

# ATIVIDADE DA PEROXIDASE E CONTEÚDO PROTÉICO AO LONGO DO ÁPICE DA RAIZ PRINCIPAL DE LINHAGENS DE MILHO CONTRASTANTES QUANTO A TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO

ISABEL R. P. S., VERA M. C. A., SIDNEY N. P., FLÁVIA F. T., EDILSON P. e ANTÔNIO A. C. P.

Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG, isabel@cnpms.embrapa.br

Palavras chaves: milho, alumínio, ápice radicular, peroxidase, isoenzimas

Por mais de 70 anos a toxidez causada pelo Al tem sido reconhecida como um dos fatores mais limitantes ao cultivo em solos ácidos. O Al inibe a absorção de N, P, Ca, Mg, K<sup>+</sup> e S e induz a formação de calose e a excreção de ácidos orgânicos (Rengel 1996). A lesão primária causada pelo Al deve estar envolvida com a absorção desse íon através da membrana plasmática ou a percepção de seu sinal através do apoplasto seguido da transdução desse sinal para os elementos responsivos dentro da célula. Existe, entretanto, considerável debate sobre a exata localização do sítio primário de ação do Al. Ainda não se demonstrou de maneira inequívoca se este é um fenômeno que acontece no apoplasto ou se existe a necessidade do Al penetrar o simplasto para que haja ocorrência de toxidez. (Kochian 1995). Apesar de já estar estabelecido que o ápice da raiz é o sítio primário da lesão, os seus aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares não são ainda bem entendidos (Delhaize e Ryan, 1995). O Al tóxico interfere na divisão celular e na deposição de polissacarídeos na parede celular, aumentando a sua rigidez (Roy et al, 1988). Em plântulas de *Pisum*, o Al aumentou a atividade da peroxidase e da polifenol oxidase (Henry et al, 1981), duas enzimas envolvidas na manutenção da integridade da parede celular. Entretanto, recentemente, Ezaki et al (1996) levantaram a possibilidade do envolvimento de algumas isoenzimas da peroxidase nos mecanismos de desintoxicação do Al em células de tabaco. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi determinar o efeito do Al na atividade e isoenzimas da peroxidase e no conteúdo protéico no ápice das raízes de linhagens de milho contrastantes quanto a tolerância a esse metal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Métodos de Cultivo

Sementes de milho das linhagens tolerante Cateto 237 e sensível L 36 foram pré-germinadas por 7 dias em papel germinex e posteriormente transferidas para uma solução nutritiva aerada como descrito por Magnavaca (1982). O nível da solução nutritiva nas bandejas de crescimento foi mantido constante pela adição diária de solução. Depois de 5 dias nesta solução, 32 plântulas foram submetidas a estresse de Al por 80 min enquanto outras 32 plântulas foram mantidas na ausência de Al, como controle. Para imposição do estresse de Al, as 32 plantas foram transferidas para uma solução nutritiva de Magnavaca com pH 4,0, na qual adicionou-se 222 µM de AlK(SO<sub>4</sub>).12H<sub>2</sub>O. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com temperaturas diurnas/noturnas variando entre 35/26° C e 70% de umidade relativa.. Cada tratamento foi repetido 4 vezes.

### Extração enzimática

Trinta e dois ápices de raízes de plântulas de cada tratamento foram coletados e os primeiros

20 mm de cada ápice foram segmentados em intervalos de 2 mm. Todo o processo foi realizado a 4° C. Estes segmentos foram macerados em nitrogênio líquido e extraídos em 3 volumes de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, contendo 1 mM de PMSF e 1,5% de PVPP (p/v). O homogenado foi centrifugado a 14.000 x g a 4°C por 30 min e o sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima.

### **Focalização isoelétrica**

Zimogramas foram obtidos utilizando-se géis de agarose 1% preparados com anfólitos, pH 3 a 10 (Pharmacia, EUA). A pré-focalização realizada por 20 min a 1200 V/1 W e a focalização por 2 h a 1200 V/4W a 10°C. O gel foi corado para atividade da peroxidase usando-se os reagentes *p*-fenildiamina e pirocatecol (Imberly et al. 1984)

### **Atividade da Peroxidase**

A atividade da peroxidase foi determinada como descrito por Souza e MacAdam (1998) utilizando-se guaiacol como substrato. A atividade total da peroxidase e o conteúdo de proteínas solúveis foram reportadas por miligrama de tecido fresco

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As linhagens diferencialmente contrastantes quanto a tolerância ao Al, Cateto 237 tolerante e L 36 susceptível, foram previamente selecionadas baseado no protocolo descrito por Magnavaca (1982).

Antes do estabelecimento do estresse de Al, o sistema radicular da L 36 apresentava mais raízes laterais e uma raiz principal mais longa do que a raiz da Cateto 237; e sob condições não estressantes, o crescimento da raiz da L 36 foi de 1 +/- 0,18 mm h<sup>-1</sup>, enquanto para a Cateto 237 foi de 0,8 +/- 0,14 mm h<sup>-1</sup>. Entretanto, durante o estresse causado pelo Al, a raiz principal da Cateto 237 cresceu ao nível de 0,85 +/- 0,13 mm h<sup>-1</sup>, enquanto o crescimento da raiz principal da L 36 cessou durante o primeiro dia de estresse. Uma rápida diminuição no crescimento do sistema radicular é geralmente um dos primeiros sintomas associados com o estresse de Al em genótipos sensíveis (Delhaize et al., 1991).

A ausência de significância para a interação Al x ápice (Tabela 1) permitiu a determinação do conteúdo protéico médio ao longo do ápice das raízes das linhagens, independentemente do tratamento com Al. As duas linhagens apresentaram conteúdo protéico significativamente maior nos primeiros 2 mm do ápice, a qual inclui a região meristemática (Tabela 2). Na ausência de Al, a linhagem L 36 mostrou maior conteúdo protéico que a linhagem Cateto 237. Entretanto, depois de 80 min de exposição ao Al, o conteúdo protéico da L 36 tendeu a diminuir, enquanto o do Cateto 237 permaneceu constante (Tabela 3).

A toxidez do Al inibiu a atividade da peroxidase no sistema radicular da linhagem sensível L 36, mas não na linhagem tolerante Cateto 237 (Figura 1). O efeito inibitório da toxidez do Al na atividade da peroxidase foi especialmente importante nos 6 primeiros mm do ápice das raízes da L 36, segmento que inclui as regiões meristemática e de alongamento. Da mesma maneira, já se observou que a maior acumulação de Al em raízes de trigo acontece nos primeiros 5 mm do sistema radicular das linhagens sensíveis (Rincon and Gonzales, 1992). Estes resultados, são portanto uma indicação de que a manutenção dos níveis de atividades da peroxidase, na presença de Al, pode ser parte de um mecanismo constitutivo que confere tolerância ao Al na linhagem Cateto 237. Para cada uma das linhagens, o zimograma não apresentou alterações na expressão das isoformas devido ao tratamento (Figura

2). Entretanto, diferenças significativas foram observadas entre linhagens e independente do tratamento, a linhagem Cateto 237 apresentava uma isoenzima aniônica, pI 4,79, a qual estava ausente na L 36. Além disso, a linhagem Cateto 237 apresentava uma outra isoenzima aniônica, pI 4,48, presente ao longo dos 20 mm apicais e que na linhagem L36 estava presente apenas nos 2 mm iniciais do ápice. As isoenzimas aniônicas da peroxidase têm também sido associadas com a lignificação da parede celular e com o intercruzamento dos monômeros de extensinas e dos polissacarídeos esterificados a ácidos ferúlicos (Lamport, 1986). É possível, portanto, que o Cateto 237 seja mais tolerante ao Al por possuir um mecanismo capaz de manter a integridade da parede celular na presença deste íon. Uma parede celular íntegra poderia, portanto, atuar como uma barreira física na prevenção da entrada do Al no apoplasto das células corticais (Rengel, 1996).

**Tabela 1** Quadrado médio das características atividade da peroxidase e conteúdo protéico ao longo dos 20 mm dos ápices de raiz das linhagens L 36 e Cateto 237

Fonte	GL	Quadrado Médio <sup>1</sup>			
		Conteúdo Protéico ( $\mu\text{g mg PF}^{-1}$ )		Atividade da Peroxidase ( $\text{A}_{470} \text{ min}^{-1} \text{ mg PF}^{-1}$ )	
Repetição	3	150536214.628	**	6978097.898	
Linhagem (L)	1	275077116.496	**	185956020.785	**
Alumínio (Al)	1	127362439.043	**	19928243.928	**
L x Al	1	76297703.944	**	16187990.863	**
Apice (A)	9	153591416.834	**	8839872.413	**
L x A	9	12649091.074	*	4563945.369	**
Al x A	9	7711684.455		1133019.941	
L x Al x A	9	8039736.197		1614232.459	
Erro	117	4950777.339		1412519.690	

\* Significante a  $P < 0.05$

\*\* Significante a  $P < 0.01$

1 Os valores de Quadrado Médio foram multiplicados por 10<sup>3</sup>

**Tabela 2.** Conteúdo protéico médio ao longo do ápice da raiz principal das linhagens L 36 e Cateto 237

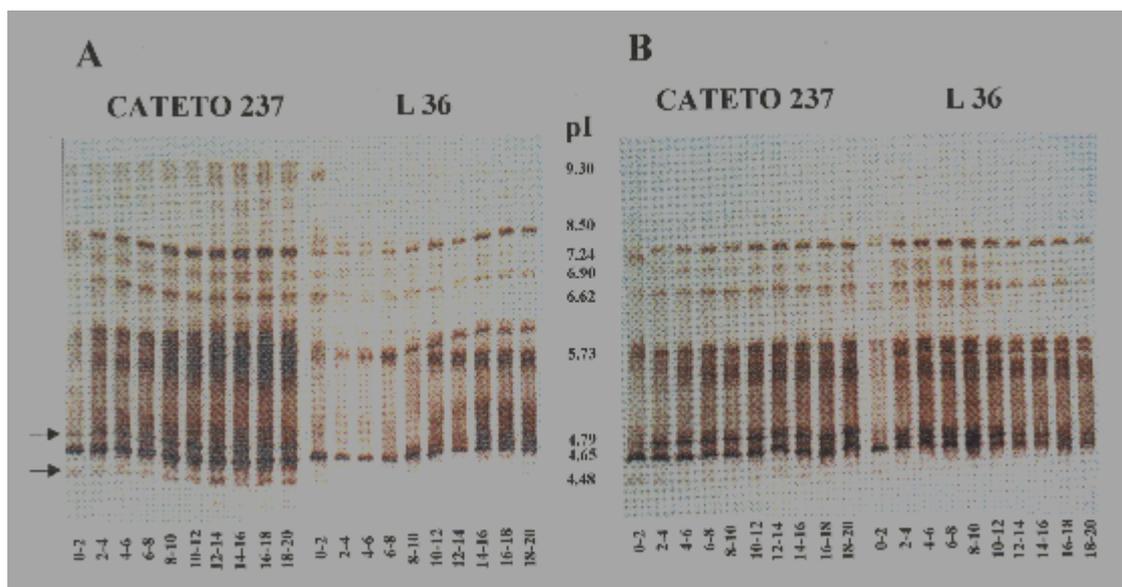
Distância do ápice (mm)	Conteúdo Protéico (µg mg PF <sup>-1</sup> )					
	L 36 (Sensível)			Cateto 237 (Tolerante)		
0 - 2	17.54	A		10.91	A	
2 - 4	7.87		B	4.87		B
4 - 6	8.22		B	5.70		B
6 - 8	7.58		B	3.37		B
8 - 10	6.64		B	3.37		B
10 - 12	4.70		B	3.48		B
12 - 14	3.86		B	3.09		B
14 - 16	4.91		B	2.90		B
16 - 18	5.60		B	4.26		B
18 - 20	5.71		B	4.48		B

Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a  $P > 0,005$

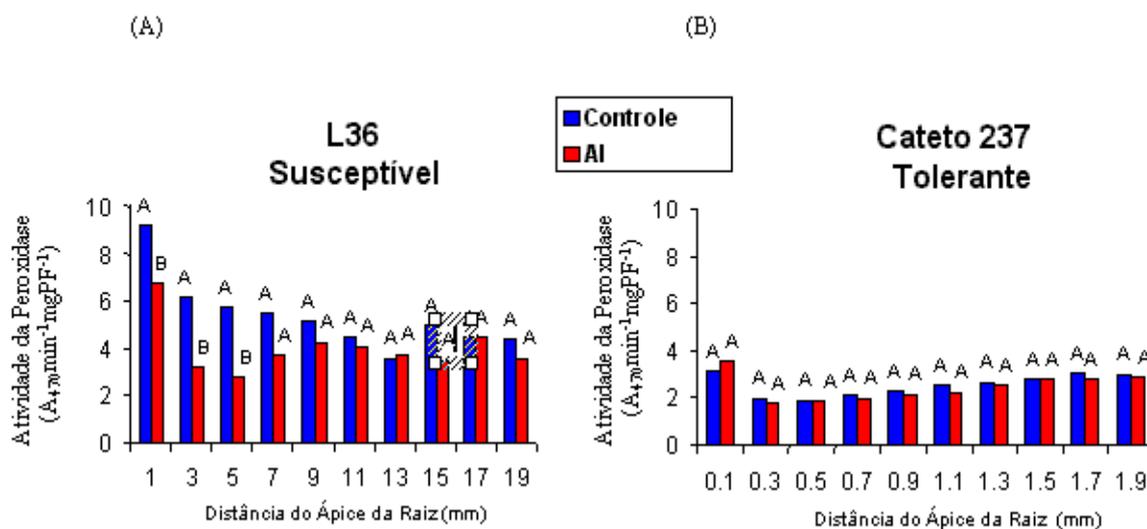
**Tabela 3.** Conteúdo protéico médio ao longo dos primeiros 20 mm do ápice da raiz principal das linhagens L 36 e Cateto 237

Tratamento	Conteúdo Protéico (µg mgPF <sup>-1</sup> )	
	L36 (Sensível)	Cateto 237 (Tolerante)
<b>Controle</b>	8.85 A	4.84 A
<b>Al<sup>3+</sup></b>	5.68 B	4.44 A

Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a  $P > 0,005$



**Figura 2.** Zimograma de isoenzimas da peroxidase em intervalos de 2 mm ao longo do ápice da raiz principal das linhagens Cateto 237 e L 36 na ausência (A) e presença (B) de estresse de alumínio por 80 min.



## REFERÊNCIAS

- DELHAIZE, E.; HIGGINS, T.J.V.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat: Analysis of polypeptides in the root apices of tolerant and sensitive genotypes. *In*: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C.; MURRMAN, R.P. eds. **Plant-Soil Interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.1071-1079.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v.107, p.315-321, 1995.
- EZAKI, B.; TSUGITA, S.; MATSUMOTO H. Expression of a moderately anionic

peroxidase is induced by aluminum treatment in tobacco cells: possible involvement of peroxidase isoenzymes in aluminum ion stress. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 96, p.21-28, 1996.

HENRY, E.W.; MILLER, J. F.; DUNGY, L.J.; JOHSON, M.T.; YEEKPEH, J. K. Effect of aluminum uptake on growth and enzyme activity in *Pisum sativum* var. "Alaska" and "Little Marvel". **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.4, p.353-373, 1981.

IMBERTY, A.; GOLDBERG, R.; CATESSON, A-M. Tetramethylbenzidine and p-phenylenediamine-pyrocatechol for peroxidase histochemistry and biochemistry: two new, non-carcinogenic chromogens for investigating lignification process. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.35, p.103-108, 1984.

KOCHIAN, L.V.; Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.46, p.237-260, 1995.

LAMPORT, D.T.A. Roles for peroxidase in cell wall genesis. *In*: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. eds. **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Geneva: University of Geneva, 1986. p.199-208.

MAGNAVACA, R. **Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize** (*Zea mays*, L.). Lincoln: University of Nebraska, 135p. Tese Doutorado.

RENGEL, Z. Aluminum uptake by plant cells. **New Phytologist**, Oxford, v.134, p.389-406, 1996.

RINCÓN, M.; GONZALES, A. Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Plant Physiology**, Bethesda, v.99, p.1021-1028, 1992.

ROY, AK.; SHARMA A; TALUKDER, G. Some aspects of aluminum toxicity in plants. **Botanical Review**, Bronx, v.54, p.145-178, 1988.

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.