

Avaliação enzimática e fisiológica de plântulas de milho submetidas à seca¹

Flávia Bordignon Hendges², Cassia Rosana Rambo³, Leidilaine Peixer Alcassa³, Julia Liebl³,
Eliane Cristina Gruska Vendruscolo⁴, Antonio Carlos Torres da Costa⁵

¹Aceito para publicação no 2º Trimestre de 2015.

²Mestranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia - PPGA na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Marechal Cândido Rondon-PR, Brasil, fla.bordignon@gmail.com

³Acadêmicas do curso de Tecnologia em Biotecnologia na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, Brasil,

cassiarambo@hotmail.com; leidilainepea@gmail.com; juh.liebl@gmail.com;

⁴Professora do Departamento de Biociências, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina. Palotina, Paraná, Brasil, egvendru@gmail.com

⁵Professor do Centro de Ciências Agrárias (CCA), Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus Marechal Cândido Rondon. Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil, antonio.costa2@unioeste.br

RESUMO – O milho (*Zea mays L.*) é uma espécie de gramínea importante para a economia de diversos países. Plantas submetidas a déficit hídrico sofrem alterações na estrutura bioquímica de suas células, entre elas a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou radicais livres e a planta, em resposta a esses radicais livres, sintetizam agentes antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros fisiológicos relacionados à seca, como Índice de estabilidade de membrana (IEM), Teor relativo de água (TRA), biomassa fresca e seca e parâmetros enzimáticos como atividade da ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), peroxidação lipídica (MDA%) e prolina (PRO). Plantas de milho (V3), em triplicata, foram submetidas à restrição hídrica por 6 dias sendo as plantas controle irrigadas normalmente. Como resultados obtidos, plantas controle e irrigadas não diferiram em relação a biomassa e

IEM (%). Foi observada uma atividade 6x maior da CAT nas plantas estressadas, porém nenhuma atividade da APX no período avaliado. Os dados obtidos de MDA demonstram uma degradação de membrana pelo estresse aplicado. Os níveis de prolina não aumentaram, possivelmente explicado pela fase fenológica em que os dados foram avaliados.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes, restrição hídrica, poaceas.

Physiological and enzymatic evaluation of corn plantlets submitted to drought

ABSTRACT – Maize (*Zea mays* L.) is an important poacea to the economy of many countries. Plants subjected to water stress undergoes changes in the biochemical structure of your cells, including the production of reactive oxygen species (ROS) or free radicals and the plant in response to these free radicals, synthesize antioxidants. The objective of this study was to evaluate physiological parameters related to drought, as membrane stability Index (MSI%), relative water content (TRA%), fresh and dry biomass and enzymatic parameters as ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) activity, lipid peroxidation (MDA%) and proline (PRO). Corn plants (V3), in triplicate, were submitted to water restriction for 6 days while control plants were irrigated normally. As the results, control and irrigated plants did not differ with regard to biomass and MSI (%).CAT activity were 6x greater in stressed plants, but no activity of APX was observed during the study period. The data obtained from MDA demonstrate a membrane degradation by stress applied. Proline levels did not increased, possibly explained by the phenological stage in which the data were evaluated.

Keywords: Antioxidant enzymes, water restriction, poaceas.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é uma poacea de grande importância econômica, sendo cultivado em várias regiões no mundo (COELHO, 2013; PATERNIANI et al., 2000).

Alguns dos estresses abióticos tais como frio, seca, salinidade e alagamento, limitam o crescimento vegetal e a produtividade de culturas de interesse agrônômico (HMIDA-

SAYARI *et al.*, 2005) além de reduzir a qualidade dos grãos, o que onera ainda mais o agricultor (HUBNER, 2010).

O estresse hídrico é caracterizado por envolver sutis alterações na estrutura bioquímica das células, que parecem ser o resultado da acumulação de solutos compatíveis e de proteínas específicas que podem ser rapidamente induzidas por estresse osmótico (SHAO *et al.*, 2005). As várias respostas fisiológicas da planta ao déficit de água, geralmente variam com a gravidade do déficit hídrico aplicado.

Um dos produtos do déficit hídrico sobre a fotossíntese é a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas formas que também são conhecidos como radicais livres. As formas predominantes de ROS incluem O_2^- , H_2O_2 e OH° . Os radicais livres inativam enzimas e danificam componentes celulares importantes, além de causar degradação de fosfolipídios presentes na membrana (BARTOLI, 2012, ABOGADALLAH, 2012); degradação de polissacarídeos, desnaturação de enzimas e a quebra do DNA (MATYSIK, 2002) e o branqueamento de pigmentos da clorofila (MILLER, 2010).

Os mecanismos de defesa contra os radicais livres são importantes na limitação da ação do estresse oxidativo e na destruição das espécies reativas de oxigênio, dependem da duração do estresse e da capacidade da planta sobreviver a estes estresses. A planta pode reagir com o aumento da expressão de genes de enzimas com funções antioxidantes e com a síntese de espécies sequestradoras dos ROS (MUNNÉ-BOSCH, 2013).

Muitas enzimas parecem estar envolvidas no mecanismo de proteção à presença destes radicais livres, entre elas, as catalases, superóxido dismutases, peroxidases, glutathione redutases (MUNNÉ-BOSCH; QUEVAL; FOYER, 2013). As catalases são enzimas antioxidantes que realizam o catabolismo do peróxido de hidrogênio em moléculas menores, como água e oxigênio (CHELIKANI, P.; RAMANA, T.; RADHAKRISHNAN, T. M., 2005). A ascorbato peroxidase é uma das principais enzimas envolvidas na eliminação rápida de H_2O_2 , por possuir alta afinidade com essa molécula, removendo-a mesmo em baixas concentrações. Ao contrário da catalase, que atua removendo o excesso de peróxido de hidrogênio (MITTLER, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade das enzimas catalase e ascorbato peroxidase associados a parâmetros fisiológicos de plantas de milho submetidas a estresse hídrico na fase inicial do ciclo fenológico.

Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal do Paraná (UFPR), *Campus* Palotina/PR de fevereiro a março de 2014, em vasos plásticos com aproximadamente 10 kg de solo. O solo utilizado foi Latossolo roxo de alta fertilidade previamente peneirado.

Os vasos foram dispostos aleatoriamente, em um delineamento inteiramente ao acaso, de modo a terem as mesmas condições de radiação solar, temperatura e umidade relativa do ar. Foram semeadas, em cada vaso, seis sementes de milho Pioneer 4285, tratadas com Gaucho FSTM. Dezesete dias após a emergência, quando as plantas de milho estavam no estágio V3, foi aplicado o déficit hídrico, por um período de 6 dias de restrição hídrica total, sendo irrigado ao término deste período. Foram amostradas folhas antes e depois da aplicação do estresse (tempo 0 e tempo 6).

Foram realizadas as seguintes avaliações: Teor relativo de água (TRA%) seguindo recomendações de Schonfeld *et al.*, 1988. O índice de estabilidade de membrana celular (IEM%) foi determinado indiretamente pela medida da condutividade elétrica, seguindo o protocolo de Chandra *et al.*, (2004). Para determinação da massa fresca as plantas tiveram a parte aérea separada das raízes, as quais colocadas em estufa de secagem com circulação forçada de ar a 72°C por 72 h para determinação da massa seca.

Para realização dos ensaios da atividade enzimática, 0,5g de amostra foliar foram usados e a atividade específica da catalase foi avaliada segundo protocolo proposto por Beers e Sizer, (1952) e a ascorbato peroxidase foi determinada segundo o protocolo de Venisse *et al* (2001).

A avaliação do nível de peroxidação de lipídios foi medida em termos de concentração de MDA (malondialdeído), usando a reação do ácido tiobarbitúrico (SAIRAM, 2002). Os conteúdos de prolina em tecidos vegetais foram quantificados pelo método de (BATES, 1973).

Resultados e discussão

Os resultados obtidos para TRA% e IEM% em plântulas de milho estão demonstradas na Figura 1. Entre as plantas avaliadas (controle e estresse), foram observados valores de 82,49% - 85,33% e 84,96% - 88,61% respectivamente, para o TRA e IEM, não

diferindo significativamente entre controle e plantas estressadas. Os resultados obtidos permitem concluir que os 6 dias de restrição hídrica na fase inicial do crescimento do milho (estádio V3) não modificaram os parâmetros fisiológicos das células vegetais. Períodos maiores de restrição hídrica ou fases mais avançadas do ciclo fenológico deveriam ser usadas para experimentos que visem a observação do estresse hídrico. Mendes *et al* (2011), observaram que plantas em florescimento seriam as melhores para avaliação do estresse hídrico desta cultura. Os resultados concordariam com o fato da relativa tolerância desta cultura ao déficit hídrico durante a fase vegetativa (SANTOS; CARLESSO, 1998). Por outro lado, Maia *et al* (2007) observaram TRA% menores em plântulas de milho (cv Pontinha e Dente de Cavalo) submetidas a 5 dias de estresse hídrico sugerindo que a percepção do estresse é uma característica genótipo dependente.

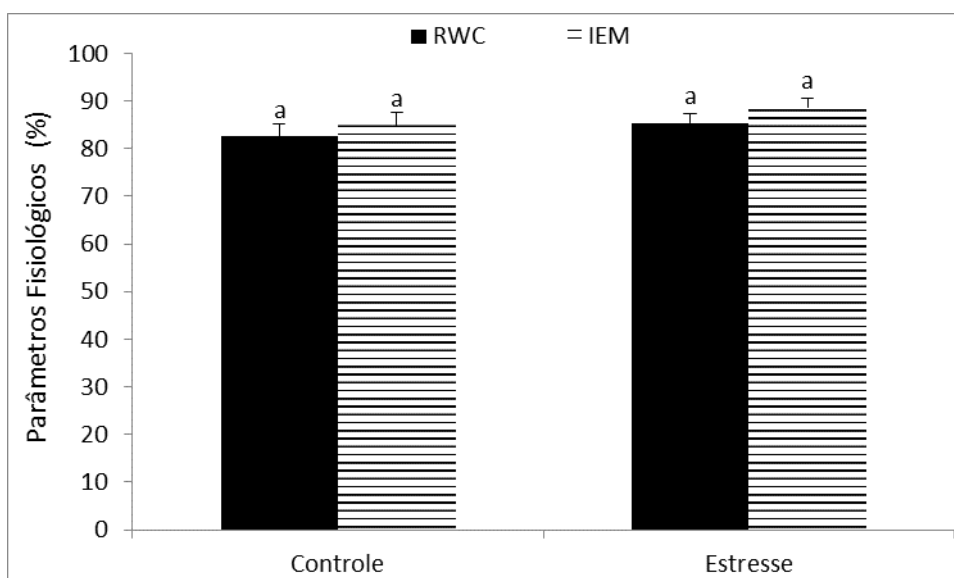


Figura 1: Parâmetros fisiológicos avaliados. Teor Relativo de Água (TRA %) e Índice de Estabilidade de Membrana(IEM (%)) em plantas de milho submetidas a estresse hídrico.

Plantas de milho na fase inicial de crescimento e não estressadas não apresentaram atividade para a enzima catalase (Figura 2). No entanto, plantas submetidas a 6 dias de restrição hídrica apresentaram um aumento na atividade específica desta enzima na ordem de 6x, demonstrando que a catalase é induzida pelo estresse e participa do mecanismo antioxidante e de proteção celular. Coelho (2013), trabalhando com milho submetido a estresse hídrico, observou incremento nos valores da catalase somente 14 dias após o início do estresse.

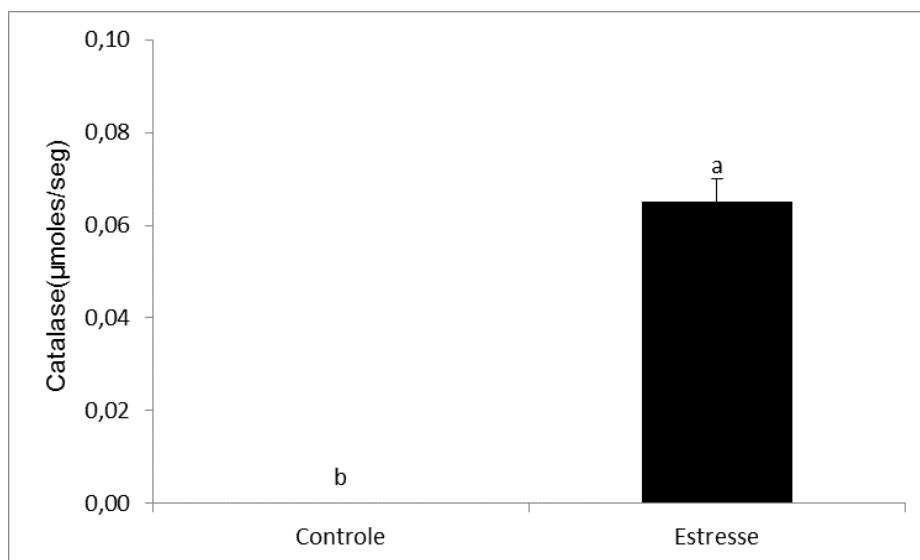


Figura 2 – Atividade enzimática da catalase ($\mu\text{mol}/\text{segundo}$) em plantas controle e plantas estressadas

No entanto, a atividade específica da enzima ascorbato peroxidase nas plantas avaliadas não foi percebida e quantificada. Viana *et al.* (2001), trabalhando com milho no estágio V4, observaram que não houve diferenças significativas na atividade da ascorbato peroxidase comparando plantas com e sem estresse.

Na reação de peroxidação de lipídeos as amostras controle apresentaram em média 0,73 moles de MDA/ g de peso fresco. Nas plantas estressadas, houve um aumento de 283,5% nos valores (Figura 3) demonstrando que 6 dias de restrição foram determinantes para modificarem a composição da membrana embora o TRA% e IEM% não apresentaram valores distintos.

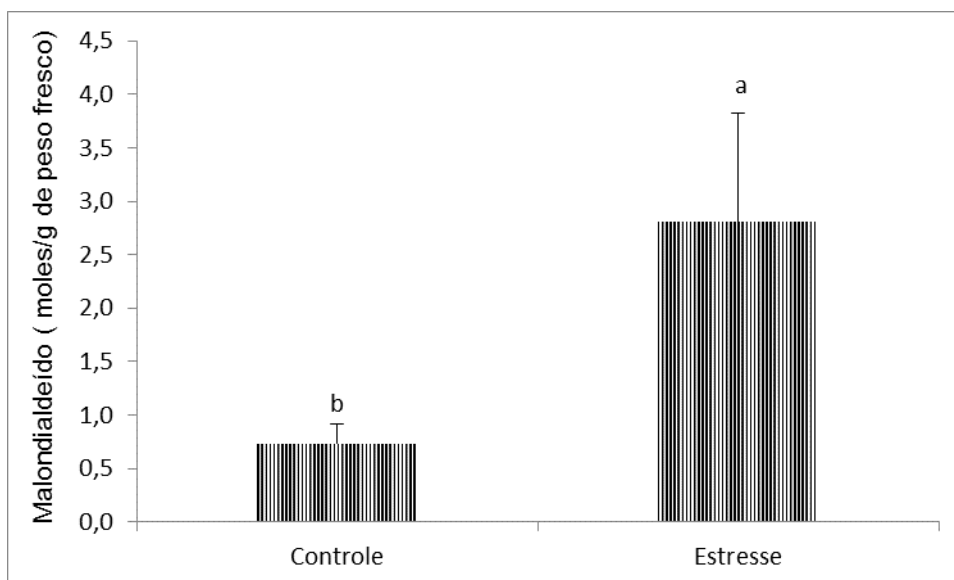


Figura 3 – Concentração de Malondialdeído (MDA) em plantas estressadas de milho.

A peroxidação dos lipídeos produz malondialdeído (MDA), que é usado para determinar a peroxidação dos lipídeos das membranas das células. Viana *et al.* (2002), em seu trabalho com quatro níveis de déficit hídrico, verificou que o estresse mais drástico que foi aplicado induziu um aumento de 23% na quantidade de MDA. Resultados semelhantes aos encontrados por Silva (2010) que, trabalhando com cana-de-açúcar, encontrou um aumento médio de quase 39% nas concentrações de MDA nas plantas submetidas à seca.

A quantificação dos níveis de prolina nas amostras controle apresentaram em média 1,10 $\mu\text{moles}/\mu\text{g}$ de peso fresco, demonstrando que este aminoácido participa na rota do metabolismo de crescimento, uma vez que, as plantas estão no estágio V3. Porém, nas plantas estressadas, observou-se uma redução de 22,72% (Figura 4).

Os resultados obtidos diferem dos observados na literatura onde vários autores descrevem um aumento nos níveis de prolina por ocasião da restrição hídrica (DAS *et al.*, 1990; HASEGAWA *et al.*, 1986; RENSBURG; KRÜGER; KRÜGER, 1993; VOETBERG; SHARP, 1991).

Trabalhando com dois genótipos de milho Ferreira, *et. al.* (2002) obteve como resultado para o genótipo BR 205 acúmulo menor deste aminoácido não diferindo entre os tratamentos, e para o genótipo BR 2121 a concentração de prolina foi maior para o tratamento com estresse hídrico no estágio V3.

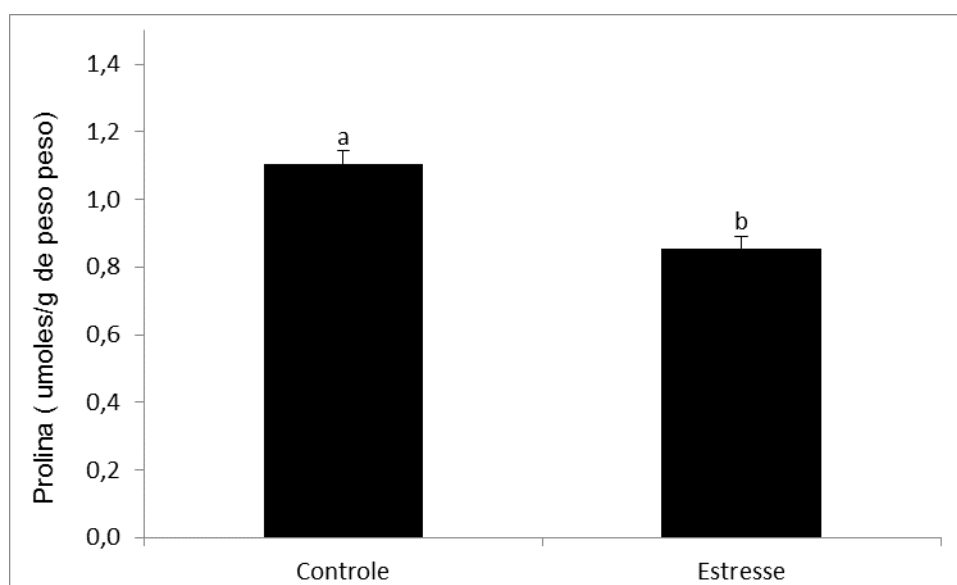


Figura 4– Níveis de prolina em plantas estressadas de milho

A área foliar é um importante fator da produção e determina o uso da água pelas plantas e seu potencial de produtividade é severamente inibido quando exposta à déficit hídrico (FERNANDES *et al.*, 1996).

Para a biomassa das plantas de milho, acondicionadas em casa de vegetação, os resultados demonstram que o peso fresco da raiz, peso fresco da parte aérea e peso seco da raiz para o controle e para as plantas estressadas, não foram significativamente distintos (Figura 5). Entretanto, os resultados obtidos para o peso seco da parte aérea apresentaram-se distintos onde o peso das plantas estressadas foi maior. Este resultado poderia ser explicado pelo fato de plantas submetidas ao estresse tenderiam a estender mais a sua superfície radicular, absorve mais solutos e deste modo, aumentar a área foliar. Os resultados obtidos

nesse experimento na parte radicular, embora não significativos, foram numericamente maiores. Já, os maiores pesos frescos da parte aérea poderiam ser explicados pelo fato de que, na tentativa de vencer o estresse, as plantas acelerariam o crescimento vegetal, o que resultaria numa maior biomassa (Figura 5).

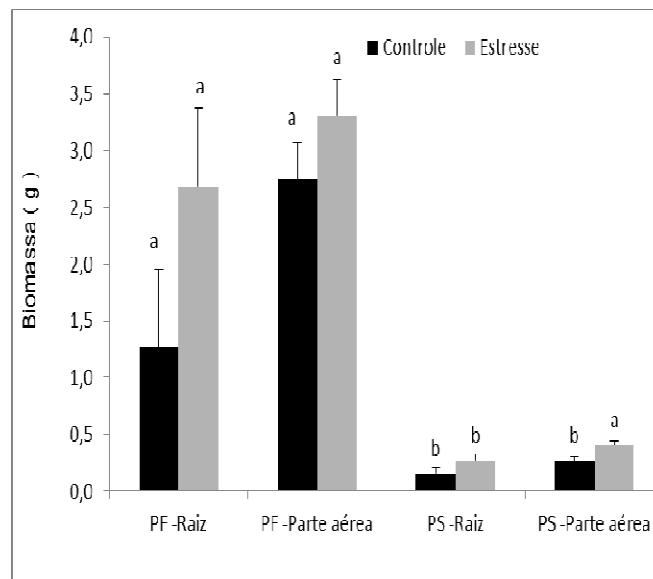


Figura 5: Biomassa de plantas de milho submetidas a estresse hídrico. PF-Peso fresco e PS-Peso Seco.

Conclusões

Os parâmetros fisiológicos avaliados não diferiram estatisticamente demonstrando que as plantas estressadas de milho não perceberam 6 dias de estresse hídrico. Pode-se observar diferenças nos resultados obtidos para os parâmetros biofísicos avaliados e de biomassa.

Como resultados obtidos, foi observada a atividade da catalase nas plantas estressadas, porém a outra enzima, ascorbato peroxidase, não pode ser determinada no período avaliado de 6 dias de restrição hídrica. Os dados obtidos de MDA corroboram para a conclusão de que as plantas avaliadas tiveram seus parâmetros fisiológicos modificados pelo estresse aplicado, por

outro lado, os níveis de prolina não aumentaram, dado esse que, possivelmente possa ser explicado pela fase fenológica em que os dados foram avaliados.

Referências

ABOGADALLAH, M. G. Antioxidative Defense under Salt Stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 4, p. 369-374, 2012.

BARTOLI, C. G. *et al.* Interactions between Hormone and Redox Signalling Pathways in the Control of Growth and Cross Tolerance to Stress. **Environ Exp Bot (in press)**. 2012.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies. **Plant and Soil**, v.39, n.1, p.205-207, 1973.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 133-140, 1952.

CHANDRA, B. *et al.* *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. **Plant Science**, v. 166, p. 885-862, 2004.

CHELIKANI, P.; RAMANA, T.; RADHAKRISHNAN, T. M. Catalase: a repertoire of unusual features. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 20 (2), p.131-135, 2005.

COELHO, H. A. **Diferentes condições de estresse hídrico no desenvolvimento de milhos transgênico e convencional**. 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

DAS, N.; MISRA, M.; MISRA, A. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus cultures of Pear millet: free solute accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v. 137, p. 244-246, 1990.

FERNÁNDEZ, C.J.; McINNES, K.J.; COTHREN, J.T. Water status and leaf area production in water-and nitrogen-stressed cotton. **Crop Science, Madison**, v.36, p.1224-1233, 1996.

FERREIRA, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; OLIVEIRA, L. E. M. de; PURCINO, A. A. C.; Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 32, n. 1, p. 13-17, 2002.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. D.; HANDA, A. K. Cellular mechanism of salinity tolerance. **Hort. Science**, v. 21, p. 1317-1324, 1986.

HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDANI, A.; JAOUA, L.; SAVOURÉ, A.; JAOUA, S. Overexpression of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v. 196, n. 4, p. 746-752, 2005.

HUBNER, O. Análise da Conjuntura do Trigo Safra 2009/2010. SEAB - Secretaria da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Economia Rural, Estado do Paraná. (Ed. **SEAB**). Curitiba, PR. 2010.

MAIA, P. S. P. *et al.* Conteúdo Relativo de água, teor de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de milho submetidas a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 918-920, 2007.

MATYSIK, J., ALIA, A., BHALU, B. e MOHANTY, P. Molecular Mechanism of Quenching of Reactive Oxygen Species by Proline under Water Stress in Plants. **Current Science**, v. 82, p. 525-532, 2002.

MENDES, J.L. *et al.* Physiological and Biochemical Responses of Wheat Subjected to Water Deficit Stress at Different Phenological Stages of Development. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 1, p. 1116-1124, 2011.

MILLER, G. *et al.* Reactive Oxygen Species Homeostasis and Signalling During Drought and Salinity Stresses. **Plant Cell Environ**, v. 33, n. 4, p. 453-67, 2010.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v. 7, Issue 9, p. 405-410, 2002.

MUNNÉ-BOSCH, S., QUEVAL, G; FOYER, C. H. The Impact of Global Change Factors on Redox Signaling Underpinning Stress Tolerance. **Plant Physiology**, v. 161, p. 5-19, 2013.

PATERNIANI, E.; NASS, L. L.; SANTOS, M. X. O valor dos recursos energéticos de milho para o Brasil: uma abordagem histórica da utilização de germoplasma. *In*: UDRY, C.W.; DUARTE, W. (Org.) **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**. Brasília: Paralelo 15, 2000. p. 11-41.

RENSBURG, L. V.; KRÜGER, G. H. J.; KRÜGER, H. Proline accumulation as drought-tolerance selection criterious: its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum*. **Journal Plant Physiology**, v. 141, Issue 2, p. 188- 194, 1993.

SAIRAM, R. K., RAO, K. V., SRIVASTAVA, G. C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**, v.163, n.5, p.1037-1046. 2002.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998.

SCHONFELD, M. A. *et. al.* Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. **Crop Science**, v. 28, p. 526-531, 1988.

SHAO, H. B. *et al.* Dynamic Changes of Anti-Oxidative Enzymes of 10 Wheat Genotypes at Soil Water Deficits. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 42, Issues 3-4, p. 187-195, 2005.

SILVA, P. B da. **Aspectos fisiológicos de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos a estresse hídrico**. 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal e Proteção de Plantas) –. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2010.

VOETBERG, G. S.; SHARP, R. E. Growth of the maize primary root at low water potentials: III. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. **Plant Physiology**, v. 96, p. 1125-1130, 1991.