



**FERNANDO RODRIGO DE OLIVEIRA CANTÃO**

**CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE  
LINHAGENS DE MILHO PARA TOLERÂNCIA À SECA  
CULTIVADAS EM DOIS REGIMES HÍDRICOS**

**LAVRAS-MG  
2021**

**FERNANDO RODRIGO DE OLIVEIRA CANTÃO**

**CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE LINHAGENS DE MILHO PARA  
TOLERÂNCIA À SECA CULTIVADAS EM DOIS REGIMES HÍDRICOS**

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.

PhD. Paulo César Magalhães  
(Orientador)

Dr. Evaristo Mauro Castro  
(Co-orientador)

**LAVRAS-MG**

**2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Cantão, Fernando Rodrigo de Oliveira.

Características morfofisiológicas de linhagens de milho para  
tolerância à seca cultivadas em dois regimes hídricos / Fernando  
Rodrigo de Oliveira Cantão. - 2021.

70 p.

Orientador(a): Paulo César Magalhães.

Coorientador(a): Evaristo Mauro Castro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Morfofisiologia. 2. Estresse Hídrico. 3. Milho. I. Magalhães,  
Paulo César. II. Castro, Evaristo Mauro. III. Título.

**FERNANDO RODRIGO DE OLIVEIRA CANTÃO**

**CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE LINHAGENS DE MILHO PARA  
TOLERÂNCIA À SECA CULTIVADAS EM DOIS REGIMES HÍDRICOS**

**MORPHOPHYSIOLOGICAL TRAITS OF DROUGHT TOLERANT INBRED LINES  
GROWN UNDER TWO WATER REGIMES**

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 15 de Dezembro de 2021.

Prof. Dr. Evaristo Mauro Castro - UFPA

Dr. Frederico Ozanan Machado Durães - Embrapa Milho e Sorgo

Prof. Dr. Thiago Souza Corrêa - UNIFAL

Dr<sup>a</sup>. Daniele Maria Marques - UNIFAL

PhD, Paulo César Magalhães - Embrapa Milho e Sorgo  
Orientador

**LAVRAS-MG**

**2021**

*Às mulheres de minha vida: Maria José, minha mãe, minhas tias Rosarinha e Flávia, minha amada Lilian, e minhas irmãs Fabiane e Franciane, ao meu tio Dr. Antônio Carlos de Oliveira e a meus amigos e eternos mestres Dr. Paulo César Magalhães e Dr. Frederico Ozanan Machado Durães, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Exemplo de caráter, respeito e profissionalismo.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar presente durante minha caminhada!

A meus grandes amigos, confidentes e incentivadores Dr. Paulo César Magalhães, Dr. Frederico Ozanan Machado Durães e Dr. Antônio Carlos de Oliveira pelo exemplo de vida, orientação, confiança, incentivo e força durante meu mestrado e doutorado, e muitas fases de minha vida pessoal e profissional (meus eternos MESTRES). Exemplos de caráter, profissional e ético! Obrigado pelo apoio incondicional de sempre! Vocês tornaram essa conquista realidade, não tenho palavras para descrever minha gratidão!

Ao Professor Dr. Evaristo Mauro pela confiança, amizade e acolhida no Setor de Botânica Aplicada, tornando o início possível e essa conquista uma realidade.

Ao meu colega de curso e amigo Vinicius Politi, pela contribuição nas análises anatômicas e sugestões na redação desse material, muito obrigado!

À minha colega de curso Dra. Daniele Maria Marques pelo apoio no planejamento dos experimentos, coletas de amostras e avaliações, meu muito obrigado!

Ao amigo de longa data, Dr. Lauro José Guimarães pela confiança, seleção e fornecimento das linhagens para condução desses experimentos.

Ao meu grande amigo Reinaldo Vasco, sempre me auxiliando no necessário para instalação, condução, avaliações de meus experimentos. Gratidão por compartilhar comigo bons momentos!

Ao eterno Geraldinho (*in memoriam*) amigo de longa data, pessoa que através do seu jeito único de ser, tornava cada desafio mais suave! Sua partida prematura deixou muitas saudades, mas jamais será esquecido!

Aos pesquisadores e amigos do Milho e Sorgo Israel Alexandre, Ivanildo Evódio Marriel, Décio Karan e Ivan Cruz, vocês fazem parte de minha história! Gratidão pelo auxílio na minha evolução profissional e pessoal.

À meu grande amigo Dr. Thiago Corrêa Souza pela prontidão de sempre, e por nunca medir esforços em me ajudar, minha eterna gratidão.

Ao Gilberto Cambraia, amigo de longa data, obrigado por todo zelo e dedicação decisiva no sucesso da preparação, instalação condução e avaliações do nosso campo de multiplicação de sementes e experimentos, minha gratidão!

Ao Eduardo Elias de Faria, técnico do Núcleo de Recursos Genéticos e Cultivares pela assistência no pré plantio, plantio e colheita mecanizada do experimento de campo.

À Universidade Federal de Lavras e todos os professores do Programa de Pós Graduação em Botânica Aplicada, e à Embrapa Milho e Sorgo pelo suporte financeiro, pessoal e transferência de conhecimento, meu muito obrigado por tornarem realidade a conclusão desse curso!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001, e agradeço pela concessão de bolsa de estudos e pelo auxílio no desenvolvimento do projeto.

*“A vida irrefletida não vale a pena ser vivida” Sócrates*

## RESUMO GERAL

As plantas são expostas a vários estresses ambientais durante o seu crescimento e desenvolvimento em condições naturais e agrícolas. Entre eles, o estresse hídrico é um dos mais severos. Considerando a hipótese de que o milho apresenta grande variabilidade para caracteres secundários em resposta ao estresse hídrico, esses poderão auxiliar na seleção de genótipos tolerantes ao estresse hídrico, uma vez que apresentam alta herdabilidade. Foram conduzidos dois experimentos com seis linhagens, com diferentes backgrounds genéticos para eficiência no uso da água (*EUA*), pertencentes ao programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo em condições de casa de vegetação e campo, para avaliar os efeitos do estresse hídrico sobre suas características morfofisiológicas. As variáveis resposta avaliadas foram fluorescência da clorofila, trocas gasosas (somente para o experimento em casa de vegetação), anatomia foliar e rendimento de grãos (somente para o experimento em campo), em dois diferentes regimes hídricos (capacidade de campo e 50% da disponibilidade de água no solo). Em condição de casa de vegetação, as linhagens tolerantes apresentaram maior eficiência do PSII e menores valores de fotossíntese e transpiração, levando a uma maior *EUA* desses genótipos. A anatomia foliar das linhagens tolerantes apresentaram alterações significativas e positivas, sem efeito sobre a capacidade fotossintética em condições de estresse hídrico. Os dados de anatomia e fotossíntese indicam que as linhagens tolerantes ao estresse hídrico utilizaram de ajustes estomáticos para controlar as trocas gasosas, evitando a perda de água, com conseqüente aumento da *EUA*. O conjunto de características anatômicas estão diretamente correlacionados com os aumentos em produtividade observadas nas linhagens tolerantes ao estresse hídrico. As linhagens G 176-11.2.1 e 521233 apresentaram as maiores produtividades quando cultivadas em ambiente estressado. O aumento de produtividade apresentou forte correlação com a anatomia foliar e massa de 1000 grãos. De acordo com os resultados encontrados nesses estudos é plausível afirmar que, as características morfofisiológicas são ferramentas muito úteis para auxiliar programas de melhoramento na seleção de novos cultivares mais eficientes no uso da água.

**Palavras-chave:** milho, seca, características secundárias, morfofisiologia, *EUA*



## GENERAL ABSTRACT

Plants are exposed to various environmental stresses during their growth and development under natural and agricultural conditions. Among them, water stress is one of the most severe. Considering the hypothesis that maize has great variability for secondary traits in response to drought stress and that those traits have high heritability, which can help breeders in the selection of drought stress tolerant genotypes. Two experiments were carried out with six inbred lines with different genetic background to drought tolerance, belonging to Embrapa Maize and Sorghum Breeding's Program in greenhouse and field conditions. The goal of those trials was to evaluate the effects of drought stress on morphophysiological traits and their effect on yield production. The response variables evaluated were chlorophyll fluorescence, gas exchange (only the foliar greenhouse experiment), leaf anatomy and yield (only in the field experiment), in two different water regimes (field capacity and 50% of the soil capacity). In greenhouse condition, the drought tolerant inbred lines showed higher PSII efficiency, low photosynthesis, and transpiration values, leading those genotypes having a higher *WUE*. The leaf anatomy of the drought tolerant inbred lines showed significant and positive alterations, with no effect on photosynthesis capacity in drought stress conditions. Leaf anatomy and photosynthesis data indicate that drought stress tolerant inbred lines used stomata to regulate gas exchange, avoiding water loss, with consequently increase on *WUE*. The anatomical traits are directly correlated with yield gains observed on drought tolerant inbred lines. G176-11.2.1 and 521233 genotypes showed higher yields on the drought stressed condition. The yield data showed strong correlation to leaf anatomy and 1000 kernel weight. According to the results findings in these studies, it is plausible to say that morphophysiological traits, are useful tools to assist breeding programs in the selection of cultivars drought stress tolerant.

**Key words:** maize, drought, secondary traits, morphophysiology, *WUE*

## LISTA DE FIGURAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO

#### ARTIGO 1

Table 1 - Photosystem II efficiency ( $F_v/F_m$ ), photosynthetic rate ( $A$ , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), stomata conductance ( $g_s$ , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), intercellular $\text{CO}_2$ concentration ( $C_i$ , $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), transpiration rate ( $E$ , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), water use efficiency ( $WUE$ , $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol}^{-1}\text{H}_2\text{O}$ ) and instantaneous carboxylation efficiency ( $E_iC$ , $\text{mol H}_2\text{O m}^2 \text{s}^{-1}$ ) of six maize inbred lines contrasting for drought tolerance cultivated in two different water regimes.....	35
Table 2 - Adaxial epiderms (EPD), abaxial epiderms (EPB) and mesophyll thickness (MES) of six maize inbred lines contrasting for drought tolerance cultivated in two different water regimes.....	37
Table 3 - Response of leaf anatomy characteristics vascular bundle (VBA), xylem (Xy) and phloem total area (Ph) of six maize inbred lines contrasting for drought tolerance cultivated in two water regimes.....	38
Figure 1 - Photomicrographies of transversal leaf sections showing the adaxial epidermis (EPD, $\mu\text{m}$ ), abaxial epidermis (EPB, $\mu\text{m}$ ) and mesophyll thickness (MES, $\mu\text{m}$ ). Figures 1A, 1B, 1C, 1D, 1E and 1F represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 (drought tolerant), and 521237, TR6DM25 e L 53 (drought sensible) grown under well watered condition; figures 1G, 1H, 1I, 1J, 1K and 1L represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1, 521237, TR6DM25 and L 53 grown under water stress condition respectively.....	39
Figure 2 - Photomicrographies of transversal leaf sections showing the xylem (Xy), phloem (Ph), vascular bundle (VBA), metaxylem (MXy). Figures 2A, 2B, 2C, 2D, 2E and 2F represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 (drought tolerant), and 521237, TR6DM25 e L 53 (drought sensible) grown under well watered condition; figures 2G, 2H, 2I, 2J, 2K and 2L represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1, 521237, TR6DM25 and L 53 grown under water stress condition respectively.....	40

## ARTIGO 2

Table 1 - Adaxial epiderms (EPD), abaxial epiderms (EPB) and mesophyll thickness (MES) of six maize inbred lines contrasting for drought tolerance cultivated in two different water regimes.....	57
Table 2 - Vascular bundle (VBA), xylem (Xy) and phloem total area (Ph) of six maize inbred lines contrasting for drought tolerance cultivated in two different water regimes.....	58
Table 3 - Relative chlorophyll content (SPAD), 1000 kernel weight and yield of inbred lines contrasting to drought stress grown under different water regimes.....	61
Table 4 - Correlations among morfophysiology variables measured in corn leaves whose plants were grown under irrigation. Correlations were obtained from the averages of the variables, above the diagonal are the correlations coefficients among the variables (significant at 5%), below the diagonal are the correlations strength among variable.....	63
Table 5 - Correlations among morfophysiology variables measured in corn leaves whose plants were grown under drought stress. Correlations were obtained from the averages of the variables, above the diagonal are the correlations coefficients among the variables (significant at 5%), below the diagonal are the correlations strength among variable.....	63
Figure 1 - Meteorological elements recorded in the research site, covering from planting until R6 growth stage.....	54
Figure 2 - Photomicrographies of tanversal leaf sections showing the adaxial epidermis (EPD, $\mu\text{m}$ ), abaxial epidermis (EPB, $\mu\text{m}$ ) and mesophyll thickness (MES, $\mu\text{m}$ ). Figures 1A, 1B, 1C, 1D, 1E and 1F represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 (drought tolerant), and 521237, TR6DM25 e L 53 (drought sensiable) grown under well waltered condition; figures 1G, 1H, 1I, 1J, 1K and 1L represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1, 521237, TR6DM25 and L 53 grown under drought stress respectively.....	65
Figure 3 - Photomicrographies of tanversal leaf sections showing the xylem (Xy), phloem (Ph), vascular bundle (VBA). Figures 2A, 2B, 2C, 2D, 2E and 2F represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 (drought tolerant), and 521237, TR6DM25 e L 53 (drought sensiable) grown under well waltered condition; figures 2G, 2H, 2I, 2J, 2K and 2L represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1, 521237, TR6DM25 and L 53 grown under drought stress respectively.....	66
Figure 4 - Correlations among morfophysiology variables measured in corn leaves whose plants were grown under irrigation (A) and drought stress (B). Correlations were obtained from the averages of the variables. Above the diagonal are the correlations coefficients among the variables at 5% of significance, below the diagonal are the correlations strength among variables. Abbreviations: EPD, epidermis adaxial ( $\mu\text{m}$ ); MES, mesofilo thickness ( $\mu\text{m}$ ); EPB, abaxial epidermis ( $\mu\text{m}$ ); VBA, vascular bundle area ( $\mu\text{m}^2$ ); Xy, xylem area ( $\mu\text{m}^2$ ); Ph, phloem area ( $\mu\text{m}^2$ ); Yield, grain production ( $\text{tons}\cdot\text{ha}^{-1}$ ); kwt, kernel individual weight (mg), SPAD, chlorophyll content.....	66

## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE .....	14
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 A cultura do milho .....	15
2.2 Efeito do estresse hídrico no crescimento e desenvolvimento das plantas.....	16
2.3 Respostas genéticas a eficiência no uso da água ( <i>EUA</i> ).....	17
2.4 Modificações morfoanatômicas em folhas de milho em resposta ao déficit hídrico .....	18
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	20
REFERÊNCIAS .....	21
SEGUNDA PARTE .....	25
ARTIGO 1 - Anatomia foliar e trocas gasosas de linhagens de milho contrastantes ao estresse hídrico cultivadas em casa de vegetação sob duas condições hídricas .....	25
RESUMO.....	26
1 INTRODUÇÃO.....	28
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1 Descrição das linhagens utilizadas no experimento: características gerais.....	30
2.1.1 Linhagens indicadas como tolerantes ao stress hídrico .....	30
2.1.2 Linhagens indicadas como sensíveis ao estresse hídrico .....	31
2.2 Características avaliadas.....	32
2.2.1 Fluorescência da clorofila e trocas gasosas .....	32
2.2.2 Anatomia foliar .....	32
2.2.3 Análise estatística .....	33
3 RESULTADOS.....	33
3.1 Fluorescência da clorofila e trocas gasosas .....	33
3.2 Anatomia foliar .....	36
4 DISCUSSÃO .....	41
4.1 Fluorescência da clorofila e trocas gasosas.....	41
4.2 Anatomia foliar.....	43
5 CONCLUSÕES .....	45
REFERÊNCIAS .....	46
ARTIGO 2 - Produtividade de linhagens de milho contrastantes ao estresse hídrico cultivadas à campo sob duas condições hídricas .....	50
RESUMO.....	51
1 INTRODUÇÃO.....	53

2 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1 Características avaliadas.....	56
2.1.1 Anatomia foliar.....	56
2.1.2 Teor relativo de clorofila .....	56
2.1.3 Produtividade.....	56
2.1.4 Análise estatística.....	57
3 RESULTADOS.....	57
3.1 Anatomia foliar.....	57
3.2 Teor relativo de clorofila, massa de 1000 grãos e produtividade .....	61
4 DISCUSSÃO.....	65
5 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A seca é o mais importante estresse abiótico que pode limitar o crescimento e desenvolvimento das plantas, podendo reduzir drasticamente a produtividade das culturas de interesse econômico. Nas próximas décadas, os períodos de seca podem aumentar, tendo grande potencial de reduzir o potencial produtivo em várias regiões do mundo (DARYANTO et al., 2017; RODRIGUES, 2018; YU-XIU et al., 2020).

Considerada como uma das culturas mais importantes a nível global, o milho (*Zea mays* L.), pode ter sua produtividade radicalmente reduzida pelo estresse hídrico. No entanto, as perdas podem variar em função do genótipo, estágio fenológico da cultura, duração e intensidade do estresse (LAVINSKY et al., 2015), como também pelas diversas interações entre esses fatores.

Aproximadamente 33% dos solos agricultáveis ao redor do mundo são considerados propensos à redução na disponibilidade hídrica (BIANCHINI, 2019). Dentro desse contexto é fundamental entender como os parâmetros morfofisiológicos de alta herdabilidade genética, tornam-se uma estratégia para seleção de genótipos com maior eficiência na utilização da água (EUA).

O período no qual o milho é particularmente mais sensível ao estresse hídrico acontece no pré-florescimento e enchimento de grãos (MAGALHÃES & DURÃES, 2006; ARAUS et al., 2012). Conforme descrito por EDMÉADES et al., (2000), durante esse período o estresse hídrico pode levar a um aumento no intervalo entre florescimento masculino e feminino (IFMF), ou seja, pode causar um assincronismo entre a emissão do estilo-estigma das plantas, afetando diretamente a polinização, que é negativamente correlacionado com a produção (MAGALHÃES et al., 2012).

A nível fisiológico quando as necessidades hídricas do milho não são atendidas, ocorre um distúrbio no balanço hídrico das plantas, desencadeando uma série de mudanças a nível metabólico, como redução da taxa fotossintética (*A*), transpiração (*E*), danos na membrana celular, e aceleração da senescência foliar (AHMAD et al., 2018). Alterações morfofisiológicas de alta herdabilidade e correlação com mecanismos de tolerância à seca podem ocorrer devido à plasticidade fenotípica apresentada por genótipos, com diferentes backgrounds para tolerância ao estresse hídrico. E essas características vêm sendo incorporadas em programas de melhoramento, para seleção de genótipos mais adaptados aos estresses abióticos (BOLANÕS & EDMÉADES., 1996).

Dessa forma, houve a oportunidade de trabalhar com linhagens do grupo Elite Prioritário do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo sendo elas: 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 (tolerantes ao estresse hídrico) e 521237, TR6DM25 e L53 (sensíveis ao estresse hídrico) em experimentos de casa-de-vegetação e campo, em dois regimes hídricos (capacidade de campo e 50% da água disponível no solo) no período de abril a agosto de 2019.

Considerando que as linhagens avaliadas apresentam características morfofisiológicas contrastantes em resposta a estresses abióticos, os experimentos apresentados tiveram como objetivo: identificar alterações anatômicas em folhas de milho relacionadas a maior eficiência na utilização de água, avaliar os efeitos de diferentes disponibilidades hídricas sobre a fluorescência da clorofila, trocas gasosas e os componentes do rendimento e produtividade, identificar possíveis estratégias utilizadas pelas linhagens 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1, 521237, TR6DM25 e L53 para superar os efeitos do estresse hídrico, com potencial de auxiliar programas de melhoramento na seleção de materiais mais eficientes no uso da água.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A cultura do milho**

O milho é uma planta de ciclo anual, monocotiledônea, pertencente à família das *Poaceas*, é o terceiro cereal mais importante no mundo, depois do arroz e do trigo (BIANCHINI, 2019). Originário da América Central é um dos cereais mais antigos cultivados no mundo, sua produção ocorre em climas que variam desde a zona temperada até a tropical.

O Brasil é o 3º maior produtor mundial de milho, ocupando o 2º lugar em exportação deste cereal. Para a safra 2020/2021 a CONAB estima uma produção de 85,7 milhões de toneladas, ou seja, uma redução de 16,4% em relação à safra 2019/2020. Esse ajuste ocorre diante da constatação em campo de uma redução de produtividade de 27% na segunda safra, devido ao estresse hídrico, nas mais importantes regiões produtoras do país. A produtividade média nacional ( $5.690 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) é baixa considerando o potencial da cultura e avanços tecnológicos observados nos últimos anos (PETEAN et al., 2019).

Devido sua alta variabilidade genética, o milho é uma espécie que apresenta grande potencial adaptativo, podendo ser cultivado em três épocas no Brasil. Sendo elas o período chuvoso ou plantio de verão (primeira safra), o milho safrinha (segunda safra) referente ao milho sequeiro plantado entre os meses de janeiro, fevereiro e março com alguns plantios mais tardios no mês de abril (MATTOSO et al., 2006).

As plantas de milho apresentam metabolismo fotossintético C4, sendo uma via

fotossintética adaptativa que evoluiu para diminuir os efeitos prejudiciais do declínio gradual de CO<sub>2</sub> atmosférico, como a fotorrespiração. A via C<sub>4</sub> da fotossíntese permite a redução da abertura estomática e, conseqüentemente, diminuição na transpiração. Dessa forma, o milho é caracterizado como uma planta altamente eficiente na assimilação do CO<sub>2</sub>. No entanto, estresses abióticos são fatores que impactam negativamente na atividade fisiológica dessa cultura, tendo efeitos negativos na produção de grãos (ZEFFA et al., 2019).

## **2.2 Efeito do estresse hídrico no crescimento e desenvolvimento de plantas**

O milho pode expressar grande sensibilidade ao estresse hídrico, e a sua ocorrência é mais crítica durante alguns estádios fenológicos como na germinação, que possui o potencial de reduzir o número de plantas por unidade de área (stand), nos estádios vegetativos podendo reduzir a área foliar e conseqüentemente, a taxa fotossintética, acumulação de carboidratos, e definição do número de óvulos potenciais, sendo essa característica muito importante para o estabelecimento do potencial produtivo da cultura (MAGALHÃES et al., 2006). No entanto, durante o florescimento e enchimento de grãos são os estádios fenológicos nos quais a cultura é mais sensível ao estresse hídrico, pois as folhas e o pendão estão completamente expostos. Nesse período o estresse hídrico pode ter como consequência a dessecação dos grãos de pólen, como também levar ao assincronismo do intervalo entre o florescimento masculino e feminino (IFMF) e antecipar a senescência foliar reduzindo a capacidade fotossintética das plantas, tendo como consequência a redução da produção de fotoassimilados (MAGALHÃES & DURÃES, 2006).

Durante o estágio reprodutivo (R3) o estresse hídrico, pode reduzir a translocação de fotoassimilados, podendo levar a redução do peso individual de grãos (SOUZA et al., 2016). Sendo assim, o estresse hídrico durante os estádios reprodutivos como entre o florescimento e enchimento de grãos, pode levar a perdas diretas em produtividade. De acordo com (BIANCHINI, 2019), estresse hídrico no pré-florescimento pode resultar em perdas de 50% em produtividade, podendo chegar em até 100% dependendo da severidade e duração.

Muitas alterações podem ocorrer no metabolismo de plantas desenvolvidas em condições de estresse hídrico. As respostas do milho usualmente incluem a limitação estomática, concentração interna de CO<sub>2</sub> (REIS et al., 2018), redução da condutância estomática e transpiração, sendo estas um mecanismo evolutivo para diminuir a perda de água para a atmosfera (ÁVILA et al., 2017). Dentre as modificações que podem ocorrer a redução no teor de clorofila, especialmente em folhas mais velhas pode limitar a fotossíntese (BARNABY, 2013).



O estresse hídrico, pode induzir diferentes eventos metabólicos que podem resultar na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), através da inibição da fotossíntese em resposta ao fechamento dos estômatos, reduzindo a absorção de CO<sub>2</sub>, diminuindo o carbono no mesófilo das folhas e assim, reduzindo a taxa fotossintética e o desenvolvimento das plantas (LAVINSKY et al., 2015). Esses processos são controlados a nível hormonal, com muitas proteínas envolvidas em diferentes rotas metabólicas durante as fases fenológicas da cultura (BIANCHINI, 2019).

### 2.3 Respostas genéticas e eficiência no uso da água

Apesar do uso de novas cultivares desenvolvidas através de inovações biotecnológicas ou técnicas convencionais de melhoramento, altas produtividades não serão alcançadas se a disponibilidade hídrica for limitada ou se as plantas não forem eficientes em sua utilização (BASSO & RITCHIE, 2018). Dessa forma o conceito de eficiência no uso da água (*EUA*) juntamente com outros parâmetros, foram propostos por melhoristas de plantas para identificar genótipos mais eficientes para essa característica sobre condições de estresses de temperatura, hídrico e suas interações (HATFIELD & DOLD, 2019).

O conceito de *EUA* foi introduzido há 100 anos por BRIGGS & SHANTZ, 1913. Esses autores introduziram esse conceito, como sendo a medida da quantidade de biomassa produzida por unidade de água utilizada pelas plantas. Desde então, foram publicados incontáveis artigos e revisões sobre o tema (BASSO & RITCHIE, 2018), demonstrando que a produtividade de milho pode ser aumentada sem mudanças na quantidade de água utilizada, resultando no aumento da *EUA*.

Variabilidade entre genótipos para *EUA* tem sido observado em grande número de espécies, incluindo cevada (HUBICK & FARQUHAR, 1989), feijão de frade (ISMAIL & HALL, 1992; ASHOK et al., 1999), amendoim (HUBICK et al., 1988), sorgo (DONATELI et al., 1992), soja (HUFSTETLER et al., 2007) e milho (LANKISKY et al., 2015; SOUSA et al., 2016; PIRES et al., 2020).

A nível foliar a *EUA* é uma característica complexa com respostas fisiológicas que ligam a condutância mesofílica ( $g_m$ ) e estomática ( $g_s$ ) como as variáveis chave. A relação entre  $g_m/g_s$  foi proposta por (FLEXAS et al., 2014) como variável chave relacionada com a captura do CO<sub>2</sub> pelas folhas, afetando os processos fotossintéticos em escala foliar.

A taxa de respiração é também considerada fator chave na determinação da *EUA*, pois alterações nessa característica têm impacto direto na captação líquida de carbono pelas folhas (GACO et al., 2014). Dessa forma, a seleção de plantas para características diretamente

relacionadas com eficiência fotossintética ou menor respiração poderia levar ao melhor entendimento dos impactos do estresse hídrico e identificação de genótipos com maior *EUA* (HATFIELD & DOLD, 2019).

A identificação de genótipos com plasticidade fenotípica e alto potencial produtivo em condições de baixa disponibilidade hídrica, pode contribuir com o avanço de programas de melhoramento focados na seleção de genótipos com maior *EUA* (GLEASON et al., 2019). Em adição, é importante demonstrar a relação entre plasticidade fenotípica e potencial produtivo, para melhor entender o efeito dessas características no rendimento de grãos de genótipos tolerantes em condições de estresse hídrico (PIRES, 2020).

#### **2.4 Modificações morfofisiológicas em folhas de milho em resposta ao déficit hídrico**

Uma forma de avaliar o impacto do estresse hídrico na *EUA* é analisar alterações a nível foliar (HATFIELD e DOLD 2019), pois as plantas podem sofrer modificações morfoanatômicas em resposta a estresses abióticos. Esses processos podem ser adaptativos, quando geram mecanismos mitigadores, sendo essas características controladas geneticamente, graças à chamada plasticidade fenotípica.

A adaptação a ambientes áridos dotou as plantas de mecanismos específicos que lhes permitem enfrentar com sucesso a redução da transpiração sem sofrer reduções na capacidade fotossintética. Tais mecanismos incluem o acúmulo de substâncias osmoticamente ativas presentes nos vacúolos (manutenção do turgor celular), aumento do número de estômatos (melhor controle da perda de água), redução do volume dos espaços intercelulares no mesofilo (diminuição da quantidade de vapores de água difundidos para os estômatos) e aumento do número de células do mesofilo (aumento no número de cloroplastos e maior superfície celular para a captação de  $\text{CO}_2$  (CHARTZOULAKIS et al., 2002).

A entrega de  $\text{CO}_2$  para os centros de carboxilação, envolve o transporte por várias rotas e limitações que criam resistências a esse transporte e causando inevitavelmente algum atraso no transporte. Dependendo de quão ativo são os centros de carboxilação, essas limitações no fluxo de  $\text{CO}_2$  podem restringir a capacidade fotossintética, para a produção de açúcares que as plantas dependem para seu metabolismo (LUNDGREN & FLEMING, 2020).

O estresse hídrico pode modificar as estruturas do mesofilo, ocorrendo o aumento na densidade de células, redução dos espaços intercelulares e no tamanho das células. LUNDGREN et al., (2019) propuseram que a coordenação estomática e os padrões dos espaços intercelulares do mesofilo têm grande relação com a *EUA* em diferentes genótipos de trigo. LUNDGREN & FLEMING, (2020) destacaram a importância da condutância mesofilica (*gm*) reforçando a

importância de alterações anatômicas dos espaços intercelulares do mesofilo no aumento da eficiência fotossintética.

A maior espessura do mesofilo (parênquima clorofiliano), está relacionada com maior eficiência fotossintética (BACELAR et al., 2004; GUERFEL et al., 2009). FANG & XIONG (2015) também citam algumas modificações anatômicas em plantas sob estresse hídrico, como a redução dos vasos condutores xilema/floema, folhas menores e mais espessas. A redução na área do tecido vascular sugere maior capacidade das plantas em manter o transporte de água e redução da possibilidade de cavitação sob deficiência hídrica, uma vez que a embolia é uma das principais causas de morte das plantas durante a seca (CHOA et al., 2016). No entanto, o xilema evoluiu para fornecer água de forma eficiente às folhas e, simultaneamente, proteger contra cavitação e propagação da embolia. Os vasos do xilema também estão interligados para fornecer redundância na rede de condução hídrica, oferecendo dessa forma caminhos alternativos para contornar o elemento de vaso embolizado e manter o transporte de água estável (HWANG et al., 2016).

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O milho é uma cultura que apresenta grande variabilidade de respostas morfofisiológicas ao estresse hídrico. Dessa forma, a escassez de água em estádios fenológicos críticos, como pré-florescimento e enchimento de grãos pode causar grandes reduções na produtividade de grãos.

Considera-se as hipóteses que existe variabilidade genética para características de anatomia foliar e de eficiência fotossintética de um grupo elite de linhagens de milho do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, com diferentes background genéticos para tolerância à seca, cultivadas em diferentes regimes hídricos (capacidade de campo e 50% do teor de água disponível no solo).

Nesse contexto, diferentes características podem trabalhar de forma associada para desenvolver mecanismos de tolerância ao estresse hídrico, tendo potencial para geração de novos cultivares com performances superiores em condições de seca. Sendo a identificação dessas características e suas relações com mecanismos de uso e eficiência da água o objetivo deste estudo.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, Z.; AMJUM, S.; WARAICH, E. A.; AYUB, M. A.; AHMAD, T. TARIQ, R. M. S. AHMAD, R. IQBAL, M. A. Growth, physiology and biochemical activities of plant responses with foliar potassium application under drought stress - A Review. **Journal of Plant Nutrition**, 41. 1734-1743, 2018.
- ARAUS, J. L.; SÁNCHEZ, C.; EDMEADES, G. O. Phenotyping maize for adaptation to drought. 2011. In: MONNEVEUX, P.; RIBAUT, J. M. (Ed.). **Drought phenotyping in crops: from theory to practice**. Texcoco: CGIAR Generation Challenge Programme, p. 263-283, 2011.
- ASHOK, I. S. A.; PRASAD, T. G.; WRIGHT, G. C.; KUMAR, M. U. and RAO, R. C. N. (1999). Variation in transpiration efficiency and carbon isotope discrimination in cowpea. **Funct. Plant Biol.** 26, 503-510. doi: 10.1071/PP98097
- ÁVILA, R., MAGALHAES, P. C., DE ALVARENGA, A. A., LAVINSKY, A. D. O., CAMPOS, C. N., DE SOUZA, T. C., & GOMES JÚNIOR, C. C. Drought-tolerant maize genotypes invest in root system and maintain high harvest index during water stress. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 3, p. 450-460, 2017.
- BARCELAR, E. A. et al. (2004). Sclerophylly and leaf anatomical traits of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. **Tree Physiology**, Victoria, v. 24, n. 2, p. 233-239.
- BARNABY, J.Y.; KIM M.; BAUCHAN, G.; BUNCE, J.; REDDY V, et al. (2013) Drought responses of foliar metabolites in three maize hybrids differing in water stress tolerance. *PLoS One* 8: e77145.
- BASSO, B., and RITICHIE, J. T. (2018). Evapotranspiration in high-yielding maize and under increased vapor pressure deficit in the US Midwest. *Agric. Environ. Lett.* 3:170039. doi: 10.2134/aes2017.11.0039
- BIANCHINI, H. C. **Influence of the application of silicon on the physiological and biometric characteristics of maize cultivars under water stress**. Tese de doutorado 74p. 2019.
- J. BOLAÑOS, G.O. EDMEADES. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. **Field Crops Research**, v. 48, n.1, p 65-80, doi.org/10.1016/0378-4290(96)00036-6.
- BRIGGS, L. J., and SHANTZ, H. L. (1913). "The water requirement of plants" in Bureau of Plant Industry Bulletin (Washington, DC: US Department of Agriculture), 282-285.
- CHARTZOULAKIS, K. et al., Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relationship and growth of two avocado cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, p. 39-50, 2002.
- CHOA, B. et al 2016 . Noninvasive measurement of vulnerability to drought-induced

embolism by X-ray microtomography. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 170, p. 273-282, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Terceiro levantamento da safra de grãos, **Safra 2021/2022**. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos> (acesso 09/12/2021)

DARYANTOS, WANG L X, JACINTHE P A. 2017. Global synthesis of drought effects on cereal, legume, tuber and root crops production: A review. **Agricultural Water Management**, 179, 18–33

DONATELLI, M.; HAMMER, G. L.; and Vanderlip, R. L. (1992). Genotype and water limitation effects on phenology, growth and transpiration efficiency in grain sorghum, **Crop Sci.** 32, 781-786. doi: 10.2135/cropsci1992.0011183X003200030041x.

EDMEADES G.O., J. BOLAÑOS, A. ELINGS, J.-M. RIBAUT, M.BÄNZIGER, M.E. WESTGATE, 2000 The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. pp. 43-73. In: M.E. Westgate, K.J. Boote (Eds.), **Physiology and Modeling Kernel Set in Maize**. CSSA Special Publication No. 29. CSSA, Madison, WI.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 72, p. 673-689, 2015.

FLEXAS, J.; DIAZ-ESPEJO, A.; A.; GAGO, J.; GALLÉ, A.; GALMÉS, J.; GULIAS, J. et al (2014). Photosynthetic limitations in Mediterranean plants: a review. **Environ. Exp. Bot.** 103, 12-33. doi:10.1016/j.envexpbot.2013.2013.09.002

GAGO, J., DOUTHE, C., FLOREZ-SARASA, I., ESCALONA, J. M., GALMES, J., FERNIE, A. R., et al. (2014). Opportunities for improving leaf water use efficiency under climate change conditions. **Plant Sci.** 226, 1-8-119. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.04.007

GLEASON, S. M., COOPER, M., WIGGANS, D. R., D. R., BLISS, C. A., ROMAY, M. C. GORE, M. A., MICKELBART, M V. TOPP, C. N., SHANG, H., DEJONGE, K. C. COMAS, L. H. 2019. Stomatal conductance, xylem water transport, and root traits underpin improved performance under drought and well-watered conditions across a diverse panel of maize inbred lines. **Field Crops Res.** 234, 119-128.

GUERFEL, M et al. Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 257-263, 2009.

HWANG, B.G.; Ryu, J.; Lee, S.J. (2016) Vulnerability of Protoxylem and Metaxylem Vessels to Embolisms and Radial Refilling in a Vascular Bundle of Maize Leaves. **Front. Plant Sci.** 7:941. doi: 10.3389/fpls.2016.00941

HATFIELD, J. L.; DOLD, C. (2019). Water use efficiency: advances and challenges in a changing climate. **Frontiers in Plant Science**. February 2019; v.10, 103.

- HUBICK, K., and FARQUAR, G. D. (1989). Carbon isotope discrimination and the ratio of carbon gained to water lost in barley cultivars. **Plant Cell Environ.** 12, 795-804, doi: 10.1111/j.1365-3040.1989.tb01641.x
- HUBICK, K.; SHORTER, R.; and FARQUAR, G. (1988). Heritability and genotype x environment interactions of carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Funct. Plant Biol.** 15, 799-813. doi: 10.1071/PP9880799
- HUFSTELLER, E. V., DOERMA, H. R.; CARTER, T. E. and EARL, H. J. (2007). Genotype variation for three physiological traits affecting drought tolerance in soybean. **Crop Sci.** 47, 25-35. doi: 10.2135/cropsci2006.04.0243
- ISMAIL, A. M., and Hall, A.E. (1992). Correlation between water use efficiency and carbon isotope discrimination in diverse cowpea genotypes and isogenic lines. **Crop Sci.** 32, 7-12. doi 10.2135/cropsci1992.0011183X003200010002X.
- LAVINSKY AO, MAGALHÃES PC, ÁVILA R, GOMES-JR CC, CARNEIRO NP (2015). Analysis of Maize Photosynthesis Parameters and Whole Plant Oxidative Damage Under Long-term Drought. **Adv Crop Sci Tech.** doi:10.4172/2329-8863. S1-007.
- LUNDGREN, M.R., MATHERS, A., BAILLIE, A.L. *et al.* Mesophyll porosity is modulated by the presence of functional stomata. **Nat Commun** 10, 2825 (2019). doi.org/10.1038/s41467-019-10826-5
- LUNDGREN, M. and FLEMING, A. J. Cellular perspectives for improving mesophyll conductance. **The Plant Journal** (2020) 101, 845-857. doi:10.1111/tpj.14656
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da produção de milho.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 10p.
- MAGALHÃES, P. C.; ALBUQUERQUE, P. E. P.; VIANA, J. **Resposta fisiológica do sorgo ao estresse hídrico em casa de vegetação.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012.
- MATTOSO, M. J. *et al.* **Aspectos de produção e mercado de milho.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 27, n. 233, p. 95-104, jul.ago. 2006.
- PETEAN, C. C. *et al.* Polímeros orgânicos com ureia dissolvida e doses de nitrogênio no milho. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 62, 2019.
- PIRES, M. V., CASTRO, E. M., FREITAS, B. S. M. LIRA, J. M. SOUZA., MAGALHÃES, P. C., PEREIRA, M. P. Yield-related phenotypic traits of drought resistant maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany.** 171, 2020.
- REIS, C. O.; MAGALHÃES, P. C.; AVILA, R. G.; ALMEIDA, L. G.; RABELO, V. M.; CARVALHO, D. T.; CABRAL, D. F.; KARAM, D.; SOUZA, T. C. Action of N-Succinyl and N, O-Dicarboxymethyl Chitosan Derivatives on Chlorophyll Photosynthesis and Fluorescence in Drought-Sensitive Maize. **Journal of Plant Growth Regulation.** p. 1-12, 2018.

RODRIGUES, L. A. **Respostas Fisiológicas e Estruturais em Plantas submetidas a Estresse Hídrico Recorrente em Diferentes Condições de Luz.** Botucatu, 2018.

SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C.; CASTRO, E. M.; DUARTE, V. P.; LAVINSKY, A. O. Corn root morphoanatomy at different development stages and yield under water stress. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.51, n.4, p.330-339, abr. 2016

YU-XIU, YE; ZHANG-RONG, WEN; HUAN, YANG, WEI-PING; LU DA-LEI1, LU. Effect of Post-silking water deficit on the leaf photosynthesis and senescence of waxy maize. **Journal of Integrative Agriculture.** 2020, 19(9): 2216–2228.

ZEFFA, D. M., PERINI, L. J., SILVA, M. B., DE SOUSA, N. V., SCAPIM, C. A., DE OLIVEIRA, A. L. M., et al. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PloS One.** v. 14, n. 4, p. 1-19, 2019.



## **SEGUNDA PARTE**

### **ARTIGO 1 - ANATOMIA FOLIAR E TROCAS GASOSAS DE LINHAGENS DE MILHO CONTRASTANTES PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO CULTIVADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO SOB DUAS CONDIÇÕES HÍDRICAS**

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003) e formatado de acordo com o Manual da UFLA.**

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi identificar características morfofisiológicas de linhagens milho contrastantes para tolerância ao estresse hídrico, cultivadas em dois regimes hídricos distintos em casa de vegetação. Seis linhagens do grupo Elite Prioritário do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo com diferentes *backgrounds* genéticos foram usadas: 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 (tolerantes) e 521237, TR6DM25 e L 53 (sensíveis). No pré-florescimento foi suspensa a irrigação por 22 dias no tratamento estressado, momento no qual foi atingida uma tensão de -138 KPa ou 50% capacidade de disponibilidade de água no solo. No tratamento irrigado não teve restrição hídrica, sendo o potencial matricial mantido na capacidade de campo (CC) durante todo o ciclo da cultura. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) em um fatorial 6 x 2 (seis linhagens e duas condições hídricas) com seis repetições. As variáveis analisadas foram: eficiência máxima do PSII (Fv/Fm), fotossíntese líquida (*A*), condutância estomática (*gs*), carbono interno (*Ci*), transpiração (*E*). Com base na relação entre *A* e *E* determinou-se a eficiência no uso da água (*EUA*), e eficiência de carboxilação (*EiC*). As características anatômicas avaliadas foram a espessura das epidermes abaxial (EPD) e adaxial (EPB), espessura de mesofilo (MES), área do feixe vascular (VBA), área de xilema (Xy), e área de floema (Ph). As análises estatísticas foram realizadas através da ANAVA e as médias dos tratamentos agrupadas pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ). As linhagens tolerantes ao estresse hídrico apresentaram maior *EUA* através da regulação estomática. As linhagens tolerantes ao estresse hídrico apresentaram plasticidade foliar, o que lhes conferiu alterações anatômicas e fisiológicas positivas, tendo como consequência, maior *EUA*. A utilização de características morfofisiológicas em programas de melhoramento possui grande potencial para seleção de genótipos mais tolerantes ao estresse hídrico.

**Palavras-chave:** milho, anatomia foliar, seca, plasticidade fenotípica, fenotipagem

## ABSTRACT

The objective of this study was to identify morphophysiological traits in contrasting maize inbred lines contrasting for drought tolerance, grown in two different water regimes in greenhouse conditions. Six maize inbred lines from the Priority Elite Group of Embrapa Maize and Shorghum Breeding Program were used: 5184180-04, 521223, G176-11.2.1 (drought tolerant) and 521237, TR6DM25 and L53 (drought sensitive). In the pre-flowering, the irrigation was suspended for 22 days, the water potential in the stressed treatment was -138 KPa or 50% of available water capacity. There was no water restriction in the irrigated treatment. The experimental design was the Randomized Complete Block (RCB) with a 6 x 2 factorial (six inbred lines and two water regimes) with six replications. The variables analyzed were maximum efficiency of the PSII ( $F_v/F_m$ ) and gas exchange assessment were carried out in one plant per replication collecting the following variables: net photosynthetic rate ( $A$ ), stomata conductance ( $g_s$ ), intercellular  $CO_2$  concentration ( $C_i$ ), transpiration ( $E$ ). Based on the relationship between  $A$  and  $E$  the water use efficiency was determined, and carboxylation efficiency ( $E_iC$ ). The anatomical traits evaluated were abaxial (EPD) and adaxial epidermis (EPB), mesophyll thickness (MES), vascular bundle (VBA), xylem (Xy) and phloem area (Ph). The statistical analysis were performed through ANOVA and treatments means were grouped by the Scott-Knott test at  $p \leq 0.05$ . The drought stress tolerant inbred lines showed higher  $WUE$  through stomata regulation. Drought stress tolerant inbred lines presented leaf plasticity, which led to anatomical and physiological changes, resulting in greater  $WUE$ . The use of morphophysiological traits in breeding programs has great potential for selecting genotypes drought tolerant.

**Key words:** maize, leaf anatomy, drought, phenotype plasticity, phenotyping

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos fatores mais importantes, imprevisível, que poderá alterar ambientes agrícolas nos próximos 50 anos, será a intensidade, frequência e duração dos eventos de seca. Essas mudanças, provavelmente terão um efeito dramático no metabolismo, crescimento, desenvolvimento, e produtividade de plantas (KORUP et al 2018; ALMEIDA et al., 2020; COTROZZI et al., 2020).

A seca pode ser definida como teor de água disponível no solo, capaz de causar impactos ambientais, econômicos e/ou sociais (LAMBERS et al. 2008). A tolerância à seca em plantas é um fenômeno complexo, sendo altamente influenciado por características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, e suas interações com fatores climáticos (FAROOQ et al., 2009; JALEEL et al., 2009; OBIDIEGWU et al., 2015; KHAN et al., 2018; SAHEBI et al., 2018; SANTOS et al., 2021).

Avanços na seleção de genótipos tolerantes ao estresse hídrico, vem sendo obtidos na maioria das vezes sem o auxílio de ferramentas de fisiologia vegetal, através de programas melhoramento convencionais baseados em *multi-environment testing* (MET) para identificar progênies superiores (CAMPOS et al., 2004). No entanto, esses programas utilizam somente dados de produtividade de grãos, tornando esses programas caros, trabalhosos, além de avançarem de forma lenta.

A seleção de genótipos tolerantes pode ser facilitada com a utilização de características secundárias, cuja variância genética e herdabilidade são maiores, aumentando dessa forma a eficiência de seleção (BOLANÕS & EDMEADES., 1996; SHEIKH et al., 2017; SANTOS et al., 2021).

As características mais avaliadas são aquelas derivadas de técnicas de trocas gasosas, especialmente Eficiência do Uso da Água *EUA* (SANTOS et al., 2021). Em adição as trocas gasosas, é possível avaliar respostas de genótipos contrastantes através da fluorescência da clorofila conforme proposto por SOUZA et al., (2017). Essas características são amplamente utilizadas, por refletirem a capacidade fotossintética das plantas, além de serem métodos rápidos, não destrutivos e de fácil interpretação (SANTOS et al., 2021).

No entanto, características anatômicas de folhas relacionadas ao transporte de água, nutrientes, produção e distribuição de fotoassimilados que também apresentam alta herdabilidade, ainda são pouco exploradas. Nesse experimento houve a oportunidade de testar as hipóteses de que as linhagens 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 e 521237, TR6DM25 e L 53 apresentam características contrastantes de anatomia foliar e trocas gasosas. Dessa forma, o presente experimento teve como objetivos avaliar respostas anatômicas de folhas e

características ecofisiológicas de linhagens de milho contrastantes para tolerância à seca em resposta a dois regimes hídricos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, Brasil, situada nas coordenadas geográficas: 19°26'46.10"S e 44°10'4.11"O e altitude média de 732 m. As médias das temperaturas registradas durante o período experimental foram, mínima de 13,2°C e máxima de 34,1°C e umidade relativa entre 30% e 75%.

Foram utilizadas seis linhagens do grupo Elite Prioritário do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo com diferentes backgrounds genéticos para tolerância à seca, sendo as tolerantes 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1, e as sensíveis 521237, TR6DM25 e L 53.

O teor de água no solo foi monitorado diariamente entre 09:00h e 15:00h, com auxílio de sensores de umidade modelo GB Reader N1535 (Measurement Engineering, Austrália) instalados no centro de cada vaso, com auxílio de um trado de rosca, a uma profundidade de 20 cm. Todos os tratamentos foram mantidos em capacidade de campo (CC) o que corresponde a uma tensão de água no solo de (-18 kPa) durante o período que antecedeu a imposição do estresse.

No pré-florescimento foi imposto a restrição hídrica nos tratamentos estressados por um período de 15 dias, neste tratamento, a tensão de água no solo foi reduzida para -138 KPa, que corresponde a aplicação de 50% da água disponível no solo (50%CC). O tratamento irrigado foi mantido na CC durante todo período experimental através de irrigações periódicas. Os cálculos de reposição de água foram realizados com o auxílio de uma planilha eletrônica, feita em função da curva de retenção de água do solo.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizados (DIC) com um fatorial 6 x 2, constituído por seis linhagens contrastantes para tolerância, e duas condições hídricas (irrigado e déficit hídrico), com seis repetições. A semeadura foi realizada em vasos plásticos com capacidade de 20 kg, contendo Latossolo Vermelho Distrófico Típico. Foram plantadas cinco sementes por vaso, e após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando duas plantas por vaso. A adubação foi realizada de acordo com a recomendação da análise química do solo, aplicando-se no momento do plantio o formulado 08-28-16 (10 g) e FTE BR12 (2,0 g) para 20 kg de solo. A cobertura foi realizada aplicando-se 4 g de ureia por vaso 30 dias após o plantio.

## 2.1 Descrição das linhagens utilizadas no experimento: características gerais

Trabalhos de melhoramento e diversos relatórios de pesquisa da Embrapa Milho e Sorgo, dissertações de mestrado, teses de doutorado e artigos vem gerando uma grande quantidade conhecimento sobre estudos genéticos, características de genótipos e performance de interação genótipo-ambiente, sob condições diferenciadas de estresses bióticos e abióticos. Dentre estes trabalhos, relacionam-se os estudos de inferências genético-fisiológicas na tolerância à seca em milho conduzidos por MARTINS (2012), e DIAS, et al., (2018a; 2018b) e SANTOS et al., (2021). Alguns destes trabalhos também apresentam validação de métodos morfofisiológicos, genético-estatísticos para testar hipóteses de capacidade de combinação e de performance de linhagens de interesse do melhoramento genético.

Foram realizadas avaliações prévias (fenotipagem preliminar), pelas equipes de melhoramento de milho, fisiologia e de dinâmica de água no sistema solo-planta-atmosfera, em ensaios conduzidos em Janaúba-MG e Teresina-PI, tanto para avaliações *per se* de linhagens, como também para a avaliação de híbridos obtidos dessas linhagens cruzadas com dois testadores dos grupos heteróticos Flint e Dent, em condições irrigadas e com estresse hídrico (SANTOS et al., 2021).

Com base nessas informações obteve-se a oportunidade de conduzir ensaios em casa de vegetação e condições de campo, utilizando linhagens contrastantes para tolerância à seca em dois regimes hídricos conforme descrito abaixo:

### 2.1.1 Linhagens indicadas como tolerantes ao estresse hídrico

**5184180-04:** é uma linhagem de ciclo um pouco mais curto e apresentou excelente desempenho em avaliações preliminares quanto à tolerância à seca, de forma que foi utilizada como testadora de populações para extração de linhagens com maior tolerância à seca, e para a formação de sintéticos com maior precocidade para adaptação à regiões com restrições hídricas. Entretanto, não foram obtidos híbridos com competitividade em relação à base genética elite do programa de melhoramento, mesmo para a condição de seca, sendo preservada no BAG, para outras finalidades. Esta linhagem participou na formação da variedade de milho de ciclo super precoce – BRS Gorutuba.

**521223:** é uma linhagem do grupo heterótico Flint, testada em vários cruzamentos avançados no programa de melhoramento (híbridos elites = VCU – seleção para pré-lançamento), apresentando potencial genético; entretanto, não chegou a produzir híbridos para lançamento comercial. Apresentou resultados favoráveis nas avaliações de tolerância à seca, tanto *per se*, quanto em cruzamentos.

**G176-11.2.1:** é uma linhagem derivada de híbrido comercial (antigo) e não relacionada diretamente à base genética do programa de melhoramento. Foi identificada por sua precocidade (um pouco mais precoce que a média das demais linhagens), alta capacidade de tolerância à seca e elevado número de fileiras de grãos, sendo este um componente importante para a produção de grãos, destacadamente sob condições de estresses. Entretanto, não se estabeleceu como fonte elite pois apresenta o defeito morfológico de palha aberta e exposição da ponta da espiga, tanto *per se* quanto em cruzamento.

### **2.1.2 Linhagens indicadas como sensíveis ao estresse hídrico**

**TR6DM25:** é uma linhagem considerada elite utilizada como testador Flint e participou de HSs na composição de parentais de híbridos duplos e triplos lançados comercialmente pela Embrapa. Entretanto, nas avaliações em condições de seca, essa linhagem apresentou grande perda de potencial produtivo *per se*, e os efeitos genéticos herdados pelos híbridos em que essa linhagem participa como parental mostram que ela transmite características desfavoráveis à adaptação à seca.

**521237:** é uma linhagem elite e pertence ao grupo Dent, um pouco mais precoce em relação a outras linhagens de interesse específico, por exemplo, 228-3 e 521236 (elites e base do grupo Dent), sendo usada como parental de um híbrido triplo recentemente lançado comercialmente e de outros híbridos com potencial de lançamento. Apesar de ser uma linhagem elite, com comprovado potencial produtivo de seus híbridos em condições adequadas de disponibilidade hídrica, essa linhagem apresentou grande sensibilidade ao estresse hídrico quando avaliada diretamente (*per se*) na condição de seca.

**L53:** é uma linhagem identificada como padrão de sensibilidade ao Al tóxico, apresentando, também baixo desempenho em condições de estresse hídrico. Não é uma linhagem elite. Foi escolhida para este trabalho pela possibilidade de se avaliar em outras condições de estresses abióticos e agregar informações complementares.

As seis linhagens apresentam elevada endogamia (S6 ou mais) e desempenho diferenciado na condição de estresse hídrico, sendo que os dois grupos estão bem estabelecidos (tolerantes e sensíveis). Não apresentam características completamente discrepantes quando ao ciclo, todos os materiais podem ser consideradas de ciclo precoce, com alguma tendência de ser um pouco mais rápidas no fechamento de ciclo vegetativo que a média das linhagens do programa de melhoramento; quanto ao porte, todas apresentam porte baixo, com exceção das linhagens 521223 e 521237 que podem ser consideradas de porte médio (médio a baixo, mas não discrepantes).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS AVALIADAS

As avaliações foram realizadas 30 dias após a imposição da restrição hídrica no tratamento estressado:

### 2.2.1 Fluorescência da clorofila e trocas gasosas

A eficiência máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) foi determinada utilizando um fluorímetro (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments King's Lynn, UK). As avaliações foram realizadas no terço médio das folhas da espiga, no período da manhã entre às 9:00 e 12:00 horas da manhã, em ambos os tratamentos. As plantas foram submetidas a um período de 30 minutos de adaptação ao escuro com o auxílio de clips foliares.

As trocas gasosas foram avaliadas no terço médio das folhas da espiga, no período da manhã entre às 8:00 e 11:00 horas, em ambos os tratamentos. As avaliações foram realizadas em uma planta por vaso e quatro repetições por linhagem. Foram avaliadas a taxa fotossintética líquida ( $A$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e carbono interno ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Baseado na relação entre  $A$  e  $E$  foi calculado a eficiência no uso da água ( $WUE$ ,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol}^{-1}\text{H}_2\text{O}$ ), e a partir dos valores de  $A$  e  $C_i$  foi obtida a eficiência de carboxilação ( $E_iC$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^2 \text{s}^{-1}$ ), e temperatura foliar ( $T_{\text{leaf}} \text{ } ^\circ\text{C}$ ). Estas características foram avaliadas usando um IRGA portátil, modelo LI-6400 (LI-COR, Lincoln, NE, EUA). As medições foram realizadas com uma câmara de  $6 \text{ cm}^2$  e o fluxo de ar na câmara teve concentração de  $\text{CO}_2$  de  $380 \text{ mmol mol}^{-1}$  utilizando uma densidade de fluxo de fótons (PPFD) de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com fonte de luz LED azul-vermelho, as condições de temperatura da câmara foram controladas mantendo-se a temperatura das folhas em  $28^\circ\text{C}$  e umidade relativa de aproximadamente 60%. As avaliações foram realizadas em uma planta por vaso e quatro repetições por linhagem.

### 2.2.2 Anatomia foliar

Para a análise das características anatômicas (*secções transversais*), nos terços médios das folhas da espiga foram coletadas três segmentos foliares com 3 cm de largura por repetição, totalizando 18 amostras por tratamento, 22 dias após a imposição do estresse. As amostras foram fixadas em formaldeído, ácido acético glacial e etanol 70% (F.A.A.) por um período de 72 horas e, posteriormente, conservadas em etanol 70%.

O material vegetal foi submetido a uma série etanólica crescente para a desidratação (70, 80, 90 e 100%), à temperatura ambiente de acordo com Johansen (1940), com modificações. Em seguida, o material foi imerso em solução de pré-infiltração, composta por



etanol 100% e resina base (1:1), segundo as instruções do fabricante (Kit Historesina Leica) por 24 horas. Após esse período, prosseguiu-se à infiltração em resina base, por mais 24 horas a 4°C. A polimerização foi realizada em estufa a 50 °C por 12h seguindo instruções do fabricante (Hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg, Alemanha). As secções foram realizadas em micrótomo rotativo semiautomático Yidi YD-335 (Jinhua Yidi Medical Appliance CO., LTD, Zhejiang, China), com espessura de 8 µm, sendo, em seguida, corados em solução de Azul de Toluidina 1% pH 6,7 (FEDER; O'BRIEN, 1968).

As lâminas foram observadas em microscópio trinocular (CX31, Olympus Tokyo, Japan), com sistema de captura acoplado, sendo digitalizados para posterior análise de software de análise de imagem (ImageJ). Foram avaliadas as seguintes características anatômicas no feixe vascular central das folhas: espessura de epiderme abaxial e adaxial, espessura de mesofilo, área de xilema, área de floema, área do feixe vascular, área do metaxilema e área do metafloema.

### 2.3 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados, foi utilizada a análise de variância (ANAVA) e o agrupamento das médias dos tratamentos feito pelo teste de Scott-Knott a 0,05% de significância ( $p \leq 0,05$ ), no programa Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Fluorescência da clorofila e trocas gasosas

O efeito dos diferentes regimes hídricos sobre a característica eficiência quântica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) das linhagens avaliadas são mostrados na Tabela 1. Na condição irrigada, não se observou diferenças significativas entre os resultados apresentados pelas linhagens avaliadas ( $p \leq 0,05$ ). No entanto, como resposta a imposição do estresse hídrico (50% da CC) as linhagens tolerantes 5184180-04, 521223 e G 176-11.2.1 apresentaram valores estatisticamente superiores as linhagens sensíveis 521237, TR6DM25 e L53 para essa característica (Tabela 1).

Não se observou diferenças entre as médias apresentadas para a característica  $A$ , taxa de fotossíntese líquida no ambiente irrigado. No entanto, em condições de estresse hídrico, as linhagens sensíveis à seca 521237, TR6DM25 e L53 apresentaram os maiores valores de  $A$ , não havendo diferenças significativas entre os resultados observados entre elas (Tabela 1).

A condutância estomática ( $g_s$ ) e concentração interna de  $CO_2$  ( $C_i$ ) das linhagens avaliadas não foi alterada estatisticamente nos dois regimes hídricos a que foram submetidas

(Tabela 1).

Observou-se efeito significativo dos regimes hídricos sobre a transpiração, ( $E$ ) das linhagens avaliadas. Na condição irrigada se destacou a linhagem sensível L53, sendo esta responsável pela maior média observada. No ambiente estressado, as linhagens sensíveis 521237, TR6DM25 e L53 apresentaram os maiores valores de  $E$ , tendo a linhagem TR6DM25 destacado-se entre elas (Tabela 1). As linhagens tolerantes 5184180-04, 521223 e G 176-11.2.1 apresentaram os menores valores de transpiração, não havendo diferenças significativas entre os resultados apresentados por elas (Tabela 1).

A eficiência no uso da água ( $EUA$ ), foi significativamente alterada em resposta aos regimes hídricos testados. Na condição irrigada as maiores médias foram observadas para as linhagem tolerante G 176-11.2.1, e as sensíveis 521237 e TR6DM25, não havendo diferenças significativas entre esses resultados. No entanto, sob condições de estresse hídrico as linhagens tolerantes 5184180-04, 521226, G 176-11.2.1, 521237 e a sensível 521223 apresentaram os maiores resultados para a  $EUA$ . No entanto, as linhagens tolerantes à seca apresentaram resultados estatisticamente superiores ao observado para a sensível 521237 conforme apresentado na (Tabela 1). As linhagens TR6DM25 e L53 foram os genótipos que apresentaram os menores valores para a característica  $EUA$ , não havendo diferenças significativas entre eles (Tabela 1).

Com relação à eficiência de carboxilação ( $EiC$ ), não houve diferenças significativas entre os resultados apresentados pelas linhagens nos diferentes regimes hídricos estudados (Tabela 1).

**Table 1.** Photosystem II efficiency (Fv/Fm), photosynthetic rate ( $A$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), stomata conductance ( $g_s$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), intercellular  $\text{CO}_2$  concentration ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), transpiration rate ( $E$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), water use efficiency ( $WUE$ ,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol}^{-1}\text{H}_2\text{O}$ ) and instantaneous carboxylation efficiency ( $EiC$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^2 \text{s}^{-1}$ ) of six maize inbred lines contrasting for drought tolerance cultivated in two different water regimes. Sete Lagoas, MG, Brazil, 2021.

Genotypes	Fv/Fm		$A$		$g_s$		$C_i$		$E$		$WUE$		$EiC$	
	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed
5184180-04	0.790 a†	0.788 b	21.12 a	11.02 a	0.195 a	0.054 a	132.27 a	73.52 a	3.501 a	0.911 a	6.025 a	12.100 c	0.261 a	0.150 a
521223	0.807 a	0.775 b	20.80 a	11.97 a	0.142 a	0.067 a	160.30 a	108.45 a	3.830 a	1.123 a	5.850 a	10.675 c	0.214 a	0.113 a
G 176-11.2.1	0.837 a	0.798 b	29.27 a	14.22 a	0.221 a	0.092 a	134.10 a	122.18 a	3.188 a	1.362 a	9.300 b	10.325 c	0.336 a	0.191 a
521237	0.817 a	0.717 a	20.76 a	21.60 b	0.145 a	0.142 a	108.71 a	141.92 a	2.647 a	3.671 b	8.225 b	7.225 b	0.463 a	0.252 a
TR6DM25	0.807 a	0.732 a	25.68 a	22.70 b	0.174 a	0.145 a	132.95 a	141.97 a	3.435 a	4.972 c	8.075 b	4.575 a	0.200 a	0.186 a
L53	0.807 a	0.702 a	24.15 a	17.63 b	0.191 a	0.094 a	175.67 a	89.69 a	5.284 b	3.403 b	4.600 a	5.125 a	0.141 a	0.267 a
CV (%)	7,1		11.36		3.05		30.36		10.91		9.86		6.73	

†Means followed by the same letter do not differ statistically (Scott-Knott test at  $p \leq 0.05$ ). Letters denote comparisons between inbred lines within the same water regime. CV(%): coefficient of variation. The values were transformed to  $SQRT(X+1)$ .

### 3.2 Anatomia foliar

As linhagens contrastantes para tolerância à seca apresentaram alterações anatômicas significativas em resposta aos regimes hídricos ao qual foram submetidas. Na condição irrigada o maior valor observado para a espessura da epiderme adaxial (EPD), foi apresentado pela linhagem tolerante G 176-11.2.1 (Tabela 2 e Figura 1C). Esse resultado foi seguido pelo apresentado pela linhagem 521223 (tolerante), que por sua vez, foi estatisticamente superior as linhagens 5184180-04 (tolerante), e as linhagens 521237 e TR6DM25 (sensíveis) que apresentaram resultados estatisticamente semelhantes entre si e superiores ao observado para a linhagem sensível L53 (Tabela 2 e Figuras 1ABDEF).

Em condições de restrição hídrica a linhagem tolerante à seca 521233 apresentou EPD média estatisticamente superior às demais, esse resultado foi seguido pelo apresentado pela linhagem também tolerante G 176-11.2.1 sendo esses resultados estatisticamente superiores aos apresentados pelas demais linhagens (Tabela 2 e Figura 1HI).

Os efeitos dos diferentes regimes hídricos sobre a espessura da epiderme abaxial (EPB) estão mostrados na Tabela 2 e Figura 1. Sob a condição irrigada a linhagem G 176-11.2.1, apresentou o maior valor para essa característica, sendo esse resultado estatisticamente superior aos demais. Esse resultado foi seguido pelos apresentados pelas linhagens 5184180-04, 521223, G 176-11-2-1, 521237 e TR6DM25. No entanto, esses resultados foram estatisticamente superiores ao apresentado pela linhagem L53 (Tabela 2 e Figura 1ABCDEF). Em condições de estresse hídrico as linhagens tolerantes 521223 e G 176-11.2.1 apresentaram os maiores valores para espessura da EPB, não havendo diferenças significativas entre esses resultados (Tabela 3 e Figura 1HI).

Na condição irrigada as linhagens G 176.11.2.1 e 521237 apresentaram a maior espessura de mesofilo (MES), não havendo diferenças significativas entre os resultados apresentandos por essas linhagens (Tabela 2 e Figuras 1CD). A linhagem tolerante 521223 apresentou a maior espessura de mesofilo, quando cultivada no ambiente com estresse hídrico (Tabela 2 e Figura 1H).

**Table 2.** Adaxial epiderms (EPD), abaxial epiderms (EPB) and mesophyll thickness (MES) of six maize inbred lines contrasting for drought tolerance cultivated in two different water regimes. Sete Lagoas, MG, Brazil, 2021.

Genotypes	EPD		EPB		MES	
	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed	Irrigado	Stressed
5184180-04	13.25 b†	16.67 a	12.35 b	13.22 a	108.25 a	106.90 a
521223	16.65 c	21.55 c	13.15 b	17.10 b	108.07 a	128.07 b
G 176-11.11.2.1	21.70 d	18.92 b	14.27 c	16.45 b	120.85 b	113.90 a
521237	14.15 b	15.95 a	12.55 b	12.35 a	117.35 b	107.67 a
TR6DM25	13.00 b	15.05 a	11.93 b	12.95 a	99.42 a	110.97 a
L53	10.67 a	13.77 a	8.90 a	12.60 a	97.25 a	94.70 a
CV (%)	10.24		6.09		9.91	

†Means followed by the same letter do not differ statistically (Scott-Knott test at  $p \leq 0.05$ ). Letters denote comparisons between inbred lines within the same,  $\mu\text{m}$ : micrometer, CV(%): coefficient of variation.

Os efeitos dos regimes hídricos sobre a área do feixe (VBA) são mostrados na (Tabela 3 e Figura 2). Na condição irrigada, destacaram-se as linhagens tolerantes 5184180-04, G 176-11.2.1 e a linhagem sensível 521237 por apresentarem as maiores médias para a característica VBA (Tabela 3 e Figura 2BCD). No entanto, as linhagens tolerantes apresentaram médias estatisticamente superiores, a apresentanda pela linhagem 521237 (Tabela 3). Sob restrição hídrica as linhagens tolerantes G 176-11.2.1 e 5184180-04 e a linhagem sensível 521237 apresentaram os maiores valores médios para a característica VBA (Tabela 3 e Figura 2ACD).

A linhagem tolerante G 176-11.2.1 apresentou a maior área de xilema (Xy), quando desenvolvida sem restrição hídrica, sendo esse resultado estatisticamente superior ao apresentado pela linhagem também tolerante 5184180-04 que por sua vez apresentou resultado estatisticamente superior as demais linhagens testadas (Tabela 3 e Figura 2AC).

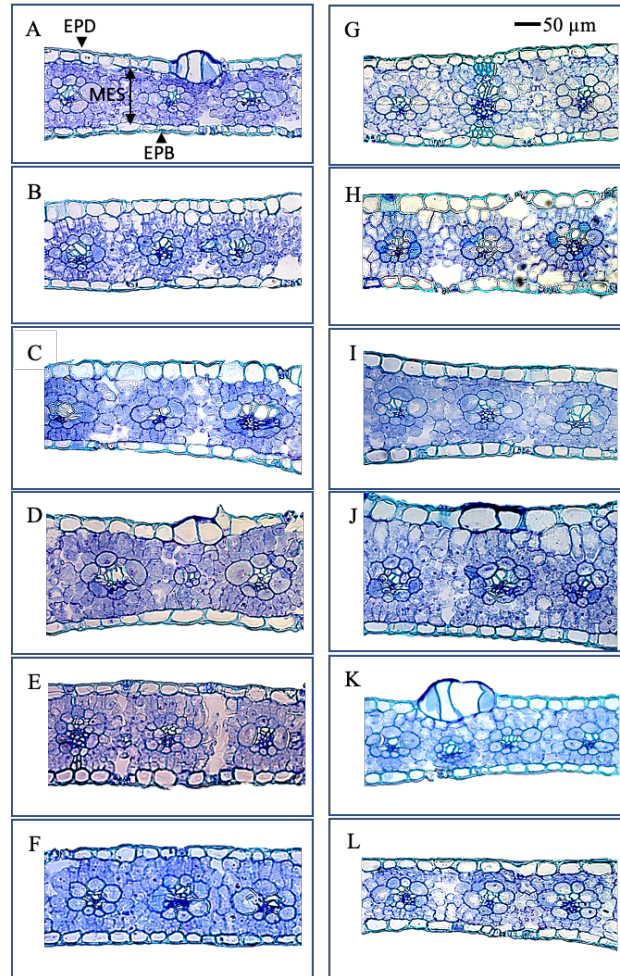
Comportamento semelhante foi observado para a linhagem G 176-11.2.1 quando cultivada sob estresse hídrico, nessa condição esse genótipo apresentou média superior aos apresentandos pelas linhagens 5184180-04 e TR6DM25 que apresentaram resultados estatisticamente semelhantes entre si. Esses resultados foram estatisticamente superiores aos apresentados pelas linhagens tolerante 521223 e a sensível L53 (Tabela 3 e Figura 2HIJLM).

Na condição irrigada as linhagens tolerantes G 5184180-04, 176-11.2.1 e a sensível 521237 apresentaram os maiores valores para a característica área de floema (Ph), não havendo diferenças significativas entre os resultados observados (Tabela 3). Sob estresse hídrico as linhagens tolerantes G 176-11.2.1, 5184180-04, 521237 e a sensível 521223 apresentaram as maiores médias para Ph, sendo os resultados observados estatisticamente semelhantes entre si (Tabela 3).

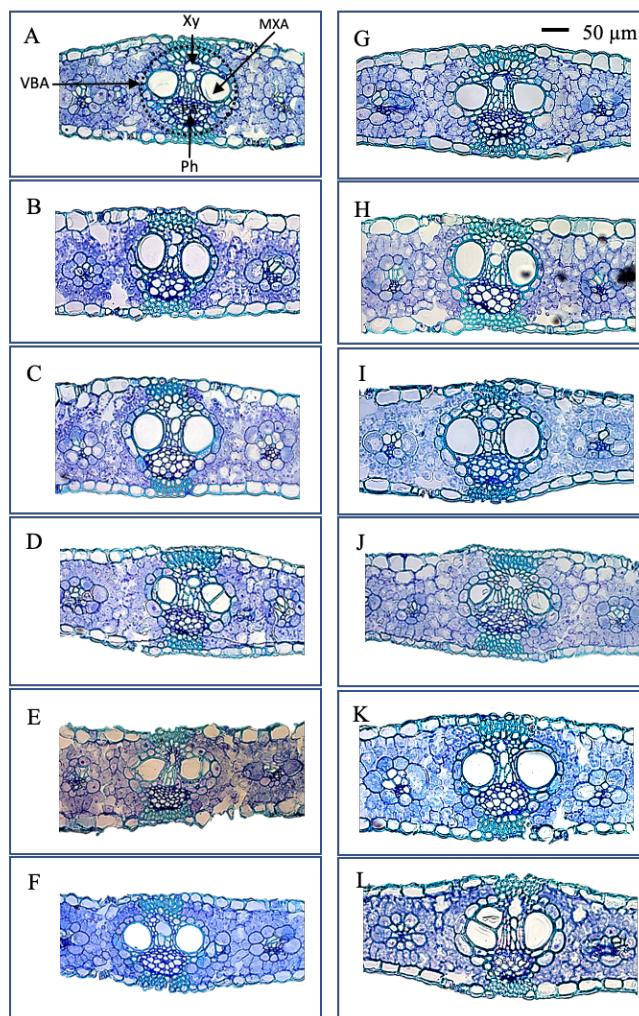
**Table 3.** Response of leaf anatomy characteristics vascular bundle (VBA), xylem (Xy) and phloem total area (Ph) of six maize inbred lines contrasting for drought tolerance cultivated in two water regimes. Sete Lagoas, MG, Brazil, 2021.

Genotypes	VBA ( $\mu\text{m}^2$ )		Xy ( $\mu\text{m}^2$ )		Ph ( $\mu\text{m}^2$ )	
	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed
5184180-04	27521.75 c	27336.72 c	4717.82 b	4840.75 c	3888.95 b	3827.55 b
521223	17048.77 a	19290.75 a	3806.82 a	3892.95 b	2748.22 a	3426.42 b
G 176-11.2.1	28723.15 c	31129.75 d	5985.17 c	6063.12 d	4224.75 b	4258.67 b
521237	24841.45 b	22757.97 b	3078.02 a	3068.85 a	3629.55 b	3832.75 b
TR6DM25	19054.57 a	20243.97 a	3534.17 a	4862.42 c	2869.57 a	2548.12 a
L53	16697.97 a	19677.40 a	3194.60 a	3995.22 b	2379.07 a	2562.95 a
CV (%)	8.32		11.04		11.48	

†Means followed by the same letter do not differ statistically (Scott-Knott test at  $p \leq 0.05$ ). Letters denote comparisons between inbred lines within the same,  $\mu\text{m}^2$ : square micro meter, CV(%): coefficient of variation.



**Figura 1.** Photomicrographies of tanversal leaf sections showing the adaxial epidermis (EPD,  $\mu\text{m}$ ), abaxial epidermis (EPB,  $\mu\text{m}$ ) and mesophyll thickness (MES,  $\mu\text{m}$ ). Figures 1A, 1B, 1C, 1D, 1E and 1F represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 (drought tolerant), and 521237, TR6DM25 e L 53 (drought sensiable) grown under well waltered condition; figures 1G, 1H, 1I, 1J, 1K and 1L represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1, 521237, TR6DM25 and L 53 grown under water estress condition respectively. Sete Lagoas, MG, Brazil. 2021.



**Figura 2.** Photomicrographias de tanversal leaf sections showing the xylem (Xy), phloem (Ph), vascular bundle (VBA), metaxylem (MXy). Figures 2A, 2B, 2C, 2D, 2E and 2F represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 (drought tolerant), and 521237, TR6DM25 e L 53 (drought sensiable) grown under well waltered condition; figures 2G, 2H, 2I, 2J, 2K and 2L represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1, 521237, TR6DM25 and L 53 grown under water estress condition respectively. Sete Lagoas, MG, Brazil. 2021



## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Fluorescência da clorofila e trocas gasosas

As linhagens tolerantes ao estresse hídrico apresentaram os maiores valores para a característica eficiência quântica máxima ( $F_v/F_m$ ), e os menores valores para fotossíntese líquida ( $A$ ) e transpiração ( $E$ ). Essas respostas demonstram que a capacidade fotossintética das linhagens tolerantes foi preservada mesmo em condições de estresse hídrico, e a combinação entre essas respostas com a regulação estomática, evitando a perda de água via transpiração culminaram na maior eficiência no uso da água ( $EUA$ ) apresentado pelos genótipos 5184180-04, 521223 e G 176-11.2.1, quando cultivados no ambiente com restrição hídrica. Limitações na captação de  $CO_2$  imposta pelo fechamento estomático podem causar um desbalanço entre a atividade fotoquímica dos fotossistemas II e I (PSII e PSI) e o requerimento de elétrons pelo Ciclo de Calvin-Benson, levando a um excesso de absorção da energia excitada, e subsequentes danos aos centros de reação (EFEOGLU et al., 2009).

Tal excesso de energia tem o potencial de desencadear uma redução do transporte de elétrons entre o PSII e o PSI o que pode resultar no aumento de espécies reativas de oxigênio (LIU et al., 2018). Podendo também causar a inibição de enzimas, como a Rubisco durante a fixação do carbono (SOUZA et al., 2014; PRADO et al., 2018, VERONEZE-JÚNIOR et al., 2019).

A significativa redução nos valores de  $E$ , tiveram como consequência direta a redução da  $A$ , em resposta ao estresse hídrico. Essa pode ter sido a estratégia utilizada pelas linhagens tolerantes, para evitarem a perda excessiva de água na condição estressada. Entretanto, os maiores valores de  $F_v/F_m$  apresentados por essas linhagens, sugerem que mesmo com a redução dos valores de  $A$ , e maior energia disponível nos fotossistemas, não houve danos nos centros de reação das linhagens tolerantes.

Dessa forma, é plausível sugerir que a redução das trocas gasosas em condição de estresse hídrico, possivelmente evitou danos no aparato fotoquímico. E que depois do período de estresse essas linhagens mantiveram sua capacidade fotossintética, síntese de fotoassimilados e sua translocação para a manutenção dos processos fisiológicos. Comparações entre e dentro de espécies não é novidade, demonstrando que a fotossíntese e transpiração sob condições de déficit hídrico são correlacionadas com  $EUA$ , e podem ser utilizada como ferramenta para seleção genética de genótipos mais eficientes no uso da água (HATFIELD & DOLD, 2019).

Dessa forma, a estratégia utilizada pelas linhagens tolerantes pode ser um possível mecanismo de adaptação à restrição hídrica, evitando possíveis danos aos fotossistemas I e II

preservando a capacidade fotossintética desses genótipos, em condições de restrição hídrica. A redução observada na relação  $F_v/F_m$  foi de 8,9% considerando a média das linhagens sensíveis (0,72) e das tolerantes (0,79). Quando cultivadas sem limitação hídrica a média para a relação  $F_v/F_m$  foi de 0,81 para ambos grupos de linhagens sensíveis e tolerantes. Esses resultados corroboram o papel central da *EUA*, manutenção do aparato fotoquímico das linhagens tolerantes. De acordo com BOLHÁR-NORDEN, KAMPF & ÖQUIST (1993), valores entre 0,85 e 0,75 para relação  $F_v/F_m$ , são considerados fotossistemas não estressados, conforme observado para as linhagens previamente indicadas como tolerantes ao estresse hídrico.

Com a diminuição da assimilação do carbono, não são fornecidos adenosina trifosfato (ATP) e NADPH suficientes para o funcionamento da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCo) devido a redução da taxa de transporte de elétrons, gerando a fotoinibição (MATHOBO *et al.*, 2017). Conseqüentemente, a proporção de centros de reação do fotossistema II abertos (quenching fotoquímico) e a eficiência da fotossíntese diminuem (SOUZA *et al.*, 2013). No entanto, as linhagens tolerantes conforme observado nesse estudo mantiveram seus centros de reação ativos independente do regime hídrico ao qual foram submetidos.

Apesar da manifestação inicial ser principalmente percebida nas trocas gasosas, o estresse hídrico tem efeito muito abrangente sobre o metabolismo de plantas (SOUSA *et al.*, 2017). Essas respostas resultam do fato de que, em geral, a própria limitação hídrica *per se* afeta vários processos metabólicos, e geralmente está associada a um aumento na temperatura e intensidade de luz (PEÑULAS *et al.*, 2004), potencializando os efeitos do estresse hídrico principalmente em ambientes tropicais.

No milho, o fechamento estomático é um dos primeiros eventos que ocorre com o declínio do potencial hídrico foliar e, invariavelmente coincide com a redução da fotossíntese líquida e da transpiração (SOUZA *et al.*, 2013). Essas mudanças na condutância estomática levam a uma melhor eficiência no uso da água (FLEXAS, MEDRANO, 2002).

As linhagens sensíveis ao estresse hídrico 521237, TR6DM25 e L53 mantiveram sua capacidade fotossintética superior aos materiais tolerantes 5184180-07, 521223 e G 176-11.2.1. O aumento na *E*, possibilitou esses materiais manterem a capacidade fotossintética mesmo com baixa disponibilidade hídrica. No entanto, essa característica pode ser indesejável, a depender da severidade e duração do estresse (ÁVILA *et al.*, 2017). Apesar de acarretar em menor assimilação de carbono, o fechamento dos estômatos é eficiente em diminuir a perda de água e, conseqüentemente, evitar a cavitação e embolismo do xilema, processo responsável por

bloquear o transporte de água através da formação de bolhas de ar nos vasos condutores (BRODRIBB; HOLBROOK, 2003; ZHANG *et al.*, 2016).

#### 4.2 Anatomia foliar

As linhagens tolerantes à seca 521223 e G 176-11.2.1 apresentaram maior espessura das epidermes abaxial e adaxial, e mesofilo, respostas estas geralmente observadas em genótipos tolerantes ao estresse hídrico (PIRES *et al.*, 2020). A maior espessura das células do mesofilo apresentado por essas linhagens, contribuiu para o aumento do número de células fotossinteticamente ativas, sem efeitos positivos sobre as taxas de fotossíntese líquida (BACELAR *et al.*, 2004; GUERFEL *et al.*, 2009). Ademais, o aumento da espessura das epidermes evita a saída de água (KAUR; ASTHIR, 2017). Dessa forma, a regulação do processo transpiratório com consequente redução da fotossíntese e aumento da *EUA*, pode ter sido o mecanismo utilizado por essas linhagens para mitigarem os efeitos da restrição hídrica.

A maior área de xilema apresentada pelas linhagens tolerantes 521233 e G 176-11.2.1 e a sensível 521237 analisada de forma isolada pode indicar uma desvantagem, quando cultivadas com restrição hídrica. Pois, a redução na área do tecido vascular, sugere maior capacidade das plantas em manter o transporte de água e redução da possibilidade de cavitação sob deficiência hídrica, uma vez que a embolia é uma das principais causas de morte das plantas durante o estresse hídrico (CHOA *et al.*, 2016). No entanto, os resultados observados nesse estudo, sugerem que os materiais tolerantes ao estresse hídrico, podem utilizar ajustes estomáticos, aumentando a *EUA*, podendo dessa forma reduzir a possibilidade de ocorrência de cavitação.

Em condições de restrição hídrica é comum encontrar na literatura diminuição do diâmetro do vaso, que é uma característica que evita a cavitação (PEREIRA, 2008), pois a presença de vasos estreitos contribui efetivamente para aumentar a condutividade hidráulica. No entanto, HWANG *et al.*, (2016) relatam que as características estruturais de uma rede de vasos do xilema, permitem o transporte estável de água nas plantas, embora os vasos do xilema individuais sejam mais vulneráveis à embolia. Dessa forma, as redes de xilema foram desenvolvidas para fornecer água de forma mais eficiente às folhas e, simultaneamente, proteger contra a cavitação e disseminação da embolia (SPERRY, 2003). Os vasos do xilema também são interligados para fornecer redundância na rede de condutos hidráulicos, oferecendo caminhos alternativos para contornar o elemento de vaso embolizado e manter o transporte de água estável (TYREE *et al.*, 1994; LOEPFE *et al.*, 2007).

De acordo com (SOUZA et al., 2016) genótipos de milho com maior área de floema em condição de estresse podem favorecer o fluxo de fotoassimilados. Conforme observado no presente estudo, as linhagens tolerantes ao estresse hídrico apresentaram valores de área de floema superiores aos apresentados pelas linhagens sensíveis, o que pode ter contribuído para um maior fluxo de fotoassimilados para o enchimento de grãos (dados não apresentados). A larga produção de açúcares pode promover o aumento da área do floema, já que a alta concentração de solutos eleva a pressão osmótica a fim de diminuir o volume de água no xilema, que seria destinado a transpiração (SEVANTO, 2018). A falta de água também pode promover a redução do xilema (área e número) e da área do parênquima celular (AKRAM *et al.*, 2016).

## 5 CONCLUSÕES

As linhagens tolerantes ao estresse hídrico apresentaram maior *EUA* através da regulação estomática.

As linhagens tolerantes ao estresse hídrico apresentaram plasticidade foliar, o que lhes conferiram alterações positivas, tendo como consequência, maior tolerância ao estresse hídrico e incrementos de produtividade.

A utilização de características morfofisiológicas em programas de melhoramento possui grande potencial para seleção de genótipos mais tolerantes ao estresse hídrico.

## REFERENCIAS

- ALMEIDA, G. L., MAGALHÃES, P.C., KARAM, D., SILVA, EDER, M and ALVARENGA, A. A. Chitosan application in the induction of water deficit tolerance in maize plants. *Acta Scientiarum*. Agronomy, v. 42, e42463, 2020.
- AKRAM, N.A., SHAFIQ, S., ASHRAF, M., AISHA, R., SAJID, M.A. Drought-induced anatomical changes in radish (*Raphanus sativus* L.) leaves supplied with trehalose through different modes. *Arid Land Research Management*, v. 30, p. 412–420. 2016a. <https://doi.org/10.1080/15324982.2016.1145760>
- ÁVILA, R., MAGALHAES, P. C., DE ALVARENGA, A. A., LAVINSKY, A. D. O., CAMPOS, C. N., DE SOUZA, T. C., & GOMES JÚNIOR, C. C. Drought-tolerant maize genotypes invest in root system and maintain high harvest index during water stress. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 15, n. 3, p. 450-460, 2017.
- BARCELAR, E. A. et al. (2004). Sclerophylly and leaf anatomical traits of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. *Tree Physiology*, Victoria, v. 24, n. 2, p. 233-239.
- BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Research*, v. 48, n. 1, p. 65-80, 1996.
- BOLHÀR, NORDENKAMPF, H. R.; OQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. – In: HALL, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R. et al., (ed): Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual. Pp. 193-206. Chapman & Hall, London, 1993.
- BRODRIBB, T.J., HOLBROOK, N.M., 2003. Stomatal Closure during Leaf Dehydration , Correlation with Other Leaf Physiological Traits 1. *Plant Physiology*, v. 132, p. 2166–2173. 2014.
- CAMPOS, H.; COOPER, M.; HABBEN, J.E.; EDMEADES, G.O.; SCHUSSLER, J.R. Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crops Research*, Amsterdam, v. 90, p.19-34, 2004.
- CHOA, B. et al. Noninvasive measurement of vulnerability to drought-induced embolism by X-ray microtomography. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 170, p. 273-282, 2016.
- COTROZZI, L.; PERON, R.; TUINSTRÀ, M. R.; MICKELBART, M. V.; COUTURE, J. J. Spectral phenotyping of physiological and anatomical leaf traits related with maize water status. *Plant Physiology* (Bethesda), 2020-11, Vol. 184(3), p.1363-1377.
- DIAS, K. O. G.; GEZAN, S. A.; GUIMARÃES, C.; PARENTONI, S. N.; GUIMARÃES, P. E. O.; CARNEIRO, N. P.; PORTUGAL, A. F.; BASTOS, E. A.; CARDOSO, M. J., ANONI, C. O, MAGALHÃES, J. V.; SOUZA, J. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; PASTINA, M. M. Estimating Genotype × Environment Interaction for and Genetic Correlations among Drought Tolerance Traits in Maize via Factor Analytic Multiplicative Mixed Models. *Crop Sci.* 58:72–83 (2018). doi: 10.2135/cropsci2016.07.0566.

DIAS, K. O. GRAÇAS; GEZAN, S. A.; GUIMARÃES, C. T.; NAZARIAN, A.; SILVA, L. C.; PARENTONI, S. N.; GUIMARÃES, P. E. O.; ANONI, C. O.; PÁDUA, J. M. V.; PINTO, M. O.; NODA, R. W.; RIBEIRO, C. A. G.; MAGALHÃES, J. V.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, J. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; PASTINA, M. M. Improving accuracies of genomic predictions for drought tolerance in maize by joint modeling of additive and dominance effects in multi-environment trials. **Heredity** (2018) 121:24–37. doi.org/10.1038/s41437-018-0053-6.

EFEÖĞLU, B., EKMEKÇI, Y.; ÇIÇEK, N. Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. **South African Journal of Botany** 75 (2009) 34–42.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S.M.A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v.29, p.185-212, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1051/agro:2008021>.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 55, n. 1, p. 123-142, Jan. 1968.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciênc. Agrotec**, Lavras, v. 3, n. 6; p. 1039-1042, nov/dez, 2011.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of Photosynthesis in C3 Plants: Stomatal and Non-stomatal Limitations Revisited. **Annals Of Botany**, v. 89, n. 2, p.183-189, 2002.

GUERFEL, M et al. Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two mais Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 257-263, 2009.

HATFIELD, J. L.; DOLD, C. (2019). Water use efficiency: advances and challenges in a changing climate. **Frontiers in Plant Science**. February 2019; v.10, 103.

HWANG, B. G., RYU, J., LEE, J. S. Vulnerability of Protoxylem and Metaxylem Vessels to Embolisms and Radial Refilling in a Vascular Bundle of Maize Leaves. **Frontier in Plant Science**. June, 2016, v.7,

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; WAHID, A.; FAROOQ, M.; AL-JUBURI, H.J.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.11, p.100-105, 2009.

KHAN, A.; PAN, X.; NAJEEB, U.; TAN, D.K.Y.; FAHAD, S.; ZAHOOR, R.; LUO, H. Coping with drought: stress and adaptive mechanisms, and management through cultural and molecular alternatives in cotton as vital constituents for plant stress resilience and fitness. **Biological Research**, v.51, art.47, 2018. doi.org/ 10.1186/s40659-018-0198-z.

KORUP, K.; LARKE, P.E.; BAADSGAARD, H.; ANDERSEN, M. N.; KRISTENSEN, K., MEUNNICH, C.; DIDION, T.; JENSEN, E. S.; LINDA-MARIA, A. and JORGENSEN, U. Biomass production and water use efficiency in perennial grasses during and after drought stress. **GCB Bioenergy** (2018) 10, 12–27, doi: 10.1111/gcbb.12464

KAUR, G., ASTHIR, B. Molecular responses to drought stress in plants. **Biology Plantarum**, v. 61, p. 1–10. 2017. doi.org/10.1007/s10535-016-0700-9

LAMBERS, H.; CHAPIN, F.; PONS, T. (2008) *Plant physiological ecology*. Springer, New York, p 540.

LIU, J., Y. GUO, Y. BAI, J. CAMBERATO, J. XUE AND R. ZHANG (2018). "Effects of drought stress on the photosynthesis in maize." *Russian journal of plant physiology* 65(6): 849-856.

LOEPFE, L.; MARTINEZ-VIALALTA, J.; PINÖL, MENCUCCINI, M. The relevance of xylem network structure for plant hydraulic efficiency and safety. *Journal of Theoretical Biology* 247 (2007) 788-803.

MARTINS, A. O. Inferências genético-fisiológicas da tolerância à seca em milho. Tese (Doutorado em Agronomia). Campos dos Goytacazes – RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. 140p.

MATHOBO, R.; MARAIS, D., STEYN, J. M. The effect of drought stress on yield, leaf gaseous exchange and chlorophyll fluorescence of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultural Water Management*, v. 180, part a, 2017, p. 118-125, doi.org/10.1016/j.agwat.2016.11.005.

OBIDIEGWU, J.E.; BRYAN, G.J.; JONES, H.G.; PRASHAR, A. Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement. *Frontiers in Plant Science*, v.6, art.542, 2015. DOI: doi.org/10.3389/fpls.2015.00542.

PEÑUELAS J, MUNNÉ-BOSCH S, LLUSIÀ J, FILELLA I. Leaf reflectance and photo- and antioxidant protection in field-grown summer-stressed *Phillyrea angustifolia*. Optical signals of oxidative stress? *New Phytol*. 2004;162:115–24.

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

PIRES, M. V., CASTRO, E. M., FREITAS, B. S. M. LIRA, J. M. SOUZA., MAGALHÃES, P. C., PEREIRA, M. P. Yield-related phenotypic traits of drought resistant maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 171, 2020.

PRADO, S.A., CABRERA-BOSQUET, L., GRAU, A., COUPEL-LEDRU, A., MILLET, E.J., WELCKER, C. and TARDIEU, F., 2018. Phenomics allows identification of genomic regions affecting maize stomatal conductance with conditional effects of water deficit and evaporative demand. *Plant, Cell & Environment*, vol. 41, no. 2, pp. 314-326. http://dx.doi.org/10.1111/pce.13083. PMID:29044609.

SAHEBI, M.; HANAFI, M.M.; RAFII, M.Y.; MAHMUD, T.M.M; AZIZI, P.; OSMAN, M.; ABIRI, R.; TAHERI, S.; KALHORI, N.; SHABANIMOFRAD, M.; MIAH, G.; ATABAKI, N. Improvement of drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.): genetics, genomic tools, and the WRKY gene family. *BioMed Research International*, v.2018, art.3158474, 2018. DOI: doi.org/10.1155/2018/3158474.



SANTOS, T. T.; CASARI, R. A. das C. N.; MOLINARI, H. B. C.; KOBAYASHI, A. K.; SOUZA JÚNIOR, M T.; SILVA, V. N. B.; FERREIRA, T. M. M.; SOUSA, C. A. F. de. Discrimination of responses of corn genotypes to drought through physiological, growth, and yield traits. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. V.56, e01948, 2021. doi.org/10.1590/S1678-3921.pan2021.v56.01948.

SEVANTO, S. Drought impacts on phloem transport. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 43, p. 76–81. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.01.002>

SHEIKH, F. M. et al. Recent advances in breeding for abiotic stress (drought) tolerance in Maize. *Int J Curr Microbiol App Sci*, v. 6, n. 4, p. 2226-2243, 2017.

SOUSA, C.A.F. de; PAIVA, D.S. de; CASARI, R.A. das C.N.; OLIVEIRA, N.G. de; MOLINARI, H.B.C.; KOBAYASHI, A.K.; MAGALHÃES, P.C.; GOMIDE, R.L.; SOUSA JR., M.T. A procedure for maize genotypes discrimination to drought by chlorophyll fluorescence imaging rapid light curves. *Plant Methods*, v.13, art.61, 2017. doi.org/10.1186/s13007-017-0209-z.

SOUZA, T.C., CASTRO, E.M., MAGALHÃES, P. C, LINO, L. O., ALVES, E. T., and ALBUQUERQUE, P.E.P., 2013. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 35, no. 11, pp. 3201-3321.

SOUZA, T.C., MAGALHÃES, P.C., CASTRO, E.M., CARNEIRO, N.P., PADILHA, F.A. and GOMES JÚNIOR, C.C., 2014. ABA application to maize hybrids contrasting for drought tolerance: changes in water parameters and in antioxidant enzyme activity. *Plant Growth Regulation*, vol. 73, no. 3, pp. 205-217.

SOUZA, T.C. de; MAGALHÃES, P.C.; CASTRO, E.M. de; DUARTE, V.P.; LAVINSKY, A.O. Corn root morphoanatomy at different development stages and yield under water stress. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.51, p.330-339, 2016.

SPERRY, J. S.; STILLER, V.; HACKE, U. W. 2003. Xylem hydraulics and the soil-plant-atmosphere continuum: opportunities and unsolved issues. *Agron. J.* 95, 1363-1370.

TYREE, M. T.; DAVIS, S. D.; AND HERVÉ COCHARD. Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? *IAWA Journal*, vol 15(4) 1994.

VERONEZE-JÚNIOR, V., MARTINS, M., MC LEOD, L., SOUZA, K. R. D., SANTOS-FILHO, P. R., MAGALHÃES, P. C., CARVALHO D. T., SANTOS, M. H. AND SOUZA, T. C. Leaf application of chitosan and physiological evaluation of maize hybrids contrasting for drought tolerance under water restriction. *Braz. J. Biol.* 2019.

ZHANG, Y., ROCKWELL, F.E., GRAHAM, A.C., ALEXANDER, T., HOLBROOK, N.M. Reversible Leaf Xylem Collapse : A Potential “ Circuit Breaker ” against Cavitation 1. *Plant Physiology*, v. 172, p. 2261–2274. 2016. doi.org/10.1104/pp.16.01

**ARTIGO 2 - PRODUTIVIDADE DE LINHAGENS DE MILHO CONTRASTANTES  
AO ESTRESSE HÍDRICO, CULTIVADAS À CAMPO EM DUAS CONDIÇÕES  
HÍDRICAS.**

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003) e formatado de acordo com  
o Manual da UFLA.**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a anatomia foliar e rendimento de grãos de linhagens de milho contrastantes para tolerância à seca, cultivadas em dois regimes hídricos em condições de campo. Foram utilizadas seis linhagens do grupo Elite Prioritário do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo com diferentes backgrounds genéticos: 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 (tolerantes à seca) e 521237, TR6DM25 e L 53 (sensíveis à seca). No pré-florescimento foram impostos os tratamentos hídricos com a suspensão da irrigação no tratamento estressado por 30 dias. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados casualizados (DBC) com um fatorial 6 x 2 (seis linhagens e duas condições hídricas) com três repetições. Para a determinação das características anatômicas, foram coletadas três amostras no terço médio das folhas da espiga, 30 dias após a imposição do estresse. As lâminas foram observadas em microscópio trinocular, com sistema de captura acoplado, as imagens foram digitalizadas e analisadas através do software ImageJ. Avaliou-se a espessura das epidermes abaxial e adaxial, espessura de mesofilo, área de xilema, área de floema, e produção de grãos. As análises estatísticas foram realizadas através da ANAVA e as médias dos tratamentos separadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Foi realizado um agrupamento hierárquico aglomerativo da matriz de correlação para variáveis de agrupamento exibindo padrões de correlação semelhantes. A matriz de correlação foi produzida por meio da correlação de Pearson, que testa a força e a direção das relações lineares entre pares de variáveis contínuas. Características morfofisiológicas e principalmente suas correlações possibilitou separar linhagens mais tolerantes ao estresse hídrico. As linhagens tolerantes 5184180-04 e G 176-11.2.1 apresentaram plasticidade foliar, resultando em alterações morfofisiológicas que possibilitaram maior tolerância ao estresse hídrico. O uso de caracteres secundários em programas de melhoramento tem grande potencial para a seleção de genótipos com eficiência no uso da água. Características de anatomia foliar apresentaram forte correlação positiva entre si e com produtividade de grãos.

**Palavras-chave:** milho, anatomia foliar, fenotipagem, produtividade, *EUA*

## ABSTRACT

The objective of this work was to characterize the leaf anatomy and grain yield of maize inbred lines contrasting to drought tolerance, grown in two water regimes under field conditions. Six inbred lines from the Priority Elite Group of Embrapa Maize and Sorghum breeding's program were used: 5184180-04, 521223, G176-11.2.1 (drought tolerant) and 521237, TR6DM25 and L53 (drought sensitive). At pre flowering growth stage the irrigation was suspended in the stressed treatment for 30 days. The experimental design used was randomized complete block (RCB) with a factorial 6x2 (6 inbred line x two water regimes) with three replications. To evaluate anatomical characteristics, three samples were collected in the third portion of the leaf blade per treatment. The slides were observed under a trinocular microscope, with image capture system attached, the images were digitalized analyzed using the software ImageJ. The abaxial and adaxial epidermis and the mesophyll thickness, vascular bundle, xylem and phloem area and grain yield were evaluated. The statistical analysis were performed through ANOVA and treatments means were separated by the Tukey test at  $p \leq 0.05$ . An agglomerative hierarchical clustering of the correlation matrix was performed for cluster variables exhibiting similar correlation patterns. The correlation matrix was produced using Pearson's correlation, which tests the strength and direction of linear relationship between pairs of continuous variables. Morphophysiological characteristics and specially their correlations allowed to separate inbred lines drought stress tolerant. The drought tolerant inbred lines 5184180-04 and G 176-11.2.1 showed leaf plasticity, resulting on morphophysiological alterations increasing their water use efficiency and yield production. The use of morphophysiological traits in breeding programs has great potential for selecting genotypes for water use efficiency. Leaf anatomy traits showed strong and positive correlation with each other and with grain yield.

**Key words:** corn, leaf anatomy, phenotyping, yield, *WUE*

## 1 INTRODUÇÃO

O estresse hídrico em plantas é um fenômeno complexo, e fortemente influenciado pela morfofisiologia, fatores climáticos e suas interações (SANTOS et al., 2021). Dessa forma, o estresse hídrico é considerado a maior limitação ambiental (FAROOQ et al., 2009; ZHU, 2016), podendo impactar negativamente a produtividade das culturas agrícolas. As plantas podem experimentar períodos de estresse hídrico em qualquer momento do seu crescimento e desenvolvimento, assim mecanismos de tolerância podem ser mais importantes a depender da época de ocorrência do referido estresse (TARDIEU, 2012).

O desenvolvimento de genótipos mais tolerantes ao estresse hídrico vem se tornando cada vez mais importante para produção de milho, em regiões com limitação hídrica (ADEE et al., 2016). Para a obtenção de genótipos mais eficientes no uso da água, o melhoramento convencional tem utilizado cada vez mais características morfofisiológicas como critérios de seleção (ZHU, 2002; GHOLIPOOR et al., 2012). Dessa forma, a identificação dessas características, pode ser uma estratégia adicional às características avaliadas dentro de um programa de melhoramento tradicional (RAZMJOO et al., 2008).

O estresse hídrico, particularmente durante o florescimento e enchimento de grãos, pode refletir significativamente no rendimento de grãos (DANTAS JÚNIOR et al., 2016). O cultivo em áreas com limitação e previsões de mudanças climáticas apontam para uma menor disponibilidade de água em muitas regiões produtoras de milho, aumentando dessa forma, a urgência para o desenvolvimento de genótipos mais eficientes no uso de água.

A Embrapa Milho e Sorgo através de suas equipes de melhoramento de milho, fisiologia e de dinâmica de água no sistema solo-planta-atmosfera tem muitos trabalhos científicos publicados, no sentido de validar métodos genético-estatísticos para testar hipóteses de capacidade de combinação e de performance de linhagens de interesse do melhoramento genético. Dentre estes trabalhos, relacionam-se os estudos de inferências genético-fisiológicas (MARTINS, 2012; DIAS et al., 2018a; DIAS et al., 2018b) e morfofisiológicas (LAVINSKY et al., 2015; SOUZA et al., 2016; ÁVILA et al., 2017).

A escolha das linhagens em fenotipagem intermediária tem como propósito a identificação de parâmetros fenotípicos que podem explicar diferenças de respostas a estresses hídricos, bem como busca parâmetros morfofisiológicos que sirvam como base para fenotipagem avançada e mesmo para novo índice de seleção de cultivares, uma vez que estudos focados em parâmetros morfofisiológicos a nível de campo são escassos.

No presente experimento foram avaliadas as linhagens 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 (tolerantes) e 521237, TR6DM25 e L 53 (sensíveis) em resposta a dois regimes hídricos

(capacidade de campo e 50% do teor de água disponível no solo), com o objetivo de avaliar o efeito do estresse hídrico sobre características anatômicas foliares e produtividade em condições de campo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado a campo, na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas - MG, Brasil, situada nas seguintes coordenadas geográficas: 19°26'46.10"S, 44°10'4.11"O, e altitude média de 732m. As médias das temperaturas registradas durante o período experimental foram máxima de 25,7°C e mínima de 12,0°C. A umidade relativa do ar oscilou entre 30% e 75%.

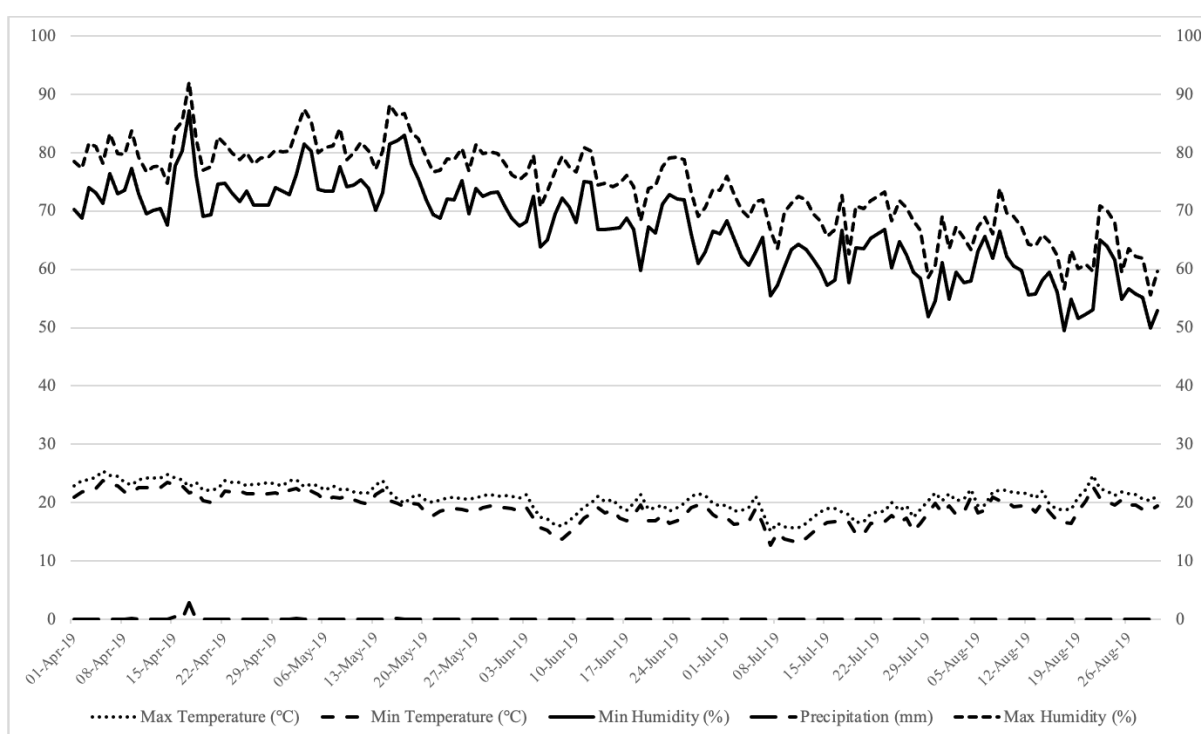
Foram utilizadas seis linhagens do Grupo Elite Prioritário do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, com diferentes backgrounds para tolerância ao estresse hídrico, sendo três linhagens caracterizadas como tolerantes 5184180-04, 521223 e G 176-11.2.1 e três sensíveis 521237, TR6DM25 e L 53. Esses materiais foram previamente avaliados para tolerância à seca (fenotipagem preliminar), pelas equipes de melhoramento de milho, fisiologia e de dinâmica de água no sistema solo-planta-atmosfera da Embrapa Milho e Sorgo, em ensaios conduzidos em Janaúba-MG e Teresina-PI, tanto para avaliações *per se* de linhagens, como também para a avaliação de híbridos obtidos dessas linhagens cruzadas com dois testadores dos grupos heteróticos Flint e Dent, em condições irrigadas e com restrição (SANTOS et al., 2021). Com base nessas informações obteve-se a oportunidade de conduzir o presente estudo em condições de campo.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados (DBC), com três repetições. As parcelas experimentais foram estabelecidas em quatro linhas de plantio de cinco metros de comprimento. Os tratamentos irrigados e estressados foram separados por uma bordadura de 15 metros semeada com o híbrido BRS 1030. A semeadura das linhagens testadas foi realizada mecanicamente, através de uma semeadora de parcelas, utilizando um espaçamento de 0,70 m entre linhas de plantio, e uma densidade populacional de 65.000 plantas.ha<sup>-1</sup> no dia 24/04/2019. A adubação de plantio foi realizada com 500 kg.ha<sup>-1</sup> do formulado 08:28:16 a adubação de cobertura foi realizada no estágio fenológico V6 (seis folhas completamente expandidas) com 100 kg.ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia. Sendo que a colheita realizou-se através de uma colheitadora de parcela.

O teor de água no solo foi mantido na capacidade de campo até o estágio fenológico V15, quando então foram impostos os tratamentos hídricos. No tratamento irrigado foi mantido a umidade na capacidade de campo (CC), enquanto que no tratamento estressado a irrigação foi suspensa, e iniciado o monitoramento da tensão de água com o auxílio de sensores de umidade

modelo GB Reader N1535 (Measurement Engineering, Austrália) instalados no centro parcelas experimentais. As leituras foram realizadas diariamente até que fosse alcançada a tensão de água no solo de -138 KPa, o que corresponde a 50% da CC, a restrição hídrica mantida durante 30 dias.

Os elementos meteorológicos observados durante o período experimental encontram-se na Figura 1. Durante o o crescimento e desenvolvimento das linhagens (do plantio até o estágio fenológico R6, maturidade fisiológica). Não houve o registro de chuvas e as temperaturas mantiveram dentro do esperado para região.



**Figure 1.** Meteorological elements recorded in the research site, covering from planting until R6 growth stage (physiological maturity). Sete Lagoas, MG. Brazil.

## 2.1 CARACTERÍSTICAS AVALIADAS

### 2.1.1 Anatomia foliar

Para a análise das características anatômicas (*secções transversais*), nos terços médios das folhas da espiga, foram coletadas três segmentos foliares com 3 cm de largura por repetição, totalizando 18 amostras por tratamento, 30 dias após a imposição do estresse. As amostras foram fixadas em formaldeído, ácido acético glacial e etanol 70% (F.A.A.) por um período de 72 horas e, posteriormente, conservadas em etanol 70%.

Para as secções transversais, o material foi submetido a uma série etanólica crescente para a desidratação (70, 80, 90 e 100%), à temperatura ambiente de acordo com Johansen (1940), com modificações. Em seguida, o material foi imerso em solução de pré-infiltração, composta por etanol 100% e resina base (1:1), segundo as instruções do fabricante (Kit Historesina Leica) por 24 horas. Após esse período, prosseguiu-se à infiltração em resina base, por mais 24 horas a 4°C. A polimerização foi realizada em estufa a 50°C por 12 h seguindo a instruções do fabricante (Hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg, Alemanha). As secções foram realizadas em micrótomo rotativo semiautomático Yidi YD-335 (Jinhua Yidi Medical Appliance CO., LTD, Zhejiang, China), com espessura de 8 µm, sendo, em seguida, corados em solução de Azul de Toluidina 1% e pH 6,7 (FEDER; O'BRIEN, 1968).

As lâminas foram observadas em microscópio trinocular (CX31, Olympus Tokyo, Japan), com sistema de captura acoplado, sendo digitalizados e analisadas pelo software ImageJ. Foram avaliadas as seguintes características anatômicas: espessura de epiderme abaxial e adaxial, espessura de mesofilo, área do feixe vascular, área de xilema, área de floema.

### 2.1.2 Teor relativo de clorofila

O teor relativo de clorofila (índice SPAD), foi determinado utilizando um clorofilómetro (Minolta, SPAD 502), sendo avaliadas 10 plantas por parcela e três leituras no terço médio da folha adjacente a espiga (30 leituras), no estágio fenológico R2 (grão leitoso).

### 2.1.3 Produtividade

O rendimento de grãos foi determinado nas duas linhas centrais com o auxílio de uma colheitadeira de parcelas. No momento da colheita foi determinado o teor de umidade dos grãos, a estimativa da produtividade com umidade corrigida para 13% (0,13 g.g<sup>-1</sup>).



#### 2.1.4 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados, foi utilizada a análise de variância (ANAVA) e o teste de Tukey para comparação de médias a 0,05% de significância ( $p \leq 0.05$ ), no programa Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011). Foi realizado um agrupamento hierárquico aglomerativo da matriz de correlação (HASTIE et al., 2008; SANTOS et al., 2021) para variáveis de agrupamento exibindo padrões de correlação semelhantes. O método de ligação utilizado foi o médio, com a distância euclidiana. A matriz de correlação foi produzida por meio da correlação de Pearson, que testa a força e a direção das relações lineares entre pares de variáveis contínuas. A interpretação do coeficiente de correlação foi realizada de acordo com MUKAKA (2012). Assim,  $r$  entre  $0,00 < |p| < 0,10$  (correlação nula positiva ou negativa),  $0,1 \leq |p| < 0,30$  (correlação fraca positiva ou negativa),  $0,30 \leq |p| < 0,60$  (correlação moderada positiva ou negativa),  $0,60 \leq |p| < 0,90$  (correlação forte positiva ou negativa),  $0,90 \leq |p| < 1,00$  (correlação muito forte positiva ou negativa),  $p = 1$  (perfeita positiva) e  $p = -1$  (perfeita negativa). No presente estudo foram consideradas somente correlações moderadas, com nível de significância de 5% para a discussão dos resultados.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Anatomia foliar

A linhagem tolerante 521223 apresentou a maior espessura de epiderme abaxial (EPD), sendo esse resultado estatisticamente superior aos apresentados pelas demais linhagens cultivadas no ambiente irrigado (Tabela 1 e Figura 2B). Esse resultado foi seguido pelo apresentado pela linhagem também tolerante 5184180-04, que foi estatisticamente superior a linhagem L53 (Tabela 1 e Figuras 2AF). A linhagem 5184180-04 no entanto, se comportou de forma semelhante as linhagens G 176-11.2.1, 521237 e TR6DM25 (Tabela 1 e Figuras 2ACDE).

No ambiente estressado as linhagens tolerantes 521233 e G 176.11.2.1 apresentaram médias estatisticamente superiores a linhagem sensível TR6DM25 para a característica EPD (Tabela 1 e Figuras 2HIK). No entanto, não se verificou diferenças significativas entre os resultados apresentados pelas linhagens 5184180-04, G 176-11.2.1 521237 e L53 (Tabela 7 e Figuras 5ACDF).

Os efeitos dos diferentes regimes hídricos sobre a espessura da epiderme abaxial (EPB) estão apresentados na Tabela 1 e Figura 2. A linhagem tolerante 521223 apresentou maior média para essa característica na condição irrigada, sendo esse resultado estatisticamente

superior ao apresentado pelas demais linhagens (Tabela 1 e Figura 2B).

No ambiente estressado as linhagens tolerantes 521223 e G 176-11.2.1 apresentaram médias estatisticamente superiores à linhagem tolerante 5184180-04 e à sensível TR6DM25 (Tabela 1 e Figura 2GHIK). No entanto, esses resultados foram estatisticamente semelhantes aos apresentados pelas linhagens sensíveis 521237 e L53 considerando a características EPB (Tabela 1 e Figuras 2GHIJKL).

Considerando a variável MES, a linhagem tolerante 5184180-04 apresentou média estatisticamente superior a linhagem sensível L53 (Tabela 1 e Figura 2 AF). No entanto, mesmo apresentando o maior valor para essa variável, não houve diferenças significativas entre os resultados apresentados pelo genótipo 5184180-04 e 521233, G 176-11.2.1, 521237 e TR6DM25 (Tabela 1 e Figuras 2ABCDE). No ambiente estressado, não houve diferenças significativas entre as médias das observadas (Tabela 1).

**Table 1.** Adaxial epiderms (EPD), abaxial epiderms (EPB) and mesophyll thickness (MES) of six maize inbred lines contrasting for drought tolerance cultivated in two different water

Genotypes	EPD ( $\mu\text{m}$ )		EPB ( $\mu\text{m}$ )		MES ( $\mu\text{m}$ )	
	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed
5184180-04	23.46 b†	17.93 ab	16.86 a	10.90 a	168.76 b	128.03 a
521223	29.26 c	21.96 b	22.33 b	16.20 b	147.33 ab	133.83 a
G 176-11.2.1	21.13 ab	21.96 b	16.50 a	15.90 b	150.66 ab	134.96 a
521237	22.16 ab	19.40 ab	14.40 a	13.00 ab	136.53 ab	122.23 a
TR6DM25	22.46 ab	15.83 a	14.96 a	11.20 a	149.63 ab	126.80 a
L 53	17.06 a	19.33 ab	14.50 a	14.03 ab	108.40 a	136.00 a
CV (%)	10.63		9.35		12.23	

regimes. Sete Lagoas, MG, Brazil. 2021.

†Means followed by the same letter do not differ statistically (Tukey test at  $p \leq 0.05$ ). Letters denote comparisons between inbred lines within the same water regime,  $\mu\text{m}$ : micrometer, CV(%): coefficient of variation.

Os efeitos dos regimes hídricos sobre a área do feixe (VBA) são mostrados na Tabela 2. Na média dos ambientes, a linhagem G 176-11.2.1 apresentou valor estatisticamente superior ao verificado para a linhagem 521233 (Tabela 2 e Figuras 3BC). No entanto, não observou-se diferenças significativas entre as linhagens 5184180-04, 521237, TR6DM25 e L53 (Tabela 2).

A área de xilema (Xy) das linhagens avaliadas não foi alterada em resposta aos regimes hídricos (Tabela 2).

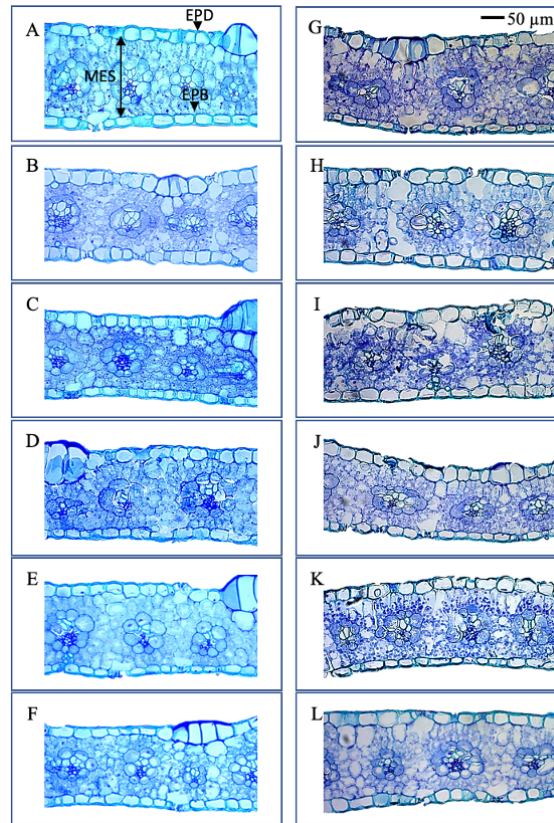
Considerando a variável área de floema (Ph) no ambiente irrigado, a linhagem tolerante G 176-11.2.1 apresentou resultado estatisticamente semelhante ao apresentado pela linhagem também 5184180-04 (Tabela 2 e Figuras 3AC). Não houve no entanto, diferenças significativas

entre as médias apresentadas pelas linhagens 5184180-04 e as linhagens 521233, 521237, TR6DM25 e L3 (Tabela 2 e Figuras 3GHJKL). No ambiente estressado as linhagens 5184180-04 e G176-11.2.1 apresentaram médias estatisticamente superiores a média apresentada pela linhagem TR6DM25 (Tabela 2 e Figuras 3GIK).

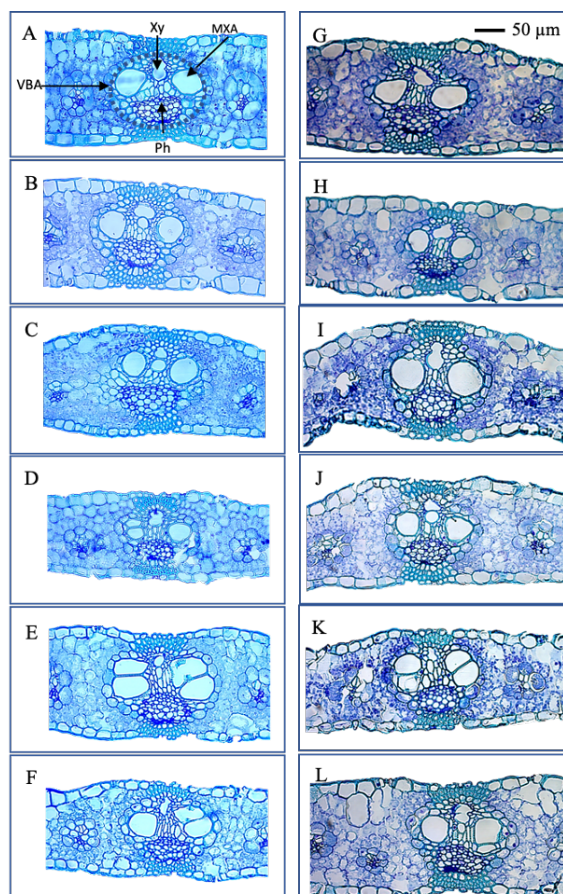
**Table 2.** Vascular bundle (VBA), xylem (Xy) and phloem total area (Ph) of six maize inbred lines contrasting for drought tolerance cultivated in two different water regimes. Sete Lagoas, MG, Brazil. 2021.

Genotypes	VBA ( $\mu\text{m}^2$ )	Xy ( $\mu\text{m}^2$ )	Ph ( $\mu\text{m}^2$ )	
	Indreds Average	Indreds Average	Irrigated	Stressed
5184180-04	38440.4 ab	6207.6 <sup>ns</sup>	5228.3 ab	5351.5 b
521223	28228.0 a	4030.7	4495.8 a	3836.8 ab
G 176-11.2.1	40814.7 b	7324.3	7183.2 b	5619.7 b
521237	32084.7 ab	4776.6	4164.6 a	4774.8 ab
TR6DM25	30151.9 ab	6432.5	4142.8 a	3248.4 a
L 53	31133.8 ab	5525.6	3411.8 a	4885.4 ab
CV (%)	19.85	32.83	16.47	

†Means followed by the same letter do not differ statistically (Tukey test at  $p \leq 0.05$ ). Letters denote comparisons between inbred lines within the same water regime,  $\mu\text{m}^2$ : square micrometer, CV(%): coefficient of variation.



**Figura 2.** Photomicrographias de seções transversais de folhas mostrando a epiderme adaxial (EPD,  $\mu\text{m}$ ), a epiderme abaxial (EPB,  $\mu\text{m}$ ) e a espessura do mesófilo (MES,  $\mu\text{m}$ ). As figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E e 1F representam as linhagens 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 (tolerante à seca), e 521237, TR6DM25 e L 53 (sensíveis à seca) cultivadas sob condições bem irrigadas; as figuras 1G, 1H, 1I, 1J, 1K e 1L representam as linhagens 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1, 521237, TR6DM25 e L 53 cultivadas sob estresse hídrico, respectivamente. Sete Lagoas, MG, Brasil. 2021.



**Figura 3.** Photomicrographies of transversal leaf sections showing the xylem (Xy), phloem (Ph), vascular bundle (VBA). Figures 2A, 2B, 2C, 2D, 2E and 2F represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1 (drought tolerant), and 521237, TR6DM25 e L 53 (drought sensiable) grown under well waltered condition; figures 2G, 2H, 2I, 2J, 2K and 2L represents the inbred lines 5184180-04, 521223, G 176-11.2.1, 521237, TR6DM25 and L 53 grown under drought stress respectively. Sete Lagoas, MG, Brazil. 2021.

### 3.2 Teor relativo de clorofila, massa de mil grãos e produtividade

As linhagens avaliadas não apresentaram diferenças significativas para a característica teor relativo de clorofila (SPAD), no ambiente irrigado. No entanto, sob estresse hídrico a linhagem L 53 apresentou o menor valor de SPAD. Não havendo diferenças significativas entre os valores observados para as linhagens 5184180-04, 521233, G 176-11.2.1, 521237 e TR6DM25 (Tabela 3).

Não houve diferenças significativas para massa de 1000 grãos apresentadas pelas linhagens testadas no ambiente irrigado (Tabela 3). No entanto, quando desenvolvidas no ambiente estressado a linhagem tolerante G 176-11.2.1 apresentou resultado estatisticamente superior aos apresentados pelas linhagens sensíveis 521237 e TR6DM25 (Tabela 3).

Considerando a carcterística produtividade houve diferenças significativas entre as respostas das linhagens nos dois ambientes testados (Tabela 3). Quando cultivadas sem

limitação hídrica, destacaram as linhagens tolerantes 5184180-04 e G 176-11.2.1 por apresentarem produtividades estatisticamente superiores as demais (Tabela 3). Esses resultados foram seguidos pela linhagem tolerante 521133 e a sensível 521237 não havendo diferenças entre esses resultados. As linhagens TR6DM25 e L53 apresentaram as menores produtividades entre os genótipos avaliados (Tabela 3).

No ambiente estressado, a linhagem tolerante G 176-11.2.1 apresentou a maior produtividade entre as linhagens avaliadas. No entanto, não houve diferença significativa entre esse resultado e o apresentado pela linhagem também tolerante 521233 (Tabela 3). Esses resultados foram seguidos pelo apresentado pela linhagem tolerante 5184180-04, que apresentou performance estatisticamente semelhante a apresentada pela linhagem 521233 (Tabela 3).

**Tabela 3.** Relative chlorophyll content (SPAD), 1000 kernel weight and yield of inbred lines contrasting to drought stress grown under different water regimes. Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil.

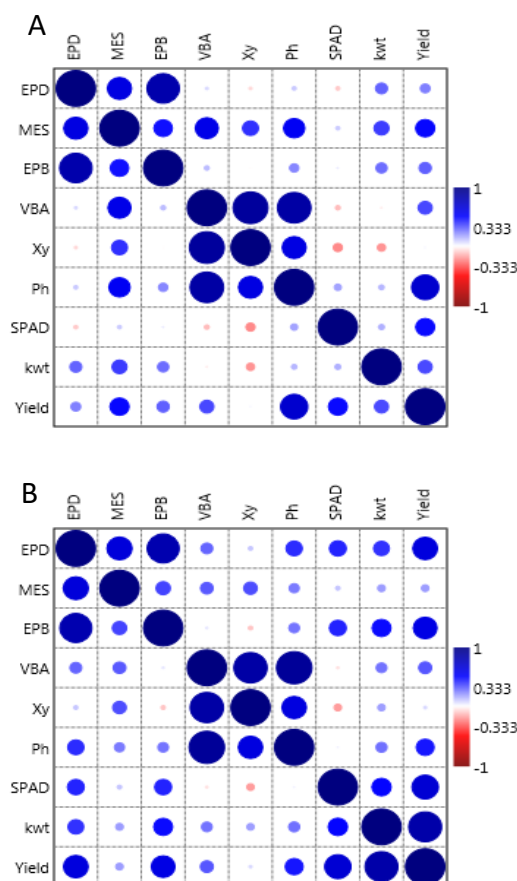
Genotypes	SPAD		1000 kwt (mg)		Yield (kg.ha <sup>-1</sup> )	
	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed	Irrigated	Stressed
5184180-04	51.56 <sup>ns</sup>	44.40 b	282.73 <sup>ns</sup>	261.73 ab	3944.43 c <sup>†</sup>	2357.16 bc
521223	47.30	49.60 b	271.83	278.13 ab	2500.00 b	2912.70 cd
G 176-11.2.1	48.80	44.20 b	262.73	321.50 b	4285.70 c	3714.26 d
521237	43.53	40.80 b	250.70	197.37 a	1841.27 b	1650.80 b
TR6DM25	47.16	44.00 b	231.70	212.26 a	761.90 a	531.73 a
L53	45.96	29.93 a	219.36	238.63 ab	722.23 a	388.90 a
CV (%)	8.79		16.79		18.86	

<sup>†</sup>Means with same letters are not significantly different from each other within the same water regime. <sup>ns</sup> not significant at 5%, CV(%): coefficient of variation.

Os coeficientes de correlação entre as variáveis resposta no ambiente irrigado são apresentados na Tabela 4. A característica espessura EPD apresentou forte coeficiente de correlação com espessura de MES e EPB. De forma semelhante a espessura de MES apresentou coeficientes de correlação moderado com as características EPB, VBA, Ph e Yield (produtividade). As características VBA e Xy, Ph apresentaram forte correlação. As características Xy e Ph apresentaram forte correlação. A área de floema apresentou correlação forte com produtividade. O teor de clorofila (SPAD) apresentou forte correlação com produtividade (Tabela 4 e Figura 4A).

Na Tabela 5 são mostrados os coeficientes de correlação entre as variáveis resposta no ambiente com restrição hídrica. As características EPD, MES, EPB e Yield; e EPB, Yield e

peso de 1000 grãos (kwt) apresentaram fortes coeficientes de correlação, VBA, Xy e Ph apresentaram coeficientes de correlação forte e muito forte (Tabela 5). A característica Xy e Ph apresentaram forte correlação, assim como SPAD, kwt e Yield (Tabela 5). As variáveis kwt e Yield também apresentaram forte correlação conforme descrito na Tabela 5 e Figura 4B).



**Figure 4.** Correlations among morphophysiology variables measured in corn leaves whose plants were grown under irrigation (A) and drought stress (B). Correlations were obtained from the averages of the variables. Above the diagonal are the correlations coefficients among the variables at 5% of significance, below the diagonal are the correlations strength among variables. Abbreviations: EPD, epidermis adaxial ( $\mu\text{m}$ ); MES, mesofilo thickness ( $\mu\text{m}$ ); EPB, abaxial epidermis ( $\mu\text{m}$ ); VBA, vascular bundle area ( $\mu\text{m}^2$ ); Xy, xylem area ( $\mu\text{m}^2$ ); Ph, phloem area ( $\mu\text{m}^2$ ); Yield, grain production ( $\text{tons}\cdot\text{ha}^{-1}$ ); kwt, kernel individual weight (mg), SPAD, chlorophyll content.

**Table 4.** Correlations among morfophysiology variables measured in corn leaves whose plants were grown under irrigation. Correlations were obtained from the averages of the variables, above the diagonal are the correlations coefficients among the variables (significant at 5%), below the diagonal are the correlations strength among variable. Sete Lagoas, MG. Brazil, 2021.

Characteristics	EPD	MES	EPB	VBA	Xy	Ph	SPAD	kwt	Yield
<b>EPD</b>	1	0.01*	0.00*	0.77	0.76	0.68	0.68	0.22	0.32
<b>MES</b>	0.62	1	0.05*	0.01*	0.09	0.02*	0.68	0.12	0.04*
<b>EPB</b>	0.82	0.47	1	0.61	0.98	0.35	0.88	0.25	0.21
<b>VBA</b>	0.08	0.59	0.13	1	0.00*	0.00*	0.61	0.88	0.14
<b>Xy</b>	-0.08	0.41	-0.01	0.89	1	0.01*	0.36	0.41	0.95
<b>Ph</b>	0.11	0.54	0.23	0.85	0.61	1	0.48	0.57	0.00*
<b>SPAD</b>	-0.10	0.10	0.04	-0.13	-0.23	0.18	1	0.54	0.04*
<b>kwt</b>	0.30	0.38	0.29	-0.04	-0.21	0.14	0.15	1	0.15
<b>Yield</b>	0.25	0.49	0.31	0.36	0.02	0.69	0.48	0.36	1

Abbreviations: EPD, epidermis adaxial ( $\mu\text{m}$ ); MES, mesofilo thickness ( $\mu\text{m}$ ); EPB, abaxial epidermis ( $\mu\text{m}$ ); VBA, vascular bundle area ( $\mu\text{m}^2$ ); Xy, xylem area ( $\mu\text{m}^2$ ); Ph, phloem area ( $\mu\text{m}^2$ ); Yield, grain production ( $\text{tons}\cdot\text{ha}^{-1}$ ); kwt, kernel individual weight (mg), SPAD, chlorophyll content, significant at 5%.

**Table 5.** Correlations among morfophysiology variables measured in corn leaves whose plants were grown under drought stress. Correlations were obtained from the averages of the variables, above the diagonal are the correlations coefficients among the variables (in red significant at 5% in blue significant at 10%), below the diagonal are the correlations strength among variable. Sete Lagoas, MG. Brazil, 2021.

Characteristics	EPD	MES	EPB	VBA	Xy	Ph	SPAD	kwt	Yield
<b>EPD</b>	1	0.01*	0.00*	0.24	0.67	0.10	0.09	0.11	0.01*
<b>MES</b>	0.64	1	0.15	0.20	0.17	0.32	0.66	0.46	0.46
<b>EPB</b>	0.81	0.37	1	0.85	0.66	0.29	0.08	0.05*	0.01*
<b>VBA</b>	0.30	0.32	0.05	1	0.00*	0.00*	0.82	0.29	0.19
<b>Xy</b>	0.11	0.35	-0.11	0.85	1	0.01*	0.46	0.47	0.77
<b>Ph</b>	0.42	0.26	0.27	0.90	0.62	1	0.92	0.28	0.06
<b>SPAD</b>	0.43	0.12	0.43	-0.06	-0.19	0.03	1	0.05*	0.00*
<b>kwt</b>	0.40	0.19	0.48	0.27	0.19	0.28	0.49	1	0.00*
<b>Yield</b>	0.63	0.19	0.60	0.33	0.08	0.46	0.67	0.84	1

Abbreviations: EPD, epidermis adaxial ( $\mu\text{m}$ ); MES, mesofilo thickness ( $\mu\text{m}$ ); EPB, abaxial epidermis ( $\mu\text{m}$ ); VBA, vascular bundle area ( $\mu\text{m}^2$ ); Xy, xylem area ( $\mu\text{m}^2$ ); Ph, phloem area ( $\mu\text{m}^2$ ); Yield, grain production ( $\text{tons}\cdot\text{ha}^{-1}$ ); kwt, kernel individual weight (mg), SPAD, chlorophyll content, significant at 5%.



#### 4 DISCUSSÃO

No presente estudo as linhagens tolerantes ao estresse hídrico apresentaram o maior conjunto de características morfofisiológicas favoráveis ao seu crescimento e desenvolvimento, com efeito direto sobre a produção de grãos. Essas respostas diferenciadas apresentadas pelas diferentes linhagens foram desenvolvidas devido à plasticidade, em resposta ao estresse hídrico. Alterações na plasticidade foliar foi documentado por (MAGALHÃES et al., 2009) trabalhando com diferentes ciclos de seleção da variedade de milho Saracura em condições de hipóxia. Muitos estudos têm como hipótese que a plasticidade confere às plantas condições de se adaptarem a diferentes ambientes, possibilitando adaptações morfofisiológicas sem a necessidade de alterações genéticas (PIRES et al., 2020).

As características da espessura das epidermes abaxial, adaxial e MES desempenham importante papel evitando a perda de água para a atmosfera e na capacidade fotossintética (LINO, 2011; KAUR; ASTHIR, 2017). A forte correlação positiva existente entre essas características como a produção de grãos (Yield), corrobora com a interação entre essas variáveis possibilitando maior eficiência no uso da água (*EUA*), e conseqüentemente a maior produção de grãos mesmo em condições de estresse hídrico.

O incremento nas médias das características VBA, Xy e Ph e a forte correlação entre elas, observado nas linhagens tolerantes 5184180-04 e G 176-11.2.1 sugere que essas linhagens apresentem maior capacidade de transporte de água, assim como podem apresentar maior capacidade de translocação de fotoassimilados das folhas para o enchimento de grãos mesmo em condições de restrição hídrica, beneficiando a relação fonte dreno dessas linhagens.

No entanto, existem muitos relatos que a diminuição do diâmetro de elementos do vaso, é uma característica que evita a cavitação, pois a presença de vasos estreitos contribuem efetivamente para aumentar a condutividade hidráulica em resposta ao estresse hídrico (PEREIRA, 2008; PIRES et al., 2020). No entanto, conforme relatado por HWANG et al., (2016) características estruturais formando rede de vasos do xilema, possibilitam o transporte estável de água nas plantas. Embora os vasos individuais sejam mais vulneráveis a embolia, as redes foram desenvolvidas para fornecer água de forma mais eficiente às folhas e, simultaneamente, proteger contra a cavitação e disseminação da embolia (SPERRY, 2003). Os vasos do xilema também são interligados para fornecer redundância na rede de condutos hidráulicos, oferecendo caminhos alternativos para contornar o elemento de vaso embolizado e manter o transporte de água estável (TYREE et al., 1994; LOEPFE et al., 2007).

O estresse hídrico pode ter como consequência o aumento, redução, ou mesmo não gerar nenhuma alteração no teor de clorofila (SONG et al., 2018). Considerando que não houve

diferença entre os teores de clorofila apresentados pelas linhagens, com exceção da linhagem L53 no ambiente estressado, a forte correlação observada entre SPAD, massa de 1000 grãos (1000 kwt) e produtividade é um indicativo que as linhagens tolerantes ao estresse hídrico, utilizaram de um conjunto de características e a interação entre elas para garantir eficiência fotossintética e translocação dos fotoassimilados para o enchimento de grãos.

Comparando a performance das linhagens com relação a rendimento de grãos, as maiores produtividades foram observadas para os genótipos tolerantes à seca. Esses resultados juntamente aos observados para massa de 1000 grãos corroboram que uma possível regulação do processo de trocas gasosas, aumentaram *EUA* desses genótipos. Em condição de estresse, essa pode ter sido estratégia utilizada por essas linhagens para assegurar uma maior eficiência fotossintética e ganhos em produtividade.

A quantidade de biomassa produzida por unidade de água utilizada pelas plantas é conhecida como eficiência no uso da água, *EUA* (HATFIELD & DOLD, 2019). Dessa forma o incremento na produção de grãos sugere que as linhagens tolerantes apresentaram maior capacidade fotossintética associada com a maior capacidade de translocação desses fotoassimilados. Esses resultados estão alinhados com os observados por SOUZA et al., (2016) que trabalhando com genótipos contrastantes de milho, observaram maior área de floema em condição de estresse, o que pode ter favorecido o fluxo de fotoassimilados para o enchimento de grãos.

Trabalhando com diferentes genótipos de milho, SANTOS et al., (2021) observaram alta correlação entre características fisiológicas (CF) e de produção, concluindo que CF foram mais efetivas na discriminação e performance desses genótipos sob condições de estresse hídrico.

Alterações morfofisiológicas de alta herdabilidade e correlação com mecanismos de tolerância ao estresse hídrico ocorrem devido à plasticidade fenotípica apresentada por genótipos com diferentes *backgrounds* para tolerância ao estresse hídrico, conforme as apresentadas pelas linhagens testadas nesse estudo. Essas características vêm sendo incorporadas em programas de melhoramento, para seleção de genótipos mais adaptados a estresses abióticos (BOLANÕS & EDMEADES., 1996). O conhecimento das correlações entre essas características é muito importante, pois o melhorista tem condições de orientar a seleção de forma indireta para aqueles caracteres de interesse.

## 5 CONCLUSÕES

Características morfofisiológicas e principalmente suas correlações possibilitou separar linhagens mais tolerantes ao estresse hídrico.

As linhagens tolerantes 5184180-04 e G 176-11.2.1 apresentaram plasticidade foliar, o que lhes conferiu alterações positivas, tendo como consequência, maior tolerância ao estresse hídrico e incrementos de produtividade.

A utilização de características morfofisiológicas em programas de melhoramento possui grande potencial para seleção de genótipos mais tolerantes ao estresse hídrico.

Características de anatomia foliar apresentaram correlação positiva entre si e com a produção de grãos.

## REFERÊNCIAS

- ADEE, ERIC., ROOZEBOOM, KRAIG., BALBOA, R. G., ACHLEGEL, A., AND CIAMPITTI, I. A. Drought-tolerant Corn Hybrids Yield More in Drought-Stressed Environments with no Penalty in Non-Stressed Environments. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, October, 2016.
- ÁVILA, R., MAGALHAES, P. C., DE ALVARENGA, A. A., LAVINSKY, A. D. O., CAMPOS, C. N., DE SOUZA, T. C., & GOMES JÚNIOR, C. C. Drought-tolerant maize genotypes invest in root system and maintain high harvest index during water stress. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 15, n. 3, p. 450-460, 2017.
- BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Research*, v. 48, n. 1, p. 65-80, 1996.
- DANTAS JUNIOR, E. E; CHAVES, L. G.; FERNANDES, J. D. Lâminas de irrigação localizada e adubação potássica na produção de milho verde, em condições semiáridas. *Revista Espacios*, v. 37, n. 27, p. 26, 2016.
- DIAS, K. O. G.; GEZAN, S. A.; GUIMARÃES, C.; PARENTONI, S. N.; GUIMARÃES, P. E. O.; CARNEIRO, N. P.; PORTUGAL, A. F.; BASTOS, E. A.; CARDOSO, M. J., ANONI, C. O, MAGALHÃES, J. V.; SOUZA, J. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; PASTINA, M. M. Estimating Genotype Environment Interaction for and Genetic Correlations among Drought Tolerance Traits in Maize via Factor Analytic Multiplicative Mixed Models. *Crop Sci.* 58:72–83 (2018). doi: 10.2135/cropsci2016.07.0566.
- DIAS, K. O. GRAÇAS; GEZAN, S. A.; GUIMARÃES, C. T.; NAZARIAN, A.; SILVA, L. C.; PARENTONI, S. N.; GUIMARÃES, P. E. O.; ANONI, C. O.; PÁDUA, J. M. V.; PINTO, M. O.; NODA, R. W.; RIBEIRO, C. A. G.; MAGALHÃES, J. V.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, J. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; PASTINA, M. M. Improving accuracies of genomic predictions for drought tolerance in maize by joint modeling of additive and dominance effects in multi-environment trials. *Heredity* (2018) 121:24–37. doi.org/10.1038/s41437-018-0053-6.
- FAROOQ M, WAHID A, KOBAYASHI N, FUJITA D, BASRA S.M.A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29, 185–212. (2009).
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*, Lancaster, v. 55, n. 1, p. 123-142, Jan. 1968.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. *Ciênc. Agrotec*, Lavras, v. 3, n. 6; p. 1039-1042, nov/dez, 2011.
- GHOLIPOOR, M.; SINCLAIR, T, R. & PRASAD, P. V. V. Genotypic variation within sorghum for transpiration response to drying soil. *Plant Soil*.357, 35-40 (2012).
- HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R.; FRIEDMAN, J.H. **The elements of statistical learning: data mining, inference and prediction.** 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer, 2008. 745p.

HATFIELD, J. L.; DOLD, C. (2019). Water use efficiency: advances and challenges in a changing climate. *Frontiers in Plant Science*. February 2019; v.10, 103.

HWANG, B. G., RYU, J., LEE, J. S. Vulnerability of Protoxylem and Metaxylem Vessels to Embolisms and Radial Refilling in a Vascular Bundle of Maize Leaves. *Frontier in Plant Science*. June, 2016, v.7,

KAUR, G., ASTHIR, B. Molecular responses to drought stress in plants. *Biology Plantarum*, v. 61, p. 1–10. 2017. doi.org/10.1007/s10535-016-0700-9.

LAVINSKY AO, MAGALHÃES PC, ÁVILA R, GOMES-JR CC, CARNEIRO NP (2015). Analysis of Maize Photosynthesis Parameters and Whole Plant Oxidative Damage Under Long-term Drought. *Adv Crop Sci Tech S1*: 007. doi:10.4172/2329-8863. S1-007.

MAGALHÃES, P.C.; SOUZA, T. C.; ALBUQUERQUE, P. E. P.; KARAM, D.; MAGALHÃES, M. M.; CANTAO, F. R. O. Caracterização ecofisiológica de linhagens de milho submetidas a baixa disponibilidade hídrica durante o florescimento. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.8, n.3, p. 223-232, 2009. doi.or/10.18512/1980-6477/rbms.v8n03p%25p.

LINO, L. O. **Características anatômicas e fisiológicas de genótipos de sorgo contrasntantes para tolerância à seca**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Lavras – MG. Universidade Federal de Lavras – UFLA. 85p.

LOEPFE, L.; MARTINEZ-VIALALTA, J.; PINÖL, MENCUCCINI, M. The relevance of xylem network structure for plant hydraulic efficiency and safety. *Journal of Theoretical Biology* 247 (2007) 788-803.

MARTINS, A. O. **Inferências genético-fisiológicas da tolerância à seca em milho**. Tese (Doutorado em Agronomia). Campos dos Goytacazes – RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. 140p.

MUKAKA, M.M. Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, v.24, p.69-71, 2012. DOI: <https://doi.org/10.4314/MMJ.V24I3>.

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

PIRES, M. V., CASTRO, E. M., FREITAS, B. S. M. LIRA, J. M. SOUZA., MAGALHÃES, P. C., PEREIRA, M. P. Yield-related phetotypic traits of drought resitant maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 171, 2020.

SANTOS, T. T.; CASARI, R. A. das C. N.; MOLINARI, H. B. C.; KOBAYASHI, A. K.; SOUZA JÚNIOR, M T.; SILVA, V. N. B.; FERREIRA, T. M. M.; SOUSA, C. A. F. de. Discrimination of resposnes of corn genotypes to drought through physiological, growth, and yield traits. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. V.56, e01948, 2021. DOI://<https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pan2021.v56.01948>.

SONG, H.; LI, Y.; ZHOU, L.; XU, Z.; ZHOU, G. Maize leaf functional responses to drought episode and rewatering. **Agricultural and Forest Meteorology**. V.249, 2018, p. 57-70. doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.11.023.

SOUZA, T.C. de; MAGALHÃES, P.C.; CASTRO, E.M. de; DUARTE, V.P.; LAVINSKY, A.O. Corn root morphoanatomy at different development stages and yield under water stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, p.330-339, 2016.

SPERRY, J. S.; STILLER, V.; HACKE, U. W. 2003. Xylem hydraulics and the soil-plant-atmosphere continuum: opportunities and unsolved issues. **Agron. J.** 95, 1363-1370.

RAZMJOO, K., P. HEYDARIZADEH AND M.R. SABZALIAN. Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. **Int. J. Agric. Biol.**, 10: 451–454. 2008.

TARDIEU, F. Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.25-31, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/err269>.

TYREE, M. T.; DAVIS, S. D.; AND HERVÉ COCHARD. Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? **IAWA Journal**, vol 15(4) 1994.

ZHU, J.K., Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 53: 247–273, 2002.

ZHU, J. K. Abiotic stress signaling and responses in plants. **Cambridge**, v. 167, n. 2, p. 313-324, 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.