

Alterações na expressão de isoenzimas da ascorbato peroxidase (APX) podem afetar a produção de EROs em resposta ao choque térmico em plantas de arroz

YUTCELIA CAROLINA GALVIZ¹; LUIS FELIPE BASSO²; GABRIEL STRECK BORTOLIN³; GUSTAVO MAIA SOUZA⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – yutcecarol@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – felipestrapazon2409@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – gabrielbortolin91@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – gumaia.gms@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Devido ao seu estilo de vida sésil, as plantas não conseguem escapar das condições do ambiente, como por exemplo de altas temperaturas, e são forçadas a alterar seu estado celular para evitar danos. Para tanto, desenvolveram mecanismos complexos para se adaptar a aumentos irregulares de temperatura (KATANO et al., 2018). Sob alta temperatura, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são frequentemente induzidas e podem causar danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Para eliminar as EROs e manter a estabilidade da membrana celular, a síntese de antioxidantes, osmólitos e proteínas de choque térmico é de vital importância, sendo a enzima ascorbato peroxidase (APX) um dos principais antioxidantes enzimáticos conhecida por catalisar a reação de quebra do peróxido de hidrogênio (ASTHIR, 2015).

A enzima APX possui várias isoformas. No arroz existem oito isoformas com diferentes localizações intracelulares: duas citossólicas (*OsAPx1* e *OsAPx2*), duas peroxissômicas (*OsAPx3* e *OsAPx4*), uma forma mitocondrial (*OsAPx6*) e três isoformas cloroplásticas (*OsAPx5*, *OsAPx7* e *OsAPx8*) (TEIXEIRA et al., 2006). Especialmente em condições de estresse, é esperado um aumento na concentração de peróxido de hidrogênio em plantas com algum grau de silenciamento desta enzima.

A detecção e quantificação de EROs podem ser realizadas por diferentes métodos. Dentre eles, a detecção histoquímica fornece informações precisas sobre a distribuição *in situ* e o acúmulo de EROs em diferentes células e tecidos em uma área relativamente grande (SEKULSKA-NALEWAJKO et al., 2016). A peroxidação lipídica, em que os lipídios nas membranas celulares são danificados, também é geralmente quantificada por meio de um ensaio colorimétrico. É assim que resulta de interesse o uso das técnicas histoquímicas para mapear o estresse oxidativo em plantas. Este trabalho propõe avaliar por meio de análises histoquímicas, como alterações na expressão das isoenzimas 7 e 8 da APX pode afetar a produção de EROs, bem como a extensão da peroxidação de membranas em plantas de arroz submetidas a um tratamento de choque térmico de alta temperatura.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas plantas de arroz (*Oryza sativa* L. spp. Japonica cv. Nipponbare) não transformadas (NT), e mutantes que subexpressam isoenzimas APX 7 e APX 8. As sementes de arroz foram fornecidas pelo Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

As sementes foram esterilizadas em hipoclorito de sódio a 1,5% (*m/v*) por 20min, sob agitação eventual, lavadas três vezes e embebidas overnight em água destilada. Posteriormente, estas sementes foram distribuídas em papel para germinação (280 x 380 mm) e umedecidas com água destilada na proporção de duas vezes a massa do papel e levadas à câmara de germinação com uma temperatura de 25°C. Aos 10 dias após semeadura, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos contendo areia e irrigadas com solução nutritiva Hoagland e Arnon. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura 30°C/dia e 24°C/noite, fotoperíodo de 10h de luz e 80% de umidade relativa. Plantas no estágio fenológico V6 foram submetidas a um choque térmico de 40°C por 2 horas.

A partir de segmentos de folhas coletadas, logo após o tratamento de alta temperatura, foram feitos os procedimentos para as detecções histoquímicas seguindo a metodologia de Shi et al. (2010) para a localização de radical superóxido com o uso de azul de nitrotetrazólio (NBT) e de peróxido de hidrogênio empregando diaminobenzidina (DAB). Aldeídos provenientes da peroxidação lipídica foram detectados *in situ* como descrito por Pompella et al. (1987). Os segmentos foliares foram digitalizados e com ajuda do software ImageJ (JUSZCZAK & BAIER, 2014), foram realizadas as quantificações por meio do cálculo da porcentagem de área colorida para cada reação.

Uma análise de Correlação de Pearson for feita para verificar eventuais correlações entre os resultados da quantificação histoquímica e as concentrações de radical superóxido (O_2^-), de H_2O_2 e de malondialdeído obtidas de acordo com Li et al. (2010), Velikova et al. (2000) e Heath e Packer (1968), respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas visualizações histoquímicas e quantificação através da porcentagem de área colorida das folhas, foi possível observar que o choque térmico aumentou os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), assim como a peroxidação lipídica em todos os genótipos testados (Figura 1).

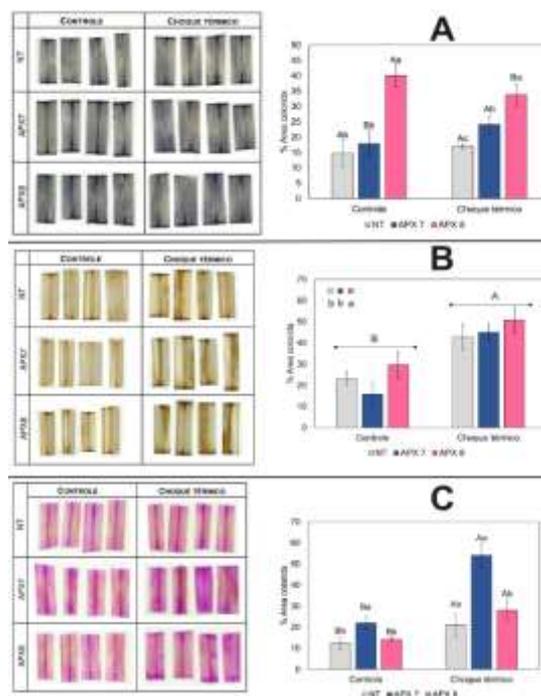


Figura 1. (A) Determinação histoquímica do conteúdo de superóxido. (B) Determinação histoquímica do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (C) Determinação histoquímica do conteúdo da peroxidação lipídica. Letras maiúsculas indicam diferenças entre plantas controle e que passaram pelo choque térmico, letras minúsculas indicam diferenças entre genótipos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Por outro lado, as concentrações de radical superóxido (O_2^-) e de H_2O_2 foram mais altas para o genótipo que subexpressa a isoenzima APX8, ainda sob condição controle. Por outro lado, plantas com subexpressão da APX7 apresentaram sempre maior grau de peroxidação lipídica.

A produção de EROs é uma resposta ao estresse de alta temperatura e como causa, é observado em resposta um aumento no conteúdo de malondialdeído, que é um indicador de dano oxidativo (FAHAD et al., 2017). Aumentos na produção de EROs em plantas que subexpressam formas cloroplásticas da APX condizem com o fato de que as isoformas deste compartimento desempenham um papel significativo na desintoxicação de H_2O_2 e na minimização de danos foto-oxidativos durante o estresse de temperatura (CARVEZAN et al., 2012).

Ao analisar as correlações de Pearson entre os dados obtidos através da porcentagem de área colorida e a concentração das moléculas obtidas a partir das análises espectrofotométricas, é possível observar que existem correlações significativas entre elas (Figura 2), especialmente em relação à peroxidação lipídica (Figura 2C).

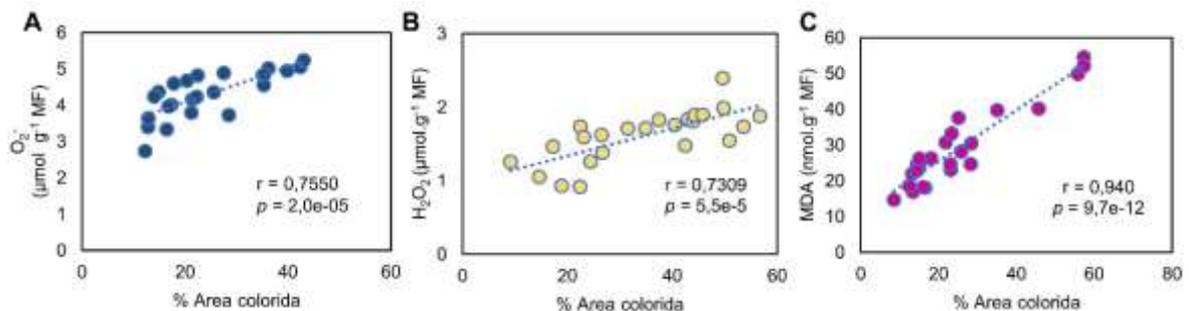


Figura 2. Correlações entre a porcentagem de área colorida e a concentração de (A) superóxido, (B) peróxido de hidrogênio e (C) peroxidação lipídica.

4. CONCLUSÕES

Plantas que subexpressam a isoenzima APX7 e a isoenzima APX8 apresentaram maiores concentrações de radical superóxido (O_2^-), H_2O_2 e peroxidação lipídica, em relação as plantas não transformadas (NT), ressaltando a importância dessas isoenzimas para a manutenção da homeostase redox. O choque térmico de alta temperatura por 2 horas foi suficiente para aumentar os níveis de EROs em todos os genótipos. Além disso, através de análises de correlação de Pearson, as avaliações histoquímicas mostraram-se como uma excelente técnica para avaliação de EROs.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTHIR, B. Mechanisms of heat tolerance in crop plants. **Biol Plant.** v. 59, n. 4, p. 620–628 2015.

CAVERZAN, A. et al. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genet Mol Biol.** v. 35, p. 1011-1019, 2012.

FAHAD, S. et al. Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. **Frontiers in Plant Science.** v. 8, p. 1147, 2017.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. **Arch Biochem Biophys.**, v. 125, p. 189–198, 1968.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils.** Berkeley: California Agricultural Experimental Station, p. 347, 1950.

JUSZCZAK, I.; BAIER, M. (2014) **Quantification of Superoxide and Hydrogen Peroxide in Leaves.** In: Hinch D., Zuther E. (eds) Plant Cold Acclimation. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol. 1166. Humana Press, New York, NY.

KATANO, K, HONDA, K, SUZUKI, N. Integration between ROS Regulatory Systems and Other Signals in the Regulation of Various Types of Heat Responses in Plants. **International Journal of Molecular Sciences.** v. 19, n. 11, p. 3370, 2018.

LI, C.; BAI, T.; MA, F.; HAN, M. Hypoxia tolerance and adaptation of anaerobic respiration to hypoxia stress in two *Malus* species. **Sci Hortic.**, v. 124, p. 274–279, 2010.

POMPELLA, A.; MAELLARO, E.; CASINI, A. F.; COMPORTI, M. Histochemical detection of lipid peroxidation in the liver of bromobenzenepoisoned mice. **American Journal of Pathology.** v. 129, p. 295-301, 1987.

SEKULSKA-NALEWAJKO, J. et al. Automated image analysis for quantification of reactive oxygen species in plant leaves. **Methods.** v. 109, p. 114-122, 2016.

SHI, J. et al. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. **Tree Physiology.** v. 30, p. 914-922, 2010.

TEIXEIRA, F.K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; GALVÃO, V.C.; et al. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. **Planta,** v. 224, p. 300, 2006.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Sci.**, v. 151, p. 59–66, 2000.