

Atividade de Enzimas Antioxidantes 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, ALVES, V.M.C.², SOUZA, I.R.P.², QUEIROZ, C.G.S.³, PARENTONI, S.N.², SCHAFFERT, R. E. ²

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

Palavras-chaves: Glutaciona redutase, Ascorbato peroxidase, Catalase, Estresse oxidativo, *Zea mays*

Introdução

Alumínio (Al) é um elemento mineral que apresenta ampla distribuição na crosta terrestre, sendo sua toxidez o principal fator limitante à produtividade das culturas em solos ácidos, os quais abrangem cerca de 40% das terras aráveis do mundo, particularmente nos trópicos e sub-trópicos (Kochian, 1995). A toxidez do Al tem sido abordada recentemente como um tipo de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é resultante do aumento de espécies reativas de oxigênio, que podem causar danos a membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos (Smirnoff, 1993). As plantas podem reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio e minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo, removendo enzimaticamente essas espécies, por meio de enzimas de varredura como a glutaciona redutase (GR), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (Price e Hendry, 1991). Estudos *in vivo* têm mostrado que o tratamento com Al aumenta a atividade de algumas enzimas relacionadas com o estresse oxidativo (Eltner et al., 1988; Cakmak e Horst, 1991), podendo levar a indução de genes relacionados com estresse oxidativo em *Arabidopsis thaliana*. Richards et al. (1988) sugerem que o estresse oxidativo pode estar diretamente relacionado ao estresse de Al e que os genes que controlam a expressão das enzimas antioxidantes, como ascorbato peroxidase e glutaciona redutase podem ser induzidos pelo Al. Neste trabalho procurou-se verificar a ligação entre a tolerância ao Al e o metabolismo de algumas enzimas detoxificadoras de radicais livres, em três linhagens de milho contrastantes quanto à tolerância ao Al.

Material e métodos

Foram utilizadas três linhagens de milho provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG, previamente caracterizadas quanto à tolerância ao Al: Cateto e L3 - tolerantes e L53 – sensível (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, permanecendo em câmara de crescimento com temperatura diurna de 27°C e noturna de 20°C, luminosidade de 540 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12h. Três dias após a germinação, as plântulas foram selecionadas, transplantadas e dispostas em bandejas contendo solução nutritiva completa (Magnavaca, 1982), pH 4,5, arejada constantemente,

onde as plântulas permaneceram por 24 horas. Após este período as plântulas foram expostas à mesma solução nutritiva completa, na ausência e na presença de Al ($\text{Al}(\text{SO}_4)_2$) na atividade de $39 \mu\text{M}$, pelo período 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, o qual foi lavado em água destilada e acondicionado em papel alumínio, imerso em nitrogênio líquido e armazenado 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 ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11) foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981), pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290nm , a 28°C . A atividade da catalase (EC 1.11.1.6.) foi determinada de acordo com Peixoto et al., (1999) pelo acompanhamento do decréscimo na absorvância a 240nm , a 28°C . A atividade da glutathione redutase (EC 1.6.4.2) foi determinada de acordo com Queiroz et al., (1998). A oxidação do NADPH foi medida monitorando-se o decréscimo na absorvância a 340nm , a 28°C . 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

A atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) de modo geral diferenciou-se mais na linhagem sensível L53, havendo maior diferença no período de 24h entre o controle e o tratamento com Al. O período de 48h de exposição ao AL, para as três linhagens, provocou um grande aumento na atividade da APX, em relação ao controle (Figura 1). Este comportamento foi semelhante ao encontrado por Peixoto et al., (1999), em plantas de sorgo submetidas a estresse por Al, onde a toxidez de Al levou a um grande aumento na atividade da APX, no material sensível.

Quando expostas a 30min de tratamento com Al o maior valor de atividade da glutathione redutase (GR) foi encontrado na linhagem sensível L53 (Figura 2C). Em seguida, após 6h de exposição ao Al, Cateto e L3 tiveram modificação significativa na atividade da GR, em relação ao controle, sendo esta diferença maior para a Cateto. Nos últimos períodos de exposição ao Al, 24 e 48horas, as três linhagens, mantiveram a atividade da GR semelhante ao controle (Figura 2). O comportamento da atividade da catalase (CAT) apresentou-se diferenciado nas três linhagens (Figura 3). No primeiro período de exposição ao Al, 30min, a atividade da CAT foi significativamente maior na linhagem sensível L53, enquanto que em L3 diminuiu significativamente em relação ao seu controle a partir de 6h. Houve maior alteração da atividade da CAT em L53, no tempo de exposição de 48h e em L3 a partir de 6 h, quando comparadas ao controle. O menor valor para a atividade desta enzima foi encontrado na linhagem tolerante Cateto, que não apresentou atividade diferente em relação ao seu controle. Os dados mostram que a enzima CAT teve uma participação discreta na detoxificação de radicais livres, quando comparada à APX, nas raízes destas plântulas submetidas ao estresse por Al. Estudos em raiz têm demonstrado que no estresse por Al a diminuição da atividade da catalase se contrapõe ao aumento da atividade da ascorbato peroxidase, que tem maior afinidade por H_2O_2 (Cakmak & Horst, 1991; Nocter & Foyer, 1988).

Plantas de sorgo quando submetidas ao estresse por Al apresentaram este padrão, sugerindo uma participação limitada da catalase na eliminação da H_2O_2 em resposta à toxidez de Al

(Peixoto *et al.*, 1999). Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o ciclo Glutathiona / Ascorbato está operando nas raízes das plântulas destas três linhagens, sob estresse por Al, principalmente no período de 48h, e que possivelmente durante o processo de toxidez por Al uma grande quantidade de radicais livres pode estar sendo produzida em L3 e L53 e/ou que Cateto possui mecanismos de detoxificação mais eficientes que as outras linhagens e que esses mecanismos podem contribuir para aumentar a tolerância ao Al.

Observou-se aumento da atividade das enzimas APX, GR e CAT seis horas após o início dos tratamentos, tanto na ausência quanto na presença de Al, principalmente nas linhagens tolerantes. É relevante destacar que a coleta destas amostras correspondeu a nove horas após o início do fotoperíodo, enquanto que as demais coletas foram feitas após três horas de exposição à luz. Estes dados sugerem que o horário da coleta interferiu nos resultados, levando a um estímulo na 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.

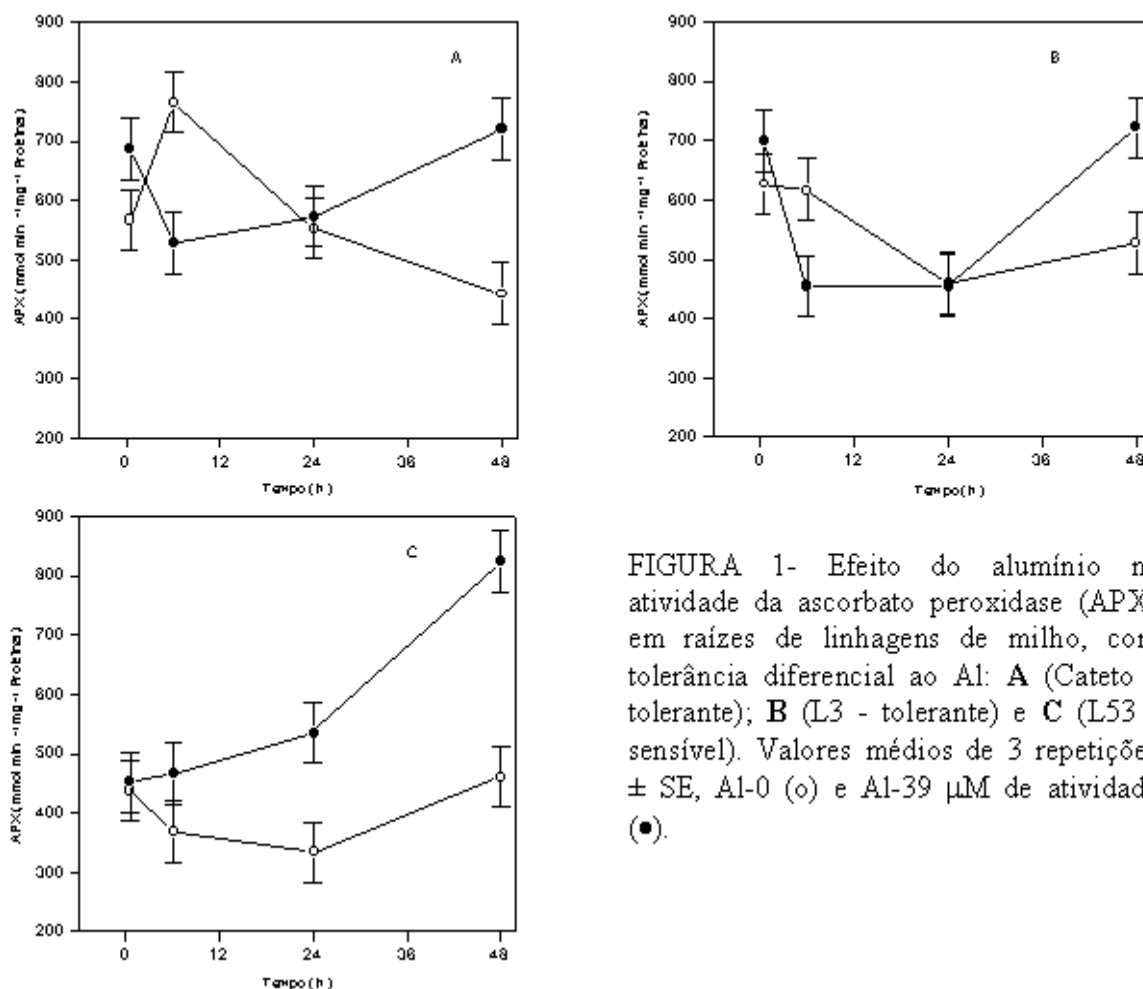


FIGURA 1- Efeito do alumínio na atividade da ascorbato peroxidase (APX) em raízes de linhagens de milho, com tolerância diferencial ao Al: **A** (Cateto - tolerante); **B** (L3 - tolerante) e **C** (L53 - sensível). Valores médios de 3 repetições \pm SE, Al-0 (○) e Al-39 μM de atividade (●).

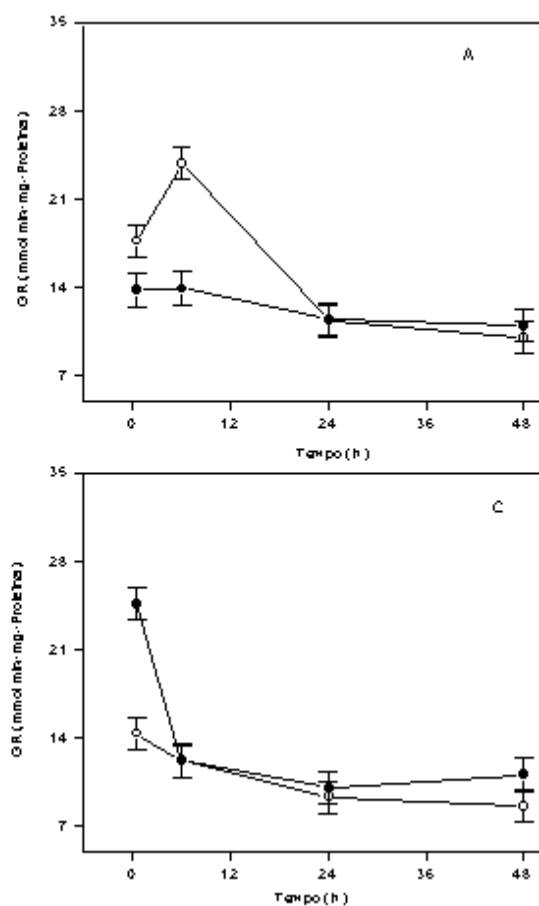
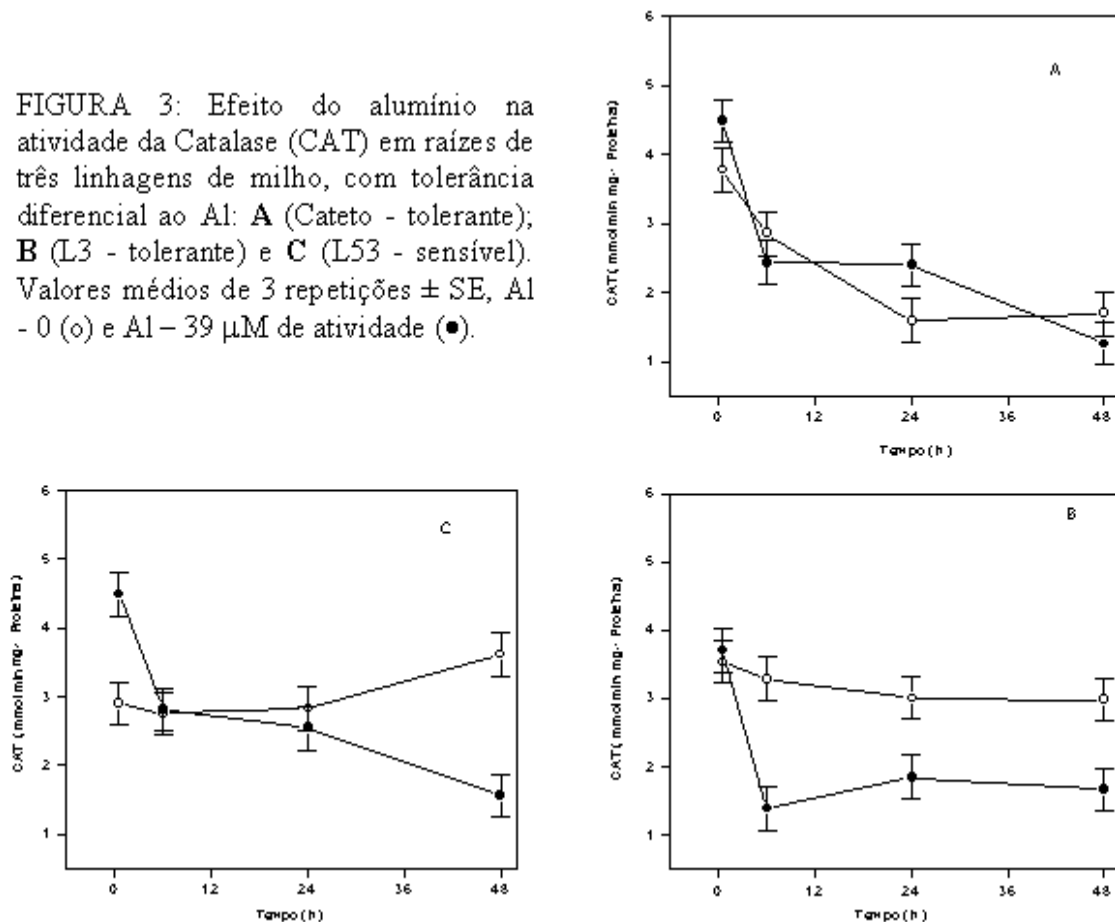


FIGURA 2: Efeito do alumínio na atividade da Glutathione Redutase (GR) em raízes de três linhagens de milho, com tolerância diferencial ao Al: **A** (Cateto - tolerante); **B** (L3 - tolerante) e **C** (L53 - sensível). Valores médios de 3 repetições \pm SE, Al - 0 (o) e Al - 39 μ M de atividade (●).

FIGURA 3: Efeito do alumínio na atividade da Catalase (CAT) 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.
- 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.
- CAKMAK, I. AND HORST, W., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83: 463– 468.
- ELSTNER, E.F.; WAGNER, G.A. & SCHUTZ, W., 1988. Activated oxygen in green plants in relation to stress situations, - *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* 7: 159-187
- FOSTER, J.G. & HESS, J.L., 1982. Oxygen effects on maize leaf superoxide dismutase and glutathione reductase. *Phytochemistry*, 21(7) 1527-1532.
- 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. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant & Cell Physiol*. 22: 867-880.
- NOCTOR, G. FOYER, C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.
- 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.
- PRICE, A.H. e HENDRY, G.A.F. Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant Cell Environ.* v.14, p.477-484, 1991.
- QUEIROZ, C.G.S., ALONSO, A., MARES-GUIA, M., MAGALHÃES, A.C., Chilling-induced changes in Membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabic* L. roots. *Biologia Plantarum*, 41(3): 403-413.
- RICHARDS, D. K.; SCHOTT; E.J.; SHARMA, Y.K.; DAVIS, K.R. AND GARDNER, R.C., 1998. Aluminum Induces Oxidative Stress Genes in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Physiol*. 116: 409-418.
- 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.