

ATIVIDADE DE PEROXIDASE E NÍVEIS DE PROTEÍNAS EM PLANTAS DE ABACAXIZEIRO MICROPROPAGADAS EM MEIO SALINO

PEROXIDASE ACTIVITY AND PROTEINS LEVELS ON PINEAPPLE PLANTS MICROPROPAGATED ON SALINITY MEDIUM

PIZA, Isabela M. T.¹; LIMA, Giuseppina P. P.²; BRASIL, Oswaldo G.³

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram quantificar a atividade da enzima peroxidase em plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. Smooth Cayenne, cultivadas *in vitro*, em meio salino, como um possível marcador bioquímico de estresse e organogênese, e verificar as variações nos teores de proteínas totais solúveis. Gemas axilares de abacaxizeiro foram cultivadas *in vitro* em meio MS, acrescido de 8,881 µM de BAP e 5,37 µM de ANA. Os níveis de salinidade testados foram: 0 (controle); 0,57 g L⁻¹; 1,15 g L⁻¹; e 2,30 g L⁻¹ de NaCl. A atividade da enzima peroxidase foi quantificada em todas as fases de desenvolvimento *in vitro*, em gemas, plantas e raízes, bem como as proteínas totais solúveis. A atividade da peroxidase foi maior em gemas nos teores mais elevados de sal aos 15 dias, e proteínas totais solúveis apresentaram diminuição de teores em todos os tratamentos. Nas plantas a atividade da enzima peroxidase e os teores de proteínas variaram de acordo com os níveis de salinidade e tempos de coletas. As raízes formadas apresentaram atividade de peroxidase e teores de proteínas maiores em meio salino.

Palavras-chaves: *Ananas comosus*, cultivo *in vitro*.

INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae compreende aproximadamente 46 gêneros e cerca de 1.900 espécies de plantas herbáceas, quase todas originárias das Américas Tropical e Subtropical. O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) é a espécie que se destaca, por sua importância econômica e em razão de abranger todos os cultivares atualmente plantados (MEDINA, 1987).

O Brasil é grande produtor de abacaxi, ocupando a primeira posição na América do Sul e a segunda em produção mundial, apresentando crescimento constante, com taxa média anual de 2,93% (FAO, 2000).

A salinidade no solo ou em meios de cultivo *in vitro* provoca respostas metabólicas nas plantas, por proporcionar uma condição estressante. Entre elas, estão as alterações nos níveis de proteínas e na atividade de enzimas, como a peroxidase. As peroxidases estão relacionadas com os processos de crescimento e diferenciação celular, e mudanças morfogenéticas em resposta aos estresses físico, químico e biológico. O aumento da atividade desta enzima em plantas submetidas a estas condições pode ser fator determinante da capacidade de adaptação dessas plantas, podendo essa atividade ser identificada como um marcador bioquímico de estresse. Em relação aos níveis de proteínas, o estresse

salino pode provocar mudanças nos teores protéicos e atividade enzimática, com danos no crescimento e desenvolvimento vegetal (ULISSES et al., 1998).

Atualmente, trabalhos buscam correlacionar diferenças metabólicas nos tecidos em processos de morfogênese *in vitro*, uma vez que a identificação visual é subjetiva e somente comprovada depois de prolongados períodos de cultivo. Assim, marcadores bioquímicos, como a peroxidase, podem auxiliar na identificação precoce de processos morfogênicos durante a diferenciação celular, crescimento e multiplicação de plantas.

Os objetivos deste trabalho foram quantificar a atividade da enzima peroxidase e analisar as variações nos teores de proteínas totais solúveis em plantas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*, em meio salino.

MATERIAL E MÉTODOS

Gemas axilares de abacaxizeiro foram cultivadas *in vitro* em meio constituído pelos sais minerais do MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 8,881 µM de BAP (6-benzilaminopurina); e 5,37 µM de ANA (ácido naftalenoacético), e solidificado com a adição de 5 g L⁻¹ de ágar. As plantas obtidas foram enraizadas em meio MS líquido com a metade de sua concentração de sais, acrescido de 5,37 µM de ANA.

Os níveis de salinidade testados na fase de obtenção de plantas e enraizamento foram: 0 (controle); 0,57 g L⁻¹; 1,15 g L⁻¹; e 2,30 g L⁻¹ de NaCl. O pH do meio foi ajustado para 5,8 ± 0,1. Alíquotas de 20 mL de meio de cultura foram distribuídas em frascos de cultivo de 268 mL de capacidade. Em seguida, os frascos foram fechados com tampas transparentes de polipropileno e autoclavados a 121 °C e 1,5 kg cm⁻², durante 20 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram distribuídos a razão de quatro por frasco de cultivo, que foi fechado em seguida com filme transparente de PVC e incubados à temperatura de 25 ± 1° C, fotoperíodo de 16 horas.

As análises de peroxidases e proteínas totais solúveis foram realizadas em todas as fases do cultivo *in vitro*, ou seja, gemas em desenvolvimento (0, 15 e 30 dias), plantas (0, 15, 30, 60 e 90 dias) e raízes (30 e 60 dias).

¹ Bióloga Dra., Departamento de Química e Bioquímica, I.B., UNESP, CP 545, 18618-000, Botucatu - SP - Brasil - E-mail: isabelapiza@terra.com.br

² Eng. Agr., Dra., Profa. Livre Docente, Departamento de Química e Bioquímica, I.B., UNESP, CP 545, 18618-000, Botucatu - SP - Brasil E-mail: gpplima@ibb.unesp.br

³ Eng. Agr., Dr., Prof. Titular Departamento de Química e Bioquímica, I.B., UNESP, CP 545, 18618-000, Botucatu - SP - Brasil

(Recebido para Publicação em 12/12/2002, Aprovado em 04/09/2003)

Atividade de Peroxidase

O material vegetal coletado foi pesado e macerado em 5 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,7, e o resíduo filtrado duas vezes em gaze, obtendo-se o denominado extrato bruto. O procedimento foi realizado em banho de gelo.

A determinação da atividade da enzima peroxidase foi realizada de acordo com o método de LIMA (1994), utilizando-se o extrato bruto obtido. A atividade específica da peroxidase foi expressa em $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ decomposto} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína⁻¹.

Teor de Proteínas Totais Solúveis

Empregou-se o método proposto por BRADFORD (1976). As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 595 nm e comparadas com a curva-padrão de caseína a 1%, sendo o teor protéico da amostra expresso em mg de proteína $\cdot \text{g}^{-1}$ de matéria fresca.

Delineamento Experimental

Em todo o trabalho foi utilizado o programa Estat-Graph (UNESP - Jaboticabal) para a análise estatística, sendo o delineamento experimental adotado o inteiramente casualizado, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, comparando-se as médias dos diferentes níveis de salinidade em cada coleta. As coletas referem-se a diferentes medidas tomadas em uma mesma unidade experimental.

Na primeira fase (desenvolvimento de gemas) realizaram-se três coletas: 0 = gemas recém extraídas da coroa, 15 dias = gemas com início de desenvolvimento e 30 dias = gemas com emissão de parte aérea, nos quatro níveis de salinidade propostos, avaliando-se a atividade de peroxidase e os teores de proteínas totais solúveis em quatro repetições. Na segunda fase (desenvolvimento de plantas) realizaram-se cinco coletas (0; 15; 30; 60; 90 dias) analisando-se a parte aérea e, após 30 dias, parte aérea e raízes, nos quatro níveis de salinidade propostos, para os mesmos parâmetros bioquímicos, em quatro repetições. Foi determinada a curva de regressão nas análises, das coletas (no tempo) e análise de variância para as comparações entre níveis de salinidade testados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade de Peroxidase

As variações na atividade da enzima peroxidase em gemas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*, em diferentes níveis de salinidade, estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividade de peroxidase ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2 \text{ decomposto} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína), em gemas de abacaxizeiro propagadas *in vitro* em diferentes níveis de salinidade (0; 0,57; 1,15 e 2,30 g L⁻¹ de NaCl), em três tempos de coletas.

Dias de Coletas	NaCl (g L ⁻¹)			
	0	0,57	1,15	2,30
0	0,0135A*	0,0135A	0,0135A	0,0135A
15	0,0308B	0,0368B	0,1668A	0,1613A
30	0,0055C	0,0270A	0,0123B	0,0118B

*Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5%.

Ocorreu aumento na atividade da enzima peroxidase em todos níveis de salinidade nos primeiros 15 dias, sendo maior a atividade nas maiores concentrações de NaCl, que diferiram significativamente das demais. Aos 30 dias, houve decréscimo

na peroxidase em todos os níveis de salinidade, com menor atividade no controle.

A maior atividade da peroxidase aos 15 dias, conforme descrito, parece estar relacionada a fatores estressantes, como coleta, preparo e manuseio dos explantes, início da cultura *in vitro* e níveis de salinidade aos quais as gemas foram expostas, causando aumento na atividade da enzima, provavelmente com a finalidade de promover adaptação dos explantes às condições *in vitro*, de modo a permitir o crescimento em meio salino. STROGONOV (1980) também observou grande aumento da atividade de peroxidase em folhas injuriadas por NaCl. Esta enzima, segundo o autor, deve ter função na oxidação de substâncias acumuladas em decorrência de possíveis danos provocados pelo NaCl. LIMA et al. (1998) observaram aumento de peroxidase em calos de arroz submetidos a estresse salino e concluíram que esta enzima poderia ser usada como parâmetro para identificar estresse fisiológico e que o aumento de atividade da enzima pode estar associado à habilidade de certos genótipos em degradar substâncias tóxicas como radicais livres (peróxidos), fenóis e outros liberados em condições de estresse.

Muitas funções têm sido atribuídas as peroxidases em plantas, estando relacionadas com respostas ao estresse. As plantas respondem ao estresse salino desenvolvendo mecanismos de tolerância como o acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos, requeridos para manter o turgor necessário ao crescimento (SANCHO et al., 1996). Enzimas antioxidativas têm importante papel na adaptação e sobrevivência de plantas durante o estresse (CHANG & KAO, 1998).

Aos 30 dias, ocorreu diminuição na atividade da enzima nas gemas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*, com valores próximos à coleta inicial, provavelmente devido à adaptação desta estrutura ao estresse, já que não se observou visualmente nenhuma injúria causada pelo sal nestes explantes e não se evidenciou nenhum comprometimento de crescimento ou sobrevivência das gemas em relação ao NaCl.

A atividade da enzima peroxidase foi também analisada em plantas micropropagadas de abacaxizeiro durante 90 dias (Tabela 2 e Figura 1). Plantas expostas à salinidade tiveram maior tendência de aumento da atividade de peroxidase quando comparadas com a testemunha (omisso). Aos 60 dias, plantas sob efeito da maior concentração salina apresentaram maior atividade à enzima, justamente quando as plantas mostraram emissão desordenada de novos brotos e ausência de enraizamento.

As peroxidases podem reagir à salinidade aumentando ou diminuindo sua atividade, dependendo da concentração salina (ZHANG; KIRKHAM, 1994). A produção de altas concentrações de H₂O₂, em resposta ao estresse, pode induzir à liberação de peroxidases nas membranas, as quais estas enzimas estão geralmente associadas, como observado em cloroplastos de espinafre por GRODEN & BECK (1979).

As peroxidases são responsáveis pela síntese de polímeros (lignina) na parede celular e pela prevenção da oxidação dos lipídios da membrana. O aumento de peroxidase em plantas em estresse salino permitiria maior tolerância ao estresse (MITTAL & DUBEY, 1991). Danos celulares causados por radicais livres e pela peroxidação dos lipídios podem ser reduzidos ou prevenidos pelo metabolismo oxidativo envolvendo enzimas antioxidantes, como a peroxidase (CHANG; KAO, 1998).

PIERIS & SIEGEL (1991) identificaram uma correlação direta entre a inibição de crescimento e a indução de peroxidase em plantas de arroz cultivadas em vasos, como

resultado do estresse salino, e interpretaram estes resultados com a suposição de que ocorre correlação recíproca entre crescimento e atividade da peroxidase.

O aumento de peroxidase aos 60 dias pode estar relacionado à mudança de fase do processo organogênico, visto que os brotos foram transferidos para um meio de enraizamento, o qual apresentava apenas a metade dos minerais nutrientes do meio de proliferação de brotos, causando, provavelmente, estresse adicional às plantas.

ANDERSEN (1986) afirmou que a enzima peroxidase poderia ser usada como marcador de organogênese e estádios de desenvolvimento, por participar da regulação endógena de AIA, agindo como AIA oxidase, sistema enzimático capaz de oxidar o AIA, principalmente nas fases de intenso crescimento ou formação de órgãos nas plantas. O autor, estudando o desenvolvimento *in vitro* de células de *Rhododendron*, concluiu que baixa atividade da enzima poderia estar relacionada com perda do potencial morfogênico.

A atividade da peroxidase também foi quantificada nas raízes formadas *in vitro* com dois tempos de coletas, aos 30 e 60 dias. Os resultados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade de peroxidase ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2$ decomposto $\text{minuto}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em raízes de plantas de abacaxizeiro propagadas *in vitro*, em diferentes níveis de salinidade (0; 0,57; 1,15 e 2,30 g L⁻¹ de NaCl), aos 30 e 60 dias.

Dias de Coletas	NaCl (g L ⁻¹)			
	0	0,57	1,15	2,30
30	0,1028A*	0,0308B	----	----
60	0,0910A	0,0973A	0,0978A	----

*Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5%.

Aos 30 dias ocorreram diferenças significativas na atividade da enzima entre o controle (0 g L⁻¹ NaCl), que apresentou maior valor e níveis de baixa salinidade, em que o controle apresentou o maior valor. Na segunda coleta, aos 60 dias, não se observaram diferenças significativas entre os níveis de salinidade, com diminuição de atividade em raízes no controle e aumento na presença de NaCl. Não houve formação de raízes aos 30 dias nos níveis salinos de 1,15 e 2,30 g L⁻¹ de NaCl e aos 60 dias com 2,30 g L⁻¹ de NaCl.

CONVERSO et al. (1997) relataram variações na atividade e na expressão da peroxidase como resultado do estresse salino em plantas de trigo submetidas à alta salinidade, cultivadas em caixas plásticas contendo vermiculita, onde as raízes foram mais tolerantes à salinidade e apresentaram os mais altos valores de atividade quando comparados com folhas e caules, que mostraram sinais de clorose em altas salinidades. Concluíram que em raízes a peroxidase teve efeito protetor em relação aos danos causados pelo NaCl.

Neste trabalho, a atividade da peroxidase em raízes de plantas de abacaxizeiro provavelmente se relaciona a condições estressantes. O próprio cultivo *in vitro* seria condição de estresse, e isto é evidenciado no controle em que

Tabela 2 - Atividade de peroxidase ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2$ decomposto $\text{minuto}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em plantas de abacaxizeiro propagadas *in vitro*, em diferentes níveis de salinidade (0; 0,57; 1,15 e 2,30 g L⁻¹ de NaCl), durante 90 dias.

Dias de Coletas	NaCl (g L ⁻¹)			
	0	0,57	1,15	2,30
0	0,1283 A*	0,1283 A	0,1283 A	0,1283 A
15	0,2535 A	0,2553 A	0,2333 A	0,2073 A
30	0,1863 AB	0,2615 A	0,1605 B	0,1443 B
60	0,2125 A	0,3003 A	0,2853 A	0,3453 A
90	0,1315 A	0,2103 A	0,2013 A	0,1643 A

*Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5%.

se nota alta atividade da enzima. A salinidade também interferiu na atividade da peroxidase, ocorrendo aumento de atividade em raízes em meios salinos.

Os resultados relativos à peroxidase em gemas, plantas e raízes de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*, em meio salino, podem refletir a capacidade adaptativa das diversas estruturas aos fatores estressantes. Em gemas não se observou visualmente injúria causada pelo sal, mas notou-se aumento da atividade da peroxidase aos 15 dias nos maiores níveis de NaCl, talvez devido a um efeito protetor da enzima em relação à salinidade, permitindo crescimento satisfatório. No caso de plantas, observou-se comportamento variável da enzima, mas também teores mais altos foram identificados em meios salinos aos 15 e 60 dias, épocas críticas que requeriam adaptação das plantas para garantir o crescimento. Já em raízes, os resultados mostraram aumento de peroxidase em meio salino, confirmando a condição estressante do NaCl. A alta atividade da enzima no controle (sem sal) pode ser o mecanismo de defesa da planta contra o estresse causado pela mudança de concentração de nutrientes no meio e, conseqüentemente, o que garantiu o enraizamento de 100% das plantas. Altas concentrações de sal comprometeram o enraizamento

Proteínas Totais Solúveis

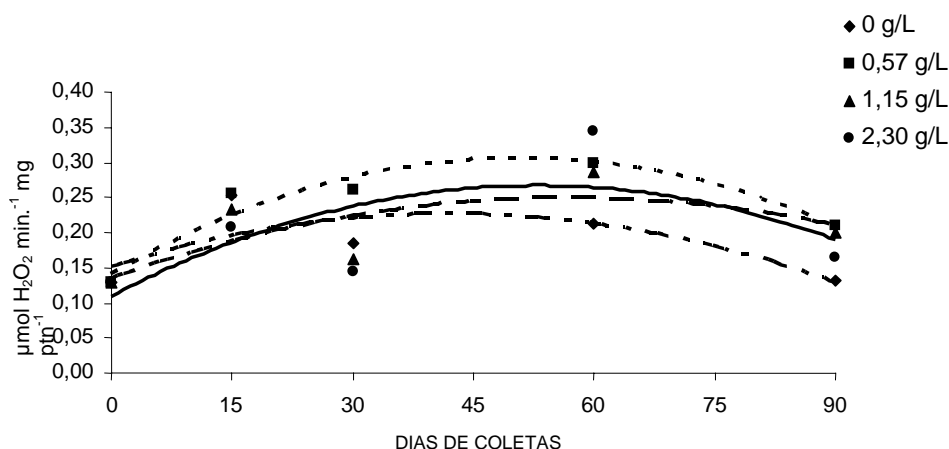
Na Tabela 4 estão os resultados dos teores de proteínas totais solúveis em gemas de abacaxizeiro propagadas *in vitro*, em diferentes tratamentos salinos.

Tabela 4 - Teores de proteínas totais solúveis (mg de proteína grama de matéria fresca⁻¹) em gemas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*, em diferentes níveis de salinidade (0; 0,57; 1,15 e 2,30 g L⁻¹ de NaCl).

Dias de Coletas	NaCl (g L ⁻¹)			
	0	0,57	1,15	2,30
0	2,6345A*	2,6345A	2,6345A	2,6345A
15	0,8987A	0,6853B	0,1625C	0,1645C
30	1,5493C	1,5910C	1,8383B	5,5890A

*Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5%.

Em todos os níveis de salinidade houve diminuição nos teores de proteínas totais solúveis na segunda coleta, aos 15 dias, quando as gemas apresentavam início de desenvolvimento com aumento de tamanho e coloração verde. Nesta fase, notaram-se diferenças significativas entre os níveis de salinidade, em que maiores concentrações de NaCl mostraram menores teores de proteínas. Aos 30 dias, os teores de proteína aumentaram, com diferenças significativas, fase em que as gemas mostravam grande crescimento com o início da brotação.



$$\begin{aligned}
 0 \text{ g L}^{-1} & y = -0,00004x^2 + 0,0036x + 0,1522 & R^2 & = 0,5539 \\
 0,57 \text{ g L}^{-1} & y = -0,000006x^2 + 0,0065x + 0,1412 & R^2 & = 0,9195 \\
 1,15 \text{ g L}^{-1} & y = -0,00004x^2 + 0,004x + 0,1351 & R^2 & = 0,5027 \\
 2,30 \text{ g L}^{-1} & y = -0,000006x^2 + 0,0059x + 0,1097 & R^2 & = 0,4553
 \end{aligned}$$

Figura 1 - Atividade de peroxidase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ decomposto $\text{min}^{-1} \text{mg}$ de proteína $^{-1}$) em plantas de abacaxizeiro propagadas *in vitro*, em diferentes níveis de salinidade (0; 0,57; 1,15 e 2,30 g L^{-1} de NaCl), durante 90 dias.

Os resultados provavelmente relacionam-se tanto com o estágio de desenvolvimento das gemas quanto com o efeito do estresse salino durante o processo de crescimento. Segundo LEVITT (1980), o NaCl provoca diminuição da síntese de proteína e aumenta a hidrólise protéica em grande grupo de plantas, sendo a hidrólise considerada o efeito primário do sal. Observou-se neste trabalho que, nos primeiros 15 dias de exposição ao sal, ocorreu redução dos teores de proteínas com maior intensidade em alta salinidade, com diferença significativa entre os níveis salinos e o controle. O decréscimo no conteúdo de proteína pode refletir retardamento na síntese protéica ou aceleração na sua degradação, levando ao aumento na quantidade de aminoácidos livres ou à inibição da incorporação destes aminoácidos nas proteínas.

No nível de salinidade de 2,30 g L^{-1} observou-se maior concentração de proteínas aos 30 dias, tendo resultados semelhantes sido relatados por KRISHNAMURTHY & BHAGWAT (1989), que comprovaram acúmulo de proteínas solúveis em brotos de arroz cultivados em meio salino quando comparado com o controle, sem sal. Este acúmulo foi considerado uma adaptação para a sobrevivência em estresse salino. Esta pode ser uma hipótese para o acúmulo de proteínas no tratamento salino aos 30 dias; isto é, uma adaptação ao estresse, garantindo o desenvolvimento da gema em alta salinidade, já que, visualmente, injúrias causadas pelo estresse salino não foram observadas.

Os resultados da salinidade em plantas propagadas *in vitro* de abacaxizeiro em relação aos teores de proteínas totais solúveis estão demonstrados na Tabela 5, enquanto que os resultados gráficos estão apresentados na Figura 2.

No controle, ocorreu diminuição dos teores de proteínas aos 15 dias, com diferença significativa em relação aos níveis salinos. Aos 30 dias estas proteínas mostraram pequeno aumento, também com diferença significativa dos meios

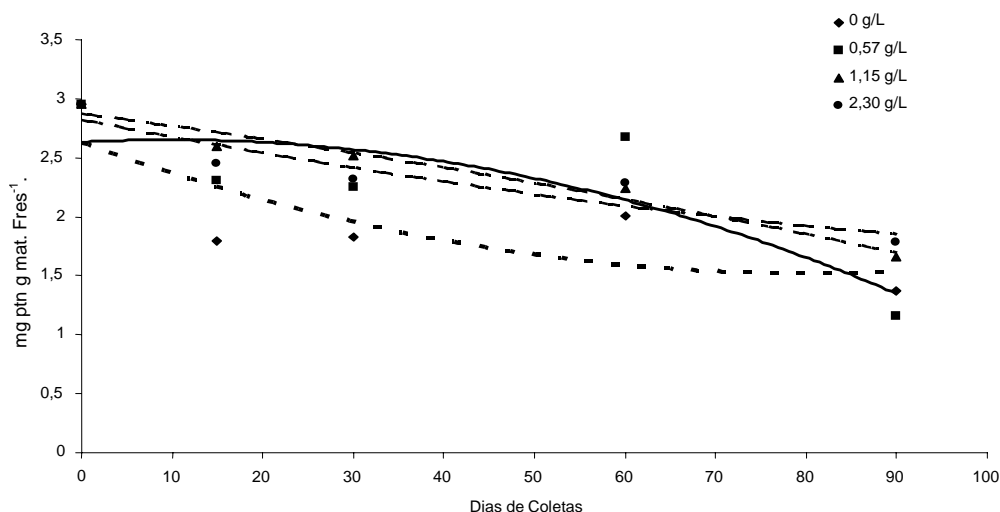
salinos. Após transferência para o meio de enraizamento, aos 30 dias, ocorreram aumentos nos teores de proteínas no controle e 0,57 g L^{-1} de NaCl. Nos maiores níveis de sal, houve decréscimo constante nos teores de proteína.

Tabela 5 - Teores de proteínas totais solúveis (mg de proteína/ grama de matéria fresca) em plantas de abacaxizeiro propagadas *in vitro*, em diferentes níveis de salinidade (0; 0,57; 1,15 e 2,30 g L^{-1} de NaCl).

Dias de Coletas	NaCl (g L^{-1})			
	0	0,57	1,15	2,30
0	2,9523A*	2,9523A	2,9523A	2,9523A
15	1,7900B	2,3025A	2,6005A	2,4535A
30	1,8240B	2,2560A	2,5193A	2,3148A
60	2,8235A	2,6723AB	2,2408B	2,2895B
90	1,3718AB	1,1580B	1,6603A	1,7798A

*Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5%.

O decréscimo constante nos teores de proteínas totais solúveis nos maiores teores de sais indicou que, provavelmente, houve inibição da síntese protéica. Segundo MARTINEZ & CERDA (1989), o estresse iônico produzido pelo NaCl em folhas de tomate interferiu no transporte de nitrato dos vacúolos para o citoplasma, diminuindo assim a capacidade das células em incorporar nitrogênio (nitrato) para o crescimento, principalmente para a síntese de proteínas. A concentração de proteínas totais solúveis declinou com o aumento de NaCl em todos os estádios de crescimento de feijão de fava. Este fato foi associado ao concomitante decréscimo nos aminoácidos livres. A diminuição no conteúdo de proteína frente ao NaCl foi similar nos diferentes estádios de desenvolvimento, mas os aminoácidos livres decresceram mais em brotos e em estádios vegetativos, quando comparados a estádios de florescimento (GARG et al., 1997).



$$\begin{aligned}
 0 \text{ g L}^{-1} & y = 0,0002x^2 - 0,0275x + 2,6228 & R^2 & = 0,6136 \\
 0,57 \text{ g L}^{-1} & y = -0,0002x^2 + 0,004x + 2,6322 & R^2 & = 0,6588 \\
 1,15 \text{ g L}^{-1} & y = -0,00003x^2 - 0,0101x + 2,8737 & R^2 & = 0,9684 \\
 2,30 \text{ g L}^{-1} & y = 0,00005x^2 - 0,0149x + 2,8218 & R^2 & = 0,8646
 \end{aligned}$$

Figura 2 - Teores de proteínas totais solúveis (mg de proteína grama de matéria fresca⁻¹) em plantas de abacaxizeiro propagadas *in vitro*, em diferentes níveis de salinidade (0; 0,57; 1,15 e 2,30 g L⁻¹ de NaCl), durante 90 dias.

Tabela 6 - Teores de proteínas totais solúveis (mg de proteína/ grama de matéria fresca) em raízes de plantas de abacaxizeiro propagadas *in vitro*, em diferentes níveis de salinidade (0; 0,57; 1,15 e 2,30 g L⁻¹ de NaCl), aos 30 e 60 dias.

Dias de Coletas	NaCl (g L ⁻¹)			
	0	0,57	1,15	2,30
30	3,4093B*	7,4278A	-----	----
60	5,7273A	4,6028B	3,4668C	-----

*Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5%.

Na fase de enraizamento, os teores de proteínas totais solúveis estão demonstrados na Tabela 6, naqueles níveis salinos em que houve formação de raízes, em dois tempos de coletas.

Observou-se aumento nos teores de proteínas em raízes de plantas de abacaxi no controle e decréscimo em 0,57 g L⁻¹ de NaCl, entre os dois períodos de coletas. Os demais níveis de salinidade não apresentaram resultados possíveis de serem discutidos, embora a concentração de 1,15 g L⁻¹ de NaCl aos 60 dias tenha apresentado diferença significativa dos demais. BROETTO (1995) relatou diminuição nos teores de proteínas totais solúveis em calos de feijão cultivados em meio salino, quando comparados com a testemunha, e concluiu que a diminuição da incorporação de aminoácidos em proteínas ou a redução dos níveis de polirribossomos, devido ao estresse salino, pode ter sido a causa da redução da síntese de proteínas.

As proteínas em plantas, como em outros organismos, são constantemente degradadas e restabelecidas. Embora à primeira vista isso pareça um processo antieconômico, uma observação mais efetiva mostrou que é essencial e permite

às plantas a reutilização de aminoácidos, alterando seu conteúdo protéico durante o desenvolvimento, a fim de se adaptar a novas condições ambientais. A proteólise também fornece aminoácidos necessários para a manutenção celular e o crescimento, e a degradação protéica também se acelera durante distúrbios nutricionais, que podem ser causados pela salinidade, com a finalidade de manter um *pool* de aminoácidos (VIESTRA, 1993).

CONCLUSÕES

1) A atividade da enzima peroxidase mostrou variação em relação aos níveis de salinidade e ao desenvolvimento vegetal. Em gemas aos 15 dias verificou-se aumento de atividade em meios salinos. Em plantas, a enzima apresentou atividade semelhante em relação à salinidade. Em raízes, a atividade de peroxidase aumentou em meios salinos.

2) As proteínas totais solúveis variaram em função dos níveis de salinidade e fases de desenvolvimento, com maiores teores em gemas cultivadas sob alta salinidade.

ABSTRACT

The objectives of this work were to analyze the peroxidase activity in pineapple plants (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. Smooth Cayenne, cultured *in vitro* on saline medium, as a stress and organogenesis marker. It also aimed to study the influence of saline stress on enzyme activity, and analyze the changes in total soluble proteins. Axillary buds of pineapple were cultured *in vitro* in MS medium, supplemented with 8.881 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP and 5.37 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAA. The levels of salinity tested were: 0.57 g L⁻¹; 1.15 g L⁻¹ and

2.30 g L⁻¹ of NaCl. Peroxidase activity and total soluble proteins were evaluated in the development of buds, shoots and roots. The results showed that peroxidase activity was higher in buds at the highest salt concentration at 15 days and proteins showed a decrease in all treatments. Shoots cultured showed that peroxidase activity and total proteins change with treatments and time. The obtained roots showed peroxidase activity and total proteins to be higher in saline medium.

Key words: *Ananas comosus*, *in vitro* culture.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, W. C. A. A revised medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal American Society Horticultural Science**, v.109, p.343-347, 1986.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROETTO, F. **Efeito de estresse salino e biológico sobre o metabolismo de calos e suspensão de células de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Piracicaba, 1995. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CHANG, C. J.; KAO, C. H. H₂O₂ metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkness. **Plant Growth Regulators**, v. 25, p. 11-15, 1998.
- CONVERSO, D. A.; FERNÁNDEZ, M. E.; TOMARO, M. L. Effect of development and salt stress on the activity and expression of wheat peroxidases. **Phyton**, v. 6, p. 147-156, 1997.
- FAO. **Production Crops** Disponível em <:http://www.apps.fao.org>. Acesso em: 05 abr. de 2000.
- GARG, B. K.; KATHJU, S. P.; LAHIRI, A. N. Sensitivity of cluster bean to salt stress at various growth stages. **Indian Journal Plant Physiology**, v. 2, p. 49-53, 1997.
- GRODEN, D.; BECK, E. H₂O₂ destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts. **Biochemistry Biophysics Acta**, v. 546, p. 426-435, 1979.
- KRISHNAMURTHY, R.; BHAGWAT, K. A. Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. **Plant Physiology**, v. 91, p. 500-504, 1989.
- LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses. Vol. II: Water, radiation, salt and other stresses. Academic Press, N. York. 1980, p. 25-211.
- LIMA, G. P. P. **Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas e atividade da peroxidase e redutase de nitrato em calos de arroz (*Oryza sativa* L. cv. IAC 4440)**. Botucatu, 1994. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- LIMA, G. P. P.; BROETTO, F.; BRASIL, O. G. Efeito da salinidade sobre o teor de proteínas e atividades da peroxidase e redutase de nitrato em calos de arroz. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 20, p. 357-363, 1998.
- MARTINEZ, V.; CERDA, A. Nitrate reductase activity in tomato and cucumber leaves as influenced by NaCl and N source. **Journal Plant Nutrition**, v. 12, p. 1335-1350, 1989.
- MEDINA, J. C.; Cultura, In: **Abacaxi**. 2 ed. Campinas: SP, Itai, 1987. p. 1-133.
- MITTAL R.; DUBEY, R. Behavior of peroxidases in rice: changes in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 29, p. 31-40, 1991.
- MURASHIGE, T. S.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PIERIS, B.; SIEGEL, S. M. The relation of electrolyte-induced peroxidase changes in salt-sensitive and salt-tolerance rice varieties to changes in other physiological parameters. In: LOBARZEWSKI, J.; GREPPIN, H.; PENEL, C. et al. (eds.). **Biochemical, molecular, and physiological aspects of Plant Peroxidases**. Université de Genève, 1991, p. 425-432.
- SANCHO, M. A.; FORCHETTI, S.; MILRAD, A. et al. Peroxidase activity and isoenzymes in the culture medium of NaCl adapted tomato suspension cells. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 44, p. 161-167, 1996.
- STROGONOV, B. P. Salt and ion stresses. In: LEVITT, J. (ed.) **Responses of plants to environmental stresses**. V. II. Acad. Press, 1980, p: 365-488.
- ULISSES, C.; ROCHA, P.; ALBUQUERQUE, C. et al. Determinación de prolina en yemas de plátano (*Musa* sp. cv Nanicão-AAA) seleccionadas *in vitro* en cuanto a la tolerancia a la salinidad. In: ENCUESTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 3 1998, La Habana, Cuba. **Anais...** Cuba, 1, p. 334-35.
- VIESTRA, R. D. Protein degradation in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 385-410, 1993.
- ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. Drought stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. **Plant Cell Physiology**, v. 35, p. 785-791, 1994.