

## **Aplicação de ABA e atividade antioxidante em dois híbridos de milho contrastantes a seca**

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

<sup>(1)</sup>Universidade Federal de Lavras [thiagonepre@hotmail.com](mailto:thiagonepre@hotmail.com), <sup>(2)</sup>Embrapa Milho e Sorgo [pcesar@cnpms.embrapa.br](mailto:pcesar@cnpms.embrapa.br) e <sup>(3)</sup>Graduando Universidade Federal de São João del Rey e bolsista Funarbe [juninhoiam@yahoo.com.br](mailto:juninhoiam@yahoo.com.br)

**RESUMO** - Para aumentar a produtividade agrícola em áreas com deficiência hídrica é de suma importância induzir tolerância à seca, assim como implementar várias práticas agronômicas e fisiológicas. A aplicação exógena de certas substâncias em plantas com intuito de aumentar a tolerância, tem sido uma prática utilizada e estudada por vários pesquisadores. 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 avaliado em casa de vegetação a atividade de algumas enzimas do sistema antioxidante. 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. Com 5 dias de estresse, o híbrido tolerante em relação ao sensível apresentou maior atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase do ascorbato e do guaiacol. Com 10 dias de estresse DKB 390 diminuiu a atividade das enzimas e o BRS 1030 apresentou maior atividade. A aplicação de ABA está relacionado com uma maior tolerância apenas no DKB 390, devido ao aumento do status hídrico e da atividade enzimática, principalmente a catalase.

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

### **Introdução**

A seca 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 para caminhos de defesa. (Karuppanandia et al., 2011). Para aumentar a produtividade agrícola em áreas com deficiência hídrica é de suma importância induzir tolerância à seca e implementar várias práticas agronômicas e fisiológicas 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 trocas gasosas. Existem alguns trabalhos, com relação à aplicação exógena do ácido abscísico (ABA), em gramíneas (*Cynodon dactylon*) (Lu et al., 2009) e arroz (Ye et al., 2011), contudo em milho a literatura é carente de publicações.

Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar as possíveis modificações da aplicação

exógena de ácido abscísico em aumentar a tolerância à seca em híbridos de milho tolerante e sensível baseado em mudanças fisiológicas como atividade antioxidante enzimática.

### **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<sup>-1</sup> 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 (*Phyto-detec ABA Enzyme Immunoassay Test Kit – Sigma-Aldrich*).

A extração das enzimas foi feita pela maceração de 500 mg de folha em nitrogênio líquido, adicionando-se 1,5 mL do tampão de extração constituído de: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,8 mM PMSF, 1% de PVPP e 1 mM de ácido ascórbico (ASC). O extrato foi centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C no período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises de todas as enzimas. Foi obtida a atividade específica das enzimas utilizando-se o método de Bradford, sendo utilizada uma curva padrão de albumina de soro bovina (BSA).

A atividade da dismutase do superóxido foi avaliada pela capacidade em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977) e a da catalase foi determinada pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm por 3 minutos (Havir e Mchale 1987).

A atividade da peroxidase do ascorbato foi determinada pelo acompanhamento da oxidação do ascorbato a 290 nm por 3 minutos (Nakano e Asada 1981) e a atividade da peroxidase do guaiacol (POD, EC 1.11.1.7) foi determinada pela oxidação do guaiacol a 470 nm segundo Lin e Wang (2002) com modificações.

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.

### **Resultados e Discussão**

O aumento dos dias de estresse hídrico acarretou maior atividade das enzimas tanto no DKB 390 quanto no BRS 1030. Os tratamentos irrigados nos dois híbridos, incluindo também os com aplicação de ABA não diferenciaram suas atividades enzimáticas entre os tratamentos ao longo dos dias de coleta (com algumas exceções) (Fig. 1). Na análise da atividade da superóxido dismutase (SOD) não foram observados diferenças significativas entre os tratamentos no primeiro dia de estresse (Fig. 1A). No quinto dia de estresse houve um

aumento da atividade da SOD nos tratamentos DKB 390 estressado e estressado+ABA. Neste mesmo dia no DKB 390, apesar da aplicação do ABA ter aumentado a atividade da SOD, não houve diferenças significativas no tratamento com e sem aplicação de ABA. No décimo dia de estresse ocorreu uma diminuição da atividade da SOD no DKB 390 estressado e estressado+ABA e um aumento nos tratamentos estressado e estressado com aplicação de ABA no BRS 1030. Na reidratação (recuperação hídrica) não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Fig. 1A).

Não houve diferença entre os tratamentos para a atividade da catalase (CAT) no primeiro dia de estresse hídrico, porém com 5 dias de estresse no tratamento estressado, a atividade do DKB 390 aumentou significativamente e a do DKB 390 com aplicação de ABA apresentou maior média (Fig. 1B). O híbrido BRS 1030 além de ter uma menor atividade da catalase, não apresentou diferenças na atividade com aplicação de ABA. Com 10 dias de estresse hídrico, no tratamento estressado a atividade do DKB 390 diminuiu e a do BRS 1030 aumentou independente da aplicação de ABA. Não houve diferenças na recuperação hídrica (Fig. 1B).

Na atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) não foi verificada diferenças entre os tratamentos no primeiro dia de estresse (Fig. 1C). Com cinco dias no tratamento estressado, o DKB 390 mostrou superioridade na atividade da APX e apesar de maior média, com aplicação de ABA não houve diferenças estatísticas. A aplicação de ABA também elevou a atividade do BRS 1030 (BRS 1030 estressado+ABA) a valores semelhantes ao DKB 390 estressado e estressado+ABA, contudo o tratamento BRS 1030 estressado apresentou a menor atividade. No 10º dia de coleta os tratamentos BRS 1030 estressado e estressado+ABA apresentaram a maior atividade da APX enquanto que DKB 390 estressado+ABA juntamente com os tratamentos irrigados tiveram a menor atividade. Após 24 horas de recuperação hídrica (1\* dia) os tratamentos DKB 390 estressado+ABA, BRS 1030 estressado+ABA e DKB 390 irrigado+ABA apresentaram menor atividade da peroxidase do ascorbato (Fig. 1C).

Da mesma forma que na atividade das enzimas anteriores para a atividade da peroxidase do guaiacol (POD) não houve diferenças no primeiro dia de estresse hídrico (Fig. 1D). Já no quinto dia os tratamentos DKB 390 estressado e estressado+ABA tiveram uma atividade maior que o restante dos tratamentos. No décimo dia de estresse esses mesmos genótipos diminuíram significativamente suas atividades da POD em relação aos tratamentos BRS 1030 estressado e estressado+ABA e também foram iguais a atividade do tratamento BRS 1030 irrigado. Em nenhum dos dias da recuperação hídrica houve diferença entre os

tratamentos (Fig. 1D).

O DKB 390 teve algumas particularidades nas atividades enzimáticas antioxidantes (Fig 1). No início do estresse apresentou alta atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e do guaiacol (POD) e com 10 dias de deficiência hídrica ocorreu uma diminuição da atividade. Apesar de em alguns casos ocorrer maiores médias nas atividades, não houve influência da aplicação de ABA nessas enzimas, exceto para a atividade da CAT, que com a aplicação do ABA elevou sua atividade resultando em valores mais altos principalmente no DKB 390. Uma alta atividade de todas essas enzimas principalmente no quinto dia de estresse está ligada resumidamente, a remoção dos radicais livres (incluindo o  $H_2O_2$ ) através da rota conhecida como via de Halliwell-Asada ou ciclo do ascorbato/glutathione (Apel e Hirt 2004). Com aumento dos dias de estresse (10 dias) o híbrido tolerante apresentou menor atividade enzimática mostrando efetivação do controle do estresse oxidativo enquanto o híbrido sensível BRS 1030 de forma contrária teve baixa atividade enzimática que pode acarretar em altos teores de  $H_2O_2$  e de peroxidação lipídica (teor de MDA). Em arroz (Ye et al., 2011) e em milho (Hu et al., 2005) sob estresse de seca, a aplicação de ABA também elevou a atividade da enzima catalase.

Conclui-se que o DKB 390 apresentou maior capacidade de combater o estresse oxidativo via enzimas antioxidantes e a aplicação de ABA elevou a atividade da catalase.

### Literatura citada

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

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Biol* 55, 373–399

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

Bradford M (1976) Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anual Biochem* 72, 284-252

Giannopolitis, C.N., Ries, S. K., 1977. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309–314.

Guóth A, Tari I, Gallé A, Csiszár J, Pécsvárad 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,

Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84, 450–455

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

Hu XL, Jiang M, Zhang A, Lu J (2005) Abscisic acid-induced apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta* 223, 57–68

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

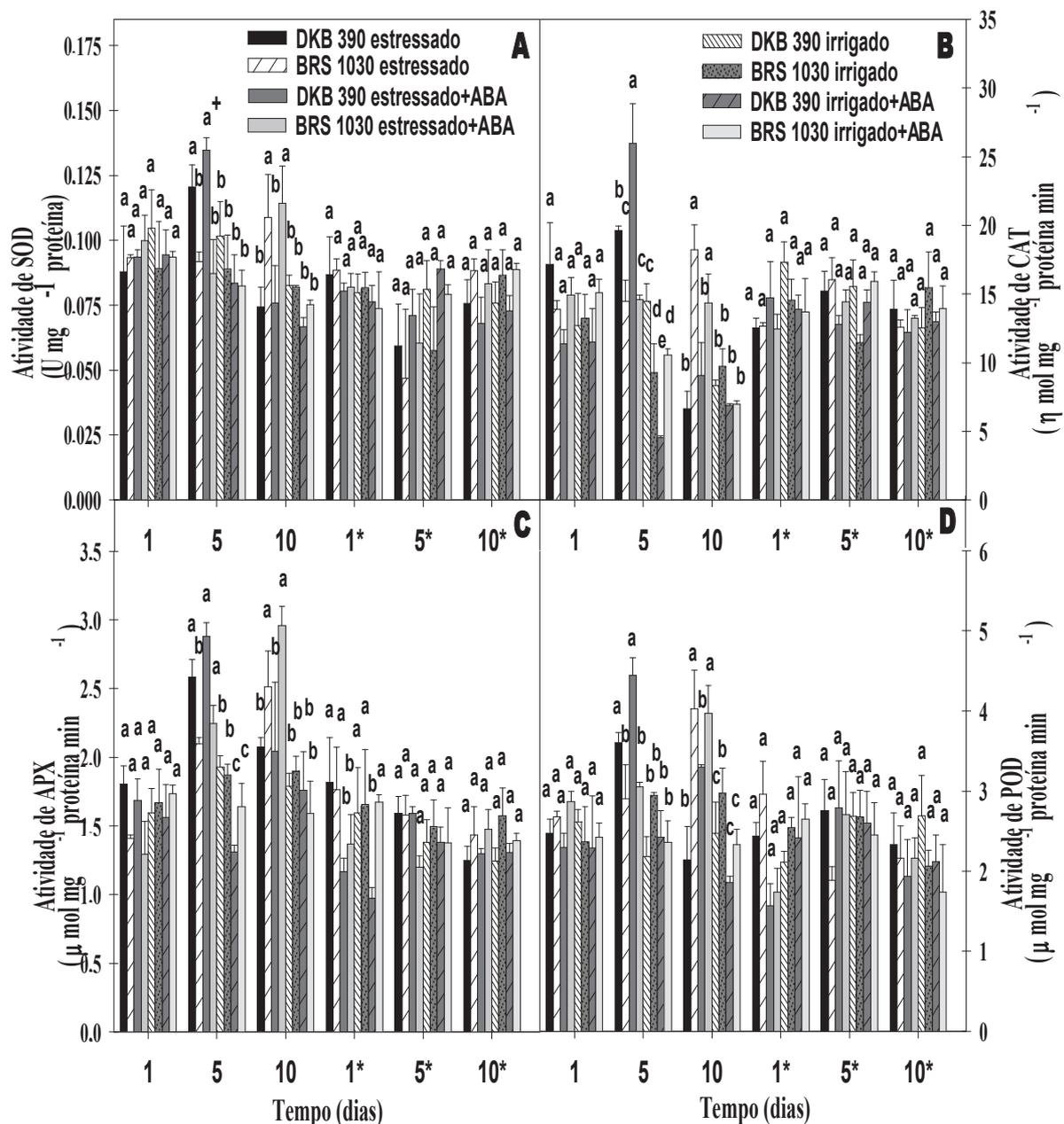
Kellos T, Tímár I, Silágyi V, Szalai G, Galiba G, Kocsy G (2008) Stress hormones and abiotic stress have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity. *Plant Biol* 10, 563–572

Lin J, Wang G (2002) Doubled CO<sub>2</sub> could improve the drought tolerance better in sensitive cultivars than in tolerant cultivars in spring wheat. *Plant Sci* 163, 627–637

Lu S, Su W, Li H, Guo Z (2009) Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and NO-induced antioxidant enzyme activities. *Plant Physiol Bioch* 47, 132–138

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiol* 22, 867–880

Ye N, Zhu G, Liu Y, Li Y, Zhang J (2011) ABA Controls H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation through the induction of OsCATB in rice leaves under water stress. *Plant Cell Physiol* 52, 689–698



**Fig. 1** Atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (POD) 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. \* Médias seguidas por mesma letra em cada dia não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ( $P < 0.05$ ). Cada barra indica a média do tratamento  $\pm$  S.E e \* indicam fase da recuperação hídrica.