

A herbivoria no fruto promove incremento de espécies reativas de oxigênio e resposta antioxidante em folhas e frutos distantes do local da predação

RICARDO PADILHA DE OLIVEIRA¹; DOUGLAS ANTÔNIO POSSO²; THIAGO FRANCISCO DE CARVALHO OLIVEIRA³; ANDRÉ GEREMIA PARISE⁴; GABRIELA NIEMEYER REISSIG⁵; GUSTAVO MAIA SOUZA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas– ricardo.padilha69@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – douglasposso@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fthicar@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – andregparise@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – gabriela.niemeyer.reissig@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – gumaia.gms@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A compreensão da interação entre plantas e herbívoros é de vital importância para biologia e para a agronomia, tendo em vista que os maiores desafios da humanidade hoje são produzir alimentos de forma eficaz e com o menor impacto no ambiente possível. Para isso, precisamos elucidar os processos de percepção, sinalização e respostas das plantas sob os mais variados estresses bióticos que as plantas enfrentam no ambiente natural (LEW et al., 2020). Neste trabalho buscamos compreender como plantas de tomateiro respondem ao ataque de herbívoros no fruto. Pressupomos que a sinalização sistêmica também pode partir do fruto predado, de forma que a planta perceba estes sinais e posteriormente elabore seus mecanismos de defesa e resistência ao estresse (AZEVEDO et al., 2006).

Os sinais elétricos (REISSIG et al., 2021), assim como os sinais químicos e hidráulicos, aparecem como fortes candidatos para essa sinalização de longa distância do fruto para o restante da parte aérea, e a herbivoria, assim como virtualmente todos os fatores ambientais de estresse, parece desencadear uma resposta oxidativa em toda a planta (BI; FELTON, 1995; VELIKOVA et al. 2000). Assim, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar as respostas sistêmicas ao fruto predado, em folhas e frutos distantes do local da herbivoria, associadas ao sistema antioxidante enzimático, demonstrando que o fruto transmite sinais de longa distância para o restante da planta quando submetido à herbivoria e é capaz preparar outras partes da planta para um possível ataque.

2. METODOLOGIA

O cultivo dos tomateiros foi realizado conforme procedimentos adotados por Reissig et al. (2020), em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Botânica/UFPEL. A criação das lagartas de *Helicoverpa armigera* foi realizada no laboratório de Entomologia da Embrapa Clima Temperado, e foi baseada na metodologia proposta por Vilela et al. (2014), até atingirem o quarto ínstar. Quando os frutos estavam totalmente maduros, as plantas foram levadas da casa de vegetação para a sala de eletrofisiologia do LACEV (Laboratório de Cognição e Eletrofisiologia Vegetal), onde ficaram aclimatando por um dia antes da realização do experimento (temperatura da sala 25,0 °C ± 0,2; fotoperíodo de 12 horas).

As lagartas foram colocadas nos frutos e mantidas neles com o auxílio de sacos plásticos de polietileno de baixa densidade (PEBD), com orifícios perfurados para

permitir as trocas gasosas. Após 24 e 48 h, foi realizada a coleta de frutos e folhas das plantas submetidas à herbivoria, bem como as plantas controle não submetidas à herbivoria. As amostras foram imediatamente armazenadas a -86 °C para posterior análise bioquímica. Foram realizadas as análises de quantificação das espécies reativas de oxigênio (ROS) peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (VELIKOVA et al., 2000) e ânion superóxido (ELSTNER; HEUPEL, 1976), assim como a atividade das enzimas catalase (AZEVEDO et al., 1998), guaiacol peroxidase (AZEVEDO et al., 2006), ascorbato peroxidase (NAKANO; ASADA, 1981) e superóxido dismutase (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

Foram realizadas cinco repetições (n = 5) de frutos maduros (controle e 24 h sob herbivoria) e folhas (controle e 24 e 48 h sob herbivoria) analisados por variância unilateral (ANOVA). Quando F foi significativo, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste *t*-Student (*p* ≤ 0,05). A análise estatística e os gráficos foram realizados usando o programa Sigmaplot 12.0 (Systat Software Inc.)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

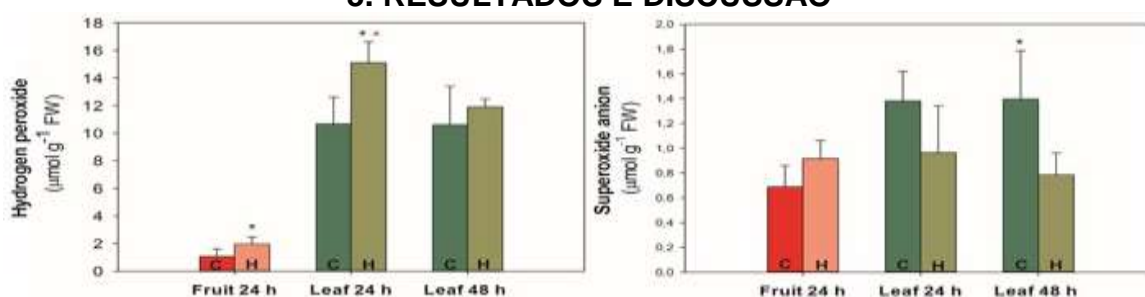


Figura 1 - Conteúdo de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido de frutos e folhas de tomate 'Micro-Tom' durante 24/48 h de tratamento com herbivoria (*Helicoverpa armigera*). Os valores representam a média ± DP (n = 5). * Preto representa a diferença estatística entre controle e herbivoria 24 h ou controle e herbivoria 48 h. * Vermelho representa a diferença estatística entre o controle 24 e 48 h ou herbivoria 24 e 48 h. C: controle; H: herbivoria.

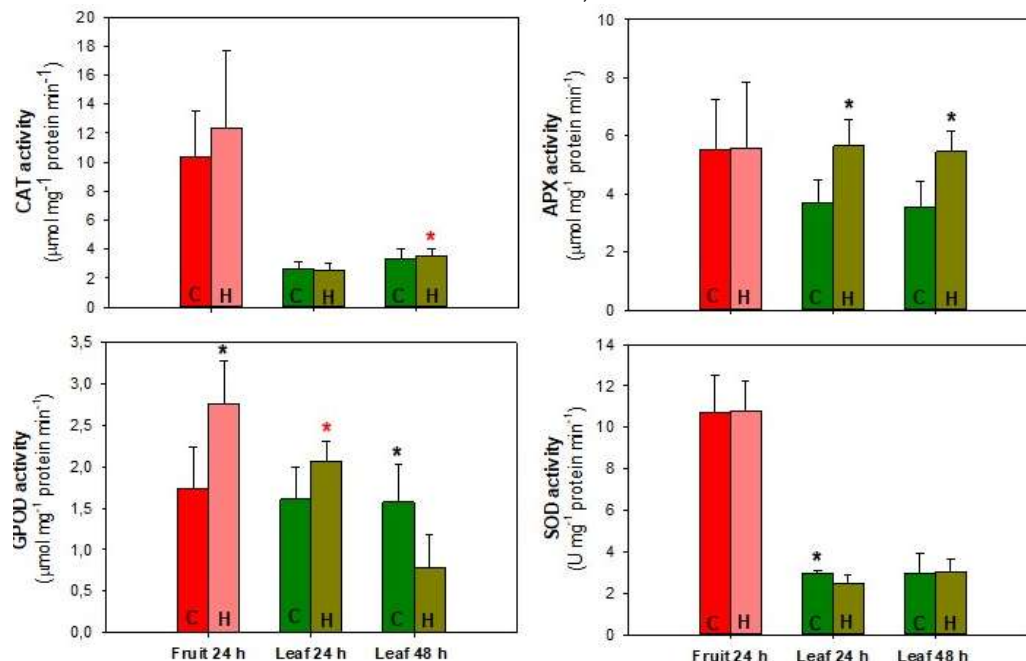


Figura 2 - Atividade de enzimas antioxidantes da fruta e folhas do tomate 'Micro-Tom' durante 24/48 h de tratamento com herbivoria (*Helicoverpa armigera*). Os valores representam a média ± DP (n = 5). * Preto representa a diferença estatística entre controle e herbivoria 24 h ou controle e herbivoria 48 h. * Vermelho representa a diferença estatística entre o controle 24 e 48 h ou herbivoria 24 e 48 h. C: controle; H: herbivoria.

A concentração de H_2O_2 foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) no fruto da planta sob herbivoria (Fig. 1). Isso também foi observado na folha sob 24 h de herbivoria (Fig. 1). Comparando as folhas durante 24 e 48h, é possível notar uma diminuição na concentração de H_2O_2 no último. Quanto ao ânion superóxido, não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre controle e herbivoria no fruto, nem na folha 24 h (Fig. 1). No entanto, houve uma diminuição no teor de ânion superóxido na folha 48 h sob herbivoria, diferindo significativamente ($p \leq 0,05$) do controle, que manteve o nível das 24 h.

Não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre o tratamento controle e herbivoria para frutas e folhas durante 24 h em relação a atividade da enzima catalase (CAT). Um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na atividade de CAT (Fig. 2) foi observado apenas em comparação com a folha 48 h, ambos sob condição de herbivoria do fruto. Com relação à atividade da ascorbato peroxidase (APX), não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) para o fruto. Para a folha, tanto 24 e 48 h, a atividade de APX foi maior nas folhas do tomateiro que sofreu herbivoria no fruto.

A guaiacol peroxidase (GPOD) foi a única enzima que apresentou maior atividade no fruto da planta que sofreu herbivoria quando comparado ao controle. Quanto às folhas, o tratamento controle praticamente manteve a atividade nas 24 e 48 h. Folhas pertencentes ao tratamento de herbivoria no fruto apresentaram maior atividade nas 24 h. Nas 48 h de herbivoria, a atividade diminuiu, sendo significativamente menor do que o controle ($p \leq 0,05$). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi praticamente a mesma nas folhas entre 24 e 48 h no tratamento controle. Durante 24 h, a folha controle apresentou uma atividade significativamente ($p \leq 0,05$) maior do que a folha do tratamento sob herbivoria. Quando a análise foi realizada na folha 48 h, observou-se que a atividade aumentou e não houve diferença em relação ao controle. Não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) na atividade SOD entre os frutos.

Em todas as análises realizadas existe uma estabilidade entre o controle com 24 e 48 h, sem diferença significativa ($p \geq 0,05$) em nenhum dos casos. Já com relação aos tratamentos sob herbivoria, há uma flutuação na concentração dos compostos e atividade das enzimas, efetivamente demonstrando a influência da predação da lagarta no fruto na resposta oxidativa em diferentes órgãos. Um estudo publicado recentemente, utilizando técnicas de captação de sinais elétricos e análise de dados associados com *Machine Learning*, conseguiu trazer evidências de que os sinais elétricos estão envolvidos na sinalização fruto para o restante da parte aérea da planta quando o fruto é atacado pela lagarta *Helicoverpa armigera* (Reissig et al., 2021). Não podemos correlacionar diretamente a influência dos sinais elétricos nas respostas ao estresse oxidativo, mais estudos serão feitos para elucidar os efeitos da sinalização elétrica do ponto de ataque para o restante da planta, assim como as respostas de defesa e sua conexão com o sinal elétrico.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o momento indicam que fatores ambientais de estresse, como ataque de herbívoros, são percebidos pelo fruto e geram sinalização e resposta sistêmica. Os resultados obtidos abrem novos caminhos para diferentes estudos envolvendo frutos como um órgão capaz de perceber estímulos ambientais e auxiliar a planta a se preparar contra adversidades.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, A.D.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; ABREU, C.E.B.; GOMES-FILHO, E. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v.56, p.87-94, 2006.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.280-292, 1998.

BI, J.L.; FELTON, G.W. Foliar oxidative stress and insect herbivory: Primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. **Journal of Chemical Ecology**, v.21, p.1511-1530, 1995.

ELSTNER, E.F.; HEUPEL, A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium-chloride: a simple assay for superoxide dismutase. **Analytical Biochemistry**, v.70, p. 616-620, 1976.

LEW, T.T.S.; KOMAN, V.B.; SILMORE, K.S. et al. Real-time detection of wound-induced H₂O₂ signalling waves in plants with optical nanosensors. **Nature Plants**, Londres, v.6, p.404-415, 2020.

NAKANO, Y.; ASADA, A.K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1981.

REISSIG, G.N.; OLIVEIRA, T.F.C.; OLIVEIRA, R.P.; POSSO, D.A.; PARISE, A.G.; NAVA, D.E.; SOUZA, G.M. Fruit Herbivory Alters Plant Electrome: Evidence for Fruit-Shoot Long-Distance Electrical Signaling in Tomato Plants. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v.5, n.657401, 2021.

REISSIG, G.N.; POSSO, D.A.; BORELLA, J.; SILVEIRA, R.D.V.; ROMBALDI, C.V.; BACARIN, M.A. High MT-sHSP23.6 expression and moderate water deficit influence the antioxidant system in 'Micro-Tom' tomato fruit under hypoxia. **Fruits**, v.75, n.2, p.55-70, 2020.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v.151, p.59-66, 2000.