



EFEITO DO ALUMÍNIO E ATIVIDADE DE ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO EM BROTAÇÕES DE PEREIRA CULTIVADAS *IN VITRO*

RIBEIRO, Mirian de Farias¹; AFFONSO, Luana Borges¹; DEUNER, Sidnei²; MARINO, Grazia³; SCHUCH, Márcia Wulff¹

¹Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, Dept^o de Fitotecnia – FAEM/UFPeI

²Laboratório de Metabolismo e Nutrição Mineral de Plantas, Dept^o de Botânica – IB/UFPeI
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. mirianpelotas@yahoo.com.br

³Dept^o de Cultura Arbórea, Universidade de Bolonha, Itália

1. INTRODUÇÃO

A produção de pêras no Brasil ainda é incipiente, principalmente pela pouca pesquisa existente sobre a cultura. Com a falta de produção, a importação do produto colocou a pêra como a fruta importada mais consumida pelos brasileiros no ano de 2005. Um dos problemas apresentados por esta cultura é a incompatibilidade entre porta-enxertos e cultivares-copa. Isto pode ser minimizado pela utilização de cultivares auto-enraizadas, como é realizado em alguns países que apresentam solos menos férteis. As regiões de cultivo de pereira no sul do Brasil apresentam geralmente solos muito ácidos e de baixa fertilidade natural.

Um elemento presente no solo que afeta negativamente a maioria dos vegetais e diminui o pH do solo para números baixos entre 4,5 a 5,0 é o alumínio (Al), sendo o principal fator de toxidez na maioria dos solos. O estresse oxidativo é um importante componente das respostas das plantas a níveis tóxicos de alumínio (Richards *et al.*, 1998), pois causa a ativação de enzimas antioxidantes. No Brasil cerca de 205 milhões de hectares apresentam altas concentrações de Al (De La Fuente & Estrela, 1999) e onde a correção da acidez do solo é de difícil execução, as cultivares tolerantes a este mineral podem ser a solução para este problema.

Poucos trabalhos relatam o efeito do alumínio em plantas cultivadas *in vitro* e sua ação nas brotações. Porém, sabe-se que existe uma relação bastante forte entre a toxidez ao alumínio e o stress oxidativo. Desta forma, o presente trabalho visou avaliar *in vitro* os efeitos do alumínio e pH ácido na multiplicação de brotações de pereira, com particular atenção a ativação das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), envolvidas no estresse oxidativo e no crescimento dos tecidos vegetais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas do Departamento de Fitotecnia da FAEM/UFPel em Pelotas - RS. Os explantes constituíram-se de segmentos nodais provenientes de brotações de pereira cultivares Conference e Abate Fetel cultivadas *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi o QL modificado por Leblay (1991) adicionado de alumínio, sob a forma de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$, nas seguintes concentrações, que constituíram os tratamentos: Controle ($0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Al}$; pH 5,7), 0, 15, 30, 45 e $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ Al}$ (pH 4,0), colocado em frascos contendo 1 g de algodão hidrófilo e 30 mL de meio. Após 60 dias, foram avaliados a percentagem de explantes brotados, número médio de brotações, comprimento das brotações, massa fresca e massa seca total.

Para a extração das enzimas antioxidantes, 200 mg de tecido foliar foram macerados em polivinilpirrolidona (PVPP) 20% acrescido do seguinte tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 1 mM. Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 g , por 20 minutos, a 4°C , coletando-se os sobrenadantes para as análises enzimáticas da CAT e APX (Biemelt et al., 1998). A CAT foi avaliada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, durante 3 minutos, em um tampão de incubação contendo fosfato de potássio 200 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM, incubado a 28°C , em que foi monitorado o consumo do peróxido de hidrogênio (Havir & McHale, 1987). A atividade da APX foi realizada segundo Nakano & Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O tampão de incubação foi composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e H_2O_2 0,1 mM.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com fatorial 2×6 e constou de quatro repetições com cinco explantes por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos percebe-se que a cultivar Conference apresentou médias superiores a cultivar Abate Fetel (Tabela 1), apresentando o maior número médio de brotações no meio sem alumínio e com pH ácido. Para comprimento médio das brotações, a cultivar Abate Fetel apresentou maior comprimento das brotações no meio com 45 mg L^{-1} de alumínio e pH ácido, não apresentando diferença estatística entre as cultivares. Dantas et al. (2001) observou que um dos principais efeitos do Al na parte aérea de porta-enxertos somaclonais de macieira foi o encurtamento dos internódios, resultando em altura média menor. As plantas controles, em geral, tiveram melhor crescimento que aquelas em presença do Al. No presente trabalho (Tabela 1) o menor comprimento foi obtido no controle em ambas as cultivares. Para Villa et al. (2008) através dos resultados apresentados para avaliação *in vitro* de porta-enxertos de videira introduzidos em meio de cultivo contendo alumínio supôs que o Al no meio induz mecanismos bioquímicos e fisiológicos na planta, que melhoram as condições de crescimento neutralizando a toxicidade por H^+ e Al^{+3} , o que pode ter ocorrido nas cultivares analisadas. Para percentagem de explantes brotados houve diferença estatística entre as cultivares e também entre as concentrações no controle, sendo que a cultivar Abate Fetel apresentou a menor percentagem de explantes brotados nesse tratamento. Para massa fresca total, o controle e os meios com 30 e 60 mg L^{-1} de alumínio e pH ácido fizeram com que a cultivar Conference diferísse estatisticamente da cultivar Abate Fetel, apresentando médias superiores. A cultivar Abate Fetel

apresentou maior massa fresca total no meio com 45 mg L⁻¹ de alumínio e pH ácido. Para massa seca total, houve diferença estatística em todas as concentrações de alumínio, com exceção da concentração de 60 mg L⁻¹. Basso et al. (2003) trabalhando com eucalipto *in vitro* mostrou que houve um aumento de massa nas brotações tratadas com diferentes doses de alumínio. Segundo Morettini et al. (1967) a cultivar Conference é mais vigorosa que a cultivar Abate Fetel, estando de acordo com o que foi apresentado neste trabalho, onde a cultivar Conference apresentou valores médios superiores em praticamente todas as variáveis analisadas.

Tabela 1. Efeito do alumínio e pH ácido no número médio de brotações, comprimento das brotações, percentagem de explantes brotados, massa fresca (MF) e massa seca (MS) total de pereira 'Conference' e 'Abate Fetel' tratadas com diferentes concentrações de alumínio e pH ácido durante a multiplicação *in vitro*.

Cultivar	Concentração de Alumínio (mg L ⁻¹)					
	Controle	0	15	30	45	60
Número médio de brotações						
Conference	2,46 aA	2,97 aA	2,95 aA	2,45 aA	2,6aA	3,02 aA
Abate Fetel	1,83 bB	2,55 aA	1,61 bB	1,73 bB	1,66 bB	1,51 bB
Comprimento médio das brotações (cm)						
Conference	1,07 aA	1,24 aA	1,31 aA	1,30 aA	1,19 aA	1,35 aA
Abate Fetel	0,99 aB	1,37 a AB	1,33 aAB	1,89 aA	1,19 aB	1,45 aAB
Explantes brotados (%)						
Conference	85 aA	85 aA	80 aA	90 aA	100 aA	95 aA
Abate Fetel	50 bB	90 aA	90 aA	85 aA	90 aA	80 aA
MF total (mg)						
Conference	1018,5 aA	1199,75 aA	1115 aA	1286,5 aA	1398,5 aA	1247,25 aA
Abate Fetel	608,25 bB	908,25 aAB	691,75 aAB	786,25 bAB	1094,5 aA	753,25 bAB
MS total (mg)						
Conference	227,25 aA	255,25 aA	236,5 aA	252,25 aA	244,5 aA	208 aA
Abate Fetel	109 bA	174,25 bA	143,25 bA	143,75 bA	165,5 bA	154,25 aA

*Médias seguidas por letras distintas (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas) diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Os efeitos do alumínio sobre os sistemas de defesa antioxidativos enzimáticos mostrou que a atividade total da CAT, para a cultivar Conference, se manteve ativa em todos os tratamentos, obtendo uma menor atividade na concentração de 30 mg L⁻¹ de alumínio e pH 4,0. Já para a cultivar Abate Fetel, após uma queda inicial, a sua atividade aumentou nas brotações submetidas a 30 mg L⁻¹, voltando a reduzir novamente. A atividade na concentração de 15 mg L⁻¹ foi reduzida a metade em relação ao controle (Figura 1). Schuch et al (2008) trabalhando com alumínio e estresse oxidativo em marmeleiro BA-29 *in vitro* observou que a CAT não mostrou variação nas diferentes concentrações de alumínio, ou seja, teve uma atividade diferente da que foi observada nas cultivares de pereira analisadas no presente trabalho.

A atividade da APX se manteve variável em relação ao controle em ambas as cultivares. Na concentração de 60 mg L⁻¹, a atividade da APX na cultivar Abate Fetel foi mínima, enquanto que na cultivar Conference foi máxima (Figura 1).

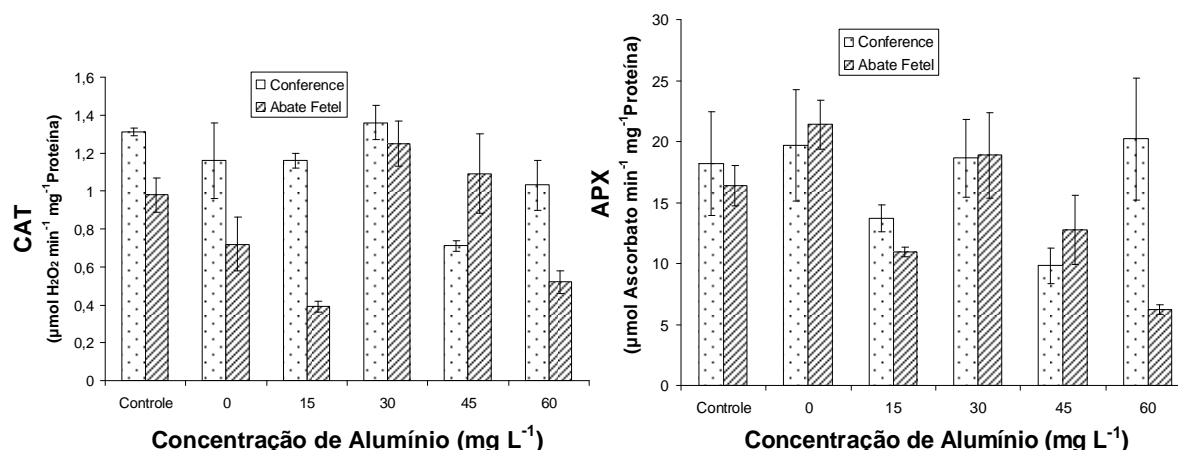


Figura 1. Atividade específica da CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Proteína}$) e APX ($\mu\text{mol Ascorbato min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Proteína}$) em folhas de pereira cv. Abate Fetel e Conference tratadas com diferentes concentrações de alumínio e pH ácido na multiplicação *in vitro*.

4. CONCLUSÃO

As respostas obtidas entre os tratamentos ocorreu pela diferença de cultivares. A cultivar Conference possui uma maior taxa de multiplicação do que a cultivar Abate Fetel, mesmo na presença de alumínio e pH ácido e, de modo geral, as atividades dos sistemas de defesa antioxidativos enzimáticos parecem indicar a cultivar Conference, como aquela com mecanismos de defesa mais eficientes durante o tratamento com Al.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASSO, L. H. M., GONÇALVES, A N., SILVEIRA, L. V. A, LIMA, G. P. P. Efeito do alumínio no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas *in vitro*. **Scientia Forestalis**, 2003, vol.63, p.67-177.
- BIEMELT, S., KEETMAN, U., ALBRECHT, G. Re-aeratio following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense in roots of wheat seedlings. **Plant Physiol**, 1998, vol.116, p.651-658.
- BURKHARDT, S. L., VILLA, F., SILVA, A. Lima da *et al.* **Avaliação de porta-enxertos de videira in vitro em condições de estresse por alumínio**. *Ciência Téc. Vitiv.*, 2008, vol.23, no.1, p.21-27.
- DANTAS, Adriana Cibele de Mesquita *et al.* Tolerância ao alumínio em porta-enxertos somaclonais de macieira cultivados em solução nutritiva. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, 2001, v.36, n. 4.
- DE LA FUENTE, J.M.; ESTRELLA, L.H. Advances in the Understanding of aluminum Toxicity and the Development of Aluminum – Tolerant Trasgenic Plants. **Advances in Agronomy**. 1999, v.66, p.103-120.
- HAVIR, E. A., MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Physiologia Plantarum**, 1987, vol. 84, p.450-455.
- LEBLAY C.,CHEVREAU E., RABOIN L. M. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell, tissue and organ culture**, 1991, vol.25, p.99-105.

MORETTINI, A., BALDINI, E., SCARAMUZZI, F., MITTEMPERGER, L. Monografia delle principali cultivar di Pero. Firenze: Centro miglioramento piante da frutto, 1967. 412p.

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

RICHARDS, D. K., SCHOTT, E. J., SHARMA, Y. K., DAVIS, K., GARDNER, R. C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 1998, vol.116, p.409-418.

SCHUCH, M. W., CELLINI, A., MASIA, A., MARINO G. Alumínio e estresse oxidativo em porta-enxerto de pereira, marmeleiro BA 29, *in vitro*. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008, Vitória-ES. **Anais do...** Brasil, 2008.

VILLA, F., BURKHARDT, S. L., SILVA, A. L., PASQUAL M. Avaliação *in vitro* de dois porta - enxertos de videira introduzidos em meio de cultivo contendo alumínio. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008, Vitória-ES. **Anais do...** Brasil, 2008.