

Sete Lagoas, MG
Dezembro, 2009

Autores

Paulo César Magalhães
Eng°. Agrônomo PhD,
Embrapa Milho e Sorgo,
Sete Lagoas, MG, CP
151, CEP 35701-970
pcesar@cnpms.embrapa.br

Paulo Emílio Pereira de
Albuquerque
Eng°. Agrônomo PhD
emilio@cnpms.embrapa.br

Décio Karam
Eng°. Agrônomo PhD
karam@cnpms.embrapa.br

Fernando Rodrigo de
Oliveira Cantão
Eng°. Agrônomo MSc,
Bolsista da Embrapa
Milho e Sorgo

Caracterização de plantas de milho sob estresse hídrico

Introdução

O estresse pela baixa disponibilidade hídrica (seca) é um dos principais problemas da agricultura e a habilidade das plantas para resistir a tal estresse é de suma importância para o desenvolvimento do agronegócio de qualquer país (SHAO et al., 2008). Estudos de tolerância à seca envolvendo o milho podem trazer melhorias no crescimento e no rendimento da cultura em regiões com limitação hídrica (LI et al., 2009), já que o milho é conhecido pela sua alta sensibilidade a este estresse (WELCKER et al., 2007).

Grandes avanços em estudos sobre melhoramento do milho para a seca têm trazido resultados satisfatórios, gerando genótipos tolerantes (MONNEVEUX et al., 2006). Contudo, pouco é conhecido sobre os mecanismos fisiológicos para a tolerância à seca (BANZIGER et al., 2002). Nesse sentido, a caracterização dos materiais genéticos, assim como a elucidação dos possíveis mecanismos responsáveis pelo comportamento diferencial de genótipos sob condição de estresse, pode facilitar o processo de geração de novos materiais genéticos, além de contribuir para o desenvolvimento de técnicas de seleção que podem reduzir o tempo e o trabalho para avaliação de fontes genéticas de tolerância ao estresse hídrico.

A avaliação da fotossíntese em estudos com a planta de milho em diferentes condições ambientais é prática importante para uma seleção mais “refinada” de genótipos, objetivando obter altas produtividades em meio à limitação climática (KIM et al., 2006). Juntamente com a fotossíntese e outros parâmetros de trocas gasosas, a fluorescência da clorofila também pode ajudar no entendimento fisiológico do processo em condições de seca, sendo que os padrões de fluorescência nessas condições são bem estabelecidos. A eficiência do fotossistema II revela o nível de excitação da energia no sistema de pigmentos que dirige a fotossíntese e tem constituído uma potente ferramenta de seleção de plantas de milho tolerantes a condições adversas como a seca (DURÃES et al., 2005).

As respostas fisiológicas na tolerância à seca podem variar de acordo com a severidade e a duração de imposição do estresse, o estágio fenológico e o material genético (SHAO et al., 2008). Com relação ao estágio fenológico, de acordo com Edmeades et al. (2000), o milho é particularmente muito sensível no estágio de florescimento. Seca durante este período leva a um aumento no intervalo entre florescimento masculino e feminino (IFMF), que é negativamente correlacionado com a produção (DUVICK, 2005).

Tendo conhecimento da variabilidade genética para tolerância à seca, esta pesquisa caracterizou linhagens de milho contrastantes à seca no estágio de florescimento pleno através de parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila.

Em experimento realizado na Embrapa Milho e Sorgo, situada no município de Sete Lagoas, MG, Brasil, foram avaliadas três linhagens de milho com background genético e origens distintas, sendo duas tolerantes (L 31.2.1.2 e L 29.1.1) e uma sensível (L 2.3.2.1) à seca, oriundas do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, com duas plantas por vaso de 20L com solo tipo Latossolo Vermelho Distrófico Típico. As adubações de base e de cobertura foram realizadas de acordo com a recomendação para a cultura no estado de Minas Gerais (RIBEIRO et al., 1999).

O teor de água no solo foi monitorado diariamente nos períodos da manhã e da tarde (9:00 e 15:00 horas), com auxílio de um sensor de umidade modelo GBReader, N 1535 (Measurement Engineering, Austrália) instalado no centro dos vasos a uma profundidade de 20cm. A reposição hídrica foi realizada com base nas leituras obtidas com o sensor e a água repostada até a capacidade de campo (CC). Esses cálculos foram realizados com o auxílio de uma planilha eletrônica, feita em função da curva de retenção de água do solo.

No pré-florescimento, dois tratamentos hídricos, sem (SD) e com deficiência hídrica (CD), foram impostos. No primeiro, a reposição hídrica foi realizada diariamente, até o solo atingir a umidade na CC, enquanto que, no segundo tratamento, a indução do estresse hídrico foi realizada diariamente aplicando-se 50% da água total disponível, ou seja, até o potencial da água no solo atingir aproximadamente o valor de -70 kPa. Esse estresse foi mantido por sete dias. Avaliações foram realizadas cinco dias após a imposição do estresse hídrico, no momento em que as plantas encontravam-se no florescimento pleno. A taxa de fotossíntese foliar (A), a condutância estomática (g_s), a transpiração foliar (T) e a eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s , $iWUE$) foram avaliadas através de um sistema portátil de trocas gasosas IRGA LI 6400 (Portable Photosynthesis System LICOR,

Nebraska, USA). As medidas foram feitas em uma área foliar de 6cm^2 , com um fluxo de ar na câmara de $1200\mu\text{mol s}^{-1}$ e uma intensidade de radiação fotossinteticamente ativa de $1500\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após cinco dias de imposição do estresse hídrico, foi estimado o teor de clorofila por leituras no SPAD ("Soil plant analysis development", Minolta SPAD 502 Osaka, Japan) e, em folhas adaptadas ao escuro, foi determinada a produção quântica máxima (relação F_v/F_m), a produção quântica basal dos processos fotoquímicos no fotossistema II (relação F_0/F_m) e a eficiência fotoquímica no fotossistema II (relação F_v/F_0), por meio de um fluorímetro (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments King's Lynn, UK). O acondicionamento das folhas foi realizado com a ajuda de cliques foliares e a intensidade de luz no sensor foi de 60% da capacidade total do aparelho durante cinco segundos em cada leitura. Todas as leituras foram realizadas no período da manhã, entre as 8:00 horas e as 10:00 horas, sempre na folha bandeira.

Os resultados relativos à fluorescência da clorofila (Tabela 1) revelaram a superioridade da linhagem L 29.1.1, na condição "com deficiência hídrica" (CD), sobretudo para as características de F_v/F_m e F_v/F_0 , que apresentaram valores maiores (0,634 e 1,783 respectivamente) em relação às linhagens L 2.3.2.1 e L 31.2.1.2. Por outro lado, essas duas linhagens tiveram valores superiores a L 29.1.1 na relação F_0/F_m . Na condição sem estresse hídrico (SD), não houve diferença entre as linhagens. Na média dos ambientes, as plantas sem deficiência hídrica foram significativamente superiores às plantas com deficiência em todos os parâmetros relativos à fluorescência da clorofila (Tabela 1).

Tabela 1. Produção quântica máxima (Fv/Fm), produção quântica basal dos processos fotoquímicos (F0/Fm), eficiência fotoquímica no fotosistema II (Fv/F0) em plantas de milho sem (SD) e com (CD) deficiência hídrica. Sete Lagoas, MG. 2008

Características ecofisiológicas						
Genótipos	Fv/Fm		F0/Fm		Fv/F0	
	SD	CD	SD	CD	SD	CD
L 2.3.2.1	0,682 a	0,546 a	0,314 a	0,453 b	2,203 a	1,223 a
L 29.1.1	0,692 a	0,634 b	0,307 a	0,359 a	2,346 a	1,783 b
L 31.2.1.2	0,679 a	0,536 a	0,317 a	0,470 b	2,154 a	1,145 a
Média ambientes	0,684 B	0,572 A	0,313 A	0,427 B	2,234 B	1,383 A
CV (%)	10,40		16,93		19,81	
Média geral	0,628		0,37		1,8	

Médias seguidas pela letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

Para a avaliação do teor de clorofila, através do SPAD, não foram detectadas diferenças estatísticas entre linhagens com e sem deficiência hídrica. No entanto, a média dos ambientes revelou superioridade significativa do ambiente sem deficiência hídrica (SD) (Tabela 2). Com relação à taxa fotossintética (A), não se observaram diferenças significativas nas linhagens submetidas a deficiência hídrica (CD), enquanto que, nas plantas sem deficiência hídrica (SD),

houve predominância significativa da linhagem L 29.1.1 sobre as demais. Na média dos ambientes, houve diferença na fotossíntese, sendo que o ambiente sem estresse (SD) foi significativamente maior (Tabela 2).

Tabela 2. Teor de clorofila através do SPAD e taxa de fotossíntese foliar A, assimilação em $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e em plantas de milho sem (SD) e com (CD) deficiência hídrica. Sete Lagoas, MG. 2008²

Características ecofisiológicas				
Genótipos	Clorofila - SPAD		A ($\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	
	SD	CD	SD	CD
L 2.3.2.1	39,93 a	32,41 a	32,26 a	10,07 a
L 29.1.1	40,30 a	35,11 a	41,18 b	11,59 a
L 31.2.1.2	46,85 a	38,45 a	38,58 a	9,18 a
Média ambientes	42,36 B	35,32 A	37,34 B	10,28 A
CV (%)	12,26		20,97	
Média geral	39,46		23,81	

Médias seguidas pela letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

Para a condutância estomática (gs), não foi possível detectar diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens, embora o ambiente sem deficiência hídrica (SD), na média, tenha superado o ambiente com deficiência hídrica (Tabela 3). A transpiração (T) no ambiente estressado não resultou em diferenças entre as linhagens, enquanto que, nas plantas sem deficiência hídrica a L 2.3.2.1, foi inferior em relação às demais. Na média dos ambientes, as plantas sem deficiência tiveram, significativamente, uma transpiração maior do que as plantas com deficiência (Tabela 3). Na eficiência intrínseca do uso da água (iWUE), também houve diferença significativa nas médias dos ambientes, tendo valores maiores no ambiente com deficiência hídrica. Para as plantas sem deficiência hídrica (SE), não houve diferenças entre as linhagens. Porém, nas plantas com deficiência hídrica (CD), as linhagens tolerantes à seca (L 29.1.1 e L 31.2.1.2) corresponderam a valores significativamente maiores na iWUE com relação à linhagem sensível (L 2.3.2.1) (Tabela 3).

O déficit hídrico como um fator de estresse pode causar ação inibitória na fase bioquímica da fotossíntese (XU et al., 2008). Sabendo-se que o

fotossistema II é responsável pelo fornecimento de energia para a fotossíntese, a avaliação de sua eficiência pode tornar-se um indicador da tolerância em plantas sob estresse de seca. A avaliação da fluorescência da clorofila é uma ferramenta positiva na caracterização das linhagens de milho na avaliação de danos causados pelo estresse hídrico, sendo a linhagem L 29.1.1 com maior eficiência fotoquímica no fotossistema II (Fv/Fm). Este é o principal parâmetro utilizado para avaliação dos danos no sistema fotossintético, indicando a eficiência fotoquímica do fotossistema II, quando todos os centros de reação estão abertos (BAKER; ROSENQVST, 2004). Embora a razão Fv/Fm normalmente decresça em plantas submetidas a algum tipo de estresse (KRAUSE; WEIS, 1991), em trigo, Hura et al. (2007) não observaram influência do déficit hídrico nesta relação, diferentemente de Xu et al. (2009), que detectaram mudanças na relação Fv/Fm em gramíneas (*Leymus chinensis*) sob deficiência hídrica. Já Rahman et al. (2004), estudando duas cultivares de milho, concluíram que o retardamento do crescimento desses genótipos sob seca foi devido à diminuição da eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm).

Tabela 3. Condutância estomática (gs em $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiração (T em $\mu\text{g cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) e eficiência intrínseca do uso da água (iWUE em $[(\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1})]$) em plantas de milho sem (SD) e com (CD) deficiência hídrica. Sete Lagoas, MG. 2008

Genótipos	Características ecofisiológicas					
	gs ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		T ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)		iWUE $[(\mu\text{mol CO}_2 (\text{mol H}_2\text{O})^{-1})]$	
	SD	CD	SD	CD	SD	CD
L 2.3.2.1	0,210 a	0,049 a	5,496 a	1,299 a	155,0 a	206,2 a
L 29.1.1	0,268 a	0,038 a	9,208 b	1,306 a	157,4 a	404,4 b
L 31.2.1.2	0,248 a	0,019 a	9,325 b	0,938 a	167,6 a	475,6 b
Média ambientes	0,242 B	0,035 A	8,009 B	1,181 A	160,0 A	362,0 B
CV (%)	37,26		31,66		26,00	
Média geral	0,139		4,59		261,0	

Médias seguidas pela letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

A imposição de 5 dias de estresse (deficiência hídrica) não foi capaz de levar a mudanças na concentração da clorofila. Em muitos casos, inclusive no milho, a deficiência hídrica leva a uma redução da clorofila (GRZESIAK et al., 2007). O teor de clorofila pode ser considerado uma característica secundária; em milho, seu aumento pode se associar com o rendimento da cultura (BETRÁN et al., 2003).

Nos ambientes com e sem deficiência hídrica, não ocorreram mudanças entre as linhagens nos parâmetros de taxa de fotossíntese, condutância estomática e transpiração. Entretanto, na eficiência intrínseca do uso da água (iWUE), as linhagens tolerantes (L 29.1.1 e L 31.2.1.2) se sobressaíram em relação à linhagem sensível (L 2.3.2.1) no ambiente com deficiência hídrica, mostrando-se mais tolerantes ao estresse hídrico devido à economia de água durante as trocas gasosas. Esta economia de água nas linhagens tolerantes pode ter ocorrido devido à menor condutância estomática (gs), porém não foram detectadas diferenças estatísticas na condutância.

A fotossíntese em plantas tipo C₄, como o milho, sob estresse hídrico tem sido pouco estudada (GHANNOUM, 2009). O milho sob uma deficiência hídrica moderada possui um decréscimo da fotossíntese que é devido à diminuição da condutância estomática, levando ao fechamento dos estômatos e à redução da transpiração. Contudo, em um estresse severo e prolongado, limitações não estomáticas (bioquímicas) começam a ocorrer (GRZESIAK et al., 2007). Diminuição da condutância e fotossíntese foram observadas por Xu et al. (2008) em uma variedade de milho chinesa sob deficiência hídrica. Hund et al. (2009) avaliaram a tolerância de híbridos ao déficit hídrico e observaram aumento na eficiência intrínseca do uso da água (iWUE). Segundo esses, autores o aumento na iWUE é um importante fator para os híbridos esquivarem-se do estresse.

Considerações finais

- Existem diferenças nas trocas gasosas e na fluorescência da clorofila que caracterizam as

linhagens tolerantes à seca em relação às linhagens sensíveis.

- As linhagens tolerantes à seca apresentaram maior eficiência no uso da água em comparação com a linhagem sensível.

- A linhagem L 29.1.1 apresentou maior eficiência no fotossistema II do que as linhagens L 2.3.2.1 e L 31.2.1.2.

Referências

- BAKER, N. R.; ROSENQVST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 55, p. 1607-1621, 2004.
- BANZIGER, M.; EDMEADES, G. O.; LAFITTE, H. R. Physiological mechanisms contributing to the increased N stress tolerance of tropical maize selected for drought tolerance. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 75, p. 223-233, 2002.
- BETRÁN, F. J.; BECK, D.; BANZIGER, M.; EDMEADES, G. O. Secondary traits in parental inbreds and hybrids under stress and non-stress environments in tropical maize. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 83, p. 51-65, 2003.
- DURÃES, F. O. M.; MAGALHÃES, P. C.; GAMA, E. E. G.; OLIVEIRA, A. C. Caracterização fenotípica de linhagens de milho quanto ao rendimento e à eficiência fotossintética. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, n. 3, p. 355-361, 2005.
- DUVICK, D. N. The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). **Advances in Agronomy**, New York, v. 86, p. 83-145, 2005.
- EDMEADES, G. O.; BOLANOS, J.; ELINGE, A.; RIBAUT, J. M.; BÄNZIGER, M.; WESTGATE, M. E. The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. In: WESTGATE, M. E.; BOOTE, K. J. (Ed.). **Physiology and modeling Kernel set in Maize**. Madison: CSSA, 2000. p. 43-73. (CSSA Special Publication, 29).
- GHANNOUM, O. C. photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, London, v. 103, p. 635-644, 2009.

GRZESIAK, M. T.; RZEPKA, A.; HURA, T.; HURA, K.; SKOCZOWSKI, A. Changes in response to drought stress of triticale and maize genotypes differing in drought tolerance. **Photosynthetica**, Prague, v. 45, p. 280-287, 2007.

HUND, A.; RUYA, N.; LIEDGENS, M. Rooting depth and water use efficiency of tropical maize inbred lines, differing in drought tolerance. **Plant and Soil**, The Hague, v. 318, p. 311-325, 2009.

HURA, T.; GRZESIAK, S.; HURA, K.; THIEMT, E.; TOKARZ, K.; DZONY, M. W. Physiological and biochemical tools useful in drought-tolerance detection in genotypes of winter triticale: accumulation of ferulic acid correlates with drought tolerance. **Annals of Botany**, London, v. 100, p. 767-775, 2007.

KIM, S-H.; SICHER, R. C.; BAE, H.; GITZ, D. C.; BAKER, J. T.; TIMLIN, D.; REDDY, V. R. Canopy photosynthesis, evapotranspiration, leaf nitrogen, and transcription profiles of maize in response to CO₂ enrichment. **Global Change Biology**, Oxford, v. 12, p. 588-600, 2006.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 313-349, 1991.

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

MONNEVEUX, P.; SANCHEZ, C.; BECK, D.; EDMEADES, G. O. Drought tolerance improvement in tropical maize source populations: evidence of progress. **Crop Science**, Madison, v. 46, p.180-191, 2006.

RAHMAN, M. U.; GUL, S.; AHMADI, I. Effects of water stress on growth and photosynthetic pigments of corn (*Zea mays* L.) cultivars. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 6, n. 4, p. 652-655, 2004.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ V., V. H. (Ed.). **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5a. aproximação**. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. 359 p.

SHAO, H.; CHU, L.; JALEEL, C. A.; ZHAO, C. Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, p. 215-225, 2008.

XU, Z.; ZHOU, G.; SHIMIZU, H. Are plant growth and photosynthesis limited by pre-drought following rewatering in grass? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 3737-3749, 2009.

XU Z. Z.; ZHOU G. S.; WANG Y. L.; HAN G. X.; LI, Y. J. Changes in chlorophyll fluorescence in maize plants with imposed rapid dehydration at different leaf ages. **Journal Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 27, p. 83-92, 2008.

WELCKER, C.; BOUSSUGE, B.; BENCIVENNI, C.; RIBAUT, M.; TARDIEU, F. Are source and sink strengths genetically linked in maize plants subjected to water deficit?: a QTL study of the responses of leaf growth and of Anthesis-Silking Interval to water deficit. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 58, p. 339-349, 2007.

Circular Técnica, 116

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 - Caixa Postal 151
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2009): 200 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino
Secretário-Executivo: Flávia Cristina dos Santos
Membros: Elena Charlotte Landau, Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana e Clenio Araujo

Expediente

Revisão de texto: Clenio Araujo
Normalização Bibliográfica: Rosângela L. de Castro
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa