

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE *Erythrina crista-galli* L. SOB CONDIÇÕES DE ALAGAMENTO

WINHELMANN, Mara Cíntia¹; LARRÉ, Cristina Ferreira¹; PETERS, José Antonio¹

¹Universidade Federal de Pelotas; Deptº de Botânica Laboratório de Cultura de Tecido de Plantas
Campus Universitário – Caixa Postal 354 CEP 96010-900. (marawinhelmann@yahoo.com.br)

1 INTRODUÇÃO

A *Erythrina crista-galli* L., popularmente conhecida como Corticeira-dobanhado, é uma árvore de porte médio, pertencente à família Fabaceae, conhecida, especialmente, pela coloração vibrante de suas flores. A corticeira está listada como planta imune ao corte, pelo CONAMA, tamanha é a devastação do seu habitat natural e devido a sua importância na restauração de mata ciliar e recuperação de ecossistemas degradados em locais com inundação periódica e de rápida duração (BACKES; IRGANG, 2002).

A capacidade das espécies de se mostrarem tolerantes e adaptadas a períodos de encharcamento ou inundação do solo pode ser atribuída a mecanismos de adaptação morfo-anatômicos, fisiológicos e bioquímicos (ISHIDA et al., 2002). Dependendo da espécie, da velocidade de encharcamento do solo, da altura da lâmina d'água e do tempo de submersão, esses mecanismos podem ser mais evidentes, favorecendo a sobrevivência das plantas nestes ambientes (ISHIDA et al., 2002). Dentre as alterações morfo-anatômicas utilizadas como estratégia de tolerância ao alagamento está a formação de raízes adventícias e lenticelas hipertróficas (EZIN et al., 2010). No entanto, o excesso de água diminui a difusão de gases reduzindo a disponibilidade de oxigênio no solo e, conseqüentemente, para o sistema radicular das plantas. Essa depleção na disponibilidade de oxigênio sinaliza para um estresse abiótico fazendo, desta forma, com que a planta altere o seu metabolismo normal (DAT et al., 2004).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical superóxido ($O^{\bullet-}_2$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são continuamente produzidas em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos durante o metabolismo normal da planta. Entretanto, a produção e remoção destas EROs são extremamente controladas (MITTLER, 2002), sendo esse equilíbrio alterado por diversos fatores, como por exemplo, o excesso de água nas raízes.

O equilíbrio entre a produção aumentada de EROs e a capacidade de acionar rapidamente o sistema de defesa antioxidante vai refletir na resposta da planta ao estresse e, conseqüentemente, na sua adaptação e/ou tolerância à condição adversa proporcionada pelo alagamento (MITTLER, 2002). Nessa condição, a planta reduz o crescimento e direciona suas reservas para manter o metabolismo ativo em órgãos com crescimento preferencial, além de ativar o sistema antioxidante enzimático, aumentando a atividade de enzimas como a SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase) e APX (ascorbato peroxidase).

Desta forma, o monitoramento da atividade de enzimas antioxidantes pode ser utilizado como indicativo de estresse oxidativo em plantas. Portanto, o objetivo do trabalho foi determinar o nível de tolerância ao estresse ocasionado por

diferenças nas condições hídricas, em plantas de *Erythrina crista-galli* L., através da avaliação da atividade de enzimas antioxidantes.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Plantas oriundas de sementes foram cultivadas em vasos de 0,5 litros em casa de vegetação e transferidas para vasos de cinco litros. Foram utilizados dois tratamentos: plantas alagadas na raiz com a manutenção de uma lâmina de água de até 3cm acima do solo e plantas não alagadas (controle). As avaliações foram realizadas aos 10, 20, 30, 40 e 50 dias após a indução dos tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e analisados por comparação de médias pelo Teste de Tukey a 5% de significância. Em cada período foram avaliadas a atividade da superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase.

A atividade das enzimas antioxidantes foi avaliada em folhas e raízes principais. O extrato enzimático para a determinação das atividades da superóxido dismutase (**SOD**, EC 1.15.1.1), catalase (**CAT**, EC 1.11.1.6) e ascorbato peroxidase (**APX**, EC 1.11.1.11), foi obtido pela maceração, em nitrogênio líquido, de aproximadamente 500mg de material vegetal acrescido de 20% de PVPP, seguida pela adição de 1,8 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,8), EDTA 0,1mM e ácido ascórbico 20mM. Após centrifugação a 13.000g por 20 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade das enzimas e para a quantificação das proteínas pelo método de BRADFORD (1976).

A atividade da **CAT** foi determinada de acordo com AZEVEDO et al. (1998), com algumas modificações. A atividade da enzima foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240nm durante um período de um minuto e meio, a 28°C e calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $39,4\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$. Os resultados expressos em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da **APX** foi determinada segundo NAKANO; ASADA (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato (ASA) a 290nm. O decréscimo na absorbância foi monitorado por um período de um minuto e meio e a atividade da enzima calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol ASA min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da **SOD** foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de dinitrotetrazólio (NBT) no meio de reação (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado e, como branco foi utilizado um tubo com meio de reação, com a amostra, mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560nm, sendo uma unidade da SOD correspondente à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificado um aumento na atividade das enzimas APX e CAT nas folhas para manter estáveis os níveis de H_2O_2 . O aumento da APX justifica a manutenção

dos níveis de H_2O_2 como sinalizadores do estresse, já que esta enzima tem maior afinidade pelo H_2O_2 do que a CAT.

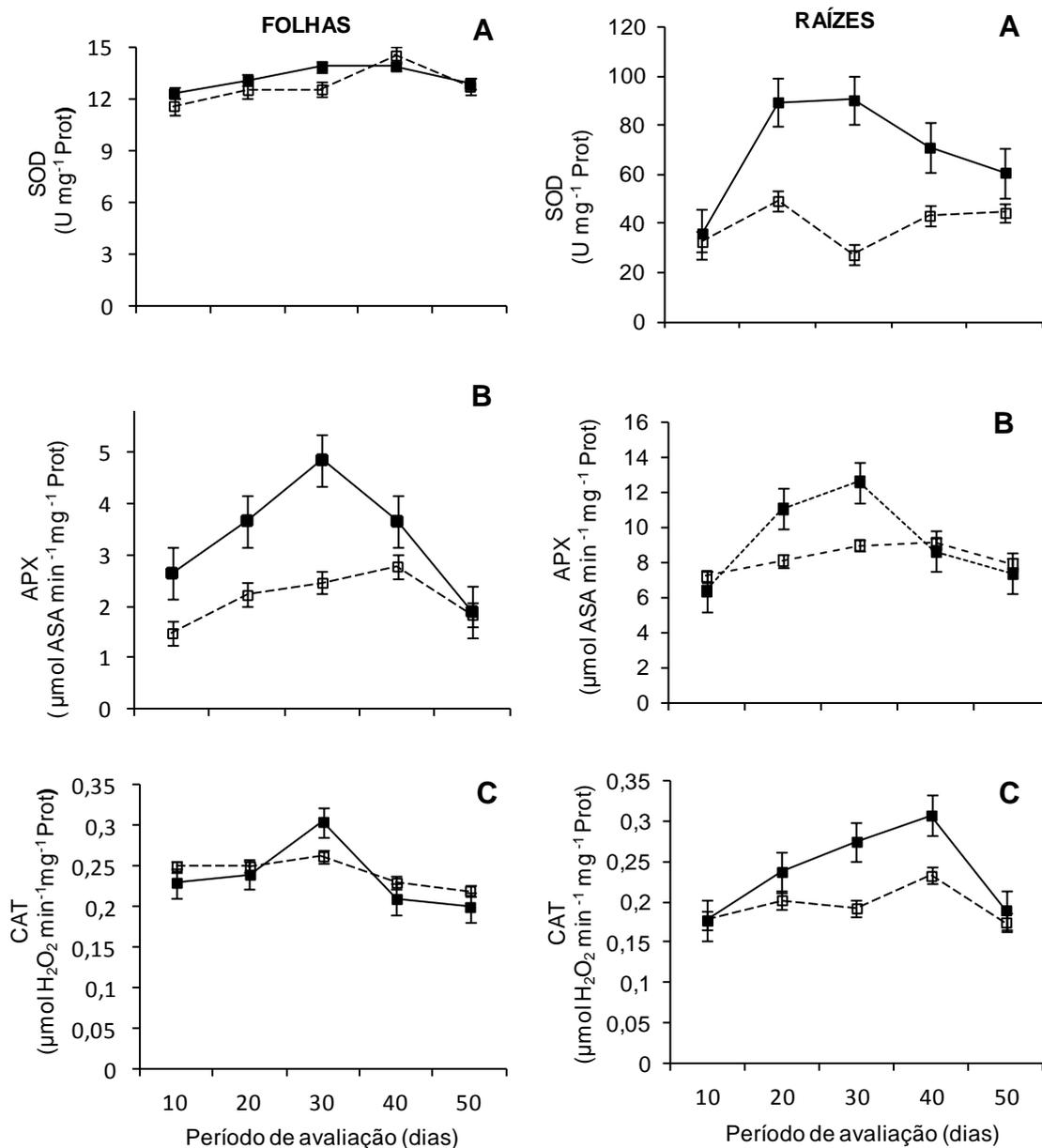


Figura 1 - Atividade das enzimas SOD (A), APX (B) e CAT (C) em folhas e raízes de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento-E (■) e em plantas controle-C (□). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

Nas raízes foi verificada uma atividade mais marcante de todas as enzimas antioxidantes até os 30 dias de alagamento, em função deste órgão estar diretamente submetido à hipoxia. Os resultados da SOD (Fig. A), que é a primeira enzima a atuar no sistema de defesa antioxidante enzimático, justificam o aumento da APX e da CAT (Fig. B e C, consecutivamente) neste mesmo período, já que o aumento na produção do $O_2^{\bullet-}$ ativa a SOD e, desta forma, reflete diretamente no incremento na concentração de H_2O_2 livre, exigindo assim um estímulo na atividade das enzimas responsáveis pela degradação desta molécula, APX e CAT. A

formação das raízes adventícias é uma estratégia morfológica comum para a sobrevivência das plantas sob alagamento, permitindo que através das mesmas ocorra um ajustamento metabólico lento e contínuo, durante todo o período de estresse, observada nas plantas de *E. crista-galli* L.

4 CONCLUSÃO

O alagamento, durante o período estudado, não compromete as plantas de *Erythrina crista-galli* L., visto que estas são capazes de acionar, rapidamente, o sistema de defesa antioxidante enzimático, reduzindo assim os danos oxidativos.

5 REFERÊNCIAS

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

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul** : guia de identificação & interesse ecológico – as principais espécies nativas sul-brasileiras. Instituto Souza Cruz, Rio de Janeiro, 2002, 322p.

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.48-254, 1976.

DAT, J.F.; CAPELLI, N.; FOLZER, H.; BOURGEADE, P.; BADOT, P.M. Sensing and signaling during plant flooding. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42, p. 273-282, 2004.

EZIN, V.; PENA, R.L.; A, A. Flooding tolerance of tomato genotypes during vegetative and reproductive stages. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 22, n. 1, p. 131-142, 2010.

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

ISHIDA, F.; OLIVEIRA, L.E.M.; CARVALHO, C.J.R.; ALVES, J.D. Efeitos da inundação parcial e total sobre o crescimento, teor de clorofila e fluorescência de *Setaria anceps* e *Paspalum repens*. **Ciência e agrotecnologia**, v.26, n.6, p.1152-1159, 2002.

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