

## **Atividade de enzimas antioxidantes em linhagem de milho (*Zea mays* L.)**

### **submetidas a déficit hídrico<sup>1</sup>.**

Maria Celuta Machado VIANA<sup>2</sup>; Cristina Generosa de Senna QUEIROZ<sup>3</sup>; Isabel Regina

Prazeres de SOUZA<sup>4</sup>; Frederico Ozanan Machado DURÃES<sup>4</sup>

<sup>2</sup>. EPAMIG, [mcviana@uai.com.br](mailto:mcviana@uai.com.br); <sup>3</sup>. UFMG/ICB; <sup>4</sup> Embrapa Milho e Sorgo

### **Introdução**

O déficit hídrico ocorre na maioria das áreas agricultáveis, sujeitas a distribuição irregular das chuvas, limitando o desenvolvimento das plantas (Boyer, 1982). A cultura do milho tem sua produtividade grandemente afetada pela falta de água, principalmente quando esta ocorre durante a fase de florescimento, com perdas na produção de grãos podendo ultrapassar 50% (Durães et al., 1999).

Nas plantas submetidas a condições de seca, os processos oxidativos são intensificados devido ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio que causam peroxidação dos lipídeos e danos nos pigmentos, proteínas e ácidos nucleicos (Price e Hendry, 1991; Smirnov, 1993). As plantas podem reduzir a formação de radicais livres e minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo, removendo enzimaticamente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através de enzimas de varredura de radicais livres como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD) e enzimas do ciclo ascorbato/glutathione (Purvis e Shewfelt, 1993). Duas enzimas importantes neste ciclo são a glutathione redutase (GR) e a ascorbato peroxidase (AP).

Diversos autores relatam que a tolerância à seca pode ser correlacionada com aumento de atividade da SOD, GR e CAT (Malan et al., 1990; Pastori e Trippi, 1992; Sgheri et al., 1995; Li et al., 1998). Van Rensburg e Krüger (1994), recomendam o monitoramento da atividade da AP e/ou GR como um possível critério de seleção para cultivares de milho tolerantes a seca.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as mudanças que ocorrem na atividade das enzimas que participam do mecanismo enzimático de defesa antioxidante, em plantas de milho submetidas ao déficit hídrico durante a fase de florescimento.

### **Materiais 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 para o solo utilizado no experimento 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 (estádio V4, segundo Ritchie et al., 1989), por controle da irrigação, até a fase de florescimento completo (masculino e feminino). A folha imediatamente superior à espiga foi coletada para as análises enzimáticas.

**Avaliação da atividade enzimática:** a atividade da ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11) foi determinada de acordo com Nakano e Asada (1981) monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm a 28 °C. A atividade da Catalase (EC 1.11.1.6) foi determinada de acordo com Peixoto et al. (1999). A decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medida acompanhando-se o decréscimo na absorbância a 240 nm a 28 °C. A atividade da glutathione redutase (EC 1.6.4.2) baseou-se no

---

<sup>1</sup> Apoio: Embrapa Milho e Sorgo

método modificado de Cakmak et al. (1993). A oxidação do NADPH foi medida acompanhando-se o decréscimo da absorbância a 340 nm a 28 °C. Não houve necessidade de correção para oxidação de NADPH na ausência de GSSG. A atividade da guaiacol peroxidase (EC 1.11.1.7) foi determinada de acordo com Souza e MacAdam (1998). A formação do tetraguaiacol foi medida seguindo-se o aumento da absorbância a 470 nm a 28 °C.

A concentração protéica no extrato foi determinada pelo método de Bradford (1976), protocolo BIORAD (Hercule, CA, USA) para leitura em placa de Elisa, usando BSA como padrão.

### Resultados e Discussão

A atividade da GR, em folhas de milho, manteve-se inalterada nos tratamentos de 80 e 65% da ADT no solo. Entretanto, o déficit hídrico mais severo, 50% ADT, parece ter induzido estresse oxidativo verificando-se um aumento significativo na atividade desta enzima em relação ao tratamento de 100% da ADT. (Fig. 1A). Resultados semelhantes foram obtidos por Malan et al. (1990) e Pastori e Trippi (1992), em folha de milho. De acordo com Price et al. (1989), o déficit hídrico gera um aumento na produção de  $O_2^*$  e  $H_2O_2$ , inibição da síntese de proteína e aumento na atividade das enzimas capturadoras de  $H_2O_2$ . A enzima GR participa do ciclo ascorbato/glutationa, o qual representa um mecanismo eficiente para detoxificar a célula contra radicais livres de oxigênio.

As atividades da CAT, AP, e POD, não apresentaram alterações significativas nos níveis de déficit hídrico estudados (Fig. 1 – B, C e D).

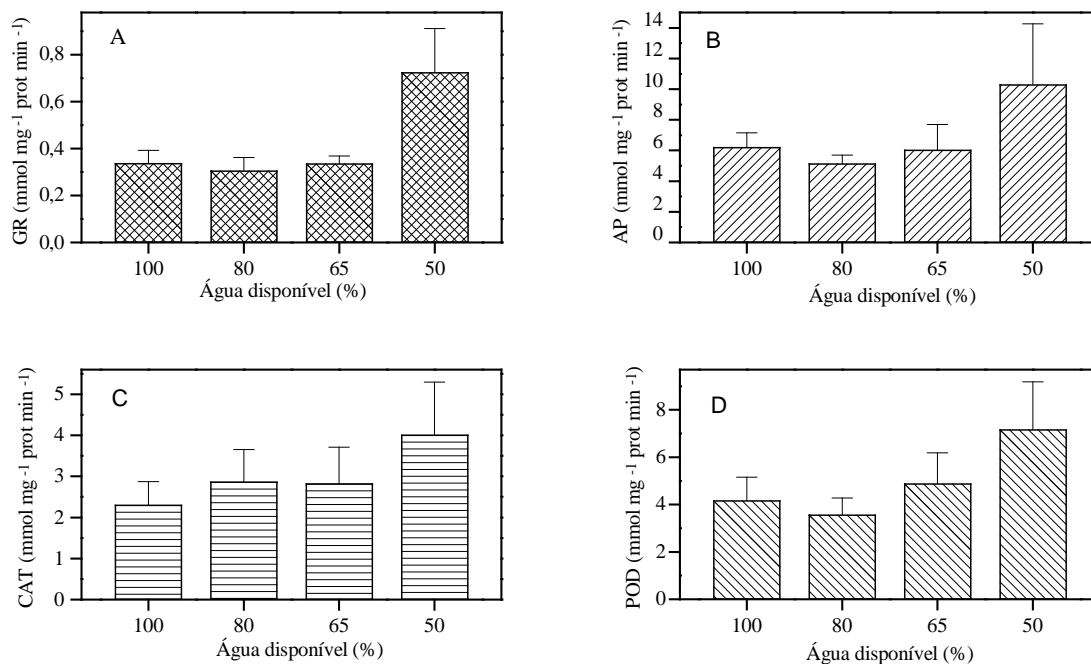


Fig 1. Atividade de glutatona redutase – GR (A), ascorbato peroxidase – AP (B), catalase –CAT (C) e guaiacol peroxidase - POD (D) em folhas de milho submetido a diferentes níveis de água no solo. Médias e erro padrão (SE) de três repetições.

Na fase de desenvolvimento do milho em que as análises foram realizadas, observaram-se alterações significativas na atividade da GR. Porém, as outras enzimas detoxificadoras de radicais livres de oxigênio não apresentaram alterações significativas na sua atividade. Como esta linhagem foi selecionada para tolerância à seca, a indução dos mecanismos de defesa antioxidantes, provavelmente se estabeleceram a partir de um nível de estresse hídrico mais drástico, correspondendo a 50% da ADT, induzindo um aumento significativo na atividade da GR, enzima importante do ciclo Ascorbato/glutationa.

### Referências Bibliográficas

- BOYER, J. S. Plant productivity and environment. *Science*, v.218, p.443-448, 1982
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, v. 72, p.255-250, 1976.
- CAKMAK, I.; STRBAC D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *J. Exp. Bot.* v. 44, p.127-132. 1993
- DURAES, 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(Suplemento). p..53,. Resumo. 1999.
- LI, L.;VAN-STADEN, J.; JAGER, A.K. Effects of plant regulators on the antioxidant system in seedlings of maize cultivars subjected to water stress. *Plant growth Regul.* v.25, n.2, p.81-87, 1998.
- MALAN, C. ; GREYLING, M. ; GRESSEL, J. Correlation between CuZn superoxide dismutase and glutathione reductase and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. *Plant Sci.* , v.69, p.157-166, 1990.
- NAKANO, Y., ASADA, K.. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* v.22, p.867-880, 1981.
- PASTORI, G.M. e TRIPPI, V.S. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain *Plant Cell Physiol.* v.33, n.7, p.957-961, 1992.
- PEIXOTO, P.H.P., CAMBRAIA, J., SABBANA, R., MOSQUIM,R., MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, n.11, v.3, p. 137-143. 1999.
- PRICE, A.H. e HENDRY, G.A.F. Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant Cell Environ.* v.14, p.477-484, 1991.
- PURVIS, A.C.; SHEWFELT, R.L. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiol. Plant.*, v.88, p.712-718. 1993.
- RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. How a corn plant develops. Mas: Iowa State University of Science and Technology,. 21 p. (Special Report, 48), 1989
- SCANDALIOS, J.G.. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* v.101, p. 7-12, 1993.
- SGHERRI, C.L.M. ;NAVARI-IZZO, F. Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defence mechanisms. *Physiol. Plant.* v.93, n. 1, p.25-30, 1995.
- SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* v.125, p.27-58, 1993.
- SOUZA, I.R.P. e MACADAM, J.W. A transient increase in apoplastic peroxidase activity preceds decrease in elongation rate of B73 maize (*Zea mays* L.) leaf blades. *Physiol. Plant.*, v. 104,p.556-562. 1998.
- VAN RENSBURG, L., KRÜGER, G.H. Evaluation of Oxidative stress metabolism for use in selection to drought tolerant cultivars of *Nicotiana tabacum* L. *J. Plant Physiol.*, v.143. p.730-737, 1994.