

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

Trocas gasosas e Metabolismo Antioxidativo em plantas de girassol em resposta ao déficit hídrico

Marília Mércia Lima Carvalho Carneiro

Pelotas, 2011

Marília Mércia Lima Carvalho Carneiro

Trocas gasosas e metabolismo antioxidativo em plantas de girassol em resposta ao déficit hídrico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Sidnei Deuner

Co-orientador: Dr. Marcos Antonio Bacarin

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C289t Carneiro, Marília Mércia Lima Carvalho
Trocas gasosas e Metabolismo Antioxidativo em plantas de girassol em resposta ao déficit hídrico / Marília Mércia Lima Carvalho Carneiro. – 42f. : gráf. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2011. – Orientador Sidnei Deuner ; co-orientador Marcos Antonio Bacarin.

1. *Helianthus annuus* L. 2. Estresse. hídrico
3. Fotossíntese. 4. Enzimas antioxidantes. 5. Girassol.
I. Deuner, Sidnei. II. Bacarin, Marcos Antonio. III. Título.

CDD: 583.55

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sidnei Deuner

Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Dr^a. Ilisandra Zanandrea

**À minha família,
DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e proteger sempre;

Ao meu orientador, professor Sidnei Deuner, pela atenção, dedicação, aprendizado, e principalmente pela amizade dedicada a mim nesse período;

Ao professor, Marcos Antonio Bacarin por permitir o desenvolvimento da pesquisa no Laboratório de Metabolismo Vegetal;

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal por todo o apoio;

À banca examinadora pela contribuição e ensinamentos;

Aos meus colegas que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho: Anelise Perboni, Camila Sousa, Emanuela Martinazzo, Márcio Farias, Pablo Valadão, Henrique Chiarelo, Isabel Borba e Sheila Bigolin;

Aos amigos desse Programa por todo esse período de muito companheirismo e amizade, em especial a Ane, Camila, Manu, Janete e Márcio;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante o curso;

E às pessoas essenciais em minha vida, na qual sem elas eu não estaria aqui:

A Papai e Mamãe, pelo amor, apoio, incentivo, “presença” e por não medirem esforços para me ajudar a alcançar os meus objetivos! Serei sempre grata!

Aos meus irmãos, Bárbara e Luan, pelo incentivo e apoio em todos os momentos, principalmente, naqueles em que as forças pareciam estar se esgotando;

À Titia Zana, por todo empenho e dedicação, pois sem ela, com certeza, esse trabalho não teria sido desenvolvido por mim;

À Juci, companheira de morada, por todos os momentos;

A Micael Martins e a Nilce Rosaura, pela presença, atenção e, principalmente, pelo amor e carinho, que me ajudou a suportar a falta da minha família e vencer mais essa etapa! Muito obrigada!

E por fim, a todos meus amigos que torceram e emitiram energias positivas para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

*“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele,
mas aquilo em que ele nos transforma.”*

(John Ruskin)

RESUMO

CARNEIRO, Marília Mércia Lima Carvalho. **Trocas gasosas e metabolismo antioxidativo em plantas de girassol em resposta ao déficit hídrico**. 2011. 42f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O presente estudo teve por objetivo avaliar parâmetros relacionados à fotossíntese e metabolismo antioxidante em duas cultivares de girassol submetidas a diferentes regimes hídricos, na fase inicial de crescimento. Sementes das cultivares MG2 e M735 foram semeadas em vasos com capacidade para 10 L, utilizando solo como substrato. Trinta dias após a semeadura foi realizado um desbaste mantendo quatro plantas por vaso, irrigadas diariamente. Após dois meses foram estabelecidos os tratamentos, onde uma parcela das plantas de cada cultivar foi mantida irrigada diariamente (controle) e a outra submetida à suspensão total da irrigação (déficit hídrico). Após 24 horas, cinco e doze dias da indução dos tratamentos, na antemanhã foi avaliado o potencial hídrico foliar e nas primeiras horas seguintes o índice de clorofila. Entre 9:00 e 10:00 horas foram mensurados parâmetros fotossintéticos e fluorescência da clorofila *a*. A seguir, folhas e raízes foram coletadas e armazenadas em freezer a - 80°C para quantificação dos danos celulares e atividade de enzimas antioxidantes. Em resposta ao estresse hídrico imposto, ao final das avaliações, observou-se uma queda acentuada no potencial hídrico das duas cultivares. Por outro lado, o índice de clorofila sofreu queda somente na cv M735. A queda no potencial de água nas folhas refletiu em reduções na condutância estomática, taxa transpiratória, assimilação líquida do CO₂ e na sua concentração interna para as duas cultivares, destacando maiores reduções na transpiração e concentração interna de CO₂, o que justifica o aumento da eficiência no uso da água para ambas as cultivares. A fluorescência da clorofila *a* apresentou queda na eficiência quântica fotoquímica efetiva (F_V'/F_M') e na produção quântica efetiva do FS II (Φ_{PS2}) nas plantas da cv MG2. Nesse mesmo período foi observado aumento nos níveis de peroxidação de lipídios, teores de H₂O₂ e na atividade das enzimas SOD e CAT, com maior diferença em relação ao controle, principalmente, na cv M735, que evitou de forma mais efetiva o estresse oxidativo.

Palavras-chave: *Helianthus annuus* L., estresse hídrico, fotossíntese; enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

CARNEIRO, Marília Mércia Lima Carvalho. **Gas exchange and antioxidative metabolism in sunflower plants in response to drought**. 2011. 42f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

This study aimed evaluate parameters related to photosynthesis and antioxidant metabolism in two sunflower cultivars under different water regimes in the initial growth phase. Seeds of the cultivars MG2 and M735 were grown in pots with a capacity of 10 L, using soil as substrate. Thirty days after sowing was done a thinned to four plants per pot, watered daily. Two months after the treatments were established, where a portion of the plants of each cultivar was kept watered daily (control) and another submitted to the full suspension of irrigation (water deficit). After 24 hours, five and twelve days of induction treatment in predawn leaf water potential was measured and leaf chlorophyll content in the early hours. Between 9:00 and 10:00 hours were measured photosynthetic parameters and chlorophyll fluorescence. Then, leaves and roots were collected and stored in a freezer at -80°C for quantification of cell damage and antioxidant enzymes. In response to water stress imposed at the end of the evaluations, there was a sharp drop in water potential of both cultivars. On the other hand, the chlorophyll index was down only in cv M735. The decline in leaf water potential reflected in reductions in stomatal conductance, transpiration rate, net assimilation of CO_2 and its internal concentration in both cultivars, emphasizing greater reductions in transpiration and internal CO_2 concentration, hence increasing efficiency water use for both varieties. The fluorescence of chlorophyll a decreased effective quantum yield photochemistry (F_v' / F_M') and produce effective quantum of photosystem II (ΦPS2) in cv MG2. During that same period we observed an increase in the levels of lipid peroxidation, H_2O_2 content and activity of SOD and CAT, with the greatest difference compared to control, especially in cv M735, which prevented more effectively oxidative stress.

Keywords: *Helianthus annuus* L.; water stress; photosynthesis; antioxidant enzymes.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	09
CAPÍTULO 1 – Trocas gasosas e parâmetros da fluorescência da clorofila a em plantas de girassol sob estresse hídrico	11
1. Introdução.....	12
2. Material e Métodos	14
3. Resultados e Discussão	15
4. Conclusões.....	23
CAPÍTULO 2 – Metabolismo antioxidante e danos celulares em plantas de girassol submetidas ao déficit hídrico.....	24
1. Introdução.....	25
2. Material e Métodos	27
3. Resultados e Discussão	30
4. Conclusões	36
CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS.....	38

INTRODUÇÃO GERAL

O girassol (*Helianthus annuus* L.), uma das quatro mais importantes culturas anuais produtoras de óleo do mundo, juntamente com a soja, a palma e a canola, apresenta grande importância na economia mundial (EMPARN, 2009). Assim, as perspectivas de crescimento da área cultivada com esta espécie são bastante favoráveis e vêm aumentando em diversas regiões do Brasil (BARROS, 2009), visando atender o mercado de óleos comestíveis nobres, produção de mel, silagem, farelo e torta para alimentação animal, sendo também importante no ramo das flores ornamentais (EMBRAPA, 2008).

As características morfológicas e bioquímicas do girassol como ciclo curto (90 a 130 dias), polinização cruzada, espécie anual herbácea, adaptação a diferentes climas e solos, como também boa resistência ao frio e períodos de seca (LEITE, 2007) fazem dessa planta uma ótima alternativa para a rotação de culturas (MUSSI, 2005). Além disso, devido ao alto teor de óleo no grão, que varia de 40 a 54%, dependendo da cultivar e do ambiente de cultivo (ROSSI, 1998) desponta como uma nova opção para a produção de biocombustíveis (BALBINOT JR., 2009).

Essa espécie passou a ganhar destaque econômico após a II Guerra Mundial, sendo adaptada como planta produtora de óleo. Acredita-se que, no Brasil, seu cultivo foi iniciado na época da colonização, principalmente na região sul, com a introdução do hábito do consumo de suas sementes torradas. Atualmente, é cultivado com sucesso nos cinco continentes, sendo os maiores produtores mundiais a Rússia, a União Européia, a Argentina e os Estados Unidos (UNGARO, 2000; CONAB, 2010).

A produção mundial de grãos de girassol para a safra 2010/11, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), deverá ter um acréscimo de 3,69%, por conta das condições climáticas mais favoráveis que estão

beneficiando as plantações nos principais países produtores. Porém, no Brasil, a área cultivada na safra 2009/10 diminuiu em relação à de 2008/09 em 26,3%, exceto nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul, em decorrência da falta de chuva em todas às regiões produtoras (CONAB, 2010).

O déficit hídrico é o maior problema enfrentado pela agricultura e desencadeiam várias respostas nas plantas, como a redução do potencial hídrico foliar, o fechamento estomático que provoca o declínio da condutância estomática reduzindo a concentração interna de CO₂ e, conseqüentemente, diminuindo a taxa fotossintética, além de promover um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio desencadeando o estresse oxidativo, dentre outras alterações bioquímicas e moleculares (HONG-BO, 2008).

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas há décadas, para o entendimento dos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico, em diferentes espécies vegetais (GONÇALVES et al., 2009). Atualmente, já se sabe que a tolerância ao estresse hídrico envolve mudanças sutis na bioquímica celular, e isso parece ser o resultado do acúmulo de solutos e de proteínas específicas que podem ser rapidamente induzidas pelo estresse osmótico, porém mais estudos são necessários para o melhor entendimento (HONG-BO et al., 2006).

Dessa forma, devido o cultivo do girassol ocorrer em segunda época ou safrinha, está sujeito à condições climáticas mais desfavoráveis à sua semeadura e emergência (DICKMANN, 2005), portanto, o conhecimento das possíveis alterações fisiológicas e bioquímicas no comportamento de uma cultivar de girassol, sob diferentes condições hídricas, é essencial para o entendimento geral dos mecanismos de tolerância e na escolha do manejo mais adequado para a cultura, principalmente em regiões de climas tropicais, onde as informações existentes dessa cultura sob estresse hídrico são bem escassas.

CAPÍTULO 1

TROCAS GASOSAS E PARÂMETROS DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A EM PLANTAS DE GIRASSOL SOB ESTRESSE HÍDRICO

Gas Exchange and Chlorophyll Fluorescence Parameters of Sunflower Plants Under Water Stress

RESUMO - O girassol (*Helianthus annuus* L.), importante nos sistemas de rotação e sucessão de culturas nas regiões produtoras de grãos no Brasil, está freqüentemente, sujeito a condições climáticas desfavoráveis para seu desenvolvimento. Dessa forma, esse estudo objetivou avaliar o impacto do estresse hídrico através da suspensão da irrigação sobre o potencial de água nas folhas, as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila em duas cultivares de girassol, M735 e MG2. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos com capacidade para 10 litros, mantendo quatro plantas por vaso. Dois meses após a semeadura, as plantas das duas cultivares foram separadas em dois tratamentos, controle (irrigadas diariamente) e déficit hídrico (suspensão total da irrigação). As avaliações foram realizadas 24 horas, cinco e doze dias após a indução dos tratamentos e foram determinados: o potencial hídrico foliar; índice de clorofila; parâmetros da fotossíntese e a fluorescência da clorofila *a*. A assimilação de CO₂, assim como a concentração intercelular de CO₂, avaliadas após 24 horas e cinco dias de indução do estresse não diferiram do tratamento controle nas duas cultivares. A cultivar M735 sofreu queda a partir do quinto dia nas plantas sob estresse, e o potencial hídrico decresceu também a partir do quinto dia nas plantas sob estresse, nas duas cultivares. A condutância estomática e a taxa transpiratória apresentaram pequena variação entre os tratamentos. Porém, a maior diferença foi observada aos 12 dias de avaliação, período que caracterizou elevado estresse hídrico pela baixa condutância estomática e transpiração o que afetou negativamente a assimilação do CO₂ reduzindo a taxa fotossintética das plantas sob déficit hídrico. Quanto à fluorescência da clorofila, a cultivar MG2 apresentou uma queda na eficiência quântica fotoquímica efetiva (F_v'/F_M) e na produção quântica efetiva do FS II ($\Phi PS2$) nas plantas sem irrigação. Em resposta aos parâmetros de fotossíntese analisados, a cultivar MG2 foi a mais sensível ao déficit hídrico.

Palavras – chave: *Helianthus annuus* L.; déficit hídrico; fotossíntese; potencial hídrico foliar.

ABSTRACT - Sunflower (*Helianthus annuus* L.), important in crop rotation and crop succession in the grain producing regions in Brazil, is often subject to adverse weather conditions for their development. Thus, this study aimed to evaluate the impact of water stress by withholding irrigation on leaf water potential, gas exchange and chlorophyll fluorescence in two sunflower cultivars, M735 and MG2. As plants were grown in a greenhouse in pots with a capacity of 10 liters, keeping four plants per pot. Two months after sowing, plants of both cultivars were separated into two treatments, control (watered daily) and water deficit (total suspension of irrigation). Evaluations were performed 24 hours, five and twelve days after induction treatments and were determined: the leaf water potential; chlorophyll index, parameters of photosynthesis and chlorophyll a fluorescence. The CO₂ assimilation and the intercellular CO₂ concentration, as assessed after 24 hours and five days of induced stress did not differ from control treatment in both cultivars. The cultivar M735 was down from the fifth day in plants under stress, and water potential also decreased from the fifth day in plants under stress in both varieties. The stomatal conductance and transpiration rate showed little variation among treatments. But the biggest difference was observed at twelve-day evaluation period that featured high water stress by low stomatal conductance and transpiration, which adversely affected the assimilation of CO₂ by reducing the photosynthetic rate of plants under drought. As for chlorophyll fluorescence, to cultivate MG2 showed a decrease in the effective photochemical quantum efficiency (Fv / Fm') and produce effective quantum of photosystem II (ΦPS2) in plants without irrigation. The response to photosynthetic parameters examined, the cultivar MG2 was the most sensitive to drought.

Keywords: *Helianthus annuus* L.; water deficit; photosynthesis; leaf water potential.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo do girassol vem aumentando anualmente, sendo a quarta oleaginosa mais produzida no mundo (EMPARN, 2009). Devido ao alto teor de óleo no grão, que varia de 40 a 54%, essa cultura desponta como uma nova opção para a produção de biocombustíveis (BALBINOT JR., 2009), atendendo o mercado de óleos comestíveis nobres, produção de mel, silagem para alimentação animal, e também o ramo das flores ornamentais (EMBRAPA, 2008).

O girassol é cultivado, geralmente, em segunda época ou safrinha, estando sujeito a condições climáticas menos favoráveis para o seu crescimento e desenvolvimento (DICKMANN, 2005), como o déficit hídrico, que é o principal fator limitante para o desenvolvimento das culturas em solos agricultáveis (MANIVANNAN et al., 2008; SCHITTENHELM, 2010), constituindo-se na maior causa de variabilidade dos rendimentos de grãos de um ano para outro.

O déficit hídrico, caracterizado pela redução do conteúdo de água na planta, é o maior problema enfrentado pela agricultura e a habilidade de tolerância à seca é

de grande importância. O estresse por falta d'água desencadeia uma ampla variedade de respostas no vegetal, como alterações na expressão genética e metabolismo celular, diminuições nas taxas de crescimento e produtividade devido à redução do potencial hídrico das folhas, fechamento estomático e conseqüente diminuição das trocas gasosas, o que inibe vários processos bioquímicos e fisiológicos, como a fotossíntese, respiração, absorção de íons, metabolismo dos nutrientes, entre outros. Geralmente, essas numerosas respostas fisiológicas das plantas à seca, variam com a severidade bem como com a duração do estresse. Quando severo, pode resultar na suspensão da fotossíntese, distúrbios do metabolismo e, finalmente, a morte do vegetal (BOHNERT, 1996; HONG-BO, 2008).

Sob condições de estresse hídrico, ocorre redução da concentração intercelular de CO_2 , em razão do controle da abertura dos estômatos. Assim, também ocorre a diminuição da condutância estomática que é um componente de fundamental importância na manutenção da turgescência em resposta a decréscimos no potencial hídrico das plantas. Todavia, quando o estômato se fecha para proteger a planta da perda de água, ele, simultaneamente, restringe a difusão do CO_2 atmosférico e, conseqüentemente, provoca queda na taxa fotossintética (DAMATTA, 2003).

O aparelho fotossintético e, particularmente, o fotossistema II (PSII) é conhecido por ser sensível a diferentes estresses. Ele pode, temporariamente, ser afetado por estresses ambientais, antes de quaisquer danos estruturais irreversíveis tornarem-se aparentes. Assim, a alteração na emissão da fluorescência da clorofila decorrente, principalmente, do PSII fornece informações sobre quase todos os aspectos da atividade fotossintética (PANDA, 2008). Esse é um método não-destrutivo, altamente sensível e de fácil manuseio, o que permite adquirir informações qualitativas e quantitativas sobre a condição fisiológica do aparato fotossintético (FALQUETO, 2007; YUSUF, 2010).

Os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* são comumente usados para estudar o funcionamento do aparato fotossintético sob estresse hídrico e este método tem sido muito utilizado para investigar as respostas do girassol a esse tipo de estresse. Estudos relatam que o estresse hídrico não causa um efeito de longo prazo sobre a eficiência fotoquímica do PSII em girassol, mas diminui a eficiência quântica do transporte de elétrons do PSII (ΦPSII) (PANKOVIC, 1999; POORMOHAMMAD KIANI, 2008).

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), houve um decréscimo em torno de 26% na produção nacional de girassol na safra de 2009/10 em relação à anterior, por conta da falta de chuva em todas as regiões produtoras do Brasil (CONAB, 2010). Dessa forma, o entendimento sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos desenvolvidos pelo girassol para tolerar a seca é de grande importância e poderá refletir num melhor desempenho dessa cultura em ambientes com déficit hídrico. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da restrição hídrica sobre o potencial de água nas folhas, índice de clorofilas, trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a* em duas cultivares de girassol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, da Universidade Federal de Pelotas, *campus* Capão do Leão/RS no período de janeiro à março de 2010.

Sementes de duas cultivares de girassol (*Helianthus annuus* L.), MG2 e M735, foram semeadas em vasos com capacidade para 10 litros contendo solo como substrato. A análise química e física do solo utilizado está apresentada na tabela 1. Foram semeadas seis sementes por vaso, os quais foram dispostos aleatoriamente, sendo selecionados 18 vasos para cada cultivar. Trinta dias após a semeadura foi realizado um desbaste, mantendo quatro plantas por vaso. As mesmas receberam irrigação diária e solução nutritiva de **Hoagland & Arnon** (1950) de meia força nas duas primeiras semanas, seguida da completa, uma vez por semana até o início do estabelecimento dos tratamentos.

Tabela 1. Propriedades químicas e físicas do solo utilizado no experimento.

Registro	pH água	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC efetiva	Saturação (%)		Índice SMP
							Al	Bases	
Amostra	5,0	1,3	1	0,9	4,4	3,4	26	36	6
Registro	% Mat. Org. m/v	% Argila m/v	Text.	P-Mehlich mg/dm ³	P-resina	CTC pH 7 cmolc/dm ³	K mg/dm ³		
Amostra	1,7	18	4	1,8	---	7,9	75		

Dois meses após a semeadura, as plantas de ambas as cultivares foram separadas em dois tratamentos, um controle onde foram mantidas irrigadas

diariamente próximas a capacidade de campo, e outro sob restrição hídrica, com a suspensão total da irrigação. Após 24 horas, cinco e doze dias da indução dos tratamentos, três vasos por cultivar, em cada regime hídrico, foram selecionados aleatoriamente para a avaliação do potencial de água nas folhas, índice de clorofilas, taxa fotossintética e fluorescência da clorofila *a* com pulso modulado, totalizando 12 repetições para cada parâmetro analisado.

O potencial hídrico foliar (Ψ_w máximo) em cada período, foi avaliado na antemanhã, entre 5:00 e 6:00 horas, em folhas completamente expandidas, de 12 plantas por tratamento, com auxílio de uma bomba de pressão tipo Scholander.

O índice de clorofila foi determinado no início da manhã, com o auxílio de um medidor portátil de clorofila, o clorofilômetro (Hansatech CL-01). As leituras foram realizadas em folhas completamente expandidas, uma por planta.

As trocas gasosas foram avaliadas entre 9:00 e 10:00 horas da manhã, a partir das mesmas folhas onde foi determinado o índice de clorofila. Utilizou-se um analisador de gás infravermelho IRGA (Infrared Gas Analyzer, LI6400, Licor), sendo avaliada a taxa assimilatória líquida de CO_2 (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); concentração intracelular de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$); condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e taxa transpiratória (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A eficiência do uso da água (EUA , kg m^{-3}) foi estimada com base no cálculo da razão entre A e E .

Os parâmetros da fluorescência modulada das clorofilas em estado adaptado à luz foram determinados no período da manhã, à temperatura ambiente, nas mesmas folhas em que foram feitas as avaliações das trocas gasosas, através do fluorômetro com amplitude de pulso modulado (FMS-2, Hansatech, King's Lynn, UK). Foram avaliados os parâmetros: coeficiente de extinção fotoquímico (qP), rendimento quântico fotoquímico primário máximo em estado adaptado a luz (F_V'/F_M'), rendimento quântico fotoquímico primário atual em estado adaptado a luz [$\Phi_{PS2} = (F_M' - F_S')/F_M'$] e taxa de transporte de elétrons no fotossistema II (ETR).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com bifatorial, (regimes hídricos) e duas cultivares de girassol (M735 e MG2). Os resultados foram submetidos à análise da variância ($p \leq 0,05$), sendo utilizado o teste de Tukey para comparação de médias entre os tratamentos de cada cultivar, já que foram experimentos independentes. Para a plotagem das figuras foi utilizado o programa SigmaPlot, versão 10.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas plantas sob irrigação diária (controle), não houve variação expressiva no potencial hídrico foliar, valores próximos a $-0,50$ MPa (Figura 1). Porém, no tratamento sob restrição hídrica, o potencial de água nas folhas caiu linearmente com o aumento do período de estresse hídrico, sendo significativa em relação ao controle, a partir do quinto dia. Observou-se uma queda acentuada na cv M735, com potencial de $-1,20$ MPa aos 12 dias de estresse, e também na cv MG2 apresentando um potencial de $-1,72$ MPa (Figuras 1A e 1B). Esses resultados estão de acordo com Cechin et al. (2010) que, avaliando o estresse hídrico em folhas jovens e maduras de girassol, também obtiveram a redução do potencial hídrico foliar com o aumento do estresse em ambas as folhas. Reduções de forma gradual no potencial hídrico foliar em função do déficit hídrico também foram observadas em genótipos de trigo (SUBRAHMANYAM et al., 2006) e em café (DEUNER et al., 2011).

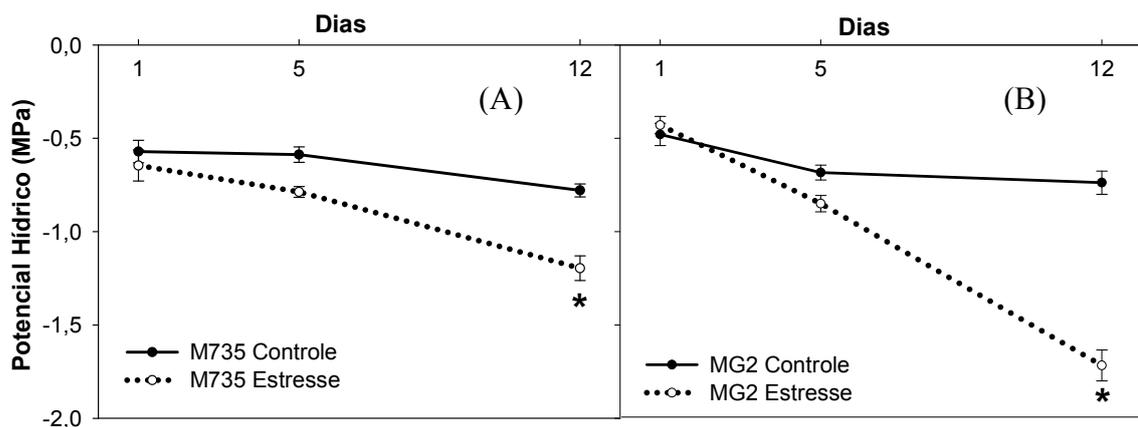


Figura 1: Potencial hídrico foliar de duas cultivares de girassol (M735 e MG2) cultivadas sob condição de irrigação diária (Controle) e déficit hídrico (Estresse) por 12 dias. *Representa diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Tukey.

A atividade fotossintética para as duas cultivares, seguiu tendência em resposta à redução do potencial hídrico (Figura 2). Embora as duas cultivares, em ambos os tratamentos tenham sofrido queda nos parâmetros analisados de forma distinta entre a avaliação efetuada após 24 horas e cinco dias, essa queda não foi significativa. Essa variação entre os dois períodos, principalmente nas plantas controle, pode ser justificada devido às pequenas variações nas condições climáticas em cada dia de avaliação, as quais afetam diretamente a fotossíntese. Já

ao prolongar o período de estresse, aos 12 dias, foi observada significativa diferença entre as plantas controle e estressadas nas duas cultivares.

A assimilação líquida de CO_2 (A) apresentou diferença semelhante entre os tratamentos nas duas cultivares de girassol no último período de avaliação (Figuras 2A e 2B). A condutância estomática (g_s) apresentou diferença expressiva em ambas as cultivares (Figuras 2C e 2D) e a taxa transpiratória (E) também expressou diferença semelhante (Figuras 2G e 2H). O parâmetro que mais diferiu entre os tratamentos foi a concentração interna de CO_2 (C_i) (Figuras 2E e 2F), sendo mais acentuado na cv MG2.

A C_i representa a quantidade de CO_2 existente na câmara subestomática, ou seja, quanto mais o estômato estiver fechado, menor será a entrada de CO_2 e desta forma menor a taxa fotossintética. Estes resultados são reflexos da redução do potencial hídrico foliar (Figura 1B).

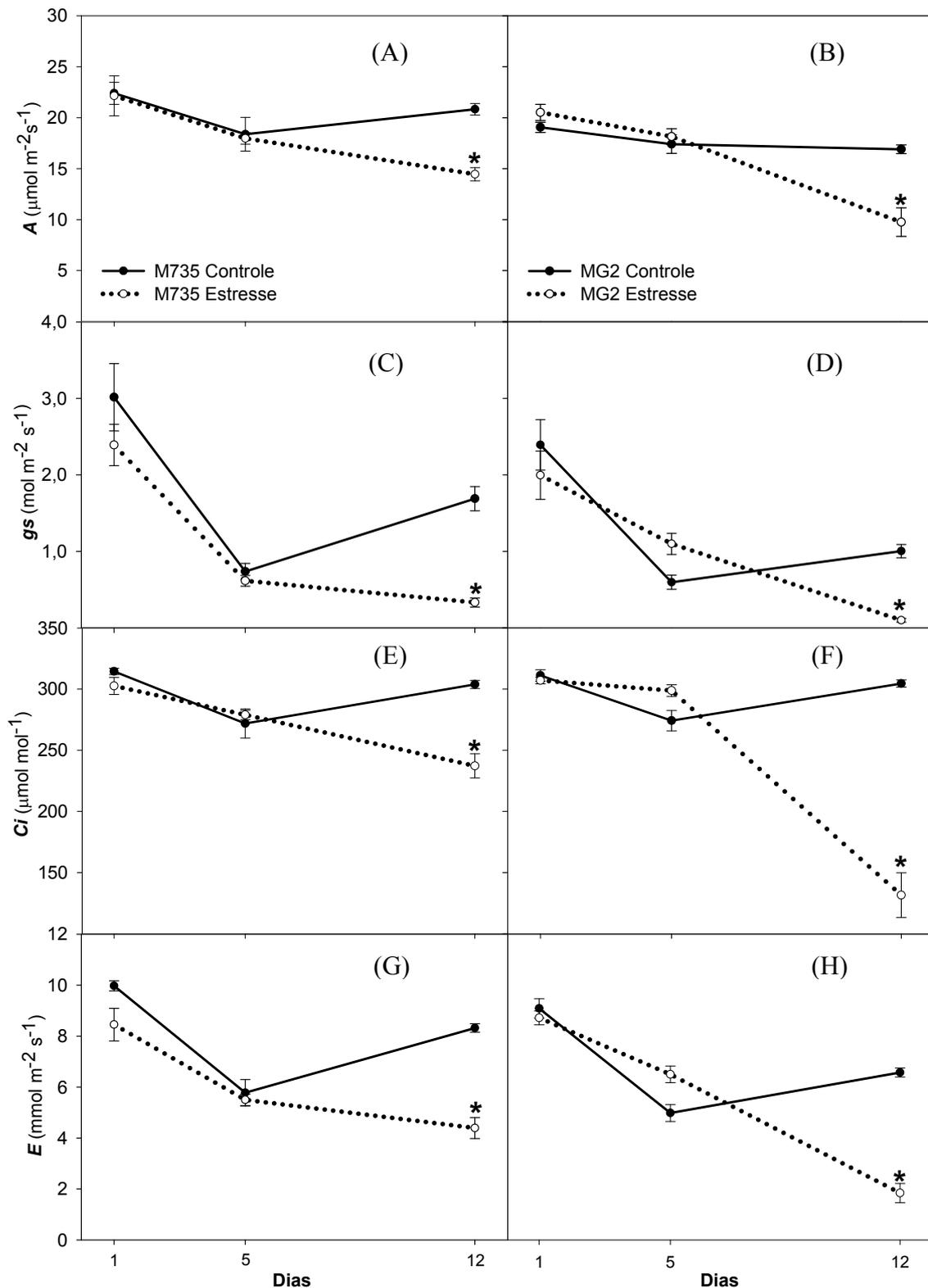


Figura 2 - Taxa assimilatória líquida de CO₂ (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); concentração intracelular de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$); e taxa transpiratória (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de duas cultivares de girassol (M735 e MG2) cultivadas sob condição de irrigação diária (Controle) e déficit hídrico (Estresse), por 12 dias. *Representa diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Tukey.

Buscando maior tolerância ao déficit hídrico, uma estratégia adotada pelas plantas é aumentar a eficiência no uso da água (*EUA*) uma vez que, com a redução da disponibilidade de água no solo, a *EUA* tende a aumentar para minimizar dessa forma as perdas de água pela planta, através do controle da abertura dos estômatos. Verificou-se que este comportamento foi bastante pronunciado na cv MG2 no último período de avaliação (Figura 3A e 3B).

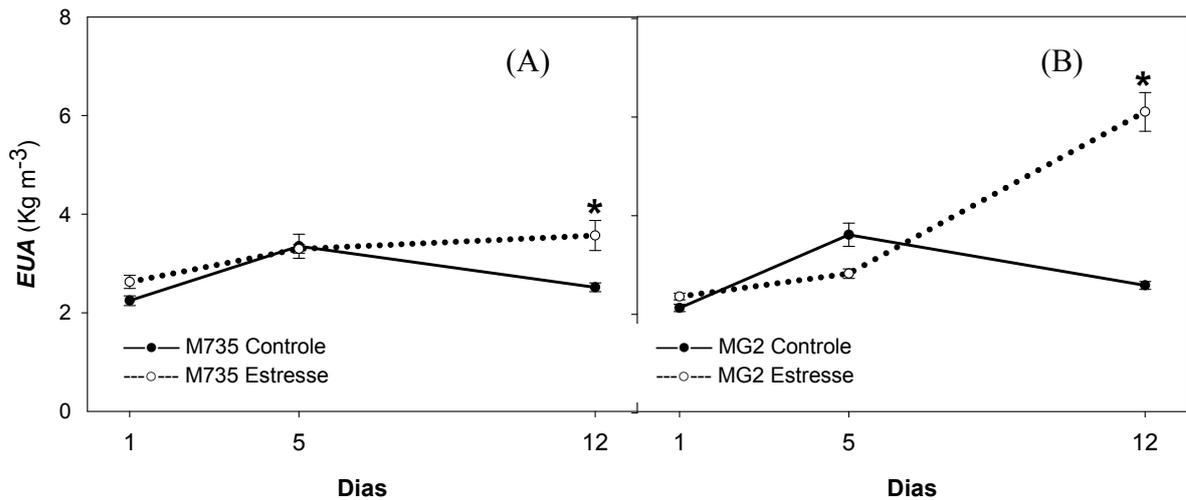


Figura 3: Eficiência do uso da água (*EUA*, kg m⁻³) de duas cultivares de girassol (M735 e MG2) cultivadas sob condição de irrigação diária (Controle) e déficit hídrico (Estresse), por 12 dias. *Representa diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Tukey.

Resultados similares foram encontrados por Bolla et al. (2010) e Cechin et al. (2010) em roseiras 'Euroded' (Hybrid Tea) e girassol, respectivamente, onde o estresse hídrico moderado afetou negativamente a taxa fotossintética, a condutância estomática, a transpiração e o potencial hídrico foliar, sendo também observado um aumento na eficiência do uso da água nas roseiras. Porém, nesses estudos, a *Ci* não diferiu expressivamente do controle, ao contrário do encontrado em nossa pesquisa, o que reforça a idéia de que a taxa fotossintética foi diminuída por conta do fechamento estomático. Reduções nos parâmetros fotossintéticos sob déficit hídrico também foram observados por Zheng et al. (2010), Ben Ahmed et al. (2009), Tezara et al. (2008) e Subrahmanyam et al. (2006).

O estado hídrico da folha e a absorção de carbono estão sob o controle dos estômatos, assim, o fechamento estomático é uma das primeiras respostas das plantas à falta de água, protegendo-as contra a desidratação prejudicial. Porém, esse processo reduz, inevitavelmente, a captação de CO₂ para a fotossíntese, e

conseqüentemente, reduz a difusão de CO₂ na folha, logo a *Ci* diminui (CECHIN et al., 2010).

Diversos estudos sobre os componentes estomático e não-estomático referem-se a condições de deficiência hídrica, mas em girassol os resultados são conflitantes. Enquanto alguns autores ressaltam que a limitação estomática é a principal causa da redução da assimilação de carbono, outros atribuem a diminuição da taxa fotossintética à limitação não-estomática (PANKOVIC et al., 1999; STEDUTO et al., 2000), sugerindo que esse comportamento depende da espécie e de cada cultivar.

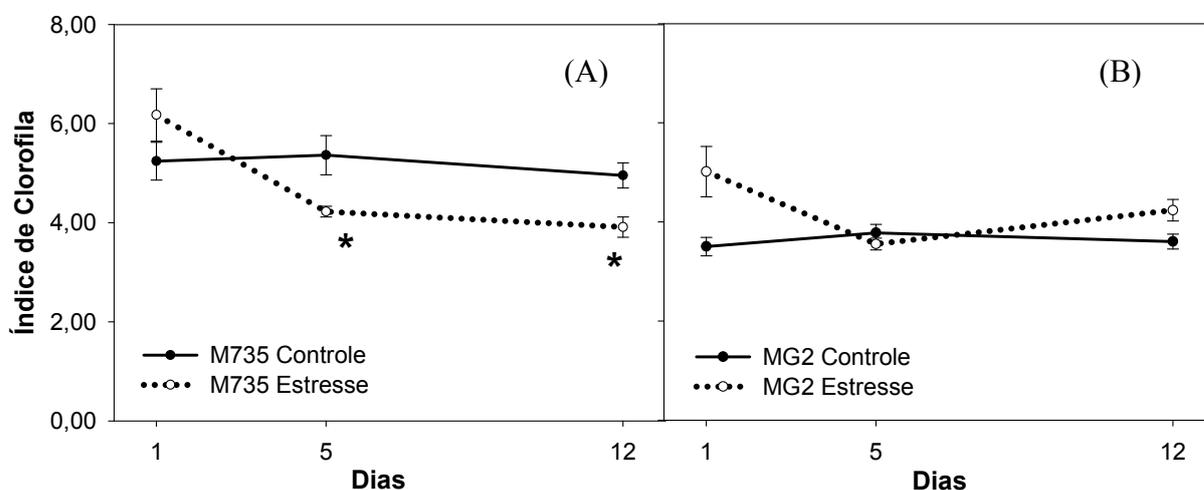


Figura 4: Índice de clorofila de duas cultivares de girassol (M735 e MG2) cultivadas sob condição de irrigação diária (Controle) e sob déficit hídrico (Estresse), por 12 dias. *Representa diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Tukey.

A redução no conteúdo de clorofila sob restrição hídrica também tem sido relatada em plantas de girassol (KIANI et al., 2008) e *Catharanthus roseus* (JALEEL et al., 2008). No presente estudo, o índice de clorofila da cv M735 sofreu queda aos cinco e doze dias para as plantas com deficiência hídrica em relação às mantidas irrigadas (Figura 4A), por outro lado a cv MG2 não sofreu expressiva variação ao longo do período avaliado (Figura 4B). Esse decréscimo pode ser resultado na degradação da clorofila ou deficiência na sua síntese (SMIRNOFF, 1993).

O fato da cv M735 apresentar uma queda no índice de clorofila não interferiu no funcionamento do fotossistema II, já que as plantas estressadas dessa cultivar praticamente não apresentaram alterações em relação ao controle em todos os parâmetros da fluorescência avaliados (Figuras 5A; 5C; 5E; 5G). Esses parâmetros

são comumente usados para estudar o funcionamento do aparato fotossintético de plantas de girassol sob estresse hídrico (KIANI, 2008). Segundo Pankovic et al. (1999), o déficit hídrico não ocasionou efeito a longo prazo na eficiência fotoquímica do PSII em girassol e Tezara et al. (2008) confirmaram que em plantas desta espécie, quando a fotossíntese é inibida pelo déficit hídrico, existe uma fração dos centros de reação do PSII que ficam abertos e são capazes de realizar o trabalho fotoquímico, sendo provavelmente o ocorrido nesse estudo, já que apesar do método utilizado ser altamente sensível, os resultados não diferiram entre os tratamentos nessa cultivar. Maury et al. (1996) completa que a resposta da eficiência fotoquímica de girassol sob estresse hídrico é dependente de cada genótipo.

A cultivar MG2 apresentou uma leve queda na eficiência quântica fotoquímica efetiva (F_V'/F_M') e na produção quântica efetiva do FS II (Φ_{PS2}) a partir do quinto dia de estresse, mas logo se igualou ao controle no último dia de avaliação (Figuras 5B e 5D). Ainda para esta cultivar, o coeficiente de extinção fotoquímico (qP) e a taxa de transporte de elétrons no fotossistema II (ETR) mostraram-se semelhantes ao controle (Figuras 5F e 5H). Subrahmanyam et al. (2006) encontraram resultados semelhantes com a redução em F_V'/F_M' e Φ_{PS2} provocado pelo estresse hídrico em quatro genótipos de trigo.

O fotossistema II é protegido pelo aumento da dissipação de energia e/ou pelo aumento da fotorrespiração (HEBER et al., 1996). Dessa forma, como a fase fotoquímica da fotossíntese no presente estudo permaneceu praticamente inalterada com o estresse hídrico imposto, acredita-se que as plantas realizaram a fotorrespiração para dissipar o excesso de ATP e NADPH produzidos na fase luminosa, protegendo o aparato fotossintético da fotoinibição. A fotorrespiração em plantas C_3 , como exemplo do girassol, pode ser uma alternativa que pode ajudar a consumir uma parte considerável do fluxo de elétrons quando a disponibilidade de CO_2 nos cloroplastos está limitada (HEBER et al., 1996), como nas condições impostas no presente estudo.

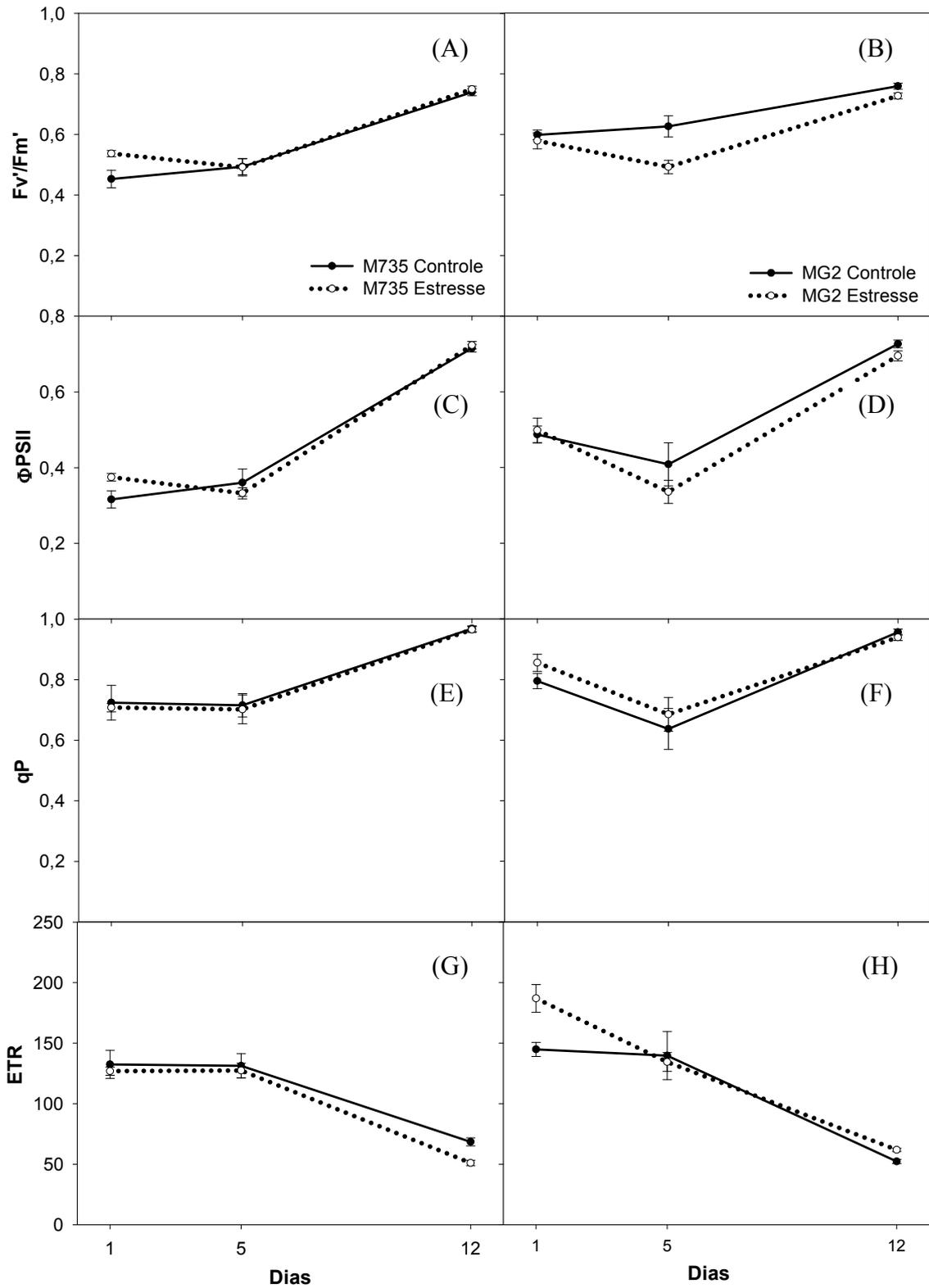


Figura 5 - Eficiência quântica fotoquímica efetiva (F_v/F_m'), coeficiente de extinção fotoquímico (qP), produção quântica efetiva do FS II (Φ_{PSII}) e taxa de transporte de elétrons no fotossistema II (ETR) de duas cultivares de girassol (M735 e MG2) cultivadas sob condição de irrigação diária (Controle) e sob déficit hídrico (Estresse), por 12 dias.

4. CONCLUSÕES

Plantas jovens de girassol são sensíveis ao déficit hídrico quando da sua duração de 12 dias. Para minimizar este efeito, as mesmas adotam estratégias como o fechamento dos estômatos, maximizando a eficiência do uso da água.

Embora o déficit hídrico tenha reduzido as trocas gasosas e causado variação no índice de clorofilas, o funcionamento do aparato fotoquímico não foi alterado pelo método avaliado nas cultivares de girassol estudadas.

CAPÍTULO 2

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPONENTES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS DE GIRASSOL SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO

Cellular Damage and Antioxidant Metabolism in Sunflower Plants Submitted to Water Deficit

RESUMO - O girassol (*Helianthus annuus* L.) representa grande importância na economia mundial, aparecendo como uma das mais importantes culturas produtoras de óleo do mundo. O presente estudo objetivou avaliar o impacto do déficit hídrico através da suspensão da irrigação sobre o potencial hídrico, as respostas antioxidantes e os danos celulares em duas cultivares de girassol, M735 e MG2. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos com capacidade para 10 litros, mantendo quatro plantas por vaso. Dois meses após o plantio, as plantas das duas cultivares foram submetidas a dois tratamentos: controle (irrigadas diariamente) e déficit hídrico (suspensão total da irrigação). As avaliações do potencial hídrico através da bomba de Scholander e a coleta de folhas e raízes para as análises bioquímicas foram realizadas 24 horas, cinco e doze dias após a indução dos tratamentos. Foram quantificados os danos celulares através dos níveis de peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), a atividade específica das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Peroxidase (POX), bem como o potencial hídrico das plantas. Após 24 horas de suspensão da irrigação não houve alteração no potencial hídrico, nem nos danos celulares entre os tratamentos para as duas cultivares. Aos cinco dias houve ligeiro aumento na peroxidação lipídica na cultivar MG2 submetida ao déficit hídrico, e uma ligeira queda no potencial de água para as plantas submetidas ao déficit hídrico. Neste mesmo período foi observado um aumento na atividade das enzimas SOD e CAT em ambas as cultivares. Na última avaliação, 12 dias após a suspensão da irrigação, houve expressivo aumento nos níveis de peroxidação, teores de H₂O₂ e nas atividades das enzimas SOD e CAT, e uma queda acentuada do potencial hídrico nas plantas estressadas, com maior diferença em relação ao controle, principalmente, na cultivar M735, que mostrou ser menos sensível ao déficit hídrico. A atividade da APX não mostrou diferença expressiva.

Palavras – chave: *Helianthus annuus* L.; restrição hídrica; enzimas antioxidantes; danos celulares.

ABSTRACT – Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is of great importance in the global economy, emerging as one of the most important oil-producing crops in the world. This study aimed to evaluate the impact of the drought through the cessation of irrigation on water potential, antioxidant responses and cell damage in two sunflower cultivars, M735 and MG2. Plants were grown in a greenhouse in pots with a capacity of 10 liters, keeping four plants per pot. Two months after sowing, plants of both cultivars were subjected to two treatments: control (watered daily) and water deficit (total suspension of irrigation). Measurements of water potential through the chamber pressure Scholander and collecting leaves and roots for biochemical analysis were performed 24 hours, five and twelve days after treatment induction. We quantified cell damage through the levels of lipid peroxidation and hydrogen peroxide (H_2O_2), the specific activity of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase (POX), and the water potential of plants. After 24 hours without irrigation there was no change in water potential, neither in cell damage between treatments for both cultivars. At five days there was a slight increase in lipid peroxidation in MG2 cultivar subjected to water deficit, and a slight decrease in water potential for plants subjected to water deficit. In the same period there was an increase in the activity of SOD and CAT in both cultivars. At last evaluation, 12 days after suspension of irrigation, there was significant increase in the levels of peroxidation, H_2O_2 content and activities of SOD and CAT, and a sharp drop in water potential in stressed plants, with greater difference from control, especially in cv M735, which was more tolerant to drought. The activity of APX showed no significant difference.

Keywords: *Helianthus annuus* L.; water restriction; antioxidant enzymes; cell damage.

1. INTRODUÇÃO

As plantas estão sujeitas, freqüentemente, a diversos estresses ambientais que afetam o crescimento, o metabolismo e o rendimento das culturas (MANIVANNAN et al., 2008a). O estresse hídrico é o maior problema enfrentado pela agricultura, principalmente em áreas áridas e semi-áridas, onde a demanda da transpiração é muito elevada (CECHIN, 2010). Dessa forma, a habilidade para resistir a tal condição é de grande importância (HONG-BO et al., 2008).

Manivannan (2008 b) diz que a água é o fator ambiental mais importante que regula o crescimento e desenvolvimento do vegetal, e caracteriza o déficit hídrico como a ausência da umidade adequada do solo para a planta crescer normalmente e completar o seu ciclo de vida. Logo, a seca é o fator limitante que afeta o rendimento das culturas em muitas partes do mundo.

Dentre numerosas respostas fisiológicas das plantas ao estresse hídrico o fechamento estomático e a limitação das trocas gasosas são as principais, uma vez que diminui ou cessa a fotossíntese. Essas respostas geralmente variam com a

severidade, com a cultura, bem como a duração do estresse (HONG-BO et al., 2008).

Com o fechamento dos estômatos, a fixação de CO₂ torna-se limitada, diminuindo a redução do carbono pelo ciclo de Calvin e, conseqüentemente, o NADP⁺ oxidado, que serve como acceptor de elétrons da fotossíntese. Durante a transferência de elétrons, quando a ferredoxina se encontra super reduzida, elétrons podem ser transferidos do fotossistema I (PS I) para o oxigênio, o que leva a formação do radical superóxido (O₂^{•-}), por um processo conhecido como reação de Mehler. Esse processo provoca mais reações na cadeia, gerando mais espécies reativas de oxigênio (EROs), causando o chamado estresse oxidativo (BEN AHMED, 2009; PANDA & KHAN, 2009).

Muitas evidências sugerem que a seca induz o estresse oxidativo em diversas plantas, em que as EROs como o radical superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila (OH[•]), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio singlete (¹O₂) são formadas. Essas espécies são geradas durante processos metabólicos nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, sendo seu acúmulo potencialmente prejudicial às células da planta, provocando danos em biomoléculas valiosas como o DNA, RNA, proteínas e membranas celulares (JALEEL et al., 2009). Em condições de estresse severo, pode ocorrer um aumento considerável na produção de EROs, as quais podem levar a uma cascata de eventos que inicia com a peroxidação de lipídeos, avança para degradação de membranas e morte celular (GREGGAINS et al., 2000; PANDA & KHAN, 2009).

Como uma estratégia de proteção aos danos oxidativos, as plantas têm desenvolvido um complexo sistema de defesa não-enzimático, composto por carotenóides, ascorbato, glutathiona, α-tocoferóis; e enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD; 1.15.1.1)), que catalisa a reação do radical superóxido à H₂O₂; catalase (CAT; EC 1.11.1.6) que produz água (H₂O) e oxigênio (O₂) a partir do H₂O₂; e enzimas do ciclo ascorbato-glutathiona, como a ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) que detoxifica o H₂O₂ produzido pela SOD e as peroxidases (POX) (MANIVANNAN et al., 2008; BEN AHMED, 2009; JALEEL et al., 2009).

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é a quarta oleaginosa mais produzida no mundo (EMPARN, 2009), e atualmente desponta como uma nova opção para a produção de biocombustíveis (BALBINOT JR., 2009), demonstrando sua grande importância na economia. Nesta última safra (2010/11), por exemplo, a produção

mundial dos seus grãos teve um aumento em decorrências das condições climáticas favoráveis, porém, no Brasil, essa produção foi reduzida por conta da falta de chuva em todas as regiões produtoras (CONAB, 2010).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto do déficit hídrico sobre o potencial de água das folhas, atividade antioxidante de enzimas envolvidas na remoção de EROs e os danos celulares em duas cultivares de girassol, visando entender os mecanismos bioquímicos e fisiológicos que essas plantas desenvolvem para tolerar a seca, o que refletirá numa melhor produtividade dessa cultura em ambientes com deficiência hídrica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, da Universidade Federal de Pelotas, *campus* Capão do Leão/RS, no período de janeiro a março de 2010.

Sementes de duas cultivares de girassol (*Helianthus annuus* L.), MG2 e M735, foram semeadas em vasos com capacidade para 10 litros contendo solo, cuja composição química e física está descrita no capítulo 1, como substrato. Foram semeadas seis sementes por vaso, os quais foram mantidos dispostos aleatoriamente, sendo selecionados 18 vasos para cada cultivar, onde, 30 dias após a semeadura foi realizado um desbaste, mantendo quatro plantas por vaso. As plantas receberam irrigação diária e solução nutritiva de **Hoagland & Arnon** (1950) de meia força nas duas primeiras semanas, seguida da completa, uma vez por semana até o início do estresse.

Dois meses após a semeadura, as plantas de ambas as cultivares foram separadas em dois tratamentos (um experimento independente para cada cultivar) um controle onde foram mantidas irrigadas diariamente próximas a capacidade de campo, e outro sob restrição hídrica, com a suspensão total da irrigação. Após 24 horas, cinco dias e doze dias da indução dos tratamentos, três vasos por cultivar, em cada regime hídrico, foram selecionados aleatoriamente para a avaliação do potencial hídrico foliar, atividade de enzimas antioxidantes e danos celulares.

O potencial hídrico foliar (Ψ_w máximo) em cada período, foi avaliado na antemanhã, entre 5:00 e 6:00 horas, em folhas completamente expandidas, de 12

plantas por tratamento, com auxílio de uma bomba de pressão tipo Scholander, totalizando 12 repetições.

A seguir, folhas novas completamente expandidas e as raízes, após serem separadas da parte aérea e lavadas, foram coletadas, acondicionadas em envelopes de papel alumínio e armazenadas em ultra-freezer a - 80°C para as posteriores análises.

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes, aproximadamente 200 mg de tecido foliar e radicular foram utilizados separadamente. O material foi macerado em N₂ líquido acrescido de 20% de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) insolúvel, para que não houvesse oxidação e, homogeneizados em 1,8 mL do tampão de extração (Fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado para a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976), sendo as leituras destas realizadas a 595 nm, e as análises das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidase (POX).

A atividade da SOD foi estimada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS & REIS, 1977). O meio de reação foi composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM. Os tubos que continham o meio de reação mais a amostra, e o controle, que continha apenas o meio de reação, foram iluminados por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20 w. O branco permaneceu no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima feito pela equação:

$$\% \text{ DE INIBIÇÃO} = (A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$$

Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998), com pequenas modificações. Sua atividade foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante dois minutos em um meio de reação incubado a 28°C contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), H₂O₂ 12,5 mM e o extrato enzimático.

A atividade da APX foi determinada segundo Nakano e Asada (1981), através do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O meio de reação foi composto de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM, H₂O₂ 0,1 mM e o extrato incubado a 28°C. O decréscimo na absorvância foi monitorado por um período de dois minutos ao iniciar a reação.

A atividade da POX foi determinada de acordo com metodologia de Chance e Maehly (1955). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6.8), 30 mM de H₂O₂, 30 mM de guaiacol e o extrato enzimático. O acréscimo na absorvância a 420 nm foi monitorado por dois minutos.

Os metabólitos oxidantes e danos celulares foram estimados através da quantificação dos teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica, respectivamente. Os extratos foram obtidos através da maceração de 200 mg de tecido foliar e radicular em N₂ líquido, acrescido de 20% de PVPP e homogeneizado em uma solução de 0,1% (p/v) de ácido tricloacético (TCA), seguido de centrifugação a 12.000 g por 15 minutos. O conteúdo de H₂O₂ foi estimado segundo metodologia proposta por Velikova et al. (2000), onde, 0,5 mL do sobrenadante foram adicionados a 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e a 1 mL de iodeto de potássio 1 M. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390 nm e o conteúdo de H₂O₂ calculado através da comparação das leituras com curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de H₂O₂.

Os danos celulares, que indicam a ocorrência de estresse oxidativo, foram avaliados por meio da peroxidação lipídica (CAKMAK; HORTS, 1993), determinada através da medição da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Desta forma, 250 µL do sobrenadante obtido acima, foram adicionados a 1 mL da solução contendo 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (p/v) de TCA. O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. O meio de reação foi incubado a 95°C por 30 minutos mantendo os tubos fechados, e a reação foi paralisada pelo resfriamento rápido em banho de gelo e água. A absorvância das TBARS formadas foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm. A peroxidação foi expressa em nmol de MDA g⁻¹ de massa fresca.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial, dois regimes hídricos e duas cultivares de girassol (M735 e

MG2). Para o potencial hídrico foram utilizadas 12 repetições e para as análises enzimáticas e bioquímicas, cinco repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise da variância ($p \leq 0,05$), sendo utilizado o teste de Tukey para comparação de médias entre os tratamentos de cada cultivar, já que foram experimentos independentes. Para a plotagem das figuras foi utilizado o programa SigmaPlot, versão 10.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O decréscimo do potencial hídrico foi maior quanto maior o período de restrição hídrica nas duas cultivares (dados apresentados no capítulo 1). Este comportamento também foi observado por Cechin et al. (2010) avaliando o estresse hídrico em folhas jovens e maduras de girassol.

Segundo Pinheiro et al. (2005), Deuner et al. (2008) e Nascimento et al. (2008), o fechamento dos estômatos parece ser uma das primeiras estratégias para minimizar a perda de água que ocorre com a transpiração em condições de baixo potencial hídrico. Os efeitos do estresse hídrico nas plantas pode ser mediado pela produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a danos extensos as membranas celulares, desencadeando processos de peroxidação de lipídios (SMIRNOFF, 1993). A ativação de enzimas do sistema antioxidante interfere nos níveis de alguns destes compostos envolvidos nestas reações.

No presente estudo, a atividade da SOD nas folhas, não expressou diferença entre os tratamentos na avaliação realizada 24 horas após a indução do estresse, em ambas as cultivares (Figura 2A e 2B). A partir deste período, foi observado gradual aumento na atividade desta enzima no tratamento sob restrição hídrica, diferindo significativamente do controle aos 12 dias na cv MG2. Nas raízes os efeitos do estresse hídrico não expressaram diferenças na atividade das enzimas antioxidantes avaliadas (dados não apresentados).

Entre as enzimas envolvidas na remoção das EROs, a SOD pode ser considerada uma enzima chave e é geralmente a primeira linha no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (POMPEU et al., 2008). O déficit hídrico induziu uma maior atividade da SOD, a qual determina a concentração de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , sendo central nos mecanismos de defesa necessários para prevenir a formação de

radicais OH^{\bullet} (YOSHIMURA et al., 2000), sendo assim, conhecido por conferir tolerância ao estresse oxidativo (JALEEL et al., 2007).

O comportamento da CAT foi similar ao da SOD, leve aumento nas plantas estressadas em relação às plantas controle para a cv M735 (Figura 2C) e mais acentuado na cv MG2, com diferença significativa na última avaliação, aos 12 dias (Figura 2D). A CAT é abundante nos peroxissomos de plantas C_3 , como exemplo do girassol, e remove o H_2O_2 produzido durante a fotorrespiração na conversão do glicolato em glioxilato. Essa enzima catalisa a conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 (FOYER; FLETCHER, 2001) e o aumento da sua atividade em folhas de plantas estressadas pode ser uma adaptação que visa a eliminação de H_2O_2 produzido durante a fotorrespiração promovido pelo estresse hídrico (BEN AHMED et al., 2009). Dessa forma, a maior atividade da CAT pode ser justificada pela necessidade de remoção do H_2O_2 produzido pela atividade da SOD e também pela possível taxa de fotorrespiração ocorrida nas plantas estressadas da cv MG2.

Esses resultados estão de acordo com Manivannan et al. (2008a) que avaliando, dentre outros tratamentos, o estresse hídrico em plantas de girassol em intervalos de 3,6 e 9 dias, observaram o aumento na atividade dessas enzimas nas folhas. Por outro lado, também detectaram alta atividade da SOD, CAT e APX nas raízes sob deficiência hídrica, resposta contrária a encontrada na presente pesquisa, onde suas atividades não diferiram entre os tratamentos (dados não apresentados). Provavelmente o período de estresse imposto nesse trabalho não foi suficiente para ativar o sistema antioxidante nas raízes das cultivares estudadas.

Outro fator importante na atividade antioxidante é afinidade das enzimas pelo substrato. Enquanto a CAT tem uma baixa afinidade pelo H_2O_2 , sendo ativa somente quando este está em altas concentrações, ou seja, quando o estresse é mais severo, a APX e outras peroxidases, que também eliminam o H_2O_2 , tem alta afinidade, eliminando o H_2O_2 quando em baixas concentrações. Além disso, a CAT atua nos peroxissomos, enquanto a APX e POX atuam basicamente nos cloroplastos e paredes celulares, respectivamente (GECHEV et. al, 2006; JALEEL et. al, 2009).

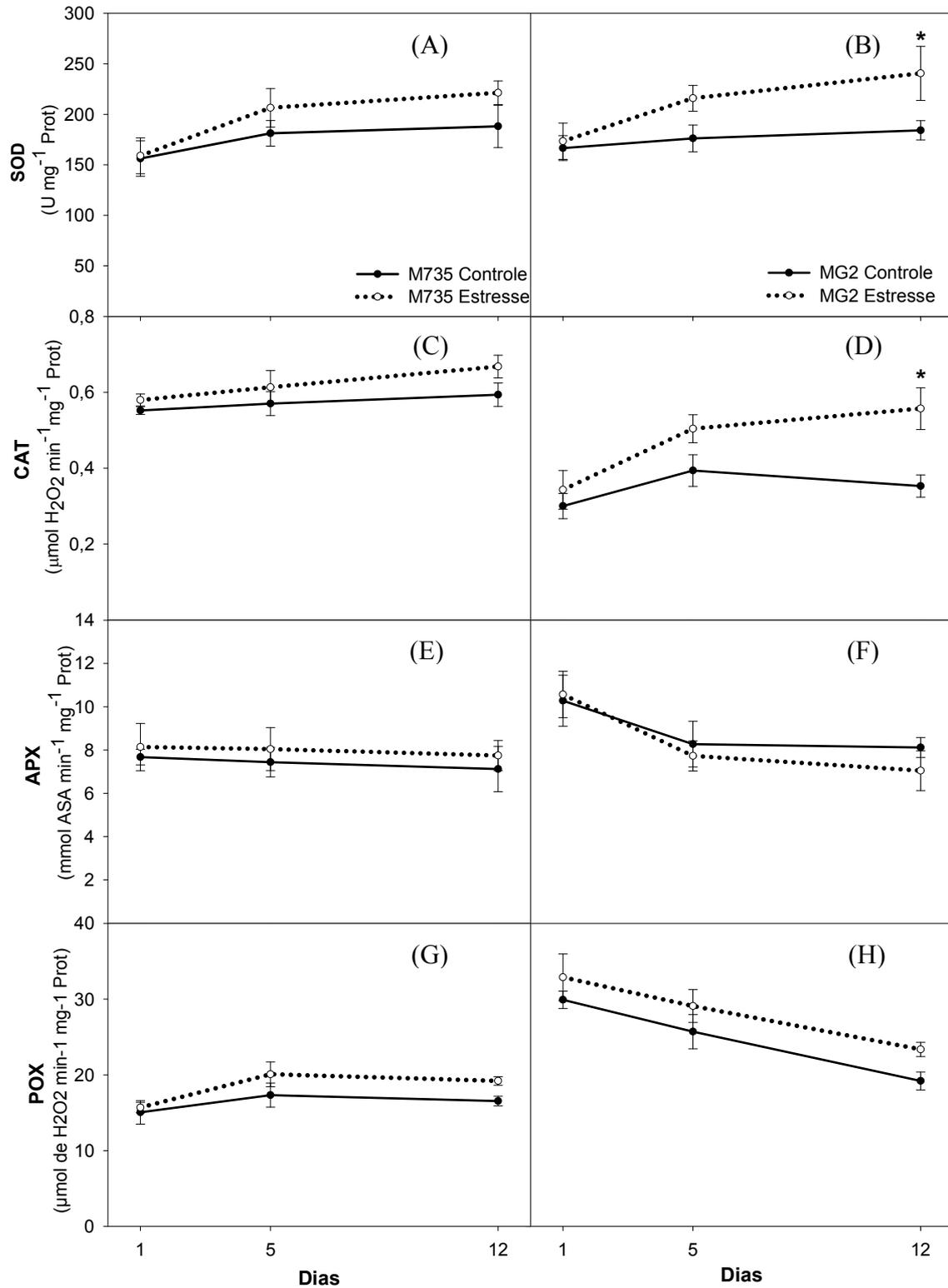


Figura 2 – Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX E POX em folhas de duas cultivares de girassol (MG2 e M735) irrigadas diariamente (Controle) e sob déficit hídrico (Estresse) por um período de 12 dias. *Representa diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Tukey.

Analisando a atividade da enzima APX, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para as duas cultivares de girassol (Figuras 2E e 2F). Comportamento semelhante foi observado para POX, embora sua atividade tenha apresentado declínio entre a primeira e última avaliação para a cultivar MG2, porém não diferindo entre os tratamentos (Figura 2H).

Outras pesquisas também têm avaliado o estresse oxidativo provocado pela seca em diversas culturas como a Andiroba (COSTA et. al, 2010), Oliveira (BEN AHMED et. al 2009) e cafeeiro (DEUNER et al., 2011) onde também foram observados aumento na atividades das enzimas antioxidantes, principalmente, SOD, CAT e APX, mostrando um eficiente sistema de defesa contra os danos celulares provocado pelo déficit hídrico.

A capacidade de manter, em níveis elevados, a atividade da SOD, CAT e APX, em condições de estresse ambiental, é essencial para manter o equilíbrio entre a formação e remoção de H_2O_2 do ambiente intracelular (ZHANG; KIRKAM, 1996).

O teor de H_2O_2 nas folhas das plantas de girassol (Figura 3), embora tenha aumentado ao longo do período experimental, apresentou diferença entre os tratamentos somente aos 12 dias de estresse, nas duas cultivares. Este elevado teor pode ser devido à maior atividade da SOD neste período, justificando o aumento da atividade da CAT (Figura 2).

Nas raízes, houve um aumento gradativo nos teores de H_2O_2 , tanto no tratamento controle quanto no estressado, diferindo, assim como nas folhas, entre os tratamentos somente aos 12 dias de estresse. Embora significativa, essa diferença entre os tratamentos nas raízes foi expressivamente menor que nas folhas, o que pode estar relacionado a baixa atividade das enzimas antioxidantes nas raízes.

Em algumas plantas tolerantes à seca, o aumento da produção de antioxidantes pode limitar a peroxidação de lipídeos (BLOKINA et al., 2003). O malondialdeído (MDA) é um produto secundário do processo de peroxidação, e o seu acúmulo é, freqüentemente, utilizado como um indicador de estresse oxidativo (DEL RIO et al. 2005). Uma pequena elevação nos níveis de MDA nas folhas foi verificada na cv M735 aos cinco dias sob estresse hídrico e aos 12 dias para a cv MG2 (Figura 4). Porém esta diferença entre os tratamentos nas duas cultivares de girassol não foi significativa, mostrando que os efeitos do estresse hídrico foram contornados pela capacidade antioxidante das enzimas, evitando assim, o estresse

oxidativo, não havendo uma significativa peroxidação dos lipídios. Nas raízes os níveis de peroxidação foram praticamente idênticos entre os tratamentos.

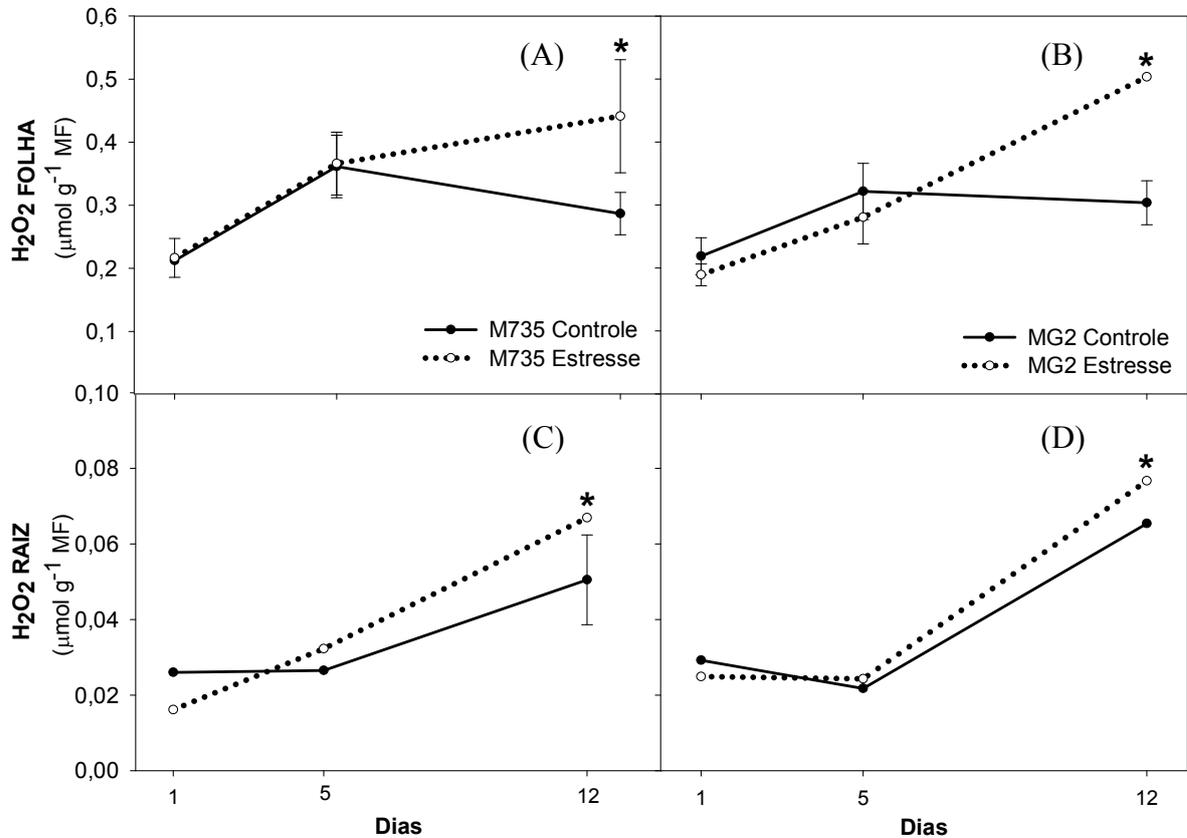


Figura 3: Teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas e raízes de duas cultivares de girassol (MG2 e M735) cultivadas sob condição de irrigação diária (Controle) e déficit hídrico (Estresse), por um período de 12 dias. *Representa diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Tukey.

Bian & Jiang (2009) verificaram que o conteúdo de MDA foi eficientemente controlado pela manutenção das atividades da SOD, CAT e APX em plantas de *Poa pratensis* sob déficit hídrico, e Cechin et al., (2010) observaram aumento no teor de MDA em folhas jovens e adultas de girassol da variedade CATISSOL-01, também sob déficit hídrico. Estes autores afirmam que o aumento dos níveis de MDA pode estar correlacionado com a atividade inadequada das enzimas antioxidantes SOD e CAT, o que não foi encontrado no presente trabalho, já que as enzimas SOD e CAT se mostraram ativas. Panda & Khan (2009) afirmam que a prevenção dos danos oxidativos e o aumento da tolerância a estresses ambientais estão associados com um sistema antioxidante eficiente.

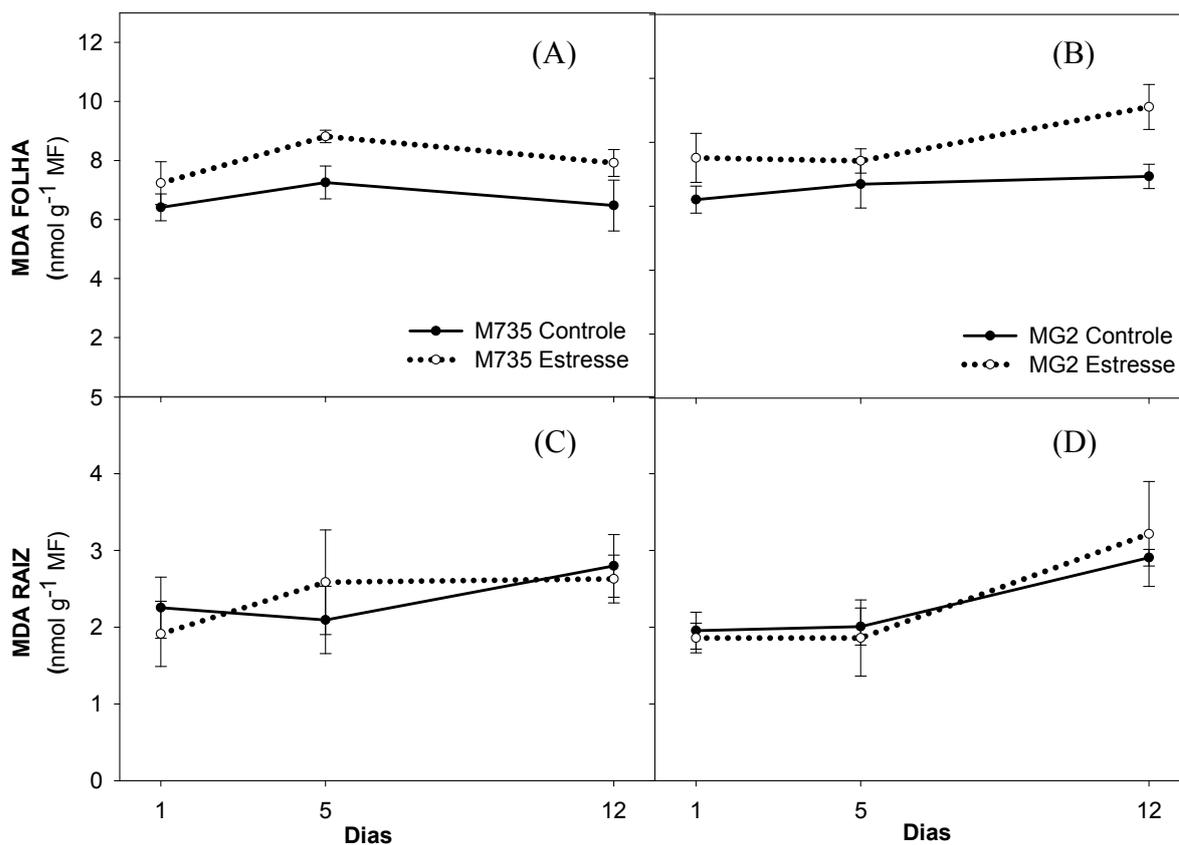


Figura 4: Peroxidação de lipídios em folhas e raízes de duas cultivares de girassol (MG2 e M735) cultivadas sob condição de irrigação diária (Controle) e déficit hídrico (Estresse), por um período de 12 dias. *Representa diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Tukey.

4. CONCLUSÕES

O período de submissão das plantas de girassol ao estresse hídrico desencadeou maior atividade de enzimas antioxidantes nas folhas. Porém, os resultados indicam que este período não foi suficiente para uma maior atividade enzimática nas raízes, o que demonstra que o nível de estresse pode não ter atingido o sistema radicular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise detalhada dos parâmetros avaliados auxilia a identificar o comportamento de cada cultivar e a estabelecer a melhor estratégia de manejo da cultura frente às possíveis condições ambientais adversas. Entretanto, estudos futuros poderão auxiliar em uma melhor caracterização da cultura frente ao estresse hídrico, identificando, por exemplo, se a deficiência hídrica ocorre mais rápida nas folhas ou nas raízes.

A indução do estresse em diferentes estádios de desenvolvimento da cultura para identificar qual é mais sensível e períodos de estresse mais prolongados para verificar até que ponto o sistema radicular suporta sem ativar o mecanismo antioxidativo, também são necessários.

A análise conjunta destes parâmetros permitirá um maior conhecimento sobre a cultura e auxiliará no seu manejo de forma mais eficaz frente às possíveis condições de estresse hídrico.

REFERÊNCIAS

- ADATI, C.; OLIVEIRA, V. A.; KARAM, D. Análise matemática e biológica dos modelos de estimativa de perdas de rendimento na cultura devido à interferência de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v.24, p.1-12, 2006.
- AZEVEDO, R.A., ALAS, R.M., SMITH, R.J., LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiology Plant**, v.104, p. 280–292. 1998
- BALBINOT JR., A.A.; BACKES, R.L.; SOUZA, A. M. Desempenho de cultivares de girassol em três épocas de semeadura no planalto norte catarinense. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.2, p.127-133. 2009.
- BARROS, C.S.; ROSSETTO, C.A.V. Teste de germinação sob condições de restrição hídrica para avaliar o vigor de sementes de girassol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n. 9, p.2621-2624. 2009.
- BEN AHMED, Ch.; BEN ROUINA, B.; SENSOY, S.; BOUKHRIS, M.; BEN ABDALLAH F. Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p. 345–352. 2009.
- BIAN, S. & JIANG, Y. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. **Science Horticulture**, v. 120, p. 264–270. 2009
- BOHNERT, H.J.; JENSEN, R.G. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. **Trends Biotechnology**, v.14, p. 89–97. 1996.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p. 248-254.1976
- CAKMAK I, DRAGANA S & HORST, M. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, p.127–132. 1993.
- CATUNDA, M.G.; FREITAS, S.P.; OLIVEIRA, J.G.; SILVA, C.M.M. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comossus*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 23, n. 1, p. 115-121, 2005.
- CECHIN, I.; CORNIANI, N.; FUMIS, T. F.; CATANEO, A.C.; Differential responses between mature and young leaves of sunflower plants to oxidative stress caused by water deficit. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, p.1290-1294, 2010.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, 2010. Acesso em: www.conab.gov.br

COSTA, M. A.; PINHEIRO, H. A.; SHIMIZU, E. S. C.; FONSECA, F. T.; SANTOS FILHO ; B. G.; MORAES, F. K. C.; FIGUEIREDO; D. M. Lipid peroxidation, chloroplastic pigments and antioxidant strategies in *Carapa guianensis* (Aubl.) subjected to water-deficit and short-term rewetting. **Trees**, v. 24, p. 275–283. 2010.

DAMATTA, F.M., RENA, A.B. 2002. Ecofisiologia de cafezais sombreados e a pleno Sol. In: Zambolim L (ed), O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café, pp.93-135. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DAMATTA, F.M.; CHAVES, A.R.M.; PINHEIRO, H.A.; DUCATTI, C. & LOUREIRO, M.E. 2003. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**, v.164, p.111-117.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J., PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr Metab Cardiovasc Dis** , v. 15, p.316–328. 2005

DEUNER, S.; ZANANDREA, I.; SILVEIRA, N.M.; MESQUITA, A.C.; GOULART, P.F.P.; ALVES, J.D. Stomatal behavior and components of the antioxidative system in coffee plants under water stress. **Scientia Agrícola**, v.68, n.1, p.77-85, 2011.

DICKMANN, L.; CARVALHO, M. A. C.; BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P. Comportamento de sementes de girassol (*helianthus annuus l.*) submetidas a estresse salino. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.3, p.64-75, 2005.

EMBRAPA. Tecnologia de Produção. Girassol. Exigências Climáticas. Disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br/producaoqirassol/exigencias.htm>. 2008. Acesso em: 20/07/2010

EMPARN. Recomendações técnicas para o cultivo do girassol. Disponível em: http://www.emparn.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/emparn/arquivos/pdf/cartilha_cultivo_do_girassol.pdf. 2009. Acesso em 25/11/2010.

FALQUETO, A.R.; CASSOL, D.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; OLIVEIRA, A. C.; BACARIN, M.A. 2007. Características da Fluorescência da Clorofila em Cultivares de Arroz Com Ciclo Precoce, Médio e Tardio. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 579-581.

FOYER, C.H., FLETCHER, J.M. Plant antioxidants: colour me healthy. **Biologist**, v. 48, p.115-120. 2001.

GIANNOPOLITIS CN & RIES SK. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59:309-314.1977.

GECHEV, T. S.; BREUSEGEM, F. V.; STONE, J. M.; DENEV, I.; LALOI; C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**, v. 28, p. 1091–1101. 2006.

GREGGAINS, V.; FINCH-SAVAGE, W.E.; QUICK, W.P.; ATHERTON, N.M. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of

viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, Lancaster, v.148, p.267-276, 2000.

HEBER, U., BLIGNY, R., STREB, P., DOUCE, R. Photorespiration is essential for the protection of the photosynthetic apparatus of C3 plants against photoinactivation under sunlight. **Botanica Acta**, v.109, p.307–315. 1996.

HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method of growing plants without soil. Berkeley, University of California, 32p. 1950.

HONG-BO; S.; CHU, L.Y.; JALEEL, C. A.; ZHAO, C.X. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, v.331, p 215–225. 2008.

HONG-BO; S; LIANG, Z.S., SHAO, M.A. Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits, **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 47, p. 132–139. 2006.

JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARUM, R.; PANNEERSELVAN, R. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 60: 110-116. 2007.

JALEEL, C. A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; INES, J.; AL-JUBURI, H. J.; CHANG-XING, Z.; HONG-BO;S.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiology Plant**, v. 31, p. 427–436. 2009.

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

KIANI, S.P., MAURY, P., SARRAFI, A.; GRIEU, P. QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. **Plant Science**, v.175, p. 565–573. 2008

LEITE, R. M. V. B de C.; CASTRO, C. de; BRIGHENTI, A. M.; OLIVEIRA, F. A. de; CARVALHO, C. G. P. de; OLIVEIRA, A. C. B de. Indicações para o cultivo do girassol nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso, Goiás e Roraima. Londrina: **Embrapa**, 2007.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **WinStat – Sistema de Análise Estatística** para Windows versão 1.0. Universidade Federal de Pelotas, 2007.

MANIVANNAN, P.; JALEEL, C.A.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Osmoregulation and antioxidant metabolism in drought-stressed *Helianthus annuus* under triadimefon drenching. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 418–425. 2008a.

MANIVANNAN, P.; JALEEL, C.A.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B., SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Protection of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. plants from salt stress by paclobutrazol. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 61, p.315–318. 2008b

MUSSI, M.M. Germinação e vigor de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) submetidas a diferentes concentrações de CO₂, períodos de exposição e embalagens. Curitiba, 2005. 14 p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Paraná.

NAKANO Y & ASADA. K Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto. 22:867-880.1981.

NASCIMENTO, M.N.; ALVES, J.D.; SOARES, A.M.; CASTRO, E.M.; MAGALHÃES, M.M.; ALVARENGA, A.A.; Silva, G.H. Biochemical alterations of plants and bud morphology of coffee tree associated to events on flowering in response to meteorological elements. **Ciência Rural**, v.38, p.1300-1307, 2008.

PANDA, S. K. & KHAN, M. H. Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.195, p. 442–454, 2009.

PANDA, D.; SHARMA, S. G., SARKAR, R.K. Chlorophyll fluorescence parameters, CO₂ photosynthetic rate and regeneration capacity as a result of complete submergence and subsequent re-emergence in rice (*Oryza sativa* L.). **Aquatic Botany**, v. 88, p. 127–133. 2008.

PANKOVIC, D.; SAKAC; Z.; KEVRESAN, S., PLESNICAR, M. Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 127–138, 1999.

PEREIRA, W. E. Trocas gasosas, fluorescência da clorofila, crescimento e composição mineral de quatro porta-enxertos de citros submetidos a estresse por Alumínio, em Cultivo Hidropônico. Viçosa, 2001. 123 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

PINHEIRO, H.A.; DAMATTA, F.M.; CHAVES, A.R.M.; LOUREIRO, M.E.; DUCATTI, C. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, v.96 p.101-108, 2005.

POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.L.; VITORELLO, V.A.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. **Scientia Agricola**, v. 65, p.548-552, 2008.

POORMOHAMMAD KIANI , S.; MAURY,P.; SARRAFI, A.; GRIEU, P. QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. **Plant Science**,v. 175, p. 565-573 2008.

RASCHER, U.; LIEBIG, M.; LÜTTGE, U. 2000. Evaluation of instant light-responses curves of chlorophyll parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. **Plant Cell & Environmental**, Oxford, v. 23, n. 12, p. 1397-1405.

ROSSI, R.O. Girassol. Curitiba: **Tecnoagro**, 1998. 333p.

SCHITTENHELM, S. Effect of Drought Stress on Yield and Quality of Maize/Sunflower and Maize/Sorghum Intercrops for Biogas Production. **Journal Agronomy & Crop Science**, v. 196, p. 253–261.2010.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, v. 125, p.27–58.1993.

STRASSER, R.J., SRIVASTAVA, A., GOVINDJEE. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 61, p. 32–42. 1995

STEDUTO, P., ALBRIZIO, R., GIORGIO, P., SORRENTINO, G., Gas-exchange response and stomatal and non-stomatal limitations to carbon assimilations of sunflower under salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v.44, p.243–255. 2000.

SUBRAHMANYAM, D., SUBASH, N., HARIS, A.; SIKKA, A.K. Influence of water stress on leaf photosynthetic characteristics in wheat cultivars differing in their susceptibility to drought. **Photosynthetica**, v. 44, p. 125-129. 2006.

TEZARA, W.; DRISCOLL, S.; LAWLOR, D.W. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ assimilation and O₂ reduction in sunflower plants under water deficit. **Photosynthetica**, v.46, p.127- 134. 2008.

UNGARO, M. R. G. 2000. Cultura de Girassol. **Boletim Técnico**, **188**. Instituto Agrônômico, Campinas. 36p.

YUSUF, M.A., KUMAR, D., RAJWANSHI, R., STRASSER, R.J., TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B. 2010. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic Brassica juncea plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1-11.

ZHANG, J.; KIRKAM, M.B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid and propyl gallate. **Journal of Plant Physiology**, v.149: p. 498-493, 1996.

ZHENG, Y.X. ; WU, J.C.; CAO, F.L.; ZHANG, Y.P. Effects of water stress on photosynthetic activity, dry mass partitioning and some associated metabolic changes in four provenances of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). **Photosynthetica**, v. 48, p.361-369, 2010.