição de espécies reativas de oxigênio. O decréscimo na atividade da GR, após este período, pode estar associado a um aumento da concentração de compostos antioxidantes e/ou aumento da atividade de outras enzimas antioxidantes.

LITERATURA CITADA

BRADFORD, J. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utiliing the principle of protein-dye binding. **Analitical 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.

HENRIQUES, A. P.; DAFRÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M. **Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos**. In: SERAFINI, L.

A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463 p.

PARENTONI, N. P.; GAMA, E. E. G.; MAGNAVACA, R.; MAGALHÃES, P. C. **Seleção para tolerância ao encharcamento em milho (*Zea mays L.*)**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O MILHO EM PERSPECTIVA. EMBRAPA/CNPMS, Sete Lagoas, MG, Brasil, 1995.

POOLE, A.; RENNENBERG, H. Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. In: FOWDEN, L.; MANSFIELD, T.; STODDART, J.; HALL, C. (Ed.). **Plant adaptation to environmental stress**. London, 1993. p. 263-273.

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.

SMITH, I. K.; VIERHELLER, T. L.; THORNE, C. A. Properties and functions of glutathione reductase in plants. **Physiologia Plantarum**, Copanhagen, v. 77, n. 3, p. 449-456, Nov. 1989.

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.

YAN, B.; DAI, Q.; LIU, X.; HUANG, S.; WANG, Z. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 179, n. 2, p. 261-268, Feb. 1996.

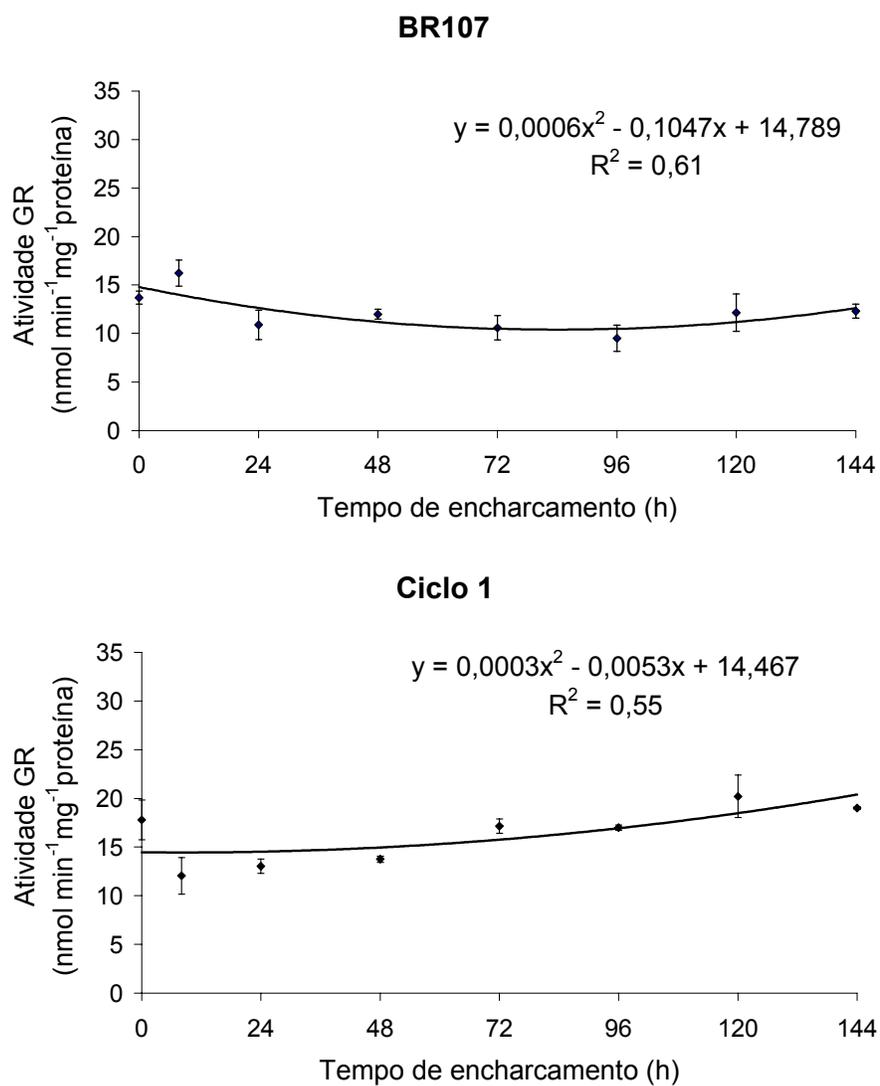


FIGURA 1. Efeito do encharcamento contínuo na atividade da redutase da glutathiona (GR), em raízes de plântulas da cv. BR107 e do ciclo 1 de seleção do ‘Saracura’. Os valores de cada cultivar representam a média de 3 repetições \pm erro padrão da análise de variância, $p < 0,01$.

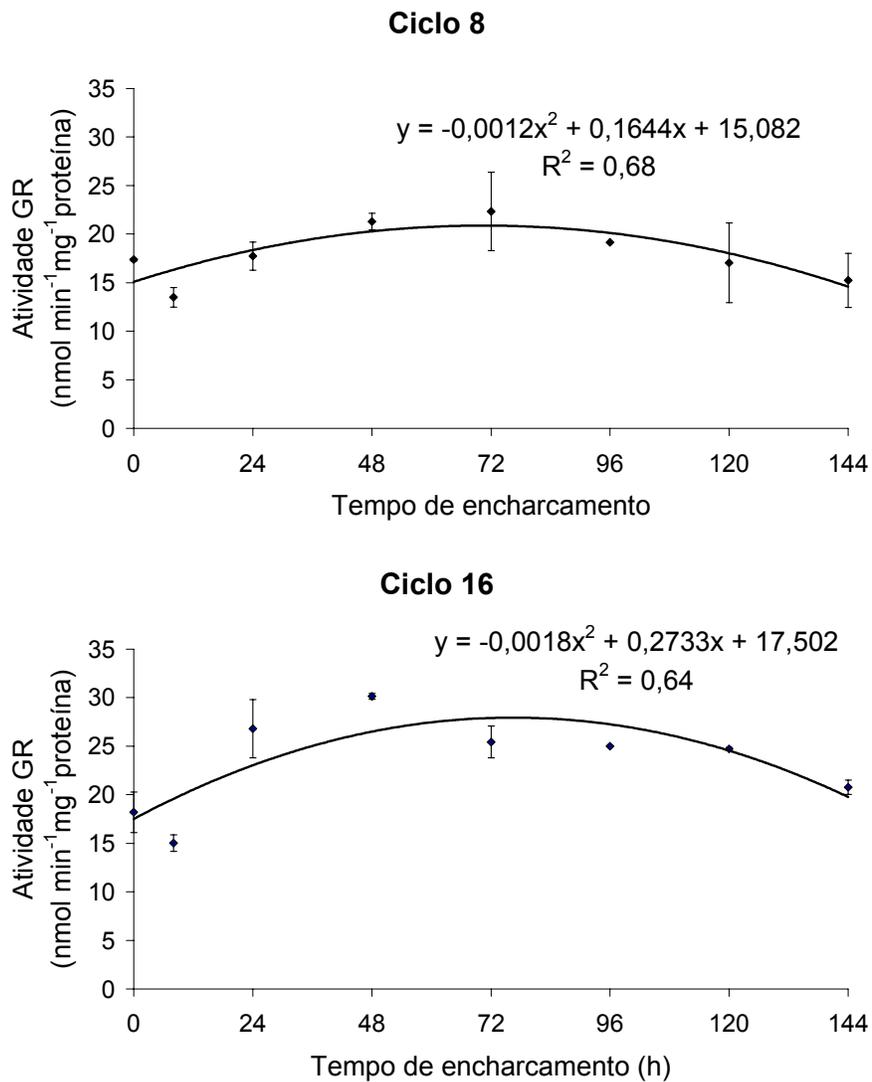


FIGURA 2. Efeito do encharcamento contínuo na atividade da redutase da glutatona (GR), em raízes de plântulas dos ciclos 8 e 16 de seleção do ‘Saracura’. Os valores de cada cultivar representam a média de 3 repetições \pm erro padrão da análise de variância, $p < 0,01$.