

Enzimas do Metabolismo de Fenólicos em Raízes de Milho Sob Toxidez de Alumínio

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

SOUZA, J.B.¹, QUEIROZ, C.G.S.², SOUZA, I.R.P.³, ALVES, V.M.C.³, PARENTONI, S.N.³, SCHAFFERT, R. E.³

¹Mestranda em Biologia Vegetal na UFMG/Bolsista CAPES; ² Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte/MG. ³Embrapa Milho e Sorgo, CP. 151, 35701-970, Sete Lagoas/MG; E-mail: julianabio@aol.com
Projeto parcialmente financiado pela Comissão Européia ICA4-CT-2000-30017

Palavras-chaves: Fenilalanina amonialiase, Polifenol oxidase, Guaiacol peroxidase, Estresse oxidativo, *Zea mays*

Introdução

A toxidez do alumínio (Al) tem sido abordada recentemente como um tipo de estresse oxidativo, resultante do aumento de espécies reativas de oxigênio, que podem causar danos a membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos (Smirnov, 1993). A tolerância ao estresse oxidativo pode consistir na capacidade de limitar a produção de radicais livres de oxigênio, sob condição de estresse e/ou ativar mecanismos de detoxificação destes radicais. Dentre esses mecanismos, o sistema antioxidante envolvendo compostos fenólicos pode ser ativado em resposta a diversos fatores de estresse abiótico, como por exemplo estresse hídrico e por Al (Jones, 1984; Yamamoto et al., 1998). A ativação desse sistema envolvendo fenólicos tem como enzima chave a fenilalanina amonialiase (PAL). Esta enzima é responsável por um dos passos iniciais da biossíntese de importantes substâncias, como por exemplo, flavonóides (Jones, 1984; Harborne, 1994), os quais podem acumular em células deficientes em fósforo, durante a exposição ao Al e ao Fe (II), tendo papel de proteção contra a lipoperoxidação (Yamamoto et al., 1998). O acúmulo de substâncias de natureza fenólica em plantas submetidas ao estresse parece ser consequência do aumento da atividade da PAL, o que resulta geralmente em aumento na atividade de outras enzimas como, por exemplo, polifenol oxidase (PPO) e peroxidases (Gaspar et al., 1985). Guaiacol peroxidase (POD), na presença de substâncias fenólicas e ascorbato em membranas celulares podem agir na detoxificação de H₂O₂ na interface parede celular / plasmalema e contribuir para a proteção da bicamada fosfolipídica da lipoperoxidação provocada pelos radicais •OH, que são fortes oxidantes causadores de danos à semipermeabilidade das membranas (Vianello et al., 1997).

Este trabalho objetivou verificar se a maior tolerância das linhagens de milho Cateto e L3 pode estar associada à capacidade de detoxificar radicais livres de oxigênio por meio de vias metabólicas que utilizam compostos fenólicos.

Material e métodos

Três linhagens de milho provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG, previamente caracterizadas quanto à tolerância ao Al foram estudadas. A linhagem Cateto tem se mostrado mais tolerante a toxidez de

Al em relação a L3, enquanto que a linhagem L53 apresenta sensibilidade a este metal, com conseqüente diminuição do crescimento da raiz seminal (Alves et al., 2001).

As sementes foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 5%, por 15min, lavadas com água destilada e colocadas para germinar em papel de filtro umedecido, em câmara de crescimento com temperatura diurna de 27° C e noturna de 20° C, luminosidade de 540 μ molm⁻².s⁻¹, umidade relativa de 70 % e fotoperíodo de 12h. Após três dias as plântulas foram selecionadas e transplantadas para bandejas contendo solução nutritiva completa (Magnavaca, 1982), pH 4,5, arejada constantemente, permanecendo por 24 horas. A seguir as plântulas de cada linhagem foram expostas à mesma solução nutritiva, na ausência e na presença de Al (AlK(SO₄)₂) na atividade de 39 μ M, durante os períodos de 30 min, 6 h, 24 h e 48 h. Ao final de cada intervalo de tempo foi coletado o primeiro centímetro do ápice da raiz seminal de cada plântula. Os seguimentos foram lavados em água destilada, acondicionados em papel alumínio, imersos em nitrogênio líquido e armazenados a -80° C, para posteriores análises enzimáticas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições. O delineamento dos tratamentos foi composto por um fatorial de 3 (linhagens) x 2 (doses de Al) x 4 (períodos de exposição ao Al).

A atividade da guaiacol peroxidase (EC 1.11.1.7) foi determinada pelo método de Souza e MacAdam (1998), acompanhando-se a formação do tetraguaiacol a 28° C através do acréscimo na absorbância à 470 nm. A atividade da polifenol oxidase (EC 1.10.3.1) foi determinada de acordo com Kar e Mishra (1976) e a absorbância da purpurogalina formada foi lida a 420 nm. A atividade da fenilalanina amonialiase (PAL) (EC 4.3.1.5) foi determinada de acordo com o método descrito por Peixoto et al. (1999). A reação foi acompanhada medindo-se a absorbância a 290 nm, correspondente à formação do ácido transcinâmico. A concentração protéica do extrato enzimático foi determinada pelo método de Bradford (1976), protocolo BIORAD (Hercules, CA, USA) para leitura em placa de Elisa, usando albumina bovina (BSA) como padrão.

Resultados e discussão

Após 30min de exposição ao Al ocorreu inibição da atividade da fenilalanina amonialiase (PAL) na linhagem mais tolerante Cateto. Após 48h, Cateto e L53 apresentavam significativamente maior atividade desta enzima, que o controle (Figura 1).

A linhagem Cateto, mesmo na ausência do Al na solução nutritiva apresentou níveis significativamente maiores da atividade da polifenol oxidase (PPO), no período de 6h. Nos períodos de 24h e 48h esta linhagem continuou a apresentar maior atividade desta enzima em relação às outras linhagens, na presença de Al. A linhagem sensível, após 6h de exposição ao Al apresentou elevação contínua da atividade da PPO em relação ao seu controle, e no período de 48h, L3 teve aumento significativo na atividade da PPO (Figura 2).

Em relação a atividade da guaiacol peroxidase (POD), a linhagem Cateto, quando exposta ao Al, apresentou menores valores nos três primeiros períodos de exposição e maior no último período, quando comparada ao controle (Figura 3). Ao final do período de 48h o Al induziu, nas três linhagens, aumentos significativos desta enzima, sendo este aumento muito mais acentuado na linhagem sensível L53.

Observou-se aumento da atividade das enzimas PAL, PPO e POD 6 horas após o início dos tratamentos, tanto na ausência quanto na presença de Al, principalmente na

linhagem Cateto. É relevante destacar que as coletas destas amostras correspondem a nove horas após o início do fotoperíodo, enquanto que as demais coletas foram feitas após três horas de luz. Estes dados sugerem que o horário da coleta interferiu nos resultados, levando a um estímulo para a atividade destas enzimas antioxidantes na raiz nove horas após o início do fotoperíodo. Estudos realizados em folhas mostraram a ocorrência de um ritmo diurno na concentração de m-RNA para a enzima ascorbato peroxidase (Kubo *et al.* 1995). No entanto, não há informações na literatura sobre as ocorrências de ritmo diurno na atividade de enzimas antioxidantes em raiz, o que seria essencial para o entendimento da dinâmica do metabolismo oxidativo na planta.

Os resultados sugerem que, embora a indução da produção de substâncias fenólicas, avaliada pela atividade da PAL, tenha mostrado semelhança entre as três linhagens, a capacidade de utilizar estas substâncias como capturadoras de peróxidos foi muito mais acentuada na linhagem sensível. As linhagens tolerantes possivelmente apresentam menor produção de peróxidos e/ou possuem mecanismos de remoção destes radicais livres mais eficientes que a linhagem sensível.

Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Peixoto *et al.* (1999), em plantas de sorgo submetidas a estresse por Al, quando a toxidez de Al levou a grande aumento na atividade da POD e inibição da atividade da PAL no material sensível. No entanto, estes autores encontraram uma grande atividade da PPO no material sensível, quando submetido ao Al, diferenciando assim, neste aspecto, dos resultados obtidos neste trabalho, com milho.

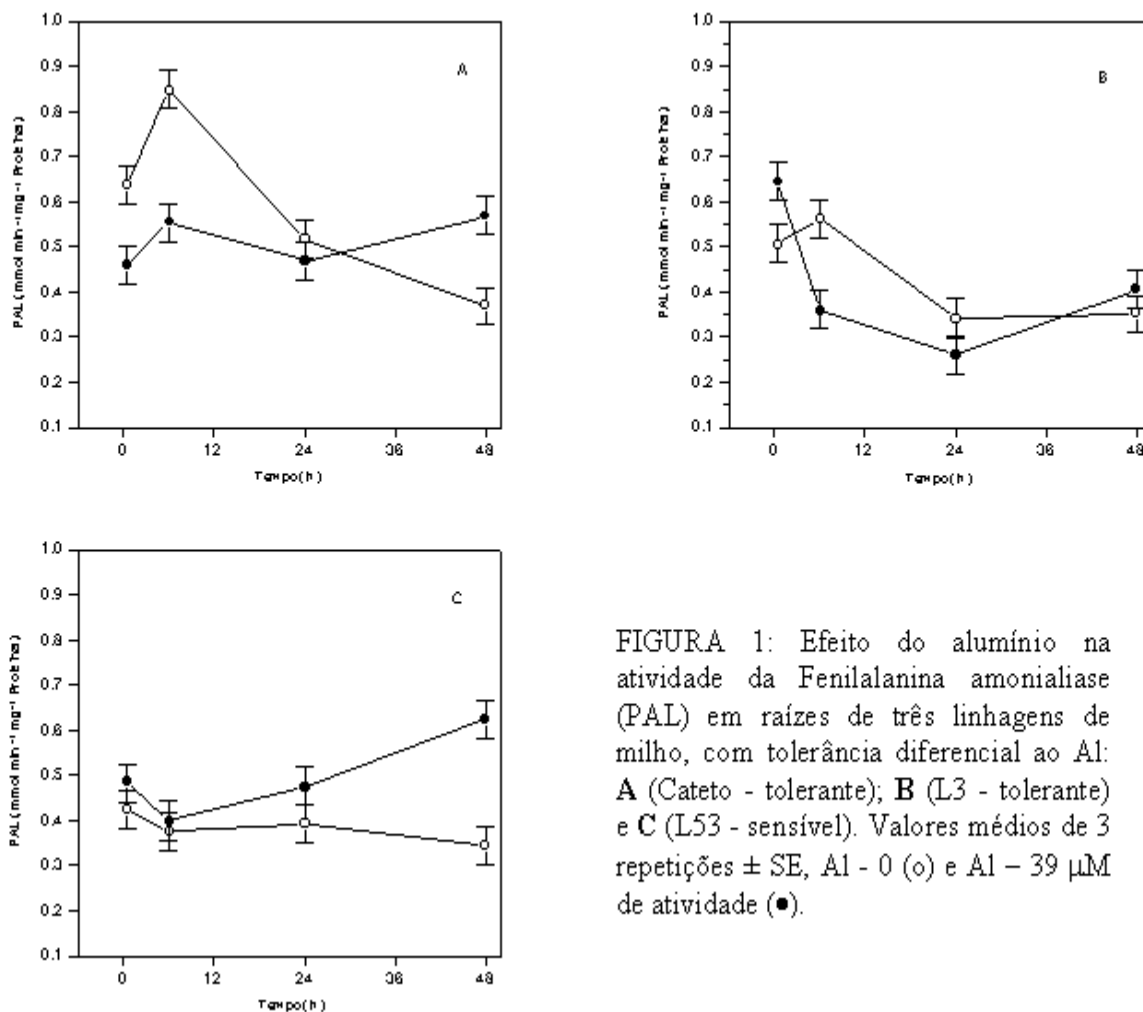
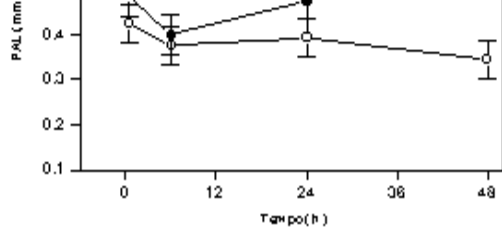


FIGURA 1: Efeito do alumínio na atividade da Fenilalanina amonialiase (PAL) em raízes de três linhagens de milho, com tolerância diferencial ao Al: **A** (Cateto - tolerante); **B** (L3 - tolerante) e **C** (L53 - sensível). Valores médios de 3 repetições \pm SE, Al - 0 (o) e Al - 39 μM de atividade (●).



A (Cateto - tolerante), B (L3 - tolerante) e C (L53 - sensível). Valores médios de 3 repetições ± SE, Al - 0 (o) e Al - 39 μM de atividade (●).

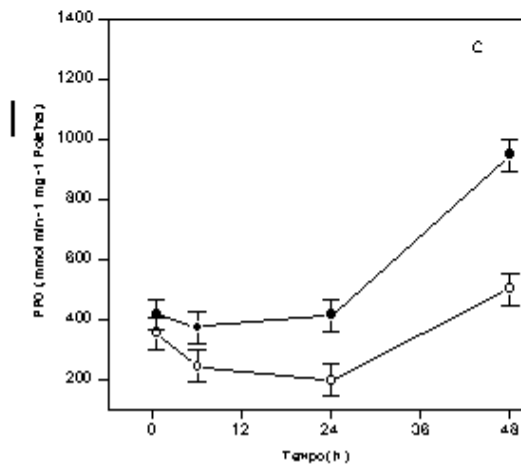
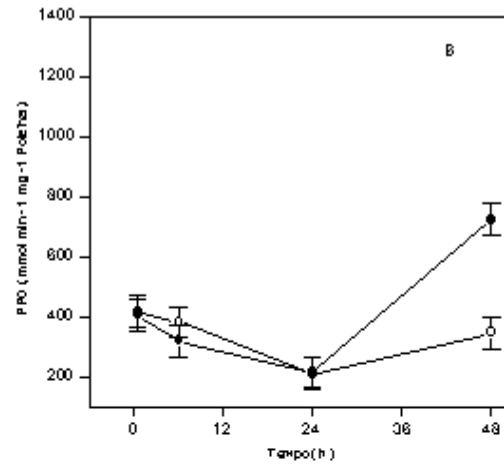
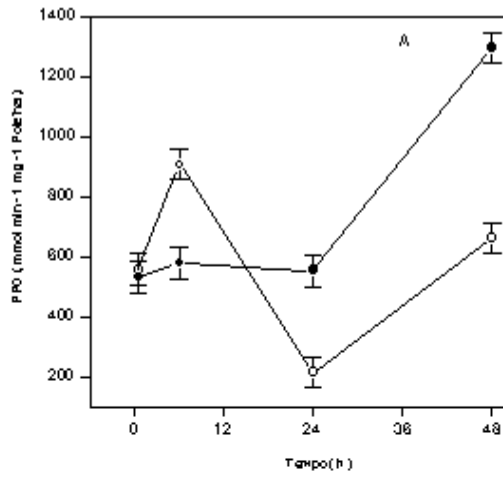
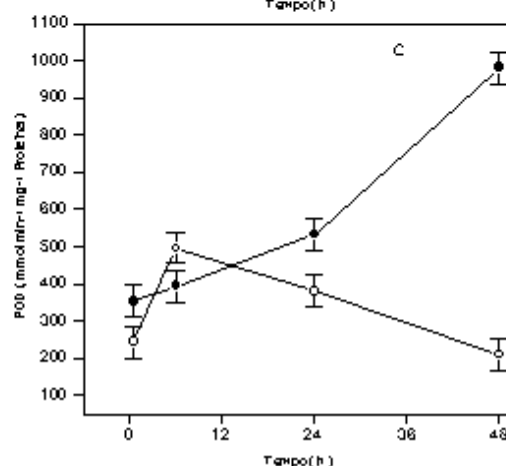
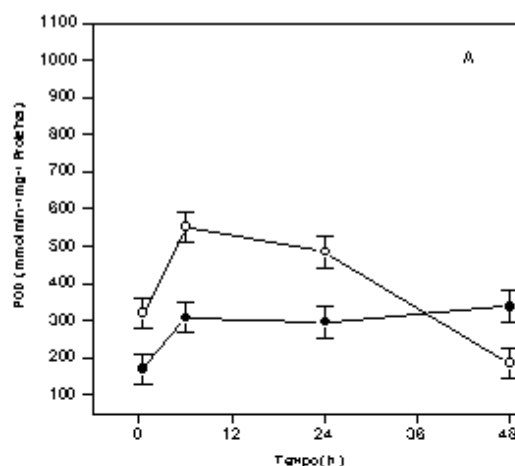
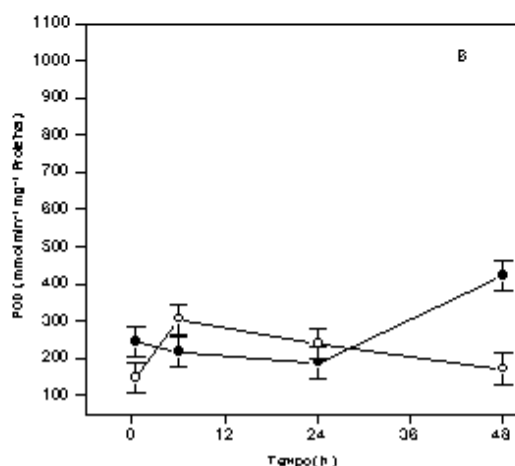


FIGURA 2: Efeito do alumínio na atividade da Polifenol oxidase (PPO) em raízes de três linhagens de milho, com tolerância diferencial ao Al: A (Cateto - tolerante); B (L3 - tolerante) e C (L53 - sensível). Valores médios de 3 repetições ± SE, Al - 0 (o) e Al - 39 μM de atividade (●).

FIGURA 3- Efeito do alumínio na atividade da Guaiacol peroxidase (POD) em raízes de três linhagens de milho, com tolerância diferencial ao Al: **A** (Cateto - tolerante); **B** (L3 - tolerante) e **C** (L53 - sensível). Valores médios de 3 repetições \pm SE, Al - 0 (o) e Al - 39 μ M de atividade (●).



Referências

- Alves, V.M.C.; MAGALHÃES J.V.; SHAFF, J.E.; PIÑEROS, M.A.; PURCINO, A.C.; PARENTONI, S.N.; PITTA, G.V.E.; PRATES, H.T.; SCHAFFERT, R.E & KOCHIAN, L.V. Exsudação de ácidos orgânicos como mecanismo de tolerância a alumínio em milho. Caderno de Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Ilhéus – Bahia, 2 a 7 setembro de 2001, 163 pp.
- ASADA, K., 1992. Minireview: Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85: 235-241.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248—254.
- GASPAR, T., PENEL, C., CASTILLO, F.J., GREPPIN, H. (1985) A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant.* 64: 418-423.
- Harborne, J.B. (ed.) (1994) *The flavonoids - Advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London, 764p.
- JONES, D.H. (1984) Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry* 23: 1349-1359.
- KAR, M. AND MISHRA, D., 1976. Catalase, Peroxidase and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology*, 57,315-319.

- KOCHIAN, L.V., 1995. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Ann. Rev. Plant Physiology Molecular Biology*, 46:237-260.
- KUBO, A., SAJI, H., TANAKA, K., KONDO, N., 1995. Expresión of *arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone of sulfur dioxide. *Plant Molecular Biology*. 29: 479-489.
- MAGNAVACA, R. Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). Lincoln/Nebraska, sec.edition, 1982 (Tese de Phd).
- NAKANO, Y. & ASSADA, K., 1981. Hidrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant & Cell Physiol*. 22: 867-880.
- PEIXOTO, P.H.P., CAMBRAIA, J., SANT'ANA R., MOSQUIM, P.R. AND MOREIRA, M.A., 1999. Aluminum effects of lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11 (3):137 - 143.
- SMIRNOFF, N., 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. *In: Environmental and plant metabolism-flexibility and acclimation* – Ed. N. Smirnoff BIOS Scientific Publishers, 1995, 270p.
- SOUZA, I.R.P.; MacADAM, J.W. A transient increase in apoplastic peroxidase activity precedes decrease in elongation rate of B73 maize (*Zea mays* L.) leaf blades. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.104, p.556-562, 1998.
- VIANELLO, A., ZANCANI, M., NAGY, G., MACRI, F., 1997. Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranas oxidizes ascorbate. *J. Plant Physiology*. 150:573-577.
- YAMAMOTO, Y., HACHIYA, A., HAMADA, H. & MATSUMOTO, H., 1988. Phenylpropanoids as a protectant of aluminum toxicity in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiology*, 39 (9): 950-957.