

Influência do Ácido Abscísico na Atividade Enzimática Antioxidante, nos Parâmetros Hídricos e na Tolerância à Seca em Híbridos de Milho



ISSN 1679-0154

Dezembro, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 53

Influência do Ácido Abscísico na Atividade Enzimática Antioxidante, nos Parâmetros Hídricos e na Tolerância à Seca em Híbridos de Milho

Paulo César Magalhães
Thiago Correa de Souza
Fábio Andrade Padilha

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Flávia Cristina dos Santos Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Paulo César Magalhães

1ª edição

1ª impressão (2012): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Magalhães, Paulo César

Influência do ácido abscísico na atividade enzimática antioxidante, nos parâmetros hídricos e na tolerância à seca em híbridos de milho / Paulo César Magalhães, Thiago Correa de Souza, Fabio Andrade Padilha -- Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012.

40 p. : il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 53).

1. *Zea mays*. 2. Potencial hídrico. I. Souza, Thiago Correa. II. Padilha, Fábio Andrade. III. Série.

CDD 633.15 (21. ed.)

© Embrapa 2012

Sumário

Resumo	5
Introdução	6
Material e Métodos	8
Resultados	15
Discussão	28
Referências	33

Influência do Ácido Abscísico na Atividade Enzimática Antioxidante, nos Parâmetros Hídricos e na Tolerância à Seca em Híbridos de Milho

Paulo César Magalhães¹

Thiago Correa de Souza²

Fábio Andrade Padilha³

Resumo

Estudos relacionados à tolerância à seca estão sendo cada vez mais estratégicos para o Brasil, já que este é o estresse abiótico mais complexo e de maior efeito sobre as culturas. A prática de aplicação de substâncias em plantas com intuito de aumentar a tolerância vem ganhando espaço na pesquisa. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação do ácido abscísico (ABA) no aumento à tolerância à seca em híbridos de milho contrastantes à seca: DKB 390 (tolerante) e BRS 1030 (sensível). Para isso, foi realizada em casa de vegetação a caracterização do status hídrico (potencial hídrico de base Ψ_{pd} , médio Ψ_{md} e do caule Ψ_{st}) e da atividade antioxidante enzimática. Os teores de ABA, de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de malonaldeído (MDA) também foram analisados. A deficiência hídrica foi imposta por 10 dias no estágio de florescimento e uma

¹Eng.-Agr., Phd, Pesquisador em Fisiologia da Produção, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. paulo.magalhaes@embrapa.br

²Pós-doutorando na Unifal, Alfenas, MG. thiagonepre@hotmail.com

³Eng.-Agr., Mestrando em Produção Vegetal, Assistente de Pesquisa A, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. fabio.padilha@embrapa.br

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 menor teor de MDA, menor redução do status hídrico e maior atividade das enzimas superoxidodismutase, catalase, peroxidase do ascorbato e do guaiacol, glutathioneredutase, deidroascorbato redutase, polifenoloxidase e L-fenilalanina amonialiase. Com 10 dias de estresse, o DKB 390 diminuiu a atividade das enzimas e o BRS 1030 apresentou maior atividade, porém, este teve grandes quantidades de H_2O_2 e MDA. A aplicação de ABA levou à maior tolerância apenas no DKB 390, devido ao aumento do status hídrico e da atividade enzimática (principalmente a CAT).

Palavras-chave: *Zea mays* L.; estresse hídrico; estresse oxidativo; ácido abscísico; potencial hídrico; peróxido de hidrogênio; peroxidação lipídica

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; FARRÉ; FACI, 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. Assim, as espécies reativas de oxigênio podem ser vistas como indicadoras celulares do estresse e como mensageiros secundários envolvendo rotas de sinal de transdução, em resposta ao estresse (KARUPPANAPANDIA et al., 2011; MITLER, 2002). Em quantidades exageradas, as espécies reativas de oxigênio podem atacar as membranas lipídicas, levando a formação de um produto final chamado malonaldeído (MDA), pelo processo de peroxidação lipídica (MITLER, 2002).

Na presença tóxica das espécies reativas de oxigênio (ERO), o milho responde ao estresse hídrico produzindo mecanismos de defesa. Um dos mecanismos de defesa é o sistema de desintoxicação antioxidante que consiste de um sistema não enzimático (moléculas de pequeno peso molecular), como glutathione, ácido ascórbico, compostos fenólicos; e de um sistema enzimático composto pelas enzimas superoxidodismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e do guaiacol (POD), glutathioneredutase (GR), monodeidroascorbato redutase (MDHAR), deidroascorbato redutase (DHAR) e polifenoloxidase (PPO) (MITLER, 2002; ALI; ASHRAF, 2011; KARUPPANAPANDIA et al., 2011). Além dessas enzimas, a L-fenilalanina amonialiase tem mostrado importante papel na tolerância a vários estresses (incluindo a seca) devido à sua atividade estar ligada à produção de compostos fenólicos que também são antioxidantes (POURCEL et al., 2006; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ 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 feitas a fim de garantir este propósito (ANJUM et al., 2011b). Uma dessas práticas que vêm ganhando destaque nos últimos tempos é a aplicação exógena de substâncias em plantas. No milho pode-se citar aplicação de várias

moléculas, como ácido ascórbico (DOLATABADIAN e al., 2009), ácido fúlvico (ANJUM et al., 2011b), glinenobetaína (ANJUM et al., 2011a); trealose (ALI; ASHRAF, 2011), pró-oxidantes (DARKÓ et al., 2011), brassinolídeos (ANJUM et al., 2011c) e ácido abscísico (JIANG; 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 relativos à aplicação exógena do ácido abscísico (ABA), em gramíneas (*Cynodondactylon*) (LU et al., 2009) e arroz (YE et al., 2011), contudo, em milho há poucos estudos neste sentido. Estudos evidenciam que o ABA pode estar relacionado com o estresse oxidativo em células de milho (HU et al., 2005). Jiang e Zhang (2002, 2003) observaram em milho um aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e da atividade de enzimas antioxidantes quando submetidas à concentrações variáveis de ABA. Apesar disso, pouco se sabe sobre a interação de ABA com genótipos de milho tolerantes e sensíveis à seca.

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 tolerantes e sensíveis, baseado em mudanças fisiológicas, como parâmetros hídricos e atividade antioxidante enzimática.

Material e Métodos

Material vegetal e condições de crescimento

Foram utilizados dois híbridos contrastantes para tolerância à seca: DKB 390 (tolerante) e 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, Brasil (altitude de 732 m, latitude Sul 19°28', longitude Oeste 44°15'). As médias de temperaturas máxima e mínima registradas durante o período de avaliação foram de 29,2 °C e 22,5 °C, respectivamente. A umidade relativa do ar oscilou entre 52% a 78%. 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-se uma ótima umidade do solo até a imposição do estresse. Todos os tratamentos fitossanitários necessários à cultura foram aplicados.

Imposição do estresse hídrico, aplicação de ABA e design experimental

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 (modelo 200SS – 5", IRROMETER, Califórnia – USA), instalado no centro dos vasos de cada repetição, na profundidade de 20 cm. Estes sensores detectam a tensão de água no solo com base na resistência elétrica e foram acoplados a medidores digitais (Watermark meter) da mesma empresa. Os valores variam de 0 kPa (totalmente úmido) a -200 kPa (muito seco). A reposição hídrica foi realizada com base nas leituras obtidas com o sensor e a água foi repostada até a capacidade de campo (CC) durante o período que antecedeu a imposição dos tratamentos. Esses cálculos foram realizados com o auxílio de uma planilha eletrônica, feita em função da curva de retenção de água do solo.

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 μ M. 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 aplicada nas folhas (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).

Parâmetros de relação hídrica

O potencial hídrico foliar foi determinado através de uma câmara de pressão do tipo Scholander (Soil Moisture Equipment Corp., Modelo 3005, Santa Barbara CA, USA) em quatro folhas totalmente

expandidas por repetição. Foram feitas medidas de potencial hídrico de base (pre-dawn, Ψ_{pd}) às 5 h da manhã, potencial hídrico médio (midday, Ψ_{md}) às 12 h e potencial hídrico do caule (Ψ_{st}). O Ψ_{st} foi feito em folhas sem transpiração, cobertas com papel insulfilm e papel alumínio, uma hora antes das medidas (10h). A cobertura de papel nas folhas impede a transpiração foliar, igualando o potencial hídrico da folha ao do caule; foram escolhidas folhas que estavam sombreadas para evitar estresse por aquecimento (BEGG; TURNER, 1970; CHONÉ et al., 2001).

Extração e quantificação de ABA foliar

Após a coleta dos tecidos foliares, esses foram guardados em freezer a 80 °C até a extração. O método de extração do ABA foliar foi adaptado de Guóth et al. (2009). Quinhentos miligramas de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido, em seguida foram adicionados 5 ml de 80% (v/v) de metanol contendo 0,1% de BHT como um antioxidante. O extrato foi incubado a 4 °C por 4 h e, subsequentemente, centrifugado duas vezes a 4.000 rpm na mesma temperatura. O sobrenadante foi seco em rotaevaporizador em temperatura de 26 °C. Para a quantificação, as amostras foram dissolvidas em tampão TBS (25 mM Tris, 100mMNaCl, 1mM $MgCl_2$ hexaidratado) (1,5 μ L/100⁻¹ mg de amostra) e a detecção foi feita utilizando kits de ensaio imuno-enzimático (Phytodetec ABA EnzymelImmunoassay Test Kit – Sigma-Aldrich).

Extração e quantificação do teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malonaldeído (MDA)

Amostras contendo 250 mg de tecido foliar foram maceradas em nitrogênio líquido, acrescidas de 20% de PVPP, homogeneizadas em 5 mL de tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugadas a 10.000

rpm 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 meio de reação consistiu de 0,5 mL do sobrenadante do extrato, 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e 2 mL de 1 M de iodeto de potássio (KI). A reação foi desenvolvida por uma hora no escuro e a absorbância medida a 390 nm. A concentração de H₂O₂ foi calculada através de uma curva padrão. 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 com Buege e Aust (1978), baseado na reação com ácido tiobarbitúrico. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação (0,5% (m/v) de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA), incubando-se, em seguida, a 95 °C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O teor de MDA foi trabalhado utilizando um coeficiente de extinção de 155 mM cm⁻¹ usando-se a seguinte fórmula: teor de MDA (ηM) = [(A535-A600)/1,56] x 105.

Extração e atividade enzimática

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 14.000 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. A atividade das

enzimas foi expressa por miligramas (mg) de proteínas que foram determinadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

A atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) foi avaliada pela capacidade em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977). A mistura reacional foi constituída de 100 μL de extrato enzimático e 1,9 mL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM , NBT 75 μM , riboflavina 2 μM . A mistura foi iluminada com uma lâmpada de 20 W por 10 minutos. Para o controle foi utilizado a mesma mistura anterior, porém, sem a presença do extrato enzimático e mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e uma unidade de SOD correspondeu à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 240 nm por 3 minutos. A mistura reacional foi incubada a 28 °C e foi constituída de 25 μL de extrato enzimático e 0,975 mL do meio reacional contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) e H_2O_2 12,5 mM. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (HAVIR; MCHALE, 1987).

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada pelo acompanhamento da oxidação do ascorbato a 290 nm por 3 minutos. A mistura reacional foi incubada a 28 °C e foi constituída de 60 μL de extrato enzimático e 0,94 mL do meio reacional contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), H_2O_2 1 mM, L-ácido ascórbico 0,8 mM e água destilada. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (NAKANO; ASADA, 1981).

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. A mistura reacional foi constituída de 20 μL de extrato enzimático e 1,02 mL de meio reacional contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,0), guaiacol 3,24 mM, H_2O_2 3,87 mM. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A análise da atividade da redutase da glutathiona (GR, EC 1.6.4.2) baseou-se no método de Cakmak et al. (1993), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH, com decréscimo na absorbância a 340 nm. A mistura reacional foi incubada a 28 °C, sendo constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 7,8), glutathiona oxidada (GSSG) 0,5 mM, NADPH 0,12 mM e 30 μL do extrato enzimático. Para cálculo da atividade da GR, utilizou-se o coeficiente de extinção molar $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Correções dos extratos foram feitas através da atividade a 340 nm sem NADPH quando necessárias.

A atividade da redutase do deidroascorbato (DHAR, EC 1.15.1.1) foi realizada através de uma mistura reacional contendo 100 μL de extrato enzimático e 1,9 mL de um meio reacional constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), deidroascorbato (DHA) 0,5 mM, glutathiona reduzida (GSH) 1 mM e água destilada. A atividade foi determinada pela redução do DHA a ácido ascórbico via GSH a 265 nm e o coeficiente de extinção molar utilizado foi $14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HOSSAIN; ASADA, 1984).

A atividade da polifenoloxidase (PPO, EC 1.10.3.2) foi acessada através do método proposto por Kar e Mishra (1976) com algumas modificações. Esse método quantifica a formação de purpurogalina a 420 nm. A mistura reacional foi formada por 10 μL de extrato enzimático e 0,990 mL do meio reacional contendo tampão fosfato

de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 10mM e água destilada. A mistura foi incubada a 25 °C por 5 minutos e imediatamente cessou-se a reação pela adição de 0,1 mL de H₂SO₄ 5%.

A atividade da L-fenilalanina amonialiase (PAL, EC 4.3.1.5) foi determinada pela formação de ácido cinâmico a 290 nm (CAHILL; McCOMB, 1992). A mistura reacional compreendeu 25 µL de extrato enzimático e 0,975 mL de meio de reação constituído de tampão borato 67 mM (pH 8.8), L-fenilalanina 33 mM e água destilada. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 104 mM⁻¹ cm⁻¹ e a mistura foi incubada a 30 °C por 1 hora e imediatamente cessou-se a reação pela adição de 33 µL de HCl 6 N.

Análise dos dados

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

Resultados

Monitoramento da umidade do solo

A Figura 1 ilustra a tensão de água no solo em todos os tratamentos. Nos 10 primeiros dias, em todos os tratamentos estressados, tanto no híbrido DKB 390 quanto no BRS 1030, com ou sem aplicação de ABA. Observou-se que os valores de tensão de água no solo variaram entre -139 a -192 kPa (Figs. 1A, 1B). Nesses mesmos tratamentos e considerando os dias de avaliação

das características fisiológicas (1, 5 e 10 dias) observou-se uma diminuição gradativa da tensão de água no solo. Após os 10 dias de deficiência hídrica iniciou-se a reidratação do solo chegando a variações nas leituras entre -10 e -25 kPa, indicando umidade do solo próxima à capacidade de campo (Figs. 1A, 1B). No tratamento irrigado sem aplicação de ABA ocorreu menor controle da umidade tendo maiores variações na tensão do solo (Fig. 1C). No quinto dia observou-se maior tensão (-49 kPa) nos vasos plantados com o BRS 1030. No tratamento irrigado com aplicação de ABA os valores de tensão de água do solo variaram menos e tiveram médias mais próximas da capacidade de campo (Fig. 1D).

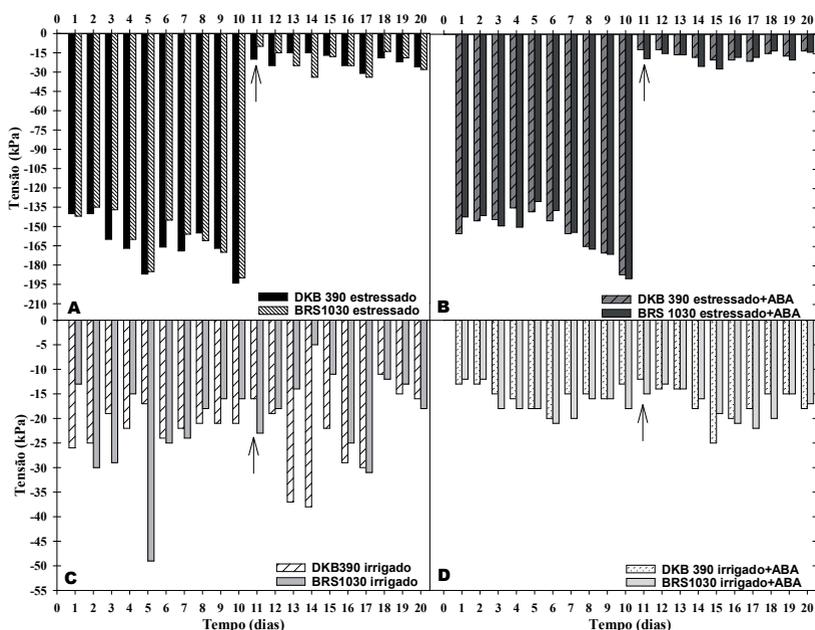


Figura 1. Valores médios da tensão da água no solo medida com sensores Watermark durante a imposição do estresse e recuperação hídrica. (A) DKB 390 e BRS1030 estressados (B) DKB 390 e BRS1030 estressados com aplicação de ABA (C) DKB 390 e BRS1030 irrigados (D) DKB 390 e BRS1030 irrigados com aplicação de ABA. Setas indicam início da recuperação hídrica.

Parâmetros de relação hídrica

Com relação aos parâmetros de relação hídrica, nos tratamentos irrigados, não houve diferenças durante os dias de análises para os dois híbridos, mesmo com a aplicação de ABA. Contudo, para todos os tratamentos com imposição de estresse hídrico, houve uma redução efetiva desses parâmetros quando comparados aos 10 dias seguintes de reirrigação (recuperação hídrica) (Figs. 2A, 2B, 2C).

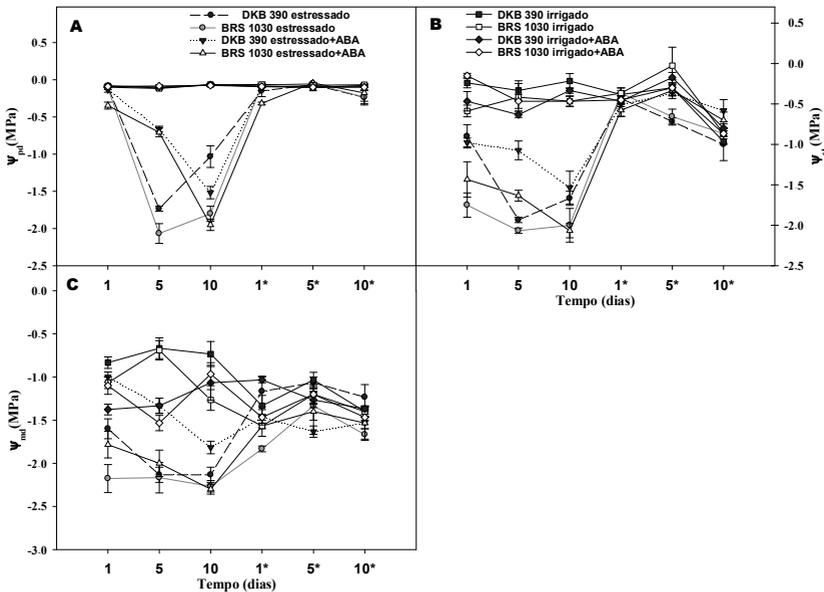


Figura 2. Parâmetros de relação hídrica durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes à seca

Quanto ao potencial hídrico de base (Ψ_{pd}), o híbrido DKB 390 (tolerante) sob tratamento estressado apresentou menor redução do que o híbrido BRS 1030 (sensível) nos dias 1, 5 e 10 de coleta (Fig. 2A). O mesmo comportamento foi observado no DKB sob

estresse com aplicação de ABA (DKB 390 estressado+ABA), tendo menor redução do Ψ_{pd} que o BRS com aplicação de ABA (BRS 1030 estressado+ABA). Para o DKB 390, a aplicação de ABA proporcionou um aumento do potencial hídrico de base (Ψ_{pd}), contudo, para o BRS 1030 isto não ocorreu. No primeiro dia de reidratação, o BRS 1030 estressado+ABA apresentou significativamente menor Ψ_{pd} (-0,31 MPa) (Fig. 2A). Na avaliação do potencial hídrico do caule (Ψ_{st}), foi verificado, nos tratamentos estressados, que a redução foi mais pronunciada no híbrido sensível à seca do que no tolerante. Nos dois híbridos estressados, com aplicação de ABA em relação aos sem aplicação, ocorreu um aumento das médias do Ψ_{st} , sendo que o tolerante se destacou com maior aumento no 5º e 10º dias de estresse e o sensível se destacou com maior aumento no 1º e 5º dias (Fig. 2B). Nos 5 dias de estresse, o tratamento DKB 390 estressado+ABA teve menor redução do potencial hídrico do caule em relação aos outros tratamentos estressados. Observa-se na Figura 2C que no primeiro dia de imposição do estresse o BRS 1030 estressado mostrou menor potencial hídrico médio (Ψ_{md}) (-2,1 MPa). Com a aplicação do hormônio ABA houve uma menor redução do Ψ_{md} em todas as coletas sob estresse (1, 5 e 10 dias), sendo o BRS 1030 com menores médias em relação ao DKB 390 (Fig. 2C). O híbrido sensível à seca BRS 1030 estressado apresentou menor Ψ_{md} no 1º dia de recuperação hídrica.

Teor de ácido abscísico (ABA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA)

Entre os tratamentos, observa-se que no primeiro dia de estresse o DKB 390 estressado e o 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 5° e 10° dia de recuperação hídrica não houve diferenças entre os tratamentos (Tabela 1).

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 5° e 10° dia 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 5° e 10° dia de estresse, quando considerados 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.

No geral, os tratamentos estressados tiveram um aumento no teor de malonaldeído (MDA) e após a recuperação hídrica o teor diminuiu (Tabela 3). No 1° dia de estresse observou-se que não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 3). No 5° dia de estresse, todos os tratamentos estressados, incluindo os com aplicação exógena de ABA, apresentaram um aumento significativo no teor de malonaldeído (MDA), quando comparados com os tratamentos irrigados. E com 10 dias de estresse, o maior teor foi encontrado no tratamento BRS 1030 estressado e o menor foi no DKB 390 estressado+ABA e nos tratamentos irrigados. Não houve diferenças entre os tratamentos nos dias de recuperação hídrica (Tabela 3).

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

Treatamento/DAE	1	5	10	1 [*]	5 [*]	10 [*]
	Teor de ácido abscísico (ABA) pmol 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	9.001.7± 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 (H_2O_2), durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes à seca (DKB 390 e BRS 1030), com e sem aplicação de ABA exógeno.

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

⁺ Médias seguidas por mesma letra minúscula para os tratamentos não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). 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 à seca (DKB 390 e BRS 1030), com e sem aplicação de ABA exógeno.

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

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

Atividade enzimática

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 logicamente não diferenciaram suas atividades enzimáticas entre os tratamentos ao longo dos dias de coleta (com algumas exceções) (Figs. 3, 4). Na análise da atividade da superóxido dismutase (SOD) não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos no 1° dia de estresse (Fig. 3A). No 5° dia de estresse, houve um aumento da atividade da SOD nos tratamentos DKB 390 estressado e estressado+ABA. Nesse mesmo dia, no DKB 390, apesar de a aplicação do ABA ter aumentado a atividade da SOD, não houve diferenças significativas no tratamento com e sem aplicação de ABA. No 10° 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. 3A).

Não houve diferença entre os tratamentos para a atividade da catalase (CAT) no 1° 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. 3B). 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. 3B).

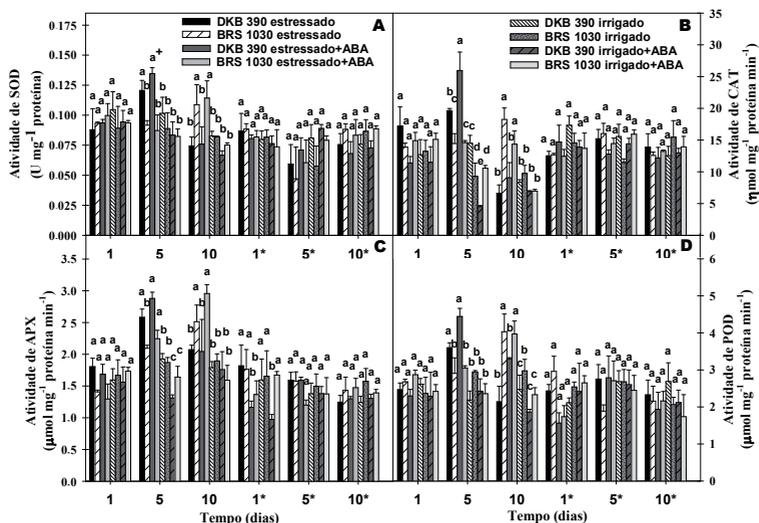


Figura 3. Atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (POD) durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes à seca (DKB 390 e BRS 1030), com e sem aplicação de ABA exógeno. * Médias seguidas por mesma letra em cada dia não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E e * indicam fase da recuperação hídrica.

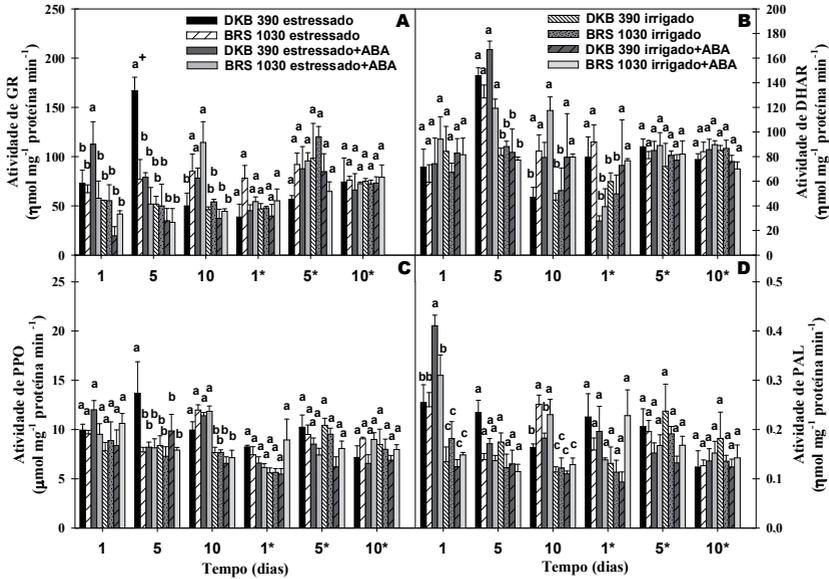


Figura 4. Atividade da glutionaredutase (GR), deidroascorbatoresutase (DHAR), polifenol oxidase (PPO) e L-fenilalanina amonialiase (PAL) durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes à seca (DKB 390 e BRS 1030), com e sem aplicação de ABA exógeno. * Médias seguidas por mesma letra em cada dia não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E e * indicam fase da recuperação hídrica.

Na atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) não foram verificadas diferenças entre os tratamentos no 1° dia de estresse (Fig. 3C). 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 10° dia de coleta, os tratamentos BRS 1030 estressado e estressado+ABA apresentaram a maior atividade da APX e DKB-estressado, 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. 3C).

Da mesma forma que na atividade das enzimas anteriores para a atividade da peroxidase do guaiacol (POD), não houve diferenças no 1° dia de estresse hídrico (Fig. 3D). Já no 5° dia, os tratamentos DKB 390 estressado e estressado+ABA tiveram uma atividade maior que o restante dos tratamentos. No 10° 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 à atividade do tratamento BRS 1030 irrigado. Em nenhum dos dias da recuperação hídrica houve diferença entre os tratamentos (Fig. 3D).

No primeiro dia de estresse hídrico observou-se que a atividade da glutationaredutase (GR) foi maior no DKB 390 estressado+ABA em relação aos outros tratamentos (Fig. 4A). No 5° dia, a atividade da GR foi significativamente maior no DKB 390 estressado e

no 10° dia foram os tratamentos BRS 1030 estressado, DKB 390 estressado+ABA e BRS 1030 estressado+ABA que tiveram maior atividade. Não foram observadas diferenças nos dias de recuperação hídrica (Fig. 4A).

Para as médias da atividade da deidroascoratorredutase (DHAR), no 1° dia de estresse hídrico, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, porém, no 5° dia de estresse, os tratamentos estressados e estressados com aplicação de ABA, para os dois híbridos, tiveram uma atividade significativamente mais pronunciada do que os tratamentos irrigados (Fig. 4B). No 10° dia de estresse, DKB 390 estressado, DKB 390 e o BRS 1030 irrigado apresentaram as menores médias. No 1° dia de recuperação hídrica, o DKB 390, o BRS 1030 estressado, o DKB 390 e o BRS 1030 irrigado+ABA apresentaram as maiores médias (Fig. 4B).

Na atividade da enzima polifenol oxidase (PPO) foram observadas diferenças significativas apenas no 5° e 10° dias de estresse (Fig. 4C). No 5° dia, a maior atividade da PPO foi verificada no DKB 390 estressado. Já no 10° dia, os tratamentos dos dois híbridos estressados, incluindo os estressados com aplicação de ABA, apresentaram maior atividade do que os tratamentos irrigados (Fig. 4C).

O DKB 390 estressado+ABA apresentou a maior atividade da L-fenilalanina amonialiase (PAL), no 1° dia de estresse (Fig. 4D). Em seguida, os tratamentos DKB 390, BRS 1030 estressado e BRS 1030 estressado+ABA apresentaram as segundas maiores médias e, finalmente, os tratamentos irrigados tiveram as menores. Com 5 dias de estresse, nenhum tratamento se diferenciou significativamente e, com 10 dias, o BRS 1030 estressado e estressado+ABA tiveram uma atividade da PAL maior em relação ao

DKB 390 estressado e estressado+ABA (Fig. 4D).

Discussão

Uma das dificuldades em experimentos envolvendo a seca é a qualidade do monitoramento da umidade do solo. Foi observado neste trabalho que durante os 10 dias de restrição hídrica, a umidade foi igual ou menor a 50% da capacidade total de água disponível no solo (Fig. 1), significando a presença de um estresse que pode ser descrito como entre moderado nos primeiros dias (1 e 5 dias) e severo nos últimos (10 dias) (BETTAIEB et al., 2011).

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

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, inclusive a seca (JIANG; ZHANG, 2002; LU et al., 2009). 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; BANO; YASMEEN, 2010). Ainda a aplicação de ABA na parte aérea aumentou o teor de ABA nas folhas dos dois híbridos, porém, 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. Da mesma forma, em algumas gramíneas, menor acumulação de ABA foi encontrada em genótipos tolerantes à seca no final do estresse (COSTA; HUANG, 2007). 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).

A perda de água em células, tecidos e órgãos, devido ao estresse hídrico, é bem discutida na literatura (FAROOQ et al., 2009). Muitas investigações têm mostrado que, quando plantas de milho são submetidas à seca, ocorre uma grande redução no potencial hídrico, assim, um controle do status hídrico é importantíssimo para a sobrevivência e tolerância nos ambientes com pouca umidade no solo (MÉDICLI et al., 2003; ALI;ASHRAF, 2011). Com relação aos parâmetros de relação hídrica avaliados, observa-se claramente uma maior recuperação do status hídrico noturno (devido ao maior Ψ_{pd}) e maior status hídrico diurno (devido a maiores médias de Ψ_{st} e Ψ_{md}) no híbrido tolerante (DKB 390) em relação ao híbrido sensível (BRS 1030) (Fig. 2). Em relação ao status hídrico, o híbrido DKB 390, sob estresse, respondeu mais (foi mais sensível) à aplicação de ABA e manteve um maior status hídrico do que sem aplicação do hormônio. Um maior status evidenciado no híbrido tolerante com aplicação do ABA pode ter sido devido à função desse hormônio de aumentar a condutividade hidráulica, favorecendo uma melhor hidratação dos tecidos. O balanço de ABA raiz/parte aérea influencia o status hídrico das plantas (KUDOYAROVA et al., 2011). Como relatado anteriormente, foi observado nas folhas de milho um aumento do teor de ABA endógeno com a aplicação de ABA na parte aérea (Tabela 1). De acordo com Christmann et al. (2005), o ABA na parte aérea acumula-se principalmente nos tecidos vasculares e em seguida nas células guardas. Assim, como relatado

por Kudoyarova et al. (2011), em trabalhos com trigo, no híbrido DKB 390, o acúmulo de ABA nas folhas sugere que o ABA poderia ser facilmente transportado via tecidos vasculares para as raízes aumentando a condutividade hidráulica e favorecendo o status hídrico da parte aérea. Apesar de o potencial hídrico do caule (Ψ_{st}) ser mais utilizado em outras culturas, como a uva (CHONÉ et al., 2001), vale ressaltar aqui que este parâmetro mostrou ser um bom indicador do estresse hídrico também para milho.

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, pois teve o tratamento BRS 1030 estressado um pronunciado aumento em relação aos outros tratamentos e a aplicação de ABA parece ter atenuado 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 foi 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 (MOLLER et al., 2007). Com o aumento do estresse hídrico é notória 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.

Em milho, baixo teor de malonaldeído (MDA) tem sido associado com 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. Quando foram comparados os tratamentos, é interessante perceber que, com 10 dias de estresse, onde o teor de água no solo foi mais baixo, ocorreram maiores médias de teor de MDA. 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 , observada 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; 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).

O DKB 390 teve algumas particularidades nas atividades enzimáticas antioxidantes (Figs. 3, 4). No início do estresse, ele apresentou alta atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e do guaiacol (POD) e deidroascorbato redutase (DHAR) e, com 10 dias de deficiência hídrica, ocorreu uma diminuição da atividade. Apesar de, em

alguns casos, ocorrerem 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. A glutathionaredutase (GR), enzima importante na reciclagem da glutathiona em condições de estresse (SZALAI et al., 2009), foi a única enzima que exibiu diferenças entre os tratamentos (destacando-se o DKB 390-estressado-ABA) logo no primeiro dia de estresse. Uma alta atividade de todas essas enzimas, principalmente no 5° dia de estresse, está ligada, resumidamente, à remoção dos radicais livres (incluindo o H_2O_2) através da rota conhecida como via de Halliwell-Asada ou ciclo do ascorbato/glutathiona (APEL; 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, o que pode ter acarretado os altos teores de H_2O_2 e de peroxidação lipídica (teor de MDA).

No DKB 390, com relação à aplicação de ABA (DKB 390 estressado+ABA), houve um aumento do teor de ABA e de H_2O_2 , no 1° dia de estresse, seguido de um aumento da atividade enzimática da catalase, no 5° dia, que podem ser explicados do seguinte modo: o tratamento exógeno com ABA pode aumentar o teor de ABA interno e isto leva a um acúmulo de H_2O_2 , que é uma molécula sinalizadora para ativação de enzimas antioxidantes. Esta explicação foi demonstrada em arroz (avaliando a atividade da CAT) (YE et al., 2011) e também em milho (avaliando a atividade da CAT e outras enzimas) (JIANG; ZHANG, 2002; HU et al., 2005).

A polifenoloxidase (PPO), juntamente com a peroxidase do guaiacol (POD), pode agir em difenóis e fenóis para a produção de outros

compostos fenólicos importantes na varredura de radicais livres, como os flavonoides (POURCEL et al., 2006). Alguns estudos com gergelim (*Sesamum indicum* L.) evidenciaram maior atividade da PPO em genótipos tolerantes em comparação aos sensíveis (FAZELI et al., 2007), contudo, nos resultados mostrados nesse trabalho não ocorreram diferenças entre os híbridos contrastantes à seca. Foi verificado um aumento da atividade da L-fenilalanina amonialiase (PAL) pelo DKB 390 no primeiro dia de estresse. Esses dados são semelhantes ao encontrado por Hura et al. (2008), em que genótipos tolerantes de milho tiveram maior atividade da PAL. Uma atividade alta da PAL no início do estresse pode ser importante também para uma produção rápida de compostos fenólicos, aumentando a proteção contra o estresse oxidativo (HURA et al., 2008; GHOLIZADEH, 2010).

Conclui-se com base nesta pesquisa que ocorreram significativas diferenças nas características fisiológicas relacionadas à tolerância à seca entre os dois híbridos contrastantes à seca; o DKB 390 apresentou maior capacidade de manter o status hídrico e de combater o estresse oxidativo, via enzimas antioxidantes; e foi mais responsivo à aplicação de ABA, que levou ao aumento da tolerância à seca.

Referências

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 24, p. 1337-1344, 2001.

ALI, Q.; ASHRAF, M. Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth,

photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, p. 258-271, 2011.

ANJUM, S. A.; FAROOQ, M.; WANG, L. C.; XUE, L. L.; WANG, S. G.; WANG, S.; ZHANG, S.; CHEN, M. Gas exchange and chlorophyll synthesis of maize cultivars are enhanced by exogenously-applied glycinebetaine under drought conditions. **Plant, Soil and Environment**, v. 57, p. 326-331, 2011a.

ANJUM, S. A.; WANG, L.; FAROOQ, M.; XUE, L.; ALI, S. Fulvic acid application improves the maize performance under well-watered and drought conditions. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, p. 409-417, 2011b.

ANJUM, S. A.; WANG, L. C.; FAROOQ, M.; HUSSAIN, M.; XUE, L. L.; ZOU C. M. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, p. 177-185, 2011c.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

AROCA, R.; VERNIERI, P.; IRIGOYEN, J. J.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M.; TOGNONI, F.; PARDOSSI, A. Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. **Plant Science**, Limerick, v. 165, p. 671-679, 2003.

BANO, A.; YASMEEN, S. Role of phytohormones under induced drought stress in wheat. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, p. 2579-2587, 2010.

BEGG, J. E.; TURNER, N. C. Water potential gradients in field tobacco. **Plant Physiology**, Washington, v. 46, p. 343-346, 1970.

BETTAIEB, I.; HAMROUNI-SELLAMI, I.; BOURGOU, S.; LIMAM, F.; MARZOUK, B. Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 1103-1111, 2011.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BRADFORD, M. Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 284-252, 1976.

CAHILL, D. M.; McCOMB, J. A. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Orlando, v. 40, p. 315-332, 1992.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germination wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 44, p. 127-132, 1993.

CHRISTMANN, A.; HOFFMANN, T.; TEPLOVA, I.; GRILL, E.; MULLER, A. Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 137, p. 209-219, 2005.

CHONÉ, X.; LEEUWEN, C. V.; DUBOURDIEU, D.; GAUDILLERE, J. P. Stem water potential is a sensitive indicator of grapevine water status. **Annals of Botany**, London, v. 87, p. 477-483, 2001.

CHUGH, V.; KAUR, N.; GUPTA, A. K. Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, New Delhi, v. 48, p. 47-53, 2011.

COSTA, M.; HUANG, B. Drought survival and recuperative ability of bentgrass species associated with changes in abscisic acid and cytokinin production. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 132, p. 60-66, 2007.

DARKÓ, É.; FODOR, J.; DULAI, S.; AMBRUS, H.; SZENZENSTEIN, A.; KIRÁLY, Z.; BARNABÁS, B. Improved cold and drought tolerance of doubled haploid maize plants selected for resistance to prooxidant tert-butyl hydroperoxide. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, p. 454-465, 2011.

DOLATABADIAN, A.; MODARRES-SANAVY, S. A. M.; SHARIFI, M. Alleviation of water deficit stress effects by foliar application of ascorbic acid on *Zea mays* L. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 195, p. 347-355, 2009.

FAN, X. W.; LI, F. M.; SONG, L.; XIONG, Y. C.; AN, L. Z.; JIA, Y.; FANG, X. W. Defense strategy of old and modern spring wheat varieties during soil drying. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 136, p. 310-323, 2009.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOKAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management.

Agronomy for Sustainable Development, Paris, v. 29, p. 185-212, 2009.

FARRÉ, I.; FACI, J. M. Deficit irrigation in maize for reducing agricultural water use in a mediterranean environment. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 96, p. 383-394, 2009.

FAZELI, F.; GHORBANLI, M.; NIKNAM, V. Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 51, p. 98-103, 2007.

GHOLIZADEH, A. Anti-oxidation profile in the leaves of maize inbreds: elevation in the activity of phenylalanine ammonia lyase under drought stress. **Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 137-145, 2010.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 59, p. 309-314, 1977.

GUÓTH, A.; TARI, I.; GALLÉ, A.; CSISZÁR, J.; PÉCSVÁRADI, A.; CSEUZ, L.; ERDEI, L. 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. **Journal of Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 28, p. 167-176, 2009.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 84, p. 450-455, 1987.

HOSSAIN, M. A.; ASADA, K. Purification of dehydroascorbatereductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 25, p. 85-92, 1984.

HU, X. L.; JIANG, M.; ZHANG, A.; LU, J. Abscisic acid-induced apoplasmic H_2O_2 accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. **Planta**, Berlin, v. 223, p. 57-68, 2005.

HURA, T.; HURA, K.; GRZESIAK, S. Contents of total phenolics and ferulic acid, and PAL activity during water potential changes in leaves of maize single-cross hybrids of different drought tolerance. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, p. 104-112, 2008.

JIANG, M.; ZHANG, J. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 929-939, 2003.

JIANG, M.; ZHANG, J. Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. **Planta**, Berlin, v. 215, p. 1022-1030, 2002.

KAR, M. E.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 57, p. 315-319, 1976.

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J. C.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian**

Journal of Crop Science, v. 5, p. 709-725, 2011.

KELLOS, T.; TÍMÁR, I.; SILÁGYI, V.; SZALAI, G.; GALIBA, G.; KOCSY, G. Stress hormones and abiotic stress have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 10, p. 563-572, 2008.

KUDOYAROVA, G.; VESELOVA, S.; HARTUNG, W.; FARHUTDINOV, R.; VESELOV, D.; SHARIPOVA, G. Involvement of root ABA and hydraulic conductivity in the control of water relations in wheat plants exposed to increased evaporative demand. **Planta**, Berlin, v. 233, p. 87-94, 2011.

LIN, J.; WANG, G. Doubled CO₂ could improve the drought tolerance better in sensitive cultivars than in tolerant cultivars in spring wheat. **Plant Science**, Limerick, v. 163, p. 627-637, 2002.

LU, S.; SU, W.; LI, H.; GUO, Z. Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂- and NO-induced antioxidant enzyme activities. **Plant Physiology and Biochemistry**, Kalyani, v. 47, p. 132-138, 2009.

MÉDICI, L. O.; MACHADO, A. T.; AZEVEDO, R. A.; PIMENTEL, C. Glutamine synthetase activity relative water content and water potential in maize submitted to drought. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 47, p. 301-304, 2003.

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

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of**

Plant Biology, Palo Alto, v. 58, p. 459-481, 2007.

MOUSSA, H. R.; ABDEL-AZIZ, S. M. Comparative response of drought tolerant and sensitive maize genotypes to water stress. **Australian Journal of Crop Science**, v. 1, p. 31-36, 2008.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 22, p. 867-880, 1981.

POURCEL, L.; ROUTABOUL, J. M.; CHEYNIER, V.; LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, p. 29-36, 2006.

QUEVAL, G.; HAGER, J.; GAKIÈRE, B.; NOCTOR, G. Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 59, p. 135-146, 2008.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E.; MORENO, D. A.; FERRERES, F.; RUBIO-WILHELMI, MDELM, M.; RUIZ, J. M. Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. **Phytochemistry**, New York, v. 72, p. 723-729, 2011.

SZALAI, G.; HELLOS, T.; GALIBA, G.; KOCSY, G. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under stress conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 28, p. 66-80, 2009.

YE, N.; ZHU, G.; LIU, Y.; LI, Y.; ZHANG, J. ABA Controls H₂O₂ accumulation through the induction of OsCATB in rice leaves under water stress. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 52, p. 689-698, 2011.

Embrapa

Milho e Sorgo



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA