



EDER MARCOS DA SILVA

**CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS À TOLERÂNCIA A SECA
EM HÍBRIDOS DE SORGO CONTRASTANTES: UMA
ABORDAGEM MORFOANATÔMICA, FISIOLÓGICA E
BIOQUÍMICA**

**LAVRAS – MG
2018**

EDER MARCOS DA SILVA

**CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS À TOLERÂNCIA A SECA EM HÍBRIDOS DE
SORGO CONTRASTANTES: UMA ABORDAGEM MORFOANATÔMICA,
FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA**

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

Prof. Dr. Paulo César Magalhães
Orientador

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro
Coorientador

**LAVRAS – MG
2018**

EDER MARCOS DA SILVA

**CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS À TOLERÂNCIA A SECA EM HÍBRIDOS DE
SORGO CONTRASTANTES: UMA ABORDAGEM MORFOANATÔMICA,
FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA**

**CHARACTERISTICS ASSOCIATED WITH DROUGHT TOLERANCE IN
CONTRASTING SORGHUM HYBRIDS: A MORPHO-ANATOMICAL,
PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL APPROACH**

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

APROVADA em ____ de _____ de 2018.

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. Paulo César Magalhães
Orientador

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro
Coorientador

**LAVRAS – MG
2018**

Àquela que manteve acesa a chama
da esperança em meu coração. Eu te
amo, mãe!

Dedico

A todas as crianças e adolescentes do Brasil que anseiam por um país mais justo e igualitário. Vocês podem sonhar alto!

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus todo poderoso, por sempre ter estado ao meu lado durante minha jornada, protegendo-me, fazendo com que cada novo passo se tornasse uma nova conquista.

A minha amada mãe, Aparecida Claudia. Obrigado por estar comigo durante todos os momentos felizes e delicados da minha vida. Seu amor e confiança foram cruciais até aqui. Eu te amo incondicionalmente.

Ao meu pai, Ivo, por ter me ensinado tantos valores importantes, e acima de tudo, por toda colaboração para com minha formação. Pai, nós somos do tamanho dos sonhos que sonhamos.

A minha irmã, Luana, que, por muitas vezes foi minha segunda mãe, encorajando-me a seguir em frente. Sem você, nada disso seria possível.

As minhas amadas sobrinhas Nicolý, Nathália e Eloá por todo amor e compressão da minha ausência.

Ao meu orientador, Dr. Paulo César, por ser um exemplo de profissionalismo e ética. Serei eternamente grato pelos muitos ensinamentos.

Ao meu coorientador, Prof. Evaristo Mauro, por ter acreditado em mim e ter aberto as portas para tantas oportunidades.

Ao meu grande amigo, Roniel, por toda amizade e as muitas contribuições na condução desse trabalho.

A Lorena, por toda contribuição na condução do experimento e os muitos momentos de descontração.

Aos incentivos do Governo Federal, por programas como o REUNI, que possibilitaram meu ingresso a um ensino superior gratuito e de qualidade.

À EMBRAPA Milho e Sorgo que foi minha segunda casa, durante seis meses de estágio. Meus sinceros agradecimentos pela infraestrutura na condução do experimento e pela contribuição de todos os muitos funcionários.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada.

Aos meus amigos do #padrezinho, Alisson, Kaline e Camila, pelas corridas e muitos momentos de descontração e alegria.

Às mães e amigas do #cafezinho (Marcela, Poly, Aretha e Aline) pelos desabafos, amizade e momentos que ficarão para sempre eternizados no meu coração.

Aos meus queridos amigos Alexandre, Matheus, Laís, Guilherme Pinheiro, Quênia (Doçura), Flávia, Ana Livia (Pítica), Isabela e Yasmini.

Aos estagiários Tiago e Fábio por toda contribuição na condução do trabalho.

À professora Thelma Soares, exemplo de profissionalismo e humanidade que, de certa forma, me apresentou uma Universidade que mudaria minha vida profissional para sempre.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Setor de Botânica Aplicada pelas oportunidades e crescimento profissional.

À Fapemig, pela concessão da bolsa de estudos durante todo o doutorado.

A todas as pessoas e instituições que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse grande sonho.

Muito obrigado!

... I push to the limits, I climb every wall, I keep on
believing ANYTHING'S POSSIBLE...

Lea Michele (Anything's possible)

RESUMO

As mudanças climáticas em curso potencializam os efeitos do déficit hídrico (DH) sobre a produtividade das culturas, colocando em risco a segurança alimentar mundial. Logo, torna-se necessário concentrar estudos em culturas mais tolerantes, como o sorgo, capazes de sustentar alta produtividade mesmo em condições de restrição hídrica. Com o intuito de contribuir para a melhor compreensão da alta complexidade de características que possam estar associadas à tolerância da cultura à seca, o presente estudo objetivou investigar características morfoanatômicas, fisiológicas e bioquímicas que possam estar associadas a respostas de híbridos de sorgo contrastantes para tolerância ao DH. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, ou seja, duas condições hídricas: capacidade de campo (CC), solo com tensão de água a -18 Kpa e DH, solo tensão de água a -138kpa, com dois híbridos, um tolerante (1G 282) e outro sensível (AG 1060), com seis repetições. O DH foi imposto no pré-florescimento e mantido por doze dias. Ao final do período de estresse, avaliaram-se as seguintes variáveis nas folhas dos híbridos: o potencial hídrico foliar ao meio-dia (Ψ_{md}), a área foliar fotossinteticamente ativa, medidas de trocas gasosas, a eficiência quântica do fotossistema II, o teor dos pigmentos fotossintetizantes, a atividade de enzimas do metabolismo antioxidante, a concentração de peróxido de hidrogênio, os níveis de peroxidação lipídica, a concentração de ascorbato, o teor de prolina, a concentração de biomoléculas do metabolismo primário, assim como a densidade e o índice estomáticos. No fim do ciclo, foram avaliados também os componentes de produtividade. 1G 282 sustentou maior produtividade de grãos na condição de DH, confirmando sua maior tolerância quando comparado a AG 1060 na mesma condição. Sua maior tolerância está associada à manutenção de um maior potencial hídrico foliar, maior teor de pigmentos fotossintetizantes, área foliar reduzida e maior densidade estomática na condição de DH. Além de sustentar maior taxa fotossintética durante o estresse, 1G 282 exibiu um sistema antioxidante não-enzimático e enzimático altamente responsivo, caracterizado pela manutenção da concentração de carotenoides, a produção de altas concentrações de ascorbato e o aumento na atividade da SOD, CAT e APX em suas folhas na condição de restrição hídrica. Ademais, o aumento na concentração de proteínas e o maior acúmulo de prolina e açúcares também contribuíram para a maior tolerância do híbrido tolerante sob DH.

Palavras-chave: Mudanças climáticas. Estresse hídrico. Produtividade. *Sorghum bicolor*.

ABSTRACT

The climate changes around the globe enhance the effects of the water deficit (WD) on plantations, bringing risks to the world's food security. For this reason, it is necessary to focus our studies in other tolerant crops, such as sorghum, which is capable to maintain high sustainability even under conditions of water deficit. Focusing to contribute to the comprehension of the high complexities that might be associated to sorghum tolerance to drought, this study aimed to investigate the morpho-anatomical, physiological and biochemical characteristics that might be associated to responses of sorghum hybrids to drought tolerance and water deficit. The experiment was carried under greenhouse at Embrapa Milho e Sorgo. A completely randomized design in factorial scheme 2x2 was used, with two water conditions: field capacity (FC), using soil with water tension of -18 Kpa and WD, soil with water tension of -138kpa, with two hybrids, one tolerant (1G 282) and the other sensitive (AG 1060), with six replications. The WD was imposed during the first blooming phases and maintained for 12 days. After the stress period, we evaluated the following variables on the leaves of the hybrids: water potential on the leaves at noon (Ψ_{md}), active photosynthetic area, the mean of the gas exchange, the quantum efficiency of the photosystem II, the amount of photosynthetic pigments, the activity of the antioxidant metabolism enzymes, the concentration of hydrogen peroxide, the levels of lipid peroxidation, concentration of ascorbate, amount of proline, concentration of biomolecules on the primary metabolism and the stomata density. At the end of the cycle, we evaluated the components of productivity. The 1G 282 hybrid sustained higher productivity of grains under WD condition, highlighting its tolerance when compared to AG 1060 under the same condition. Its higher tolerance is associated to the maintenance of higher water potential on the leaves, higher amount of photosynthetic pigments, reduced leaf area and higher amount of stomata under the WD condition. Hybrid 1G 282 presented higher photosynthetic rates during the stress, a highly responsive antioxidant and non-enzymatic system characterized by the stability of the carotenoids concentration, production of high concentrations of ascorbate and the increase on the activity of the SOD, CAT and APX in its leaves under the condition of water deficit. The increasing on the concentration of proteins and higher accumulation of proline and sugar also contributed to the higher tolerance of the hybrid under WD.

Keywords: Climate change. Water deficit. Productivity. *Sorghum bicolor*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da produção agrícola nacional de sorgo.	15
Figura 2 - Descrição dos possíveis eventos que levam à redução do crescimento das plantas sob estresse hídrico por seca.	16
Figura 3 - Esquema integralizando as possíveis respostas nas plantas induzidas pela seca.	20
Figura 4 - Potencial hídrico foliar ao meio-dia (Ψ_{md}) em dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).	32
Figura 5 - Quantificação de peróxido de hidrogênio (A) peroxidação lipídica (B) em folhas de dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).	35
Figura 6 - Teor de ascorbato (AsA) em folhas em folhas de dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).	36
Figura 7 - Teor de biomoléculas do metabolismo primário em folhas de híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).	37
Figura 8 - Teor de prolina em folhas de dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).	38
Figura 9 - Densidade abaxial (DEA) e adaxial (DED) de estômatos em folhas de dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> obtidos em dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).....	33
Tabela 2 - Teor de clorofilas e carotenoides em folhas de dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).	34
Tabela 3 - Atividade do sistema de defesa antioxidante enzimático em folhas de híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).....	35
Tabela 4 - Componentes de produtividade de dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Sorgo: aspectos conjunturais da cultura	14
2.2	Quais são os principais efeitos da seca nas plantas?	15
2.2.1	Crescimento e produtividade	16
2.2.2	Teor de pigmentos fotossintéticos e fotossíntese	17
2.2.3	Dano oxidativo	18
2.3	Como as plantas podem responder à condição de déficit hídrico?	19
2.3.1	Sistemas de defesa antioxidante	21
2.3.2	Osmorregulação	23
2.3.3	Modificações morfoanatômicas condicionadas pelo déficit hídrico	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Material vegetal, condições de crescimento e <i>design</i> experimental	26
3.2	Potencial hídrico foliar, medidas de trocas gasosas e eficiência quântica do fotossistema II	26
3.3	Extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos	27
3.4	Extração e atividade das enzimas do metabolismo antioxidante	27
3.5	Extração e quantificação do teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA)	28
3.6	Extração e quantificação de ascorbato	29
3.7	Extração e quantificação das biomoléculas do metabolismo primário	29
3.8	Extração e quantificação de prolina	30
3.9	Análises anatômicas da folha	30
3.10	Componentes de produtividade	31
3.11	Análises estatísticas	31
4	RESULTADOS	32
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas em curso causam impactos negativos à disponibilidade de fatores climáticos essenciais para o desenvolvimento das culturas, comprometendo, assim, a qualidade e a quantidade dos alimentos produzidos (FOLEY et al., 2011). Logo, poderão ser capazes de mudar a geografia da produção agrícola em escala mundial. Isso se deve, principalmente, pela capacidade dessas oscilações climáticas potencializarem os efeitos de vários estresses bióticos e abióticos. Um desses efeitos seria a mudança nos padrões de precipitação, fazendo com que aumente a incidência de extremos ambientais como as inundações e as secas atípicas em diversas regiões do planeta (VIDAL, 2013). De fato, a seca se destaca como o principal fator ambiental que limita a produtividade das culturas (FANG; XIONG, 2015; MANAVALAN; NGUYESS, 2017). Tal fato, faz com que as mudanças climáticas se tornem uma grande ameaça a produção mundial de alimentos, colocando a segurança alimentar em risco (FOLEY et al., 2011).

Tratando-se de modificações na demografia mundial, segundo Vidal (2013), existe uma previsão, por exemplo, da China, que atualmente possui a maior população mundial, diminuir em 400 milhões o número de habitantes ainda neste século. Apesar de já existir um controle na natalidade, essa redução também ocorre como uma resposta à dificuldade futura em adquirir alimentos a uma população tão grande. Em contrapartida, nos EUA a previsão é que ocorra um aumento de 120 milhões de habitantes até 2050. Por lá, áreas como a Califórnia verão os rendimentos de culturas como milho, tomate e algodão diminuírem rapidamente, após 2050.

Ainda segundo o mesmo autor, como poucas culturas poderão suportar aumentos médios de temperatura maiores que 2 C°, espera-se que a América Latina seja seriamente afetada por um clima mais extremo. Falando especificamente do Brasil (que é um dos grandes fornecedores mundiais de alimentos), é previsto que o país seja fortemente afetado, tendo em vista que países tropicais e subdesenvolvidos poderão sofrer de forma mais acentuada os efeitos das mudanças climáticas sobre a produção das culturas. Nesse caso, aumentos de 1 a 2C° serão suficientes para reduzir a produtividade de culturas como arroz, feijão, mandioca, milho e o café como uma das mais vulneráveis. Além disso, a produção brasileira de soja, que atualmente é um dos principais insumos para a alimentação animal em grande parte do mundo, pode sofrer uma brusca queda de 25% nos próximos 20 anos.

Ademais, pelo predomínio da agricultura em sua economia, o Brasil poderá sofrer de maneira mais acentuada os impactos negativos das mudanças climáticas em sua economia (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC, 2014). Logo, com o

intuito de minimizar os efeitos da escassez hídrica sobre a produção agrícola nacional, torna-se necessária uma maior compreensão dos fatores biológicos associados à tolerância de culturas mais resistentes a essa condição ambiental. O sorgo, por exemplo, é uma cultura que apresenta uma extraordinária capacidade de suportar condições de baixa disponibilidade hídrica, e tem - se tornado uma opção para a produção de grãos e forragem em situações desfavoráveis para o desenvolvimento de outras culturas, como o milho.

Nesse contexto, a melhor compreensão das respostas, dos mecanismos e de características relacionadas à maior tolerância das plantas à seca são, de certo modo, essenciais para o fortalecimento dos programas de melhoramento genético e desenvolvimento de cultivares cada vez mais tolerantes. Além de contribuir para a melhor compreensão da alta complexidade de características que possam estar associadas à maior tolerância à seca na cultura. Logo, o presente estudo teve como objetivo investigar e identificar características morfoanatômicas, fisiológicas e bioquímicas que possam estar associadas a respostas de híbridos de sorgo contrastantes para tolerância ao deficit hídrico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sorgo: aspectos conjunturais da cultura

O sorgo [*Sorghum bicolor* (Moench) L.] faz parte da família Poaceae, originário da África tropical, no entanto, algumas evidências indicam que pode ter havido duas regiões de dispersão independentes (África e Índia) (FORNASIERI FILHO; FORNASIERI, 2009). Além disso, para os mesmos autores, sua domesticação segundo registros arqueológicos, deve ter acontecido por volta de 3000 a.C.. Nas últimas décadas, essa cultura tem se tornado uma importante matéria-prima para produção de fibras, biocombustível e alimentação animal, e, assim, considerada a quinta cultura mais importante do mundo (DUTRA et al., 2013). O sorgo ainda representa uma importante fonte de alimento para mais de 500 milhões de pessoas em 98 países (PENNISI, 2009).

Sua importância aumentou com a crescente pressão global por alimentos associados, sobretudo, às mudanças climáticas alarmantes que forçaram os pesquisadores a concentrar esforços em outras culturas para encontrar uma resposta aos desafios de segurança alimentar, especialmente em regiões mais pobres (HAMZA et al., 2016). Apesar de apresentar grãos altamente nutritivos e ser tradicionalmente utilizado na alimentação humana em diversos países da África e Ásia (PAIVA et al., 2017), no Brasil o cereal ainda é utilizado, principalmente, como matéria prima para a alimentação animal e produção de etanol (DUTRA et al., 2013).

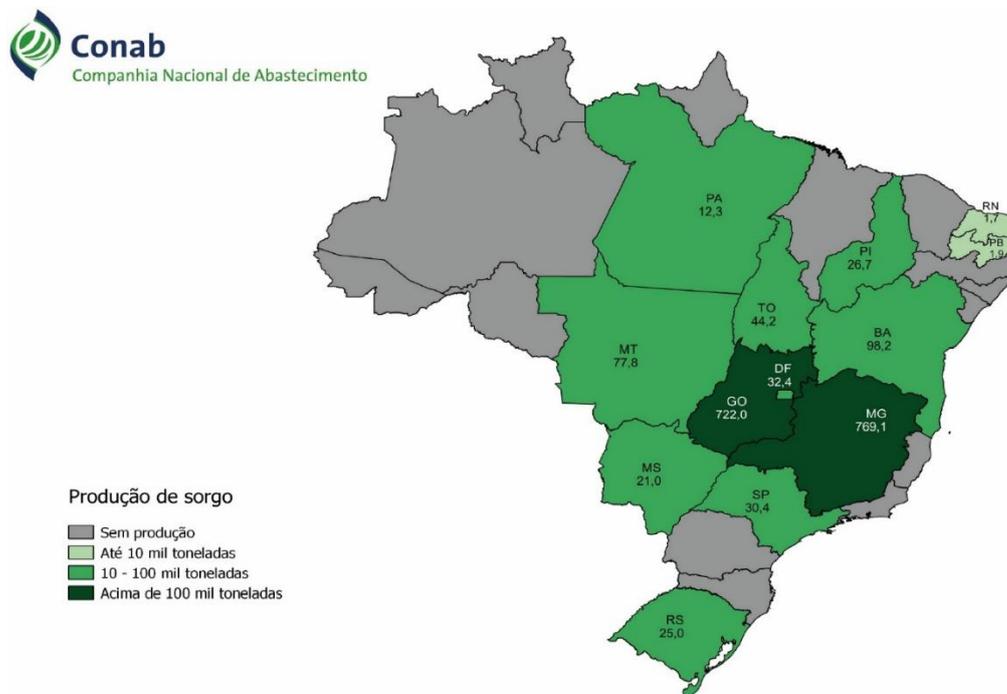
O sorgo é de enorme utilidade em regiões muito quentes e mais secas, onde o homem não consegue boas produtividades de grãos ou de forragem cultivando outras espécies como o milho (FORNASIERI FILHO; FORNASIERI, 2009). Sua melhor performance em regiões com pouca disponibilidade hídrica remete a características genéticas adaptativas que condicionaram diferentes mecanismos morfológicos de tolerância à seca, que são intrínsecos à espécie (PATERSON et al., 2009).

Esse cereal possui grande quantidade de características xerofíticas que o torna uma espécie adaptada à condição de restrição hídrica (SANS et al., 2003). Quando comparado a outros cereais (e.g. milho), o sorgo possui (1) um sistema radicular mais desenvolvido e fibroso, capaz de melhor explorar o perfil do solo em busca de água, (2) reduzido nível de transpiração, com regulação estomática mais eficaz, (3) superfície foliar funcional mais reduzida, (4) cobertura cerosa presente nos colmos e nas folhas da planta (FORNASIERI FILHO; FORNASIERI, 2009). Tais características fazem com que o cultivo da cultura seja recomendado após as culturas de verão, durante condições de menor disponibilidade hídrica

provenientes do outono e inverno (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011).

Com base nos dados do oitavo levantamento realizado pela Companhia Nacional de abastecimento (CONAB, 2018), os estados com maior produção de sorgo continuarão a ser Minas Gerais, Goiás e Bahia (FIGURA 1). A estimativa nacional de produção para 2018 é de 1,8 milhões de toneladas, com produtividade de 2.823 Kg/ha e área plantada de 632,8 mil hectares. No entanto, é esperada uma queda na produção de 5,2%, com base na última estimativa. Segundo o levantamento, tal redução na produção ocorrerá em função do estresse hídrico observado principalmente durante o desenvolvimento vegetativo do grão.

Figura 1 - Mapa da produção agrícola nacional de sorgo.



Fonte: CONAB (2018).

2.2 Quais são os principais efeitos da seca nas plantas?

Os efeitos da seca nas plantas variam desde níveis morfoanatômicos a bioquímicos e moleculares, e são evidentes em todos os estádios fenológicos do crescimento da planta que ocorra o déficit. No entanto, é nos estádios reprodutivos que, de modo geral, os efeitos na produtividade de plantas cultivadas são mais pronunciados (FAROOQ et al., 2009).

Conceitualmente, a seca enquanto estresse pode causar dois tipos de efeitos nas plantas, os chamados efeitos (i) primários e (ii) secundários. Os efeitos primários, como a redução do

potencial hídrico e desidratação celular, alteram (afetam) diretamente as propriedades físicas e bioquímicas nas células, que por sua vez, podem desencadear os chamados efeitos secundários. Esses efeitos secundários, como a alteração da atividade metabólica, citotoxicidade iônica e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), comprometem seriamente a integridade celular, podendo, por fim, provocar a morte celular (ANJUM et al., 2011b; TAIZ et al., 2017).

2.2.1 Crescimento e produtividade

Partindo do princípio de que a célula é a unidade básica de qualquer ser vivo, pode-se dizer que o crescimento do indivíduo reflete o crescimento de suas células individualmente. Assim, é interessante entender como a seca influencia o crescimento e a formação de novas células no vegetal. O esquema na figura 1 mostra como o estresse causado pela seca pode reduzir a atividade meristemática e o turgor celular, o que reflete diretamente no crescimento da planta como um todo (ANJUM et al., 2011b; FAROOQ et al., 2009).

Figura 2 - Descrição dos possíveis eventos que levam à redução do crescimento das plantas sob estresse hídrico por seca.



Fonte: Adaptado de Anjum et al. (2011b) e Farroq et al. (2009).

Inicialmente, a redução na absorção de água resulta em uma diminuição no conteúdo de água nos tecidos. Como resultado, o turgor celular é perdido e por consequência diminui a pressão hidrostática que possibilita a expansão das células. Do mesmo modo, a seca promove uma inibição na atividade dos meristemas, uma vez que são tecidos que consomem muita água e CO₂. Logo, a divisão celular é limitada, de modo que, sem a formação de novas células e com o crescimento das já existentes limitado, o crescimento da planta é, então, comprometido (ANJUM et al., 2011b; JALEEL et al., 2009).

De modo geral, o estresse causado pela seca afeta o rendimento colhível em várias espécies de plantas (JALEEL et al., 2009). No entanto, antes de mais nada, é importante deixar

claro que, quando se fala em redução de produtividade causada pela seca, alguns aspectos devem ser levados em consideração: (i) a intensidade do estresse (leve, moderado ou severo), (ii) o estágio fenológico da planta durante o estresse, (iii) o material genético em questão (genótipo), assim como (iv) o tempo de duração do estresse (FAROOQ et al., 2009). Por exemplo, a produtividade de genótipos sensíveis de sorgo (MAGALHÃES; SOUZA; LAVINSKY, 2016) e milho (AVILA et al., 2016; LAVINSKY et al., 2015), durante o estágio de pré-florescimento, é significativamente afetada, após doze dias de estresse hídrico severo.

Além disso, para o sorgo, é conhecido que alguns genótipos possuem tolerância ao déficit hídrico no estágio de pré-florescimento, enquanto que outros apresentam tolerância ao déficit hídrico no período de pós-florescimento (ROSENOW et al., 1996). O déficit hídrico no pré-florescimento pode desencadear atraso na floração e aborto de flores, enrolamento das folhas e redução no diâmetro e comprimento da panícula (BORRELL et al., 2014). Em contrapartida, durante o pós-florescimento o estresse hídrico em questão pode provocar diminuição na massa e no número de grãos (ROSENOW et al., 1996).

2.2.2 Teor de pigmentos fotossintéticos e fotossíntese

Como sabemos, os pigmentos fotossintéticos são essenciais para a produção de ATP e poder redutor durante a etapa fotoquímica, que por sua vez é utilizado durante a etapa bioquímica da fotossíntese (ANJUM et al., 2011b; FAROOQ et al., 2009; JALEEL et al., 2009). Os carotenoides possuem uma importância multifacetada, uma vez que, além de funcionarem como pigmentos acessórios, atuam como antioxidantes efetivos, desempenhando um papel importante na integridade dos processos fotoquímicos (JALEEL et al., 2009). O estresse causado pela seca normalmente promove mudanças na proporção das clorofilas *a* e *b*, e carotenoides. Essa mudança na proporção dos pigmentos está relacionada à capacidade da seca em mudar seu *turnover*, ou seja, reduzir a síntese dos pigmentos e aumentar sua velocidade de degradação (ANJUM et al., 2011b).

A diminuição do teor de clorofila sob estresse hídrico é considerada uma das principais causas da inativação da fotossíntese (JALEEL et al., 2009). Um exemplo bem interessante a respeito do papel dos pigmentos em condição de seca é o chamado *stay green* que alguns genótipos podem apresentar. A característica *stay green* faz com que as folhas das plantas permaneçam verdes por mais tempo, principalmente no período final de produção, visto que nesse caso ocorre a manutenção dos pigmentos e um retardo da senescência das folhas (BORRELL et al., 2014).

A redução da produtividade das plantas está intimamente ligada à redução da taxa fotossintética (ANJUM et al., 2011b; FAROOQ et al., 2009). A seca pode ocasionar dois tipos de limitação fotossintética, a chamada (i) limitação estomática e (ii) a não estomática (ou bioquímica) (ANJUM et al., 2011b). Quando se fala em limitação da fotossíntese pela seca, existe um grande debate se tal limitação ocorre principalmente por fechamento estomático ou por limitação bioquímica (MANAVALAN; NGUYEN, 2017). A primeira, como o próprio nome sugere, ocorre por diminuição da condutância estomática durante a seca, ou seja, o fechamento estomático. Inicialmente esse fechamento ocorre pela simples desidratação das células guarda e posteriormente, à medida que o estresse hídrico prossegue, vão ocorrendo mecanismos de sinalização como o acúmulo de ABA, fazendo com que os estômatos permaneçam fechados por mais tempo (ANJUM et al., 2011b).

Por um lado, o fechamento estomático é importante durante o período de estresse, uma vez que a planta perde menos água via transpiração. No entanto, à medida que a planta deixa de perder água para a atmosfera, ela deixa também de assimilar CO₂. Então nesse caso, a fotossíntese é limitada porque ocorre uma diminuição da concentração interna de CO₂ e, conseqüentemente, uma menor atividade de carboxilação da rubisco (ANJUM et al., 2011b).

Com o aumento dos dias e intensidade do estresse, ocorre o fechamento estomático por períodos prolongados, isso faz com que ocorra uma diminuição na transpiração e um aumento da temperatura foliar, resultando da menor perda de calor latente (ANJUM et al., 2011b). Como a atividade de carboxilação da rubisco será baixa durante um longo período, ocorre um acúmulo de poder redutor que seria utilizado durante a etapa bioquímica. Esse acúmulo faz com que ocorra a formação de EROs que podem danificar os fotossistemas e causar a peroxidação lipídica nas membranas celulares. A etapa bioquímica é dependente de poder redutor e ATP produzidos durante a etapa fotoquímica, como o aparato fotoquímico pode ser danificado o ciclo de Calvin não funciona, ocasionando, assim, a chamada limitação não estomática ou bioquímica da fotossíntese (FAROOQ et al., 2009).

2.2.3 Dano oxidativo

As chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas altamente reativas produzidas pela redução incompleta de O₂ para H₂O em diferentes organelas (cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos), através de processos metabólicos vitais para o vegetal, tais como a fotossíntese, respiração e a fotorrespiração (GILL; TUTEJA, 2010; MANAVALAN; NAUYEN, 2017). O termo EROs é genérico e inclui tanto radicais de oxigênio como o radical

superóxido (O^{2-}), oxigênio singlete (1O_2), alcoxila (RO^*) ou hidroxila (OH^*), como alguns derivados de radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCL$) (KARUPPANAPANDIA et al., 2011).

É importante salientar que o oxigênio é essencial para a produção de energia em organismos aeróbicos. De modo que, em condições fisiológicas adequadas ou estáveis, as moléculas de EROs são removidas por diferentes mecanismos de defesa antioxidante (FOYER; NOCTOR, 2005). Além disso, os radicais livres e o peróxido de hidrogênio são importantes moléculas que atuam nas reações enzimáticas, como intermediários ou produtos, e em baixas concentrações como sinalizadores (MANAVALAN; NGUYEN, 2017). No entanto, quando a produção de EROs excede a capacidade antioxidante de eliminá-las, ocorre o estresse oxidativo que leva ao dano oxidativo propriamente dito.

O equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs pode ser perturbado por uma série de fatores ambientais condicionadores de estresse, tais como a salinidade, temperatura, metais pesados, radiação UV e o déficit hídrico (APEL; HIRTO, 2004). O déficit hídrico propicia um desbalanceamento entre a produção e a eliminação de EROs. Logo, por serem extremamente reativas, as EROs podem causar grandes prejuízos às células vegetais, aumentando a peroxidação lipídica, a degradação das proteínas, a fragmentação do DNA e, por fim, a morte celular (ANJUM et al., 2011b; MANAVALAN; NAUYEN, 2017). A superprodução de EROs induzida pela seca aumenta a produção de malondialdeído (MDA) que por sua vez, é considerado um indicador de dano oxidativo nos tecidos vegetais (ANJUM et al., 2011b).

2.3 Como as plantas podem responder à condição de déficit hídrico?

Na literatura, ao se tratar de respostas das plantas a fatores ambientais como a seca, é bem rotineiro encontrar termos empregados inadequadamente. Dentre esses termos, merece um melhor esclarecimento a condição de adaptação e aclimatação das plantas (FIGURA 2). O nível adaptativo refere-se a uma tolerância geneticamente determinada, adquirida por um processo de seleção natural durante gerações (TAIZ; ZEIGER, 2009). Um exemplo bem claro de adaptação são as plantas xerófitas que normalmente possuem um conjunto de estruturas xeromórficas, como folhas menores e mais espessas, estômatos menores e mais densos. Logo, tais características fazem com que esse grupo de plantas consiga se sobressair em ambientes com limitação hídrica associada a altas temperaturas (FANG; XIONG, 2015).

Figura 3 - Esquema integralizando as possíveis respostas nas plantas induzidas pela seca.



Fonte: Do autor (2018).

Por outro lado, a aclimação é um termo geralmente utilizado para descrever a capacidade das plantas em promoverem modificações em diferentes níveis de organização, em resposta a mudanças em seu ambiente de desenvolvimento (TAIZ; ZEIGER, 2009). Essas respostas são frequentemente referidas como plasticidade fenotípica, que pode ser conceituada como a capacidade do genótipo em expressar diferentes fenótipos sob variações ambientais (VALLADARES et al., 2000).

Normalmente os autores organizam as possíveis respostas das plantas à seca em três diferentes categorias de mecanismos ou estratégias (TAIZ; ZEIGER, 2004; FARROQ et al., 2009; LUO, 2010; FANG; XIONG, 2015). São elas (1) escape, (2) evitação e a (3) tolerância, no entanto, alguns autores inserem uma quarta categoria, (4) a recuperação (FANG; XIONG, 2015), que está relacionada à capacidade da planta em retomar seu desenvolvimento quando a condição de estresse é revertida. Entretanto, as três primeiras são as mais aceitas e difundidas.

O escape é um mecanismo desenvolvido por plantas que reduzem seu ciclo de vida permitindo sua reprodução, antes que o ambiente se torne seco e, portanto inapropriado para seu desenvolvimento (FANG; XIONG, 2015). Para um contexto ecológico, o escape possui muita relevância, uma vez que as plantas que desenvolvem esse mecanismo conseguem sustentar algum tipo de reprodução e assim possibilitar a perpetuação da espécie. No entanto, quando se trata de plantas cultivadas e termos produtivos, esse mecanismo não é bem visto, já que leva a uma redução direta na produtividade das plantas (ANJUM et al., 2011b). Por sua vez, a evitação e a tolerância são consideradas os mecanismos mais importantes para as plantas (FANG; XIONG, 2015). No entanto, é importante ressaltar que essas respostas, normalmente resultam de eventos integrados que ocorrem em todos os níveis de organização da planta.

De todos os mecanismos a evitação é a que possui mais divergência terminológica na literatura, e pode ser encontrada em trabalhos como evitação, prevenção e retardo da

desidratação (TAIZ; ZEIGER, 2004; ANJUM et al., 2011b; FANG; XIONG, 2015; MANAVALAN; NGUYEN, 2017;). Entretanto, geralmente é encontrada como evitação, apesar de alguns autores (TAIZ; ZAIGER, 2004), sugerirem que o termo é inapropriado, tendo em vista que para eles, as únicas plantas que evitam realmente a seca, são aquelas que conseguem escapar dela, ou seja, as que desenvolvem a estratégia de escape.

De modo geral, o mecanismo de evitação visa retardar a desidratação dos tecidos, sobretudo, pela maximização do acesso à água, bem como pela minimização de sua perda para a atmosfera via transpiração (FANG; XIONG, 2015). Isso é conseguido pelas plantas através de um sistema radicular bem desenvolvido e altamente responsivo à condição de restrição hídrica (LAVINSKY et al., 2015). Assim como pelo fechamento estomático, ou mesmo pelo desenvolvimento de uma cutícula mais espessa (MANAVALAN; NGUYEN, 2017). É importante ressaltar que o mecanismo de evitação se torna particularmente essencial em condições de seca leve a moderada (FANG; XIONG, 2015).

A estratégia de tolerância é a que integra a maior quantidade de possíveis respostas. Esse mecanismo é desenvolvido pelas plantas quando a quantidade de água no solo está extremamente reduzida e estas podem experimentar um déficit hídrico severo (FANG; XIONG, 2015). Essas diferentes respostas visam à manutenção contínua dos processos fisiológicos sob baixa disponibilidade de água. Dentre as principais respostas pode-se citar: acumulação dos chamados osmólitos compatíveis como a prolina, glicina betaina e açúcares solúveis; o acúmulo de ABA que possui um importante papel em vias de sinalização; a manutenção do teor de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides); formação de elementos de vaso de menor calibre (reduzir a cavitação) e um sistema de defesa antioxidante altamente responsivo (ANJUM et al., 2011b; FANG; XIONG, 2015; MANAVALAN; NGUYEN, 2017).

Todos essas respostas são extremamente importantes para as plantas tolerarem a seca. No entanto, o sistema de defesa antioxidante é considerado um dos mais importantes por muitos autores (ANJUM et al., 2011b; MANAVALAN; NGUYEN, 2017), tendo em vista os danos que as EROs podem ocasionar nas células, como mostrado anteriormente.

2.3.1 Sistemas de defesa antioxidante

Visando impedir o dano oxidativo causado pelo acúmulo de EROs, ocasionado pela seca, as plantas podem aumentar a atividade de seus mecanismos de defesa antioxidantes. Tais mecanismos de desintoxicação incluem (i) complexos antioxidantes enzimáticos e (ii) não-enzimáticos. Os antioxidantes não-enzimáticos incluem compostos de baixo peso molecular

capazes de interagir com componentes celulares e funcionar como cofatores enzimáticos. Integram o sistema antioxidante não enzimático, o ácido ascórbico (ascorbato), glutamina, α -tocoferol, prolinas, flavonóides e os carotenóides (BARBOSA et al., 2014; STEFFENS; STEFFENHEINS; SAUTER, 2013).

Já os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT), peroxidase (POD) glutamina redutase (GR), glutamina-S-transferase (GST), peroxidase do guaicol (GPOX), peroxidase da glutatona (GPX), monohidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR) e polifenoloxidase (PPO) (BARBOSA et al., 2014; GILL; TUTEJA, 2010).

A SOD constitui a linha de defesa celular primária contra EROs, posto que sua atuação na prevenção dessas espécies reativas envolve outras peroxidases como a POD (JALEEL et al., 2009). Através de catálise, a SOD catalisa a dismutação de duas moléculas do radical superóxido em H_2O_2 e H_2O (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). De modo que, um radical superóxido tem uma meia vida de menos de um segundo, sendo rapidamente dismutado em H_2O_2 , que é um produto relativamente estável e que pode ser desintoxicado pela catalase e peroxidase (FAROOQ et al., 2009).

Dentre as enzimas antioxidantes, a CAT possui um dos mecanismos mais eficientes para remover o H_2O_2 formado nas células sob condições de estresse (MALICK; MOHN, 2000). A ação da CAT torna-se mais importante, quando a concentração de H_2O_2 se eleva, tendo em vista que em concentrações menores o H_2O_2 é reduzido pela glutatona e peroxidase (RICE-EVANS; DIPLOCK; SYMONS, 1991).

Ao contrário da CAT, que reduz os níveis de H_2O_2 nos peroxissomos, a APX realiza a mesma função nos cloroplastos e citosol das células vegetais. A APX utiliza o ascorbato como doador de hidrogênio e elétrons para quebrar H_2O_2 formando H_2O e monodehidroascorbato (MDHA) que é desmembrado a DHA não enzimaticamente (SHARMA et al., 2012).

O ascorbato, também conhecido como ácido ascórbico, é um importante antioxidante não-enzimático. Essa molécula apresenta a capacidade de doar elétrons em várias reações enzimáticas e não-enzimáticas, participando diretamente da desintoxicação de EROs em processos de fotossíntese e respiração (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Ademais, a minimização dos danos causados pelas EROs se devem também à ação de sinergismo que o ascorbato possui com outros antioxidantes (JALEEL et al., 2009).

Já os carotenoides possuem papel multifacetado, funcionando como pigmentos acessórios, absorvendo luz na região do visível e transferindo-a para as moléculas de clorofila. Além disso, atuam como importantes agentes antioxidantes não enzimáticos combatendo o

oxigênio singlete e dissipando o excesso de energia contida no estado triplete da clorofila (GILL; TUTEJA, 2010).

2.3.2 Osmorregulação

A osmorregulação ou ajuste osmótico pode ser definida como a capacidade das células vegetais em acumular solutos orgânicos e inorgânicos intracelularmente e utilizá-los para baixar o potencial hídrico durante períodos de estresse osmótico (MANAVALAN; NAUYEN, 2017; TAIZ et al., 2017). Segundo Taiz et al. (2017), existem duas maneiras principais pelas quais a osmorregulação pode ocorrer. A primeira envolve o vacúolo onde íons inorgânicos são utilizados no ajuste osmótico, impossibilitando, assim, que possam afetar processos metabólicos no citosol. A segunda envolve a acumulação de solutos compatíveis, em geral, não carregados.

Os solutos compatíveis são compostos orgânicos osmoticamente ativos nas células, no entanto, diferentemente dos íons, em altas concentrações não desestabilizam a membrana nem interferem no funcionamento enzimático (TAIZ et al., 2017). Logo, as células vegetais conseguem acumular altas concentrações desses compostos sem nenhum tipo de efeito prejudicial em seu metabolismo. Os principais solutos compatíveis são, aminoácidos como a prolina, açúcares-alcoóis como o sorbitol, compostos quartenários de amônio como a glicina betaína e carboidratos solúveis (ANJUM et al., 2011b; FAROOQ et al., 2009; MANAVALAN; NAUYEN, 2017; TAIZ et al., 2017).

Dentre todos os solutos, a prolina se destaca por ser a mais amplamente estudada, dada sua considerável importância na tolerância de inúmeros estresses, como o déficit hídrico (ANJUM et al., 2011b). A prolina é um aminoácido essencial para o metabolismo primário das plantas, e possui uma excepcional rigidez conformacional. Anteriormente acreditava-se que a prolina seria apenas um osmólito inerte compatível, que protege estruturas subcelulares e macromoléculas sob estresse osmótico (SZABADOS; SAVOURÉ, 2009). No entanto, hoje já é conhecido que o acúmulo de prolina pode influenciar a tolerância ao estresse de várias maneiras, sendo uma molécula chave para a manutenção da homeostase celular.

Logo, inúmeras funções fisiológicas podem ser atribuídas à prolina, tais como sua atuação como molécula sinalizadora, modulando as funções mitocondriais, sua influência na proliferação celular ou morte celular e desencadeadora da expressão gênica específica (SZABADOS; SAVOURÉ, 2009). Além disso, a molécula pode contribuir para a estabilização de macromoléculas, funcionar como um sumidouro para o excesso de poder redutor, além de

constituir uma importante fonte de carbono e nitrogênio durante a fase de recuperação, ou seja, quando a condição estressante é revertida (FAROOQ et al., 2009).

A acumulação de prolina sob condições de déficit hídrico em muitas espécies de plantas foi correlacionada com a tolerância ao estresse, e sua concentração mostrou geralmente ser superior em plantas tolerantes, quando comparada às sensíveis (ANJUM et al., 2011b). Foi verificada uma alta concentração de prolina em variedades de arroz tolerantes à seca (CHOUDHARY; SAIRAM; TYOGI, 2005). O conteúdo de prolina também aumentou significativamente nas folhas e raízes de sorgo submetido ao déficit hídrico (SOUZA et al., 2013). Além disso, o estresse progressivo da seca induziu uma acumulação considerável de prolina em plantas de milho (ANJUM et al., 2011a).

2.3.3 Modificações morfoanatômicas condicionadas pelo déficit hídrico

Características morfológicas e anatômicas podem ser adaptativas quando geram mecanismos de tolerância a condições ambientais adversas. Essas adaptações resultam das relações dos organismos com o seu ambiente e das características do genótipo do indivíduo (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Segundo os mesmos autores, as características morfoanatômicas previamente definidas geneticamente podem ser modificadas formando um fenótipo particular. Esse fenótipo é formado graças à chamada plasticidade fenotípica (VALLADARES et al., 2000).

Dentre os órgãos vegetais, a folha se destaca por desempenhar funções vitais para o vegetal (fotossíntese, trocas de O_2 e CO_2 e transpiração) e por ser o órgão mais plástico em resposta a fatores ambientais. Muitos são os fatores ambientais capazes de promover alterações na morfologia e anatomia foliar. Dentre esses fatores, a restrição hídrica se destaca como um importante condicionador de inúmeras modificações morfoanatômicas nesse órgão (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

No tecido epidérmico foliar, é comum encontrar uma vasta quantidade de variações que podem ocorrer em resposta à condição de seca. Normalmente ocorre um aumento na espessura desse tecido, suas células são densamente cutinizadas e cobertas por espessas camadas de ceras (CAMERON; TEECE; SMART, 2006). Importantes anexos epidérmicos, como estômatos e tricomas, também sofrem variações impostas pelo déficit hídrico. Os estômatos podem sofrer modificações com relação à sua frequência e tamanho das células e ostíolo, ocorre, assim, uma redução em seu tamanho e um aumento em sua densidade. Tal ajuste é essencial para as plantas, tendo em vista que possibilita uma maior eficiência no uso da água (LARCHER, 2000).

Apesar de ocorrerem algumas excessões, a maioria dos integrantes da família Poaceae, assim como o sorgo, são plantas do tipo C4. Essas plantas apresentam um arranjo diferente e específico nas células do mesófilo foliar que permite uma importante capacidade de “divisão de trabalho”, aumentando, assim, as chances de sobrevivência em ambientes com maior intensidade de radiação solar, altas temperaturas e limitações na disponibilidade de água (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Durante essa divisão, ocorre a fixação do CO₂ em forma de oxaloacetato pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase) nas células do mesófilo, seguido de uma conversão do oxaloacetato em malato que migra para as células da bainha KRANZ. Logo ocorre a descarboxilação do malato nas células da bainha e a liberação do CO₂ que é assimilado pela ribulose-1-5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). Tal mecanismo resulta em uma baixa atividade oxigenase da rubisco e um aumento da taxa fotossintética associada a baixas taxas de fotorrespiração (FAROOQ et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal, condições de crescimento e *design* experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil (19°28' S, 44°15'08'' W, 732 m de altitude). O material vegetal constituiu de dois híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) contrastantes para tolerância ao déficit hídrico, um é tolerante (1G 282) e outro sensível (AG 1060). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, sendo duas condições hídricas e dois híbridos com 6 repetições.

As plantas foram cultivadas em vasos plásticos contendo 20 kg de Latossolo Vermelho Distrófico Típico e, mediante a análise química do solo, foram realizadas as adubações de base e cobertura. Com auxílio de sensores de umidade modelo GB Reader N1535 (Measurement Engineering, Austrália) instalados no centro de cada vaso, o teor de água foi monitorado diariamente entre 9 e 15 h. Com base na resistência elétrica e acoplados a medidores digitais, esses sensores são capazes de monitorar a tensão de água no solo. A irrigação dos vasos foi realizada com base nas leituras obtidas pelos sensores, a água foi repostada até a capacidade de campo, durante o período que antecedeu o estresse. Durante o ensaio, foram realizados todos os tratamentos culturais e fitossanitários necessários, de acordo com a demanda da cultura do sorgo.

Durante o estágio de pré-florescimento, metade das plantas de cada tratamento foram submetidas à condição de DH, ao passo que a outra metade permaneceu com irrigação diária a fim de manter a umidade do solo na capacidade de campo (CC), com a tensão da água no solo de -18 kPa. O DH foi atingido a partir da aplicação de 50% da água disponível até que a tensão da água do solo atingisse pelo menos -138 kPa (SOUZA, T. et al., 2014).

3.2 Potencial hídrico foliar, medidas de trocas gasosas e eficiência quântica do fotossistema II

Após doze dias nas condições anteriormente estabelecidas, o potencial hídrico foliar ao meio-dia (Ψ_{md}) foi determinado, utilizando uma bomba de pressão do tipo Schollander (modelo 1000. PMS Instrument Company – Albany OR, EUA). As medições foram realizadas às 12 horas de acordo com a metodologia descrita por Scholander et al. (1964). As medidas de trocas gasosas foram obtidas por meio de um analisador de gás infravermelho (IRGA-Infrared Gas Analyzer) (modelo LI 6400 (LI-COR, 86 Lincoln, NE, EUA). Todas as medidas foram

realizadas no período da manhã entre 8 e 10h na última folha totalmente expandida das plantas (folha bandeira). Os parâmetros avaliados foram a taxa fotossintética foliar (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), concentração intercelular de CO_2 (C_i) e calculada a eficiência no uso da água (A/E). 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 $400\ \mu\text{mol mol}^{-1}$. A densidade de fluxo de fótons (PPFD) foi de $1500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. A eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) foi determinada através de um fluorímetro com amplitude de pulso modulada (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Instruments King's Lynn, Reino Unido).

3.3 Extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos

Para a extração dos pigmentos fotossintéticos foram coletados fragmentos foliares em sacos de alumínio condicionados em gelo. Posteriormente, foram adicionados 100 mg de tecido foliar fragmentado em frascos contendo 20 mL de acetona 80% (v/v), e assim permaneceram durante 24 horas sob refrigeração (4°C). Em seguida, foram realizadas as leituras espectrofotométricas a 445, 645 e 663 nm. Logo, a partir dos valores obtidos nas leituras foram calculados os teores dos carotenoides e das clorofilas a , b e total (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001).

3.4 Extração e atividade das enzimas do metabolismo antioxidante

Para as análises das enzimas do sistema antioxidantes, assim como as demais análises que necessitaram de material fresco, foram utilizadas folhas devidamente coletadas, acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer a -80°C .

A extração das enzimas foi realizada a partir da maceração de 200 mg de tecido foliar em nitrogênio líquido com 50% de PVPP e procedendo-se ao protocolo de extração proposto por Biemelt, Keetman e Albrecht (1998), o tampão de extração foi composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico a 10 mM. Em seguida, o extrato foi submetido à centrifugação a 13000 g por 10 minutos, a 4°C . Os sobrenadantes, posteriormente obtidos foram utilizados para avaliar a atividade da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase (POD), assim como para quantificar a concentração de proteínas presentes nas amostras.

A atividade da SOD foi determinada com base na metodologia de Giannopolitis e Ries (1977), em que é avaliada a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de

nitrotetrazólio (NBT). Logo, alíquotas do sobrenadante (6 μL) foram pipetadas em placas de acrílico visível junto ao meio de incubação composto por fosfato de potássio 100 mM e pH 7,8, metionina 70 mM, EDTA 10 μM , NBT Mm, Riboflavina 0,2 mM e água destilada. As placas contendo as amostras e o meio de incubação foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W durante 7 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm.

Para avaliar a atividade da CAT foi utilizada metodologia proposta por Havir e Mchale (1987), em que alíquotas do sobrenadante (9 μL) foram pipetadas em placas de acrílico UV junto com o meio de incubação composto por tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), peróxido de hidrogênio 250 mM e água destilada. A atividade da enzima foi determinada com base no consumo de H_2O_2 a cada 15 segundos, por 3 minutos, através de espectrofotometria a 240nm. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade da APX foi avaliada com base na metodologia de Nakano e Asada (1981), em que se acompanha a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, durante 3 minutos. Para tal, alíquotas do sobrenadante (9 μL) foram pipetadas em placas de acrílico UV junto ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 200 mM e pH 7,0, ácido ascórbico 10 mM, peróxido de hidrogênio 4 mM e água destilada. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $2,8 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Já para avaliar a atividade da POD, foi utilizada a metodologia de Fang e Kao (2000) na qual é observada a formação de tetra guaiacol pelo aumento da absorbância. Para isso, alíquotas do sobrenadante (4 μL) foram pipetadas em placas de acrílico UV junto ao meio de incubação composto por tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 6,0, guaiacol 0,8% e água destilada. Antes da leitura espectrofotométrica a 470 nm durante 3 minutos, foi adicionado H_2O_2 0,9%. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

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

Para a quantificação de peróxido de hidrogênio e malonaldeído MDA, 200 mg de tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido e PVPP, homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 10000 g por 15 minutos, a 4°C. A concentração de H_2O_2 foi obtida por espectrofotometria de acordo com Vasellati et al. (2000). Já para concentração de MDA, que corresponde ao produto final da peroxidação lipídica e é utilizado para determinar o nível de dano nas membranas celulares, utilizou-se a metodologia proposta por Buege e Aust (1978).

3.6 Extração e quantificação de ascorbato

Para a quantificação da concentração de ascorbato nas folhas, utilizou-se protocolo estabelecido por Arakawa et al. (1981), em que 50 mg de tecido foliar fresco foram macerados em nitrogênio líquido com PVPP e posteriormente homogeneizado em 1500 de ácido tricloroacético (TCA) 5% (m/v), em seguida o homogeneizado foi centrifugado a 13000 g, por 15 minutos, a 4°C. Posteriormente foi retirada uma alíquota do sobrenadante (20 µL) e adicionada ao meio de reação contendo TCA 5% (m/v), etanol 99,8% (v/v), ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,4% em etanol (v/v), bathophenantrolina 0,5% em etanol (p/v) e FeCl₃ 0,03% em etanol (m/v). Após homogeneizada, a mistura foi incubada a 30°C, por 90 minutos. A concentração de ascorbato nas folhas foi determinada de acordo com a absorbância das amostras a 534 nm e com base na curva-padrão com concentrações conhecidas.

3.7 Extração e quantificação das biomoléculas do metabolismo primário

No fim do período de estresse, para a extração das biomoléculas do metabolismo primário, duas folhas completamente expandidas foram coletadas, secas em estufa de circulação forçada a ± 65 °C até atingir massa constante e moídas em moinho. Posteriormente, homogeneizou-se 200 mg do tecido foliar seco, previamente processado, em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), e, em seguida, os extratos foram levados ao banho-maria por 30 minutos, a 40 °C. Logo, o extrato foi centrifugado a 1000 g durante 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e o processo repetido uma vez e os sobrenadantes combinados. Após a coleta do sobrenadante, o material foi armazenado a -20°C.

Utilizaram-se alíquotas desses sobrenadantes para analisar a concentração dos açúcares solúveis totais (AST) pelo método de Antrona (YEMM; WILLIS, 1954), para determinar a concentração dos açúcares redutores (AR) pelo método do Ácido dinitrosalicílico - DNS (MILLER, 1959) e para a determinação da concentração de proteínas totais e aminoácidos, seguindo os métodos espectrofotométricos de Bradford (BRADFORD, 1976) e Ninhidrina (YEMM; COCKING; RICKETTS, 1955), respectivamente. O conteúdo de sacarose nas folhas foi estimado pela diferença entre a concentração de AST e dos AR.

Para a extração e quantificação de amido, após os processos de homogeneização e centrifugação do tecido foliar, já descritos anteriormente para obtenção dos extratos brutos, o pellet de cada amostra foi ressuscitado com 8 mL do tampão acetato de potássio 200 mM pH 4,8. Posteriormente foram adicionados 2 mL da enzima amiloglucosidase 1 mg/mL (1 mg da

enzima em 1 mL de tampão acetato de potássio 200 mM pH 4,8), foram encubadas em banho-maria a 40 °C por 2 horas. Logo depois, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e o volume completado para 15mL de água destilada. A concentração de amido foi determinada pelo método da Antrona (YEMM; WILLIS, 1954).

3.8 Extração e quantificação de prolina

A quantificação da concentração de prolina nas folhas foi realizada com base na metodologia proposta por Bates, Waldren e Teare (1973). Para tal foram macerados 100 mg de tecido foliar seco com ácido sulfosalicílico 3%. Os extratos obtidos foram homogeneizados à temperatura ambiente durante 60 minutos e, posteriormente, filtrados com papel de filtro. As alíquotas obtidas após a filtração reagiram com solução composta por 2 ml de ninhidrina ácida e 2 ml de ácido acético glacial em tubo de ensaio, durante 1 hora, a 100 ° C. A reação foi paralisada em banho contendo gelo. A concentração de prolina nas folhas foi determinada de acordo com a absorvância das amostras a 520 nm e com base na curva-padrão com concentrações conhecidas de prolina.

3.9 Análises anatômicas da folha

As avaliações anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras. Para a anatomia foliar, foi coletada uma amostra na região do terço médio da última folha totalmente expandida das plantas (folha bandeira) de cada repetição. As amostras foram fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e etanol 70% (FAA 70) (JOHANSEN, 1940), por 48 horas e, em seguida, preservadas em etanol 70%. As secções paradérmicas foram realizadas manualmente nas faces adaxial e abaxial das folhas. Essas sessões foram clarificadas com hipoclorito de sódio 5%, por 10 minutos, reidratadas duas vezes em água destilada por 10 minutos, coradas com safranina 2% e montados em lâminas com água glicerinada 50% (KRAUS; ARDUIN, 1997).

As secções foram, então, fotografadas em microscópio óptico de luz Olympus BX-60 acoplado a uma câmara digital. A partir das secções paradérmicas nas faces adaxial e abaxial das folhas foram obtidos os seguintes parâmetros: densidade estomática (número de estômatos/mm²) e o índice estomático [(número de estômatos/mm²) /número de células epidérmicas]*100. Foi confeccionada uma lâmina por repetição e 5 campos fotografados. Para a contagem dos estômatos e células epidérmicas foi utilizado o software Image J.

3.10 Componentes de produtividade

Ao final do período de estresse, avaliou-se a altura e o número de folhas por planta. A altura das plantas foi obtida a partir de uma régua graduada. A área foliar foi obtida com auxílio de um medidor de área (LI-COR). No final do ciclo, foi determinado o comprimento e diâmetro das panículas, bem como o número de ramificações férteis por panícula. Posteriormente, as partes reprodutivas foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 70 ° C durante 72 h. Logo, obteve-se a biomassa seca das panículas, biomassa seca dos grãos e o peso de 100 grãos.

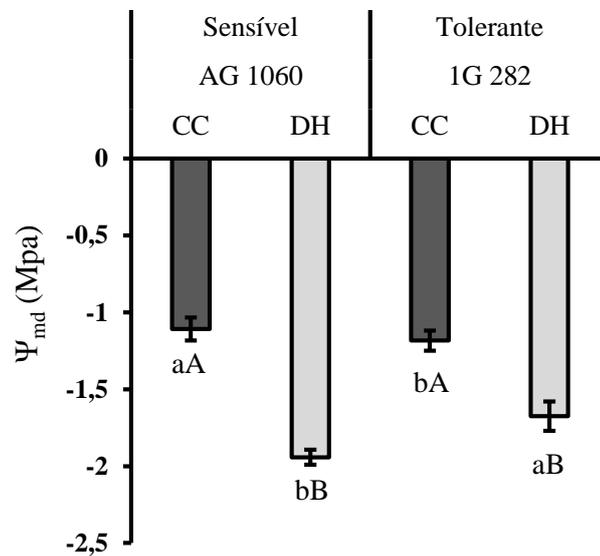
3.11 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a testes estatísticos preliminares para a adequação, ou não, à análise de variância (ANOVA). Posteriormente as médias foram testadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o software estatístico Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2016).

4 RESULTADOS

Ao final do período de estresse, observou-se uma redução do potencial hídrico foliar (Ψ_{md}) em ambos os híbridos sob DH, quando comparados aos seus controles em CC (FIGURA 4). Em contrapartida, o híbrido sensível AG 1060 apresentou uma maior queda de seu *status* hídrico em relação ao tolerante 1G 282 na mesma condição.

Figura 4 - Potencial hídrico foliar ao meio-dia (Ψ_{md}) em dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).



Legenda: As médias seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes umas das outras. Letras minúsculas denotam comparações entre híbridos dentro do mesmo nível de água no solo, e letras maiúsculas denotam comparações entre os níveis de água no solo dentro do mesmo híbrido. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2018).

Ao analisar os parâmetros de trocas gasosas (TABELA 1), verificou-se uma redução na taxa fotossintética (A) em ambos híbridos sob efeito do DH, no entanto, em AG 1060 foi verificada uma redução mais acentuada de 55%. Além disso, o híbrido sensível reduziu em 54,04 % sua condutância estomática (g_s) e 47,69 % sua taxa transpiratória (E), ao passo que 1G 282 não apresentou redução significativa para ambas as variáveis na condição de estresse. A concentração interna de carbono (C_i) aumentou em ambos os híbridos durante o DH, no entanto AG 1060 apresentou uma maior concentração (37,32%). O uso e eficiência da água (A/E) não apresentou interação significativa entre os híbridos e as condições hídricas. Ademais, a seca

afetou negativamente a relação F_v/F_m em ambos os híbridos (TABELA 1), entretanto, AG 1060 exibiu uma redução de 15,38 %, enquanto que 1G 282 apenas 5,94 %.

Tabela 1 - Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* obtidos em dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).

Parâmetros	Sensível		Tolerante	
	AG 1060		1G 282	
	CC	DH	CC	DH
A	32,39 bA	14,49 bB	43,57 aA	26,56 aB
g_s	0,420 aA	0,193 bB	0,410 aA	0,330 aA
E	4,420 aA	2,312 aA	4,806 aA	3,004 aA
C_i	175,9 aB	291,8 aA	160,4 aB	190,8 bA
A/E	10,37 aA	8,180 aA	9,340 aA	10,03 aA
F_v/F_m	0,806 aA	0,682 bB	0,807 aA	0,759 aB

Fonte: Do autor (2018).

Abreviaturas: A = taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); g_s = condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); E = taxa de transpiração ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); A/E = eficiência no uso da água; F_v/F_m = eficiência máxima do fotossistema II.

Nota: As médias seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes umas das outras. Letras minúsculas denotam comparações entre híbridos dentro do mesmo nível de água no solo, e letras maiúsculas denotam comparações entre os níveis de água no solo dentro do mesmo híbrido. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Analisando o teor dos pigmentos fotossintéticos (TABELA 2), observou-se uma redução no teor de clorofila *a*, clorofila *b* e conteúdo total de clorofila nas folhas dos híbridos sob DH, quando comparados aos seus controles em CC. Em contrapartida, o híbrido sensível AG 1060 apresentou uma maior queda em relação ao tolerante 1G 282 na mesma condição, apresentando uma redução mais acentuada de 33,25, 37,32 e 34,21% sobre o teor da clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total, respectivamente. A razão *a/b* aumentou em ambos os híbridos sob efeito do DH, tendo o híbrido sensível um aumento mais acentuado. O teor de carotenoides reduziu em 22,01% em AG 1060 durante o DH, enquanto que em 1G 282 não ocorreu redução significativa.

Tabela 2 - Teor de clorofilas e carotenoides em folhas de dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).

Parâmetro	Sensível		Tolerante	
	AG 1060		1G 282	
	CC	DH	CC	DH
Clorofila <i>a</i>	1737,82 bA	1159,88 bB	1919,94 aA	1538,35 aB
Clorofila <i>b</i>	534,97 aA	335,28 bB	548,17 aA	461,21 aB
Clorofila total	2272,79 bA	1495,17 bB	2468,12 aA	1999,56 aB
Relação <i>a/b</i>	3,25 bB	3,46 aA	3,50 aA	3,33 bB
Carotenoides	935,47 aA	729,51 bB	930,44 aA	917,10 aA

Fonte: Do autor (2018).

As médias seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes umas das outras. Letras minúsculas denotam comparações entre híbridos dentro do mesmo nível de água no solo, e letras maiúsculas denotam comparações entre os níveis de água no solo dentro do mesmo híbrido. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O sistema antioxidante enzimático (TABELA 3), foi aqui constituído pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidase (POD) (TABELA 3). O híbrido sensível AG 1060 manteve a atividade da SOD inalterada sob efeito do DH, enquanto que o tolerante 1G 282 aumentou 1,55 vezes sua atividade. Já para a APX verificou-se um aumento de atividade sob efeito do DH para ambos os híbridos, tal atividade foi superior nas folhas de AG 1060, quando comparada à 1G 282 na mesma condição. Apesar da atividade da CAT não ter sido aumentada pela condição de DH em ambos os híbridos, as folhas do tolerante apresentaram maior atividade da enzima tanto na condição de CC como em DH, quando comparadas às de AG 1060 nas mesmas condições. A atividade da POD, manteve-se inalterada para ambos os híbridos, independentemente do nível de água no solo.

Tabela 3 - Atividade do sistema de defesa antioxidante enzimático em folhas de híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).

Enzimas	Sensível		Tolerante	
	AG 1060		1G 282	
	CC	DH	CC	DH
SOD	0,0659 aA	0,7662 aA	0,0539 aB	0,0916 aA
CAT	0,0319 bA	0,0350 aA	0,0448 aA	0,0453 bA
APX	1,5925 bB	3,5402 aA	2,4093 aB	2,9464 bA
POD	3,6634 aA	3,1091 aA	4,9633 aA	4,9344 aA

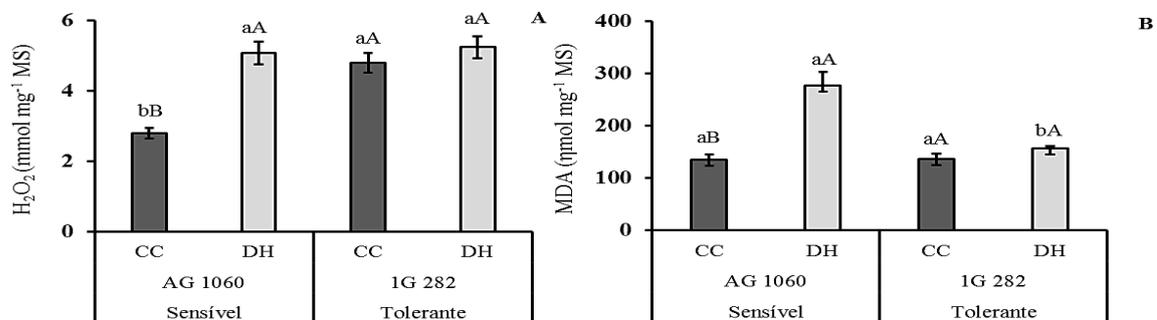
Fonte: Do autor (2018).

Abreviaturas: SOD = superóxido dismutase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$); CAT = catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$); APX = ascorbato peroxidase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$); POD= peroxidase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$).

Nota: As médias seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes umas das outras. Letras minúsculas denotam comparações entre híbridos dentro do mesmo nível de água no solo, e letras maiúsculas denotam comparações entre os níveis de água no solo dentro do mesmo híbrido. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na condição de CC, as folhas de AG 1060 apresentaram menores níveis de peróxido de hidrogênio, quando comparadas às de 1G 282 (FIGURA 5A). O estresse causado pelo DH promoveu um aumento nos níveis de H_2O_2 nas folhas de AG 1060, no entanto, nas folhas de 1G 282 os níveis permaneceram inalterados. Já em relação aos níveis de MDA (FIGURA 5B), que representam a peroxidação de lipídeos, obervou-se apenas nas folhas de AG 1060, sob efeito do DH, um aumento de 2,05 vezes em relação ao seu controle em CC.

Figura 5 - Quantificação de peróxido de hidrogênio (A) peroxidação lipídica (B) em folhas de dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).

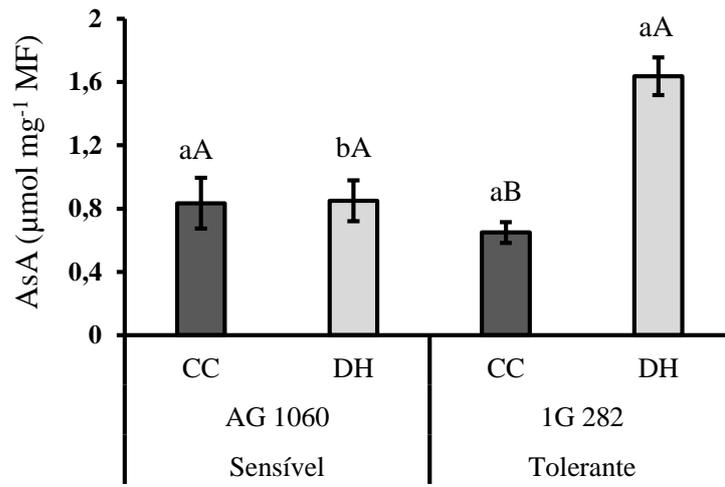


Legenda: As médias seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes umas das outras. Letras minúsculas denotam comparações entre híbridos dentro do mesmo nível de água no solo, e letras maiúsculas denotam comparações entre os níveis de água no solo dentro do mesmo híbrido. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2018).

Ao analisar a quantidade de ascorbato presente nas folhas dos híbridos (FIGURA 6), constatou-se que o estresse causado pela seca não propiciou nenhuma alteração em AG 1060. No entanto, a condição de DH promoveu um aumento de 2,50 vezes nos níveis de ascorbato nas folhas do tolerante 1G 282.

Figura 6 - Teor de ascorbato (AsA) em folhas de dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).



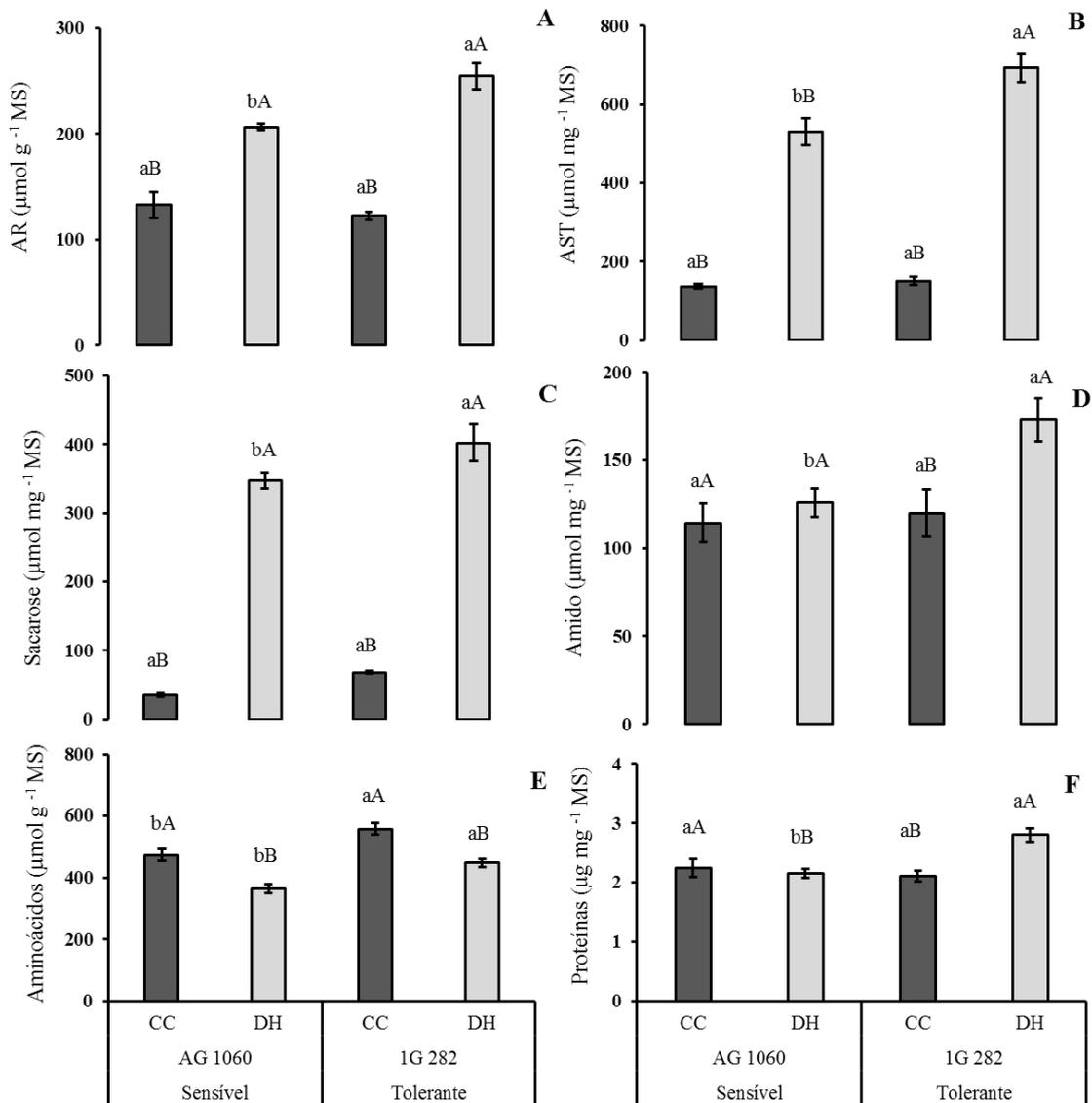
Legenda: As médias seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes umas das outras. Letras minúsculas denotam comparações entre híbridos dentro do mesmo nível de água no solo, e letras maiúsculas denotam comparações entre os níveis de água no solo dentro do mesmo híbrido. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2018).

Ao analisar o conteúdo de biomoléculas nas folhas dos híbridos (FIGURA 7), constatou-se que, de modo geral, o estresse causado pelo DH foi capaz de promover alterações nas concentrações. Analisando isoladamente, sob DH, houve um aumento no conteúdo de açúcares redutores (AR) nas folhas de ambos os híbridos, uma vez que AG 1060 apresentou um incremento de 35,69%, enquanto que em 1G 282 foi de 51,89% (FIGURA 7A). O mesmo comportamento foi observado na concentração dos açúcares solúveis totais (AST), e, em AG 1060 e 1G 282 o incremento sob DH foi respectivamente de 74,13% e 78,14% (FIGURA 7B). O conteúdo de sacarose nas folhas dos híbridos também sofreu aumento na condição de DH, no entanto no híbrido sensível aumentou 89,76%, enquanto que no tolerante foi de 83,00% (FIGURA 7C). Já com relação ao teor de amido (FIGURA 7D), observou-se que o DH promoveu um aumento de 9,21% nas folhas de AG 1060 e de 30,21% em 1G 282.

Ao contrário do padrão verificado para os açúcares, a seca promoveu uma redução no teor de aminoácidos (FIGURA 7E) nas folhas dos híbridos, visto que para AG 1060 foi de 23,12% e 1G 282 de apenas 19,50%. A quantidade de proteínas permaneceu inalterada nas folhas do híbrido sensível, ao passo que no tolerante o DH promoveu um aumento de 24,73%.

Figura 7 - Teor de biomoléculas do metabolismo primário em folhas de híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).

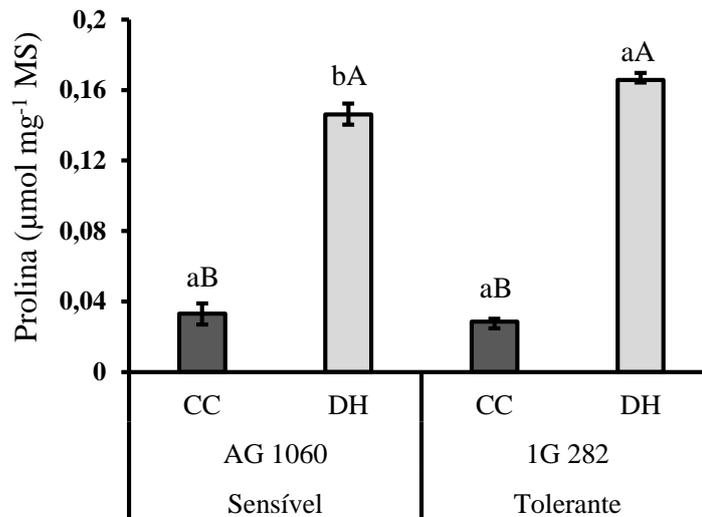


Legenda: As médias seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes umas das outras. Letras minúsculas denotam comparações entre híbridos dentro do mesmo nível de água no solo, e letras maiúsculas denotam comparações entre os níveis de água no solo dentro do mesmo híbrido. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2018).

O DH promoveu um aumento nos níveis de prolina nas folhas de ambos os híbridos (FIGURA 8). No entanto, o aumento nas folhas do sensível AG 1060 foi de 77,27%, ao passo que nas folhas do tolerante 1G 286 verificou-se um aumento mais acentuado de 82,75%, na condição de DH.

Figura 8 - Teor de prolina em folhas de dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).

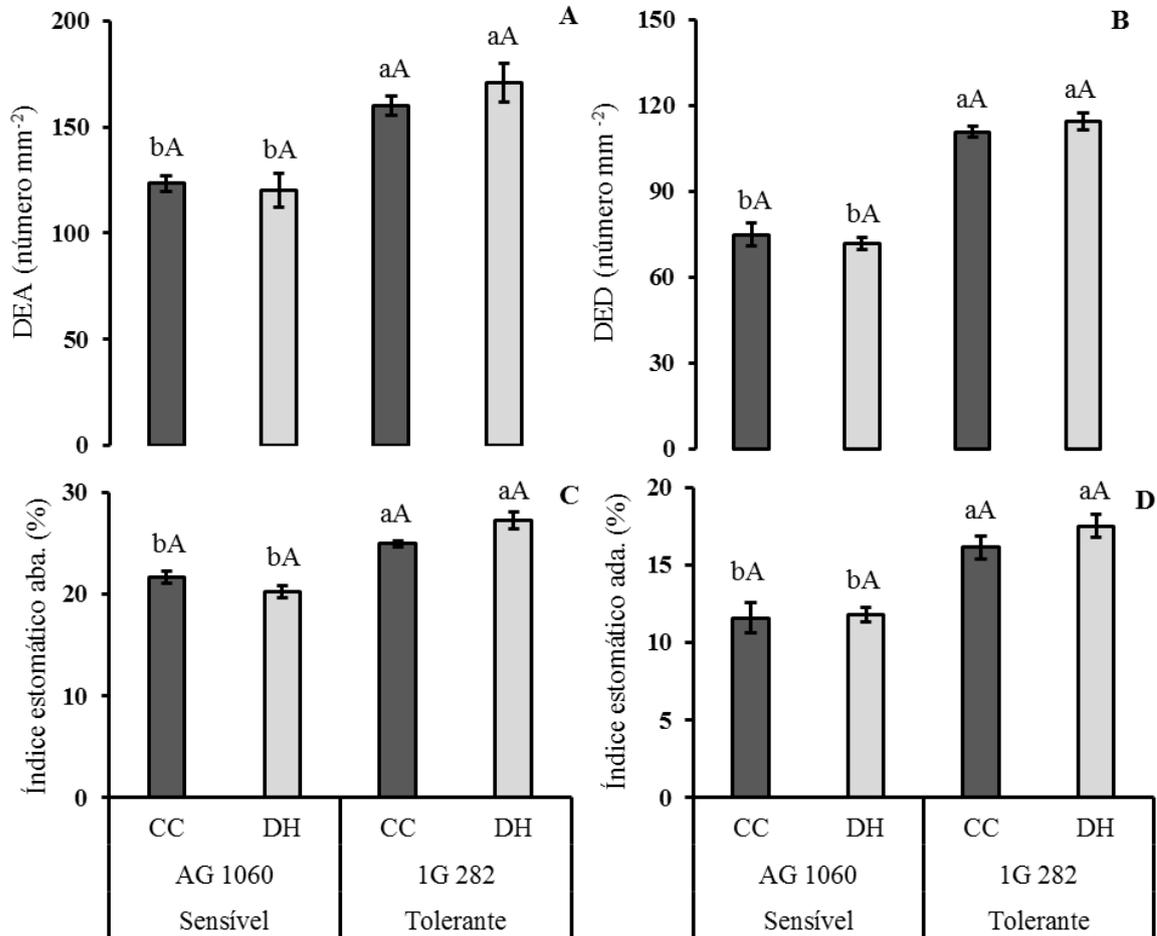


Legenda: As médias seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes umas das outras. Letras minúsculas denotam comparações entre híbridos dentro do mesmo nível de água no solo, e letras maiúsculas denotam comparações entre os níveis de água no solo dentro do mesmo híbrido. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2018).

A seca não promoveu nenhum tipo de alteração nas características estomáticas analisadas (FIGURA 9). No entanto, as folhas de 1G 282 apresentaram maior DEA (FIGURA 9) e DED (FIGURA 9B), tanto na condição de CC como sob DH, quando comparada às folhas do sensível AG 1060 em ambas as condições. Para o índice estomático, ocorreu o mesmo padrão observado na densidade estomática das folhas dos híbridos, uma vez que o DH não promoveu nenhum de tipo de modificação nesse parâmetro. Além disso, o híbrido tolerante mostrou ter um maior investimento na formação de estômatos, apresentando maior índice estomático nas faces abaxial (FIGURA 9C) e adaxial (FIGURA 9D) de suas folhas em ambas as condições de cultivo, quando comparado às folhas de AG 1060 nas mesmas condições.

Figura 9 - Densidade abaxial (DEA) e adaxial (DED) de estômatos em folhas de dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).



Legenda: As médias seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes umas das outras. Letras minúsculas denotam comparações entre híbridos dentro do mesmo nível de água no solo, e letras maiúsculas denotam comparações entre os níveis de água no solo dentro do mesmo híbrido. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2018).

Com relação aos componentes de produtividade (TABELA 4), notou-se que a condição de DH afetou negativamente o número de folhas (NF) em ambos os híbridos, não ocorrendo distinção entre si nas duas condições. Também ocorreu uma redução na área foliar (AF) de ambos os híbridos sob DH, no entanto o híbrido AG 1060 apresentou maior AF em ambas as condições hídricas, quando comparado ao 1G 282. A altura das plantas (AP) não apresentou interação significativa entre as condições hídricas e entre os híbridos, e o mesmo comportamento foi observado para o comprimento (CP) e diâmetro das panículas (DP). No

entanto, o DH reduziu o número de ramificações férteis por panícula (NRFP) em ambos os híbridos.

Apenas o híbrido sensível AG 1060 sofreu redução (58,83%) na biomassa seca dos grãos (BSG) sob DH. Entretanto, o DH reduziu a biomassa seca das panículas em ambos os híbridos, no entanto, a redução no tolerante 1G 282 (21,03%) foi significativamente menor que no sensível AG 1060 (53,25%). Já o peso dos grãos (P100) não sofreu interação significativa entre as condições hídricas e nem entre os híbridos.

Tabela 4 - Componentes de produtividade de dois híbridos de sorgo com características contrastantes para tolerância à seca cultivados sob diferentes níveis de água no solo (capacidade de campo – CC e déficit hídrico – DH).

Parâmetros	Sensível		Tolerante	
	AG 1060		1G 282	
	CC	DH	CC	DH
NF	9,333 aA	6,666 aB	9,333 aA	6,666 aB
AF	0,537 aA	0,449 bA	0,435 bA	0,313 bB
AP	1,084 aA	1,022 aA	1,411 aA	1,416 aA
CP	36,08 aA	35,75 aA	37,91 aA	38,50 aA
DP	10,75 aA	8,333 aA	9,166 aA	8,083 aA
NRFP	60,33 aA	47,33 aB	70,66 aA	55,00 aB
BSG	143,5 aA	59,07 bB	138,7 aA	112,3 aA
BSP	159,6 aA	74,05 bB	154,5 aA	122,0 aB
P100	3,363 aA	3,055 aA	2,763 aA	2,850 aA

Fonte: Do autor (2018).

Abreviaturas: NF = número de folhas (N°); AF = área foliar (m²); AP = altura da planta (m); CP = comprimento da panícula (cm); DP = diâmetro da panícula (cm); NRFP = número de ramificações férteis por panícula (N°); BSG = biomassa seca dos grãos (g); BSP = biomassa seca da panícula (g); P100 = peso de 100 grãos (g).

Nota: As médias seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes umas das outras. Letras minúsculas denotam comparações entre híbridos dentro do mesmo nível de água no solo, e letras maiúsculas denotam comparações entre os níveis de água no solo dentro do mesmo híbrido. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As barras indicam o erro padrão da média.

5 DISCUSSÃO

De modo geral, a exposição das plantas ao estresse da seca diminuiu de maneira substancial o Ψ_{md} em ambos os híbridos. De fato, em condições de baixa disponibilidade hídrica no solo, ocorre uma diminuição no Ψ_{md} que leva ao déficit hídrico (LAVINSKY et al., 2015). Analisando o Ψ_{md} em genótipos de milho no final do período de DH, Avila et al. (2016) e Souza et al. (2013) também observaram uma significativa redução do *status* hídrico foliar em relação à condição controle. Os mesmos autores ainda verificaram, assim como no presente trabalho, uma possível discriminação entre genótipos tolerantes e sensíveis à seca com base no Ψ_{md} . O maior Ψ_{md} apresentado pelo híbrido tolerante 1G 282, sugere a existência de estratégias que garantam uma maior hidratação do tecido foliar durante a seca.

O maior potencial hídrico foliar apresentado pelo híbrido tolerante 1G 282 na condição de seca, contribuiu para a manutenção das trocas gasosas, garantindo uma maior g_s , e conseqüentemente, maior entrada de CO_2 para o mesofilo. Tal gerenciamento hídrico foi determinante para garantir uma redução menos acentuada na sua taxa fotossintética na condição de DH. Durante a seca, plantas que não apresentam um bom gerenciamento hídrico, têm sua fotossíntese diminuída pela redução na condutância estomática, o que caracteriza uma limitação estomática (ANJUM et al., 2011b). De fato, em trabalhos com genótipos de sorgo contrastantes para tolerância à seca, Ogbaga, Stepien e Johnson (2014) observaram uma redução da taxa fotossintética e condutância estomática em ambos os genótipos, no entanto o declínio foi mais rápido no genótipo mais sensível.

O significativo aumento na concentração interna de carbono na condição de DH sugere uma limitação da fotossíntese por vias bioquímicas, ou não estomática, para ambos os híbridos. Isso é confirmado observando o rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), que é um indicador de dano oxidativo ocorrido no centro de reação PSII e eficiência fotoquímica (KALAJI et al., 2016; OGBAGA; STEPIEN; JOHNSON, 2014). Logo, foi observada uma redução da relação F_v/F_m em ambos os híbridos durante o estresse, uma redução mais acentuada no híbrido sensível. Ao observar a eficiência no uso da água (A/E), nota-se que não ocorreu divergência entre as condições hídricas e entre os híbridos. Alguns autores afirmam que nem sempre genótipos mais eficientes no uso da água são mais produtivos (BORBA et al., 2017), uma vez que ao reduzir a g_s limitam estomáticamente a fotossíntese, e conseqüentemente diminuem sua produtividade.

De modo geral, o estresse causado pelo DH promoveu mudanças no teor dos pigmentos fotossintetizantes nas folhas de ambos os híbridos. De fato, o estresse promovido pelo DH

promove mudanças na proporção dos pigmentos fotossintetizantes, posto que tal mudança está relacionada à capacidade da seca em alterar o *turnover*, diminuindo sua síntese e aumentando sua degradação (MANAVALAN; NAUYEN, 2017). No entanto, é importante destacar que 1G 282 conseguiu manter um maior teor de pigmentos na condição de estresse. A manutenção de um maior teor de pigmentos fotossintéticos durante a seca é uma característica essencial para a tolerância das plantas, tendo em vista sua importância durante a etapa fotoquímica da fotossíntese (FANG; XIONG, 2015). Logo, tendo em vista que a diminuição do teor de pigmentos sob estresse hídrico é considerada uma das principais causas da inativação da fotossíntese (ANJUM et al., 2011a; MANAVALAN; NAUYEN, 2017), os maiores teores de clorofilas nas folhas do híbrido tolerante podem estar contribuindo diretamente para a manutenção de uma maior taxa fotossintética na condição de DH (TABELA 1).

Além disso, essa capacidade de 1G 282 em reter um maior teor de pigmentos durante o estresse, retardando assim a senescência foliar, pode ser considerada uma característica de *stay green* funcional, caracterizado pela manutenção de um maior teor de pigmentos fotossintéticos, bem como do processo fotossintético (BORRELL et al., 2014). Estudando o comportamento dos pigmentos fotossintéticos em genótipos de sorgo contrastantes ao longo de um período com déficit hídrico, Ogbaga, Stepien e Johnson (2014) não notaram perda aparente no teor de clorofila nas folhas do genótipo mais tolerante ao longo do período de estresse, ao passo que o sensível apresentou uma perda progressiva de clorofila por unidade de área.

A manutenção do teor de carotenoides nas folhas de 1G 282 na condição de DH pode ser considerada uma importante estratégia de tolerância à seca. Os carotenoides possuem papel multifacetado, uma vez que funcionam como pigmentos acessórios, absorvendo luz na região do visível do espectro, entre 400 e 500 nm (mais energéticos), transferindo-a para as moléculas de clorofila sob a forma de comprimentos de onda menos energéticos (GILL; TUTEJA, 2010). Tal efeito é importante, uma vez que durante o estresse acumula um excesso de energia no complexo antena, desse modo agem como agentes fotoprotetores (SHARMA et al., 2012). Somado a isso, tais moléculas ainda atuam como importantes agentes antioxidantes não enzimáticos, combatendo principalmente o oxigênio singlete e dissipando o excesso de energia contida no estado tripleto da clorofila, contribuindo assim, para integridade do aparato fotoquímico durante a condição de estresse (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011).

Além da manutenção dos níveis de carotenoides durante a condição de DH, o híbrido tolerante apresentou um aumento significativo nos níveis de ascorbato na mesma condição (FIGURA 6). O ascorbato ou ácido ascórbico pertence à classe dos antioxidantes não enzimáticos, essa molécula apresenta a capacidade de doar elétrons em várias reações

enzimáticas e não-enzimáticas, participando diretamente da desintoxicação de EROs principalmente nos processos de fotossíntese e respiração (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Além disso, a minimização dos danos causados pelas EROs se devem também à ação de sinergismo que o ascorbato possui com outros antioxidantes (JALEEL et al., 2009). Assim como no presente estudo, o ascorbato foi relacionado como um antioxidante eficaz, melhorando a tolerância à seca em plantas de *Glycine max* (MOHAMED; AKLADIOUS, 2014), *Saccharum* spp. (SALES et al., 2015) e *Cucumis sativus* (NAZ; AKRAM; ASHRAF, 2016). Os presentes dados mostram um investimento do híbrido tolerante em um sistema antioxidante não-enzimático eficaz, caracterizado, sobretudo, pelo aumento dos níveis de ascorbato (FIGURA 6) e a manutenção no teor de carotenoides (TABELA 2) na condição de DH.

Ambos os híbridos apresentaram um aumento significativo nos níveis de prolina em suas folhas na condição de DH (FIGURA 8), confirmando assim, a prolina como um importante marcador fisiológico durante condição de estresse hídrico (SILVA et al., 2011). Atrelado a isso, é importante ressaltar que a biossíntese de prolina é um processo de alto consumo energético na forma de NADPH, o que torna sua biossíntese um processo preventivo à formação de EROs (GILL; TUTEJA, 2010; KAUR; ASTHIR, 2015). De modo que o maior acúmulo de prolina nas folhas do híbrido tolerante pode ter contribuído para um menor dano ao fotossistema II. Além de neutralizar diretamente as EROs, as moléculas de prolina são ainda capazes de funcionar como uma chaperona molecular, estabilizando proteínas, prevenindo desconfigurações e aglomerações conformacionais (HAYAT et al., 2012).

Ademais, o acúmulo de prolina no citosol das células de plantas expostas a estresses abióticos, sobretudo o déficit hídrico, é visto como uma clássica e importante estratégia de osmorregulação, que contribui para a manutenção do turgor celular durante o estresse (ANJUM et al., 2011b). A osmorregulação é referida como uma característica importante que adia a desidratação celular e sua acumulação em muitas espécies de plantas é correlacionada com a tolerância ao estresse, e sua concentração mostrou, normalmente, ser superior em plantas tolerantes ao DH (ANJUM et al., 2011b; MANAVALAN; NAUYEN, 2017). Sob condições de DH os níveis de prolina também se mostraram superiores em trabalhos com milho (ANJUM et al., 2011a) e sorgo (SOUZA, L. et al., 2014). Logo, a alta concentração de prolina pode ser vista como uma importante estratégia que contribuiu com o maior potencial hídrico (FIGURA 1) observado no híbrido tolerante durante o DH.

De modo geral, plantas crescendo em condição de déficit hídrico estão sujeitas a um aumento na produção de EROs que condicionam o estresse oxidativo, e os mecanismos que

reduzam tal estresse desempenham importante papel na tolerância à seca (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). Além do sistema antioxidante não enzimático, os dados mostram que ambos os híbridos apresentaram sistemas antioxidantes enzimáticos responsivos à seca. O tolerante 1G 282 aumentou a atividade da SOD durante o estresse, tal enzima tem um papel central no metabolismo oxidativo, é responsável pela dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e água (RIO et al., 2018). Sales et al. (2015), trabalhando com genótipos de *Saccharum* spp. contrastantes para tolerância à seca também observaram, assim como para o presente trabalho, um aumento na atividade da SOD nas folhas do genótipo tolerante na condição de restrição hídrica. Logo, o aumento da atividade da SOD nas folhas de 1G 282 evidencia um importante ajuste contra o estresse oxidativo desencadeado pelo estresse hídrico.

Com aumento na concentração de H_2O_2 , a APX, enzima componente do ciclo ascorbato-glutadiona, é a primeira peroxidase responsável por reduzi-lo a H_2O e monodeidroascorbato (SHARMA et al., 2012). No entanto, com o aumento do pool de H_2O_2 outras peroxidases (CAT e POD) passam a ser responsáveis por catalisar a quebra das moléculas de peróxido (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). Vale ressaltar que o híbrido tolerante apresentou um duplo sistema de defesa enzimático, constituído pelo aumento da atividade da CAT e APX, enquanto o sensível apresentou aumento apenas na atividade da APX. Assim como em outros trabalhos envolvendo sorgo em condição de DH (MAGALHÃES; SOUZA; LAVINSKY, 2016), não foram verificadas alterações na atividade da POD entre os híbridos e nem entre as condições hídricas.

Logo, os mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos mostraram ser mais responsivos nas folhas do híbrido tolerante 1G 282 submetido à condição de DH. Tal fato é corroborado pela menor peroxidação lipídica, representada pelos níveis de MDA, em suas folhas durante o DH (FIGURA 5B). Mesmo apresentando níveis de H_2O_2 semelhantes ao sensível, sugere-se que naturalmente 1G 282 produza níveis de peróxido superiores aos de AG 1060, visto que o híbrido tolerante não apresentou diferença da condição de CC para DH. Além disso, os altos níveis de peróxido exibidos nas folhas de 1G 282 durante o DH podem estar desempenhando um importante papel de sinalização durante o estresse.

O conteúdo de carboidratos foi modulado pelo DH, visto que ambos os híbridos nessa condição aumentaram, de modo geral, o conteúdo de carboidratos em suas folhas (FIGURA 7). No entanto, o tolerante 1G 282 apresentou maiores níveis, o que pode ser justificado pela manutenção de uma maior atividade fotossintética associada a uma reengenharia da estrutura foliar, e conseqüentemente, maior produção de fotoassimilados durante a condição estresse

(TABELA 1). Torna-se necessário ressaltar que o DH foi imposto durante o período de pré-florescimento, nesse estágio fenológico, as plantas já tinham atingido seu estágio vegetativo máximo. Logo, o dreno com maior atividade nesse período são os órgãos reprodutivos em desenvolvimento, no entanto, a seca compromete o desenvolvimento dessas estruturas (MANAVALAN; NAUYEN, 2017), reduzindo, portanto, a eficiência de particionamento de carbono (carboidratos), induzindo seu acúmulo nas folhas, colmo e raízes (AVILA et al., 2016). Isso é válido, uma vez que as plantas irrigadas que apresentaram panículas maiores e bem formadas (TABELA 4), e conseqüentemente maior atividade do dreno, apresentaram menor conteúdo de carboidratos em suas folhas, mesmo apresentando fotossíntese superior (TABELA 1).

É interessante ressaltar que, o acúmulo de carboidratos nas folhas pode ter contribuído na proteção das moléculas e membranas celulares da oxidação, principalmente do efeito de EROs que não são eliminadas por vias enzimáticas (e.g. $^1\text{O}_2$, O_2^- e OH^-) (OGBAGA; STEPIEN; JOHNSON, 2014). Ademais, o maior acúmulo de açúcares também pode ter contribuído para reduzir o potencial osmótico das células sob efeito do DH (MANAVALAN; NAUYEN, 2017), de modo que as maiores concentrações de AR, AST e sacarose nas folhas de 1G 282 podem ter contribuído diretamente para seu maior potencial hídrico foliar durante a condição de estresse (FIGURA 1).

A seca influenciou ainda o metabolismo de compostos nitrogenados, fazendo com que reduzisse o *turnover* entre a síntese e a degradação de aminoácidos, induzindo uma degradação maior que a síntese em ambos os híbridos (FIGURA 7E). O aumento na concentração de proteínas nas folhas do tolerante 1G 282 pode estar relacionado com o melhor ajustamento metabólico desse híbrido à condição estressante (FIGURA 7F). Isso é sustentado, visto que o DH induz a codificação de proteínas de suma importância para a tolerância a desidratação, tais como aquaporinas (GARG et al., 2018), deidrininas (OSAKABE et al., 2014), proteínas LEAs (ZAMORA-BRISEÑO; JIMÉNEZ, 2016), além das enzimas antioxidantes. Ao contrário do tolerante, o sensível AG 1060 parece não apresentar tal ajuste (FIGURA 7F).

O maior número de estômatos por área em 1G 282 corrobora com a maior condutância estomática na condição de DH, assim como sua maior atividade fotossintética em ambas condições de cultivo, quando comparado ao sensível AG 1060. Os estômatos podem sofrer variações sob a influência de diversos fatores ambientais, tais como a disponibilidade hídrica, é, portanto, um importante indicador de respostas ambientais nas plantas (LARCHER, 2000). De modo que, o aumento no número de estômatos, associado à diminuição do seu tamanho é

uma característica importante na regulação das trocas gasosas em condição de déficit hídrico (MELO et al., 2007).

A condição de déficit hídrico não causou nenhum efeito sobre a densidade estomática e o índice estomático nas folhas dos híbridos. Isso ocorreu, possivelmente em função do estágio de crescimento das folhas em questão. Trabalhando com linhagens de sorgo com características também contrastantes para tolerância à seca durante o pré-florescimento, Magalhães, Souza e Lavinsky (2016) também não verificaram nenhum efeito do DH sobre as características estomáticas. No entanto, assim como para o presente trabalho a linhagem tolerante apresentou maior densidade de estômatos na face abaxial em ambas as condições de cultivo, assim como maior índice estomático em ambas as faces. O índice estomático utiliza como base para sua determinação o número de estômatos e células epidérmicas por unidade de área, representa o investimento da planta na produção de estômatos em relação ao total de células epidérmicas (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Aqui, os maiores valores para o índice estomático em ambas as condições e faces da folha em 1G 282, corrobora com um maior investimento constitutivo do híbrido na formação de estômatos.

Ambos os híbridos reduziram o número de folhas fotossinteticamente ativas durante a condição de DH. A seca induz a senescência precoce das folhas, causando uma redução no número de folhas fotossinteticamente ativas (SMIT; SINGELS, 2006). Esse processo está bem caracterizado na literatura como uma estratégia de resposta das plantas a ambientes com restrição hídrica (BORREL et al., 2014; SOUZA et al., 2013). O híbrido tolerante ainda reduziu sua área foliar na condição de DH, no entanto, apesar de ter uma área foliar reduzida, o mesmo foi capaz de sustentar uma fotossíntese mais eficiente por área, quando comparado a AG 1060 na mesma condição. Tal fato pode ser justificado através da sua maior densidade estomática em ambas as faces de suas folhas (FIGURA 9A e 9B), associado a um aparato fotoquímico mais eficiente na condição de estresse (TABELA 2) e menor dano oxidativo (TABELA 1).

O híbrido tolerante não apresentou maior comprimento e diâmetro de panículas, assim como maior número de ramificações férteis por panícula durante o DH, quando comparado ao sensível na mesma condição. No entanto, foi capaz de sustentar maior biomassa seca de panícula e biomassa seca de grãos (TABELA 4). A maior biomassa seca de grãos em 1G 282 na condição de DH pode estar diretamente relacionada a maior taxa fotossintética sustentada pelo híbrido durante o estresse, quando comparado a AG 1060 na mesma condição. Logo, a maior taxa fotossintética levou a uma maior produção de fotoassimilados os quais foram exportados e utilizados no desenvolvimento dos órgãos florais e enchimento dos grãos (ARAUS; SÁNCHEZ; EDMEADES, 2011).

6 CONCLUSÃO

As avaliações aqui realizadas confirmaram a sensibilidade à seca de AG 1060 e a maior tolerância de 1G 282, como observado na sua maior produtividade sustentada durante o DH. A maior tolerância de 1G 282 está diretamente relacionada a diferentes estratégias de aclimação em nível morfoanatômico, fisiológico e bioquímico adotadas durante a condição de estresse hídrico.

Dentre tais estratégias, vale ressaltar sua capacidade em manter um maior potencial hídrico foliar, reter maior concentração de pigmentos fotossintetizantes, apresentar área foliar reduzida e maior densidade estomática em suas folhas na condição de DH. Além de sustentar maiores taxas de trocas gasosas e maior taxa fotossintética durante o estresse.

A maior tolerância à seca de 1G 282 também está associada a um sistema antioxidante não enzimático e enzimático altamente responsivo, caracterizado pela manutenção da concentração de carotenoides, a produção de altas concentrações de ascorbato e o aumento na atividade da SOD, CAT e APX em suas folhas na condição de restrição hídrica.

Além disso, o aumento mais acentuado no teor de prolina, e maior acúmulo de açúcares e proteínas nas folhas de 1G 282 em condição de queda da fotossíntese, sustentam a existência de uma grande reengenharia estrutural e metabólica, capaz de condicionar maior tolerância durante o DH.

REFERÊNCIAS

- ANJUM, S. A. et al. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 197, n. 3, p. 177-185, June 2011a.
- ANJUM, S. A. et al. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 6, n. 9, p. 2026-2032, May 2011b.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARAKAWA, N. et al. Separative determination of ascorbic acid and erythorbic acid by high-performance liquid chromatography. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 27, n. 1, p. 1-7, 1981.
- 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.
- AVILA, R. G. et al. Drought-tolerant maize genotypes invest in root system and maintain high harvest index during water stress. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 15, p. 450-460, 2016.
- BARBOSA, M. R. et al. Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. **Ciência Rural**, Santa Rural, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, The Hague, v. 39, n. 1, p. 205-207, Aug. 1973.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 2, p. 179-194, 2003.
- BORBA, M. E. A. et al. Gas exchanges and water use efficiency in the selection of tomato genotypes tolerant to water stress. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 2, June 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28653741>>. Acesso em: 10 mar. 2018.
- BORRELL, A. K. et al. Drought adaptation of stay-green sorghum is associated with canopy development, leaf anatomy, root growth, and water uptake. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 21, p. 6251-6263, Nov. 2014.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, May 1976.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: QIN, P. Z. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic, 1978. p. 302-310.
- 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.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: Ed. UFLA, 2009. 243 p.
- CHOUDHARY, N. L.; SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Expression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, New Delhi, v. 42, p. 366-370, Dec. 2005.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: quarto levantamento, novembro/2011**. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>>. Acesso em: 5 jan. 2017.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2017/18: décimo levantamento**. Brasília, DF, 2018. 145 p.
- DUTRA, E. D. et al. Ethanol production from the stem juice of different sweet sorghum cultivars in the state of Pernambuco, northeast of Brazil. **Sugar Tech**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 316-321, 2013.
- FANG, W. C.; KAO, C. H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Science**, Limerick, v. 158, n. 1/2, p. 71-76, Sept. 2000.
- FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 72, p. 673-689, 2015.
- FAROOQ, M. et al. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, Novosibirsk, v. 29, p. 185-212, 2009.
- FOLEY, J. A. et al. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, London, v. 478, p. 337-342, 2011.
- FORNASIERI FILHO, D.; FORNASIERI, J. L. **Manual da cultura do sorgo**. Jaboticabal: FUNEP, 2009.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, Dordrecht, v. 28, p. 1056-1071, 2005.

GARG, G. et al. A plant aquaporin (SoPIP2; 1): regulatory protein channel in plants under stress. **Octa Journal of Biosciences**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 5-8, June 2018.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidante machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

HAMZA, N. B. et al. MicroRNA expression profiles in response to drought stress in Sorghum bicolor. **Gene Expression Patterns**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 88-98, 2016.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HAYAT, S. et al. Role of proline under changing environments: a review. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 7, n. 11, p. 1456-1466, Nov. 2012.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Fifth assessment report**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014.

JALEEL, C. A. et al. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture and Biology**, Beijing, v. 11, n. 1, p. 100-105, 2009.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGrawHill, 1940. 523 p.

KALAJI, H. M. et al. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 38, p. 102, Apr. 2016.

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.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 59, n. 4, p. 609-619, Dec. 2015.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 221 p.

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

LAVINSKY, A. O. et al. Partitioning between primary and secondary metabolism of carbon allocated to roots in four maize genotypes under water deficit and its effects on productivity. **The Crop Journal**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 379-386, 2015.

- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: J. Wiley, 2001. p. F4.3.1-F4.3.8.
- LUO, L. J. Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, p. 3509-3517, 2010.
- MAGALHÃES, P. C.; SOUZA, T. C. de; LAVINSKY, A. O. Phenotypic plasticity of root system and shoots of *Sorghum bicolor* under different soil water levels during pre-flowering stage. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 10, p. 81-87, 2016.
- MALIICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 157, p. 183-193, 2000.
- MANAVALAN, L. P.; NGUYEN, H. T. Drought tolerance in crops: physiology to genomics. In: SHABALA, S. (Ed.). **Plant stress physiology**. 2nd ed. Wallingford: CABI, 2017. p. 1-23.
- MELO, H. C. et al. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 145-153, 2007.
- MILLER, G. L. Modified DNS method for reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOHAMED, H. I.; AKLADIOUS, S. A. Influence of garlic extract on enzymatic and non enzymatic antioxidants in soybean plants (*Glycine max*) grown under drought stress. **Life Science Journal**, Woodbury, v. 11, n. 3, p. 46-58, Jan. 2014.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.
- NAZ, H. I. R. A.; AKRAM, N. A.; ASHRAF, M. Impact of ascorbic acid on growth and some physiological attributes of cucumber (*Cucumis sativus*) plants under water-deficit conditions. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 48, n. 3, p. 877-883, 2016.
- OGBAGA, C. C.; STEPIEN, P.; JOHNSON, G. N. Sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties adopt strongly contrasting strategies in response to drought. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 152, n. 2, p. 389-401, 2014.
- OSAKABE, Y. et al. Response of plants to water stress. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 86, Mar. 2014.
- PAIVA, C. L. et al. Mineral content of sorghum genotypes and the influence of water stress. **Food Chemistry**, London, v. 214, p. 400-405, 2017.
- PATERSON, A. H. et al. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature**, London, v. 457, p. 551-556, 2009.

PENNISI, E. How sorghum withstands heat and drought. **Science**, New York, v. 323, n. 5914, p. 573, 2009.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology**: techniques in free radical research. London: Elsevier, 1991. 291 p.

RIO, L. A. et al. Plant superoxide dismutases: function under abiotic stress conditions. In: GUPTA, D. K.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. (Ed.). **Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants**. Amsterdam: Springer, 2018. p. 1-26.

ROSENOW, D. T. et al. Breeding for pre- and post-flowering drought stress resistance in sorghum. In: THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON GENETIC IMPROVEMENT OF SORGHUM AND MILLET, 1996, Lubbock. **Proceedings...** Lubbock: International Sorghum and Millet, 1996. p. 400-424.

SALES, C. R. G. et al. Photosynthetic and antioxidant responses to drought during sugarcane ripening. **Photosynthetica**, Prague, v. 53, n. 4, p. 547-554, 2015.

SANS, L. M. A. et al. Zoneamento de riscos climáticos para a cultura do sorgo nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 13., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 2003. p. 521-522.

SCHOLANDER, P. F. et al. Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 52, n. 1, p. 119-125, July 1964.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, New York, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, Sept. 2016.

SILVA, V. A. et al. Resposta fisiológica de clone de café Conilon sensível à deficiência hídrica enxertado em porta-enxerto tolerante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 5, p. 457-464, maio 2011.

SMIT, M. A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 98, p. 91-97, 2006.

SOUZA, L. C. et al. Osmorreguladores em plantas de sorgo sob suspensão hídrica e diferentes níveis de silício. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 12, n. 3, p. 240-249, 2014.

SOUZA, T. C. et al. ABA application to maize hybrids contrasting for drought tolerance: changes in water parameters and in antioxidant enzyme activity. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 73, p. 205-217, 2014.

SOUZA, T. C. et al. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 35, p. 3201-3211, 2013.

STEFFENS, B.; STEFFENHEINS, A.; SAUTER, M. Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants. **Frontiers in Plants Science**, Lausanne, v. 4, p. 179, June 2013.

SZABADOS, L.; SAVOURE, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

VALLADARES, F. et al. Plastic phenotypic response to light of 16 congeneric shrubs from a Panamanian rainforest. **Ecology**, Durham, v. 81, n. 7, p. 1925-1936, 2000.

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.

VIDAL, J. **Climate change: how a warming world is a threat to our food supplies**. 2013. Disponível em: <<https://www.theguardian.com/environment/2013/apr/13/climate-change-threat-food-supplies>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, London, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, July 1954.

ZAMORA-BRISEÑO, J. A.; JIMÉNEZ, E. S. de. A LEA 4 protein up-regulated by ABA is involved in drought response in maize roots. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 43, n. 4, p. 221-228, Apr. 2016.