

Teor de ácido abscísico (ABA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA) em dois híbridos de milho contrastantes a seca

Thiago Corrêa de Souza⁽¹⁾, Paulo César Magalhães⁽²⁾, Carlos César Gomes Júnior⁽³⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras thiagonepre@hotmail.com, ⁽²⁾Embrapa Milho e Sorgo pcesar@cnpmc.embrapa.br e ⁽³⁾Graduando Universidade Federal de São João del Rey e bolsista Funarbe juninhoiam@yahoo.com.br

RESUMO - Estudos relacionados à tolerância à seca estão sendo cada vez mais estratégicos para Brasil, já que, este é o estresse abiótico mais complexo e de maior efeito sobre as culturas. Dentro deste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação do ácido abscísico (ABA) no aumento à tolerância ao estresse hídrico em híbridos de milho contrastante à seca: DKB 390 (tolerante) e BRS 1030 (sensível). Para isso foi realizado em casa de vegetação a caracterização da atividade antioxidante enzimática, analisando-se os teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA), assim como os teores de ABA. A deficiência hídrica foi imposta por 10 dias no estágio de florescimento e uma dose de 100 µM de ABA foi aplicada na parte aérea. As avaliações também foram feitas durante 10 dias após a recuperação hídrica. O ABA exógeno parece ter influenciado o DKB 390 (tolerante) principalmente no 1º dia após sua aplicação e com o passar dos dias o conteúdo interno de ABA diminuiu. Com 5 dias de estresse, o híbrido tolerante em relação ao sensível apresentou menor teor de MDA. Com 10 dias de estresse o BRS 1030 apresentou maior acúmulo de H₂O₂ e MDA. Conclui-se que o DKB 390 foi mais responsivo a aplicação de ABA o que provavelmente aumentou a tolerância à seca desse híbrido.

Palavras-chave: *Zea mays* L., peroxidação lipídica, estresse hídrico.

Introdução

A seca é um tópico importante e crescente em muitas partes do mundo. Ela é uma das principais limitações no cultivo do milho. Devido às mudanças climáticas os problemas com a seca vêm aumentando e áreas que atualmente são grandes produtoras de grãos podem não estar mais aptas ao plantio devido à falta ou má distribuição de água (Fan et al., 2009).

A seca também induz um estresse oxidativo em plantas pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). O aumento da produção de EROs durante o estresse pode ser uma ameaça para as células se ocorrer um aumento elevado, mas também sabe-se que elas agem como sinais para ativação da resposta ao estresse e caminhos de defesa (Karuppanapandia et al., 2011). Para aumentar a produtividade agrícola em áreas com deficiência hídrica é de suma importância induzir tolerância à seca e várias práticas agronômicas e fisiológicas têm sido implementadas a fim de garantir este propósito (Anjum et al., 2011b). Uma dessas práticas que vem ganhando destaque nos últimos tempos é a aplicação exógena de substâncias em plantas. Em milho pode-se citar aplicação de ácido abscísico (Jiang

e Zhang 2002; Kellos et al., 2008), esses autores relatam que a aplicação dessas moléculas tem aumentado o status hídrico foliar, a atividade enzimática antioxidante, e as trocas gasosas.

Neste sentido o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis papéis da aplicação exógena de ácido abscísico em aumentar a tolerância à seca em híbridos de milho tolerante e sensível baseado em mudanças bioquímicas como teor de ABA endógeno, teor de peróxido de hidrogênio e teor de malonaldeído.

Material e Métodos

Foram utilizados dois híbridos contrastantes para tolerância à seca: DKB 390 (tolerante) BRS 1030 (sensível) esse último oriundo do Programa de Melhoramento da Embrapa. O ensaio foi conduzido, em regime de casa de vegetação, no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (Embrapa), em Sete Lagoas, estado de Minas Gerais. Utilizaram-se duas plantas por vaso de 20 litros, preenchidos previamente com solo do tipo Latossolo Vermelho Distrófico Típico. A adubação foi feita de acordo com a recomendação da análise química do solo, aplicando-se no momento do plantio uma adubação básica com 5-20-20+Zn com doses de 23 g. 20 Kg⁻¹ de solo. As plantas foram irrigadas regularmente mantendo uma ótima umidade do solo até a imposição do estresse.

O teor de água no solo foi monitorado diariamente nos períodos da manhã e da tarde (9 e 15 horas), com o auxílio de um sensor de umidade *watermark* (tensiômetro) modelo 200SS – 5''(IRROMETER, Califórnia – USA), instalado no centro dos vasos de cada repetição, na profundidade de 20 cm. No pré-florescimento, foram impostos dois tratamentos hídricos: irrigado e estressado. No primeiro, a reposição hídrica foi realizada diariamente até o solo atingir a umidade próxima a CC (tensão da água no solo de aproximadamente -18 kPa), enquanto que, no segundo tratamento, a indução do estresse hídrico foi realizada diariamente aplicando-se no mínimo 50% da água total disponível, ou seja, até a tensão da água no solo atingir no mínimo -138 kPa, cujo valor corresponde ao solo especificado. Esse estresse foi mantido por 10 dias.

Com 12 horas da imposição do estresse as plantas foram tratadas com (+/-)-cis, trans-ABA (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) na concentração de 100 µM. O ABA foi primeiro dissolvido em 1 ml de etanol 70% e em seguida completado o volume para 1 litro. Logo após, a solução foi pulverizada na parte aérea (Aroca et al., 2003).

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso em esquema fatorial com 8 tratamentos (DKB 390 estressado e irrigado e estressado e irrigado com aplicação de ABA

exógeno; e BRS 1030 estressado e irrigado e estressado e irrigado com aplicação de ABA exógeno) e 6 épocas de coleta (1, 5 e 10 dias de estresse hídrico e 1, 5 e 10 dias de recuperação hídrica) e 3 repetições. As avaliações foram realizadas durante 10 dias na imposição do estresse hídrico, no momento em que as plantas se encontravam no florescimento pleno e durante 10 dias na recuperação hídrica das plantas (retomada da umidade do solo para a capacidade de campo).

Após a coleta dos tecidos foliares estes foram armazenados em freezer -80°C até a extração. O método de extração do ABA foliar foi adaptado a partir de e Guóth et al. (2009) e a detecção foi feita utilizando *Kits* de ensaio imuno-enzimático (*Phytodetec ABA Enzyme Immunoassay Test Kit – Sigma-Aldrich*).

Amostras contendo 250 mg de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP, homogeneizados em 5 mL de tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugados, a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação do teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e MDA. O teor de H₂O₂ foi medido em espectrofotômetro de acordo com Alexieva et al. (2001). O teor de malonaldeído (MDA) que é um produto final da peroxidação lipídica foi utilizado para determinar o nível de dano nas membranas. O método utilizado foi de acordo Buege e Aust (1978) baseado na reação com ácido tiobarbitúrico.

Para todos os parâmetros analisados foram calculadas as médias e o \pm erro padrão (SE). Para análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Skott-Knott, a 0,05% de significância ($P \cdot 0.05$), no programa Sisvar versão 4.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

Resultados e Discussão

A aplicação de ABA não afetou significativamente as características analisadas nos tratamentos irrigados (Tabela 1; 2 e 3). Em milho, Jiang e Zhang (2002) também não encontraram influência da aplicação de ABA em tratamentos com irrigação.

Entre os tratamentos, observa-se que no primeiro dia de estresse o DKB 390 estressado e estressado+ABA apresentaram maior teor de ABA seguido dos tratamentos BRS 1030 estressado e estressado+ABA (Tabela 1). No quinto dia sob estresse o DKB 390 estressado+ABA apresentou significativamente maior teor de ABA, seguido dos outros tratamentos estressados. Com o aumento de dias sob estresse (10 dias) houve inversão com o BRS 1030 estressado+ABA significativamente maior, seguido do BRS 1030 estressado, DKB

390 estressado+ABA e DKB irrigado+ABA. No primeiro dia de recuperação hídrica os tratamentos BRS 1030 estressado e estressado+ABA apresentaram os maiores valores seguidos dos outros tratamentos. No 5º e 10º dia de recuperação hídrica não houve diferenças entre os tratamentos (Tabela 1).

O ácido abscísico é um hormônio muito importante, pois além de funções de regulação nos processos fisiológicos e de desenvolvimento, é o principal regulador nas respostas adaptativas a estresses ambientais, sobretudo a seca (Jiang e Zhang 2002). No tratamento estressado sem aplicação exógena do ácido abscísico, o DKB 390 teve maior teor de ABA no início do estresse hídrico do que o BRS 1030 (Tabela 1). Alguns trabalhos também relatam aumento de ABA endógeno em plantas tolerantes de milho sob estresse (Aroca et al., 2003). Ainda a aplicação de ABA na parte aérea aumentou o teor de ABA nas folhas dos dois híbridos, porém com resultado mais pronunciado no tolerante. Com o aumento dos dias de estresse (10 dias) e início da recuperação hídrica, o híbrido sensível foi o que apresentou maior teor de ABA. Portanto o ABA exógeno parece ter influenciado o DKB 390 (tolerante) principalmente no 1º dia após sua aplicação e com o passar dos dias o conteúdo interno de ABA diminuiu. Em estudos com genótipos de trigo de programas de melhoramento para a seca os autores observaram que os genótipos produzidos antigamente, tinham maior quantidade de ABA do que os genótipos modernos (Fan et al., 2009).

Observa-se que, no primeiro dia sob estresse, o DKB 390 estressado+ABA apresentou o maior teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Tabela 2). No quinto e décimo dias sob estresse o híbrido BRS 1030 estressado foi o que apresentou significativamente o maior teor seguido de BRS 1030 estressado+ABA e DKB 390 estressado. Também no quinto e décimo dia de estresse, quando considerado apenas os tratamentos estressados, o menor teor de H_2O_2 foi encontrado no tratamento DKB 390 estressado+ABA (Tabela 2). Mesmo com 24 horas de recuperação hídrica (1 dia) o BRS 1030 estressado e estressado+ABA ainda apresentaram maior teor de H_2O_2 e nos dias restantes de recuperação hídrica não houve diferenças entre os tratamentos.

Um fato marcante com relação ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi que nos dias iniciais de estresse o DKB 390 estressado+ABA teve maior teor e com 10 dias de estresse foi observado neste mesmo tratamento um teor significativamente menor em relação aos outros tratamentos (Tabela 2). Contrariamente, o híbrido sensível com 10 dias de estresse apresentou outro comportamento, onde o tratamento BRS 1030 estressado mostrou um pronunciado aumento em relação aos outros tratamentos, sendo que a aplicação de ABA parece ter aliviado

esta situação. Com relação ao aumento do teor de H_2O_2 nos dias iniciais de estresse no híbrido tolerante (DKB), com aplicação de ABA, resultados semelhantes foram encontrados por Kellos et al., (2008) em que uma linhagem de milho tolerante exibiu maior teor de H_2O_2 quando aplicado ácido abscísico. O aumento de H_2O_2 no início do estresse no DKB 390 pode ser explicado pelo papel do H_2O_2 como uma potente molécula sinalizadora do estresse. Com o aumento do estresse hídrico é notório a participação do H_2O_2 pela reação de Haber-Weiss/Fenton como radical livre atacando as membranas celulares (Queval et al., 2008). Torna-se necessário então, uma varredura para diminuição dessas moléculas, mas esta capacidade não foi encontrada no híbrido sensível (BRS 1030) porque não conseguiu diminuir a quantidade de peróxido de hidrogênio.

No geral os tratamentos estressados tiveram um aumento no teor de malonaldeído (MDA) e após a recuperação hídrica o teor diminuiu (Tabela 3). No primeiro dia de estresse observou-se que não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 3). No quinto dia de estresse todos os tratamentos estressados incluindo os com aplicação exógena de ABA apresentaram um aumento significativo no teor de malonaldeído (MDA) quando comparado com os tratamentos irrigados. E com 10 dias de estresse o maior teor foi encontrado no tratamento BRS 1030 estressado e o menor foram no DKB 390 estressado+ABA e nos tratamentos irrigados. Não houve diferenças entre os tratamentos nos dias de recuperação hídrica (Tabela 3).

Em milho baixo teor de malonaldeído (MDA) tem sido associado à tolerância à seca (Anjum et al., 2011b). Um maior teor de MDA com o aumento dos dias de estresse hídrico foi evidenciado nos dois híbridos, mesmo quando o ABA foi aplicado. O híbrido sensível (BRS 1030) exibiu um aumento mais significativo durante os dias de estresse do que o tolerante (DKB 390) sendo que a aplicação de ABA aliviou significativamente o dano nas membranas principalmente no DKB 390. Um alívio no dano das membranas (menor formação de malonaldeído) também foi evidenciado em milho com aplicação de ABA (Kellos et al., 2008).

A diminuição do teor de MDA e de H_2O_2 observados quando o híbrido tolerante (DKB 390) estava sob estresse severo (10 dias) pode ter sido devido ao aumento da atividade enzimática antioxidante nas folhas que proporciona uma melhor proteção contra o estresse oxidativo (Moussa e Abdel-Aziz 2008). Nos últimos tempos tem sido grande o interesse em investigações do sistema de defesa antioxidante em folhas, devido a um dos princípios de que a folha age como um sensor primário no estresse de seca. Além disso, tem sido demonstrado que as respostas antioxidantes são bem correlacionadas com a tolerância de cultivares de milho sob

seca (Chugh et al., 2011).

Conclui-se que o DKB 390 foi mais responsivo a aplicação de ABA o que provavelmente induziu o aumento da tolerância à seca.

Literatura citada

Alexieva V, Sergiev I, MApelli S, Karanov, E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ* 24, 1337–1344

Ali Q, Ashraf M (2011) Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. *J Agron Crop Sci* 197, 258–271

Anjum SA, Wang L, Farooq M, Xue L, Ali S (2011b) Fulvic acid application improves the maize performance under well-watered and drought conditions. *J Agron Crop Sci* 197, 409–417

Aroca R, Vernieri P, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M, Tognoni F, Pardossi A (2003) Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant Sci* 165, 671–679

Buege JA, Aust S D (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzimology* 52, 302–310

Chugh V, Kaur N, Gupta AK (2011) Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought. *Indian J Biochem Biophys* 48, 47–53

Fan, XW, Li FM, Song L, Xiong YC, An LZ, Jia, Y, Fang XW (2009) Defense strategy of old and modern spring wheat varieties during soil drying. *Physiol Plant* 136, 310–323

Guóth A, Tari I, Gallé A, Csiszár J, Pécsváradi A, Cseuz L, Erdei L (2009) Comparison of the drought stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: changes in flag leaf photosynthetic activity, ABA levels, and grain yield. *J Plant Growth Regul* 28, 167–176

Jiang M, Zhang J (2002) Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta* 215, 1022–1030

Karuppanapandian T, Moon J-C, Kim C, Manoharan K, Kim W (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci* 5, 709–725

Kellos T, Tímár I, Silágyi V, Szalai G, Galiba G, Kocsy G (2008) Stress hormones and abiotic stress have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity. *Plant Biol* 10, 563–572

Moussa HR, Abdel-Aziz SM (2008) Comparative response of drought tolerant and sensitive

maize genotypes to water stress. Aust J Crop Sci 1, 31–36

Queval G, Hager J, Gakière B, Noctor G (2008) Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. J Exp Bot 59, 135–146

Tabela 1 Teor de ácido abscísico (ABA) durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030) com e sem aplicação de ABA exógena.

Tratamento/DAE	1	5	10	1*	5*	10*
Teor de ácido abscísico (ABA) • mol g⁻¹ MF						
DKB estressado	15.83±1.1 b ⁺	17.17±1.3 b	10.30±0.7 c	8.00±0.6 b	9.33±0.7 a	9.00±1.7± a
BRS estressado	13.33±0.7 c	14.66±0.8 b	13.50±0.8 b	12.00±1.5 a	10.00±0.6 a	9.22±0.3 a
DKB estressado+ABA	21.00±0.6 a	20.00±0.6 a	15.33±0.3 b	10.33±0.3 b	12.00±0.6 a	11.61±0.7 a
BRS estressado+ABA	17.34±1.2 b	16.66±0.9 b	21.68±0.9 a	12.29±0.3 a	11.34±1.2 a	12.33±0.3 a
DKB irrigado	10.35±0.3 d	9.66±1.1 d	10.66±0.4 c	10.30±1.3 b	11.00±0.6 a	11.10±1.6 a
BRS irrigado	10.00±0.5 d	10.00±0.5 d	11.31±1.2 c	9.67±0.3 b	10.65±0.3 a	11.23±1.2 a
DKB irrigado+ABA	12.20±0.2 c	11.66±1.0 c	13.00±0.9 b	10.00±0.8 b	11.00±0.1 a	12.34±0.7 a
BRS irrigado+ABA	12.00±0.4 c	12.60±1.2 c	11.66±1.1 c	10.67±0.6 b	12.00±0.6 a	12.20±1.0 a

⁺ Médias seguidas por mesma letra minúscula para os tratamentos, não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade (P•0.05). Cada valor indica a média do tratamento ±S.E e * indicam fase da recuperação hídrica

Tabela 2 Teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030) com e sem aplicação de ABA exógena.

Tratamento/DAE	1	5	10	1*	5*	10*
Teor de peróxido de hidrogênio ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$)						
DKB estressado	174.1 \pm 33 b ⁺	500.00 \pm 11 b	241.22 \pm 15 b	124.33 \pm 37 a	138.00 \pm 09 a	158.37 \pm 34 a
BRS estressado	151.5 \pm 27 b	599.00 \pm 36 a	405.20 \pm 92 a	116.00 \pm 33 a	135.33 \pm 11 a	137.33 \pm 30 a
DKB estressado+ABA	384.3 \pm 94 a	339.91 \pm 59 c	118.66 \pm 14 c	141.02 \pm 30 a	131.00 \pm 08 a	161.33 \pm 16 a
BRS estressado+ABA	188.9 \pm 50 b	460.86 \pm 66 b	314.18 \pm 40 b	147.33 \pm 20 a	149.33 \pm 24 a	130.33 \pm 15 a
DKB irrigado	128.9 \pm 27 b	155.66 \pm 20 d	90.02 \pm 20 c	170.33 \pm 47 a	159.05 \pm 27 a	178.33 \pm 20 a
BRS irrigado	141.3 \pm 28 b	170.60 \pm 37 d	67.89 \pm 51 c	106.33 \pm 04 a	169.00 \pm 23 a	147.67 \pm 26 a
DKB irrigado+ABA	73.7 \pm 18 b	154.44 \pm 38 d	127.38 \pm 19 c	134.00 \pm 12 a	137.33 \pm 16 a	126.30 \pm 07 a
BRS irrigado+ABA	109.1 \pm 38 b	134.00 \pm 25 d	90.98 \pm 39 c	156.45 \pm 06 a	147.00 \pm 06 a	126.00 \pm 06 a

⁺ Médias seguidas por mesma letra minúscula para os tratamentos, não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade (P•0.05). Cada valor indica a média do tratamento \pm S.E e * indicam fase da recuperação hídrica

Tabela 3 Teor malonaldeído (MDA) durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030) com e sem aplicação de ABA exógeno

Tratamento/DAE	1	5	10	1*	5*	10*
Teor de MDA ($\bullet \text{ mol g}^{-1} \text{ MF}$)						
DKB estressado	27.04 \pm 10 a ⁺	112.34 \pm 46 a	150.43 \pm 11 b	20.02 \pm 14 a	53.80 \pm 12 a	50.74 \pm 17 a
BRS estressado	25.45 \pm 12 a	132.99 \pm 15 a	222.85 \pm 38 a	41.61 \pm 32 a	30.49 \pm 16 a	70.81 \pm 27 a
DKB estressado+ABA	27.42 \pm 02 a	71.49 \pm 09 a	88.40 \pm 11 c	51.67 \pm 24 a	65.23 \pm 45 a	11.98 \pm 03 a
BRS estressado+ABA	31.30 \pm 13 a	95.70 \pm 13 a	115.35 \pm 10 b	78.00 \pm 28 a	28.63 \pm 05 a	12.45 \pm 02 a
DKB irrigado	24.30 \pm 11 a	29.67 \pm 09 b	32.51 \pm 08 c	24.68 \pm 10 a	23.50 \pm 05 a	40.62 \pm 18 a
BRS irrigado	24.52 \pm 03 a	18.67 \pm 06 b	17.58 \pm 04 c	58.25 \pm 33 a	13.04 \pm 08 a	22.85 \pm 06 a
DKB irrigado+ABA	35.50 \pm 08 a	22.17 \pm 03 b	40.35 \pm 18 c	22.00 \pm 09 a	50.00 \pm 22 a	06.37 \pm 03 a
BRS irrigado+ABA	49.56 \pm 10 a	22.54 \pm 10 b	28.65 \pm 08 c	31.28 \pm 10 a	49.35 \pm 15 a	12.46 \pm 01 a

⁺ Médias seguidas por mesma letra minúscula para os tratamentos, não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade (P•0.05). Cada valor indica a média do tratamento \pm S.E e * indicam fase da recuperação hídrica.