

## TOLERÂNCIA À SALINIDADE EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L)

F. BROETTO; G.P.P. LIMA; O.G. BRASIL

Instituto de Biociências-UNESP, C.P. 505, CEP: 18618-000 - Botucatu, SP

**RESUMO:** Uma das aplicações das técnicas da cultura de tecidos no melhoramento é a identificação de linhas de células que apresentam tolerância à salinidade. Vários autores obtiveram linhas de células tolerantes ao estresse salino; e estudo de mecanismos bioquímicos da tolerância a sais em plantas tem demonstrado altas correlações entre estes e o acúmulo de macromoléculas em tecido de plantas superiores. Para verificar essas correlações em feijão (*Phaseolus vulgaris* cv IAC carioca), calos oriundos de eixos embrionários foram cultivados em meio sólido, suplementado com NaCl nas concentrações de 0 a 60 mM. Após 13 dias de incubação, os calos foram coletados e analisados quanto ao crescimento relativo, teor de proteínas, teor de prolina e atividade da peroxidase. Os parâmetros analisados mostraram decréscimo no crescimento relativo e no de proteínas em resposta ao NaCl. Paralelamente, observou-se aumento significativo no conteúdo de prolina e atividade da enzima peroxidase.

**Descritores:** cultura de tecidos, prolina, tolerância salina, peroxidase

### SALT TOLERANCE IN BEAN (*Phaseolus vulgaris*) CELL CULTURE

**ABSTRACT:** One of the applications of the tissue culture technique in plant improvement is the identification of cell lines which show salinity tolerance. Several authors were able to obtain saline stress-tolerant cell lines and show that mechanisms of tolerance to salts have a strong correlation between this phenomenon and a high macromolecule concentration in plant tissues. *Callus* obtained from embryonic axis of *Phaseolus vulgaris* cv. IAC carioca in solid medium, supplemented with 0 to 60 mM NaCl, as the salt treatment, were used. *Callus* harvesting was done on the 13<sup>th</sup> day, when they were processed for relative growth, protein, proline content and peroxidase activity. The results show both, a decrease of the relative growth and of protein content in response to the NaCl treatment, as compared to controls. However, there was a significant increase on the proline content and on the peroxidase activity.

**Key Words:** plant tissue culture, proline content, salt tolerance, peroxidase activity.

### INTRODUÇÃO

Alguns aspectos metabólicos têm sido estudados em plantas superiores, correlacionados com estresse hídrico. Estudos prévios realizados por BARNETT & NAYLOR (1966) indicam que ocorre uma diminuição na velocidade de síntese de proteínas e aminoácidos com baixo potencial água. SMITH & McCOMB (1981), trabalhando com feijão, observaram um decréscimo na taxa de crescimento de calos em resposta ao NaCl após 28 dias de cultivo.

A síntese de proteína ou a sua hidrólise tem sido verificada em muitas espécies de vegetais cultivadas na presença de NaCl (LEVITT, 1980). Em feijão, a síntese de proteína foi inibida em solos salinizados por 72 mM/L com NaCl (NIEMAN, 1965). STEVENS *et al.* (1978) estudaram a atividade da peroxidase como parâ-

tro de seleção, em espécies brássicas, para tolerância ao estresse salino. Neste trabalho, os autores não encontraram uma correlação entre resposta ao crescimento e mudança na atividade da peroxidase. SAHU & MISHRA (1987) relataram mudanças na atividade enzimática durante a senescência de folhas, quando submetidas à estresse salino. Os autores observaram que o NaCl acelerou a atividade da peroxidase, o que estaria relacionado com a regulação da permeabilidade das membranas, formação da parede celular e oxidação de substâncias acumuladas.

### MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. IAC carioca) foram lavadas e desinfectadas em hipoclorito de sódio (1%) e mantidas por 18 h em água destilada para hidratação.

Os eixos embrionários excisados foram inoculados em meio nutritivo MURASHIGE & SKOOG (1962) contendo sais minerais, ácido 2,4 diclorofenoxiacético, ácido naftaleno acético, cinetina, ácido indolacético, sacarose e inositol, conforme descrito por CROCOMO *et al.* (1979). Os frascos foram mantidos em sala de cultura com temperatura de 25° C e 2000 lux de luz em fotoperíodo de 16/8 horas.

Os calos obtidos foram transferidos para meio de cultura acima citado, suplementado com concentrações de 0, 10, 30 e 60 mM de NaCl e mantidos em condições controladas por 13 dias. Após o tempo de incubação indicado, os calos foram colhidos, pesados e macerados em 5 ml de tampão-fosfato pH = 6.7, 0.2 M, seguindo-se uma centrifugação a 10 000 rpm por 10 minutos, para obtenção do extrato bruto.

Para se determinar o teor de proteínas usou-se o método descrito por BRADFORD (1976) e como padrão caseína. A determinação da atividade da peroxidase foi realizada no extrato bruto, segundo adaptação do método de EVANS & ALLDRIDGE (1965). O teor de prolina foi determinado conforme o método proposto por TORELLO & RICE (1986).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se os resultados apresentados na TABELA 1 para o parâmetro massa da matéria fresca, observou-se que houve um decréscimo no crescimento relativo para os tratamentos 30 e 60 mM de NaCl, quando comparados com o tratamento 0.00 mM de NaCl (testemunha). O mesmo foi observado para teor de proteínas principalmente para o tratamento 60 mM NaCl (TABELA 2).

TABELA 1 - Massa de matéria fresca expressa em g (médias) de *P. vulgaris* cultivado *in vitro* na presença de 0, 10, 30 e 60 mM de NaCl.

Tratamentos mM NaCl	Massa de Matéria Fresca (G) %		% (controle)
	Tempo (dias)		
	0	13	
0	0.3549	0.6450	81.74
10		0.6393	80.13
30		0.3866	8.93
60		0.4792	35.02

TABELA 2 - Teor de proteína expressa em mg/g m.F. (médias), após 13 dias de cultivo de *Phaseolus vulgaris* cultivado *in vitro* na presença de 0, 10, 30 e 60 mM de NaCl.

Tratamentos mM NaCl	Teor de Proteína (mg/g m.f.)	% (controle)
0	1.683	100.00
10	1.769	105.10
30	1.386	82.30
60	1.308	77.71

Para o acúmulo de prolina, verificou-se que o teor deste aminoácido atinge um ponto máximo para a concentração de 30 mM de NaCl, decrescendo um pouco para a concentração de 60 mM, quando comparado com o controle (TABELA 3).

TABELA 3 - Teores de prolina expressos em  $\mu\text{mol/g}$  de material fresco de *Phaseolus vulgaris* cultivado *in vitro* na presença de 0, 10, 30 e 60 mM de NaCl.

Tratamentos mM NaCl	Teor de Prolina ( $\mu\text{mol/g m.f.}$ )	% (controle)
0	5.82	100.00
10	10.19	175.10
30	14.32	246.10
60	6.49	111.50

TABELA 4 - Atividade da Peroxidase, expressa em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  consumido/min.mg proteína, de *Paseolus vulgaris* cultivado *in vitro* na presença de 0, 10, 30 e 60 mM de NaCl.

Tratamentos mM NaCl	Peroxidase ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min.}$ mg proteína.)	% (controle)
0	0.038	100.00
10	0.040	105.20
30	0.037	97.30
60	0.046	121.05

A atividade da enzima peroxidase foi incrementada significativamente apenas para a concentração máxima de NaCl utilizada (60 mM), como é mostrado na TABELA 4.

Em função dos resultados obtidos pode-se inferir que, provavelmente, a exposição direta dos calos a concentrações crescentes de NaCl tenha afetado a absorção de nutrientes orgânicos e inorgânicos, vitaminas e hormônios do meio de cultura. Como consequência, as células iniciaram um processo de degradação de proteínas por hidrólise e, desta forma, um acúmulo de prolina no suco celular (aminoácidos livres). A variação destes compostos influenciou diretamente na taxa de crescimento dos calos, bem como, o acréscimo na atividade da enzima peroxidase pode ter sido causado pela desorganização da permeabilidade das membranas e oxidação de metabólitos acumulados, em resposta ao NaCl.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNETT, N.M.; NAYLOR, A.W. Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiology*, Rockville, v.41, p.1222-1230, 19686.
- 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*, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.
- CROCOMO, O.J.; GALO, L.A.; TONIN, G.S.; SACCHI, N. Developmental control of *Phaseolus vulgaris* using embryo axis culture. *Energia Nuclear na Agricultura*, Piracicaba, v.1, n.1, p.55-58, 1979.
- EVANS, J.J.; ALLDRIDGE, N.A. The distribution of peroxidase in extreme Dwarf and normal tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Phytochemistry*, Oxford, v.4, p.459-503, 1965.
- LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses. 2.ed. New York: Academic Press, 1980. v.2.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, Munksgaard, v.15, p.473-493, 1962.
- NIEMAN, R.H. Expansion of bean leaves and its suppression by salinity. *Plant Physiology*, Rockville, v.40, p.156-161, 1965.
- SAHU, A.C.; MISHRA, D. Changes in some enzyme activities during excised rice leaf senescence under NaCl stress. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, New York, v.182, p.501-505, 1987.
- SMITH, M.K.; McCOMB, J.A. Effect of NaCl on the growth of whole plants and their corresponding callus cultures. *Australian Journal of Plant Physiology*, East Melbourne, v.8, n.3, p.267-275, 1981.
- STEVENS, H.C.; CALVAN, M.; LEE, K.; SIEGEL, S.M. Peroxidase activity as a parameter for salt stress in Brassica species. *Phytochemistry*, Oxford, v.17, p.1521-1522, 1978.
- TORRELO, W.A.; RICE, L.A. Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive and tolerant turfgrasses. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.93, n.2, p.241-247, 1986.

---

Entregue para publicação em 21.06.94  
Aceito para publicação em 26.08.94