

Notas Científicas

Reação enzimática ao estresse salino durante a germinação de estilosantes

Adriana Gonela⁽¹⁾, Eliana Gertrudes Macedo Lemos⁽²⁾, Teresinha de Jesus Deléo Rodrigues⁽³⁾
e Maria Lidia Stipp Paterniani⁽³⁾

⁽¹⁾Universidade de São Paulo, Fac. de Medicina de Ribeirão Preto, Dep. de Genética, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, CEP 14049-900 Ribeirão Preto, SP. E-mail: adriana@rge.fmrp.usp.br ⁽²⁾Unesp, Fac. de Ciências Agrárias e Veterinárias, Dep. de Tecnologia, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/nº, CEP 14884-900 Jaboticabal, SP. E-mail: egerle@fcav.unesp.br ⁽³⁾Unesp, Fac. de Ciências Agrárias e Veterinárias, Dep. de Biologia Aplicada à Agropecuária. E-mail: tedelro@fcav.unesp.br, lidia@fcav.unesp.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do NaCl nos sistemas isoenzimáticos durante o estágio inicial de germinação do *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Sementes das variedades botânicas *canenscens*, *microcephala*, *pauciflora* e *vulgaris* foram colocadas para germinar em caixas de plástico, com papel-filtro umedecido com água (controle) e solução de NaCl (134 mmol), em estufa BOD, por 14 horas. Após este período, foi realizada a extração das enzimas glutamato desidrogenase e peroxidase. As enzimas apresentaram comportamentos diferenciados nas quatro variedades quando submetidas ao estresse salino.

Termos para indexação: *Stylosanthes guianensis*, salinidade, leguminosa forrageira, isoenzimas

Enzymatic reaction to saline stress during stylosanthes germination

Abstract – The objective of this work was to evaluate the influence of the NaCl on isoenzyme systems during the initial stage of germination of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Seeds of the botanical varieties *canenscens*, *microcephala*, *pauciflora* and *vulgaris* were placed to germinate in plastic boxes, with filter paper moistened with water (control) and NaCl solution (134 mmol), in BOD greenhouse, for 14 hours. After this period, the extraction of glutamate dehydrogenase enzymes and peroxidase was carried out. The enzymes presented differentiated behaviors in the four varieties when subjected to the saline stress.

Index terms: *Stylosanthes guianensis*, salinity, forage legume, isoenzymes

A baixa precipitação e a alta evaporação nas regiões áridas e semi-áridas são fatores que contribuem para a ocorrência de solos salinos e sódicos, os quais representam, em nível global, aproximadamente 900 milhões de hectares. Nessas condições, os sais não são lixiviados, acumulando-se no solo e na água em quantidades prejudiciais ao crescimento normal das plantas (Fageria & Gheyi, 1997).

O estresse salino, além de restringir a absorção de água e nutrientes pelas plantas, também provoca mudanças na expressão gênica. A identificação de genes relacionados com a capacidade de adaptação ou tolerância ao estresse salino é essencial nos programas de melhoramento, mas pouco se conhece sobre esses mecanismos genéticos quanto à tolerância salina (Hurkman, 1992).

O gênero *Stylosanthes*, com aproximadamente quarenta e quatro espécies e subespécies, é uma das mais

importantes leguminosas utilizadas nas pastagens em ambientes tropicais e subtropicais; entre estas espécies destaca-se *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. (Quecini et al., 2002).

As variedades de *S. guianensis*, apresentam ampla variabilidade relacionada a características de produção, adaptação a solos ácidos e de baixa fertilidade, tolerância à seca e tolerância a pragas e doenças sendo consideradas moderadamente tolerantes à salinidade (Gonzalez et al., 2000; Quecini et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do NaCl nos sistemas isoenzimáticos durante o estágio inicial da germinação do *Stylosanthes guianensis*.

O trabalho foi realizado no campus da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

Sementes das variedades botânicas *canenscens*, *microcephala*, *pauciflora* e *vulgaris*, obtidas junto ao

Banco Ativo de Germoplasma Forrageiro da Embrapa Cerrados, foram colocadas para germinar em caixas de plástico sobre papel-filtro umedecido com água destilada (controle) e solução de cloreto de sódio (134 mmol), em câmara de germinação BOD, a 25°C, em ausência de luz por um período de 14 horas. Após esse período, foi realizada a análise dos sistemas isoenzimáticos, glutamato desidrogenase (Gdh, EC 1.4.1.3) e peroxidase (Po, EC 1.11.1.7).

As enzimas foram extraídas mediante a maceração das sementes em tampão de extração conforme Soltis & Soltis (1989). Cada amostra foi composta por 10 sementes embebidas e 110 µL do tampão de extração. Após a maceração foram centrifugadas a 11.000 g por meia hora. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% e coradas conforme Pasteur et al. (1988), em cada sistema enzimático.

A avaliação das variedades foi realizada por meio de análise visual dos géis obtidos após a eletroforese. Os parâmetros utilizados na diferenciação das variedades basearam-se na intensidade e ausência ou presença de bandas, que tiveram os seus coeficientes de mobilidade (R_f) calculados. O coeficiente de mobilidade expressa a relação entre a distância de migração da proteína e a distância de migração do corante de referência no gel, em condições eletroforéticas preestabelecidas.

Nas quatro variedades de *S. guianensis*, não houve alteração quanto ao número e mobilidade das bandas da glutamato desidrogenase (Figura 1). Entretanto, com relação à intensidade das mesmas, constatou-se que na variedade *pauciflora* houve um aumento de intensidade na banda $R_f = 0,35$ e na variedade *microcephala*, uma diminuição de intensidade em todas as bandas. Nas demais variedades, não houve diferença quanto ao perfil isoenzimático, quando submetidas ao cloreto de sódio. Esta diferença quanto a intensidade das bandas desta enzima pode estar indicando respostas diferenciadas das variedades com relação a tolerância à salinidade pois, em estudos realizados por Kumar et al. (2000) com arroz, foi observado que, com o aumento do estresse salino, cultivares tolerantes aumentam a atividade da glutamato desidrogenase e cultivares sensíveis diminuem.

Na análise da peroxidase, *S. guianensis* var. *microcephala* apresentou uma diferença na mobilidade da primeira banda ($R_f = 0,07$ no controle e

$R_f = 0,06$ na presença de NaCl), mas não mostrou diferença quanto à intensidade das mesmas (Figura 2). As demais variedades de *S. guianensis* apresentaram

Controle (água)				NaCl (134 mmol)				Rf
C	M	P	V	C	M	P	V	
—	■	—	—	—	■	—	—	0,13
—	■	—	—	—	■	—	—	0,18
—	■	—	—	—	■	—	—	0,21
—	■	—	—	—	■	—	—	0,25
—	■	—	—	—	■	—	—	0,27
—	■	—	—	—	■	—	—	0,28
—	■	—	—	—	■	—	—	0,29
—	■	—	—	—	■	—	—	0,31
—	■	—	—	—	■	—	—	0,35
—	■	—	—	—	■	—	—	0,39

Figura 1. Padrões eletroforéticos representando bandas de glutamato desidrogenase nas sementes das variedades botânicas de *Stylosanthes guianensis*, *canenscens* (C), *microcephala* (M), *pauciflora* (P) e *vulgaris* (V), submetidas por 14 horas a 0 (controle: água) e a 134 mmol de cloreto de sódio. R_f : coeficiente de mobilidade que expressa a relação entre a distância de migração da proteína e a distância de migração do corante de referência no gel, em condições eletroforéticas preestabelecidas.

Controle (água)				NaCl (134 mmol)				Rf
C	M	P	V	C	M	P	V	
—	—	—	—	—	—	—	—	0,04
—	—	—	—	—	—	—	—	0,05
—	—	—	—	—	—	—	—	0,06
—	—	—	—	—	—	—	—	0,07
—	—	—	—	—	—	—	—	0,09
—	—	—	—	—	—	—	—	0,10
—	—	—	—	—	—	—	—	0,40
—	—	—	—	—	—	—	—	0,41
—	—	—	—	—	—	—	—	0,42
—	—	—	—	—	—	—	—	0,44
—	—	—	—	—	—	—	—	0,45
—	—	—	—	—	—	—	—	0,47
—	—	—	—	—	—	—	—	0,49
—	—	—	—	—	—	—	—	0,50
—	—	—	—	—	—	—	—	0,60

Figura 2. Padrões eletroforéticos representando bandas de peroxidase em sementes das variedades botânicas de *Stylosanthes guianensis*, *canenscens* (C), *microcephala* (M), *pauciflora* (P) e *vulgaris* (V), submetidas por 14 horas a 0 (controle: água) e a 134 mmol de cloreto de sódio. R_f : coeficiente de mobilidade que expressa a relação entre a distância de migração da proteína e a distância de migração do corante de referência no gel, em condições eletroforéticas preestabelecidas.

uma perda de intensidade, quando submetidas ao cloreto de sódio. Quanto ao número de bandas, as variedades *S. guianensis* var. *canenscens* e *pauciflora* evidenciam perda de uma banda, $R_f = 0,50$ e $R_f = 0,60$, respectivamente, e também diferenças quanto à mobilidade. Já *S. guianensis* var. *vulgaris* apresentou o mesmo número de bandas, diferenças quanto à mobilidade e bandas menos intensas no tratamento salino.

Na hipótese de que esta diminuição de intensidade corresponda à perda de atividade da peroxidase, pode-se considerar que este comportamento esteja relacionado à sensibilidade ao estresse salino pois, em estudos realizados com *Vigna mungo* (Dash & Panda, 2001) foi observado que espécies sensíveis à salinidade diminuem a atividade desta enzima, prejudicando o ajustamento osmótico.

Conclui-se, assim, que as enzimas analisadas nas quatro variedades de *S. guianensis* apresentam comportamentos diferenciados quando submetidas ao estresse salino.

Agradecimentos

À Capes e à FCAV, campus Jaboticabal, Unesp, pelo apoio financeiro; à Embrapa Cerrados, pelo fornecimento das sementes.

Referências

- DASH, M.; PANDA, S.K. Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating *Phaseolus mung* seeds. **Biologia Plantarum**, v.44, p.587-589, 2001.
- FAGERIA, N.K.; GHEYI, H.R. Melhoria genética das culturas e seleção de cultivares. In.: GHEYI, H.R.; QUEIROZ, J.E.; MEDEIROS, J.F. (Ed.). **Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada**. Campina Grande: UFPB, 1997. p.363-383.
- GONZALEZ, L.M.; LOPEZ, R.C.; FONSECA, I.; RAMIREZ, R. Growth, stomatal frequency, DM yield and accumulation of ions in nine species of grassland legumes grown under salts conditions. **Pastos y Forrajes**, v.4, p.299-308, 2000.
- HURKMAN, W.J. Effect of salt stress on plant gene expression: a review. **Plant and Soil**, v.146, p.145-151, 1992.
- KUMAR, R.G.; SHAH, K.; DUBEY, R.S. Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. **Plant Science**, v.156, p.23-34, 2000.
- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J.; BRITTON-DAVIDIAN, J. **Practical isoenzyme genetics**. New York: Ellis Horwood, 1988. 215p.
- QUECINI, V.M.; OLIVEIRA, C.A. de; ALVES, A.C.; VIEIRA, M.L.C. Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.73-80, 2002.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides Press, 1989. 268p.

Recebido em 21 de julho de 2003 e aprovado em 14 de novembro de 2003

