



THIAGO CORRÊA DE SOUZA

**APLICAÇÃO DE ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA) E
CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E
ANATÔMICA EM DOIS HÍBRIDOS DE MILHO
CONTRASTANTES AO ESTRESSE DE SECA**

LAVRAS - MG

2012

THIAGO CORRÊA DE SOUZA

**APLICAÇÃO DE ÁCIDO ABCÍSIICO (ABA) E CARACTERIZAÇÃO
FISIOLÓGICA E ANATÔMICA EM DOIS HÍBRIDOS DE MILHO
CONTRASTANTES AO ESTRESSE DE SECA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador
Dr. Evaristo Mauro de Castro

Coorientador
Dr. Paulo César Magalhães

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Souza, Thiago Corrêa de.

Aplicação de ácido abscísico (ABA) e caracterização fisiológica e anatômica em dois híbridos de milho contrastantes ao estresse de seca / Thiago Corrêa de Souza. – Lavras : UFLA, 2012.

133 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro.

Bibliografia.

1. *Zea mays* L. 2. Estresse hídrico. 3. Aerênquima. 4. Trocas gasosas. 5. Fluorescência da clorofila. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.92

THIAGO CORRÊA DE SOUZA

**APLICAÇÃO DE ÁCIDO ABCÍSIICO (ABA) E CARACTERIZAÇÃO
FISIOLÓGICA E ANATÔMICA EM DOIS HÍBRIDOS DE MILHO
CONTRASTANTES AO ESTRESSE DE SECA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 13 de fevereiro de 2012.

Dr. Paulo César Magalhães	Embrapa Milho e Sorgo
Dr. Moacir Pasqual	UFLA
Dr. Sandro Barbosa	UNIFAL-MG
Dra. Ana Rosa Ribeiro Bastos	UFLA

Dr. Evaristo Mauro de Castro
Orientador

LAVRAS – MG

2012

A minha namorada Sheyla e a minha família que são em grande parte responsáveis por este novo momento de vitórias

OFEREÇO

Ao pesquisador Dr. Paulo César Magalhães e ao professor Dr. Evaristo Mauro de Castro cientistas fundamentais no meu crescimento profissional e humano

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus que incessantemente olha por mim, guia meus passos e ensina-me que sempre há uma solução.

Aos meus pais, exemplo de luta, humildade e amor.

A Lucimara e Milton Sérgio, por serem aqueles com os quais eu sempre aprendo algo novo.

As minhas sobrinhas, Ana Caroline e Isadora e minha cunhada Suelva, por sempre trazerem alegrias em meu coração.

As minhas avós: “Vó” Lucy e “Vó” Maria, que foram e são exemplos de perseverança na vida e a todos os tios(as) e primos (as) que torcem por mim.

A minha namorada Sheyla, por viver comigo a Palavra: “O amor é paciente, é bondoso; o amor não é invejoso, não é arrogante, não se ensoberbece, não é ambicioso, não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não guarda ressentimento pelo mal sofrido, não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade; tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta”.

Aos meus amigos(as) de Nepomuceno, Lavras e Alfenas, que são parte integrante da minha história e estão sempre guardados na memória e no coração.

Aos meus amigos (as) e companheiros (as) de sala de aula da Fisiologia Vegetal com que, nesse tempo, convivi e que fizeram este doutorado diferente.

Aos meus amigos que tiveram mais próximos de mim nestes últimos 3 anos e foram muito especiais: Claudinha, Cris, Pe. João Francisco, Marco Túlio, Lilian, Lucão, Pe. Noel, Rafael, Rodrigo, amigos das SMP.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal, na pessoa do coordenador Antônio Chalfun e do subcoordenador Renato Paiva, pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

Aos meus orientadores, Dr. Paulo César Magalhães e Dr. Evaristo Mauro de Castro, pelos exemplos de humildade, por toda a atenção, apoio, amizade e conselhos oferecidos durante estes anos.

À pesquisadora da EPAMIG Uva e Vinho: Cláudia Rita de Souza pela grande contribuição nos trabalhos.

Aos professores: Luiz Edson, Ângela, Daniel, Renato Mendes, Eduardo, Amauri, por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários técnico-administrativos da UFLA: Joel, Lena, Evaristo, Ana Cristina, D'Artagnan, Emanuelle, Joyce, Barrinha e Odorêncio.

Aos funcionários da Embrapa Milho Sorgo: Fábio, Rodrigo, Gilberto, Dédé, Edna, Hosana, e José Eduardo, por toda ajuda e pela simpatia sempre constante.

Aos bolsistas da Embrapa Milho e Sorgo e da UFLA: Carlos César Júnior, Elícia Trindade Alves e João Augusto Reis pela grande ajuda no laboratório.

Aos professores da UNIFAL-MG: Marcelo Henrique, Márcia Paranho, Marcelo Polo, Maria José, Sandro, Maria Ângela pelos conselhos, incentivo e amizade.

A Lindaura e Pedro por me acolherem tão bem em Sete Lagoas-MG e serem verdadeiros amigos.

Aos companheiros de república e da pensão Marcão, Rita, Laércio, Rubens, Séverin, Leandro e Diogo pela amizade e grandes ensinamentos.

Aos meus amigos e companheiros do Grupo de Partilha dos Profissionais São Benedito e do Ministério Universidades Renovadas da Renovação Carismática Católica de Lavras, pelas orações e amor mútuo.

A todos que, de forma direta ou indireta, participaram deste encerramento de mais um “degrau” de minha vida e que não foram citados aqui, mas Deus sabe e traz a recompensa.

“O desenvolvimento não se reduz a um simples crescimento econômico. Para ser autêntico, deve ser integral, quer dizer, promover todos os homens e o homem todo. Nos desígnios de Deus, cada homem é chamado a desenvolver-se, porque toda a vida é vocação. É dado a todos, em germe, desde o nascimento, um conjunto de aptidões e de qualidades para fazê-las render: desenvolvê-las será fruto da educação recebida do meio ambiente e do esforço pessoal, e permitirá a cada um orientar-se para o destino que lhe propõe o Criador. Dotado de inteligência e de liberdade, é cada um responsável tanto pelo seu crescimento como pela sua salvação. Ajudado, por vezes constrangido, por aqueles que o educam e rodeiam cada um, sejam quais forem às influências que sobre ele se exerçam, permanece o artífice principal do seu êxito ou do seu fracasso: apenas com o esforço da inteligência e da vontade, pode cada homem crescer em humanidade, valer mais, ser mais”. (Populorum Progressio)

Papa Paulo VI

RESUMO

O intuito deste trabalho foi desenvolver bases científicas para garantir em médio prazo o entendimento dos mecanismos utilizados pelas plantas de milho sob déficit hídrico (seca) e identificar os principais efeitos da aplicação do ácido abscísico na tolerância à seca. Assim, os objetivos deste trabalho foram: caracterizar, em condições de campo (Janaúba-MG), as modificações morfofisiológicas e morfoanatômicas e avaliar a produção de grãos; investigar, em condições de casa de vegetação, o efeito da aplicação do ácido abscísico (ABA) na atividade enzimática antioxidante, nos parâmetros hídricos, nas trocas gasosas e na fluorescência da clorofila. Utilizaram-se dois híbridos de milho contrastantes à seca conduzidos em 3 experimentos: um em campo e dois em casa de vegetação. O experimento de campo foi conduzido por dois anos e a deficiência hídrica foi imposta suspendendo a irrigação por 22 dias no pré-florescimento, e as avaliações foram realizadas no final do estresse. Já os de casa de vegetação a deficiência hídrica foi imposta por 10 dias no estágio de florescimento quando uma dose de 100 μ M de ABA foi aplicada na parte aérea. As avaliações foram feitas durante o estresse e após recuperação hídrica (volta da irrigação). Em condições de campo o híbrido tolerante (DKB 390) apresentou maior desempenho na produção do que o sensível (BRS 1030) além de maior condutância estomática, menor porcentagem de folhas secas, maior sincronismo das inflorescências, e maior relação Fv/Fm. Na raiz, o DKB 390 apresentou maior quantidade de aerênquima no córtex, um aumento da espessura exoderme, metaxilemas numerosos e com menor diâmetro. A folha também apresentou maior número de estômatos e menor distância entre os feixes vasculares do limbo. Em condições de casa de vegetação, observou-se que a aplicação de ABA levou a maior tolerância apenas no DKB 390, devido ao aumento do *status* hídrico, da atividade enzimática antioxidante (principalmente a catalase), aumento dos parâmetros fotossintéticos e diminuição do declínio nas funções do fotossistema II (PSII) durante o estresse.

Palavras-chave: Estresse hídrico. Anatomia foliar. Anatomia radicular *Zea mays*. Trocas gasosas. Fluorescência da clorofila.

ABSTRACT

This work aimed to develop scientific bases to understand at medium term the mechanisms used by maize plants under water deficit (drought) and identify the main effects of abscisic acid application on drought tolerance. Therefore the objectives of this study were: to characterize at field condition (Janauba – MG), the morph physiological and morph anatomical alterations and as well as to evaluate the grain production; at greenhouse conditions to research the application effect of abscisic acid (ABA) on antioxidant enzymatic activity, hydric parameters, gaseous exchange and chlorophyll fluorescence. It was used two maize hybrids contrast to drought carried out in three experiments: one at field and two in greenhouse. The field experiment was carried out for two years and the water deficit was imposed for 22 days at pre flowering growth stage, the evaluations were done at the end of stress period. On the other hand at greenhouse the water deficit was imposed for 10 days at flowering, when ABA application was accomplished at the concentration of 100 μ M on the leaves plant. The evaluations were done during water stress and after recovery period, in other words, when irrigation was back. At field condition the water tolerant hybrid (DKB 390) showed better performance on grain production than the sensitive one (BRS 1030), furthermore DKB had higher stomata conductance, lower percentage of drought leaves, greater flowering synchronism and greater Fv/Fm relationship. At the root system, DKB 390 presented higher aerenchyma quantity on cortex, an increase of exoderm thickness and numerous metaxylems with shorter diameter. At the leaf this hybrid also presented higher stomata number and shorter distance between vascular bundle on leaf blade. At greenhouse conditions it was observed that ABA application induced greater drought tolerance only for DKB 390, due to better water status, antioxidant activity (especially catalase), increase photosynthetic parameters and decrease of PSII functions during the water stress.

Key words: Water stress. Leaf anatomy. Root anatomy *Zea mays*. Gaseous exchange. Chlorophyll fluorescence.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Tolerância à seca em milho e os efeitos do déficit hídrico	13
2.2	Ácido abscísico, estresse oxidativo e sistema de defesa	16
2.3	Seca e modificações morfoanatômicas	18
2.4	Respostas ecofisiológicas à deficiência hídrica	20
3	CONCLUSÕES	23
	REFERÊNCIAS	24
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	35
	ARTIGO 1 Morfofisiologia, morfoanatomia e produção de grãos em dois híbridos de milho contrastantes ao estresse de seca em condições de campo	35
	ARTIGO 2 Envolvimento da aplicação foliar de ABA na tolerância de dois híbridos de milho contrastantes ao estresse de seca: mudança nos parâmetros hídricos e na atividade enzimática antioxidante	66
	ARTIGO 3 Aplicação de ácido abscísico e caracterização da fotossíntese e fluorescência da clorofila em dois híbridos de milho contrastantes ao estresse de seca	100

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nas próximas décadas, existem previsões de que, as mudanças de clima serão tão intensas, a ponto de mudar a geografia da produção agrícola mundial. Existem evidências de que deverão ocorrer aumentos de temperatura e que esses, por menores que sejam, trarão consequências dramáticas na distribuição das culturas no mundo. Isso deverá causar uma migração das culturas para regiões que hoje não são de sua ocorrência, em busca de condições climáticas melhores. Áreas que atualmente são grandes produtoras de grãos podem não estar mais aptas ao plantio antes do final do século.

A seca e a disponibilidade de água no planeta já estão entre as principais preocupações das diversas lideranças mundiais. Há previsões de que, a água será um produto raro futuramente (FARRÉ; FACI, 2009). A escassez, o uso inadequado, a poluição, a contaminação e o desperdício do recurso “água”, são temas-chave nas agendas de debates de diversas instituições públicas ou privadas. Estas mudanças climáticas deverão afetar a geografia das culturas e alterar o quadro agrícola brasileiro, que em sua maioria ocorre em condições não irrigadas. Nessa situação, é necessário um maior conhecimento dos fatores biológicos e climáticos relacionados à tolerância ao déficit hídrico, de forma a garantir que no futuro, a agricultura brasileira possa contar com genótipos cada vez mais adaptados à deficiência hídrica.

Estudos relacionados à tolerância à seca serão então cada vez mais estratégicos para o país, já que, esse é o estresse abiótico mais complexo e de maior efeito sobre as culturas, sendo ainda o principal fator que deve limitar a produção mundial de alimentos nos próximos anos (PENNISI, 2008). O Brasil é um dos grandes produtores de milho tendo uma estimativa de 59.459,2 milhões

de toneladas na safra 2010/2011 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011) e recentemente vem sendo relatado que perdas expressivas na produção de milho vêm ocorrendo devido à seca. Neste início do ano de 2012, por exemplo, as perdas diretas provocadas pela estiagem já passam de R\$ 5,3 bilhões no Rio Grande do Sul segundo levantamento divulgado pela Federação da Agricultura no Estado (Farsul). Em milho, a queda prevista é de 54%, de 5,9 milhões para 2,7 milhões de toneladas (FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA NO ESTADO - FARSUL, 2012).

Pesquisas relacionadas à tolerância à seca envolvem grande conhecimento multidisciplinar que precisa trabalhar harmonicamente focado em estratégias de mitigação dos prejuízos advindos do estresse hídrico, principalmente sob a forma de desenvolvimento de cultivares mais tolerantes. Para se atingir este objetivo é necessário determinar parâmetros relacionados aos aspectos climatológicos e edáficos, passando por especificidades da cultura com respeito a este estresse e indo até o uso de ferramentas fisiológicas e biotecnológicas visando à geração de genótipos mais adaptados.

Os objetivos deste trabalho, portanto, foram: caracterizar, em condições de campo (Janaúba-MG), as modificações morfofisiológicas e morfoanatômicas e avaliar a produção de grãos; investigar, em condições de casa de vegetação, o efeito da aplicação do ácido abscísico (ABA) na atividade enzimática antioxidante, nos parâmetros hídricos, nas trocas gasosas e na fluorescência da clorofila.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tolerância à seca em milho e os efeitos do déficit hídrico

O conceito de tolerância à seca é um dos mais ambíguos na literatura e sua definição é altamente dependente dos métodos utilizados para avaliação do mesmo (BLUM, 2005). Seleção para tolerância à seca tem resultado em progressos lentos, e inequívocos sobre diversas culturas (REYNOLDS; TUBEROSA, 2008).

Em milho, ganhos genéticos através de seleção para tolerância à seca têm sido obtidos, quando o estresse é imposto na fase de florescimento (sendo que, antes do início do estresse a cultura deve ser conduzida em condições ótimas de irrigação) (MAKUMBI et al., 2011; MONNEVEUX et al., 2006). Quanto à intensidade do estresse em milho, o ideal para a seleção de genótipos tolerantes à seca é que o nível deste estresse seja suficiente para causar as seguintes modificações: a) reduzir a produção em no mínimo 40% em relação ao ambiente sem estresse (BANZINGER et al., 2000); b) aumentar o intervalo entre florescimento masculino e feminino (IFMF) de 4 a 8 dias; c) causar abortamento de espigas, de forma que o número médio de espigas por planta varie de 0,3 a 0,7 (ARAUS; SÁNCHEZ; EDMEADES, 2011; BOLANOS; EDMEADES, 1996). Além disso, é importante que o estresse seja imposto de forma uniforme em toda a área.

Deve ser dada ênfase na avaliação simultânea de sítios com e sem estresse de seca, pois permitem obter as correlações genéticas entre os dois grupos de ambientes (GAMA et al., 2004).

A ocorrência de deficiência hídrica nas diferentes fases fenológicas da cultura do milho, afetam a produtividade de formas distintas. Déficit hídrico na fase de germinação reduz a produção via diminuição do número de plantas por

área (estande). Déficit hídrico durante a fase vegetativa reduz a área foliar e consequentemente a taxa fotossintética e a acumulação de carboidratos; na fase inicial de V5, pode diminuir o potencial produtivo já que nessa fase acontece a diferenciação floral. A seca no período de florescimento reduz o número de grãos e induz a uma senescência precoce das folhas, reduzindo o suprimento de assimilados durante a fase de enchimento de grãos (ARAUS; SÁNCHEZ; EDMEADES, 2011; BERGAMASCHI et al., 2004; MAGALHÃES; DURÃES, 2008).

A produção de grãos em milho depende do grau de formação de estruturas ditas “drenos”, como as espigas, grãos e endospermas, que são os depósitos dos carboidratos gerados pela fotossíntese. O número destas estruturas é determinado nas duas semanas que antecedem o florescimento (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 2003; SCHUSSLER; WESTGATE, 1995), fazendo com que, essa seja a fase crítica para plantas de milho submetidas ao estresse de seca (GRANT et al., 1989; MAKUMBI et al., 2011). Apesar de existirem na planta reservas acumuladas antes do florescimento, a espiga de milho na sua fase inicial de desenvolvimento tem pequena capacidade de atrair fotoassimilados durante as duas semanas iniciais de desenvolvimento. Ainda, o número de óvulos que se transformarão em grãos é afetado pela taxa de grãos que serão abortados no período até duas semanas após o florescimento (BELOW, 1996).

O estresse hídrico na fase que antecede o florescimento em milho também reduz o fluxo de fotoassimilados para os órgãos reprodutivos em formação, retardando a emissão dos estilo-estigmas na espiga, levando a uma não coincidência entre a emissão destes e do pendão. A seca leva então a um aumento do intervalo entre o florescimento masculino e feminino em milho (IFMF) (EDMEADES et al., 2000).

Cerca de duas a três semanas após a polinização, os grãos entram em uma fase linear de acumulação de biomassa, tornando-se drenos fortes para as

reservas acumuladas nas folhas e colmo. Se os grãos conseguem atingir este estágio, eles normalmente atingem pelo menos 30% do peso observado em plantas não submetidas a estresse hídrico (BOLANOS; EDMEADES, 1996).

Além do peso de grãos sob estresse, características secundárias devem ser utilizadas na seleção, pois estas podem aumentar a precisão na identificação de genótipos superiores nesse ambiente (ARAUS; SÁNCHEZ; EDMEADES, 2011; DURÃES et al., 2004). Uma característica afetada pela seca, também importante na seleção para adaptação ao estresse hídrico em milho, é o número de espigas por planta. Esse caráter possui alta herdabilidade (a qual aumenta com a intensidade do estresse hídrico) e possui alta correlação com peso de grãos em condição de seca imposta na fase de florescimento. Deve-se contar como espigas produzidas, aquelas que possuam pelo menos um único grão (BANZINGER et al., 2000).

O intervalo entre florescimento masculino e feminino (IFMF) aumenta com o estresse hídrico e é negativamente correlacionado com produção de grãos (DUVICK, 2005). A herdabilidade do IFMF é média, mas aumenta com o nível de estresse hídrico, mostrando mais alta correlação com produção de grãos em ambientes sob estresse. Seleção para reduzir o IFMF em milho tem permitido ganhos de seleção razoáveis e mostrado alto impacto positivo sobre tolerância à seca nessa cultura (DUBEY et al., 2010; RIBAUT et al., 2004).

Cultivares de milho tolerantes à seca tendem a ter um número menor de plantas sem espigas e menor percentagem de folhas mortas (LAFITTE; BANZINGER, 1997). A característica “percentagem de folhas mortas” pode ser avaliada visualmente por meio de uma escala de notas de 1 (10% folhas mortas) a 10 (100% folhas mortas) ou estabelecendo-se uma outra escala de 0 a 100%, que correspondem às folhas totalmente verdes e totalmente senescentes, respectivamente (CARLESSO et al., 1997). Essa característica é uma das estratégias utilizadas pela planta para manter a transpiração e aumentar o

acúmulo de carboidratos durante o ciclo de crescimento da cultura (BORREL; HAMMER; VAN OOSTEROM, 2001).

De modo geral, em condições de baixa disponibilidade hídrica, a perda de água excede a absorção em intensidade suficiente para causar o decréscimo no conteúdo de água da planta e a redução do turgor, resultando numa diminuição da expansão celular. Esse fato pode também causar alterações de vários processos morfológicos e bioquímicos (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003).

2.2 Ácido abscísico, estresse oxidativo e sistema de defesa

O fitormônio ABA (ácido abscísico) controla muitos processos importantes no crescimento e desenvolvimento da planta (TARDIEU; PARENT; SIMONNEAU, 2010). Além de amplas funções no desenvolvimento e crescimento ele também regula respostas adaptativas em condições adversas. Sob baixa disponibilidade hídrica há um grande acúmulo de ABA regulando a abertura e o fechamento dos estômatos. Seu acúmulo em folhas estressadas exerce um grande papel na redução da perda de água pela transpiração (ZHU, 2002). O fechamento estomático também pode ser causado pelo aumento do transporte de ABA para parte aérea (através do xilema), o qual foi produzido nas raízes, em contato com o solo seco, para a parte aérea (SCHACHTMAN; GOODGER, 2008).

Estudos evidenciam que o ABA pode estar relacionado com o estresse oxidativo em células vegetais (HU et al., 2005). Jiang e Zhang (2001, 2002, 2003) observaram em milho um aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e da atividade de enzimas antioxidantes quando submetidas a concentrações variáveis de ABA. O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) é um coletivo que inclui não somente radicais de oxigênio como o radical

superóxido (O_2^-), oxigênio singleto (1O_2), alcóxila (RO \cdot) ou hidroxila (OH \cdot), mas, também, alguns não derivados de radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCL) (KARUPPANAPANDIA et al., 2011).

Tanto o ABA quanto as espécies reativas de oxigênio também são moléculas mensageiras que induzem a defesa antioxidante (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). Quando as plantas estão submetidas a estresse de seca é comum a produção de ERO e a peroxidação lipídica (reação de oxidação em cadeia dos lipídeos de membrana) (CHEN; LI; CHEN, 2000).

Para controle do nível de ERO e proteção celular, os tecidos vegetais utilizam-se de sistemas não enzimático (moléculas de pequeno peso molecular) como glutatona, ácido ascórbico, compostos fenólicos; e de um sistema enzimático composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e do guaiacol (POD), glutatona redutase (GR), monodeidroascorbato redutase (MDHAR), deidroascorbato redutase (DHAR) e polifenoloxidase (PPO) (ALI; ASHRAF, 2011; KARUPPANAPANDIA et al., 2011; MITLER, 2002). Além dessas enzimas a L-fenilalanina amonialiase tem mostrado importante papel na tolerância a vários estresses (incluindo a seca) devidos a sua atividade estar ligada a produção de compostos fenólicos que também são antioxidantes (POURCEL et al., 2006; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011). Dessa forma uma maior produção dessas enzimas pode ajudar a caracterizar cultivares quanto à tolerância à seca (FAZELI; GHORBANLI; NIKNAN, 2007; MOUSSA; ABDEL-AZIZ, 2008).

A aplicação de produtos no milho em busca de maior tolerância à seca vem aumentando nos últimos tempos. Pode-se citar aplicação de várias moléculas como ácido ascórbico (DOLATABADIAN; MODARRES-SNAVY; SHARIFI, 2009), ácido fúlvico (ANJUM et al., 2011b), glinenobetaína (ANJUM et al., 2011c); trealose (ALI; ASHRAF, 2011), pró-oxidantes (DARKÓ et al.,

2011) e brassinolídeos (ANJUM et al., 2011a). Estas têm aumentado o *status* hídrico foliar, a atividade enzimática antioxidante e trocas gasosas.

2.3 Seca e modificações morfoanatômicas

Em condições de baixa disponibilidade hídrica do solo ocorre um aumento marcante da razão raiz:parte aérea, o qual, juntamente com o efeito do ABA no fechamento dos estômatos, auxilia a planta a enfrentar o estresse hídrico. Assim, como a expansão foliar é inibida, torna-se reduzido o consumo de carbono e energia, e uma proporção maior de assimilados vegetais pode ser distribuída ao sistema subterrâneo, onde eles podem sustentar o crescimento posterior de raízes. Esses fatores levam a um crescimento preferencial das raízes em direção a zonas do solo que permanecem úmidas. Com o avanço do déficit hídrico, as camadas superiores do solo são, em geral, as primeiras a secar. Assim, as plantas desenvolvem um sistema de raízes predominantemente superficial quando todas as camadas do solo estão umedecidas, e perda de raízes superficiais e proliferação de raízes mais profundas, quando a água é esgotada nas camadas superiores do solo. O crescimento e aprofundamento das raízes para manter a absorção de água podem ser considerados como uma linha de defesa contra a seca (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Em culturas como trigo (KIRKEGAARD et al., 2007), arroz (SURALTA; INUKAI; YAMAUCHI, 2008), sorgo (SANTAMARIA; LUDLOW; FUKAI, 1990) e milho (ZHU; BROWN; LYNCH, 2010) o sistema radicular mais desenvolvido e mais profundo contribuiu substancialmente para a performance das culturas sob estresse hídrico. Um mecanismo alternativo para maior absorção de água e nutrientes em condições de seca é a produção de raízes finas com uma maior área superficial por unidade de massa. Com isso há um aumento no comprimento específico e da área superficial de raiz que podem

levar a uma maior tolerância à seca (METCALFE et al., 2008). Com relação à morfologia e arquitetura nas raízes de milho, existem poucas informações sobre diferenças genéticas para tolerância à seca e para a absorção de água. E no geral, em culturas tolerantes à seca há poucos trabalhos sobre aprofundamento de raízes e modificações do sistema radicular (HUND; RUTA; LIEDGENS, 2009). Em estudos com dois híbridos de milho (DK585 e Santos), para tolerância a seca, Vamerali et al. (2003) observaram diferenças no sistema radicular, mas não houve relação com o rendimento da cultura.

As características anatômicas podem ser alteradas em condições de deficiência hídrica de modo a regular as repostas das plantas à seca (MAKBUI et al., 2011). Sabe-se que mudanças nas características anatômicas podem alterar a difusão de CO₂, a partir de cavidades subestomáticas, aos sítios de carboxilação, e assim, contribuir para a manutenção das taxas de fotossíntese, mesmo com baixa condutância estomática. Diferentes estratégias de tolerância são utilizadas pelas plantas, dentre as quais são comuns na folha a diminuição da área foliar e a abscisão foliar (EVANS et al., 1994; SHAO et al., 2008).

Várias modificações em plantas submetidas e/ou ocorrentes em ambientes com baixa disponibilidade de água podem propiciar uma maior tolerância à condição ambiental, como a presença de epiderme com paredes celulares densamente cutinizadas e cobertas por espessas camadas de cera (CAMERON; TEECE; SMART, 2006), estômatos em maior número, pequenos e muitas vezes escondidos sob uma densa cobertura de tricomas ou mesmo em criptas estomáticas, reduzindo, dessa forma, a perda de água e otimizando as trocas gasosas em decorrência de sua abertura (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009; LARCHER, 2000). Também é observada redução no tamanho celular e aumento na espessura da parede celular, muitas vezes associada a uma maior lignificação (LEVITT, 1980; PITMAN et al., 1983). Uma maior deposição de lignina ou suberina na endoderme, exoderme, camadas de células corticais e

medula das raízes (BARUCH; MÉRIDA, 1995) podem auxiliar na proteção da planta contra dessecação e morte das células do córtex evitando o efluxo de água para a rizosfera (PEÑA-VALDIVIA et al., 2005; SHARP; DAVIES, 1985). A presença de aerênquimas no córtex de arroz (SURALTA; YAMAUCHI, 2008) e milho (ZHU; BROWN; LYNCH, 2010) submetidos à seca também foram evidenciados sendo importantes para diminuir o custo metabólico no tecido radicular (diminuição de células em respiração) favorecendo o crescimento para regiões mais profundas em busca de água.

Um importante aspecto de resposta de plantas ao déficit hídrico é que à medida que a disponibilidade de água no solo declina, a tensão hidráulica ao longo do contínuo solo-planta-atmosfera aumenta até níveis em que a continuidade da coluna de água no xilema é interrompida por cavitação. Buscando esquivar-se de cavitação algumas plantas, inclusive o milho, modificam seu crescimento reduzindo diâmetro dos vasos de metaxilema e aumentando o número de feixes (PEÑA-VALDIVIA et al., 2005; LI; SPERRY; SHAO, 2009; VASELLATI et al., 2001).

2.4 Respostas ecofisiológicas à deficiência hídrica

Alterações na condutância estomática (GRZESIAK; GRZESIAK; SKOCZOWSKI, 2006), eficiência do uso da água (WUE) (FAROOQ et al., 2009), potencial hídrico foliar (VITALE et al., 2007), teor de clorofila (GRZESIAK et al., 2007), fluorescência da clorofila a e fotossíntese (XU et al., 2008) são observadas em plantas de milho sob baixa disponibilidade hídrica. O déficit hídrico pode reduzir a taxa fotossintética foliar que aliados a outros processos fisiológicos e bioquímicos levam a senescência (SHAH; PAULSEN, 2003). A relação e a proporção da limitação fotossintética por fatores estomáticos e não estomáticos é, ainda, um tema sob intenso debate na literatura

(XU et al., 2008). Durante muito tempo o fechamento estomático foi considerado como o principal fator para o decréscimo da fotossíntese em condições de déficit hídrico moderado. Entretanto, atualmente, tem sido evidenciado que a fosforilação, a regeneração da RuBP e a atividade da rubisco tem contribuído também para o decréscimo da fotossíntese (CARMO-SILVA et al., 2010; MEDRANO et al., 2002).

O milho é caracterizado por possuir fotossíntese tipo C_4 com mecanismos específicos de concentração de CO_2 , que inicialmente envolve a fixação de CO_2 pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) nas células do mesofilo formando um ácido de quatro carbonos, seguido pela sua descarboxilação nas células da bainha que resulta na liberação de CO_2 reassimilado pela ribulose-1-5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). O aumento da concentração de CO_2 nas células da bainha resulta em uma baixa atividade da ribulose-1-5-bifosfato oxigenase e conseqüentemente baixas taxas de fotorrespiração e aumento da taxa fotossintética (TAZI; ZEIGER, 2004). Estudos com gramíneas tipo C_4 (*Setaria sphacelata*) em condições de seca mostraram que a atividade máxima e a fisiológica da PEPC diminuíram com o aumento da intensidade do estresse (MARQUES DA SILVA; ARRABAÇA, 2004). Em folhas de milho Foyer et al. (1998) observaram apenas uma leve mudança na atividade máxima da PEPC, contudo em gramíneas do tipo C_4 submetidas à seca ainda existem respostas contraditórias quanto a sua atividade (CARMO-SILVA et al., 2008).

Estudos sobre a fotossíntese em milho sob diferentes condições ambientais são ferramentas importantes para uma seleção mais “refinada” de genótipos conseguindo assim obter altas produtividades (KIM et al., 2006; LAL; KU; EDWARDS, 1996; YU; SETTER, 2003). Juntamente com a fotossíntese, a fluorescência da clorofila (principalmente se for medida simultaneamente usando sistemas de trocas gasosas com câmara de fluorescência integrada) pode

ajudar bastante no entendimento fisiológico do processo em condições de seca, sendo que os padrões de fluorescência nessas condições são bem estabelecidos (LONG; BERNACCHI, 2003; OGREN, 1990; O' NEILL; SHAMAHAN; SCHEPERS, 2006).

3 CONCLUSÕES

Em condições de campo sob deficiência hídrica foi observado na raiz do DKB 390 uma maior quantidade de aerênquima no córtex, um aumento da espessura exoderme, maior quantidade de metaxilemas sendo estes com diâmetros menores. Nas folhas desse mesmo híbrido foi encontrado maior número de estômatos e menor distância entre os feixes vasculares do limbo. Além disso, o DKB 390 apresentou menor porcentagem de folhas secas, maior sincronismo das inflorescências, maior condutância estomática e maior relação Fv/Fm. Assim pode-se dizer que a seca afetou significativamente os híbridos de milho estudados e que o DKB 390 apresentou modificações nos caracteres morfofisiológicos e morfoanatômicos os quais favorecem a sua sobrevivência em ambientes com deficiência hídrica resultando em maior produtividade.

Em condições de casa de vegetação ocorreram significativas diferenças nas características fisiológicas relacionadas à tolerância à seca entre os dois híbridos contrastante 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 a aplicação de ABA que levou ao aumento da tolerância à seca. Os resultados deste trabalho mostraram também que o estresse hídrico afetou a atividade do fotossistema II (PSII) e os parâmetros de fotossíntese em ambos os híbridos, contudo o DKB 390 apresentou um aumento dos parâmetros fotossintéticos e uma diminuição do declínio nas funções do PSII durante o estresse.

REFERÊNCIAS

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 Agronomy and Crop Science**, Lexington, v. 197, n. 4, p. 258-271, Aug. 2011.

ANJUM, S. A. et al. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange **Journal Agronomy and Crop Science**, Lexington, v. 197, n. 3, p. 177-185, June 2011a.

ANJUM, S. A. et al. Fulvic acid application improves the maize performance under well-watered and drought conditions. **Journal Agronomy and Crop Science**, Lexington, v. 197, n. 6, p. 409-417, Dev. 2011b.

ANJUM, S. A. et al. Gas exchange and chlorophyll synthesis of maize cultivars are enhanced by exogenously-applied glycinebetaine under drought conditions. **Plant Soil and Environment**, Prague, v. 57, n. 7, p. 326-331, 2011c.

ARAUS, J. L.; SÁNCHEZ, C.; EDMEADES, G. O. Phenotyping maize for adaptation to drought. In: MONNEVEUX, P.; RIBAUT, J. M. (Ed.). **Drought phenotyping in crops: from theory to practice**. Texcoco: CGIAR Generation Challenge Programme, 2011. p. 263-283.

BANZINGER, M. et al. **Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: from theory to practice**. Mexico: CIMMYT, 2000. 68 p.

BARUCH, Z.; MÉRIDA, T. Effects of drought and flooding on root anatomy in four tropical forage grasses. **International Journal the Plant Science**, Chicago, v. 156, n. 4, p. 514-521, July 1995.

BELOW, F. E. Growth and productivity of maize under nitrogen stress. In: SYMPOSIUM, 1., 1996, México. **Proceedings...** México: CIMMYT, 1996. p. 235-240.

BERGAMASCHI, H. et al. Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 9, p. 831-839, set. 2004.

BLUM, A. Drought resistance, water-use efficiency and yield potential: Are they compatible, dissonant or mutually exclusive? **Australian Journal Agricultural Research**, Melbourne, v. 56, n. 11, p. 1159-1168, Nov. 2005.

BOLANOS, J.; EDMEADES. G. O. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 65-80, Sept. 1996.

BORREL, A.; HAMMER, G.; VAN OOSTEROM, E. Stay-green: a consequence of the balance between supply and demand for nitrogen during grain filling? **Annals of Applied Biology**, London, v. 138, n. 1, p. 91-95, June 2001.

CAMERON, K. D.; TEECE, M. A.; SMART, L. B. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 1, p. 176-183, Jan. 2006.

CARLESSO, R. et al. Grain sorghum responses under water deficits on different growth stages. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 211-215, Apr./June 1997.

CARMO-SILVA, A. E. et al. Rubisco activities, properties, and regulation in three different C₄ grasses under drought. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 9, p. 2355-2366, Apr. 2010.

CARMO-SILVA, A. E. et al. The activities of PEP carboxylase and the C₄ acid decarboxylases are little changed by drought stress in three C₄ grasses of different Subtypes. **Photosynthesis Research**, New York, v. 97, n. 3, p. 223-233, 2008.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 243 p.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, n. 3, p. 239-264, 2003.

CHEN, W. P.; LI, P. H.; CHEN, T. H. H. Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 609-618, June 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**: quarto levantamento, novembro/2011. Disponível em: <www.conab.gov.br> Acesso em: 16 nov. 2011.

DARKÓ, É. et al. Improved cold and drought tolerance of doubled haploid maize plants selected for resistance to prooxidant tert-butyl hydroperoxide. **Journal Agronomy and Crop Science**, Lexington, v. 197, n. 6, p. 454-465, Dec. 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 Agronomy and Crop Science**, Lexington, v. 195, n. 5, p. 347-355, Oct. 2009.

DUBEY, L. et al. Phenotypic evaluation of a set selected exotic maize inbred lines for drought stress tolerance. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 70, n. 4, p. 355-362, Oct. 2010.

DURÃES, F. O. M. et al. **Fenotipagem associada à tolerância a seca em milho para uso em melhoramento, estudos genômicos e seleção assistida por marcadores**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2004. 17 p. (Circular Técnica, 39).

DUVICK, D. N. The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 86, p. 83-145, 2005.

EDMEADES, G. O. et al. The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. In: WESTGATE, M. E.; BOOTE, K. J. **Physiology and modeling kernel set in maize**. Madison: CSSA, 2000. cap. 3, p. 43-73.

EVANS, J. R. et al. The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduce content of Rubisco. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 21, n. 4, p. 475-479, 1994.

FAROOQ, M. et al. Improving water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress. **Journal Agronomy and Crop Science**, Lexington, v. 195, n. 4, p. 262-269, Aug. 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, n. 3, p. 383-394, Mar. 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, n. 1, p. 98-103, Mar. 2007.

FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA NO ESTADO. **Perdas provocadas pela estiagem passam de R\$ 5 bilhões no RS, 2012**. Disponível em: <http://www.farsul.org.br/pg_informes.php?id_noticia=1675>. Acesso em: 19 jan. 2012.

FOYER, C. H. et al. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 117, n. 1, p. 283-292, May 1998.

GAMA, E. E. G. et al. Tropical maize synthetics breeding in moisture-stress tolerance for small-scale farmers in Brazilian semi arid regions. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 69-76, Aug. 2004.

GRANT, R. F. et al. Water deficit timing effects on yield components in maize. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, p. 61-65, 1989.

GRZESIAK, M. T. et al. Changes in response to drought stress of triticale and maize genotypes differing in drought tolerance. **Photosynthetica**, Prague, v. 45, n. 2, p. 280-287, 2007.

GRZESIAK, M. T.; GRZESIAK, S.; SKOCZOWSKI, A. Changes of leaf water potential and gas exchange during and after drought in triticale and maize genotypes differing in drought tolerance. **Photosynthetica**, Prague, v. 44, n. 4, p. 561-568, Dec. 2006.

HU, X. et al. Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. **Planta**, Berlin, v. 223, n. 1, p. 57-68, Dec. 2005.

HUND, A.; RUTA, N.; LIEDGENS, M. Rooting depth and water use efficiency of tropical maize inbred lines, differing in drought tolerance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 318, n. 1/2, p. 311-325, Dec. 2009.

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 & Environment**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 929-939, June 2003.

JIANG, M.; ZHANG, J. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 42, n. 11, p. 1265-1273, Nov. 2001.

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, n. 6, p. 1022–1030, Oct. 2002.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, Camberra, v. 5, n. 6, p. 709-725, June 2011.

KIM, S. H. et al. Canopy photosynthesis, evapotranspiration, leaf nitrogen, and transcription profiles of maize in response to CO₂ enrichment. **Global Change Biology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 588-600, Mar. 2006.

KIRKEGAARD, J. A. et al. Impact of subsoil water use on wheat yield. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 58, n. 4, p. 303-315, Apr. 2007.

LAFITTE, H. E.; BANZINGER, M. Maize population improvement for low soil N: selection gains and the identification of secondary traits. In: SYMPOSIUM, 1., 1996, Mexico. **Proceedings...** Mexico: CIMMYT, 1997. p. 485-489.

LAL, A.; KU, M. S. B.; EDWARDS, G. E. Analysis of inhibition of photosynthesis due to water stress in the C₄ species *Zea mays* and *Amaranthus cruentus*: electron transport, CO₂ fixation and carboxylation capacity. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 23, p. 403-412, 1996.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000. 529 p.

LEVITT, J. **Response of plants to environmental stress**. New York: Academic, 1980. p. 365-488.

LI, Y.; SPERRY, J. S.; SHAO, M. Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. **Environment & Experimental Botany**, Paris, v. 66, n. 2, p. 341-346, May 2009.

LONG, S. P.; BERNACCHI, C. J. Gas exchange measurements, what they can tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 352, p. 2393-2401, Nov. 2003.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. Fisiologia da produção. In: CRUZ, J. C. et al. **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. p. 63-87.

MAKBUI, S. et al. Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. **Turkish Journal of Botany**, Ankara, v. 35, n. 4, p. 369-377, Jan. 2011.

MAKUMBI, D. et al. Combining ability, heterosis and genetic diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) under stress and non-stress conditions. **Euphytica** Wageningen, v. 180, n. 2, p. 143-162, 2011.

MARQUES DA SILVA, J.; ARRABACA, M. C. Photosynthetic enzymes of the C₄ grass *Setaria sphacelata* under water stress: a comparison between rapidly and slowly imposed water deficit. **Photosynthetica**, Prague, v. 42, n. 1, p. 43-47, July 2004.

MEDRANO, H. et al. Regulation of photosynthesis of C₃ plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 7, p. 895-905, Sept. 2002.

METCALFE, D. B. et al. The effects of water availability on root growth and morphology in an Amazon rainforest. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 311, n. 1/2, p. 189-199, Oct. 2008.

MONNEVEUX, P. et al. Drought tolerance improvement in tropical maize source populations: evidence of progress. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 1, p. 180-191, Jan. 2006.

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

OGREN, E. Evaluation of chlorophyll fluorescence as a probe for drought stress in willow leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 4, p.1280-1285, Aug. 1990.

O' NEILL, P. M.; SHAMAHAN, J. F.; SCHEPERS, J. S. Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 2, p. 681-687, Feb. 2006.

PEÑA-VALDIVIA, C. B. et al. Root anatomy of drought sensitive and tolerant maize (*Zea mays* L.) seedlings under different water potentials. **Cereal Research Communications**, Szeged, v. 33, n. 4, p. 705-712, Mar. 2005.

PENNISI, E. The blue revolution, drop by drop, gene by gene. **Science**, v. 320, n. 5873, p. 21-39, Apr. 2008.

PITMAN, W. D. et al. Histological differences in moisture-stressed and nonstressed kleingrass forage. **Crop Science**, Madison, v. 23, n. 4, p. 793-795, July/Aug. 1983.

POURCEL, L. et al. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Trends in Plant Science**, London, v. 12, n. 1, p. 29-36, Jan. 2006.

REYNOLDS, M.; TUBEROSA, R. Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, n. 2, p. 171-179, Apr. 2008.

RIBAUT, J. M. et al. Genetic dissection of drought tolerance in maize: a case study. In: RIBAUT, J. M. (Ed.). *Physiology and biotechnology integration for plant breeding*. New York: M. Dekker, 2004. p. 571-609.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. Como a planta de milho se desenvolve. **Arquivo do Agrônomo Potafos**, Piracicaba, n. 103, p. 1-20, 2003.

SÁNCHEZ-RODRIGUEZ, E. et al. Differential responses of Five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. **Phytochemistry**, Oxford, v. 72, n. 8, p. 723-729, June 2011.

SANTAMARIA, J. M.; LUDLOW, M. M.; FUKAI, S. Contribution of osmotic adjustment to grain-yield in *Sorghum bicolor* (L) Moench under water-limited conditions. 1. Water-stress before anthesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 41, n. 1, p. 51-65, 1990.

SCHACHTMAN, D. P.; GOODGER, J. Q. D. Chemical root to shoot signaling under drought. **Trends in plant Science**, London, v. 13, n. 6, p. 281-287, June 2008.

SCHUSSLER, J. R.; WESTGATE, M. E. Assimilate flux determines kernel set at low water potential maize. **Crop Science**, Madison, v. 21, n. 4, p. 943-946, 1995.

SHAH, N. H.; PAULSEN, G. M. Interaction of drought and high temperature on photosynthesis and grain-filling of wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 257, n. 1, p. 219-226, Nov. 2003.

SHAO, H. et al. Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, n. 3, p. 215-225, Marc. 2008.

SHARP, R. E.; DAVIES, W. J. Root growth and water uptake by maize plants in drying soil. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 36, n. 9, p. 1441-1456, Feb. 1985.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, n. 2, p. 327-334, Oct. 1997.

SURALTA, R. R.; INUKAI, Y.; YAMAUCHI, A. Genotypic variations in responses of lateral root development to transient moisture stresses in rice cultivars. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 11, n. 3, p. 324-335, Dec. 2008.

SURALTA, R. R.; YAMAUCHI, A. Root growth, aerenchyma development and oxygen transport in rice genotypes subjected to drought and waterlogging. **Environmental & Experimental Botany**, Paris, v. 64, n. 1, p. 75-82, Sept. 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 449-484.

TARDIEU, F.; PARENT, B.; SIMONNEAU, T. Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or non-hydraulic processes? **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 636-647, Apr. 2010.

VAMERALI, T. et al. A comparison of root characteristics in relation to nutrient and water stress in two maize hybrids. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, n. 1, p. 157-167, Nov. 2003.

VASELLATI, V. et al. Effects of flooding and drought on the anatomy of *Paspalum dilatatum*. **Annals of Botany**, London, v. 88, n. 3, p. 355-360, Sept. 2001.

VITALE, L. et al. Effects of water stress on gas exchange of field grown *Zea mays* L. in Southern Italy: an analysis at canopy and leaf level. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 29, n. 4, p. 317-326, Aug. 2007.

YU, L. X.; SETTER, T. L. Comparative transcriptional profiling of placenta and endosperm in developing maize kernels in response to water deficit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 2, p. 568-582, Feb. 2003.

XU, Z. Z. et al. Changes in chlorophyll fluorescence in maize plants with imposed rapid dehydration at different leaf ages. **Journal of Plant Growth Regulator**, New York, v. 27, n. 1, p. 83-92, Mar. 2008.

ZHU, J. K.; BROWN, K. M.; LYNCH, J. P. Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 740-749, May 2010.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 247-273, June 2002.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

**MORFOFISIOLOGIA, MORFOANATOMIA E PRODUÇÃO DE GRÃOS
EM DOIS HÍBRIDOS DE MILHO CONTRASTANTES AO ESTRESSE
DE SECA EM CONDIÇÕES DE CAMPO**

*Artigo redigido conforme norma da Revista **Field Crops Research***

Morfofisiologia, morfoanatomia e produção de grãos em dois híbridos de milho contrastantes ao estresse de seca em condições de campo

Resumo - No Norte do estado de Minas Gerais, a falta de chuva limita a produção vegetal no campo, sendo possível apenas com irrigação. Práticas agronômicas e fisiológicas têm sido buscadas fortemente para superar a seca e consequentemente aumentar a produção. Dentro deste contexto o objetivo deste trabalho foi caracterizar as modificações morfofisiológicas e morfoanatômicas, e avaliar os atributos de produção de grãos em dois híbridos de milho contrastantes à seca em condições de campo. O experimento foi conduzido por dois anos e a deficiência hídrica foi imposta suspendendo a irrigação por 22 dias no pré-florescimento. No final do estresse foi avaliada a anatomia foliar e radicular, características morfofisiológicas (potencial hídrico, teor de clorofila, porcentagem de folhas secas, área foliar, condutância estomática, fluorescência da clorofila e intervalo entre o florescimento masculino e feminino). Para melhor interpretação da tolerância dos híbridos nas características avaliadas, um índice foi utilizado (valor relativo de tolerância, RVT). O híbrido DKB 390 (tolerante) superou o BRS 1030 (sensível) na produção de grãos. Além disso, ele apresentou menor porcentagem de folhas secas, maior sincronismo das inflorescências, maior condutância estomática e maior relação Fv/Fm. Na raiz, o DKB 390 resultou em maior quantidade de aerênquima no córtex, um aumento da espessura da exoderme, metaxilemas numerosos e com menor diâmetro. Na folha apresentou maior número de estômatos e menor distância entre os feixes vasculares do limbo. Conclui-se que ocorreram significativas modificações morfofisiológicas e morfoanatômicas relacionadas à tolerância à seca no DKB 390 que resultaram em maior produtividade no campo.

Palavras-chave: *Zea mays* L. Estresse hídrico. Anatomia foliar. Anatomia radicular. Condutância estomática. Índice de colheita.

Introdução

Um grande número de trabalhos vem sendo conduzidos para avaliar o efeito das mudanças climáticas sobre a agricultura. A alteração da disponibilidade hídrica é um dos principais fatores das mudanças climáticas (Ashral, 2010).

Em condições de baixa disponibilidade hídrica do solo ocorre uma diminuição do teor hídrico foliar levando a um déficit hídrico. Uma rápida resposta a este déficit é o fechamento dos estômatos que limita a condutância dos gases nas folhas e conseqüentemente limita a fotossíntese e a produção (Mutava et al., 2011).

O impacto do estresse hídrico pode ser amenizado através do melhoramento genético para tolerância à seca. Apesar da sensibilidade do milho à seca, resultados promissores têm sido encontrados na busca de genótipos tolerantes (Makumbi et al., 2011; Monneveux et al., 2006). Esta variabilidade genética em milho tem sido encontrada através do entendimento das respostas genéticas e fisiológicas frente ao estresse na avaliação de genótipos tolerantes (Mutava et al., 2011).

Apesar de necessários alguns requisitos para utilização, as características fisiológicas (ou secundárias) podem ser utilizadas na seleção, pois estas podem aumentar a precisão na identificação de genótipos superiores nesse ambiente (Araus et al., 2011). As respostas fisiológicas na tolerância à seca podem variar de acordo com a severidade e a duração de imposição do estresse, estágio fenológico e material genético (Shao et al., 2008). Com relação ao estágio fenológico, de acordo com Edmeades et al (2000), o milho é particularmente muito sensível no estágio de florescimento. Seca durante esse período leva a um aumento no intervalo entre florescimento masculino e feminino (IFMF), que é negativamente correlacionado com a produção (Duvick, 2005).

Na região Norte do Estado de Minas, na cidade de Janaúba, a falta de chuva limita a produção vegetal sendo o cultivo em certas épocas possível apenas com irrigação. Por isso essa região tem sido bastante importante para o entendimento da deficiência hídrica e a busca de genótipos tolerantes pode favorecer a produção de milho nesses locais. Vale ressaltar também que as respostas das plantas ao estresse hídrico observado em condições de campo são geralmente muito mais complexas do que as medidas sob condições ambientais controladas, porque outros fatores acompanham o déficit hídrico influenciando a natureza da resposta do estresse (Lopes et al., 2011).

Identificações das modificações morfoanatômicas tanto na raiz quanto na folha tem também contribuído bastante na seleção de genótipos e no entendimento dos mecanismos de tolerância em milho sob condições de seca (Grzesiak et al., 2010; Kutschera et al., 2010; Zhu et al., 2010). Dentro deste contexto os objetivos deste trabalho foram caracterizar as modificações morfofisiológicas e morfoanatômicas e avaliar os atributos de produção de grãos em dois híbridos de milho contrastantes ao estresse de seca em condições de campo em Janaúba-MG.

Materiais e Métodos

Material Vegetal e condições de crescimento

Foram utilizados dois híbridos contrastantes ao estresse de seca: DKB 390 (tolerante) BRS 1030 (sensível) esse último oriundo do Programa de Melhoramento da Embrapa. O ensaio foi conduzido nos anos de 2010 e 2011 em condições de campo na estação experimental de Janaúba, Minas Gerais, Brasil, localizada a 15°47' de latitude S, longitude 43°18' W e 516 m de altitude. As médias de temperatura máxima, temperatura mínima e umidade relativa são representadas na Fig. 1. A precipitação pluviométrica foi praticamente zero com

exceções para os meses de setembro (0.5 mm) outubro (19.7 mm) em 2010 e os meses de maio (1.3 mm) e outubro (2.5 mm) de 2011 (dados não mostrados).

O experimento foi realizado em solo do tipo Latossolo Vermelho Amarelo, textura média e siltoso e as adubações de base e cobertura foram realizadas de acordo com a análise do solo, seguindo recomendação para o milho no Estado de Minas Gerais. As plantas foram irrigadas regularmente mantendo uma ótima umidade do solo até a imposição do estresse. Todos os tratamentos fitossanitários necessários para cultura foram aplicados.

Imposição do estresse hídrico 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* (tensiômetro) modelo 200SS – 5” (IRROMETER, Califórnia – USA), instalado no centro das parcelas 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. 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, enquanto que, no segundo tratamento não houve reposição hídrica. Esse estresse foi mantido por 22 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com quatro tratamentos (DKB 390 irrigado e estressado, BRS 1030 irrigado e estressado) e cinco repetições. As dimensões da parcela experimental foram de

6m x 5,4m; com 6 fileiras de plantio, espaçadas de 0,90m, perfazendo uma área total de 32,4 m². As duas fileiras externas foram utilizadas como bordadura, enquanto que as duas centrais para a coleta de dados de produtividade e as duas intermediárias para as avaliações morfofisiológicas e morfoanatômicas realizadas no final da imposição do estresse. A avaliação do potencial hídrico médio foliar e das características morfoanatômicas foi realizada apenas no ano de 2010.

Características morfofisiológicas

O potencial hídrico médio foliar (midday, Ψ_{md}) foi determinado as 9h 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.

A característica de senescência foliar foi avaliada através da porcentagem de folhas secas. As observações e a contagem em cada folha da planta foram realizadas visualmente, estabelecendo-se uma escala de 0 a 100%, que correspondiam às folhas totalmente verdes e totalmente senescentes, respectivamente (Carlesso et al., 1997). As folhas foram contadas em oito plantas por repetição.

O teor relativo de clorofila (unidades de *spad*) foi determinado na folha bandeira utilizando um clorofilometro (*Model SPAD 502*, Minolta, Japan) e 10 leituras por planta foram realizadas. A concentração de clorofila total em $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtida através de unidades de *spad*, foi feita através de curvas de calibrações para cada híbrido. O teor relativo de clorofila *in vivo* foi determinado em folhas com variações de cores (do amarelo para o verde) e em seguida foi realizada a concentração de clorofila pelo método de Arnon (1949) nessas mesmas folhas. A concentração de clorofila total foi determinada em discos foliares (2 mm de diâmetro) em 10 mL de acetona (80%). A seguir, o extrato foi centrifugado a

3.000 g por 10 minutos e as absorvâncias dos sobrenadantes foram avaliadas em espectrofotômetro a 665 e 645 nm.

A área foliar (LA) foi estimada pela medição do comprimento (C) e largura (L) de todas as folhas que apresentavam pelo menos 50% de sua área verde. A área foliar de cada folha foi obtida através da equação: $LA = C \times L \times 0.75$ (Tollenaar, 1992). A área foliar por indivíduo foi calculada somando-se as áreas de todas as folhas da planta.

O intervalo entre o florescimento masculino e feminino (ASI) foi calculado como a diferença, em dias, entre o florescimento masculino e feminino. Os florescimentos masculino e feminino foram obtidos como número de dias do plantio até que 50% das plantas de cada parcela tivessem, respectivamente, antese e estilo-estigmas visíveis.

A condutância estomática foliar foi obtida através de um porômetro (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA). Cinco leituras por folha por repetição foram feitas entre 8 e 10h da manhã na folha bandeira. A eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) foi determinada em folhas adaptadas ao escuro por meio de um fluorímetro (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments King's Lynn, UK). O acondicionamento das folhas foi realizado com a ajuda de cliques foliares, e a intensidade de luz no sensor foi de 60% da capacidade total do aparelho, durante cinco segundos em cada leitura. Todas as leituras também foram realizadas na folha bandeira, no período da manhã, entre as 8 e as 10 horas.

Características morfoanatômicas

Para anatomia foliar e radicular foi coletado, em 3 plantas/tratamento/repetição, uma amostra na região do terço médio de uma folha totalmente expandida abaixo da folha bandeira e uma amostra de raiz (com todas as regiões). As secções parodérmicas e transversais foram realizadas de

acordo com Souza et al. (2009) e Souza et al. (2010) e foram fotografadas em microscópio óptico de luz Olympus BX-60 acoplado a uma câmara digital. Os parâmetros medidos nas secções paradérmicas na face abaxial das folhas foram: densidade estomática (número de estômatos/mm²), funcionabilidade estomática (diâmetro polar/diâmetro equatorial). Para o limbo foliar foram medidos: espessura da epiderme abaxial (BET), número de células buliformes a cada 2 mm (NBC), distância entre os feixes vasculares (DVB), espessura do mesofilo (MPT). As avaliações na lâmina foliar foram realizadas a partir do quarto feixe vascular de maior calibre, partindo da região da nervura mediana em direção à borda foliar, onde há uma maior uniformidade da espessura da lâmina foliar.

Os seguintes parâmetros foram analisados na raiz: proporção ocupada pelo aerênquima no córtex (PA), diâmetro (DM) e número das células do metaxilema (NM), espessura da camada de células suberizadas presentes na região da hipoderme (exoderme) (SC), espessura da endoderme (EW) e espessura da epiderme (EPW). A proporção da área ocupada pelo aerênquima no córtex (PA) foi calculada pela divisão da área total de aerênquima formado pela área total do córtex.

Todas estas medições foram feitas pelo programa de análise de imagens UTHSCSA ImageTool (University of Texas, San Antonio, USA) utilizando-se calibrações feitas com régua microscópica fotografada nos mesmos aumentos das fotomicrografias. Foram realizadas quatro medições de cada característica anatômica (em cada repetição) tanto na folha quanto na raiz.

Componentes de produção

Na colheita os seguintes dados foram analisados: peso de espiga (EAW), número de espigas (EN), comprimento de espigas (EL), rendimento de grãos (RY), peso de 100 sementes (W100), índice de colheita (HI) [peso seco do grão/(peso seco da planta+peso seco do grão)*100].

Análise dos dados

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 ($P \leq 0.05$), no programa Sisvar versão 4.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil). Para expressar a tolerância de cada híbrido foi criado um índice: valor relativo de tolerância (RVT) onde os valores de cada característica avaliada na condição estressada foram divididos pelos valores da condição irrigada (Souza et al., 2011).

Resultados

Características morfofisiológicas

Com relação ao potencial hídrico médio foliar (Ψ_{md}) foram observados uma diminuição dos tratamentos estressados em relação aos irrigados, entretanto o híbrido sensível (BRS 1030) apresentou maior redução do que o tolerante (DKB 390) (Fig. 2).

Com relação à porcentagem de folhas secas, apenas no ano de 2010 ocorreram diferenças entre os tratamentos, sendo que os estressados resultaram em maior porcentagem de folhas secas (Tabela 1). Ressalta-se que o valor relativo de tolerância (RVT) para porcentagem de folhas secas foi maior para o BRS 1030 estressado nos dois anos de avaliação.

Não houve diferenças entre os tratamentos nos dois anos de condução dos ensaios para a concentração de clorofila total (TC), contudo o BRS 1030 apresentou, principalmente no ano de 2010, maior RVT (Tabela 1). O DKB 390 estressado apresentou menor média para área foliar (LA) e o BRS 1030 irrigado a maior no ano de 2010 (Tabela 1). Já no ano de 2011 o BRS 1030 irrigado foi

significativamente maior do que o restante dos tratamentos. Quanto ao valor relativo de tolerância (RVT) para LA observa-se que o BRS 1030 apresentou maior valor no ano de 2010.

O estresse hídrico significativamente afetou o intervalo entre o florescimento masculino e feminino (ASI) nos anos de 2010 e 2011 (Tabela 2). No primeiro ano de avaliação observou-se que o BRS 1030 apresentou maior ASI. E o DKB 390 apresentou menor RVT no primeiro e segundo ano de avaliação.

Nos dois anos agrícolas a maior condutância estomática (g_s) foi encontrada nos tratamentos irrigados enquanto que os estressados, no ano de 2010, o BRS 1030 apresentou a menor g_s (Tabela 2). O DKB 390 se destacou com maior RVT nos dois anos.

O BRS 1030 estressado resultou na menor eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) no ano de 2010 e no ano de 2011 não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Tabela 2). Na avaliação do RVT nos anos de 2010 e 2011, o DKB 390 também apresentou maior valor.

Características morfoanatômicas

Quanto à análise da anatomia foliar, sob estresse hídrico observa-se que o DKB 390 apresentou maior densidade estomática (SD), assim como maior valor relativo de tolerância (RVT) (Fig. 3A). A funcionabilidade estomática (SF) aumentou com o estresse hídrico nos dois híbridos, contudo o DKB 390 apresentou maior média em relação ao BRS 1030 e maior RVT (Fig. 3B). Para a espessura da epiderme abaxial (BET) (Fig. 3C) e número de células buliformes a cada 2 mm (NBC) (Fig. 3D) não houve diferença entre os tratamentos e nem tampouco entre os RVT (Fig. 3C). O DKB 390 estressado foi o único tratamento que diminuiu significativamente a distância entre os feixes vasculares (DVB) e

comparando-se os valores relativos de tolerância, o DKB 390 apresentou um menor valor (Fig. 3E). Com o estresse hídrico houve um aumento da espessura do mesofilo nos dois híbridos, porém eles não diferenciaram entre si (Fig. 3F). Com relação ao RVT observa-se uma discreta diminuição no DKB 390 para o MPT.

Na análise da anatomia radicular foram observados que a proporção de aerênquima no córtex (PA) aumentou significativamente nos dois híbridos com o estresse hídrico, sendo mais pronunciado no DKB 390 estressado (Fig. 4a e 5). O número de células do metaxilema (NM) foi maior no DKB 390 irrigado e estressado, quando comparado com o BRS 1030 sendo que não houve diferenças entre os valores relativos de tolerância (RVT) (Fig. 4B). Já no diâmetro das células do metaxilema (DM) ocorreu uma significativa diminuição no DKB 390 estressado e o RVT neste mesmo híbrido foi menor (Fig. 4C). Quanto à espessura da camada de células suberizadas na região da hipoderme (exoderme) (SC) observou-se que os dois híbridos apresentaram maiores valores no tratamento estressado sendo mais pronunciado no DKB 390 (Fig. 4D). Para SC o DKB 390 também apresentou maior RVT. Não houve diferenças entre os tratamentos e entre os RVT na espessura da endoderme (EW) (Fig. 4E). Com relação à espessura da epiderme (EPW) o BRS 1030 estressado teve significativamente um maior aumento do que os outros tratamentos. Foi verificado também um maior RVT no BRS 1030 para EPW (Fig. 4F).

Componentes de produção

Nos dois anos de avaliação houve uma diminuição do peso de espigas (EAW) entre os tratamentos estressados e irrigados e o DKB 390 apresentou maior valor relativo de tolerância (RVT) (Tabela 3). Da mesma forma que o EAW em 2010, para o número de espigas (EN) houve uma diminuição nos tratamentos estressados e um aumento do RVT para o DKB 390 (Tabela 3). No

comprimento de espiga (EL) nos anos de 2010 e 2011, não houve diferença entre os tratamentos e o RVT do DKB 390 foi discretamente maior no ano de 2010 (Tabela 3).

Na tabela 4 pode-se verificar que o estresse no primeiro ano de avaliação (2010) levou a menores rendimentos de grãos (GY) do que no segundo ano (2011). Nos dois anos o BRS 1030 estressado apresentou menor GY e menor RVT do que o DKB 390 estressado (Tabela 4).

Na avaliação do peso de 100 sementes (W100) observou-se que os tratamentos estressados foram menores do que os irrigados no ano de 2010 e não houve diferenças no ano de 2011 e nem na avaliação do RVT (Tabela 4). Já para o índice de colheita (HI), no ano de 2010, BRS 1030 estressado apresentou menor valor e não houve diferenças entre os tratamentos no ano de 2011 (Tabela 4). Com relação ao RVT para o HI nos dois anos o DKB 390 apresentou maior valor sendo a diferença mais discreta no segundo ano.

Discussão

Pode-se verificar que na estação experimental de Janaúba-MG existem condições propícias para experimentação com seca em relação a outras regiões do estado, devido à ausência (ou baixa) precipitação e altas temperaturas (Fig. 1). Comparando-se as características avaliadas nos dois anos de estudos percebe-se claramente que em 2010 ocorreu maior efeito do estresse hídrico do que em 2011. Isso pode ter ocorrido devido a maiores temperaturas em 2010 (Fig. 1) que aliada à seca deve ter levado a um maior impacto sobre os híbridos, sobretudo em maior intensidade no material sensível (BRS 1030).

Avaliando o potencial hídrico médio foliar (Ψ_{md}) verifica-se que o estresse hídrico levou a menores valores nos dois híbridos, contudo o DKB 390 (tolerante) apresentou maior status hídrico do que o BRS 1030. Em condições de

campo Vitale et al. (2007) observaram também uma redução do (Ψ_{md}) em milho sob seca. Esta maior manutenção do status hídrico no DKB 390 não pode ser por causa do fechamento estomático, pois ele apresentou maior condutância estomática (g_s). Estas duas características (g_s e Ψ_{md}) estão intimamente ligadas, porque um maior status hídrico pode favorecer uma maior condutância estomática levando a um fluxo de CO_2 e a um resfriamento da folha pela transpiração. De acordo com Jones et al. (2009) e Mutava et al. (2011) genótipos tolerantes à seca com altos rendimentos têm sido identificados pelo resfriamento do dossel e para escaparem da seca necessitam de maior gasto de água. Assim, o DKB 390 por ter maior status hídrico pode gastar mais água, pela abertura dos estômatos para um maior resfriamento do dossel.

A senescência foliar é um dos primeiros sintomas visíveis a serem observados em estresse de seca (Smit e Singels, 2006). O híbrido DKB 390 apresentou menor RVT para porcentagem de senescência foliar, contudo apesar de não existir diferenças significativas entre os tratamentos para a concentração de clorofila total (TC), observou-se maior valor do RVT no BRS 1030. Esta senescência da folha pode ser causada por uma maior degradação dos pigmentos pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) que em condição de déficit hídrico tem sua produção aumentada (Karuppanapandian et al., 2011). Híbridos tolerantes tendem a ter um maior sistema antioxidante (Moussa e Abdel-Aziz, 2008) podendo ser a razão de menor senescência no DKB 390.

Menor área foliar (LA) encontrada no DKB 390 pode diminuir a superfície de transpiração foliar ajudando na sobrevivência da planta pela manutenção e controle do uso da água frente ao estresse hídrico (Shao et al., 2008).

O intervalo entre o florescimento masculino e feminino (ASI) vem sendo uma das principais características secundárias para discriminar genótipos de milho em programas de melhoramento para a seca (Araus et al., 2011; Dadu-

Apraku et al., 2011; Hao et al., 2011). Definitivamente no ano de 2010 houve uma maior falta de sincronismo entre as inflorescências no BRS 1030 sendo, portanto um dos fatores que podem ter afetado a produção neste híbrido (Dubey et al., 2010). Considerando ainda o ASI no ano em que as temperaturas foram maiores (2010), o BRS 1030 pode ter apresentado maior intervalo devido a uma maior sensibilidade em dias mais quentes, pois é relatado que temperaturas acima de 33°C podem atrasar ou até inibir os eventos de florescimento (Edreira et al., 2011).

Uma significativa diminuição na relação F_v/F_m foi verificada no BRS 1030. Com o aumento do déficit hídrico as folhas murcham devido ao fechamento dos estômatos, a fotossíntese decresce e a atividade fotoquímica é perdida (danos no fotossistema) devido ao excesso de energia. Assim, a relação F_v/F_m é um dos principais parâmetros utilizados para as avaliações dos danos no sistema fotossintético, uma vez que a eficiência quântica máxima do fotossistema II indica quando todos os centros de reação estão abertos (Baker e Rosenqvist, 2004).

Um dos fatores que podem estar facilitando uma maior condutância estomática no DKB 390 é a maior funcionabilidade (SF) e densidade estomática (SD) encontrada em suas folhas. O fechamento estomático é uma das mais proeminentes respostas à seca, levando à diminuição das trocas gasosas (Farooq et al., 2009), porém maior número de estômatos pode favorecer maior entrada de gases diminuindo as resistências estomáticas. Ennajeh et al. (2010) observaram o mesmo comportamento em oliva com maior SD em cultivares tolerantes à seca.

Uma maior funcionabilidade estomática pode aumentar a eficiência do uso da água, pois este parâmetro está relacionado com uma menor área de abertura estomática (diâmetro polar e equatorial dos estômatos) (Souza et al., 2010).

Não houve diferenças entre os tratamentos para espessura da epiderme abaxial (BET). Já Makbui et al. (2011) encontraram em soja sob condições de seca uma maior epiderme adaxial e abaxial. Apesar de, no presente trabalho não ter sido encontrada modificações nas células buliformes esta característica pode ser promissora em estudos de tolerância à seca, pois está envolvida no enrolamento foliar evitando a transpiração (Alvarez et al., 2008).

Uma característica importante em condições de restrição hídrica e altas temperaturas que também foi encontrado no DKB 390 é a menor distância entre os feixes vasculares da folha (DVB). Esta característica fornece maior habilidade na translocação de fotoassimilados e maior distribuição de água nas folhas (Sage 2004). Dados similares também foram encontrados em *Phragmites communis* submetido à seca (Gong et al., 2011).

O estresse hídrico levou a um aumento da espessura do mesofilo (MPT) tanto no DKB 390 quanto no BRS 1030. De acordo com Poorter e Bongers (2006) plantas submetidas a estresses abióticos aumentam a espessura foliar, pois essa plasticidade leva a um incremento da alocação de nitrogênio foliar aumentando a capacidade fotossintética e o uso eficiente de nitrogênio.

Nos dois híbridos uma maior proporção de aerênquima (PA) foi encontrada nos tratamentos estressados em relação aos irrigados, mas o DKB 390 apresentou o maior aumento. Aerênquimas são definidos em geral como um tecido especializado caracterizado por espaços celulares constituídos de gases e sua formação em milho envolve lise e morte celular programada (Lenochová et al., 2009). A formação de aerênquima em milho pode estar envolvida com outros tipos de tolerância de estresse como alagamento (Souza et al., 2009) e deficiência de nutrientes (Postma e Lynch, 2011). Em arroz também foram encontrados expressiva formação de aerênquima sob deficiência hídrica (Gowda et al., 2011). Uma maior quantidade de aerênquima no DKB 390 pode permitir maior exploração do solo e aquisição de água, pois estas estruturas decrescem o

custo metabólico de raízes em crescimento devido à diminuição da presença de células em respiração (Zhu et al., 2010). Poucos trabalhos envolvendo tolerância à seca em milho e formação de aerênquimas são encontrados na literatura. Zhu et al. (2010) observaram em trabalhos de campo com milho sob seca que aqueles genótipos com maior quantidade de aerênquima em suas raízes apresentaram melhor desempenho (maior crescimento radicular e biomassa da parte aérea).

O DKB 390 apresentou um maior número de metaxilemas e uma diminuição no diâmetro dessas células. Essas características do DKB 390 podem indicar uma maior condutividade hidráulica aumentando a capacidade de transporte de água (Li et al., 2009). Um menor diâmetro dos vasos está relacionado com a diminuição do risco do embolismo e aumento da resistência do fluxo de água. Já o maior número de vasos pode permitir aumento na probabilidade da água chegar ao seu destino ou do fluxo ocorrer (Souza et al., 2009). Mesmas modificações nos vasos de xilema foram observadas em genótipos de milho tolerantes à seca (Peña-Valdivia et al., 2005; Li et al., 2009).

Não houve diferenças entre os tratamentos para a espessura da endoderme (EW), contudo para a espessura da camada de células suberizadas na região da hipoderme (exoderme) (SC) observou-se um aumento sob estresse principalmente para o DKB 390. Tanto a endoderme quanto a exoderme possuem várias funções nas raízes, mas no geral são camadas de células especializadas em selecionar ou impedir a entrada de substâncias tóxicas ou microrganismos. No caso do estresse hídrico essas duas camadas podem impedir a saída de água dos feixes de xilema para o solo evitando a desidratação (Enstone et al., 2003; Peña-Valdivia et al., 2005). Neste trabalho foi verificado que o híbrido sensível (BRS 1030) apresentou maior espessura da epiderme radicular (EPW). Uma explicação para esse comportamento poderia ser o aumento do papel da epiderme como barreira por não possuir uma exoderme e endoderme tão espessa (Souza et al., 2009).

É marcante o efeito do estresse causado pela falta de água nos atributos de produção. Diferenças entre as condições estressada e irrigada foram evidenciadas neste trabalho. Os resultados encontrados no DKB 390 para o rendimento de grãos (GY) nos dois anos de avaliação confirmaram maior tolerância em relação ao BRS 1030. Um dos motivos que podem ter levado a um melhor rendimento no DKB 390 é o aumento do índice de colheita (HI), ou seja, uma maior alocação diferencial de fotoassimilados para a espiga durante seu ciclo de vida. Esta diferença na alocação entre os híbridos realça ainda mais a ideia de que milhos tropicais são fortemente limitados pelo dreno (Borrás et al., 2004).

Para os parâmetros peso de espiga (EAW), número de espigas (EM) e peso de 100 sementes (W100) foi verificada uma significativa redução nos tratamentos estressados (principalmente no primeiro ano de avaliação), mas não foram observadas diferenças entre os híbridos em uma mesma condição. Esses parâmetros foram também considerados em vários trabalhos como relevantes fatores para a tolerância à seca (Betrán et al., 2003; Monneveux et al., 2006; Dubey et al., 2010; Hao et al., 2011).

Conclusões

Em condições de campo sob deficiência hídrica foi observado na raiz do DKB 390 uma maior quantidade de aerênquima no córtex, um aumento da espessura da exoderme, maior quantidade de metaxilemas sendo estes com diâmetros menores. Nas folhas deste mesmo híbrido foi encontrado maior número de estômatos e menor distância entre os feixes vasculares do limbo. Além disso, o DKB 390 apresentou menor porcentagem de folhas secas, maior sincronismo das inflorescências, maior condutância estomática e maior relação Fv/Fm. A seca afetou significativamente os híbridos de milho estudados sendo

que o DKB 390 apresentou modificações nos caracteres morfofisiológicos e morfoanatômicos os quais favoreceram sua sobrevivência em ambientes com deficiência hídrica resultando conseqüentemente em maior produtividade.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Capes, pela bolsa de estudos; ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, por terem concedido subsídios para a realização da pesquisa.

Referências

Alvarez, J.M., Rocha, J.F., Machado, S.R., 2008. Bulliform cells in *Loudetiopsis chrysothrix* (Nees) Conert and *Tristachya leiostachya* Nees (Poaceae): structure in relation to function. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51, 113–119.

Araus J.L., Sánchez C, Edmeades G.O., 2011. Phenotyping maize for adaptation to drought. In: Monneveux P., Ribaut, J-M., eds. *Drought phenotyping in crops: from theory to practice*. CGIAR Generation Challenge Programme, Texcoco, México, pp. 263–283.

Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1–15.

Asharaf, M., 2010. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotech. Adv.* 28, 199–238.

Badu-Apraku, B., Fakorede, M.A.B., Oyekunle, M., Akinwale, R.O., 2011. Selection of extra-early maize inbreds under low N and drought at flowering and grain-filling for hybrid production. *Maydica* 56, 29–42.

- Baker, N.R., Rosenqvist, E., 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 55, 1607-1621.
- Borrás, L., Slafer, G.A., Otegui, M.E., 2004. Seed dry weight response to source-sink manipulations in wheat, maize and soybean: quantitative reappraisal. *Field Crop Res.* 86, 131–146.
- Carlesso, R., Peiter, M.X., Petry, M.T., Woschick, D., 1997. Grain sorghum responses under water deficits on different growth stages. *Cienc. Rural* 27, 211–215.
- Dubey, L., Prasanna, B.M., Hossain, F., Verma, D.K., Ramesh, B., 2010. Phenotypic evaluation of a set selected exotic maize inbred lines for drought stress tolerance. *Indian J. Genet. Plant Breeding* 70, 355–362.
- Duvick, D.N., 2005. The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). *Adv. Agron.* 86, 83–145.
- Edmeades, G.O., Bolanos, J., Elinge, A., Ribaut, J-M., Banziger, M., Westgate, M.E., 2000. The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. In: Westgate, M.E., Boote, K.J. eds. *Physiology and modeling Kernel set in Maize*. Madison: CSSA0. pp. 43–73.
- Edreira, J.I.R., Carpici, E.B., Sammarro, D., Otegui, M.E., 2011. Heat stress effects around flowering on kernel set of temperate and tropical maize hybrids. *Field Crop Res.* 123, 62–73.
- Ennajeh, M., Vadel, A.M., Cochard, H., Khemira, H., 2010. Comparative impacts of water stress on the leaf anatomy of a drought-resistant and a drought-sensitive olive cultivar. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 85, 289–294.
- Enstone, D.E., Peterson, A., Ma, F., 2003. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *J. Plant Growth. Regul.* 21, 335–351.
- Farooq, M., Wahid, A., Kokayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A., 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* 29, 185–212.

Gong, C-M., Bai, J., Deng, J-M., Wang, G-X, Liu, X-P., 2011. Leaf anatomy and photosynthetic carbon metabolic characteristics in *Phragmites communis* in different soil water availability. *Plant Ecol.* 212, 675–687.

Gowda, V.R.P., Henry, A., Yamauchi, A., Shashidhar, H.E., Serraj, R., 2011. Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. *Field Crop Res.* 122, 1–13.

Grzesiak, M.T., Filek, W., Hura, T., Kocurek, M., Pilarski, J., 2010. Leaf optical properties during and after drought stress in triticale and maize genotypes differing in drought tolerance. *Acta Physiol. Plant.* 32, 433–442.

Hao, Z-F., Li, X-H., Su, Z-J., Xie, C-X., Li, M-S., Liang, X-L., Weng, J-F., Zhang, D-G., Li, L., Zhang, S-H., 2011. A proposed selection criterion for drought resistance across multiple environments in maize. *Breeding Sci.* 61, 101–108.

Jones, H.G., Serraj, R., Loveys, B.R., Xiong, L., Wheaton, A., Price, A., 2009. Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Funct. Plant Biol.* 36, 978–989.

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.

Kutschera, U., Pieruschka, R., Berry, J.A., 2010. Leaf development, gas exchange characteristics, and photorespiratory activity in maize seedlings. *Photosynthetica* 48, 617–622.

Lenochová, Z., Soukup, A., Votrubová, O., 2009. Aerenchyma formation in maize roots. *Biol. Plant.* 53, 263–270.

Li, Y., Sperry, J.S., Shao, M., 2009. Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. *Environ. Exp. Bot.* 66, 341–346.

Lopes, M.S., Araus, J.L., Van Heerden, P.D.R., Foyer, C.H., 2011. Enhancing drought tolerance in C₄ crops. *J. Exp. Bot.* 62, 3135–3153.

Makbui, S., Guler, N.S., Durmus, N., Guven, S., 2011. Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. *Turk J. Bot.* 35, 369–377.

Makumbi, D., Betrán, F., Banziger, M., Ribaut, J-M., 2011. Combining ability, heterosis and genetic diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) under stress and non-stress conditions. *Euphytica* 180, 143–162.

Monneveux, P., Sanchez, C., Beck, D., Edmeades, G.O., 2006. Drought tolerance improvement in tropical maize source populations: evidence of progress. *Crop Sci.* 46, 180–191.

Moussa, H.R., Abdel-Aziz, S.M., 2008. Comparative response of drought tolerant and sensitive maize genotypes to water stress. *Aust. J. Crop Sci.* 1, 31–36.

Mutava, R.N., Prasad, P.V.V., Tuinstra, M.R., Kofoid, K.D., Yu, J., 2011. Characterization of sorghum genotypes for traits related to drought tolerance. *Field Crop Res.* 123, 10–18.

Pena-Valdivia, C.B., Sánchez-Urdaneta, A.B., Trejo, C., Aguirre R., R.; Cárdenas S, E., 2005. Root anatomy of drought sensitive and tolerant maize (*Zea mays* L.) seedlings under different water potentials. *Cereal Res. Commun.* 33, 705–712.

Poorter, L., Bongers, F., 2006. Leaf traits are good predictors of plant performance across 53 rain forest species. *Ecol.* 87, 1733–1743.

Postma, J.A., Lynch, J.P., 2011. Root cortical aerenchyma enhances the growth of maize on soils with suboptimal availability of nitrogen, phosphorus, and potassium. *Plant Physiol.* 156, 1190–1201.

Sage, R.F., 2004. The evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytol.* 161, 341–370.

Shao, H., Chu, L., Jaleel, C.A., Zhao, C., 2008. Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. *C. R. Biol.* 331, 215–225.

Smit, M.A., Singels, A., 2006. The response of sugarcane canopy development to water stress. *Field Crop Res.* 98, 91–97.

Souza, T.C., Castro, E.M., Pereira, F.J., Parentoni, S.N., Magalhães, P.C., 2009. Morpho-anatomical characterization of root in recurrent selection cycles for flood tolerance of maize (*Zea mays* L.). *Plant Soil Environ.* 55, 504–510.

Souza, T.C., Magalhães, P.C., Pereira, F.J., Castro, E.M., Parentoni, S. N., 2011. Morpho-physiology and maize grain yield under periodic soil flooding in successive selection cycles. *Acta Physiol. Plant.* 33, 1877–1885.

Souza, T.C., Magalhães, P.C., Pereira, F.P., Castro, E.M., Silva Junior, J.M., Parentoni, S.N., 2010. Leaf plasticity in successive selection cycles of 'Saracura' maize in response to periodic soil flooding. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 45, 16–24.

Tollenaar, M., 1992. Is low density a stress in maize? *Maydica* 37, 305–311.

Vitale, L., Di Tommasi, P., Arena, C., Fierro, A., Santo, A.V., Magliulo, V., 2007. Effects of water stress on gas exchange of field grown *Zea mays* L. in Southern Italy: an analysis at canopy and leaf level. *Acta Physiol. Plant.* 29, 317–326.

Zhu, J., Brown, K.M., Lynch, J.P., 2010. Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Environ.* 33, 740–749.

Versão preliminar do artigo.

Tabela 1 Porcentagem de folhas secas, concentração de clorofila total (TC), área foliar (LA) e seus respectivos RVT durante a imposição do estresse hídrico em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030)

Tratamentos/ano	Folhas secas (%)		TC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		LA (cm^2)	
	2010	2011	2010	2011	2010	2011
DKB estressado	22.88±2.9 a	19.06±1.4 a	6,00±4.0 a	8.28±3.0 a	5312±1269 c	6488±900 b
BRS estressado	23.68±1.1 a *	19.98±3.6 a	9,28±2.8 a	11.00±2.3 a	7081±1300 b	7701±950 b
DKB irrigado	13.51±2.5 b	15.96±5.0 a	9,05±3.6 a	8.59±3.0 a	7198±800 b	7071±410 b
BRS irrigado	12.52±3.0 b	11.60±4.0 a	12,59±5.5 a	11.31±4.0 a	8370±364 a	8544±221 a
RVT DKB	1.69	1.50	0.66	0.94	0.74	0.91
RVT BRS	1.89	1.72	0.73	0.95	0.83	0.90

* Médias seguidas por mesma letra nas colunas 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. RVT = valor relativo de tolerância (estressado/irrigado)

Tabela 2 Intervalo entre florescimento masculino e feminino (ASI), condutância estomática (g_s), eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) e seus respectivos RVT durante a imposição do estresse hídrico em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030)

Tratamentos/ano	ASI		g_s ($\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$)		Fv/Fm	
	2010	2011	2010	2011	2010	2011
DKB estressado	2.50±0.8 b	2.75±1.0 a	44.5±5.0 b	67.0±30 b	0.74±0.4 a	0.74±1.4 a
BRS estressado	4.25±0.5 a *	3.00±0.6 a	21.1±1.8 c	50.0±23 b	0.63±0.3 b	0.70±1.6 a
DKB irrigado	1.50±0.5 c	1.50±0.8 b	198±16 a	205±25 a	0.77±0.2 a	0.79±5.0 a
BRS irrigado	1.75±1.0 c	1.50±0.5 b	235±25 a	210±40 a	0.78±0.3 a	0.79±4.0 a
RVT DKB	1.69	1.50	0.26	0.33	0.96	0.90
RVT BRS	1.89	1.72	0.05	0.25	0.80	0.85

* Médias seguidas por mesma letra nas colunas 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. RVT = valor relativo de tolerância (estressado/irrigado)

Tabela 3 Peso de espigas (EAW), número de espigas (EM), comprimento de espigas (EL) e seus respectivos RVT durante a imposição do estresse hídrico em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030)

Tratamentos/ano	EAW (g)		EN		EL (cm)	
	2010	2011	2010	2011	2010	2011
DKB estressado	3.489±520 b	3.935±15 b	31.84±3.3 b	20.25±5 a	13±7 a	12±5 a
BRS estressado	2.878±566 b *	3.340±10 b	27.66±2.8 b	21.75±4 a	12±4 a	12±6 a
DKB irrigado	9.752±415 a	4.750±20 a	47.16±4.7 a	22.00±5 a	18±4 a	15±5 a
BRS irrigado	8.497±375 a	4.165±22 a	49.50±6.0 a	23.75±2 a	18±4 a	17±3 a
RVT DKB	0.41	0.83	0.69	0.91	0.72	0.70
RVT BRS	0.34	0.81	0.56	0.90	0.69	0.70

* Médias seguidas por mesma letra nas colunas 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. RVT = valor relativo de tolerância (estressado/irrigado)

Tabela 4 Rendimento de grãos (GY), peso de 100 sementes (W100), índice de colheita (HI) e seus respectivos RVT durante a imposição do estresse hídrico em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030)

Tratamentos/ano	GY (Kg ha ⁻¹)		W100 (g)		HI	
	2010	2011	2010	2011	2010	2011
DKB estressado	2.963±230 b	7.063±149 b	32.12±0.8 b	40.70±02 a	0.30±0.03 b	0.37±0.1 a
BRS estressado	2.204±110 c *	5.980±113 c	32.47±0.5 b	37.60±01 a	0.20±0.01 c	0.35±0.1 a
DKB irrigado	7.674±209 a	9.600±750 a	36.01±0.5 a	40.80±01 a	0.43±0.05 a	0.44±0.09 a
BRS irrigado	6.725±410 a	8.962±160 a	36.54±0.2 a	39.21±0.4 a	0.40±0.03 a	0.40±0.05 a
RVT DKB	0.42	0.74	0.89	0.89	0.69	0.82
RVT BRS	0.33	0.66	0.89	0.88	0.50	0.80

* Médias seguidas por mesma letra nas colunas 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. RVT = valor relativo de tolerância (estressado/irrigado)

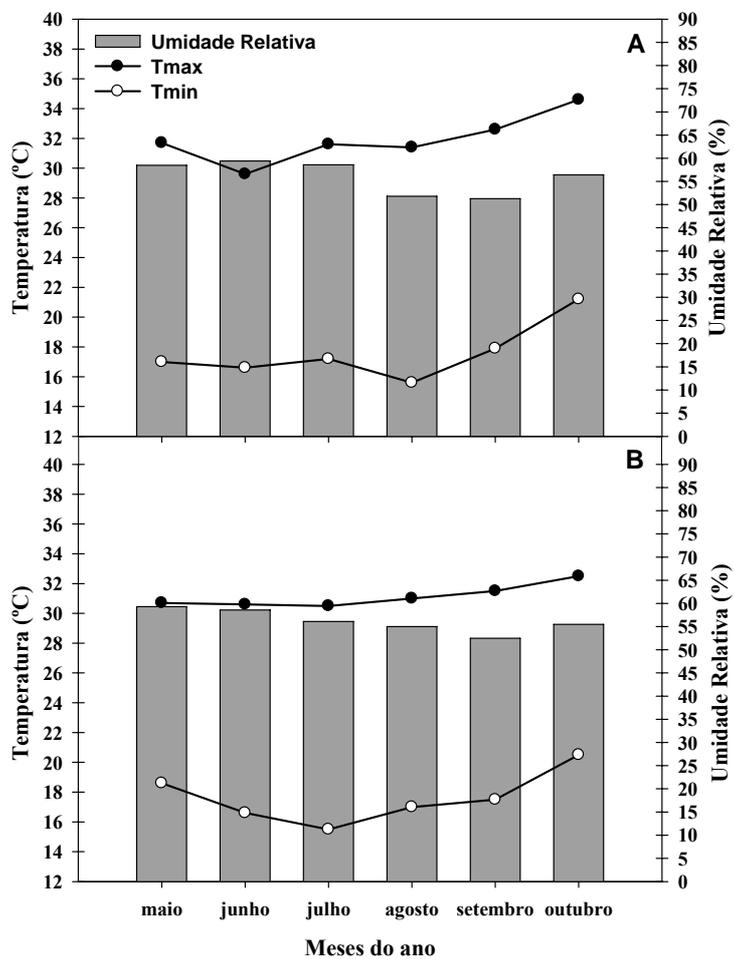


Fig. 1. Temperatura máxima e mínima e umidade relativa referentes ao período experimental. (A), ano de 2010 e (B), ano de 2011

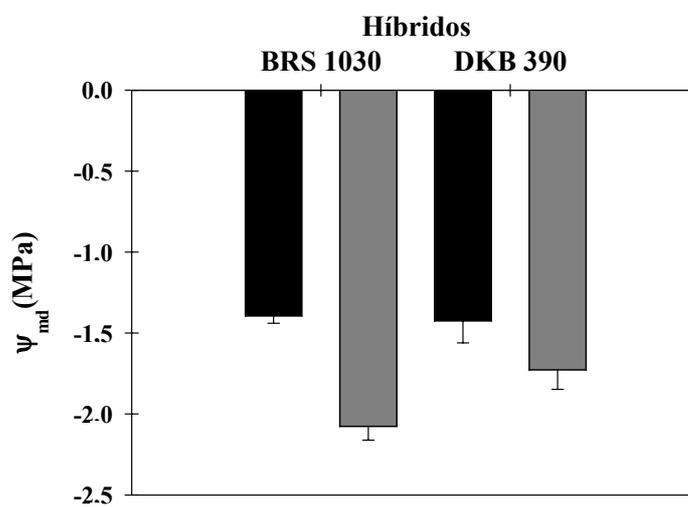


Fig. 2. Potencial hídrico médio foliar (Ψ_{md}) durante a imposição do estresse hídrico em dois híbridos contrastantes a seca no ano de 2010. Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E. Barra preta representa os tratamentos irrigados e barra cinza os tratamentos estressados

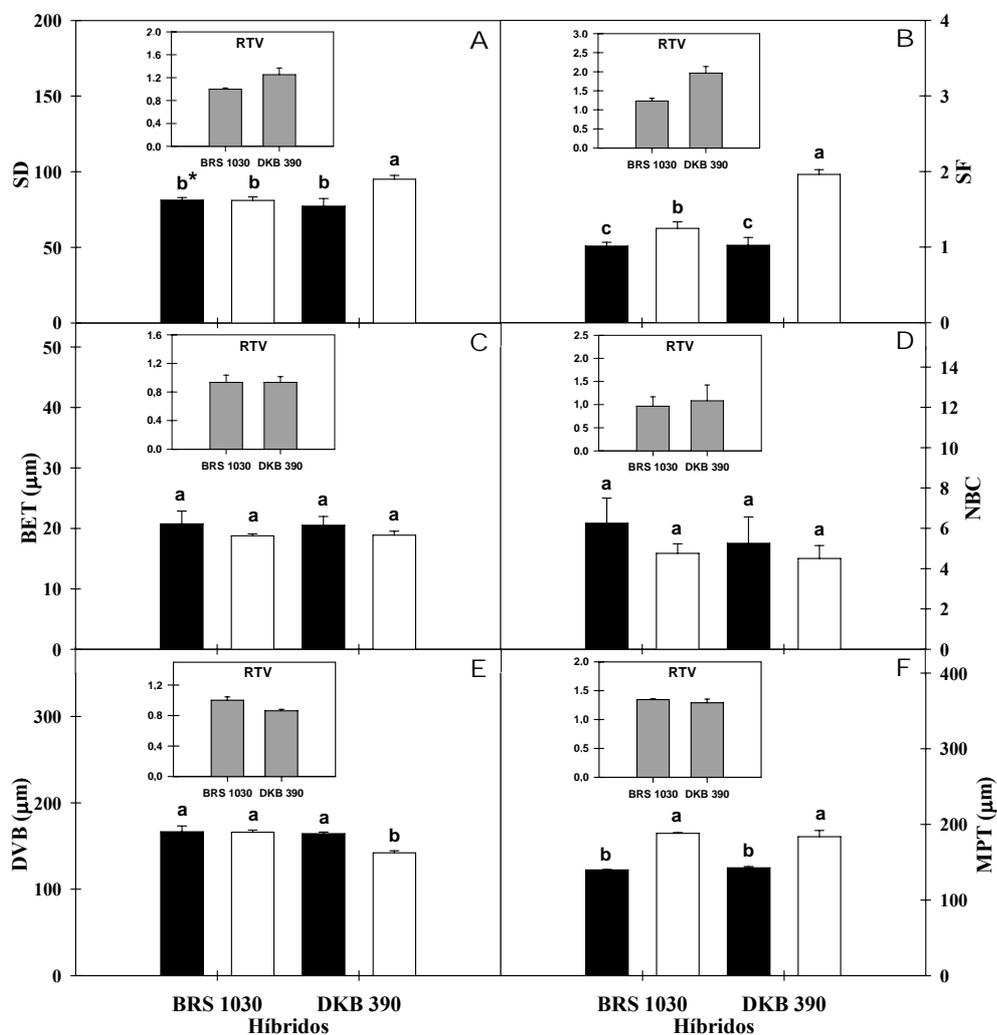


Fig. 3. Características anatômicas foliares durante a imposição do estresse hídrico em dois híbridos contrastantes a seca no ano de 2010. Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E. * Médias seguidas por mesma letra em cada barra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Barra preta representa os tratamentos irrigados, barra branca os tratamentos estressados e barra cinza os valores relativos de tolerância (RVT). (A) densidade estomática (SD), (B) funcionabilidade estomática (SF), (C) espessura da epiderme abaxial (BET), (D) número de células buliformes a cada 2 mm (NBC), (E) distância entre os feixes vasculares (DVB) e (F) espessura do mesofilo (MPT)

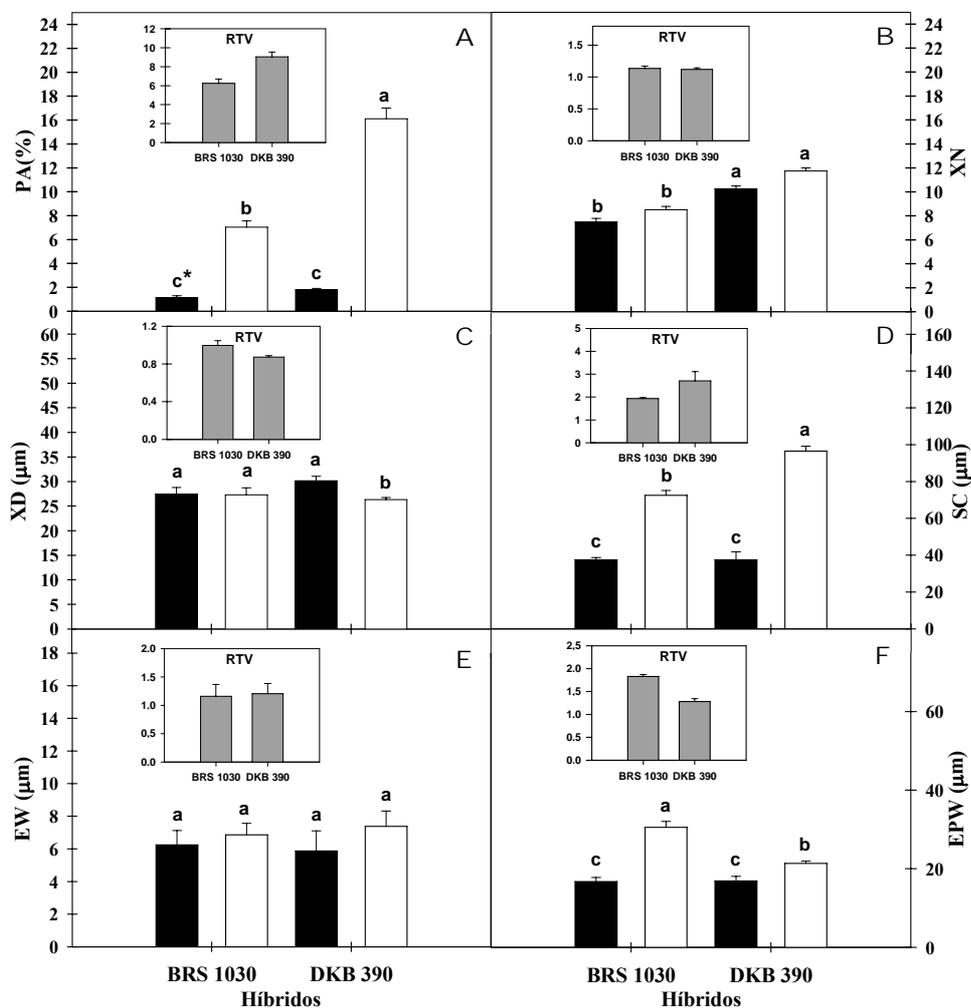


Fig. 4. Características anatômicas radiculares durante a imposição do estresse hídrico em dois híbridos contrastantes a seca no ano de 2010. Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E. * Médias seguidas por mesma letra em cada barra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Barra preta representa os tratamentos irrigados, barra branca os tratamentos estressados e barra cinza os valores relativos de tolerância (RVT). (A) proporção de aerênquima no córtex (PA), (B) número de células do metaxilema (NM), (C) diâmetro das células do metaxilema (DM), (D) espessura da camada de células suberizadas na região da hipoderme (exoderme) (SC), (E) espessura da endoderme (EW) e (F) espessura da epiderme (EPW)

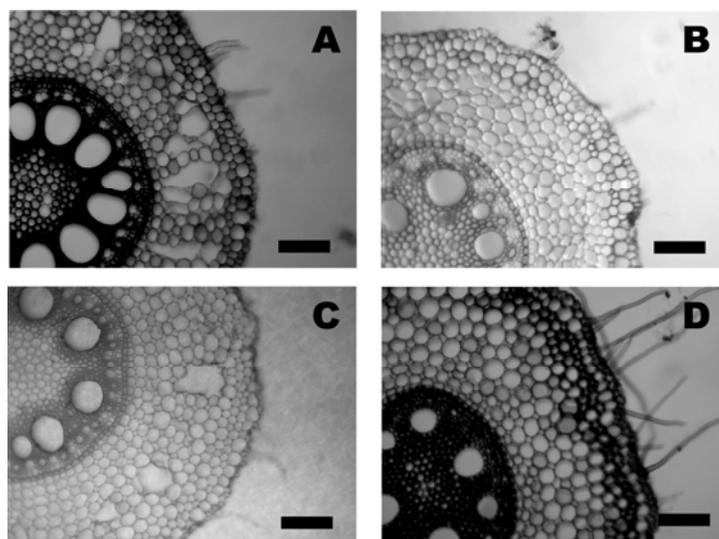


Fig. 5. Fotomicrografias de secções transversais radiculares em dois híbridos contrastantes ao estresse de seca. (A) DKB 390 estressado, (B) DKB 390 irrigado, (C) BRS 1030 estressado e (D) BRS 1030 irrigado. A barra corresponde a 100 μm

ARTIGO 2

**ENVOLVIMENTO DA APLICAÇÃO FOLIAR DE ABA NA
TOLERÂNCIA DE DOIS HÍBRIDOS DE MILHO CONTRASTANTES
AO ESTRESSE DE SECA: MUDANÇA NOS PARÂMETROS HÍDRICOS
E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE**

Artigo redigido conforme norma da revista *Journal of Plant Growth
Regulation*

Envolvimento da aplicação foliar de ABA na tolerância de dois híbridos de milho contrastantes ao estresse de seca: mudança nos parâmetros hídricos e na atividade enzimática antioxidante

Resumo - Estudos relacionados à tolerância à seca estão sendo cada vez mais estratégicos para Brasil, já que, este é o estresse abiótico mais complexo e de maior efeito sobre as culturas. 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 ao estresse hídrico em híbridos de milho contrastante à seca: DKB 390 (tolerante) e BRS 1030 (sensível). Para isso foi realizado em casa de vegetação a caracterização do status hídrico (potencial hídrico de base- Ψ_{pd} ; médio- Ψ_{md} e do caule- Ψ_{st}) e da atividade antioxidante enzimática. O teor de ABA, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malonaldeído (MDA) também foram analisados. 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 menor teor de MDA, menor redução do status hídrico e maior atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase do ascorbato e do guaiacol, glutatona redutase, deidroascorbato redutase, polifenoloxidase e L-fenilalanina amonialiase. Com 10 dias de estresse 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 a 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. 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 e outros 2009; Farré e 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 (Karuppanandia e outros 2011; Mittler 2002). Em quantidades exageradas as espécies reativas de oxigênio podem atacar as membranas lipídicas levando à formação de um produto final chamado malonaldeído (MDA) pelo processo de peroxidação lipídica (Mittler 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 glutathiona, ácido ascórbico, compostos fenólicos; e de um sistema enzimático composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e do guaiacol (POD), glutathiona redutase (GR), monodeidroascorbato redutase (MDHAR), deidroascorbato redutase (DHAR) e polifenoloxidase (PPO) (Mittler 2002; Ali e Ashraf 2011; Karuppanandia e outros 2011). Além dessas enzimas a L-fenilalanina amonialiase (PAL) tem

mostrado importante papel na tolerância a vários estresses (incluindo a seca) devido a sua atividade estar ligada a produção de compostos fenólicos que também são antioxidantes (Pourcel e outros 2006; Sánchez-Rodríguez e outros 2011).

Para aumentar a produtividade agrícola em áreas com deficiência hídrica é de suma importância induzir tolerância à seca e a várias práticas agronômicas e fisiológicas têm sido feitas 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 várias moléculas como ácido ascórbico (Dolatabadian e outros 2009), ácido fúlvico (Anjum e outros 2011b), glinenobetaína (Anjum e outros 2011a); trealose (Ali e Ashraf 2011), pró-oxidantes (Darkó e outros 2011), brassinolídeos (Anjum e outros 2011c) e ácido abscísico (Jiang e Zhang 2002; Kellos e outros 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 e outros 2009) e arroz (Ye e outros 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 e outros 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 a 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 tolerante e sensível 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) 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 uma ótima umidade do solo até a imposição do estresse. Todos os tratamentos fitossanitários necessários a 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* (tensiômetro) 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 (totalmente

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 pulverizada na parte aérea (Aroca e outros 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 5h da manhã, potencial hídrico médio (*midday*, Ψ_{md}) às 12h e potencial hídrico do caule (Ψ_{st}). O Ψ_{st} foi feito em folhas sem transpiração cobertas com papel insulfilm e papel alumínio, 1h 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 e Turner 1970; Choné e outros 2001).

Extração e quantificação de ABA foliar

Após a coleta dos tecidos foliares estes foram guardados em freezer - 80°C até a extração. O método de extração do ABA foliar foi adaptado a partir de e Guóth e outros (2009). Quinhentos miligramas de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido em seguida foram adicionados 5 ml de 80% (v/v) 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 4000 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, 100mM NaCl, 1mM MgCl₂ hexaidratado) (1,5 µL/100 mg de amostra) e a detecção foi feita utilizando *Kits* de ensaio imunoenzimático (*Phytodetec ABA Enzyme Immunoassay Test Kit – Sigma-Aldrich*).

Extração e quantificação do teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA)

Amostras contendo 250 mg de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP, homogeneizados em 5 mL de tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugados, a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação do teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e MDA.

O teor de H₂O₂ foi medido em espectrofotômetro de acordo com Alexieva e outros (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 1 h 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 Buege e Aust (1978) baseado na reação com ácido tiobarbitúrico. Aliquotas 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 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 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. A atividade das enzimas foram expressas por miligramas (mg) de proteínas que foram determinadas pelo método de Bradford (1976) utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovina (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 constituído 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ 12,5 mM. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 mM⁻¹ cm⁻¹ (Havir e 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), H₂O₂ 1 mM, L-ácido ascórbico 0,8 mM e água destilada. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8mM⁻¹ cm⁻¹ (Nakano e 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, H₂O₂ 3,87 mM. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹.

A análise da atividade da redutase da glutathiona (GR, EC 1.6.4.2) baseou-se no método de Cakmak e outros (1993), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH, com decréscimo na absorbância a 340 nm. A mistura reacional foi incubado 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 mM⁻¹cm⁻¹. Correções dos extratos foram feitas através da atividade a 340 nm sem NADPH quando necessário.

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 mM⁻¹ cm⁻¹ (Hossain e 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. Este 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 10 mM 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 e McComb 1992). A mistura reacional compreendeu 25 μ L 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 μ L de HCl 6 N.

Análise dos dados

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 ($P \leq 0.05$), 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 estressado tanto no híbrido DKB 390 quanto 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, 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 próximas a 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).

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 e sem 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).

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 a seca BRS 1030 estressado apresentou menor Ψ_{md} no 1º dia de recuperação hídrica.

Teor de ácido abscísico (ABA), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malonaldeído (MDA)

Entre os tratamentos, observa-se que no primeiro dia de estresse o DKB 390 estressado e estressado+ABA apresentaram maior teor de ABA seguido dos tratamentos BRS 1030 estressado e estressado+ABA (Tabela 1). No quinto dia sob estresse o DKB 390 estressado+ABA apresentou significativamente maior teor de ABA, seguido dos outros tratamentos estressados. Com o aumento de dias sob estresse (10 dias) houve inversão com o BRS 1030 estressado+ABA significativamente maior, seguido do BRS 1030 estressado, DKB 390 estressado+ABA e DKB irrigado+ABA. No primeiro dia de recuperação hídrica os tratamentos BRS 1030 estressado e estressado+ABA apresentaram os maiores valores seguidos dos outros tratamentos. No 5º e 10º dia de recuperação hídrica não houve diferenças entre os tratamentos (Tabela 1).

Observa-se que, no primeiro dia sob estresse, o DKB 390 estressado+ABA apresentou o maior teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (Tabela 2). No quinto e décimo dias sob estresse o híbrido BRS 1030 estressado foi o que apresentou significativamente o maior teor seguido de BRS 1030 estressado+ABA e DKB 390 estressado. Também no quinto e décimo dia de estresse, quando considerado apenas os tratamentos estressados, o menor teor de H_2O_2 foi encontrado no tratamento DKB 390 estressado+ABA (Tabela 2).

Mesmo com 24 horas de recuperação hídrica (1 dia) o BRS 1030 estressado e estressado+ABA ainda apresentaram maior teor de H_2O_2 e nos dias restantes de recuperação hídrica não houve diferenças entre os tratamentos.

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

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 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 observados diferenças significativas entre os tratamentos no primeiro dia de estresse (Fig. 3A). 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. 3A).

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. 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).

Na atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) não foi verificado diferenças entre os tratamentos no primeiro 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 10º 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 (1º 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 primeiro dia de estresse hídrico (Fig. 3D). 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. 3D).

No primeiro dia de estresse hídrico observou-se que a atividade da glutathione redutase (GR) foi maior no DKB 390 estressado+ABA em relação aos outros tratamentos (Fig. 4A). No quinto dia a atividade da GR foi significativamente maior no DKB 390 estressado e no décimo 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 deidroascorato redutase (DHAR) no 1º dia de estresse hídrico, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, porém no 5º 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 10º dia de estresse DKB 390 estressado e DKB 390; BRS 1030 irrigado apresentaram as menores médias. No 1º dia de recuperação hídrica o DKB 390; BRS 1030 estressado e DKB 390; BRS 1030 irrigado+ABA apresentaram as maiores médias (Fig. 4B).

Na atividade da enzima polifenol oxidase (PPO) foi observado diferenças significativas apenas no 5º e 10º dia de estresse (Fig. 4C). No quinto dia a maior atividade da PPO foi verificada no DKB 390 estressado. Já no décimo 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 primeiro 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. Foram observados 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 e outros 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 e Zhang 2002; Lu e outros 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 e outros 2003; Bano e Yasmeeen 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 (DaCosta e 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 e outros 2009).

A perda de água em células, tecidos e órgãos devido ao estresse hídrico é bem discutida na literatura (Farooq e outros 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 (Médici e outros 2003; Ali e 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 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) a 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 deste hormônio em aumentar a condutividade hidráulica favorecendo uma melhor hidratação dos tecidos. O balanço de ABA raiz/parte aérea influencia o status hídrico das plantas (Kudoyarova e outros 2011). Como relatado anteriormente foram observados

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 e outros (2005) o ABA na parte aérea acumula-se principalmente nos tecidos vasculares e em seguida nas células guardas. Assim como relatado por Kudoyarova e outros (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 do potencial hídrico do caule (Ψ_{st}) ser mais utilizado em outras culturas como a uva (Choné e outros 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 aliviado esta situação. Com relação ao aumento do teor de H_2O_2 nos dias iniciais de estresse no híbrido tolerante (DKB), com aplicação de ABA, resultados semelhantes foram encontrados por Kellos e outros (2008) em que uma linhagem de milho tolerante exibiu maior teor de H_2O_2 quando aplicado ácido abscísico. O aumento de H_2O_2 no início do estresse no DKB 390 pode ser explicado pelo papel do H_2O_2 como uma potente molécula sinalizadora do estresse (Moller e outros 2007). Com o aumento do estresse hídrico é notório a participação do H_2O_2 pela reação de Haber-Weiss/Fenton como radical livre atacando as membranas celulares (Queval e outros 2008). Torna-se necessário então, uma varredura para diminuição dessas moléculas, mas esta capacidade

não foi encontrada no híbrido sensível (BRS 1030) porque não conseguiu diminuir a quantidade de peróxido de hidrogênio.

Em milho baixo teor de malonaldeído (MDA) tem sido associado à tolerância à seca (Anjum e outros 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 comparado 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 e outros 2008).

A diminuição do teor de MDA e de H_2O_2 observados quando o híbrido tolerante (DKB 390) estava sob estresse severo (10 dias) pode ter sido devido ao aumento da atividade enzimática antioxidante nas folhas que proporciona uma melhor proteção contra o estresse oxidativo (Moussa e Abdel-Aziz 2008). Nos últimos tempos tem sido grande o interesse em investigações do sistema de defesa antioxidante em folhas, devido a um dos princípios de que a folha age como um sensor primário no estresse de seca. Além disso, tem sido demonstrado que as respostas antioxidantes são bem correlacionadas com a tolerância de cultivares de milho sob seca (Chugh e outros 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 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. A glutathione redutase (GR), enzima importante na reciclagem da glutathione em condições de estresse (Szalai e outros 2009) foi a única enzima que exibiu diferenças entre os tratamentos (destacando-se o DKB 390-estressado-ABA) no primeiro dia de estresse. 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 no que pode ter acarretado os altos teores de H_2O_2 e de peroxidação lipídica (teor de MDA).

No DKB 390 frente à aplicação de ABA (DKB 390estressado+ABA), um aumento do teor de ABA e de H_2O_2 no primeiro dia de estresse seguido de um aumento da atividade enzimática da catalase no quinto dia podem ser explicados: 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 e outros 2011) e também em milho (avaliando a atividade da CAT e outras enzimas) (Jiang e Zhang 2002; Hu e outros 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 flavonóides (Pourcel e outros 2006). Alguns estudos com gergelim (*Sesamum indicum* L.) evidenciaram maior atividade da PPO em genótipos tolerantes em comparação

aos sensíveis (Fazeli e outros 2007), contudo nos resultados mostrados neste 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. Estes dados são semelhantes ao encontrado por Hura e outros (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 e outros 2008; Gholizadeh 2010).

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

Agradecimentos

Os autores agradecem à Capes, pela bolsa de estudos; ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, por terem concedido subsídios para a realização da pesquisa.

Referências

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

- Ali Q, Ashraf M (2011) Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. *J Agron Crop Sci* 197, 258–271
- Anjum SA, Farooq M, Wang LC, Xue LL, Wang SG, Wang S, Zhang S, Chen M (2011a) Gas exchange and chlorophyll synthesis of maize cultivars are enhanced by exogenously-applied glycinebetaine under drought conditions. *Plant Soil Environ* 57, 326–331
- 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
- Anjum SA, Wang LC, Farooq M, Hussain M, Xue LL, Zou CM (2011c) Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. *J Agron Crop Sci* 197, 177–185
- 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
- Bano A, Yasmien S (2010) Role of phytohormones under induced drought stress in wheat. *Pak J Bot* 42, 2579–2587
- Begg JE, Turner NC (1970) Water potential gradients in field tobacco. *Plant Physiol* 46, 343–346
- Bettaieb I, Hamrouni-Sellami I, Bourgou S, Limam F, Marzouk B (2011) Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiol Plant* 33, 1103–1111
- Buege JA, Aust S D (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52, 302–310
- 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

Cahill DM, McComb JA (1992) 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*. *Physiol Mol Plant Pathol* 40,315–332

Cakmak I, Strbac D, Marschner H (1993) Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germination wheat seeds. *J Exp Bot* 44, 127–132

Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Muller A (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 137, 209–219

Choné X, Leeuwen CV, Dubourdieu D, Gaudillere JP (2001) Stem water potential is a sensitive indicator of grapevine water status. *Ann Bot* 87, 477–483

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

DaCosta M, Huang B (2007) Drought survival and recuperative ability of bentgrass species associated with changes in abscisic acid and cytokinin production. *Am Soc Hort Sci* 132, 133–141

Darkó É, Fodor J, Dulai S, Ambrus H, Szenzenstein A, Király Z, Barnabás B (2011) Improved cold and drought tolerance of doubled haploid maize plants selected for resistance to prooxidant tert-butyl hydroperoxide. *J Agron Crop Sci* 197, 454–465

Dolatabadian A, Modarres-Sanavy SAM, Sharifi M (2009) Alleviation of water deficit stress effects by foliar application of ascorbic acid on *Zea mays* L. *J Agron Crop Sci* 195, 347–355

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

Farooq M, Wahid A, Kokayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29, 185–212

Farré I, Faci J-M (2009) Deficit irrigation in maize for reducing agricultural water use in a mediterranean environment. *Agr Water Manage* 96, 383–394

- Fazeli F, Ghorbanli M, Niknam (2007) Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biol Plant* 51, 98–103
- Gholizadeh A (2010) Anti-oxidation profile in the leaves of maize inbreds: elevation in the activity of phenylalanine ammonia lyase under drought stress. *J Plant Sci* 5, 137–145
- Guóth A, Tari I, Gallé A, Csiszár J, Pécsváradi A, Cseuz L, Erdei L (2009) Comparison of the drought stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: changes in flag leaf photosynthetic activity, ABA levels, and grain yield. *J Plant Growth Regul* 28, 167–176
- Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84, 450–455
- Hossain MA, Asada K (1984) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol* 25, 85–92
- Hu XL, Jiang M, Zhang A, Lu J (2005) Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta* 223, 57–68
- Hura T, Hura K, Grzesiak S (2008) 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. *J Agron Crop Sci* 194, 104–112
- Jiang M, Zhang J (2003) 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 Environ* 26, 929–939
- 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
- Kar ME, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* 57, 315–319
- 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

Kudoyarova G, Veselova S, Hartung W, Farhutdinov R, Veselov D, Sharipova G (2011) Involvement of root ABA and hydraulic conductivity in the control of water relations in wheat plants exposed to increased evaporative demand. *Planta* 233, 87–94

Lin J, Wang G (2002) Doubled CO₂ 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 H₂O₂- and NO-induced antioxidant enzyme activities. *Plant Physiol Bioch* 47, 132–138

Medici LO, Machado AT, Azevedo RA, Pimentel C (2003/4) Glutamine synthetase activity relative water content and water potential in maize submitted to drought. *Biol Plant* 47, 301–304

Mitler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7, 405–410

Moller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58, 459–481

Moussa HR, Abdel-Aziz SM (2008) Comparative response of drought tolerant and sensitive maize genotypes to water stress. *Aust J Crop Sci* 1, 31–36

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

Pourcel L, Routaboul J-M, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I (2006) Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci* 12, 29–36

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

Sánchez-Rodríguez E, Moreno D A, Ferreres F, Rubio-Wilhelmi M del-M, Ruiz J M (2011) Differential responses of Five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. *Phytochemistry* 72, 723–729

Szalai G, Hellos T, Galiba G, Kocsy (2009) Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under stress conditions. *J Growth Regul* 28, 66–80

Ye N, Zhu G, Liu Y, Li Y, Zhang J (2011) ABA Controls H₂O₂ accumulation through the induction of OsCATB in rice leaves under water stress. *Plant Cell Physiol* 52, 689–698

Versão preliminar do artigo.

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

Tratamento/DAE	1	5	10	1*	5*	10*
Teor de ácido abscísico (ABA) $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF						
DKB estressado	15.83 \pm 1.1 b ⁺	17.17 \pm 1.3 b	10.30 \pm 0.7 c	8.00 \pm 0.6 b	9.33 \pm 0.7 a	9.001.7 \pm a
BRS estressado	13.33 \pm 0.7 c	14.66 \pm 0.8 b	13.50 \pm 0.8 b	12.00 \pm 1.5 a	10.00 \pm 0.6 a	9.22 \pm 0.3 a
DKB estressado+ABA	21.00 \pm 0.6 a	20.00 \pm 0.6 a	15.33 \pm 0.3 b	10.33 \pm 0.3 b	12.00 \pm 0.6 a	11.61 \pm 0.7 a
BRS estressado+ABA	17.34 \pm 1.2 b	16.66 \pm 0.9 b	21.68 \pm 0.9 a	12.29 \pm 0.3 a	11.34 \pm 1.2 a	12.33 \pm 0.3 a
DKB irrigado	10.35 \pm 0.3 d	9.66 \pm 1.1 d	10.66 \pm 0.4 c	10.30 \pm 1.3 b	11.00 \pm 0.6 a	11.10 \pm 1.6 a
BRS irrigado	10.00 \pm 0.5 d	10.00 \pm 0.5 d	11.31 \pm 1.2 c	9.67 \pm 0.3 b	10.65 \pm 0.3 a	11.23 \pm 1.2 a
DKB irrigado+ABA	12.20 \pm 0.2 c	11.66 \pm 1.0 c	13.00 \pm 0.9 b	10.00 \pm 0.8 b	11.00 \pm 0.1 a	12.34 \pm 0.7 a
BRS irrigado+ABA	12.00 \pm 0.4 c	12.60 \pm 1.2 c	11.66 \pm 1.1 c	10.67 \pm 0.6 b	12.00 \pm 0.6 a	12.20 \pm 1.0 a

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

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

Tratamento/DAE	1	5	10	1*	5*	10*
	Teor de peróxido de hidrogênio (μmol g⁻¹MF)					
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
DKB estressado+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≤0.05). Cada valor indica a média do tratamento ±S.E e * indicam fase da recuperação hídrica

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

Tratamento/DAE	1	5	10	1*	5*	10*
	Teor de MDA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)					
DKB estressado	27.04±10 a ⁺	112.34±46 a	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 a	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 a	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 a	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 b	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 b	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 b	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 b	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 e * indicam fase da recuperação hídrica

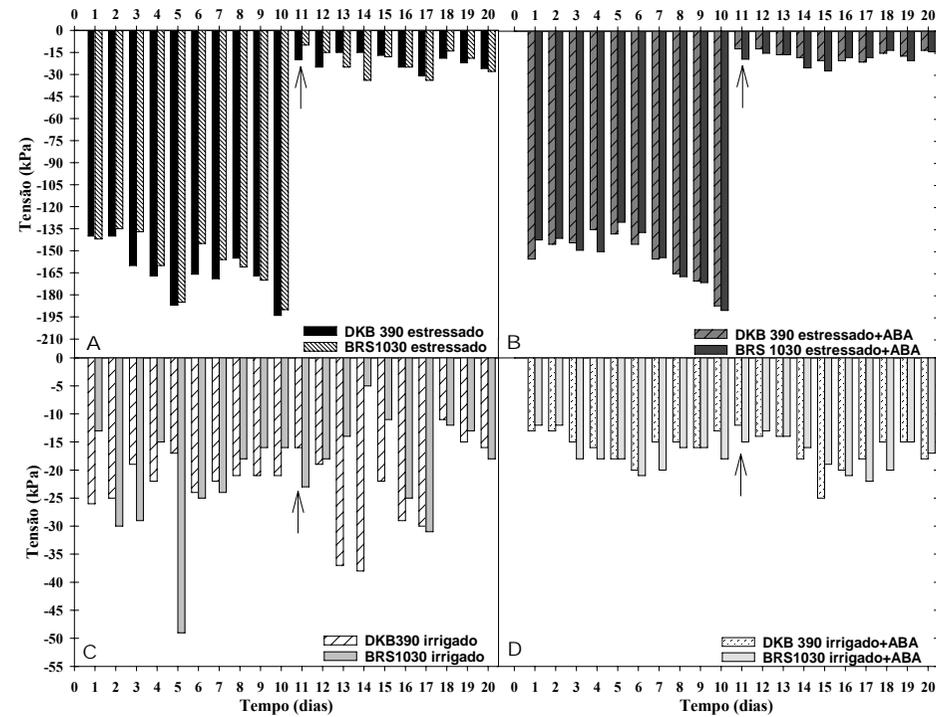


Fig. 1 Valores médios da tensão da água no solo medida com tensiômetros Watermark durante a imposição do estresse e recuperação hídrica. (A) DKB 390 e BRS1030 estressados (B) DKB 390 e BRS1030 estressados com aplicação de ABA (C) DKB 390 e BRS1030 irrigados (D) DKB 390 e BRS1030 irrigados com aplicação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

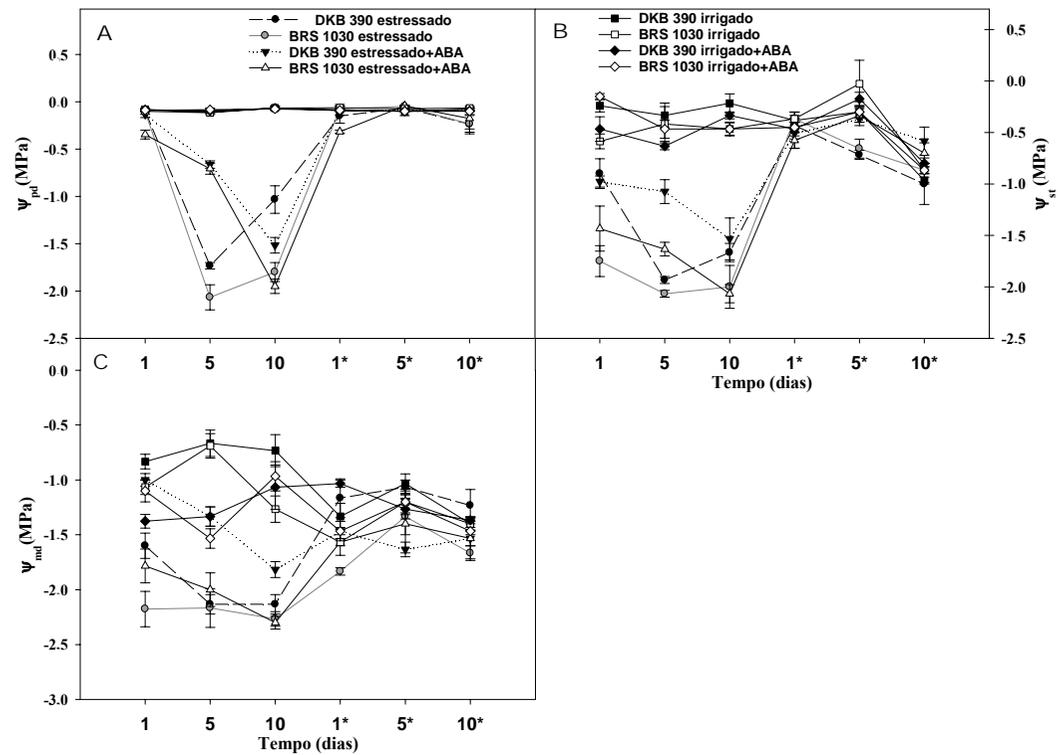


Fig. 2 Parâmetros de relação hídrica durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030) com e sem aplicação de ABA exógeno. **(A)** potencial hídrico de base (Ψ_{pd}) **(B)** potencial hídrico do caule (Ψ_{st}) e **(C)** potencial hídrico médio (Ψ_{md}). Cada valor indica a média do tratamento \pm S.E e * indicam fase da recuperação hídrica

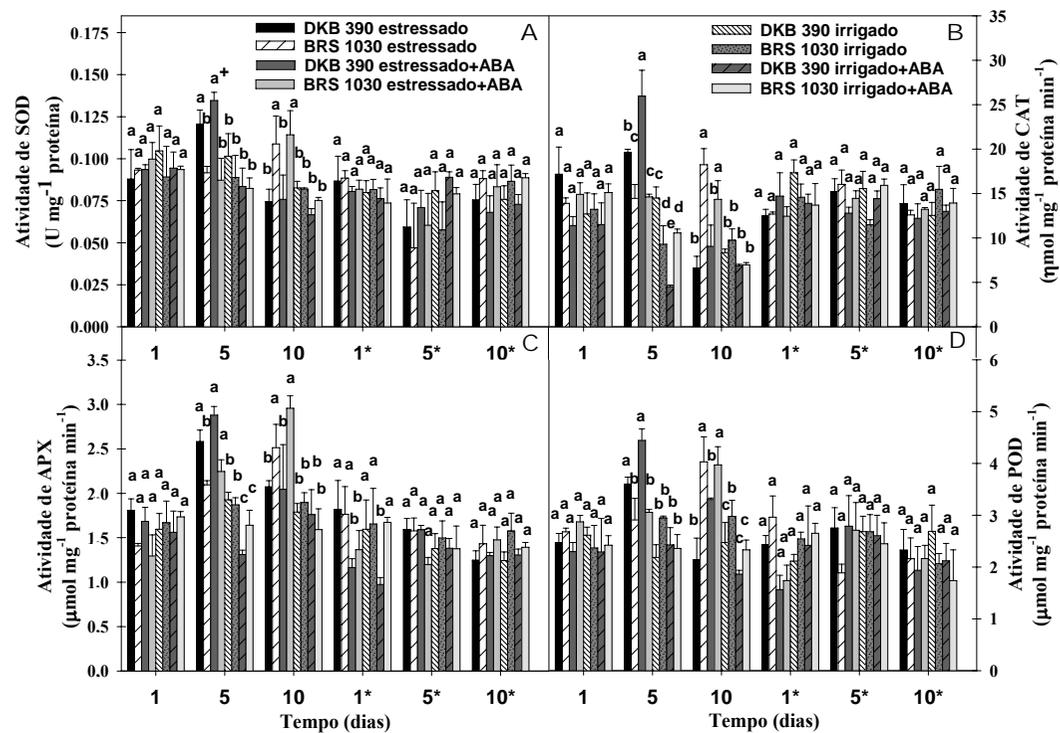


Fig. 3 Atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (POD) durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030) com e sem aplicação de ABA exógeno.* Médias seguidas por mesma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

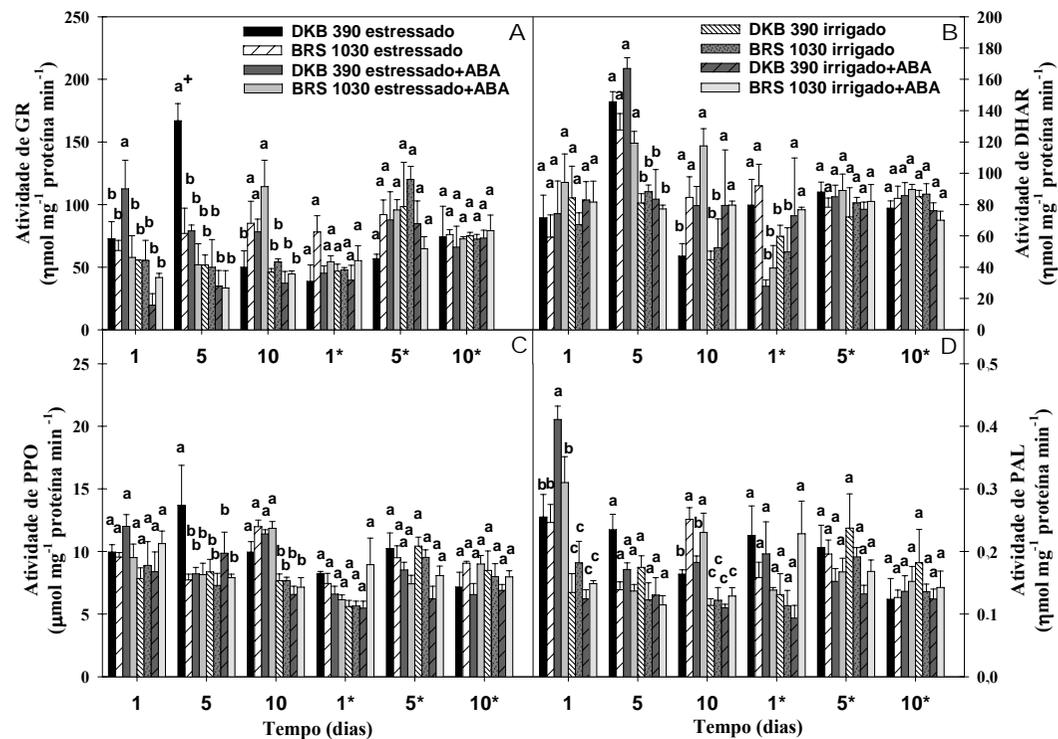


Fig. 4 Atividade da glutatona redutase (GR), deidroascorbato resutase (DHAR), polifenol oxidase (PPO) e L-fenilalanina amonialiase (PAL) durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030) com e sem aplicação de ABA exógeno.* Médias seguidas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

ARTIGO 3

**APLICAÇÃO DE ÁCIDO ABSCÍSICO E CARACTERIZAÇÃO DA
FOTOSSÍNTESE E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA EM DOIS
HÍBRIDOS DE MILHO CONTRASTANTES AO ESTRESSE DE SECA**

**Artigo redigido conforme norma da revista APP – *Acta Physiologiae
Plantarum***

Aplicação de ácido abscísico e caracterização da fotossíntese e fluorescência da clorofila em dois híbridos de milho contrastantes ao estresse de seca

Resumo - A seca é uma das principais limitações no cultivo de milho no Brasil e práticas agronômicas e fisiológicas têm sido buscadas para superar esse estresse e consequentemente aumentar a produção. Assim, neste estudo foi investigado o papel da aplicação do ácido abscísico (ABA) na tolerância à seca em dois híbridos contrastantes à seca (DKB 390 e BRS 1030, respectivamente tolerante e sensível). A deficiência hídrica foi imposta por 10 dias no estágio de florescimento associada a uma dose de 100 μ M de ácido abscísico aplicada na parte aérea. Avaliações de trocas gasosas, fluorescência da clorofila, teor relativo de água (RWC) e teor endógeno de ABA foram realizadas nos dias de estresse e também na recuperação hídrica (volta da irrigação). A relação funcional entre RWC com parâmetros de trocas gasosas e fluorescência também foi realizada e observou-se uma significativa relação. Na recuperação hídrica não foram observadas diferenças entre os tratamentos. O DKB 390 apresentou maior taxa fotossintética (P_n) e taxa de transporte de elétrons (ETR) frente ao estresse hídrico enquanto que o BRS 1030 resultou na maior concentração de carbono interno (C_i), menor *quenching* fotoquímico (qP) e não fotoquímico (NPQ) e menor relação F_v/F_m . O DKB 390 foi mais responsivo à aplicação de ABA do que o BRS 1030 apresentando maior teor de endógeno de ABA no primeiro dia de estresse. O tratamento com ABA no DKB 390 aliviou o efeito do estresse hídrico através da manutenção do status hídrico, do aumento dos parâmetros fotossintéticos e da diminuição do declínio nas funções do fotossistema II durante o estresse.

Palavras-chave: *Zea mays* L. Estresse hídrico. Status hídrico. Trocas gasosas. *Quenching*.

Introdução

As plantas de modo geral em condições de baixa disponibilidade hídrica, a perda de água excede a absorção em intensidade suficiente para causar o decréscimo no conteúdo de água e a redução do turgor, resultando numa diminuição da expansão celular. Esse fato pode também causar alterações de vários processos morfológicos e bioquímicos (Chaves et al. 2003).

O fitohormônio ABA (ácido abscísico) controla muitos processos importantes no crescimento e desenvolvimento da planta (Tardieu et al. 2010). Além de amplas funções no desenvolvimento e crescimento ele também regula respostas adaptativas em condições adversas. Sob baixa disponibilidade hídrica há um grande acúmulo de ABA regulando a abertura e o fechamento dos estômatos. Seu acúmulo em folhas estressadas exerce um grande papel na redução da perda de água pela transpiração (Liu et al. 2005). O fechamento estomático também pode ser causado pelo aumento do transporte de ABA (através do xilema), produzido nas raízes, em contato com o solo seco, para a parte aérea (Schachtman e Goodger, 2008).

Condição de déficit hídrico moderado pode levar uma redução marcante na eficiência fotossintética por fatores estomáticos (fechamento dos estômatos), entretanto, com o aumento da intensidade do estresse, começam a ocorrer limitações não estomáticas como inibição ou danificação do metabolismo bioquímico (enzimas da fotossíntese) e das reações fotoquímicas (atividade do fotossistema II) (Beyel e Bruggemann 2005; Xu et al. 2008; Guóth et al. 2009).

Estudos sobre a fotossíntese em milho sob diferentes condições ambientais são ferramentas importantes para uma seleção mais “refinada” de genótipos tolerantes, conseguindo assim obter altas produtividades em meio a estresses abióticos (Yu e Setter, 2003; Kim et al. 2006). Juntamente com a fotossíntese, a fluorescência da clorofila (principalmente se for medida

simultaneamente usando sistemas de trocas gasosas com câmara de fluorescência integrada) pode ajudar bastante na diferenciação de híbridos de milho e no entendimento fisiológico do processo em condições de seca (Long e Bernacchi 2003; O'Neil et al. 2006).

O milho é particularmente sensível à seca, contudo seu comportamento frente a esse estresse pode variar de acordo com a severidade e a duração de imposição do estresse, estágio fenológico e material genético (Soler et al. 2007). Uma das práticas que estão ganhando destaque nos últimos tempos é a aplicação exógena de substâncias em plantas que vem aumentando a tolerância de cultivares em áreas com deficiência hídrica. Em milho, por exemplo, observou-se que a aplicação de trealose e brasinoesteroides levou um aumento nos parâmetros de relações hídricas e de trocas gasosas como fotossíntese (P_n), condutância estomática (g_s), transpiração (E), concentração intercelular de CO_2 (C_i) e eficiência do uso da água (WUE) (Farooq et al. 2009a; Ali et al. 2011; Anjum et al. 2011).

Apesar de poucos trabalhos envolvendo milho com aplicação de ABA e trocas gasosas, Aroca et al. (2003) em estudos de estresse pelo frio observaram que genótipos tratados com ABA apresentaram maior tolerância devido à maior capacidade de enfrentar o déficit hídrico (pelo decréscimo da condutância estomática) causado pelo estresse. Pouco se sabe sobre a interação entre a aplicação de ABA e genótipos de milho tolerantes e sensíveis à seca. Já com relação à aplicação de ABA e estresse oxidativo em milho, sabe-se que o ABA aumenta atividade enzimática antioxidante em genótipos tolerantes à seca (Kellos et al. 2008). Os objetivos deste trabalho, portanto, foram caracterizar dois híbridos de milho contrastantes ao estresse de seca através do teor relativo de água e de ABA foliar, fluorescência da clorofila e trocas gasosas e estudar o efeito da aplicação do ABA nos dois genótipos.

Materiais e Métodos

Material vegetal e condições de crescimento

Foram utilizados dois híbridos contrastantes para tolerância ao estresse de seca: DKB 390 (tolerante) BRS 1030 (sensível) este 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 uma ótima umidade do solo até a imposição do estresse. Todos os tratamentos fitossanitários necessários a 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* (tensiômetro) 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 (totalmente 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 pulverizada em toda parte aérea (Aroca e outros 2003).

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso em esquema fatorial com 8 tratamentos (DKB 390 estressado e irrigado com e sem aplicação de ABA exógeno; e BRS 1030 estressado e irrigado com e sem aplicação de ABA exógeno) e 4 épocas de coleta (1 e 10 dias de estresse hídrico e 1 e 10 dias de recuperação hídrica) e 3 repetições. Para o teor relativo de água (RWC) e teor de ABA foram utilizados 6 épocas de coleta devido à mais uma análise no 5º dia de estresse e no 5º dia de recuperação hídrica. 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).

Teor relativo de água

O estado hídrico das plantas foi avaliado através do teor relativo de água (RWC). Para determinar o RWC, 10 discos foliares (1 cm de diâmetro) por repetição foram pesados para obter o peso fresco (PF). Em seguida estes foram colocados para flutuar em água e após 18 horas a 4 °C e escuro, o peso túrgido foi determinado (PT). Esses discos então foram levados a estufa e secos a 72 °C e o peso seco (PS) foram obtidos. O cálculo para determinar o teor relativo de água foi $RWC (\%) = (PF-PS) / (PT-PS) \times 100$ (Anjum et al. 2011).

Extração e quantificação de ABA foliar

Após a coleta dos tecidos foliares estes foram guardados em freezer - 80°C até a extração. O método de extração do ABA foliar foi adaptado a partir de e Guóth e outros (2009). Quinhentos miligramas de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido em seguida foram adicionados 5 ml de 80% (v/v) 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 4000 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, 100mM NaCl, 1mM MgCl₂ hexaidratado) (1,5 µL/100 mg de amostra) e a detecção foi feita utilizando Kits de ensaio imunoenzimático (*PhytoDetec ABA Enzyme Immunoassay Test Kit – Sigma-Aldrich*).

Medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila

As medidas de trocas gasosas foram feitas simultaneamente com a fluorescência da clorofila através de um sistema portátil de fotossíntese (IRGA, Model LI-6400, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) com câmara de fluorescência integrada (LI-6400-40 *leaf chamber fluoremeter, Li-Cor*). Todas as medidas foram realizadas no período da manhã entre 8 e 11h em uma folha totalmente

expandida (folha da espiga). Os parâmetros avaliados foram taxa fotossintética foliar (P_n), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i) e eficiência do uso da água (WUE, relação entre fotossíntese e transpiração). As medidas foram feitas em uma área foliar de 2 cm^2 , com fluxo de CO_2 controlado utilizando cilindros (Licor) de 12 gramas numa concentração de $380\ \mu\text{mol mol}^{-1}$. A densidade de fluxo de fótons (PPFD) foi de $1500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ e temperatura foliar foi controlada ($26\text{ }^\circ\text{C}$).

Após uma adaptação de 30 minutos no escuro e temperatura controlada (26°C) foi medida a fluorescência mínima (F_o) com uma luz suficientemente baixa evitando reações fotoquímicas e foi medida também a fluorescência máxima (F_m), aplicando-se por 0,8 segundos um pulso de luz saturante de $7000\ \mu\text{m}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Nas amostras adaptadas no escuro, a máxima eficiência do fotossistema (PSII) foi estimada pela razão F_v/F_m e F_v/F_o e a produção quântica basal dos processos não fotoquímicos no PSII foi calculada pela razão F_o/F_m (Roháček 2002). Em seguida as folhas foram iluminadas com luz actínica com intensidade de $1500\ \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ por 20 minutos. Então a fluorescência constante (F_s) foi obtida e em seguida outro pulso de luz saturante de luz foi aplicado por 1 s para obtenção da fluorescência máxima emitida pelas folhas (F_m'). A luz actínica foi removida e as folhas foram irradiadas com luz vermelho-distante, para obtenção de F_o adaptado a luz (F_o'). O *quenching* fotoquímico foi calculado como $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$, e o *quenching* não fotoquímico foi calculado como $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$. Outros parâmetros também foram feitos como: taxa de transporte de elétrons (ETR) = $[(F_m' - F_s)/F_m'] \times \text{PPFD} \times 0,5 \times 0,84$; mudança relativa da fluorescência da clorofila mínima (q_o) = $(F_o - F_o')/F_o$; produção quântica fotoquímica efetiva adaptada à luz (Φ_{PSII}) = $F_m' - F_s/F_m' = \Delta F/F_m'$ (van Kooten e Snel 1990).

Análise dos dados

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 ($P \leq 0.05$), no programa Sisvar versão 4.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil). A relação funcional entre teor relativo de água (RWC) com parâmetros de trocas gasosas e fluorescência e relação funcional da taxa fotossintética (P_n) com ETR e F_v/F_m foram determinadas por análise de regressão linear e não linear utilizando o programa TableCurve 2D versão 5.01 e com um nível de significância de 0.05 ($P \leq 0.05$)* e de 0.01 ($P \leq 0.01$)** . Outras análises de regressão com outras características foram realizadas, porém sem evidências significativas (dados não mostrados).

Resultados

Monitoramento da umidade do solo

A figura 1 ilustra a tensão de água no solo nos diversos tratamentos. Nos 10 primeiros dias, em todos os tratamentos estressados tanto para DKB 390 quanto para 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 e 10 dias) observou-se uma diminuição gradativa da tensão de água no solo. Após 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 próximas a 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 BRS 1030. No tratamento irrigado com aplicação de ABA os valores de tensão de água do solo

apresentaram menor variação e tiveram médias mais próximas da capacidade de campo (Fig. 1D).

Teor relativo de água

Com relação ao teor relativo de água (RWC), para os tratamentos irrigados, tanto no DKB 390 quanto no BRS 1030 e mesmo com a aplicação de ABA, não houve diferenças durante os dias de análises (Fig. 2). Contudo para todos os tratamentos com imposição de estresse hídrico houve uma redução efetiva quando comparados aos 10 dias seguintes de reirrigação (recuperação hídrica).

No primeiro dia de imposição do estresse a maior redução do teor relativo de água (RWC) foi no híbrido sensível (BRS 1030 estressado) seguido do mesmo tratado com ABA (Fig. 2). No quinto dia de estresse o tratamento BRS 1030 estressado apresentou uma significativa redução seguida do DKB 390 estressado. Ainda no quinto dia de estresse, os dois híbridos estressados tratados com ABA tiveram maior RWC do que aqueles sem aplicação de ABA, porém o DKB apresentou maior RWC. Com 10 dias de imposição do estresse o DKB 390 estressado apresentou menor redução do teor relativo de água. Não houve significativas diferenças nos tratamentos estressados na recuperação hídrica (Fig. 2).

Teor de ácido abscísico (ABA)

Tratamentos irrigados tiveram menor teor de ABA do que os estressados. No primeiro dia de estresse observa-se que o DKB 390 estressado+ABA apresentou maior teor de ABA seguido dos tratamentos BRS 1030 estressado+ABA e DKB 390 estressado (Fig.3). No quinto dia sob estresse o DKB 390 estressado+ABA apresentou significativamente maior teor, 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 DKB 390 estressado+ABA, BRS 1030-estressado e DKB irrigado+ABA (Fig. 3). No primeiro dia de recuperação hídrica os tratamentos BRS 1030 estressado e estressado+ABA apresentaram os maiores valores seguidos dos outros tratamentos. No 5º e 10º dias de recuperação hídrica não houve diferenças entre os tratamentos (Fig.3).

Trocas gasosas

Com relação à taxa fotossintética foliar (P_n), no primeiro dia, o déficit hídrico afetou significativamente os tratamentos estressados, porém foi mais pronunciado no tratamento BRS 1030 estressado+ABA (Fig. 4A). Com 10 dias de estresse os tratamentos DKB 390-estressado e BRS 1030-estressado apresentaram menor P_n com valores médios de 5,9 e 4,0 $\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente. A aplicação de ABA aumentou a taxa fotossintética sendo que o DKB 390 teve maior taxa. Não houve diferenças entre os tratamentos na recuperação hídrica (1* e 10* dias) (Fig. 4A).

Tanto no primeiro quanto no segundo dia de estresse, os tratamentos estressados apresentaram menor condutância estomática (g_s), mas não diferiram entre si. E não houve diferenças entre os tratamentos na recuperação hídrica (Fig. 4B).

No primeiro dia, os tratamentos irrigados juntamente com DKB 390 estressado apresentaram menor concentração intercelular de CO_2 (C_i) (Fig. 4C). A maior C_i foi verificada no BRS1030 estressado+ABA seguido dos tratamentos BRS 1030 estressado e DKB 390 estressado+ABA. No décimo dia de estresse o BRS 1030 estressado e estressado+ABA apresentaram a maior concentração intercelular de CO_2 (C_i) seguido dos outros tratamentos estressados. Os tratamentos irrigados foram os de menores concentrações sendo que também não houve diferenças entre os tratamentos na recuperação hídrica (Fig. 4C).

Para a eficiência do uso da água (WUE) no primeiro dia, foi verificada uma diminuição nos tratamentos estressados em relação aos irrigados (Fig. 4D). E com 10 dias de estresse foi verificado o mesmo comportamento com exceção do BRS 1030 irrigado+ABA que foi significativamente igual aos tratamentos estressados. Já com 10 dias de recuperação hídrica os tratamentos DKB 390 irrigado e BRS 1030 irrigado tiveram maiores WUE (Fig. 4D).

Fluorescência da clorofila

Nos parâmetros de fluorescência de clorofila não foram verificados nenhuma diferença significativa na recuperação hídrica entre os tratamentos (Fig. 5).

Os tratamentos BRS 1030 irrigado+ABA, BRS 1030 estressado e estressado+ABA apresentaram menor produção quântica fotoquímica efetiva adaptada à luz (Φ PSII) no primeiro dia de estresse (Fig. 5A). No décimo dia os estressados sem aplicação de ABA dos dois híbridos mais o BRS 1030 estressado+ABA resultaram nas menores médias (Fig. 5A)

Observa-se na figura 5B que no primeiro dia sob estresse o *quenching* fotoquímico (qP) diminuiu significativamente nos tratamentos BRS 1030 estressado e estressado+ABA e DKB 390 estressado+ABA. Já no décimo dia todos os estressados incluindo os com aplicação de ABA apresentaram menor qP mas não diferiram entre si (Fig. 5B).

Para o *quenching* não fotoquímico (NPQ), tanto no primeiro quanto no décimo dia de estresse os tratamentos BRS 1030 estressado e estressado+ABA apresentaram significativamente maiores medias em relação aos tratamentos DKB 390 estressado e estressado+ABA, contudo as menores médias foram verificadas nos tratamentos irrigados (Fig. 5C).

Na taxa de transporte de elétrons (ETR) no primeiro dia houve uma redução significativa no tratamento BRS 1030 estressado+ABA seguido dos

BRS 1030-estressado e DKB 390 estressado+ABA (Fig. 5D). Observa-se uma queda brusca na ETR do primeiro para o décimo dia de estresse principalmente nos tratamentos estressados sem ABA seguido do BRS 1030 estressado+ABA (Fig. 5D).

No primeiro dia os tratamentos estressados, incluindo os com aplicação de ABA, apresentaram a maior mudança relativa da fluorescência da clorofila mínima (q_0), mas não diferiram entre si (Fig. 5E). Mas, com o aumento do estresse hídrico (10 dias) o BRS 1030 estressado e estressado+ABA apresentaram maior q_0 do que os outros tratamentos estressados (Fig. 5E).

Com relação a máxima eficiência do fotossistema II (F_v/F_m) observou-se que no primeiro dia de estresse o híbrido BRS 1030 (estressado e estressado+ABA) apresentaram uma diminuição significativa em relação aos outros tratamentos (Fig. 5F). No décimo dia de estresse houve uma maior redução da relação F_v/F_m do que no primeiro dia, contudo ainda os tratamentos BRS 1030 estressado e estressado+ABA tiveram menor média (Fig. 5F).

Os tratamentos estressados incluindo os com aplicação de ABA, no primeiro e no décimo dia de estresse, apresentaram uma menor eficiência máxima do processo fotoquímico no PSII (F_v/F_0), mas não diferiram entre si (Fig. 5G).

Considerando o primeiro dia de estresse, após os tratamentos irrigados, o DKB 390 estressado+ABA apresentou a menor média da produção quântica basal dos processos não fotoquímicos no PSII (F_0/F_m) (Fig. 5H). E no décimo dia os tratamentos DKB 390 irrigado e irrigado+ABA e BRS 1030 irrigado foram os que apresentaram as menores médias (Fig. 5H).

Relação entre os parâmetros de trocas gasosas e RWC

Nos tratamentos estressados, os valores de teor relativo de água (RWC) foram significativamente relacionados com a taxa fotossintética (P_n), tanto para

DKB 390 ($y = -0.04x^2 + 7.89x - 330.44$; $R^2 = 0.89^{**}$) quanto para o BRS 1030 ($y = 52.40x^{0.5} - 0.01x^2 - 352.80$; $R^2 = 0.87^{**}$) (Fig. 6A). Em decorrência de RWC menores, o BRS 1030 possuiu P_n maior que o DKB 390. Contudo sob baixos RWC e com aplicação de ABA ocorreu inversão e o DKB 390 resultou em uma maior P_n do que o BRS 1030 (Fig. 6B). No tratamento estressado com ABA também houve significativa relação de RWC com taxa fotossintética (P_n) no DKB 390 ($y = -0.008x^2 + 1.80x - 56.02$; $R^2 = 0.85^{**}$) e no BRS 1030 ($y = 0.68x - 28.35$; $R^2 = 0.67^{**}$) (Fig. 6B). Na relação entre RWC e concentração intercelular de CO_2 (C_i) apenas os tratamentos BRS 1030 estressado ($y = -0.0013x^{2.5} + 0.09x^{1.5} + 154.95$; $R^2 = 0.68^{**}$) e BRS 1030 estressado+ABA ($y = 216.71x^{0.5} - 13.67x - 691.18$; $R^2 = 0.87^{**}$) foram significativamente relacionados (Fig. 6C, D).

Relação entre os parâmetros de fluorescência e RWC

Para o teor relativo de água (RWC) e função da taxa de transporte de elétrons (ETR) os tratamentos DKB 390 estressado ($y = 868.43x^{0.5} - 46.07x - 4001.16$; $R^2 = 0.88^{**}$), BRS 1030 estressado ($y = -0.06x^2 + 11.54x - 466.19$; $R^2 = 0.85^{**}$), DKB 390 estressado+ABA ($y = 0.038x^2 - 4.91x + 207.88$; $R^2 = 0.50^*$) e BRS 1030 estressado+ABA ($y = 0.08x^2 - 11.49x + 406.53$; $R^2 = 0.58^*$) foram significativamente relacionados (Figs. 7A e 7B). Com aplicação de ABA o DKB 390 apresentou maiores ETR em baixos RWC (Fig. 7B).

Os valores de RWC e *quenching* fotoquímico (qP) foram significativamente relacionados nos tratamentos DKB 390 estressado ($y = 0.008x - 0.45$; $R^2 = 0.74^*$) e BRS 1030 estressado ($y = 0.005x - 0.101$; $R^2 = 0.60^*$) (Fig. 7C). A aplicação de ABA afetou a relação de RWC e qP, pois levou o DKB 390 a maiores valores de qP em relação ao BRS 1030 (Fig. 7D). Os valores dos tratamentos DKB 390 estressado+ABA ($y = 0.003x - 0.01$; $R^2 =$

0.72*) e BRS 1030 estressado+ABA ($y = -1.17x^{0.5} + 0.07x + 4.93$; $R^2 = 0.50^*$) também foram significativamente relacionados.

Uma significativa relação foi encontrada entre RWC e *quenching* não fotoquímico (NPQ) nos tratamentos DKB 390 estressado ($y = -0.74x^{0.5} + 0.01x + 7.91$; $R^2 = 0.66^{**}$) e BRS 1030 estressado ($y = 0.02x^{0.5} - 0.05x + 6.42$; $R^2 = 0.85^{**}$) (Fig. 7E), assim como nos tratamentos com aplicação de ABA: DKB 390 estressado+ABA ($y = 3.99x^{0.5} - 0.25x - 13.12$; $R^2 = 0.65^{**}$) e BRS 1030 estressado+ABA ($y = 8.92x^{0.5} - 0.55x - 32.36$; $R^2 = 0.65^{**}$) (Fig. 7F).

Nos tratamentos estressados apenas houve significância na relação entre RWC e máxima eficiência do fotossistema II (Fv/Fm) no tratamento BRS 1030 ($y = 0.005x + 0.32$; $R^2 = 0.72^{**}$) (Fig. 7G). Com adição de ABA tanto o DKB 390 estressado+ABA ($y = 0.002x + 0.58$; $R^2 = 0.87^{**}$) quanto BRS 1030 estressado+ABA ($y = 0.002x + 0.51$; $R^2 = 0.75^*$) apresentaram relação significativa (Fig. 7H).

Relação entre taxa fotossintética (P_n) com ETR e Fv/Fm

Houve significativa relação entre a taxa fotossintética (P_n) e a taxa de transporte de elétrons (ETR). A análise de regressão indicou uma significativa dependência entre essas duas características no DKB 390 estressado ($y = 2.31x + 1.94$; $R^2 = 0.90^{**}$) e no BRS 1030 estressado ($y = 2.25x - 1.02$; $R^2 = 0.90^{**}$) (Fig. 8A). Da mesma forma para os tratamentos DKB 390 estressado+ABA ($y = 2.14x + 6.97$; $R^2 = 0.70^{**}$) e BRS 1030 estressado+ABA ($y = 2.31x - 0.63$; $R^2 = 0.84^{**}$) também foram encontrados significativas dependências (Fig. 8B).

Para a P_n e em função da Fv/Fm foram observadas significativas dependências entre elas em todos os tratamentos: DKB 390 estressado ($y = 0.001x + 0.73$; $R^2 = 0.75^{**}$), BRS 1030 estressado ($y = 0.004x + 0.62$; $R^2 = 0.60^{**}$) (Fig. 8A), DKB 390 estressado+ABA ($y = 0.003x + 0.66$; $R^2 = 0.63^*$) e BRS 1030 estressado+ABA ($y = 0.003x + 0.65$; $R^2 = 0.85^{**}$) (Fig. 8B).

Discussão

Foram observados 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 e outros 2011).

O estresse de seca, significativamente, afetou os teores relativos de água (RWC), teor de ABA, os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência avaliados neste trabalho, entretanto uso do tratamento de ABA nas folhas alterou significativamente os valores de alguns destes parâmetros.

Com aplicação de ABA na parte aérea, no primeiro dia de estresse, DKB 390 aumentou seu teor interno de ABA sugerindo ser mais receptivo ao ABA exógeno do que o híbrido sensível BRS 1030. Mesmo sem o tratamento com ABA, DKB 390 apresentou maior teor de ABA foliar (Fig. 2). Jiang e Zhang (2002) aplicando ABA em milho também observaram um aumento interno deste hormônio. No início do estresse hídrico uma maior quantidade de ABA foliar pode ser importante para ativação do sistema antioxidante enzimático (Ye et al. 2011) que é fundamental para a sobrevivência em milho durante o estresse (Chugh et al. 2011; Tan et al. 2011).

Com o aumento do estresse (10 dias) percebe-se que o BRS 1030 estressado+ABA apresentou maior teor de ABA do que o DKB 390 estressado+ABA. Sem aplicação de ABA o BRS 1030 ainda resultou nos maiores teores. Esta diminuição do teor de ABA no DKB 390 durante o estresse hídrico sugere sua maior tolerância à seca, pois em alguns trabalhos são relatados uma diminuição da quantidade interna de ABA foliar durante a seca para genótipos tolerantes (DaCosta e Huang 2007; Fan et al. 2009).

O BRS 1030 apresentou menor status hídrico (teor relativo de água) do que DKB 390. Além disso, a aplicação de ABA resultou em um aumento no teor relativo de água (RWC) principalmente no DKB 390 (Fig. 3). Esta capacidade de manter o status hídrico no híbrido tolerante também foi observada em genótipos tolerantes de milho Egípcios (Moussa e Abdel-Aziz 2008). A aplicação de hormônios como brassinoesteróides em arroz (Farooq et al. 2009a), e ácido abscísico em *Cynodon dactylon* (Lu et al. 2009) também levaram a maior RWC.

Cultivares tolerantes à seca mantendo maior turgor celular podem ter maior crescimento devido à atividade das expansinas que são inclusive reguladas pelo ácido abscísico e auxina acumulados nos tecidos (Zhao et al. 2011).

No início do estresse hídrico, um aumento do status hídrico do híbrido tolerante pode ser devido à maior quantidade de ABA encontrada em suas folhas, pois o ABA pode aumentar a condutividade hidráulica quando transportado das folhas para as raízes resultando em maior absorção de água e permitindo um melhor desempenho sob condições de seca (Kudoyarova et al. 2011).

Uma das primeiras respostas que ocorrem sob exposição à seca é o fechamento estomático seguido da diminuição da taxa fotossintética (P_n) (Farooq et al. 2009b). A P_n foi fortemente afetada pelo estresse hídrico nos genótipos estudados, e com 10 dias de estresse a aplicação de ABA levou os 2 híbridos (mas em maior intensidade no DKB 390) a um aumento da taxa fotossintética (Fig. 4A). Pela análise de regressão observa-se que o DKB 390 foi mais responsivo a aplicação de ABA resultando em maior fotossíntese sob baixos teores relativos de água (RWC) (Fig. 6A e B). Variabilidade genética para a tolerância à seca foi encontrada em cultivares de milho portuguesas que apresentaram maior fotossíntese (P_n) e condutância estomática (g_s) frente ao estresse (Carvalho et al. 2011).

Nos tratamentos estressados com aplicação de ABA quando o RWC decresceu ocorreu também um declínio da fotossíntese (Fig. 6B) e uma tendência de aumento na taxa de transporte de elétrons (ETR) (Fig. 7B). Isso sugere que em estresse mais severo nesses híbridos estudados ocorre uma ativação de um caminho alternativo para o fluxo de elétrons (exemplo redução de O₂; assimilação de nitrogênio) (Ripley et al. 2003; Lawlor e Tezara 2009).

O DKB 390 teve maior produção quântica fotoquímica efetiva adaptada à luz (Φ PSII) do que o BRS 1030. Além disso, a aplicação de ABA levou o DKB 390 a um significativo aumento da Φ PSII (Fig. 5A). Assim como a ETR, a Φ PSII é um indicador da capacidade fotossintética, pois mede o rendimento do transporte de elétrons no PSII (Kalefetoglu e Ekmekçi 2009). Em milho, genótipos tolerantes tendem a ter maior produção quântica fotoquímica efetiva adaptada à luz (Φ PSII) (Ding et al. 2005; O'Neill et al. 2006), contudo nenhum trabalho foi encontrado envolvendo aplicação de ABA e fluorescência da clorofila.

Em todos os tratamentos estressados ocorreram uma diminuição na condutância estomática (g_s) (Fig. 4B), entretanto não houve diferenças entre os híbridos. Apesar de o ABA ser um importante hormônio relacionado com o fechamento estomático, não foram observados efeitos entre a aplicação de ABA e a g_s . O fechamento dos estômatos limita a desidratação, diminuindo o risco da cavitação do xilema que pode comprometer a sobrevivência da planta de milho (Li et al. 2009).

As concentrações intercelulares de CO₂ (C_i) aumentaram com o estresse hídrico, sendo marcante no BRS 1030 (Fig. 4C). Este aumentou significativamente o C_i em baixos teores relativos de água (RWC) (Figs. 6C e D). Pode-se então sugerir, principalmente para o BRS 1030 que além de o fechamento estomático afetar a taxa fotossintética (P_n), houve uma limitação não estomática. Nas plantas tipo C₄, apesar de alguns autores atribuírem a limitação

estomática como fator responsável pela diminuição da fotossíntese no início do estresse, Lopes et al. (2011) em suas revisões relatam claramente a presença também da limitação não estomática.

Pode-se observar nos dados apresentados neste trabalho que o estresse hídrico levou a uma diminuição na eficiência do uso da água (WUE), porém sem diferenças entre os híbridos e entre os tratados com ABA. Uma maior sensibilidade dos estômatos (maior controle estomático) frente ao estresse hídrico que resulta em maior WUE é uma das importantes estratégias para a tolerância à seca em plantas tipo C_4 (Araus et al. 2010; Lopes et al. 2011).

Nos tratamentos estressados, a seca levou a uma diminuição na “abertura” dos centros de reação do fotossistema II medido pelo *quenching* fotoquímico (qP). No início do estresse ou quando o RWC esteve acima de 85% o DKB 390 estressado teve maior qP em relação ao BRS 1030 estressado, porém com a diminuição do RWC o qP do DKB 390 caiu com maior intensidade do que no BRS 1030. Com a aplicação de ABA pode-se verificar que houve inversão com o DKB 390 sempre com maiores médias de qP (Figs. 5B, 7C e D). Esta melhor resposta do DKB 390 pode estar ligada ao seu melhor status hídrico encontrado quando foi aplicado o hormônio. Vários trabalhos mostram diminuição de qP em milho sob estresse hídrico inclusive pelos genótipos sensíveis a seca que tendem a ter uma menor manutenção do status hídrico (Efeoglu et al. 2009; Carvalho et al. 2011).

Uma maior fotoinibição frente à seca pode estar ocorrendo no híbrido BRS 1030, pois além de menor qP ele apresentou um maior decréscimo da relação F_v/F_m e do *quenching* não fotoquímico (NPQ) (Figs. 5C e F). O NPQ está envolvido na dissipação do excesso de energia e um fraco aumento no BRS 1030 em relação ao DKB 390 pode ser devido a um pequeno pool do ciclo das xantofilas (Maxwell e Johnson 2000). Isto pode ser comprovado pela maior q_o (mudança relativa da fluorescência da clorofila mínima) encontrada no BRS

1030 (Fig. 5E). Este parâmetro (q_0) está relacionado com a quantificação do processo de dissipação térmica dentro dos centros de reação do PSII e também está ligado com a epoxidação das violoxantinas, com os mecanismos de fluxo-regulatório e com a inativação dos centros de reação do PSII (fotoinibição) (Roháček 2002; Xu et al. 2008).

Houve uma relação linear significativa e positiva entre P_n e F_v/F_m e entre P_n e ETR (Figs. 8 A e B). Com isso pode-se concluir que um decréscimo da fotossíntese foi em parte explicado pelo declínio das funções do PSII. E que com a aplicação de ABA houve um alívio no estresse hídrico reduzindo este declínio das funções do PSII. Isto também foi evidenciado em milho por Xu et al. (2008).

Na análise da eficiência máxima do PSII neste trabalho foram utilizadas dois parâmetros F_v/F_m e F_v/F_0 (Figs. 5F e G), contudo a relação F_v/F_m diferenciou mais os tratamentos. Diferentemente, Wu e Bao (2011) observaram significativas diferenças da relação F_v/F_0 em genótipos de trigo contrastantes a seca e Hura et al. (2007) também observaram em milho e tritcale.

Na avaliação da produção quântica basal do processo não fotoquímico (F_0/F_m) não houve uma expressiva diferenciação entre os tratamentos estressados apesar de que estes tiveram maiores valores do que os irrigados (Fig. 5H). Alguns autores citam a utilização do aumento desta relação como indicativo de estresse, sugerindo valores normais ou padrões entre 0.14 a 0.20 (Roháček 2002).

Os resultados deste trabalho mostram que o estresse hídrico afetou a atividade do PSII e os parâmetros de fotossíntese em ambos os híbridos, contudo o DKB 390 apresentou melhor desempenho frente ao estresse. Conclui-se também que a aplicação de ABA nas folhas aliviou o efeito do estresse hídrico no híbrido tolerante DKB 390 através da manutenção do status hídrico, do aumento dos parâmetros fotossintéticos e da diminuição do declínio nas funções do PSII durante o estresse.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Capes, pela bolsa de estudos; ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, por terem concedido subsídios para a realização da pesquisa.

Referências

- Ali Q, Ashraf M (2011) Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. *J Agron Crop Sci* 197, 258–271
- Anjum SA, Wang LC, Farooq M, Hussain M, Xue LL, Zou CM (2011) Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. *J Agron Crop Sci* 197, 177–185
- Araus JL, Sánchez C, Cabrera-Bosquet (2010) Is heterosis in maize mediated through better water use? *New Phytol* 187, 392–406
- 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
- Beyel V, Bruggemann W (2005) Differential inhibition of photosynthesis during pre-flowering drought stress in *Sorghum bicolor* genotypes with different senescence traits. *Physiol Plant* 124: 249–259
- Bettaieb I, Hamrouni-Sellami I, Bourgou S, Limam F, Marzouk B (2011) Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiol Plant* 33: 1103–1111

- Carvalho R C, Cunha A, Silva JM (2011) Photosynthesis by six Portuguese maize during drought stress and recovery. *Acta Physiol Plant* 33: 359–374
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* 30: 239–264
- Chugh V, Kaur N, Gupta AK (2011) Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought. *Indian J Biochem Biophys* 48: 47–53
- DaCosta M, Huang B (2007) Drought survival and recuperative ability of bentgrass species associated with changes in abscisic acid and cytokinin production. *Am Soc Hort Sci* 132: 133–141
- Ding L, Wang KJ, Joang GM, Liu MZ, Niu SL, Gao LM (2005) Post-anthesis changes in photosynthetic traits of maize hybrids released in different years. *Fild Crop Res* 93: 108–115
- Efeoglu B, Ekmekci Y, Çiçek N (2009) Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *S Afr J Bot* 75: 31–42
- Fan, XW, Li FM, Song L, Xiong YC, An LZ, Jia, Y, Fang XW (2009) Defense strategy of old and modern spring wheat varieties during soil drying. *Physiol Plant* 136: 310–323
- Farooq M, Wahid A, Basra SMA, Ud-Din I (2009a) Improving water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress. *J Agron Crop Sci* 195: 262–269
- Farooq M, Wahid A, Kokayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009b) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29: 185–212
- Guóth A, Tari I, Gallé A, Csiszár J, Pécsváradi A, Cseuz L, Erdei L (2009) Comparison of the drought stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: changes in flag leaf photosynthetic activity, ABA levels, and grain yield. *J Plant Growth Regul* 28: 167–176
- Hura T, Hura K, Grzesiak M, Rzepka A (2007) Effect of long-term drought stress on leaf gas exchange and fluorescence parameters in C₃ and C₄ plants. *Acta Physiol Plant* 29: 103–113

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

Kalefetoglu T, Ekmekçi Y (2009) Alterations in photochemical and physiological activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under drought stress. *J Agron Crop Sci* 195: 335–346

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

Kim S-H, Sicher RC, Bae H, Gitz DC, Baker JT, Timlin D, Reddy VR (2006) Canopy photosynthesis, evapotranspiration, leaf nitrogen, and transcription profiles of maize in response to CO₂ enrichment. *Glob Change Biol* 12: 588–600

Kudoyarova G, Veselova S, Hartung W, Farhutdinov R, Veselov D, Sharipova G (2011) Involvement of root ABA and hydraulic conductivity in the control of water relations in wheat plants exposed to increased evaporative demand. *Planta* 233: 87–94

Lawlor DW, Tezara W (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann Bot* 103: 561–579

Li Y, Sperry JS, Shao M (2009) Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. *Eviron Exp Bot* 66: 341–346

Liu F, Jensen CR, Andersen MN (2005) A review of drought adaptation in crop plants: changes in vegetative and reproductive physiology induced by ABA-based chemical signals. *Aust J Agr Res* 56: 1245–1252

Long SP, Bernacchi CJ (2003) Gas exchange measurements, what they can tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J Exp Bot* 54: 2393–2401

Lu S, Su W, Li H, Guo Z (2009) Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂- and NO-induced antioxidant enzyme activities. *Plant Physiol Bioch* 47: 132–138

Maxwell K, Johnson N (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J Exp Bot* 51: 659–668

Moussa HR, Abdel-Aziz (2008) Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Aust J Crop Sci* 1: 31–36

O' Neill PM, Shanahan JF, Schepers JS (2006) Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. *Crop Sci* 46: 681–687

Ripley BS, Gilbert ME, Ibrahim DG, Osborne CP (2007) Drought constraints on C-4 photosynthesis: stomatal and metabolic limitations in C-3 and C-4 subspecies of *Alloteropsis semialata*. *J Exp Bot* 58: 1351–1363

Roháček R (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationship. *Photosynthetica* 40: 13–29

Schachtman DP, Goodger JQD (2008) Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends Plant Sci* 13: 281–287

Soler CMT, Hoogenboom G, Sentelhas PC, Duarte AP (2007) Impact of water stress on maize grown off-season in a subtropical environment. *J Agron Crop Sci* 193: 247–261

Tan M, Lu J, Zhang A, Hu B, Zhu X, Li W (2011) The distribution and cooperation of antioxidant (Iso) enzymes and antioxidants in different subcellular compartments in maize leaves during water stress. *J Plant Growth Regul* 30: 255–271

Tardieu F, Parent B, Simonneau T Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or non-hydraulic processes? *Plant Cell Environ* 33: 636–647

van Kooten O, Snel JFG (1990) The use chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth Res* 25:147–150

Wu X, Bao W (2011) Leaf growth, gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in response to different water deficits in wheat cultivars. *Plant Prod Sci* 14: 254–259

Xu, ZZ, Zhou GS, Wang YL, Han GX, Li YJ (2008) Changes in Chlorophyll Fluorescence in maize plants with imposed rapid dehydration at different leaf ages. *J Plant Growth Regul* 27: 83–92

Ye N, Zhu G, Liu Y, Li Y, Zhang J (2011) ABA Controls H₂O₂ accumulation through the induction of OsCATB in rice leaves under water stress. *Plant Cell Physiol* 52: 689–698

Yu LX, Setter TL (2003) Comparative transcriptional profiling of placenta and endosperm in developing maize kernels in response to water deficit. *Plant Physiol* 131: 568–582

Zhao M-R, Han Y-Y, Feng Y-N, Li F, Wang W (2011) Expansins are involved in cell growth mediated by abscísico acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat. *Plant Cell Rep In press*. Doi: 10.1007/s00299-011-1185-9 (online first)

Versão preliminar do artigo.

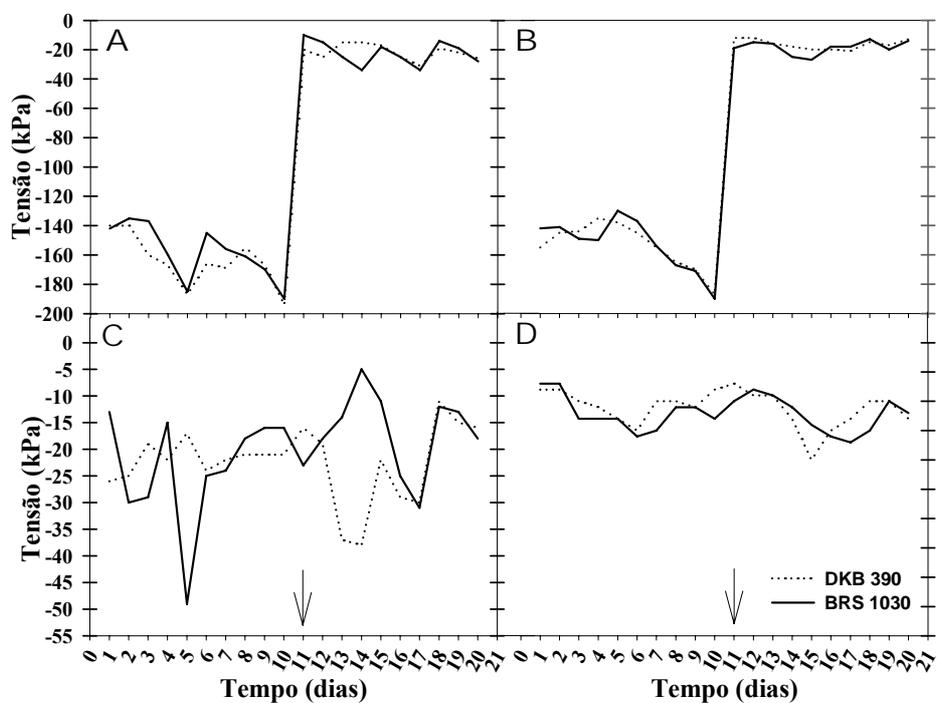


Fig. 1 Valores médios da tensão da água no solo medida com tensiômetros Watermark durante a imposição do estresse e recuperação hídrica. (A) DKB 390 e BRS1030 estressados (B) DKB 390 e BRS1030 estressados com aplicação de ABA (C) DKB 390 e BRS1030 irrigados (D) DKB 390 e BRS1030 irrigados com aplicação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

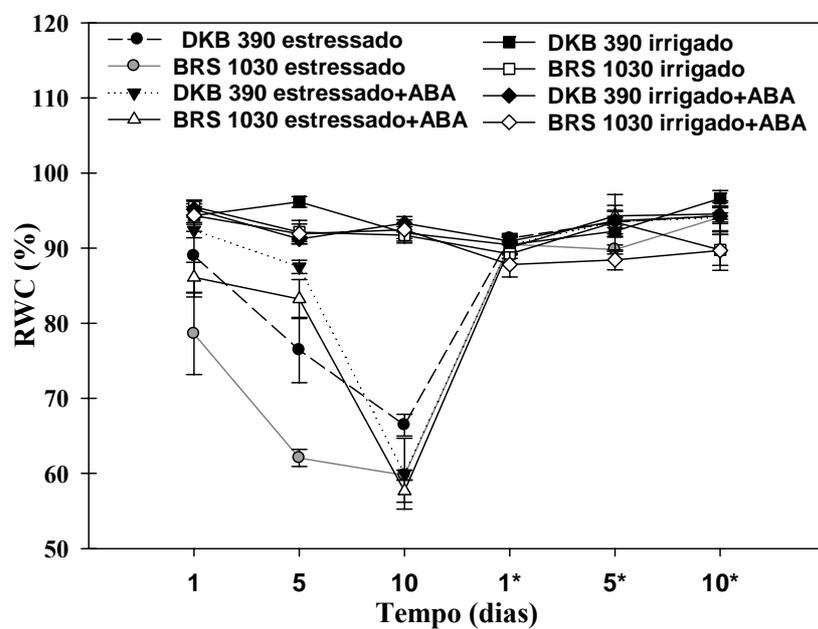


Fig. 2 Teor relativo de água (RWC) durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030) com e sem aplicação de ABA exógeno. Cada valor indica a média do tratamento \pm S.E e * indicam fase da recuperação hídrica

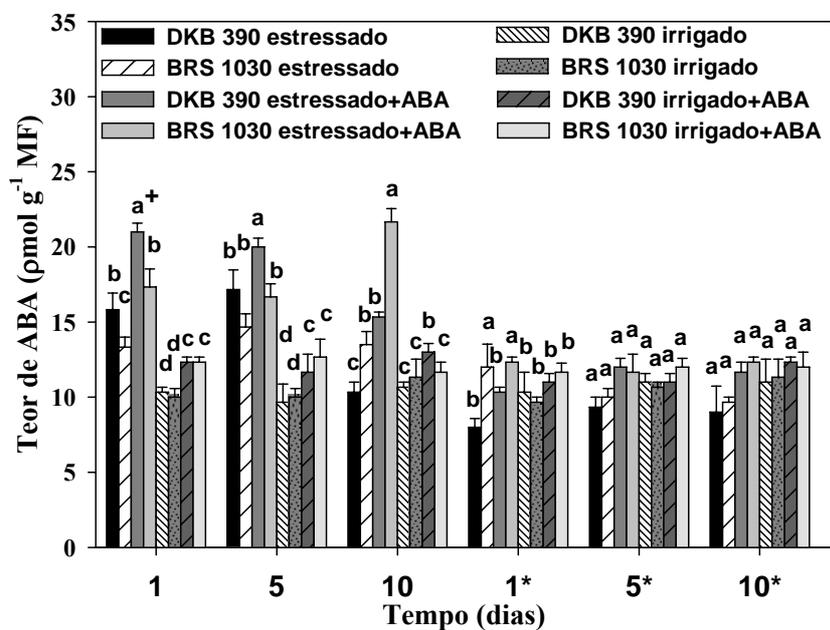


Fig. 3 Teor de ácido abscísico (ABA) durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030) com e sem aplicação de ABA exógeno. ⁺ Médias seguidas por mesma letra em cada dia não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E e * indicam fase da recuperação hídrica

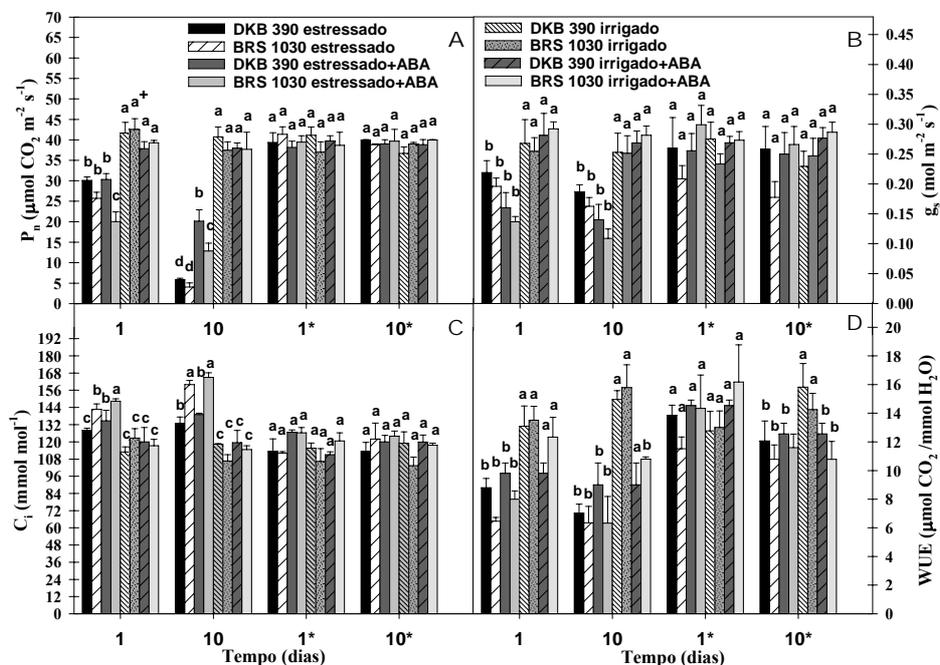


Fig. 4 Parâmetros de trocas gasosas durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030) com e sem aplicação de ABA exógeno. (A) taxa fotossintética (P_n), (B) condutância estomática (g_s), (C) concentração intercelular de CO_2 (C_i) e (D) eficiência do uso da água (WUE). + 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

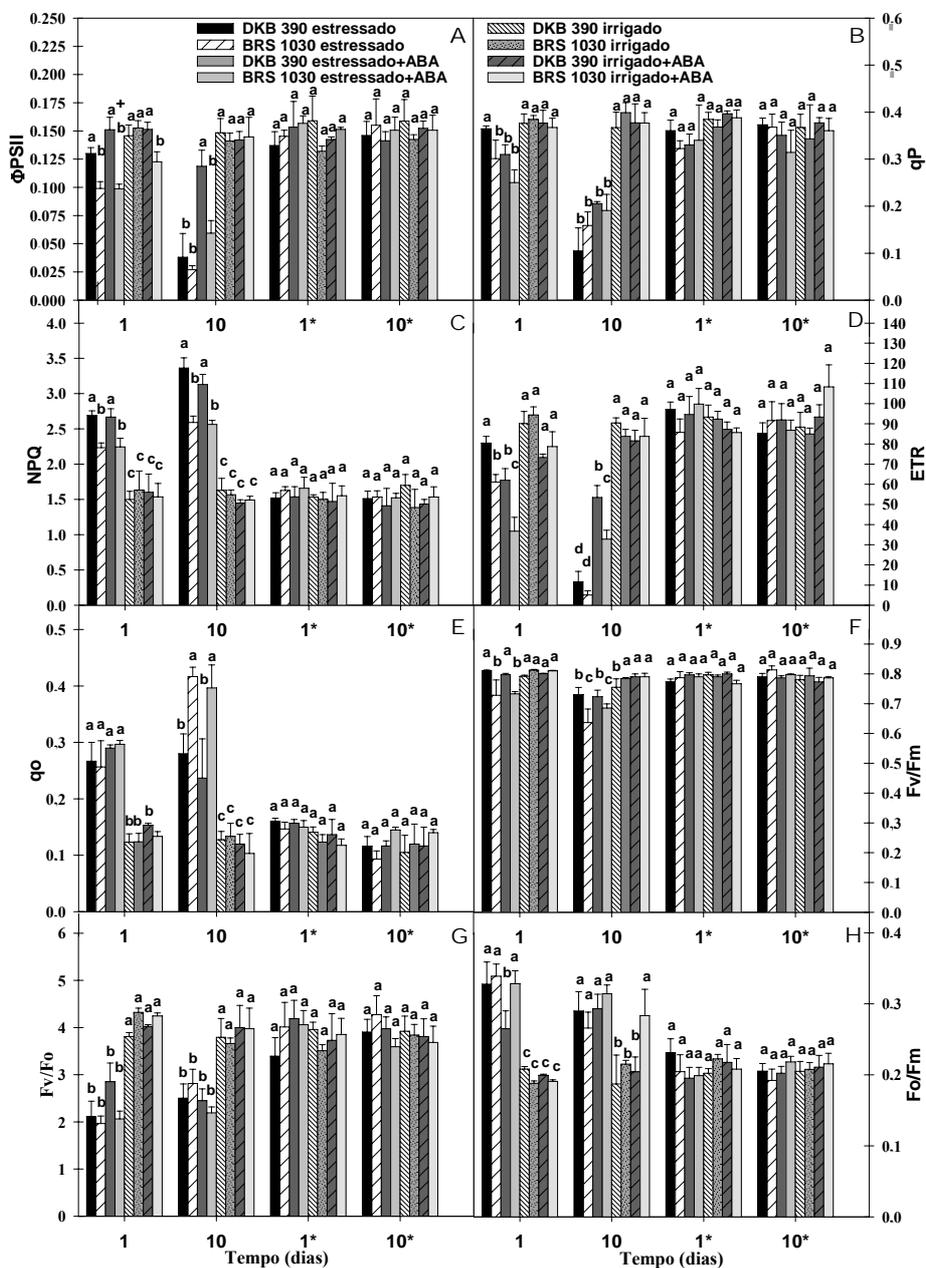


Fig. 5 Parâmetros de fluorescência da clorofila durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1030) com e sem aplicação de ABA exógeno. (A) produção quântica fotoquímica efetiva adaptada a luz (Φ_{PII}), (B) *quenching* fotoquímico (qP), (C) *quenching* não

fotoquímico (NPQ), **(D)** taxa de transporte de elétrons, **(E)** mudança relativa da fluorescência da clorofila mínima (q_0), **(F)** a máxima eficiência do fotossistema II (F_v/F_m), **(G)** eficiência máxima do processo fotoquímico no PSII (F_v/F_0) e **(H)** produção quântica basal dos processos não-fotoquímicos no fotossistema II (F_0/F_m). ⁺ 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

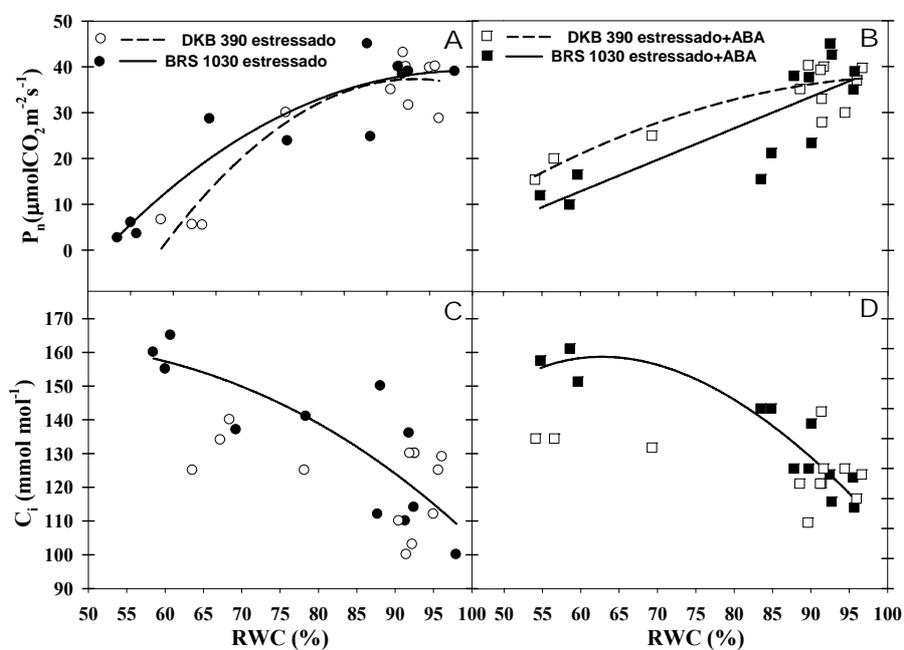


Fig. 6 Teor relativo de água (RWC) relacionado com: taxa fotossintética (P_n) (A e B) e concentração intercelular de CO_2 (C_i) (C e D) em folhas do híbrido DKB 390 e BRS 1030. Ausência das retas indicam correlação não significativa

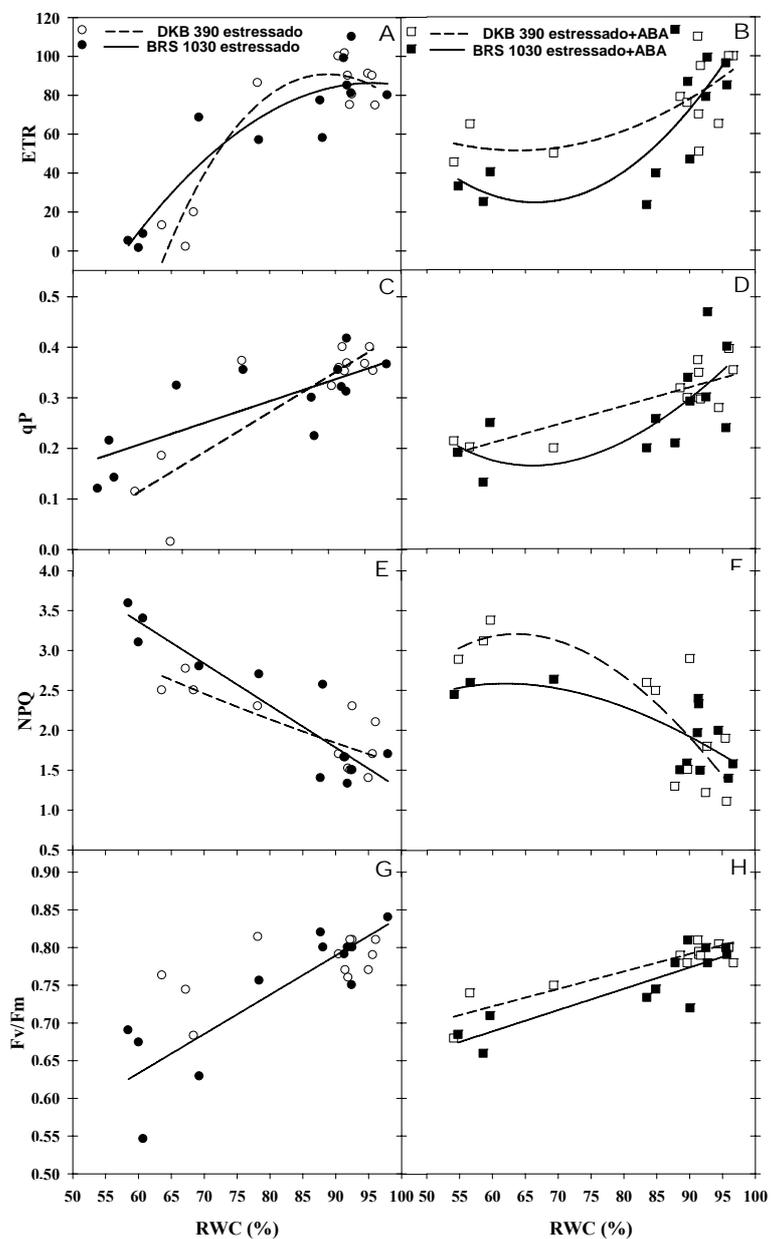


Fig. 7 Teor relativo de água (RWC) relacionado com: taxa de transporte de elétrons (ETR) (A e B); *quenching* fotoquímico (qP) (C e D); *quenching* não fotoquímico (NPQ) (E e F) e máxima eficiência do fotossistema II (Fv/Fm) (G e H) em folhas do híbrido DKB 390 e BRS 1030. Ausência das retas indicam relação não significativa

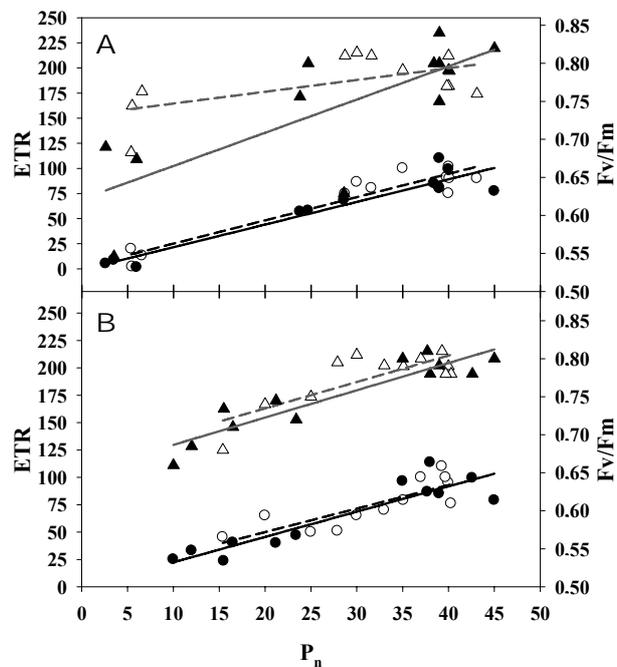


Fig. 8 Taxa fotossintética (P_n) relacionada com taxa de transporte de elétrons (ETR) (triângulo) e com máxima eficiência do fotossistema II - F_v/F_m (círculo) em folhas do híbrido DKB 390 (triângulo e círculo aberto) e BRS 1030 (triângulo e círculo fechado). Reta contínua representa o híbrido BRS1030 e reta tracejada representa o híbrido DKB 390. **A** híbridos estressados e **B** híbridos estressados com aplicação de ABA