

**Relação entre Óxido Nítrico,
Sistema Antioxidante Enzimático
e ABA em Milho sob Déficit
Hídrico Severo**



ISSN 1679-0154
Julho, 2015

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 115

Relação entre Óxido Nítrico, Sistema Antioxidante Enzimático e ABA em Milho sob Déficit Hídrico Severo

Paulo César Magalhães
Alyne Oliveira Lavinsky
Heverton Fernando Melo
Junia Clarissa Alves
Alice Pita Barbosa
Cleberon Ribeiro

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso Campanha, Roberto dos Santos Trindade, Rosângela Lacerda de Castro

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

1ª edição

Versão Eletrônica (2015)

Todos os direitos reservados

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

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

Relação entre óxido nítrico, sistema antioxidante enzimático e ABA em milho sob déficit hídrico severo / Paulo César Magalhães... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2015.
27 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1619-0154; 115).

1. *Zea mays*. 2. Deficiência hídrica. 3. Ácido abscísico. I. Magalhães, Paulo César. II. Série.

CDD 633.15 (21. ed.)

© Embrapa 2015

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	9
Avaliações Fisiológicas	10
Resultados e Discussão	14
Conclusão	23
Agradecimentos	23
Referências	23

Relação entre Óxido Nítrico, Sistema Antioxidante Enzimático e ABA em Milho sob Déficit Hídrico Severo

*Paulo César Magalhães¹
Alyne Oliveira Lavinsky¹
Heverton Fernando Melo¹
Junia Clarissa Alves¹
Alice Pita Barbosa²
Cleberon Ribeiro²*

Resumo

Avaliou-se a relação entre óxido nítrico (NO) e aumento na atividade de enzimas do sistema antioxidante induzido por ácido abscísico (ABA) em milho sob déficit hídrico severo. Para tanto, dois genótipos de milho contrastantes para tolerância à seca (BRS1010-sensível e DKB390-tolerante) foram cultivados sob irrigação, e ao atingirem o pré-florescimento foram expostos a dois níveis de água no solo (CC- capacidade de campo, e DH- déficit hídrico). Após 12 dias nessas condições, a irrigação foi restabelecida de modo a manter o nível de água no solo sob CC até a colheita. Plantas do BRS1010 sob DH tiveram a atividade da enzima catalase e os níveis de NO diminuídos, enquanto os níveis de ABA e de malonaldeído (MDA) foram aumentados em relação às suas respectivas plantas sob CC. Por sua vez, plantas do DKB390 sob DH não apresentaram variações

Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, CEP: 35701-970, Brasil. Email: paulo.magalhaes@embrapa.br, alynelavinsky@gmail.com, hevertonfernando@gmail.com, juniaclarissaalves@gmail.com.

²Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, CEP: 36570-000 Brasil. Email: pitabarbosa@yahoo.com.br, cleberon.ribeiro@ufv.br

na atividade de enzimas do sistema antioxidante tampouco nos níveis de ABA em relação às suas respectivas plantas sob CC, e ainda assim os níveis de MDA não foram aumentados; fato acoplado a aumentos nos níveis de NO. Conseqüentemente, sob DH as plantas oriundas do DKB390 apresentaram valores 50% maiores de índice de colheita em relação às dos BRS1010.

Palavras-chave: catalase, condutância do mesofilo, fotoassimilados, índice de colheita

Relationship Between Nitric Oxide, Enzymatic Antioxidant System and ABA in Maize Under Long-Term Drought

Paulo César Magalhães¹
Alyne Oliveira Lavinsky¹
Heverton Fernando Melo¹
Junia Clarissa Alves¹
Alice Pita Barbosa²
Cleberon Ribeiro²

Abstract

We evaluated the relationship between nitric oxide (NO) and up-regulation of the *acid abscisic*-induced antioxidant system in maize under long-term drought. Two maize genotypes contrasting for drought tolerance (BRS1010 – sensitive and DKB390 - tolerant) were exposed to two different soil water levels, field capacity (FC) and water deficit (WD) at pre-flowering. After 12 days in these conditions, plants were **re-irrigated** and soil water level was kept under FC until harvest. The WD plants from BRS1010 showed lower catalase (CAT) activity and NO levels, whereas ABA and malonaldehyde (MDA) levels increased related to its counterparts under FC. In turn, WD plants from DKB390 did not change CAT activity and ABA levels compared to FC plants, and cellular damage remained unaltered; this fact was coupled to increase in NO levels. As a result, WD plants from DKB390 showed harvest index values 50% higher than BRS1010 under the same condition.

Key words: catalase, mesophyll conductance, photoassimilates, harvest index.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie que apresenta um elevado consumo de água, e, em situações de déficit hídrico (DH), uma de suas primeiras respostas é o fechamento estomático, o que limita as trocas gasosas foliares e, conseqüentemente, a produtividade (SOUZA et al., 2013). Isso ocorre porque reduções no potencial hídrico do solo com a ocorrência de DH induzem a biossíntese de moléculas sinalizadoras em raízes desidratadas, particularmente, o ácido abscísico (ABA), sendo o sinal emitido e transmitido para as folhas, onde o seu acúmulo previne declínios no *status* hídrico foliar através do fechamento dos estômatos (BENESOVÁ et al., 2012), além de induzir o aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante (SOUZA et al. 2014).

Avaliando DH de curta duração, Souza et al. (2014) mostraram, também em milho, que a condutância estomática ao vapor de água (g_s) do milho decresce à medida em que o *status* hídrico diminui, o que invariavelmente coincide com a diminuição nas taxas fotossintética (A) e transpiratória (E). Além disso, tais autores propuseram que melhorias na taxa fotossintética em genótipos de milho tolerantes ao DH ocorrem, em maior extensão, por meio do controle do estresse oxidativo via aumento na atividade de enzimas do sistema antioxidante em folhas, sendo esse processo induzido por aumento nos níveis de ABA.

À medida que o DH progride, os declínios em A e na produtividade passam a ser atribuídos, principalmente, ao aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), potencialmente capazes de causar peroxidação de lipídios

(CHUGH et al., 2011), em decorrência do declínio na atividade de enzimas do sistema antioxidante e níveis de ABA (SOUZA et al. 2014). Um crescente número de evidências sugere que o óxido nítrico (NO) também é uma importante molécula sinalizadora envolvida em mecanismos de defesa em resposta ao DH prolongado, por induzir a biossíntese de ABA (ZHAO et al., 2001; XING et al., 2004; ZHANG et al., 2011) e aliviar danos em nível de membrana e nas células do mesofilo (JIE et al., 2012; ZHUK; MUSIYENKO, 2012).

Recentes estudos têm sugerido que o NO também está envolvido no aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante induzido por ABA, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (ZHOU et al., 2005; SHI et al., 2014). Entretanto, já foi observada a ação do NO como inibidor da expressão e atividade dessas enzimas (CLARKE et al., 2000; MURGIA et al., 2004). Mais evidências, portanto, são requeridas para descobrir o envolvimento do NO no aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante induzido por ABA. Aparentemente, aumentos nos níveis de ABA quando as plantas são expostas a longos períodos sob DH ocorrem a expensas de um esgotamento dos níveis basais do NO nos tecidos da planta (LOZANO-JUSTE; LEÓN, 2010), ou seja, na inexistência de outros mecanismos de tolerância ao DH.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a relação entre NO e o aumento na atividade de enzimas do sistema antioxidante induzido por aumentos nos níveis de ABA em milho sob DH severo.

Material e Métodos

Condições de Cultivo, Material Vegetal e Desenho Experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo (19°28' S, 44°15'08" W, 732 m de altitude), e o material vegetal consistiu de dois genótipos de milho com níveis contrastantes de tolerância à seca: DKB390 (tolerante) e BRS1010 (sensível).

As plantas foram cultivadas em vasos plásticos, contendo 20 kg de Latossolo Vermelho Distrófico Típico (SOUZA et al., 2014). O teor de água no solo foi monitorado diariamente entre 09h00 e 15h00, com auxílio de sensores de umidade modelo GB Reader N1535 (Measurement Engineering, Austrália) instalados no centro de cada vaso, com auxílio de um trado de rosca, a uma profundidade de 20 cm. Esses sensores detectam a tensão de água no solo com base na resistência elétrica e foram acoplados a medidores digitais. A reposição hídrica através de irrigação foi realizada com base nas leituras obtidas com o sensor e a água foi repostada até a capacidade de campo durante o período que antecedeu o início da imposição da deficiência hídrica. Os cálculos de reposição de água foram realizados com o auxílio de uma planilha eletrônica, feita em função da curva de retenção de água do solo. Em paralelo, foram realizados todos os tratamentos culturais e fitossanitários necessários.

Ao atingir o estágio de pré-florescimento, a metade das plantas de cada genótipo foi submetida ao déficit hídrico (DH); a outra metade continuou recebendo irrigação diariamente, a fim de manter a umidade do solo próxima à capacidade de campo

(CC), com tensão de água no solo em torno de -18 kPa. A exposição ao DH se deu pelo fornecimento diário de 50% da água total disponível até a tensão de água no solo atingir, no mínimo, -138 kPa. Após 12 dias de imposição dos tratamentos foram realizadas as avaliações fisiológicas, e, em seguida, o fornecimento de água foi restabelecido, mantendo-se em níveis ótimos até o final do ciclo, quando foram realizadas avaliações dos parâmetros agrônômicos. A unidade experimental foi composta por um vaso, contendo duas plantas, e seis repetições por tratamento.

Foram aplicados testes estatísticos preliminares para adequação dos resultados à análise da variância (ANOVA). O teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, foi utilizado para testar todo e qualquer contraste.

Avaliações Fisiológicas

Atividade de Enzimas do Sistema Antioxidante

Foi determinada a atividade das enzimas catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11), e dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), a partir de folhas homogeneizadas em meio contendo tampão fosfato de potássio (TFK) 0,1 M (pH 6,8), EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, ácido ascórbico 1 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1% (*p/v*) (SOUZA et al., 2014).

Peroxidação Lipídica pelo Teste do Malonaldeído (MDA)

Amostras de tecido vegetal foram trituradas em $N_{2(l)}$, homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) 1% (*p/v*), e

em seguida centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos, a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas a uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (*p/v*) dissolvido em TCA 20% (*p/v*), e incubadas em Thermomixer Confort (Eppendorf Instruments) a 95 °C durante 2 horas. A reação foi paralisada por resfriamento a 4 °C, seguida por centrifugação a 12.000 g durante 10 minutos e leitura da absorvância do MDA realizada a 532 nm. A absorvância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída das amostras (SOUZA et al., 2014).

Ácido Abscísico (ABA)

Aproximadamente 100 mg de tecido vegetal foi macerado em $N_{2(l)}$ e em seguida, transferido para tubos contendo 1 mL de metanol 80% (*v/v*) suplementado com 2,6 di-*t*-butil 4 metilfenol a 0.1%. O extrato obtido foi incubado a 4 °C durante 4 horas, e centrifugado a 4.000 g sob a mesma temperatura. O sobrenadante foi seco em rotoevaporizador, a 26 °C. Para quantificação dos níveis de ABA, as amostras foram dissolvidas em tampão TBS (Tris 25 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM), e a detecção foi realizada por meio de kit para ensaio imunoenzimático de ABA (ABA Enzyme Immunoassay Test Kit – Sigma), conforme Souza et al. (2014).

Detecção de Óxido Nítrico ($\bullet NO$)

Amostras foram incubadas em solução de 4,5 diacetato de diaminofluoresceína 10 mM (DAF-2DA, Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolvido em Tris-Cl (10 mM pH 7) durante 20 minutos, conforme recomendações do fabricante. Na ausência de luz, presença de oxigênio, de óxido nítrico e em pH neutro, o DAF-2DA foi convertido em triazol fluoresceína (DAF - 2T), que é

a forma fluorescente excitada em absorvância de 450 nm, levando à emissão de uma cor verde fluorescente a 515 nm. O NO foi visualizado em microscópio de varredura confocal Zeiss LSM 510, com filtros nos comprimentos de onda de 450 e 515 nm. As imagens obtidas foram analisadas com o programa Zeiss LCM Image Browser. Para todos os tratamentos, foi feito controle negativo, sem a presença da substância marcadora DAF-2DA, a fim de visualizar a fluorescência natural (autofluorescência).

Trocas Gasosas Foliaves

A taxa fotossintética líquida (A) e a taxa de transpiração foliar (E) foram medidas simultaneamente aos parâmetros de fluorescência da clorofila a , utilizando-se um analisador de gases infravermelho (IRGA – *Infrared Gas Analyzer*), modelo LI 6400 (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), equipado com um fluorômetro (LI-6400-40, LI-COR Inc.). A concentração intercelular de CO_2 (C_i) e a condutância estomática ao vapor de água (g_s) foram calculadas pelo referido equipamento a partir dos valores de A e E . A partir dos valores de A e E , também foi obtida a relação de eficiência do uso de água (A/E). As medições foram realizadas entre 08h00 e 10h00, sob radiação fotossinteticamente ativa artificial (RFA) de $1.500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ em n\u00edvel da folha, com 21% de O_2 e $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$.

O IRGA foi programado para realizar curvas de resposta de A \u00e0 concentra\u00e7\u00e3o interna de CO_2 (curva A/C_i), variando-se, sequencialmente, a press\u00e3o parcial de CO_2 : 40, 30, 20, 10, 5, 40, 60, 80, 100 Pa. Em seguida, a press\u00e3o parcial de CO_2 foi reduzida para 100 Pa, o fluxo de ar foi substituído por fluxo de nitrog\u00eanio

gasoso, com 1% O₂ para realização, nas mesmas folhas, de curvas de resposta de A à RFA em baixo O₂.

A eficiência fotoquímica do fotossistema II (ϕ_{FSII}) foi determinada pela medição do estado estável da fluorescência (F_s) e da fluorescência máxima (F_m'), utilizando um pulso de luz saturante de aproximadamente 8.000 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A taxa de transporte de elétrons (J) foi calculada como (digitar a fórmula) $J = \phi_{FSII} \times \beta \times \alpha \times RFA$, em que α é a absorptância da folha e β reflete o particionamento dos pacotes de energia entre os fotossistemas I e II, e o $\alpha\beta$ foi determinado a partir da relação entre A e $\frac{RFA \times \phi_{FSII}}{4}$, obtidos pela variação da intensidade de luz sob condições fotorrespiratórias.

Estimativas da condutância do mesofilo (g_m) foram realizadas usando o método de Harley et al. (1992), no qual a

$$g_m = A / ((C_i - (\Gamma + J + 8(A + R_d)) / J - 4(A + R_d)))$$

, considerando-se valores de respiração (R_d) medidos durante a noite em $RFA = 0 \mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e o valor conservativo do ponto de compensação para o CO₂ na ausência de R_d (I^*) para milho 40,53 (MASSAD et al., 2007). Para transformar as curvas A/C_i em curvas A/C_c (C_c = concentração de CO₂ nos sítios de carboxilação), C_c foi calculado de acordo com Harley et al. (1992), em que $C_c = C_i - (A/g_m)$.

A taxa máxima de carboxilação limitada pela Ribulose-1,5-bisfosfato (V_{cmax}), pelas Fosfoenol piruvato-PEPc e Piruvato ortofosfato dicinase -PPDK (V_{pmax}) e a taxa máxima de carboxilação limitada pela taxa de transporte de elétrons (J_{max}),

obtidas para cada curva A/C_c , foram estimadas conforme Massad et al. (2007).

A taxa de fotorrespiração foi estimada pela fórmula

$$FR = 1/12(J - (4(A + R_{1d}))) \quad FR = 1/12(J - (4(A + R_{1d})))$$

As correções dos vazamentos de CO_2 e vapor de água dentro e fora da câmara do LI-6400-40 foram aplicadas para todos os dados de trocas gasosas.

Avaliação do Desempenho Agronômico

O desempenho agronômico dos genótipos foi avaliado ao final do ciclo, conforme Souza et al. (2013), mediante quantificação do número e da massa de grãos por espiga, e o índice de colheita. Adicionalmente, um grupo de 50 grãos, sendo três repetições por tratamento, foi submetido à caracterização morfométrica, mensurando-se as dimensões dos grãos (comprimento, largura e espessura) com auxílio de um paquímetro digital. Posteriormente, tais grãos foram embebidos *overnight* em amolecedor etilenodiamina (10%, p/v) e cortados longitudinalmente com navalha para avaliar possíveis mudanças no tamanho do embrião, a depender dos tratamentos. Fotografias foram obtidas a partir de uma câmara fotográfica acoplada a um microscópio estereoscópico tipo lupa, utilizando-se o programa *ImageJ* para calcular a relação entre as áreas do endosperma e do embrião.

Resultados e Discussão

A atividade da enzima SOD não apresentou diferença significativa entre os diferentes genótipos e níveis de água

(dados não apresentados). Com a exposição ao DH, a atividade da APX também se manteve inalterada, enquanto a da CAT foi diminuída apenas no genótipo BRS1010; nesse genótipo, o referido declínio na atividade da CAT foi acompanhado por aumentos significativos nos níveis de ABA e de MDA (Figura 1). Plantas do genótipo DKB390 sob DH não apresentaram variações significativas na atividade de enzimas do sistema antioxidante, tampouco nos níveis de ABA, em relação às suas respectivas plantas sob CC, e, ainda assim, os níveis de MDA não foram aumentados (Figura 1).

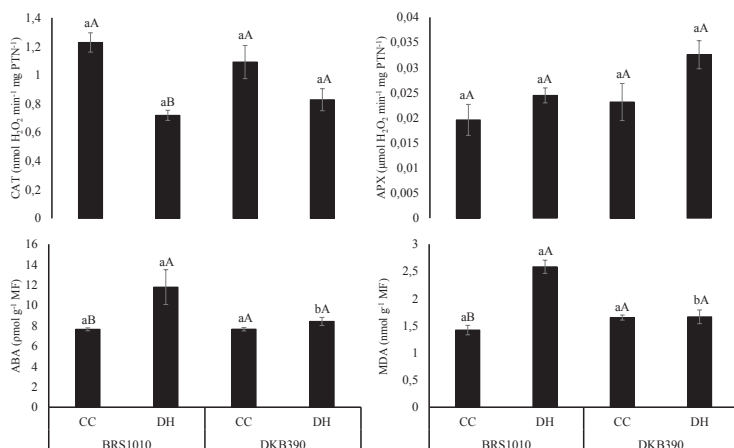


Figura 1. Atividade das enzimas peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT), e níveis de ácido abscísico (ABA) e malonaldeído (MDA) em folhas de dois genótipos de milho com características contrastantes para tolerância à seca: BRS1010 (sensível) e DKB390 (tolerante), cultivados sob dois níveis de água no solo (capacidade de campo – CC, e déficit hídrico – DH). Letras minúsculas denotam comparações entre os genótipos dentro de um mesmo nível de água no solo, e maiúsculas, comparações entre os níveis de água no solo dentro de um mesmo genótipo. Foi aplicado o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Mediante análise de cortes transversais da folha com microscopia à laser confocal utilizando uma sonda fluorescente sensível ao NO (DAF-2DA), foi possível evidenciar a presença de NO nos elementos de vaso do xilema, esclerênquima e células epidérmicas, independentemente do genótipo e nível de água; entretanto, sob DH, a produção de NO derivado da marcação verde fluorescente com DAF-2DA em plantas do genótipo BRS1010 diminuiu. Por sua vez, plantas do genótipo DKB390 sob DH aumentaram sobremaneira a fluorescência do DAF-2DA nos tecidos foliares quando comparadas a plantas sob CC (Figura 2).

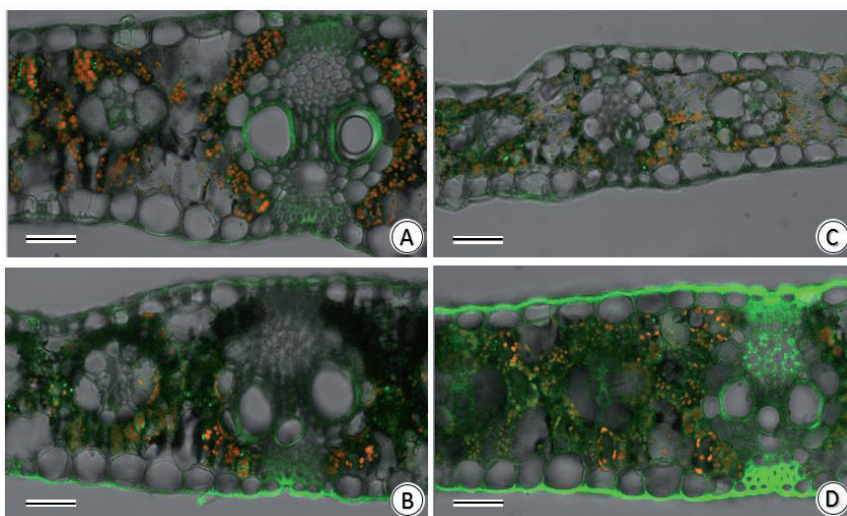


Figura 2. Análise por microscopia confocal *in situ* para NO utilizando sonda DAF-2DA em folhas de dois genótipos de milho, cultivados sob dois níveis de água no solo (capacidade de campo – CC, e déficit hídrico – DH). A) BRS1010 sob CC; B) DKB390 sob CC; C) BRS1010 sob DH; D) DKB390 sob DH. Barra: 50 μm .

Sob CC, os valores de A , g_s , $V_{p,max}$, $V_{c,max}$ e J_{max} foram maiores no DKB390 em relação ao BRS1010, enquanto os valores de C_i e C_c foram menores. Os de F/F_m , E , g_m e PR não variaram (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros de trocas gasosas obtidos *in situ* e derivados de curvas $A-C_c$ em folhas de dois genótipos de milho com características contrastantes para tolerância à seca: BRS1010 (sensível) e DKB390 (tolerante), cultivados sob dois níveis de água no solo (capacidade de campo – CC, e déficit hídrico – DH). Todos os dados foram obtidos em folha correspondente da primeira espiga de cada planta ($n = 6$)

Parâmetro	BRS1010		DKB 390	
	CC	DH	CC	DH
A	23,20bA	0,152bB	27,72aA	2,257aB
F/F_m	0,803aA	0,762aB	0,800aA	0,757aB
g_s	0,102bA	0,007bB	0,138aA	0,023aB
E	2,107aA	0,088bB	2,347aA	0,499aB
C_i	75,27aB	357,8aA	43,38bB	215,5bA
g_m	55,17aA	0,830bB	61,62aA	83,79aA
C_c	63,67aB	357,8aA	29,52bB	214,4bA
PR	-1,91aB	0,619bA	-2,63aB	1,122aA
$V_{p,max}$	38,26bA	12,54bB	42,60aA	14,94aB
$V_{c,max}$	64,84bA	50,66bB	67,60aA	52,03aB
J_{max}	231,8bA	71,29bB	260,0aA	81,56aB
A/E	11,99aA	1,645bB	11,81aA	4,592aB

Abreviaturas: taxa fotossintética (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), máxima eficiência do fotossistema II (F/F_m), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), taxa transpiratória (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância do mesofilo (g_m , $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração de CO_2 no cloroplasto (C_c , $\mu\text{mol mol}^{-1}$), taxa fotorespiratória (PR , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa máxima de carboxilação limitada pela Ribulose 1,5 bisfosfato ($V_{c,max}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa máxima de carboxilação limitada pela fosfoenolpiruvato carboxilase ($V_{p,max}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa máxima de carboxilação limitada pela taxa de transporte de elétrons (J_{max} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), eficiência de uso da água (A/E). Letras minúsculas denotam comparações entre os genótipos dentro de um mesmo nível de água no solo, e maiúsculas, comparações entre os níveis de água no solo dentro de um mesmo genótipo. Foi aplicado o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Independentemente do genótipo, houve redução expressiva de A , g_s , E , F_v/F_m , $V_{p,max}$, $V_{c,max}$, J_{max} e A/E em plantas expostas ao estresse gerado pelo DH quando comparadas ao controle, enquanto os valores de C_i , C_c e PR aumentaram. Entretanto, plantas sob DH oriundas do genótipo DKB390 exibiram valores de A , g_s , E , g_m , PR , $V_{p,max}$, $V_{c,max}$, J_{max} e A/E maiores em relação àqueles verificados em plantas oriundas do genótipo BRS1010 cultivadas na mesma condição (Tabela 1). Cabe ressaltar que apenas plantas do genótipo BRS1010 apresentaram valores de A demasiadamente baixos sob DH em razão da adicional limitação em g_m , o que, associado com valores também baixos de E , resultou em baixíssima relação de eficiência de uso da água (A/E) (Tabela 1).

Sob DH, plantas oriundas do genótipo DKB390 apresentaram, em relação às dos genótipos BRS1010, maior número e massa de grãos por espiga (Figura 3), sem alteração na biomassa total (dado não apresentado). Como consequência, o IC no genótipo DKB390 sob CC foi, em média, 50% maior em relação ao do genótipo BRS1010 (Figura 3). Registra-se, inclusive, que apenas plantas do genótipo BRS1010 tiveram os valores de EM:E reduzidos sob DH (Figura 3), corroborando a ocorrência de um menor fluxo de fotoassimilados para os grãos nesse genótipo de milho sob DH.

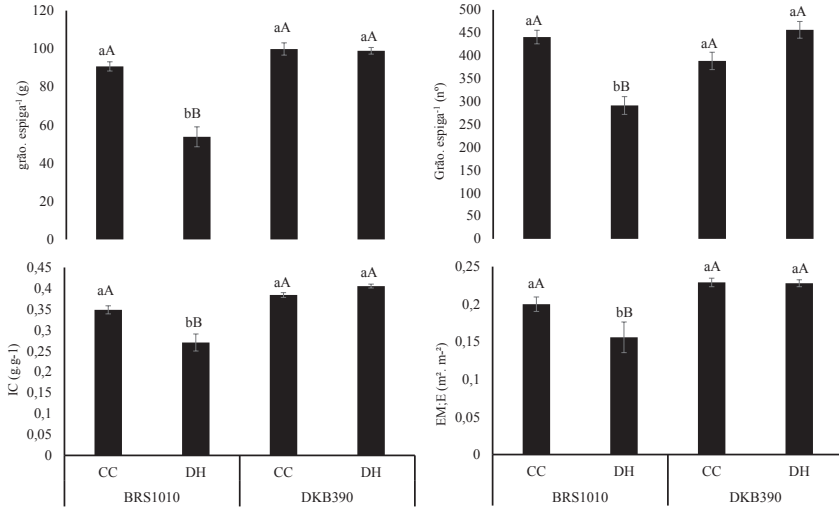


Figura 3. Desempenho agrônômico em dois genótipos de milho com características contrastantes para tolerância à seca: BRS1010 (sensível) e DKB390 (tolerante), cultivados sob dois níveis de água no solo (capacidade de campo – CC, e déficit hídrico – DH) (n = 6). Letras minúsculas denotam comparações entre os genótipos dentro de um mesmo nível de água no solo, e maiúsculas, comparações entre os níveis de água no solo dentro de um mesmo genótipo. Foi aplicado o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A tolerância de alguns genótipos ao estresse oxidativo associado ao DH, em grande extensão, se deve à indução no aumento na atividade da SOD, a qual converte O_2^- em H_2O_2 , e subsequente aumento da atividade de outras enzimas, como CAT e APX, eliminando o produto formado; registra-se, inclusive, que o ABA controla a indução de tal aumento (BANO et al., 2012; SOUZA et al., 2014; CAI et al., 2015). No presente estudo, danos oxidativos na membrana foram evidentes apenas no genótipo BRS1010. Em estudos prévios, o genótipo DKB390

comportou-se como tolerante ao DH (SOUZA et al., 2014) e esperava-se em plantas desse genótipo aumentos nos níveis de ABA e da atividade de enzimas do sistema antioxidante, além de um menor conteúdo de MDA, indicando aumento na capacidade antioxidante e poucos danos na membrana. De forma surpreendente, plantas do genótipo DKB390 sob DH não apresentaram danos peroxidativos significativos em membranas, o que ocorreu sem a necessidade de ajustes na atividade de enzimas antioxidantes mediado por ABA. Souza et al. (2014) observaram que a atividade de enzimas antioxidantes é elevada durante os primeiros dias sob DH, mas após dez dias sob tal condição estressante a atividade das enzimas antioxidantes decresce, corroborando resultados do presente estudo, no qual as plantas foram expostas ao DH durante 12 dias. Possivelmente, não apenas a enzima CAT mas também o ABA foram desativados em razão da longa exposição ao DH, e outros mecanismos de tolerância ao DH, que não o aumento na atividade de enzimas do sistema antioxidante mediado por ABA, foram ativados para controle dos processos oxidativos sob DH apenas no genótipo DKB390. Apenas plantas do genótipo BRS1010 apresentaram, sob DH, aumentos nos níveis de ABA em relação ao respectivo controle, sob CC; entretanto, por causa da inativação do sistema antioxidante enzimático de defesa e de outros mecanismos de proteção contra o dano oxidativo, os níveis de MDA aumentaram sobremaneira. De fato, o aumento nos níveis de ABA ocorre apenas se houver um esgotamento dos níveis basais do NO (LOZANO-JUSTE; LEÓN, 2010).

O papel do NO em mecanismo de tolerância ao estresse oxidativo sob DH ainda não foi elucidado (XING et al., 2004; ZHANG et al., 2011). Diversos autores evidenciam que tanto

ROS como NO induzem a biossíntese de ABA durante o DH (ZHAO et al., 2001; XING et al., 2004), mas a via de sinalização do NO é diferente daquela amplamente aceita para ROS (XING et al., 2004). Recentemente, Jie et al. (2012) mostraram que o NO alivia danos na membrana por decrescer a E em folhas de plantas de arroz sob DH. Notavelmente, plantas do genótipo BRS1010 sob DH apresentaram limitação do fechamento estomático, impedindo a perda de calor latente via E , e não investiram na produção de NO, ocasionando aumento na temperatura foliar, seguido de danos na etapa fotoquímica da fotossíntese. Com o dano fotoquímico, a disponibilidade de NADPH e ATP para uso pelas enzimas de redução e de fosforilação do carbono na etapa bioquímica foi comprometida, explicando, assim, o aumento em C_i e os baixíssimos valores de A em relação ao de plantas desse genótipo sob CC. Os baixos valores de A , associados aos também baixos valores de E resultaram em menor A/E . Além disso, apenas plantas desse material sob DH apresentaram limitação em g_m .

De acordo com Souza et al. (2013), genótipos tolerantes ao DH mantêm-se produtivos por aumentarem E , o que, por sua vez, ocorre a expensas de um maior consumo de água. Ao liberarem mais água via abertura dos estômatos, haveria um resfriamento foliar, que evitaria os danos fotoquímicos. Plantas do genótipo DKB390 sob DH também limitaram E , g_s e apresentaram dano fotoquímico; entretanto, a g_m não foi limitada, sugerindo que a g_m compensou reduções em g_s no genótipo DKB390 sob DH. Hommel et al. (2014) mostraram a importância da g_m na otimização dos recursos em períodos de restrição hídrica, e Zhuk e Musiyenko (2012) propuseram que o NO reduz os efeitos destrutivos do DH nas células do mesófilo em plantas de trigo sob DH, ainda que g_m não tenha sido levada em conta.

Em estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa, observamos que o N investido no aparato fotossintético em enzimas de carboxilação, cadeia de transporte de elétrons e do complexo coletor de luz nos fotossistemas foi reduzido em plantas dos genótipos BRS1010 e DKB390 sob DH. Apenas plantas do genótipo BRS1010 sob DH tiveram a g_m limitada por baixo investimento em N. Talvez, o genótipo DKB390 sob DH apenas decresceu a g_s pela necessidade de limitar E e prevenir a embolia no xilema, o que, por sua vez, favoreceu o desvio do N das enzimas investidas no aparato fotossintético não apenas para a construção de aquaporinas e outras proteínas que contribuem para a g_m , mas também para os custos associados com a manutenção dessas (COWAN, 1986).

O aumento na expressão gênica e na abundância de aquaporinas em folhas de feijão sob DH são correlacionadas com o declínio na E por causa do fechamento estomático induzido por ABA e do aumento na g_m (AROCA et al., 2006). Parent et al. (2009) sugeriram que o ABA afeta propriedades hidráulicas das plantas via aumento na abundância das aquaporinas, as quais contribuem para a manutenção do *status* hídrico foliar. Algumas aquaporinas, entretanto, são pouco afetadas pelo ABA (XU et al., 2013), e o NO induz a expressão de genes que codificam aquaporinas (LIU et al., 2007; DI PIETRO et al., 2013). Sugere-se, pois, que o NO induza a expressão de genes que codificam aquaporinas no genótipo DKB390 sob DH, o que, por sua vez, regula a g_m para evitar possíveis danos de membrana, ao menos quando o sistema antioxidante enzimático de defesa mediado por ABA está desativado. Análise dos componentes agrônômicos confirmam a tolerância e a sensibilidade, respectivamente, dos genótipos DKB390 e BRS1010 sob DH.

Conclusão

A tolerância ao déficit hídrico no genótipo DKB390 está associada com um aumento nos níveis de NO, compensando a perda na atividade de enzimas do sistema antioxidante mediado por ABA.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais (Fapemig).

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil (www.nmm.ufv.br), pela estrutura para realização das análises de microscopia à laser confocal.

Referências

- AROCA, R.; FERRANTE, A.; VERNIERI, P.; CHRISPEELS, M. J. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. **Annals of Botany**, London, v. 98, p. 1301-1310, 2006.
- BANO, A.; ULLAH, F.; NOSHEEN, A. Role of abscisic acid and drought stress on the activities of antioxidant enzymes in wheat. **Plant Soil and Environment**, v. 58, p. 181-185, 2012.
- BENESOVÁ, M.; FISCHER, L.; HNLICKA, F.; WILHELMOVÁ, N.; ROTHOVÁ, M.; PROCHÁZKOVÁ, D.; HONNEROVÁ, J.; FRIDRICHOVÁ, L.; HNLICKOVÁ, H. The physiology and

proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration?

PLoS One, San Francisco, v. 6, p. e38017, 2012.

CAI, S.; JIANG, G.; YE, N.; CHU, Z.; XU, X.; ZHANG, J.; ZHU, G. A key ABA catabolic gene, *OsABA8ox3*, is involved in drought stress resistance in rice. **Plos One**, San Francisco, v. 10, p. e0116646, 2015.

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

CLARKE, A.; DESIKAN, R.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. T.; NEILL, S. J. NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. **Plant Journal**, v. 24, p. 667-677, 2000.

COWAN, I. R. Economics of carbon fixation in higher plants. In: GIVNISH, T. J. **On the economy of plant form and function**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. p. 133-176.

DI PIETRO, M.; VILARET, J.; LI, G-W.; HEM, S.; PRADO, K.; ROSSIGNOL, M.; MAUREL, C.; SANTONI, V. Coordinated post-translational responses of aquaporins to abiotic and nutritional stimuli in *Arabidopsis* Roots. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, p. 3886-3897, 2013.

HARLEY, P. C.; LORETO, F.; DI MARCO, G.; SHARKEY, T. D. Theoretical considerations when estimating mesophyll conductance to CO₂ flux by analysis of the response of

photosynthesis to CO₂. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 98, p. 1429-1436, 1992.

HOMMEL, R.; SIEGWOLF, R.; SAURER, M.; FARQUHAR, G. D.; KAYLER, Z.; FERRIO, J. P.; GESSLER, A. Drought response of mesophyll conductance in forest understory species-impacts on water-use efficiency and interactions with leaf water movement. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 152, p. 98-114, 2014.

JIE, X.; LONG, Z.; GUANFU, F.; YONGJIE, Y.; CHENG, Z.; LONGXING, T. Drought-induced proline accumulation is uninvolved with increased nitric oxide, which alleviates drought stress by decreasing transpiration in rice. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 125, p. 155, 2012.

LIU, H.-Y.; YU, X.; CUI, D.-Y.; SUN, M. H.; SUN, W. N.; TANG, Z. C.; KWAK, S. S.; SU, W. A. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. **Cell Research**, v. 17, p. 638-649, 2007.

LOZANO-JUSTE, J.; LEÓN, J. Nitric oxide modulates sensitivity to ABA. **Plant Signal Behavior**, v. 3, p. 314-316, 2010.

MASSAD, R. S.; TUZET, A.; BETHENOD, O. The effect of temperature on C₄-type leaf photosynthesis parameters. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 30, p. 1191-1204, 2007.

MURGIA, I.; PINTO, M. C. de; DELLEDONNE, M.; SOAVE, C.; GARA, L. de. Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, p. 777-783, 2004.

PARENT, R.; HACHEZ, C.; REDONDO, E.; SIMONNEAU, T.; CHAUMONT, F.; TARDIEU, F. Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 149, p. 2000-2012, 2009.

SHI, H.; YE, T.; ZHU, J.; CHAN, Z. Constitutive production of nitric oxide leads to enhanced drought stress resistance and extensive transcriptional reprogramming in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 65, p. 4119-4131, 2014.

SOUZA, T. C.; CASTRO, E. M.; MAGALHÃES, P. C.; LINO, L. O.; ALVES, E. T.; ALBUQUERQUE, P. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. **Acta Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 35, p. 3201-3211, 2013.

SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C.; CASTRO, E. M.; CARNEIRO, N. P.; PADILHA, F. A.; GOMES JÚNIOR, C. C. ABA application to maize hybrids contrasting for drought tolerance: changes in water parameters and in antioxidant enzyme activity. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 73, p. 205-217, 2014.

XING, H.; TAN, L.; AN, L.; ZHAO, Z.; WANG, S.; ZHANG, C. Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 42, p. 61-68, 2004.

XU, C.; WANG, M.; ZHOU, L.; QUAN, T.; XIA, G. Heterologous expression of the wheat aquaporin gene TaTIP2;2 compromises the abiotic stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. **Plos One**, San Francisco, v. 8, p. e79618, 2013.

ZHANG, A.; ZHANG, J.; ZHANG, J.; YE, N.; ZHANG, H.; TAN, M.; JIANG, M. Nitric oxide mediates brassinosteroid-induced ABA biosynthesis involved in oxidative stress tolerance in maize leaves. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 52, p. 181-192, 2011.

ZHAO, Z.; CHEN, G.; ZHANG, C. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. **Australian Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 28, p. 1055-1061, 2001.

ZHOU, B.; GUO, Z.; XING, J.; HUANG, B. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 56, p. 3223-3228, 2005.

ZHUK, I. V.; MUSIYENKO, M. M. The influence of nitric oxide and mercury chloride on leaf mesophyll structure under natural drought conditions. **Modern Phytomorphology**, v. 1, p. 185-188, 2012.

