

**Respostas Anatômicas,  
Fisiológicas e Enzimáticas em  
Linhagens de Sorgo Contrastantes  
a Seca sob Estresse Hídrico**



ISSN 1679-0154  
Julho 2016

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

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 135**

## **Respostas Anatômicas, Fisiológicas e Enzimáticas em Linhagens de Sorgo Contrastantes a Seca sob Estresse Hídrico**

Paulo César Magalhães  
Alyne Oliveira Lavinsky  
Thiago Correia de Souza  
Evaristo Mauro de Castro  
Leandro de Oliveira Lino

Embrapa Milho e Sorgo  
Sete Lagoas, MG  
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Milho e Sorgo**

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

[www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges

Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso

Campanha, Roberto dos Santos Trindade, Rosângela Lacerda de

Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Paulo César Magalhães

**1ª edição**

**Versão Eletrônica (2016)**

**Todos os direitos reservados**

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

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Milho e Sorgo**

---

Respostas anatômicas, fisiológicas e enzimáticas em linhagens de sorgo contrastantes a seca sob estresse hídrico / Paulo César Magalhães ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2016.

31 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 135).

1. *Sorghum bicolor*. 2. Resistência a seca. 3. Enzima. I. Magalhães, Paulo César. II. Série.

---

CDD 633.174 (21. ed.)

© Embrapa 2016

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introdução</b> .....	7
<b>Material e Métodos</b> .....	9
<b>Resultados e Discussão</b> .....	14
<b>Conclusões</b> .....	24
<b>Agradecimentos</b> .....	25
<b>Referências</b> .....	25

# **Respostas Anatômicas, Fisiológicas e Enzimáticas em Linhagens de Sorgo Contrastantes a Seca sob Estresse Hídrico**

---

*Paulo César Magalhães<sup>1</sup>*

*Alyne Oliveira Lavinsky<sup>2</sup>*

*Thiago Correia de Souza<sup>3</sup>*

*Evaristo Mauro de Castro<sup>4</sup>*

*Leandro de Oliveira Lino<sup>5</sup>*

## **Resumo**

A disponibilidade hídrica e a temperatura são os fatores climáticos de maior efeito sobre a produtividade agrícola. Com o objetivo de verificar adaptações anatômicas e fisiológicas em plantas de sorgo durante o florescimento e enchimento de grãos, linhagens de sorgo foram submetidas à condição de estresse hídrico por 12 dias em casa de vegetação. A imposição do estresse foi feita gradativamente até o potencial da água no solo atingir aproximadamente o valor de  $-100$  kPa. O delineamento foi inteiramente casualizado, em um

---

<sup>1</sup>Eng.-Agrôn., PhD Fisiologia dos estresses abióticos, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, Caixa Postal -151, CEP: 357701-970, Sete Lagoas, MG, paulo.magalhaes@embrapa.br

<sup>2</sup>Bolsista Pós-Doc Fapemig, Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 37701-970 Sete Lagoas, MG, alynelavinsky@gmail.com

<sup>3</sup>Biólogo, DSc, Fisiologia dos estresses abióticos, Professor na Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, thiagonepre@hotmail.com

<sup>4</sup>Eng.-Agrôn., DSc Anatomia de plantas, Professor na Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Caixa Postal 37, Campus Universitário, CEP 37200-000, emcastro@ufla.br

<sup>5</sup>Eng.-Agrôn., Aluno de pós graduação, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Caixa Postal 37, Campus Universitário, CEP 37200-000, leanlino@yahoo.com.br

fatorial 4x2x2, sendo quatro linhagens, duas tolerantes à seca, B35Tx642B, 9910032, e duas sensíveis, BR007B e BR001B, dois estádios fenológicos, florescimento e enchimento de grãos e dois sistemas de manejo, irrigado e estressado, totalizando 16 tratamentos com 3 repetições de um vaso cada, com duas plantas até o momento da coleta. As análises de anatomia, teor de clorofila e do sistema de defesa antioxidante foram realizadas na folha bandeira após o término da imposição do estresse hídrico, durante o período da manhã. Para a estatística foi utilizada a análise de variância e teste de comparação de médias Skott-Knott, a 5% de probabilidade. A linhagem tolerante à seca 9910032 reúne o maior número de atributos anatômicos e modificações que lhe permite suportar melhor a seca. A maior parte das modificações anatômicas ocorreu no primeiro feixe de maior diâmetro no mesófilo. Foi encontrada elevada atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) na linhagem B35Tx642B, que pode ser um indicativo de maiores produções de espécies reativas de oxigênio (EROs). Todas as linhagens de sorgo sofreram redução no conteúdo relativo de clorofila sob estresse hídrico.

**Palavras-chave** - *Sorghum bicolor*, tolerância à seca, catalase, peroxidases.

# **Anatomical, Physiological and enzymatic responses in Strains of Sorghum Contrasting to Drought under Water Stress**

*Paulo César Magalhães<sup>1</sup>*

*Alyne Oliveira Lavinsky<sup>2</sup>*

*Thiago Correia de Souza<sup>3</sup>*

*Evaristo Mauro de Castro<sup>4</sup>*

*Leandro de Oliveira Lino<sup>5</sup>*

## **Abstract**

The water availability and temperature are climatic factors of greatest effect on agricultural productivity. In order to check anatomical and physiological adaptations in sorghum plants during flowering and grain filling, sorghum lines were subjected to the condition of water stress for 12 days in a greenhouse. The imposition of stress was gradually made to the water potential in the soil approximately reach the value of -100 kPa. The design was completely randomized in a factorial 4x2x2, four strains, two drought tolerant, B35Tx642B, 9,910,032, and two sensitive, BR007B and BR001B in two phenological stages, flowering and grain filling and two management systems, irrigated and stressed, totaling 16 treatments with 3 repetitions of each vase, with two plants until the time of collection. Analyses of anatomy, chlorophyll content and antioxidant defense system were held in the flag leaf after the imposition of water stress during the morning. For statistical analysis was used variance and mean comparison test Skott-Knott, at 5% probability. The drought-tolerant strain 9910032 has the largest number of

anatomical attributes and modifications allowing it to cope better with drought. Most anatomical changes occurred in the larger diameter first beam in the mesophyll. Found high enzymatic activity of ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) in B35Tx642B strain that may be indicative of larger production of reactive oxygen species (ROS). All sorghum lines were reduced in relative chlorophyll content under water stress.

**Keywords** - *Sorghum bicolor*, drought tolerance, catalase, peroxidases.

## Introdução

Originário da África tropical, o sorgo (*Sorghum bicolor* (Moench) L.) é o cereal mais adaptado à seca, constituindo fonte de alimento para mais de 500 milhões de pessoas em 98 países (PENNIZI, 2009). No Brasil, esse cereal é tradicionalmente utilizado como matéria-prima para ração de animais, e, a partir do início da década de 1980, para fabricação de etanol (SCHAFFERT et al., 1980). O seu pequeno genoma (~ 720 pb) já foi completamente sequenciado e disponibilizado em bases de dados públicas (PATERSON et al., 2009). Posteriormente, a anotação completa de cada unidade de transcrição tornou-se um grande desafio não apenas para compreender a biologia desse cereal, mas também para desvendar como ele suporta a seca (PENNIZI, 2009). Hoje se sabe que o sorgo possui, além de traços estruturais e morfofisiológicos evolutivos que permitem aumentar a eficiência de uso da água, cópias extra de inúmeros genes associados com a adaptação à seca (PATERSON et al., 2009).



Atualmente, duas principais estratégias de adaptação à seca têm sido propostas, cada uma com suas especificidades: tolerância ou evitação (LOPES et al., 2011). Tolerância à seca é caracterizada pela manutenção contínua dos processos fisiológicos sob baixa disponibilidade hídrica. Espécies tolerantes à seca podem diminuir a cavitação do xilema (COCHARD et al., 2008; SOUZA et al., 2013) e a taxa de oxidação de macromoléculas pela diminuição/eliminação de espécies reativas de oxigênio (MITTLER, 2002) sem alterar as variáveis de trocas gasosas foliares (HORTA et al., 2014), podendo ainda acumular solutos para manter a turgescência celular em potenciais hídricos relativamente baixos (HORTA et al., 2014; MUTAVA et al., 2011). Evitação à seca, por sua vez, pode ser alcançada maximizando-se o acesso à água (UGA et al., 2013) e minimizando-se a sua perda para a atmosfera (SINGH; REDDY, 2011). Características associadas a essa segunda estratégia incluem alto investimento de biomassa para o sistema radicular, elevado comprimento radicular específico, pequena área foliar e controle estomático eficiente da transpiração. A opção por uma ou por outra estratégia adaptativa, entretanto, dependerá da capacidade da planta em ajustar o seu fenótipo de forma adequada e com certa velocidade.

A plasticidade fenotípica, definida como a capacidade de um genótipo produzir diferentes fenótipos sob diferentes condições ambientais (VALLADARES et al., 2000), raramente tem sido examinada juntamente a estratégias de adaptação à seca na cultura do sorgo; ainda nesse contexto, a relação entre a alocação de carbono e os traços de economia hídrica tem sido estudada, principalmente em órgãos localizados acima do solo, com particular ênfase para as folhas (LIU et al., 2010; DUGAS et al., 2011; MUTAVA et al., 2011). Segundo a teoria do

equilíbrio funcional (BROUWER, 1962), plantas aumentariam a alocação de biomassa para a parte aérea se o ganho de carbono for afetado por recursos limitantes acima do solo, como luz e CO<sub>2</sub>. Da mesma forma, as plantas aumentariam a alocação de biomassa para as raízes quando submetidas a baixos níveis de recursos abaixo do solo, ou seja, água e nutrientes (POORTER; NAGEL, 2000). Apesar dessa flexibilidade de alocação de biomassa para esse órgão de captura e armazenamento de recursos constituir ponto-chave na coordenação das modificações morfoanatômicas e fisiológicas na folha, em ambientes com baixa disponibilidade de água no solo (DAVIES; ZHANG, 1991), pouco se sabe sobre tal relação (FORT et al., 2012).

Cientes de que a adaptação ao déficit hídrico exige uma coordenação entre os órgãos da planta localizados acima e abaixo do solo (HAJEK et al., 2013), e sob déficit hídrico as estratégias adaptativas dos órgãos localizados abaixo do solo sobrepõem aquelas dos órgãos localizados acima (FORT et al., 2012).

O presente trabalho teve por objetivo identificar adaptações anatômicas e fisiológicas em linhagens de sorgo contrastantes a seca nos estádios de florescimento e enchimento de grãos.

## **Material e Métodos**

Sementes de sorgo foram semeadas em vasos de 20 litros. Quando as plantas atingiram o estágio de V3, foi feito um desbaste, permanecendo apenas duas plantas por vaso. Um solo tipo Latossolo Vermelho Distrófico Típico foi utilizado como substrato, sendo previamente corrigido com calcário e

adubado com NPK+ Zinco (8-28-16) na proporção de 50 g para cada 100 Kg de solo de acordo com a análise do solo, seguindo recomendação para a cultura no Estado de Minas Gerais.

No estágio de V8 a V12, foram feitas duas adubações de cobertura. O teor de água no solo foi monitorado diariamente nos períodos da manhã e tarde (9h e 15h), com auxílio de um sensor de umidade modelo GBReader, N 1535 (Measurement Engineering Austrália) instalado nas parcelas experimentais a uma profundidade de 20 cm.

A reposição hídrica através de irrigação foi realizada com base nas leituras obtidas com o sensor e a água foi repostada até a capacidade de campo (CC). Esses cálculos foram realizados com o auxílio de uma planilha eletrônica, feita em função da curva de retenção de água do solo.

As imposições dos tratamentos com estresse hídrico iniciaram-se quando 50% das plantas atingiram o estágio fenológico de florescimento e no enchimento de grãos, separadamente, com a duração de 12 dias. A reposição hídrica foi realizada diariamente até o solo atingir a umidade na CC, para a condição sem estresse enquanto, na condição de deficiência hídrica, a indução do estresse hídrico foi realizada diariamente repondo-se 50% da água total disponível, ou seja, até que o potencial da água no solo atingisse aproximadamente o valor de  $-100$  kPa (MAGALHÃES et al., 2009).

Os tratamentos foram dispostos em um esquema fatorial  $4 \times 2 \times 2$ , sendo duas linhagens de sorgo tolerantes: B35B35Tx642B, 9910032, e duas sensíveis: BR007B, BR001B, combinadas com dois estádios fenológicos de desenvolvimento (florescimento

e enchimento de grãos) e dois manejos (irrigado e estressado) em três repetições, o que totalizou 48 vasos dispostos no delineamento inteiramente casualizado. Dez dias após a imposição do estresse hídrico em cada tratamento as plantas foram avaliadas quanto a anatomia foliar, enzimas do sistema de defesa antioxidante e teor relativo de clorofila.

Para anatomia de folhas foram coletadas secções do terço médio foliar da folha bandeira, em seguida elas foram fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e etanol 70% (FAA<sub>70</sub>) (JOHANSEN, 1940), por 48 horas, e preservadas em etanol 70%. Secções transversais e paradérmicas foram feitas manualmente e com auxílio de micrótomo de mesa. Em seguida, os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio 5%, por 10 minutos, enxaguados três vezes com água destilada e corados com safrablau (solução de safranina e azul de astra 7,5:2,5), por fim, montados em lâminas com glicerina 50% (KRAUS; ARDUIN, 1997). As secções foram fotografadas em microscópio óptico de luz Olympus BX-60, acoplado a uma câmara digital.

Para cada repetição foi montada uma lâmina, com aproximadamente 5 cortes, dos quais foram fotografadas três imagens aleatoriamente. Nas secções paradérmicas nas faces adaxial e abaxial das folhas foi medida a densidade estomática (número de estômatos mm<sup>-2</sup>), índice estomático [(número de estômatos mm<sup>-2</sup>)/número de células epidérmicas]\*100, diâmetro polar dos estômatos, diâmetro equatorial e funcionalidade estomática (diâmetro polar/diâmetro equatorial).

No mesofilo foi avaliada a espessura da lamina foliar, o número de células buliformes por milímetro, a espessura da epiderme e cutícula.

Todas as medições para anatomia foram feitas pelo programa de análise de imagens UTHSCSA ImageTool (University of Texas, San Antonio, USA) utilizando-se calibrações feitas com régua microscópica fotografada nos mesmos aumentos das fotomicrografias.

O restante da folha bandeira coletada para anatomia foi envolvido em papel alumínio e mergulhado em nitrogênio líquido e, posteriormente, transferido para freezer, onde permaneceu a  $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até o momento das análises enzimáticas.

Para análise enzimática, 300 mg de folha foram macerados em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino. Em seguida, foi adicionado 0,9 mL de um tampão de extração constituído de 883,8  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato, 0,1M pH 6,8 EDTA 0,1M na quantidade de 9  $\mu\text{L}$ , DTT 0,5 M com 3,6  $\mu\text{L}$ , PMSF 0,1M na quantidade de 7,2  $\mu\text{L}$  e, ainda, 18 mg de PVPP (BOR et al., 2003). Após homogeneização, o extrato enzimático foi centrifugado a 14.000 g por 20 minutos, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , quando então o sobrenadante foi coletado, para realizar as determinações das atividades das enzimas oxidases, Peroxidase do Guaiacol (POD), Peroxidase do Ascorbato (APX) e Catalase (CAT).

A atividade de POD foi analisada com a adição de 990  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0 16,7  $\mu\text{L}$  de guaiacol 0,2 M, 13,3  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,03 M, em 20  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático adaptado de Nakano e Asada (1981). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento do aumento da absorvância a 470 nm por um minuto e trinta segundos, em intervalos de 15 segundos e calculada com base no fator de extinção de  $26,6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

A APX foi analisada com a adição de 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7, 16,0  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 0,01 M, 66  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,03 M em 120  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático adaptado de Nakano e Asada (1981). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento da queda da absorbância, a 290 nm, por um minuto e trinta segundos, em intervalos de 15 segundos, e calculada com base no fator de extinção de  $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Para quantificar a atividade de CAT, adicionou-se, aos 20  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0 e 417  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,0125 M dissolvido no tampão adaptado de Madhusudhan et al. (2003). A atividade enzimática foi determinada pelo acompanhamento da queda da absorbância a 240 nm, por um minuto e trinta segundos, em intervalos de 15 segundos, e calculada com base no fator de extinção de  $36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

O teor de clorofila foi feito nas plantas durante o estágio de florescimento e enchimento de grãos, por meio de um clorofilômetro portátil da *Soil plant analysis development* (SPAD) (Minolta SPAD 502 Osaka, Japan). As medições foram feitas na folha bandeira, cada repetição foi amostrada com uma média de seis leituras por repetição, sendo cada repetição composta de duas plantas por vaso.

Para análise estatística dos dados foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias Skott-Knott, a 5% de probabilidade, no programa Sisvar versão 4.3 (FERREIRA, 2000). Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk. As variáveis foram transformadas para raiz quadrada de  $(x+1)$  e  $\log(x)$ .

## Resultados e Discussão

### Anatomia Foliar

Para a espessura da epiderme, da cutícula e número de estômatos não houve interações entre os genótipos, estádios e manejos (Tabela 1). As linhagens não apresentaram diferenças quanto à espessura da epiderme na face adaxial, mas apresentaram diferenças na espessura da cutícula em ambas as faces, sendo as linhagens tolerantes à seca B35Tx642B e 9910032 e a sensível BR 001B as que apresentaram maior espessura na face adaxial. O número de estômatos foi maior na face abaxial da linhagem B35Tx642B, e na face adaxial quando comparado com as linhagens sensíveis, que foram aquelas com menor número de estômatos em ambas as faces (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros mensurados nas secções paradérmicas da face abaxial e adaxial de linhagens de sorgo sob estresse hídrico.

Linhagens	EE ( $\mu\text{m}$ )		EC ( $\mu\text{m}$ )		NE	
	FAB	FAD	FAB	FAD	FAB	FAD
BR001B	52,79a	59,1a	12,13a	11,72b	8,00c	6,00b
BR007B	49,21b	56,70a	9,42b	10,68b	10,00b	6,00b
9910032	57,03a	61,46a	14,20a	14,05a	11,00b	9,00a
B35Tx642B	48,51b	55,63a	13,44a	13,73a	14,00a	8,00a

EE - Espessura da epiderme, EC - Espessura da cutícula, NE - Número de estômatos, FAB - Face abaxial, FAD - Face adaxial.

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Não houve interações entre genótipo e manejo para o diâmetro polar, e diâmetro equatorial, funcionalidade e índice estomático,

porém houve nessas características diferenças entre as linhagens (Tabela 2).

**Tabela 2.** Parâmetros mensurados nas seções paradérmicas da face abaxial e adaxial de linhagens de sorgo sob estresse hídrico.

Linhagens	DP		DE		F		IE %	
	FAB	FAD	FAB	FAD	FAB	FAD	FAB	FAD
BR001B	76,33a	69,18a	15,14a	13,81a	5,14b	5,18b	14,75b	10,19b
BR007B	69,05b	65,39b	12,97b	12,34b	5,46b	5,39b	15,94b	8,56b
9910032	67,80b	62,67b	12,49b	12,08b	5,46b	5,26b	14,38b	11,98a
B35Tx642B	76,36a	69,22a	11,70b	11,84b	6,73a	6,07a	17,96a	10,86a

DP - Diâmetro Polar, DE - Diâmetro equatorial, F - Funcionalidade, IE - Índice estomático

FAB - Face abaxial, FAD - Face adaxial.

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na linhagem B35Tx642B e BR 001B foram encontrados o maior diâmetro polar, em ambas as faces, o que explica sua maior funcionalidade estomática, que é a razão entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial (Tabela 2).

O número de estômatos e células epidérmicas por unidade de área é a base para a determinação do índice estomático (IE), que representa o investimento da planta na produção de estômatos em relação ao total de células epidérmicas (CASTRO et al., 2009).

A espessura da epiderme parece ser uma característica genotípica sendo pouco influenciada pelo ambiente. Já a cutícula, uma estrutura mais dinâmica, responde às mudanças



nas condições ambientais, permitindo que o vegetal se adapte as condições adversas.

A epiderme mais espessa pode conferir redução na perda de água pela imposição de uma barreira física maior à transpiração. Ristic e Jenks (2002), ao estudarem a espessura da epiderme e cutícula em linhagens de milho *Zea mays*, sob estresse hídrico no estágio vegetativo, observaram que linhagens com epiderme e cutícula mais espessas perdem menos água que linhagens com parede e cutícula fina.

A cutícula também desempenha um papel fundamental na perda de água. Cutículas mais espessas refletem adaptações a ambientes com baixa disponibilidade hídrica, pois a espessura da cutícula é inversamente proporcional às perdas de água por transpiração quando estômatos estão fechados (JENKS et al., 1994; RISTIC; JENKS, 2002).

A maior quantidade de estômato na face abaxial nas folhas de sorgo permite maior eficiência no uso da água. Muchow e Sinclair (1989), ao estudarem a perda de água pela condutância epidérmica em linhagens de sorgo, relatam que a variação da condutância epidérmica em genótipos de sorgo não está relacionada ao comprimento do poro estomático, que variou com o genótipo e com a profundidade dos estômatos.

O poro estomático ou complexo estomático varia de acordo com o diâmetro polar e equatorial; esses dois fatores estão diretamente ligados com a funcionalidade estomática. Do ponto de vista adaptativo, genótipos com maior diâmetro polar e menor diâmetro equatorial são mais funcionais e permitem

ao vegetal uma eficiência maior nos processos de abertura e fechamento estomático.

Melo et al. (2007), ao estudarem alterações anatômicas e fisiológicas em setária e paspalum sob condições de déficit hídrico, encontraram para setária diminuição do diâmetro polar dos estômatos da epiderme adaxial e, para paspalum, diminuição nos diâmetros polar e equatorial na epiderme da face abaxial e aumento no diâmetro equatorial dos estômatos na epiderme da face adaxial.

Tanto a funcionalidade quanto o índice estomático são características que podem ser relacionadas com a otimização da captação de CO<sub>2</sub> pelas folhas, pois estômatos mais funcionais permitem a captação desse gás de forma mais eficiente, ou seja, sem grandes perdas de água em decorrência do tempo gasto no processo de abertura e fechamento deles (PEREIRA, 2008).

Sob manejo irrigado não houve diferenças quanto à espessura do limbo entre as linhagens, porém, as linhagens tolerantes foram as únicas que apresentaram aumento e redução na espessura do limbo, sob mudança de manejo irrigado para estressado (Tabela 3).

Sob irrigação, as linhagens sensíveis à seca BR001B e BR007B apresentam maior densidade de células buliformes por milímetro do que as linhagens tolerantes à seca 9910032 e B35Tx642B, sendo BR001B com 37% mais células buliformes quando comparada a 9910032. Por outro lado, sob estresse hídrico, BR007B apresentou a menor média de células buliformes, enquanto BR001B permaneceu com a maior média.

A linhagem 9910032 foi a única com aumento significativo no número de células buliformes, da ordem de 35,63%, quando comparada na condição irrigada e estressada, (Tabela 3).

**Tabela 3.** Parâmetros mensurados nas secções transversais de linhagens de sorgo com e sem estresse hídrico.

Linhagens	NCB/mm		EL ( $\mu\text{m}$ )		DFV ( $\mu\text{m}$ )	
	I	E	I	E	I	E
BR001B	36 aA	39 aA	70,82 aA	68,17 cA	136,58 bA	143,15 aA
BR007B	26 bA	29 bA	96,97 aA	88,48 bA	169,89 aA	150,32 aB
9910032	23 cB	35 aA	103,12 aA	65,12 cB	94,98 cA	86,00 bA
B35Tx642B	23 cA	30 bA	83,97 aB	140,05 aA	124,82 bA	131,81 aA

NCB - Número de células buliformes, EL - Espessura do limbo, DFV - Distância entre feixes vasculares na nervura central.

I - Irrigado, E – Estressado.

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A literatura relata o aumento da espessura do mesofilo e redução da área foliar em condições de elevada incidência luminosa como adaptação a alta intensidade luminosa. Pouca informação se tem a respeito de modificações na espessura do mesofilo em plantas sob estresse hídrico. Melo et al. (2007) verificaram que variações na espessura do limbo foliar dependem da espécie estudada.

A maior espessura do limbo pode contribuir no aumento do número de cloroplastos e, conseqüentemente, com o aumento da fotossíntese, pois a atividade fotossintética está diretamente ligada ao número de cloroplastos (PIMENTEL, 1998).

## Enzimas do Estresse Oxidativo

A atividade enzimática das enzimas peroxidase do ascorbato (APX) foi maior nas linhagens BR007B e B35Tx642B, enquanto a linhagem BR001B apresentou a menor atividade enzimática para APX (Tabela 4).

**Tabela 4.** Atividade de enzimas do sistema antioxidante em linhagens de sorgo contrastantes à seca.

Linhagens	APX	CAT	POD
	mM Ascorbato min <sup>-1</sup> /mg prot.	mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .min <sup>-1</sup> /mg.prot.	mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . min <sup>-1</sup> /mg.prot.
BR001B	0,362 b	0,028 b	0,078 a
BR007B	1,256 a	0,058 b	0,092 a
9910032	0,699 b	0,058 b	0,077 a
B35Tx642B	1,123 a	0,134 a	0,091 a

APX - peroxidase do ascorbato; CAT – catalase; POD - peroxidase do guaiacol

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para a atividade da enzima catalase (CAT), a linhagem tolerante à seca B35Tx642B foi a que apresentou maior atividade enzimática, da ordem de 79.10% mais atividade que as demais linhagens. Não houve diferenças estatísticas para a atividade da enzima peroxidase do guaiacol (POD) entre as linhagens (Tabela 4).

A enzima ascorbato peroxidase (APX) está presente em quase todos os compartimentos celulares e apresenta importância fundamental nos cloroplastos onde a enzima Catalase (CAT) não está presente. Além disso, a APX e a CAT apresentam diferenças na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em razão das suas diferentes afinidades. Como a APX tem um K<sub>m</sub> da ordem de μM e a CAT da ordem de mM, a APX atua mais na modulação refinada das EROs para

a sinalização e a CAT na remoção do excesso de EROs gerado durante o estresse (MITTLER, 2002).

Pereira et al. (2010), ao estudarem a atividade enzimática e as modificações anatômicas em dezoito ciclos de seleção de milho para tolerância ao alagamento, observaram que a atividade enzimática da APX aumentou entre o primeiro e último ciclo, ao contrário do observado para atividade da CAT e POD. Madhusudhan et al. (2003) consideram que a APX tem uma maior eficiência para decompor  $H_2O_2$ , mesmo em menores proporções.

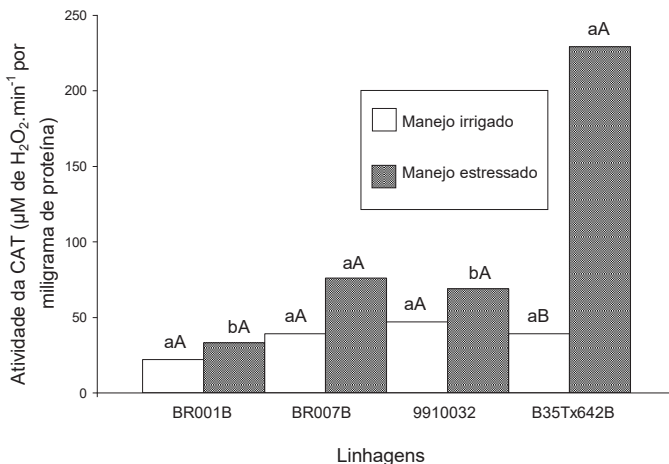
Djanaguirama et al. (2010), ao estudarem os efeitos do selênio em sorgo, na atividade de enzimas antioxidantes sob estresse de elevadas temperaturas, relatam que este estresse diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes SOD, POD e CAT, além de reduzir o teor de clorofila e a taxa de fotossíntese. Nos tratamentos com selênio, houve um aumento da atividade das enzimas antioxidantes e diminuição das espécies reativas de oxigênio (ERO).

Chai et al. (2010) verificaram, em plantas submetidas a estresse salino, que a atividade da CAT e POD aumentou em brotos e raízes enquanto a glutathione redutase (GR) diminuiu.

A ausência de atividade da POD nas condições desse experimento pode ser justificada pela eficiência das enzimas APX e CAT e pela localização dessas enzimas. Outro fator que pode ter contribuído é a presença de grandes quantidades de compostos fenólicos em sorgo que também atuam na defesa antioxidante. Kin et al. (2010), ao compararem *in vitro* a atividade antioxidante de extratos de sorgo, milho e painço,

verificaram que o extrato de sorgo continha grande quantidade de compostos fenólicos, bem como um alto nível de atividade antioxidante em comparação com milho e painço.

Apenas para a enzima catalase (CAT) houve interação entre os genótipos e o manejo, sendo que, sob o manejo irrigado, não houve diferenças estatísticas entre as linhagens na atividade enzimática dessa enzima. Em condição de manejo estressado, a maior atividade foi encontrada em B35Tx642B, com uma atividade de 85,59% maior em relação a BR001B. Além disso, B35Tx642B foi a única linhagem que apresentou aumento significativo na atividade enzimática da CAT sob estresse, quando comparada com a condição irrigada, sendo que esse aumento foi da ordem de 82.97%, (Figura 1).



**Figura 1.** Atividade enzimática CAT em linhagens de sorgo sob manejo irrigado e estressado.

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas entre os genótipos e maiúsculas entre os manejos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Existem muitos trabalhos publicados sobre estresse oxidativo e a atividade enzimática de limpeza de espécies reativas de oxigênio (EROs) em diversas culturas e nos mais variados tipos de estresse, seja biótico ou abiótico, porém pouco se sabe com relação à cultura do sorgo sob restrição hídrica em estádios reprodutivos.

O aumento significativo da atividade da CAT sob estresse hídrico na linhagem B35Tx642B mostra uma maior atividade dessa enzima no sistema de limpeza contra a ação das EROs, além de fornecer indícios de um eficiente mecanismo de tolerância à seca. Por outro lado, a maior atividade dessa enzima poderia denotar uma suscetibilidade estrutural maior à produção de (EROs).

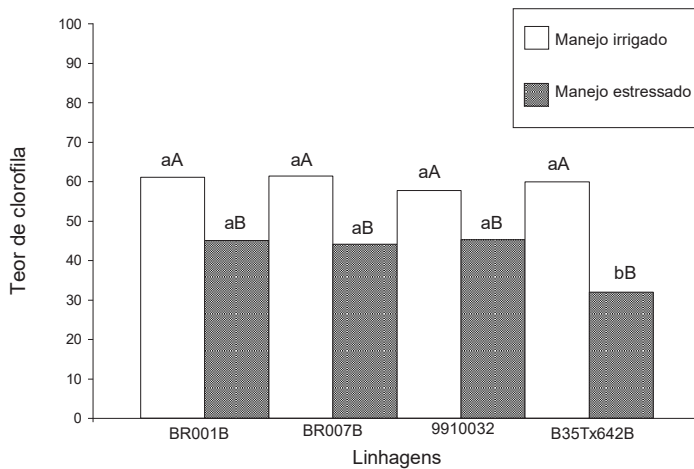
Bian e Jiang (2009), ao investigarem a acumulação de espécies reativas de oxigênio e atividade das enzimas antioxidantes em *Poa pratensis* (L.) sob estresse hídrico, verificaram um aumento da atividade da APX em folhas e atividade da CAT na raiz. Em *Cleome spinosa* (C3) a expressão do gene para atividade da enzima CAT nos peroxissomos foi correlacionada à atividade da CAT, mas para *Cleome gynandra* (C4) não houve correlação aos 10 dias de restrição hídrica, mesmo assim a restrição hídrica foi capaz de causar aumento na atividade das enzimas POD, CAT e APX (UZILDAY et al., 2012).

A atividade enzimática no enchimento de grão, no presente estudo, não foi avaliada, pois as plantas não resistiram à restrição hídrica imposta neste estágio fenológico.

## Teor Relativo de Clorofila

De todas as características avaliadas, o teor de clorofila foi a que apresentou diferenças estatísticas entre linhagens, estádios e manejos, além de apresentar interação para todas essas características.

Sob irrigação, não houve diferenças entre as linhagens, porém, em condição de estresse hídrico, a linhagem B35Tx642B foi a que apresentou o menor teor de clorofila, com 29,41% menos quando comparada a 9910032, que apresentou o maior teor de clorofila. Todas as linhagens apresentaram redução no teor de clorofila quando comparadas entre o manejo irrigado e estressado (Figura 2).



**Figura 2.** Teor de clorofila, em linhagens de sorgo sob manejo irrigado e estressado.

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas entre os genótipos e maiúsculas entre os manejos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



O menor teor de clorofila foi encontrado na linhagem B35Tx642B sob estresse. Esse menor teor pode indicar maior eficiência no uso da clorofila e uma economia com relação ao uso do nitrogênio. Porém é importante ressaltar que o desempenho fotossintético de genótipos não depende apenas da quantidade de clorofila, mas da captura e transferência de energia luminosa e de sua conversão em energia química.

Mutava et al. (2011), com o objetivo de identificarem características fisiológicas em 300 raças diferentes de sorgo para tolerância à seca, encontraram grande diversidade fisiológica para o conteúdo de clorofila, sendo que as linhagens-élites registraram maiores valores para o conteúdo relativo de clorofila (57,8), quando comparadas com os genótipos de Guiné, os quais resultaram em valores de 55,5.

Elevadas temperaturas e condições de estresse hídrico reduzem o conteúdo de clorofila (DJANAGUIRAMANA et al. 2010). Estudos realizados por Magalhães et al. (2009) para o teor relativo de clorofila em linhagens de milho contrastantes à seca, utilizando o clorofilômetro, não detectaram diferenças significativas entre as linhagens com e sem restrição hídrica, no entanto, a média dos ambientes revelou superioridade significativa do ambiente sem deficiência hídrica.

## **Conclusões**

As linhagens tolerantes à seca 9910032 e B35Tx642B reúnem maiores atributos anatômicos e adaptações que lhes permitem suportar melhor a seca. A elevada atividade enzimática da APX e CAT na linhagem B35Tx642B sugere maiores produções de EROs nessa espécie.

Todas as linhagens de sorgo estudadas nesse trabalho sofreram redução no conteúdo relativo de clorofila sob estresse hídrico. O maior conteúdo relativo de clorofila não parece estar relacionado com a maior espessura do mesofilo.

## Agradecimentos

À Fapemig pela aprovação do projeto que originou esta pesquisa.

## Referências

BIAN, S.; JIANG, Y. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, n. 2, p. 264-270, 2009.

BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, Limerick, v. 164, p. 77-84, 2003.

BROUWER, R. Distribution of dry matter in the plant. **Netherlands Journal of Agricultural Sciences**, v. 10, p. 399-408, 1962.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CHAI, Y. Y.; JIANG, C. D.; SHI, L.; SHI, T. S.; GU, W. B. Effects of exogenous spermine on sweet sorghum during germination

under salinity. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 1, p. 145-148, 2010.

COCHARD, H.; BARIGAH, S. T.; KLEINHENTZ, M.; ESHEL, A. Is xylem cavitation resistance a relevant criterion for screening drought resistance among *Prunus* species? **Plant Physiology**, Bethesda, v. 165, p. 976-82, 2008.

DAVIES, W. J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 55-76, 1991.

DJANAGUIRAMANA, M.; PRASADA, P. V. V.; SEPPANENB, M. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 999-1007, 2010.

DUGAS, D. V.; MONACO, M. K.; OLSEN, A.; KLEIN, R. R.; KUMARI, S.; WARE, D.; KLEIN, P. E. Functional annotation of the transcriptome of *Sorghum bicolor* in response to osmotic stress and abscisic acid. **BMC Genomics**, v. 12, p. 514, 2011.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000. 66 p.

FORT, F.; JOUANY, C.; CRUZ, P. Root and leaf functional trait relations in Poaceae species: implications of differing resource-acquisition strategies. **Journal of Plant Ecology**, v. 2, p. 1-9, 2012.

JENKS, M. A.; JOLY, R.; PETERS, P. J.; RICH, P. J.; AXTELL, J. D.; ASHWORTH, E. N. Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Plant Physiology**, Washington, v. 105, p. 1239-1245, 1994.

HAJEK, P.; HERTEL, D.; LEUSCHNER, C. Intraspecific variation in root and leaf traits and leaf-root traits linkages in eight aspen demes (*Populus tremula* and *P. tremuloides*). **Plant Science**, Limerick, v. 4, p. 1-11, 2013.

HORTA, L. P.; BRAGA, M. R.; LEMOS-FILHO, J. P.; MODOLO, L. V. Organ-coordinated response of early-post-germination mahogany seedlings to drought. **Tree Physiology**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 355-366, 2014.

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

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mcgraw-Hill Book, 1940. 523 p.

KIM, J.; HYUN, T. K.; KIM, M. Anti-oxidative activities of sorghum, foxtail millet and proso millet extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 18, p. 2683-2690, 2010.

LIU, G.; FRESCHER, G. T.; PAN, X.; CORNELISSEN, J. H. C.; LI, Y.; DONG, M. Coordinated variation in leaf and root traits across multiple spatial scales in Chinese semi-arid and arid ecosystems. **New Phytologist**, v. 188, p. 543-553, 2010.

LOPES, M. S.; ARAUS, J. L.; VAN HEERDEN, P. D. R.; FOYER, C. H. Enhancing drought tolerance in C4 crops. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3135-3153, 2011.

MADHUSUDHAN, R.; ISHIKAWA, T.; SAWA, Y.; SHIGEOKA S.; SHIBATA, H.. Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 117, p. 550-557, 2003.

MAGALHÃES, P. C.; SOUZA, T. C.; ALBUQUERQUE, P. E.; KARAM, D.; MAGALHÃES, M. M.; CANTÃO, F. R. O. Caracterização ecofisiológica de linhagens de milho submetidas a baixa disponibilidade hídrica durante o florescimento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 8, n. 3, p. 223-232, 2009.

MELO, H. C.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; ALVES, J. D. 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.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 601-639, 2002.

MUTAVA, R. N.; PRASSAD, P. V. V.; TUINSTRA, M. R.; KOFOID, K. D.; YU, J. Characterization of sorghum genotypes for traits related to drought tolerance. **Field Crops Research**, Warwick, v. 123, n. 1, p. 10-18, 2011.

MUCHOW, R. C.; SINCLAIR, T. R. Epidermal conductance, stomatal density and stomatal size among genotypes of

*Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 425-431, 1989.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplast. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

PATERSON, A. H.; BOWERS, J. E.; BRUGGMANN, R.; DUBCHAK, I.; GRIMWOOD, J.; GUNDLACH, H.; HABERER, G.; HELLSTEN, U.; MITROS, T.; POLIAKOV, A.; SCHMUTZ, J.; SPANNAGL, M.; TANG, H.; WANG, X.; WICKER, T.; BHARTI, A. K.; CHAPMAN, J.; FELTUS, F. A.; GOWIK, U.; GRIGORIEV, I. V.; LYONS, E.; MAHER, C. A.; MARTIS, M.; NARECHANIA, A.; OTILLAR, R. P.; PENNING, B. W.; SALAMOV, A. A.; WANG, Y.; ZHANG, L.; CARPITA, N. C.; FREELING, M.; GINGLE, A. R.; HASH, T.; KELLER, B.; KLEIN, P.; KRESOVICH, S.; MCCANN, M. C.; MING, R.; PETERSON, D. G.; RAHMAN, M.; WARE, D.; WESTHOFF, P.; MAYER, K. F. X.; MESSING, J.; ROKHSAR, D. S. The sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. **Nature**, London, v. 457, p. 551-556, 2009.

PENNIZI, E. How sorghum withstands heat and drought. **Science**, Washington, v. 323, n. 5914, p. 573, 2009.

PEREIRA, F. J. **Caracterização das modificações morfo-anatômicas e bioquímicas, em ciclos de seleção do milho saracura, para tolerância ao encharcamento do solo**. 2008. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

PEREIRA, F. J.; MAGALHÃES, P. C.; SOUZA, T. C.; CASTRO, E. M.; ALVES, J. D. Atividade do sistema antioxidante e

desenvolvimento de aerênquima em raízes de milho 'Saracura'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 5, p. 450-456, 2010.

PIMENTEL, C. **Metabolismo do carbono na agricultura tropical**. 9. ed. Seropédia : Edur, 1998. 150 p.

POORTER, H.; NAGEL, O. The role of biomass allocation in the growth responses of plants to different levels of light, CO<sub>2</sub> and water: a quantitative review. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 27, p. 595-607, 2000.

RISTIC, Z.; JENKS, M. A. Leaf cuticle and water loss in maize lines differing in dehydration. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 159, n. 6, p. 645-651, 2002.

SCHAFFERT, R. E.; BORGONOV, R. A.; SANTOS, F. G. Sweet sorghum for ethanol production in Brazil. **Agronomy Abstracts**, Madison, p. 128, 1980.

SINGH, S. K.; REDDY, K. R Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) under drought. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, Lausanne, v. 105, p. 40-50, 2011.

SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C.; CASTRO, E. M.; ALBUQUERQUE, P. E. P.; MARABESI, M. A. The influence of ABA on water relation, photosynthesis parameters, and chlorophyll fluorescence under drought conditions in two maize hybrids with contrasting drought resistance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 515-527, 2013.

UGA, Y.; SUGIMOTO, K.; SATOSHI OGAWA, S.; RANE, J.; ISHITANI, M.; HARA, N.; KITOMI, Y.; INUKAI, Y.; ONO, K.; KANNO, N.; INOUE, H.; TAKEHISA, H.; MOTOYAMA, R.; NAGAMURA, Y.; WU, J.; MATSUMOTO, T.; TAKAI, T.; OKUNO, K.; YANO, M. Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases rice yield under drought conditions. **Nature Genetics**, New York, v. 45, p. 1097-1105, 2013.

UZILDAY, B.; TURKAN, I.; SEKMEN, A. H.; OZGUR, R.; KARAKAYA, H. C. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. **Plant Science**, Limerick, v. 182, p. 59-710, 2012.

VALLADARES, F.; WRIGHT, S. J.; LASSO, E.; KITAJIMA, K.; PEARCY, R. W. Plastic phenotypic response to light of 16 congeneric shrubs from a Panamanian rainforest. **Ecology**, Tempe, v. 81, p. 1925-1936, 2000.



