

ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM GENÓTIPOS DE BATATA CULTIVADOS NA PRESENÇA DE ALUMÍNIO E SILÍCIO¹

Aline Soares Pereira², Athos Odin Severo Dorneles³, Marcelo Vielmo Afonso⁴, Ruziele De Quadros Sandri⁵, Liana Veronica Rossato⁶, Luciane Almeri Tabaldi⁷.

¹ Dissertação de Mestrado em Agrobiologia, UFSM.

² Bióloga, Mestranda em Agrobiologia da UFSM. Bolsista CAPES. lyne_asp@hotmail.com

³ Biólogo, Msc em Agrobiologia. athos_odin@hotmail.com

⁴ Biólogo, Mestrando em Agrobiologia da UFSM. marcelovielmo@yahoo.com.br

⁵ Bióloga, Mestranda em Agrobiologia da UFSM. Bolsista CAPES, ruziele@gmail.com

⁶ Pós Doc. do Departamento de Biologia, UFSM. liana.rossato@gmail.com

⁷ Prof. Dra. do Departamento de Biologia, UFSM, lutabaldi@yahoo.com.br

O silício (Si) e o alumínio (Al) são o segundo e terceiro elementos mais abundantes na crosta terrestre depois do oxigênio. Paradoxalmente, ambos não apresentam essencialidade conhecida para o homem. No entanto o Al possui a característica de ser tóxico para organismos aquáticos e terrestres, enquanto o Si é um elemento benéfico para algumas plantas e já se mostrou eficaz na redução da peroxidação dos lipídios de membrana via estimulação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. A batata (*Solanum tuberosum* L.) é um dos principais alimentos para a humanidade, consumida por mais de um bilhão de pessoas em todo mundo, devido à sua composição, versatilidade gastronômica e tecnológica, assim como pelo baixo preço de comercialização dos tubérculos. A batata cultivada (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*) é muito sensível a estresses abióticos como seca, frio, salinidade e alta irradiação. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da interação entre o Si e o Al sobre a atividade das enzimas antioxidantes guaiacol peroxidase e superóxido dismutase em genótipos de batata com distinta sensibilidade ao Al (SMIJ319-7, sensível ao Al, e SIMF212-3, tolerante ao Al).

Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Laboratório de Bioquímica de Plantas e nas casas de vegetação pertencentes ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria. Foram usados dois genótipos de batata, SMIJ319-7 (sensível ao Al) e SIMF212-3 (tolerante ao Al) (ROSSATO, 2014), obtidos do Programa de Genética e Melhoramento da Batata, UFSM, Santa Maria, RS, os quais foram propagados in vitro por 25 dias em meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio inositol e 6 g L⁻¹ de ágar. Após esse período, as plantas foram transferidas para bandejas plásticas com capacidade de 17 L contendo solução nutritiva completa, objetivando a aclimatização. Cada bandeja suportou 30 plantas. As plantas foram expostas a uma solução nutritiva completa por três dias. A solução nutritiva teve a seguinte composição (em µM): 6090,5 de N; 974,3 de Mg; 4986,76 de Cl; 2679,2 de K; 2436,2 de Ca; 359,9 de S; 243,592 de P; 0,47 de Cu; 2,00 de Mn; 1,99 de Zn; 0,17 de Ni; 24,97 de B; 0,52 de Mo; 47,99 de Fe (FeSO₄/Na-EDTA). Após este período de aclimação, as plantas foram cultivadas por quatorze dias em uma nova solução

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Jornada de Pesquisa

nutritiva (sem fósforo e pH $4,5 \pm 0,1$) expostas a combinações de duas concentrações de Al (0 e 50 mg L⁻¹ (AlCl₃)) e três concentrações de Si (0; 0,5 e 1,0 mM (Na₂SiO₃)). Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento e quinze plantas por repetição, para cada genótipo. Com exceção do Al e do Si, as concentrações dos outros elementos minerais na solução nutritiva foram as mesmas para todos os tratamentos. A solução nutritiva com os tratamentos foi substituída a cada sete dias e o pH foi ajustado diariamente.

Amostras de folhas e raízes maceradas em nitrogênio líquido foram utilizadas para as análises enzimáticas. 0,5 g de amostra foi homogeneizada em 3 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,8) 0,05 M, contendo 1 mM de EDTA e 2% (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 x g por 20 min. a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas (ZHU et al., 2004) e concentração de proteínas (BRADFORD, 1976). A atividade da enzima guaiacol peroxidase foi determinada segundo Zeraik et al. (2008), utilizando-se o guaiacol como substrato. A mistura de reação continha 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,5), 1,0 mL de guaiacol (15 mM) e 1,0 mL de H₂O₂ (3 mM). Após homogeneização, foi adicionado 50 µL do extrato da planta a esta solução. A atividade da enzima foi medida através da oxidação do guaiacol a tetraguaiacol através do aumento na absorbância a 470 nm. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por mg de proteína (U mg⁻¹ proteína). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico, descrito por Giannopolitis; Ries (1977). A mistura de reação continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, riboflavina 2 mg/M, nitrobluetetrazólio (NBT) 75 mg/M, EDTA 0,1 mM, e 100 µL de extrato enzimático. A produção fotoquímica da formazana azul a partir do NBT foi monitorada pelo incremento da absorbância a 560 nm. A reação foi realizada em tubos de ensaio a 25°C, dentro de uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Como controle, tubos com a mistura de reação foram mantidos no escuro. A reação teve início ligando-se a luz e após 15 minutos de iluminação, a reação foi paralisada, desligando-se a luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe a fotorredução do NBT em 50% (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

Os dados foram analisados conforme experimento bifatorial (genótipos x tratamentos) através de análise de variância e teste de Scott Knott para os tratamentos em 5% de probabilidade de erro, utilizando o aplicativo Sisvar (FERREIRA, 2008).

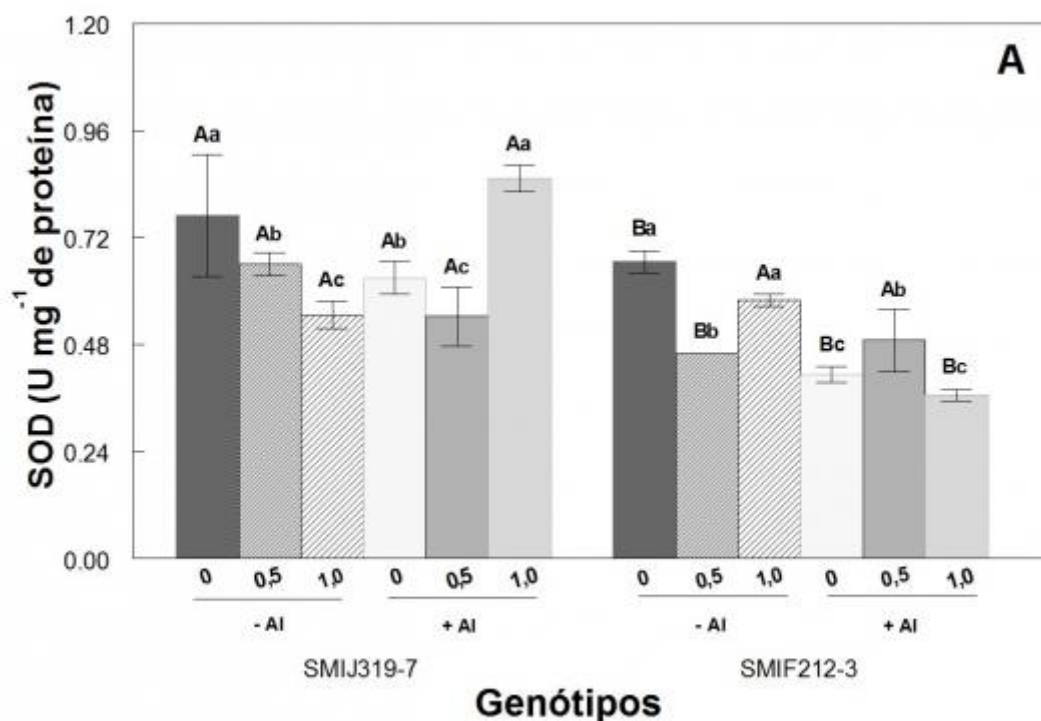
Na parte aérea (Fig. 1A), a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi reduzida com a aplicação de Si na ausência de Al no genótipo sensível ao Al. Entretanto, no genótipo tolerante essa redução foi observada somente com a aplicação de 0,5 mM de Si. Para ambos os genótipos, de modo geral, a exposição ao Al induziu inibição da SOD na parte aérea, comparado com o controle. Porém para o genótipo sensível (SMIJ319-7), com a aplicação de 1,0 mM de Si + Al, foi observado um aumento na atividade desta enzima, se igualando aos níveis do controle (Fig. 1A). Portanto, os resultados relativos a atividade da SOD sugerem que o Si tem papel de amenizar a toxicidade do Al na parte aérea do genótipo sensível ao Al através da ativação desta enzima antioxidante.

No genótipo tolerante ao Al (SMIF212-3), o tratamento com 0,5 mM de Si + Al promoveu um aumento na atividade da SOD, quando comparado com o tratamento onde somente o Al estava presente, evidenciando que o Si apresenta potencial de amenizar a toxicidade do Al através da

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Jornada de Pesquisa

ativação do sistema de defesa antioxidante. Isso pode ser um indicativo de que o dano provocado pelas espécies reativas de oxigênio sob estresse de Al pode ser amenizado pela adição de Si, em parte, devido a um aumento da atividade da SOD. Portanto, tais resultados sugerem que a aplicação de Si pode efetivamente aumentar a capacidade de defesa das plantas de batata contra o estresse oxidativo induzido pelo Al, principalmente na parte aérea.



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

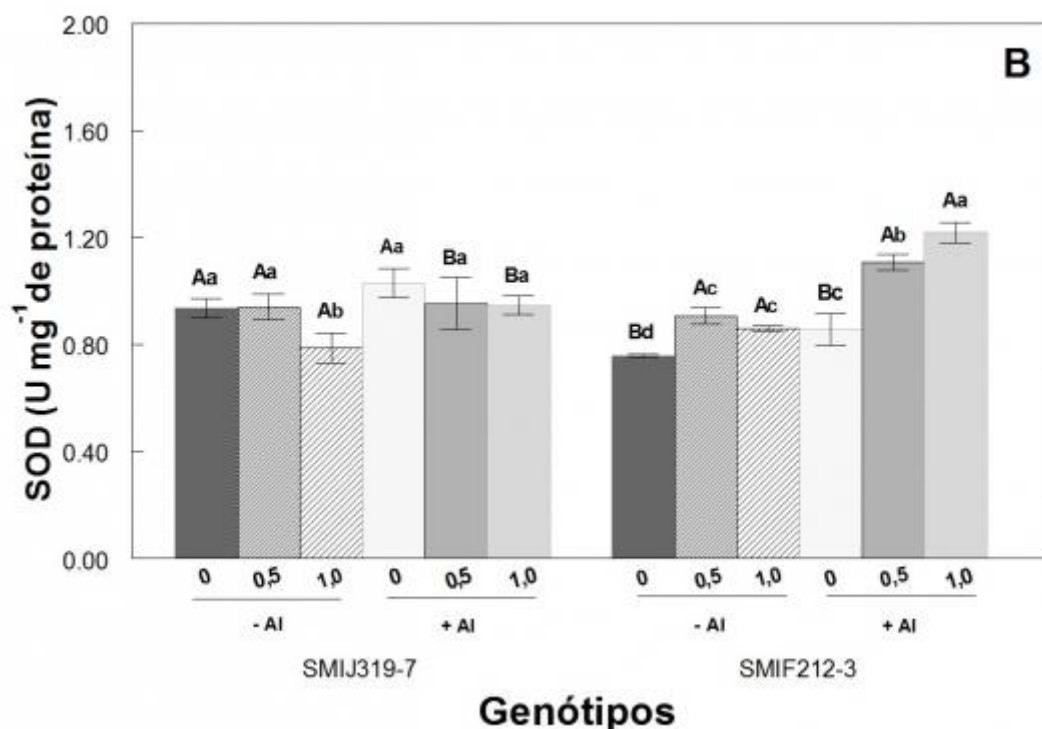


Figura 1 – Efeito de concentrações de silício (0; 0,5 e 1,0 mM) sobre a atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) na parte aérea (A) e na raiz (B) em dois genótipos de batata, SMIJ319-7 (sensível ao Al) e SMIF212-3 (tolerante ao Al) cultivados na presença (+Al, 50 mg L⁻¹) e ausência (-Al, 0 mg L⁻¹) de Al. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre genótipos dentro do mesmo tratamento. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos dentro do genótipo.

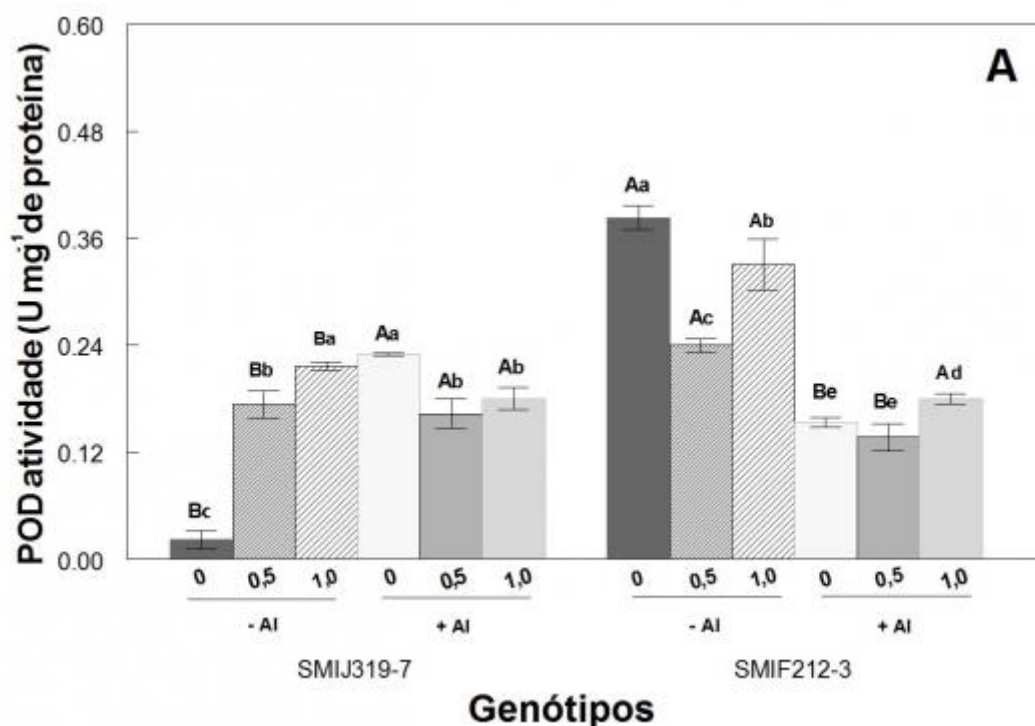
Nas raízes (Fig. 1B), a aplicação de 1,0 mM de Si promoveu uma redução da atividade da SOD no genótipo sensível ao Al (SMIJ319-7). Ao contrário, no genótipo tolerante (SMIF212-3), observou-se que o Si promoveu um aumento da atividade da SOD nas raízes (Fig. 1B). Isto mostra um potencial do Si em estimular a atividade da SOD para o genótipo tolerante. Essa resposta também foi evidenciada na presença do Al, verificando-se um aumento na atividade da SOD com o aumento da concentração de Si.

No genótipo sensível ao Al (SMIJ319-7) a atividade da guaiacol peroxidase (POD) na parte aérea foi estimulada com a aplicação de Si tanto na ausência quanto na presença de Al, em relação ao controle (Fig. 2A), indicando que o Si tem o potencial de ativar o sistema antioxidante neste genótipo, independente da presença ou não do fator estressante, como a presença de Al. Entretanto no genótipo tolerante (SMIF212-3), foi observado que esta enzima apresenta uma atividade alta no

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Jornada de Pesquisa

tratamento controle, sendo reduzida na presença do Si tanto na ausência quanto na presença de Al. A aplicação de Al promoveu uma redução ainda maior na atividade da POD, entretanto a aplicação da maior dose de Si promoveu um aumento da atividade desta enzima em relação ao tratamento com somente Al.



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

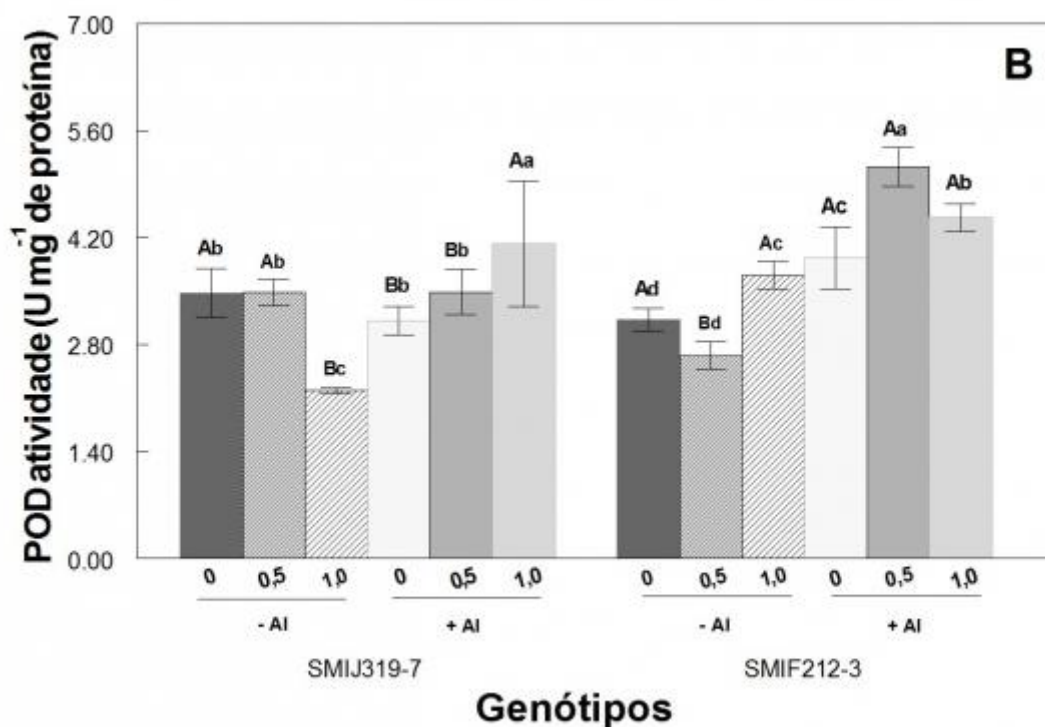


Figura 2 – Efeito de concentrações de silício (0; 0,5 e 1,0 mM) sobre a atividade da enzima Guaiacol Peroxidase (POD) de parte aérea (A) e raiz (B) em dois genótipos de batata, SMIJ319-7 (sensível ao Al) e SMIF212-3 (tolerante ao Al) cultivados na presença (+Al, 50 mg L⁻¹) e na ausência (-Al, 0 mg L⁻¹) de Al. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre genótipos dentro do mesmo tratamento. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos dentro do genótipo.

Nas raízes (Fig. 2B), a exposição a maior concentração de Si na ausência de Al promoveu uma redução na atividade da POD no genótipo sensível. Entretanto, na presença de Al, foi observado aumento na atividade da POD somente com a aplicação da maior concentração de Si, comparado com o controle. No genótipo tolerante ao Al, foi observado aumento da atividade da POD na ausência de Al, somente com a aplicação da maior concentração de Si. Neste genótipo, a exposição somente ao Al promoveu um aumento da atividade da POD, em relação ao controle, evidenciando uma característica que pode estar relacionada a sua tolerância ao Al. Além disso, a aplicação de Si na presença de Al promoveu um aumento mais pronunciado da atividade da POD.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Jornada de Pesquisa

Em ambos os genótipos de batata houve maior atividade das enzimas antioxidantes na presença do Si e do Al. Isso pode ser um fator importante para amenizar os efeitos tóxicos do Al em plantas de batata.

Palavras- chave: *Solanum tuberosum*; sistema antioxidante; metais tóxicos; elementos benéficos.

Referencias

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

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochemistry*, v.8, n.44, p.276-287, 1971.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. *Revista Symposium*, v.6, n.8, p.36-41, 2008.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *Journal of Plant Physiology*, v.48, n.59, p.315-318, 1977.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*, v.6, n.15, p.473-497, 1962.

ROSSATO, L. V. Respostas fisiológicas e Bioquímicas ao estresse de alumínio e fósforo em genótipos de batata (*Solanum tuberosum*). Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, p.151, 2014.

ZERAIK, A.E.; SOUZA, F.S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Química Nova*, v.31, p.731-734, 2008.

ZHU, Z; WEI, G.; LI, J.; QIAN, Q.; YU, J. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*, v.167, p.527-533, 2004.