

EFEITO DE FATORES AMBIENTAIS NA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA NO FEJJOEIRO¹

Itamar Pereira de Oliveira², Michael Djie Thung³,
José Renato de Freitas⁴ e Renato Sérgio Mota dos Santos⁴

ABSTRACT

Effects of Environmental Factors on the Activity of Acid Phosphatase in Common Bean

Plants with 15 days after the germination were picked in field experiments with the purpose of knowing the best pH, temperature and the necessary time to express the activity of the acid phosphatase in three bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.), Carioca, EMP-84 and CNF-10, in the presence and in the phosphorus absence. The largest values of activity of the acid phosphatase were observed when the plants were tested in pH 5,5 solution during 120 minutes at the temperature of 30°C. The use of buffer substances as PNPP + Triton X-100 expressed better the activity of the acid phosphatase. The vacuum condition constituted a positive factor to express the activity of the acid phosphatase. The plants developed under drought stress presented smaller activity of the acid phosphatase. The top leaf/root ratio of activity of the acid phosphatase got 5,72 for the Carioca, 4,91 for EMP-84 and 4,36 for CNF-10 variety. The plants when developed under drought stresses condition presented smaller values of activity of the acid phosphatase.

KEY WORDS: pH, temperature, buffered solution, time of reaction, *Phaseolus vulgaris*.

RESUMO

Plantas com 15 dias após a germinação foram colhidas em experimentos de campo com a finalidade de conhecer o pH, temperatura e tempo necessários para melhor expressar a atividade da fosfatase ácida em três variedades do feijoeiro

1 - Entregue para publicação em novembro de 1998. Trabalho realizado em colaboração entre Embrapa Arroz e Feijão e Centro Internacional de Agricultura Tropical.

2 - Embrapa Arroz e Feijão. C.P. 179 - CEP. 75375-000 - Goiânia - GO.

3 - Centro Internacional de Agricultura Tropical.

4 - Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás.

(*Phaseolus vulgaris* L.), Carioca, EMP-84 e CNF-10, na presença e na ausência de fósforo. Os maiores valores de atividade da fosfatase ácida foram observadas quando as plantas foram colocadas em solução em pH 5,5 durante 120 minutos à temperatura de 30°C. A utilização de substâncias tamponantes como PNPP + Triton X-100 expressaram melhor a atividade da fosfatase ácida. As condições de vácuo constituíram um fator positivo para a atividade da fosfatase ácida. As plantas desenvolvidas sob estresse hídrico apresentaram menor atividade da fosfatase ácida. A relação folha-raiz da atividade da fosfatase ácida atingiu 5,72 para a variedade Carioca, 4,91 para a variedade EMP-84 e 4,36 para a variedade CNF-10.

PALAVRAS-CHAVE: pH, temperatura, solução tamponada, tempo de reação, *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

A fosfatase ácida é uma enzima encontrada nos reinos vegetal (Martin & Byers 1976, Mac Donald & Lewis 1978, Woolhouse 1968) e animal (Casida 1959, Hollander 1971), com perspectiva de ser usada como índice de deficiência de fósforo em testes de avaliação do estado nutricional da cultura do feijoeiro (Besford 1976). Pode ainda ser usada nos testes de eficiência das cultivares ao uso do fósforo inorgânico (Hereda *et al.* 1963, Nye 1967) em ambientes ácidos, ricos em alumínio e manganês e tolerantes à falta de água em clima árido. Mesmo sendo uma enzima constitutiva, pode ser induzida por fatores externos como baixas concentrações de fosfato inorgânico, temperatura e pH.

Considera-se, pelo fato de a planta absorver do solo apenas formas inorgânicas de fosfato, que ela pode ser um agente transportador destes compostos ou hidrolisador dos seus ésteres, convertendo formas não disponíveis em acessíveis. A habilidade da planta em retirar fósforo, em condições de baixo teor desse nutriente, tem sido associada à sua capacidade em acidificar a região da raiz com aumento simultâneo da atividade da fosfatase ácida no tecido (MacLachlan 1980). As fosfatases, por serem termolábeis, podem variar suas atividades de acordo com as características regionais de clima. Podem ser inativadas pelo calor, ou seja, terem suas configurações alteradas para formas de baixa atividade. Com o aumento da temperatura, tem-se aumentada a velocidade da reação ou a inativação da enzima (Portes 1988, Lineweaver & Burk 1934).

Em geral, as enzimas apresentam-se em estado coloidal no interior da célula. De acordo com Michaelis e Menten, discutidos por Lineweaver & Burk (1934), elas atuam em reações sob as leis da ação das massas $v = V[S]/K_m + [S]$, onde v = velocidade de reação enzimática, V = velocidade máxima, $[S]$ = substrato em moles por litro e K_m = constante de Michaelis. As implicações no comportamento da cultura, em relação às suas necessidades, exigem estudos de fisiologia e bioquímica para melhores

conhecimentos da dinâmica do uso de produtos químicos no desenvolvimento das plantas.

Na prática, a idade da planta, a concentração e a característica da enzima, o tipo de planta, a temperatura ambiente, a acidez ou a alcalinidade e a presença de inibidores influem sobre a atividade enzimática. A velocidade das reações associada à enzima pode ser diminuída quando os testes envolvem altas concentrações de substrato, tecido rico em fósforo, ou quando a enzima encontra-se em concentrações reduzidas, em consequência da diluição do complexo enzima-substrato.

As enzimas apresentam atividades máximas em diferentes níveis de pH; por serem polivalentes, isto é, por possuírem cargas variáveis dos íons de hidrogênio e oxidrilas, apresentam variações no estado de ionização da proteína. Altas concentrações de hidrogênio funcionam como inibidores da sua atividade.

A utilização dos insumos agrícolas envolve a planta em muitas variações no ambiente, onde a planta pode ser auxiliada ou prejudicada em função dos produtos utilizados. Considerando as expressões econômica e social da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) o fato de ser cultivada de norte a sul do país, em terras que já receberam diferentes fontes e quantidades de corretivos e fertilizantes, pesquisas nos campos de fisiologia e bioquímica devem ser desenvolvidas para maiores conhecimentos dos processos que determinam a adaptação das novas cultivares às variações de clima e solo.

O objetivo desta pesquisa foi o de verificar o comportamento da fosfatase ácida em raízes intactas do feijoeiro desenvolvidas em condições ambientais simuladas que podem afetar as atividades da enzima como pH, temperatura e tempo de reação.

MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos utilizando sementes das variedades Carioca, considerada como eficiente e responsiva ao fósforo, EMP-84 e CNF-10 tidas como ineficientes e responsivas após serem imersas em álcool 96% GL durante três minutos e em solução de hipoclorito de cálcio $100\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ por cinco minutos. Assim tratadas, as sementes foram lavadas com água desmineralizada até que nenhum cheiro de hipoclorito fosse observado e semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita.

A vermiculita foi lavada em água corrente e esterilizada a 120°C durante duas horas. Todas as soluções utilizadas nos testes foram também submetidas a esta mesma temperatura sob pressão de uma atmosfera.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação por um período de 14 dias, irrigadas com solução nutritiva de Hoagland n° 2, esterilizada na presença (+P) e na ausência de fósforo (-P). Utilizaram-se, no tratamento sem fósforo (-P), os mesmos reagentes do tratamento completo, exceto o K_2HPO_4 .

Os testes de fosfatase ácida foram realizados de acordo com o método colorimétrico de Bessey *et al* (1946), adaptado por McLachlan (1980). O sistema radicular foi lavado em água corrente com sabão neutro e com água destilada para, em seguida, ser colocado em tubos de vidro, com 10 ml da solução tampão de ácido acético e acetato de sódio, ambos a 0,2 M, contendo 5 mg de PNPP (paranitrofenol fosfato), detergente neutro Triton X-100 1 g kg^{-1} e o etanol absoluto 10 g kg^{-1} em pH 5,5. Os tubos contendo as raízes e as soluções foram fechados com rolhas de borracha e submetidos a vácuo com pressão negativa de 0,066 MPa até que as bolhas fossem retiradas das soluções.

Esses tubos foram incubados por 30, 60 e 120 minutos em pH corrigidos para 4,5, 5,5 e 6,5. A reação foi mantida nas temperaturas de 20 e 30°C em banho-maria com três repetições (Freitas 1985). Após a incubação, tomaram-se 5 ml das soluções dos tubos que foram tituladas até o pH 11 com Na(OH) 0,2 M, sendo posteriormente completados os volumes para 50 ml com água destilada. Através do fosfato formado da hidrólise do fosfato de paranitrofenol (PNPP) em paranitrofenol (PNP) + fosfato, sob a ação da fosfatase ácida, determinou-se a densidade ótica. A leitura da densidade ótica foi realizada pelo processo colorimétrico em filtro azul de 410 nm. A atividade da fosfatase ácida foi expressa em termos de densidade ótica por miligrama de raiz seca.

As raízes foram retiradas da solução e secas em estufa ventilada à temperatura de 60°C, sendo posteriormente pesadas. Para conhecer o efeito do vácuo e da substância tamponante na reação da fosfatase ácida, raízes da variedade Carioca foram retiradas, lavadas e secas ao ar com papel-toalha e incubadas em 10ml de solução tampão de diferentes tratamentos. A) - tampão PNPP+Triton X-100+etanol; B) - tampão PNPP+Triton X-100+etanol sob vácuo; C) - somente tampão PNPP e D) - tampão PNPP sob vácuo.

A relação folha-raiz da atividade da fosfatase ácida foi obtida em três variedades, CNF-10, EMP-84 e Carioca, cultivadas a campo, em um latossolo vermelho-escuro. A análise da parte aérea foi feita em discos retirados das folhas com 9 mm de diâmetro em amostras incubadas pelo mesmo processo utilizado para as raízes.

Neste mesmo solo foi realizado um experimento com a finalidade de conhecer o efeito da deficiência hídrica sobre a atividade da fosfatase ácida com as variedades CNF-013, BAT 005, BAT-070, BAT-258, CNF-126, CNF-127, Moruna, BAT-447, Carioca e Aroana-80, em condições naturais e em déficit hídrico de 0,035 MPa a 15cm de profundidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram que o tempo de reação é o parâmetro mais importante para a fosfatase ácida apresentar sua maior atividade no feijoeiro (Figuras

1, 2 e 3). O feijoeiro aos 15 dias de idade encontra-se no seu ponto máximo de atividade de crescimento, apresentando condições favoráveis para formar tecidos, com teor de fósforo dentro da faixa desejável de nutrição na raiz que varia entre 1 e 2,6 g kg⁻¹ (Oliveira & Thung 1988). Se se considerarem os valores mais baixos de pH, 4,5 e 5,5, conforme foi estipulado pelo teste básico (Breseghelo 1987), os resultados obtidos à temperatura de 30°C apresentaram as mais altas atividades. Esses resultados concordam com Portes (1988), sobre o comportamento do feijoeiro, em que relata que as melhores temperaturas para essa cultura são as de 29,5°C diurna e 21,0°C noturna.

Extrapolando esses resultados para as condições de solos onde a cultura se desenvolve, o pH abaixo de 5,5 representa uma faixa onde o alumínio, o ferro e o manganês encontram-se mais disponíveis (Malavolta 1967), ao mesmo tempo, o fósforo encontra-se em menor disponibilidade para as plantas. Os maiores valores da atividade nesta faixa de acidez está de acordo com o princípio de que a fosfatase ácida é uma enzima induzida. Resultados de pesquisas realizadas por Breseghelo (1987) com o feijoeiro mostraram que, em pH 5,5, ocorreram aumentos nas concentrações de alumínio, ferro e manganês no tecido, reduções nas concentrações de fósforo, observando-se os maiores valores da atividade da fosfatase ácida. Na faixa de pH acima de 5,5 até 6,5, todos os nutrientes encontram-se em melhor disponibilidade (Malavolta 1967) para as plantas e a enzima deixa de ser induzida pela carência de fósforo mas pelos nutrientes disponíveis do meio que se encontram nas suas maiores concentrações.

O que diferencia as variedades é a eficiência de cada uma delas em relação ao uso de fósforo. A cultivar Carioca (Figura 1), eficiente e responsiva ao fósforo, atingiu valores de atividade da fosfatase 25 mg kg⁻¹ em 60 minutos muito antes que as variedades CNF-10 e EMPA 84 (Figuras 2 e 3) consideradas ineficientes e responsivas. Os resultados semelhantes obtidos com as variedades Carioca, CNF-10, EMP-84, a 120 minutos, revelam que o tempo limite para o teste da atividade da fosfatase ácida é de 60 minutos, discriminando melhor as variedades quanto à deficiência em fósforo ou à eficiência no seu uso.

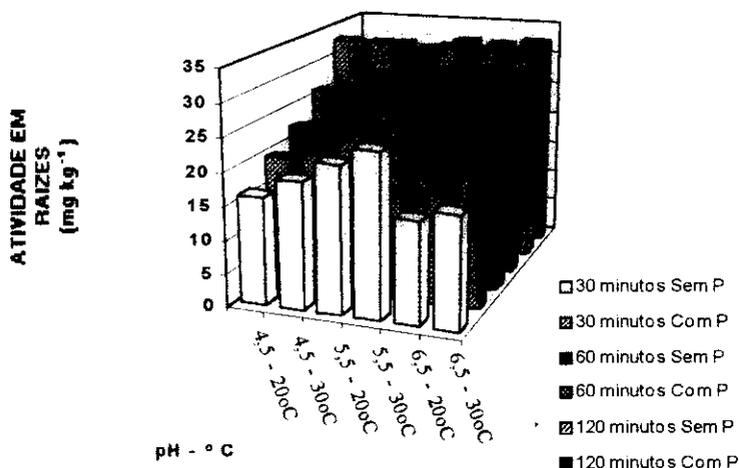


Figura 1. Efeito do pH, temperatura, tempo de incubação e do fósforo na atividade da fosfatase ácida em raízes do feijoeiro var. Carioca.

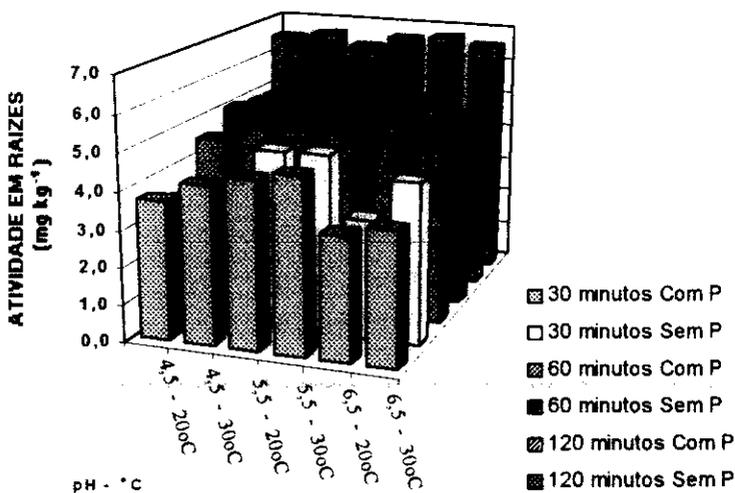


Figura 2. Efeito do pH, temperatura, tempo de incubação e do fósforo na atividade da fosfatase ácida em raízes do feijoeiro, var. CNF-10.

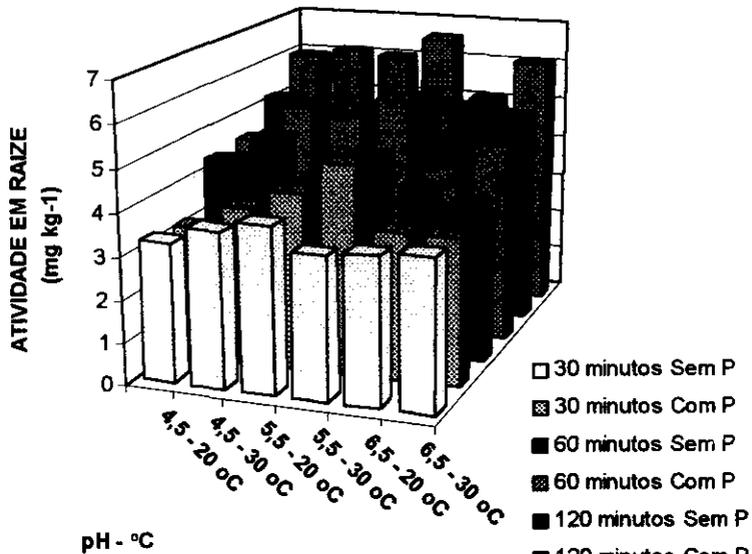


Figura 3. Efeito do pH, temperatura, tempo de incubação e do fósforo na atividade da fosfatase ácida em raízes do feijoeiro, var. EMP-84.

A atividade da fosfatase ácida foi melhor expressa quando se usou o detergente neutro Triton X-100 (1g.kg^{-1}) + etanol absoluto (10g.kg^{-1}) sob vácuo (Figura 4). As amostras ao serem submetidas a vácuo tiveram o oxigênio retirado, o que, conseqüentemente, favoreceu uma maior penetrabilidade dos reagentes na amostra. O etanol pode também ter evitado a oxidação de algum composto orgânico, essencial para a reação, no estado reduzido ou vice-versa (Leopold & Kriedemann 1975). O tratamento referente à adição de PNPP, sob vácuo, constituiu o segundo melhor tratamento, porém correspondente a 50% do valor observado no melhor tratamento.

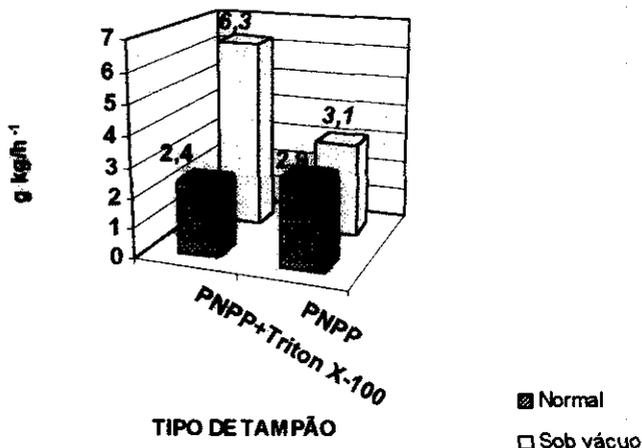


Figura 4. Efeito dos tampões na expressão da atividade da fosfatase ácida.

Em outra pesquisa realizada com a finalidade de verificar se há alguma relação entre a atividade da fosfatase ácida determinada da parte aérea e a das raízes do feijoeiro das variedades Carioca, EMP-84 e CNF-10, a variedade Carioca apresenta a mais baixa atividade tanto na parte aérea como nas raízes (Figura 5). Estes resultados são esperados uma vez que esta cultivar é tida como eficiente e responsiva a adições de fósforo no meio de crescimento. Foi verificada uma relação folhas-raízes de 5,72 nesta variedade. A variedade CNF-10 situa-se como intermediária, em valores absolutos, apresentando valores superiores aos da variedade Carioca. Sua relação folhas-raízes é de 4,37. A cultivar EMP-84 é a que apresenta os maiores valores da atividade ácida, com uma relação folhas-raízes de 4,92. Estes resultados comprovam os testes de eficiência ao uso de fósforo. As cultivares EMP-84 e CNF-10, consideradas ineficientes e responsivas à adição de fósforo, ao apresentarem maiores atividades da fosfatase ácida, mostraram utilizar esta enzima para compensar suas necessidades em relação a este nutriente.

Com uma maior disponibilidade de água no solo, aumentou-se também a atividade da fosfatase ácida nas folhas do feijoeiro em todas as variedades (Figura 6). Sob condições de déficit hídrico (0,035 MPa), três variedades demonstraram ser altamente eficientes na absorção de fósforo, Moruna, Carioca e BAT-085, apresentando os mais baixos índices de atividade da fosfatase, como preconiza McLachlan (1980) e Thung (1998). Estes valores já eram esperados uma vez que estas variedades sempre são as que se comportam melhor nas condições adversas de campo, sendo, portanto,

BAT-070, CNF 126 e Aroana-80 apresentaram atividades maiores, indicando assim uma baixa eficiência de absorção de fósforo. As demais variedades cultivadas situam-se numa faixa intermediária.

Em condições normais de cultivo de feijão, ou seja fornecendo água de acordo com as necessidades da planta, observou-se ainda a cultivar Carioca como uma das mais eficientes. Neste caso, houve uma inversão de cultivares, sendo a BAT-258 a mais eficiente em condições favoráveis de umidade. Por outro lado, a cultivar BAT-70 continuou mostrando ineficiência na utilização de fósforo nas condições de déficit hídrico. Também mostraram ineficiência nas condições normais de cultivo, as cultivares BAT-070, CNF-126 e Aroana-80. Os estudos realizados com resistência protoplasmática têm revelado que as cultivares resistentes a secas apresentam membranas mais resistentes e não solubilizam grandes quantidades de enzima (Iljin 1957).

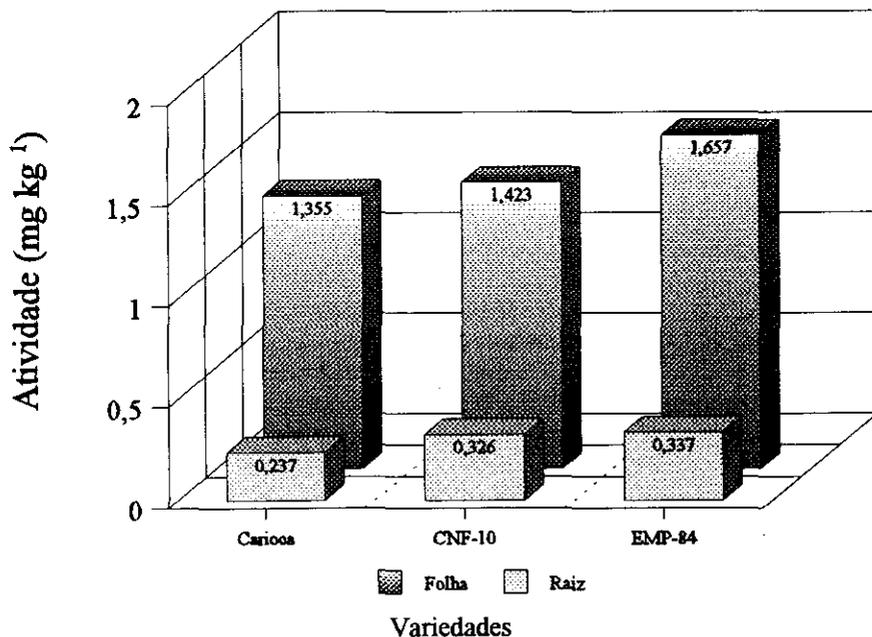


Figura 5. Concentrações da fosfatase ácida nas raízes e folhas de três cultivares do feijoeiro.

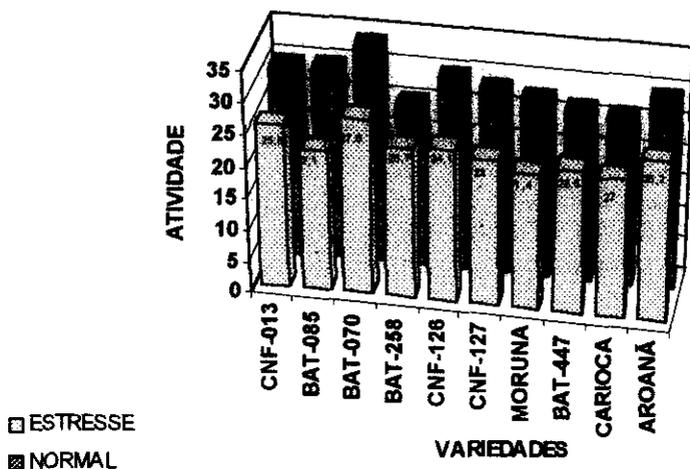


Figura 6. Efeito do estresse hídrico na atividade da fosfatase ácida na folha de dez cultivares do feijoeiro.

CONCLUSÕES

Os maiores valores de atividade da fosfatase ácida verificaram-se quando as amostras foram submetidas ao teste por um intervalo de incubação de 120 minutos. Em pH entre 4,5 e 5,5, os maiores valores foram obtidos no tempo de 60 minutos de incubação à temperatura de 30°C. Maiores atividades da fosfatase ácida foram verificadas quando se utilizaram substâncias tamponantes, como o PNPP + Triton X-100. O vácuo constituiu um fator positivo para a atividade da fosfatase ácida. As relações parte aérea-raízes de atividade da fosfatase ácida foram de 5,72 para a variedade Carioca, 4,91 para a variedade EMP-84 e 4,36 para a variedade CNF-10. As plantas, quando desenvolvidas sem estresses hídricos, apresentaram maiores valores de atividade da fosfatase ácida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Appiah, M. R. 1975. Organic phosphorus and phosphatase activity in cocoa soils in Ghana. *J. Agr. Sci. Accra*, 8 : 45-0.

- Besford, R. T.** 1976. Effect of phosphorus supply on acid phosphatase activity in the leaves of tomato plants. *Scientific Horticulturae*, 9 (4) : 303-9.
- Bessey, O. A., O. H. Lowrie, & M. J. Brock,** 1946. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with 5 ml of serum. *J. Biol. Chem.* 164 : 321-9.
- Breseghelo, M. L.** 1987. Respostas diferenciais de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) ao teste da fosfatase ácida. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 45 p.
- Casida, L. E. Jr.** 1959. Phosphatase activity of some common soil fungi. *Soil Sci.* 87 : 305-10.
- Freitas, J. R.** 1985. Atividade da enzima fosfatase ácida em folhas e raízes de feijoeiro *Phaseolus vulgaris*. s.n.t. 16 p. [não publicado].
- Hereda, C. F., F. Yen. & Y. Sols.** 1963. Role and formation of the acid phosphatase in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10 : 34.
- Holander, V. P.** 1971. Acid phosphatase, p. 498-9. In *The enzymes*. Vol. IV, P. D. Boyer, Ed., New York, Academic Press.
- Ijij, W. S.** 1957. Drought resistance in plants and physiological processes. *An. Ver. Plant Physiol*, 8 : 257-74.
- Leopold, A. C. & P. E. Kriedmann,** 1975. Plant growth and development. São Paulo, McGraw-Hill Book Company. 545 p.
- Lineweaver, H. & D. Burk,** 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (3) : 658-6.
- Malavolta, E.** 1967. Manual de química agrícola; adubos e adubação. São Paulo, Ed. Ceres. 606 p.
- Martin, S. M. & T. J. Byers.** 1976. Acid hydrolase activity during growth and encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Protazool*, 23 : 608-13.
- Matile, P.** 1965. Lissosomes of root tip cells in corn seedlings. *Planta*, 79 : 181-96.
- Mclachlan, K. D.** 1980. Acid phosphatase activity of intact of intact roots and phosphorus nutrition in plants. II Variations among wheat roots. *Aust. J. Agric. Res.*, 31 : 441 - 8.
- Mclachlan, K. D.** 1984. Effects of drought, aging and phosphorus status on leaf acid phosphatase activity in wheat *Aust. J. Agric. Res.*, 35(6) : 777-87.
- Mcalachlan, K. D.** 1976. Comparative phosphorus responses in plants to a range of available phosphorus situation. *Aust. J. Agric. Res.*, 27 : 232-41.
- Macdonald, R. M. & M. Lewis.** 1978. The occurrence of some acid phosphatase and dehydrogenases in the vesicula-arbuscular mycorrhizal al fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol*, 80 : (1) : 135-1.
- Moraes, J. F. V. & N. A. Rabelo.** 1986. Um método simples para a digestão de amostras de plantas. Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, GO. 12p. Documentos.

- Nye, J.F. 1967.** A repressible acid phosphatase from neurospora. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 : 138.
- Oliveira, I. P. & M. D. J. Thung. 1988.** Nutrição mineral, p.175-212. In M. J. O. Zimmermann, M. Rocha, T. Yamada. *Cultura do feijoeiro, fatores que afetam a produtividade.* Potafos. Piracicaba, SP. 598 p.
- Portes, T. A. 1988.** Ecofisiologia, p. 125-156. In M. J. O. Zimmermann, M. Rocha, T. Yamada. *Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade.* Potafós, Piracicaba, SP. 598 p.
- Tarafard, J. C., A. B. Roy. & D. Mandalak. 1981.** Enzime status of some jute-growing soils of west Bengal. *Aust.J.of Soil.Res.*, 2 : 181-4.
- Thung, M. D., 1985.** Teste enzimático da fosfatase ácida. Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, GO. Relatório Técnico. 15p.
- Thung, D. J. 1988.** Resultados obtidos nos testes de fosfatase ácida com o feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. no Brasil. Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, GO. Relatório Técnico. 62 p.
- Woolhuse, H. W. 1968.** Differences in the properties of the acid phosphatases of plant roots and their significance in the evolution of edaphic ecotypes, p. 357-80. In I. M. Rorison (Ed). *Ecological aspects of the mineral nutrition of plants.* Symposium of the British Ecological Society. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 575 p.