

Alterações em Pigmentos e Danos em Membranas de Milho Submetido ao Déficit Hídrico.

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

VIANA, MARIA. CELUTA M. ², QUEIROZ, CRISTINA G. S. ³, DURÃES, FREDERICO O. M. ⁴, SOUZA, ISABEL R. P. ⁴, ALBUQUERQUE, PAULO E. P. ⁴ e MACHADO, ROGÉRIO A. F. ⁵.

²EPAMIG, mcviana@uai.com.br; ³UFMG; queiroz@mono.icb.ufmg.br; ⁴Embrapa Milho e Sorgo, fduraes@cnpmis.embrapa.br, isabel@cnpmis.embrapa.br, ⁵UNESP-Botucatu, rmachado@fca.unesp.br

Palavras-chave: estresse hídrico, dano oxidativo, malondialdeído, resistência estomática.

Introdução

O déficit hídrico ocorre na maioria das áreas agricultáveis, sujeitas à distribuição irregular das chuvas sendo um dos fatores ambientais mais importantes na limitação da atividade fotossintética (Boyer, 1996). Em milho, quando o déficit hídrico ocorre na fase de florescimento, as perdas na produção de grãos podem ultrapassar 50% (Durães et al., 1999).

Durante condições de estresse hídrico, a atividade fotossintética decresce principalmente devido ao fechamento dos estômatos. Segundo Allen et al. (1989), a resistência estomática está condicionada também à disponibilidade de água no solo, à luminosidade e às demandas hídricas determinada pelas condições ambientais. À medida que o estresse progride, alterações bioquímicas podem limitar a atividade fotossintética mais diretamente, resultando em danos oxidativos nas células. O estresse por déficit hídrico gera espécies reativas de oxigênio, os quais desencadeiam processos de peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (Smirnov, 1993; Schwanz e Polle, 2001). Price e Hendry (1991) verificaram aumento na produção de lipoperóxidos em diversas espécies de gramíneas submetidas ao déficit hídrico. Entretanto, a peroxidação de lipídios de membrana não é o único evento que reflete os danos oxidativos, pois moléculas de DNA, proteínas e pigmentos também podem ser afetados pelo estresse oxidativo (Smirnov, 1993). Em folhas de trigo submetidas à seca foi observado declínio no conteúdo de luteínas, neoxantinas, beta caroteno, clorofila *a* e na razão *clo a/b* (Loggini et al, 1999).

Este trabalho teve por objetivo avaliar as alterações na peroxidação lipídica, nos pigmentos cloroplastídicos e na resistência estomática na linhagem de milho L13.1.2, submetida a diferentes níveis de déficit hídrico, durante o período de florescimento.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, utilizando a linhagem de milho, L 13.1.2, oriunda do programa de melhoramento de tolerância à seca. Para o tratamento de déficit hídrico as plantas foram submetidas a quatro níveis de água disponível no solo: -0,010 MPa (100% água disponível total, ADT), -0,024 MPa (80% ADT), -0,048 MPa (65% ADT), e -0,10 MPa (50% ADT). O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com três repetições.

O experimento foi conduzido em estufa, em vasos de 20 kg contendo Latossolo Vermelho Amarelo, textura média. Valores de retenção de umidade deste solo foram previamente determinados para se definir a quantidade de água a ser adicionada aos vasos, utilizando um minilímetro de pesagem.

Os tratamentos de déficit hídrico foram impostos na fase de emborrachamento, por meio de controle da irrigação, até a fase de florescimento completo (masculino e feminino).

Para determinação do conteúdo relativo de água, fragmentos de folhas foram pesados imediatamente após a remoção, para obtenção da matéria fresca. Em seguida, os fragmentos foram colocados para flutuar em água deionizada por 24 horas e então pesados, para obtenção da massa túrgida. A seguir, as amostras foram colocadas em estufa a 75°C por 72 horas, para obtenção da matéria seca. A partir desses dados foi calculado o conteúdo relativo de água, de acordo com a fórmula: $CRA = \frac{\text{Massa fresca} - \text{massa seca}}{\text{massa seca}} \times 100$

Massa túrgida – massa seca

As medidas de resistência estomática e transpiração foram realizadas na face abaxial da última folha totalmente expandida, em três plantas por parcela, utilizando-se o porômetro de difusão da LICOR, modelo LI 1600. As leituras foram feitas ao final da imposição do déficit hídrico, no horário compreendido entre 9 e 10 horas.

Para a determinação do teor de clorofilas (*a* e *b*) e carotenóides, uma amostra de 100 mg (MF) do tecido foliar foi retirada e macerada em 5 mL de acetona 80%, completando-se o volume para 10 mL. Os extratos foram centrifugados a 4000 g e as leituras foram realizadas nos comprimentos de onda 470, 646 e 663 nm, segundo procedimento descrito por Lichtenthaler & Wellburn (1983).

A estimativa da peroxidação de lipídios das membranas foi determinada pela medida do conteúdo de malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica. Os níveis de peroxidação lipídica em extrato de folhas de milho foram expressos como teor de MDA, determinado pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Foram maceradas amostras de 200 mg de massa fresca (MF) de tecido foliar em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e polivinil polipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:1,5 (*p/p*). O homogenato foi centrifugado a 4000 g por 30 minutos retirando-se do sobrenadante uma alíquota de 1,0 mL e misturando-se 4,0 mL da mistura TCA 10% contendo TBA (ácido tiobarbitúrico). Essa mistura foi fervida a 95°C por 15 minutos, seguindo-se de rápido resfriamento em gelo. A absorbância do sobrenadante foi lida a 535 e 600 nm segundo procedimento descrito por Dhinda. et al. (1981).

Resultado e Discussão

Os decréscimos no conteúdo relativo de água (CRA) (Figura 1A) foram acompanhados por aumentos na resistência estomática (Figura 1 B) e no conteúdo de malondialdeído (Figura 2B) e por redução no conteúdo das clorofilas *a* e *b* (Figura 2 A). O controle da abertura estomática para restringir os danos aos tecidos, como resultado da limitação de água, é de grande importância para as plantas, sendo um dos primeiros mecanismos de defesa contra a dessecação (Chaves, 1991). Segundo Ludlow e Muchow (1990), alta sensibilidade estomática ao estado hídrico foliar é considerado um atributo desejável para culturas convivendo com limitação hídrica, pois além de reduzir a perda de água e diminuir a probabilidade de dessecação, apresenta reversibilidade quando o estresse hídrico é dissipado. Os dados obtidos

neste trabalho sugerem que a maior resistência dos estômatos às trocas gasosas detectadas a partir do potencial hídrico do solo de -0,048 MPa (Figura 1B), tenha levado a decréscimo na concentração intercelular de CO₂ e redução da assimilação deste gás. Há evidências que sob condições de estresse, com baixa concentração intercelular de CO₂, uma grande proporção do fluxo de elétrons é desviada da assimilação de CO₂ para a redução de O₂. A partir de medidas de parâmetros de fluorescência e cálculo do rendimento quântico do fluxo de elétrons, Cornic e Briantais (1991) concluíram que a alocação de elétrons para o oxigênio aumenta, durante a dessecação foliar, como consequência de decréscimo na concentração intercelular de CO₂. A limitação da absorção de CO₂ pelo déficit hídrico pode, portanto, aumentar a formação de espécies de oxigênio reduzido e, conseqüentemente seu potencial para causar danos ao aparato fotossintético (Lawlor, 1995). Nestas condições, nas folhas de milho sob níveis de estresse mais drástico ocorreu a diminuição na transpiração, paralelo ao processo lipoperoxidativo.

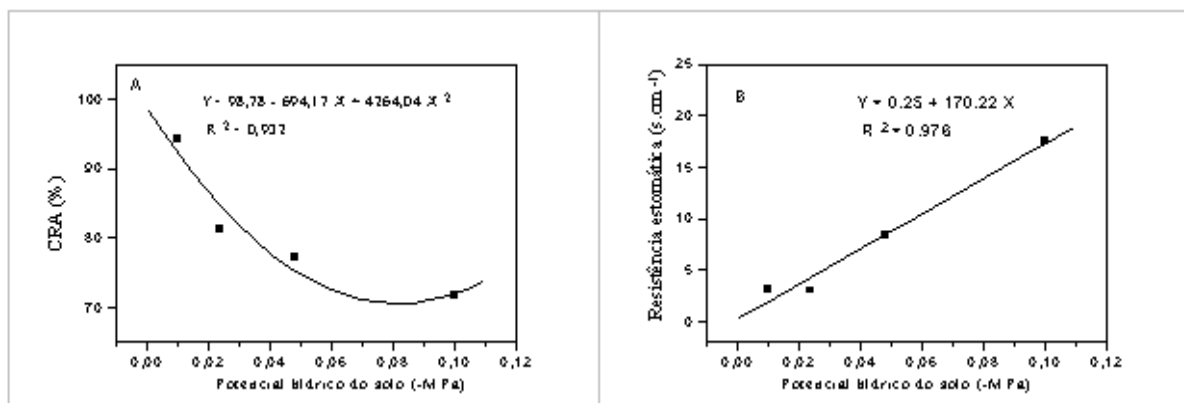


Figura 1. Alterações no conteúdo relativo de água (CRA) (A) e na resistência estomática (B), em folhas de milho da linhagem L13.1.2, em função do potencial hídrico do solo, ao final do período de imposição dos tratamentos. Cada ponto corresponde à média de três repetições. Sete Lagoas. MG. 2000.

O conteúdo dos pigmentos de clorofila (*clo*) nas folhas de milho da linhagem L13.1.2 foi afetado pela seca. Ocorreram reduções no conteúdo de *clo a*, *b*, e total (Figura 2A), quando as plantas foram submetidas ao déficit de água mais severo. Esse efeito foi mais acentuado sobre a concentração da clorofila *a*. Embora os conteúdos de *clo a* e *b* tenham alterado, a razão *clo a/b* não diferiu entre os tratamentos, devido ao declínio proporcional em ambos os tipos de clorofilas. O conteúdo de carotenóides, que inclui carotenos e xantofilas não apresentou diferenças significativas, pelo teste F, em relação ao controle (Tabela 1).

Tabela 2. Conteúdo de carotenóides e razão clorofila a/b e clorofila total/carotenóide de folhas de milho, submetidas a quatro níveis de estresse. Valores representam a média de três repetições. Sete Lagoas. MG. 2000.

Pigmentos	Tratamentos (MPa)			
	-0,010	-0,024	-0,048	-0,010
Clo a/b	3,267	2,677	3,182	2,581
Clo total/carotenóides	18,463	18,518	15,129	15,928
Carotenóides($\mu\text{gmg}^{-1}\text{MS}$)	0,265	0,243	0,299	0,203

A existência de níveis elevados de MDA nos tecidos das folhas de milho da linhagem L13.1.2 (Figura 2B), sob estresse mais drástico indica uma acumulação de radicais livres de oxigênio nas células, desencadeando o processo de peroxidação de lipídios nas membranas. Este estresse mais drástico, -0,10 MPa, induziu um aumento de 23% na concentração de MDA em relação ao controle. Como o MDA é um produto da decomposição de hidroperóxidos de ácidos graxos tri-insaturados, isto indica que no nível de estresse maior, ocorreu um aumento na peroxidação dos lipídios. Estes resultados são consistentes com os de outros autores que demonstraram que o estresse oxidativo mediado pelo $\text{O}_2\bullet$ e H_2O_2 causa aumento de hidroperóxidos, desorganização celular e de membranas cloroplastídicas bem como degradação de clorofila e proteínas (Pastori e Trippi, 1992).

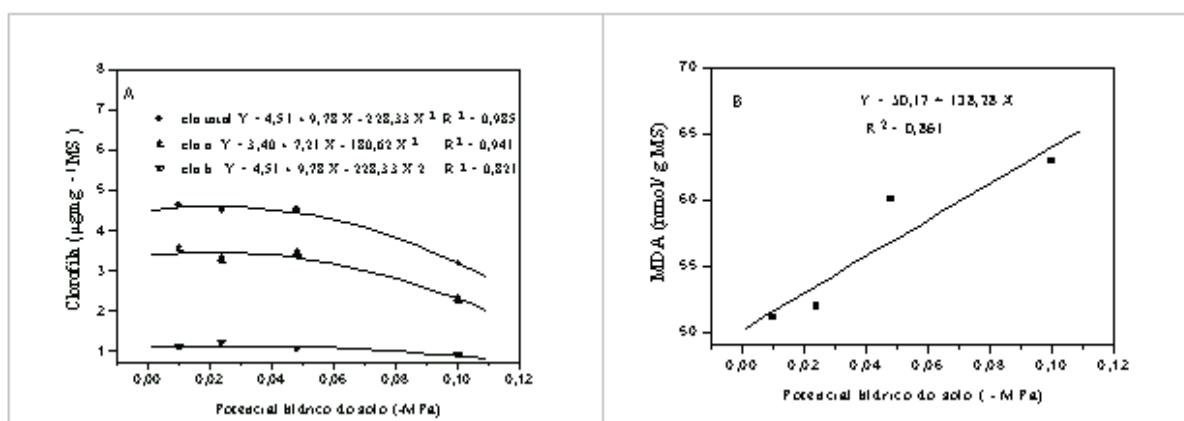


Figura 2. Alterações no conteúdo de clorofilas *a*, *b* e total (A) e na atividade lipoperoxidativa (B), expressa em termos da concentração de malondialdeído (MDA) em folhas de milho da linhagem L13.1.2 em função do potencial hídrico do solo, ao final do período de imposição dos tratamentos. Cada ponto corresponde à média de três repetições. Sete Lagoas, MG. 2000.

A presença de hidroperóxidos lipídicos no interior das membranas celulares perturba consideravelmente a organização destas membranas, devido à sua polaridade, podendo alterar a sua fluidez e permeabilidade (Queiroz et al., 1998), bem como as funções de proteínas presentes nestas membranas (Burdon et al., 1994). Há evidências de que a rigidez das membranas após peroxidação lipídica é devida principalmente à formação de ligações covalentes entre radicais lipídicos adjacentes (Chen e Yu, 1994) que podem levar a um decréscimo na liberdade de movimento das cadeias de ácidos graxos. Estas interações entre cadeias de lipídios de membrana podem também causar o rompimento do arranjo ordenado de lipídios, contribuindo desta forma para vazamento de solutos em membranas (Dhindsa et al., 1981; Burdon, 1994).

Conclusões

A linhagem L13.1.2 apresentou tolerância ao déficit hídrico até o nível de potencial hídrico do solo de $-0,048$ MPa. A partir deste nível, ocorreram manifestações de danos oxidativos nas membranas celulares, acompanhados por decréscimos no conteúdo relativo de água, conteúdo das clorofilas *a*, *b* e total, aumentos na resistência estomática e no conteúdo de malondialdeído, indicando que ocorreu peroxidação de lipídios de membranas.

Literatura Citada

- ALLEN, R.G.; JENSEN, M.E.; WRIGHT, J.L.; BURMAN, R.D. Operational estimates of reference evapotranspiration. **Agronomy Journal**, Madison, v.81, p.650-652, 1989
- BOYER, J.S. Advances in drought tolerance in plants. **Advances in Agronomy**, New York, v.56, p.187-218, 1996.
- BURDON, R.H.; GILL, V.; BOYD, P.A; O'KANE, D. Chilling, oxidative stress and antioxidant enzyme responses in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings Royal Society Edinburg**, London, v.102 B, p.177-185, 1994.
- CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.42, p.1-16, 1991.
- CHEN, G-X; YU, B.P. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. **Free Radicals Biology Medicine**, Oxford, v.17, p.411-418, 1994.
- CORNIC, G.; BRIANTAIS, J.M. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ and O₂ reduction in a C₃ leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentrations and during drought stress. **Planta**, Berlin, v.183, p.178-184, 1991.
- DHINDSA, D.S.; PLUMB-DHINDSA, P.; THORPE, T.A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.32, p.93-101, 1981.
- DURÃES, F.O.M.; MACHADO, R.A.F.; MAGALHAES, P.C.; SANTOS, M.X.; SILVA, R.; MOLINA, M. Adaptação de milho às condições de seca: 1. Caracterização de genótipos contrastantes quanto ao parâmetro fenotípico IFMF. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.11, p.53, 1999. Suplemento.
- LAWLOR, D. W. The effects of water deficit on photosynthesis. In: SMIRNOFF, N. **Environmental and plant metabolism – flexibility and acclimation**. San Diego: Bios Scientific Publishers, 1995. p.129-160.
- LICHTENTHALER, H.K.E.; WELLBURN, A.R. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, London, v.11, p.591-603, 1983.
- LOGGINI, B.; SCARTAZZA, A BRUGNOLI, E.; NAVARI-IZZO, F.. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. **Plant Physiology**, Maryland, v.119, p. 1091-1099, 1999.
- LUDLOW , M.M.; MUCHOW, R.C. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. **Advances in Agronomy**, New York, v.43, p.107-153, 1990.
- PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v.33, n.7, p.957-961, 1992.
- PRICE , A.H.; HENDRY, A. F. Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. **Plant Cell Environment**, Oxford 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 arabica* L. roots. **Biologia Plantarum**, Praha, v.41, n.3, p.403-413, 1998.

SCHWANZ, P.; POLLE, A. Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pendunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentrations. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, n.354, p.133-143, 2001.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, Cambridge, v.125, p.27-58, 1993.

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC
