

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**Mecanismos de tolerância ao déficit hídrico em espécies de forrageiras nativas
dos campos sul-brasileiros**

Angelita Celente Martins

Pelotas, 2014

Angelita Celente Martins

**Mecanismos de tolerância ao déficit hídrico em espécies de forrageiras nativas
dos campos sul-brasileiros**

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

Orientador: Prof. Dr. Luciano do Amarante

Co-orientadores: Dra. Cristina Ferreira Larré

Dra. Fernanda Bortolini

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M379m Martins, Angelita Celente
 Mecanismo de tolerância ao déficit hídrico em espécies de
 forrageiras nativas dos campos sul-brasileiros / Angelita Ce-
 lente Martins. – 86f.: il. – Dissertação (Mestrado). Programa
 de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Fede-
 ral de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orienta-
 dor Luciano do Amarante; co-orientador Cristina Ferreira Lar-
 ré e Fernanda Bortolini.

 1. Biologia. 2. Fisiologia vegetal. 3. Estresse hídrico.
 4. Leguminosas. 5. *Desmodium*. 6. *Macroptilium*. 7. *Vigna*.
 I. Amarante, Luciano. II. Larré, Cristina Ferreira. III. Bortolini,
 Fernanda. IV. Título

CDD: 633.3

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luciano do Amarante

Prof^a. Dra. Claudete Miranda Abreu

Dr^a. Cristina Moll Hüther

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

Dedico

Ao meu esposo, Carlos Fernando

Aos meus filhos Felipe e William

A minha avó ((in memoriam) Maria José

A minha mãe Sônia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar e guiar minha trajetória, em todos os momentos de minha vida, sempre me guiando.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de participar do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal para a obtenção do grau de Mestre em Fisiologia Vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) ETB, pela disponibilidade de material, para a realização dos meus experimentos, em especial, Dr^a. Fernanda Bortolini, pela co-orientação e oportunidade.

A todos os professores do Curso de Fisiologia Vegetal pelos conhecimentos transmitidos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano do Amarante, pela oportunidade em ser sua orientada, pela amizade, confiança, incentivo e pelo exemplo de humildade. Minha gratidão e respeito.

À Dr^a. Cristina Larré pela co-orientação, contribuição, companheirismo e esforço dedicado a este trabalho, pela paciência nos ensinamentos, pela dedicação e principalmente pela amizade.

Ao meu amado marido Carlos Fernando pelo companheirismo, paciência e compreensão, aos meus filhos, Felipe e William, pelo apoio incondicional que dedicaram a mim, cada um à sua maneira, para que também esta conquista fosse possível. Muito obrigada!

À minha avó amada, que hoje se encontra com Deus, mas hoje acredito que está sorrindo orgulhosa ou chorando emocionada, pela minha vitória. À minha mãe Sônia minha gratidão, pois a você foi cumprido o dom divino o dom de ser Mãe, e a minha cunhada Lizete por me proporcionar dias de sossego para o término de minha escrita.

Aos colegas do PPGFV em ESPECIAL ao Rodrigo Fernando Eichholz e Gabriela Gerhardt da Rosa pela grande amizade e pelas muitas vezes que souberam respeitar o meu silêncio; que compartilharam estes dois anos, de páginas, de livros e cadernos; que me acompanharam, choraram, riram.

Aos colegas do grupo Bioquímica Vegetal, Dominique Dellias, Junior Borella e a você Julio Vinueza pela paciência, pelas preciosas ajudas, e também pelos momentos de risos e diversão. Agradeço a todos na realização deste trabalho.

Obrigada!

RESUMO

CELENTE, Angelita Martins. **Mecanismos de tolerância ao déficit hídrico em espécies de forrageiras nativas dos campos sul-brasileiros**. 2014. 83f Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

Os campos naturais sul-americanos apresentam várias espécies nativas com grande potencial forrageiro, que podem servir para o desenvolvimento de novos materiais cultivados mais produtivos e adaptados às mudanças climáticas. Dentre essas, destacam-se algumas leguminosas, como *Macroptilium lathyroides* L., *Vigna luteola* Jacq. e *Desmodium incanum* DC. O objetivo do trabalho foi caracterizar alguns mecanismos fisiológicos e bioquímicos de adaptação ao estresse, causado pela restrição hídrica no solo, em leguminosas nativas dos campos sul-brasileiros. As plantas foram obtidas a partir de sementes coletadas a campo e semeadas em bandejas multicelular de polipropileno expendido contendo substrato comercial (turfa fértil) e cultivadas em casa de vegetação. Após 49 dias da semeadura, as plantas foram transferidas para vasos plásticos, perfurados, com capacidade de 3L, mantendo-se três plantas por vaso. O substrato utilizado foi constituído de turfa fértil e solo, na proporção de 1:1. O tratamento com restrição hídrica foi iniciado 30 dias após o transplante por meio da suspensão da irrigação. O monitoramento do teor de umidade foi realizado por gravimetria. As plantas do tratamento controle foram mantidas na capacidade de campo. As avaliações foram realizadas aos quatro, 11 e 18 dias após a submissão ao déficit hídrico e aos dois, cinco e nove dias após a reidratação. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com quatro repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e analisados por comparação de médias pelo Teste de Tukey a 5% de significância. A unidade experimental consistiu em um vaso contendo três plantas. Foram avaliados os parâmetros de crescimento, (massa seca da parte aérea e do sistema radicular e área foliar), concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a*, *b*, total e de carotenoides totais) e o teor relativo de água em folhas, extravasamento de eletrólitos, teores de açúcares solúveis totais, prolina, peróxido de hidrogênio e malondialdeído em folhas e raízes. Os resultados obtidos permitem inferir que, em plantas de *Macroptilium lathyroides* e *Desmodium incanum* há uma relação direta entre o crescimento, caracterizado pelo acúmulo de massa seca na parte aérea e raiz respectivamente, o potencial de água nas folhas, a área foliar e o teor de clorofila total. Relação esta que não foi observada em *Vigna luteola*. O acúmulo de solutos compatíveis como açúcares solúveis e prolina constitui uma estratégia metabólica evidente para adaptação à restrição hídrica nas três espécies de leguminosas.

Palavras-chave: estresse hídrico, leguminosas, *Desmodium*, *Macroptilium*, *Vigna*

ABSTRACT

CELENTE, Angelita Martins. **Mechanisms of tolerance to water deficit in species of native forages of the South Brazilian fields.** 2014. 83f Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

Many native species from southern Brazilian rangelands have elevated potential to be cultivated as forage and could be used to develop more productive and adapted materials to stress caused by climate changes such as some legume species: *Macroptilium lathyroides* L., *Vigna luteola* Jacq. and *Desmodium incanum* DC. The aim of this work was to characterize some biochemical and physiological adaptation mechanisms to stress caused by soil water deficit in native legume species from southern Brazilian rangelands. Seeds were collected from native rangelands plants and planted in foam box cells containing commercial substrate (turf with nutrients) and grown under greenhouse conditions. Plants were transferred to 3 L perforate plastic pots containing turf and soil in a 1:1 proportion, 49 days after sowing. Water deficit treatments were applied by stopping the irrigation of plants and initiated 30 days after plants were transferred to pots. Soil moisture levels were monitored by gravimetry and control plants were kept closed to the field capacity. Growth and biochemical analysis were done at four, 11 and 18 days after plants were submitted to water deficit and at two, five and nine days after rehydration of substrate in a group of plants upon 18 days of water deficit treatment. Experiments were carried out in a fully randomized block design and the data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA). When *F* was significant the treatments means were compared by Tukey's test ($p \leq 0.05$). Each treatment consisted of four replicates and each replicate consisted of one pot containing three plants. Growth parameters (root and shoot dry mass and leaf area), photosynthetic pigments concentration (chlorophyll *a*, *b* and total, total carotenoids) and relative water content in leaves, electrolyte leakage, total soluble sugars contents, proline levels, hydrogen peroxide and malondialdehyde contents in leaves and roots were quantified. *Macroptilium lathyroides* and *Desmodium incanum* growth, characterized by dry mass accumulation in shoot and root system, was affected by water deficit in a similar way as water leaf potential, leaf area and total chlorophyll content. In *Vigna luteola* plants the relationship between these parameters was not observed. Compatible solute accumulation such as soluble sugars and proline constitutes an evident metabolic strategy for adaptation to water restriction in the three legume species.

Keywords: water stress, legumes, *Desmodium*, *Macroptilium*, *Vigna*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1: Área foliar (A) e Teor relativo de água (B) em plantas de *Macroptilium lathyroides* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....26

FIGURA 2: Área foliar (A) e Teor relativo de água (B) em plantas de *Desmodium incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade..... 27

FIGURA 3: Área foliar (A) e Teor relativo de água (B) em plantas de *Vigna luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....28

FIGURA 4: Massa seca de parte aérea e raiz de plantas de *Macroptilium lathyroides* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....30

FIGURA 5: Massa seca de parte aérea (A) e raiz (B) de plantas de *Desmodium incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....31

FIGURA 6: Massa seca de parte aérea (A) e raiz (B) de plantas de *Vigna luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....32

FIGURA 7: Teor de clorofila *a* (A) e clorofila *b* (B) em plantas de *Macroptilium lathyroides* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....33

FIGURA 8: Teor de clorofila Total (A) e Carotenoides (B) em plantas de *Macroptilium lathyroides* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....34

FIGURA 9: Teor de clorofila *a* (A) e clorofila *b* (B) em plantas de *Desmodium incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....35

FIGURA 10: Teor de clorofila Total (A) e Carotenoides (B) em plantas de *Desmodium incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....36

FIGURA 11: Teor de clorofila *a* (A) e clorofila *b* (B) em plantas de *Vigna luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....37

FIGURA 12: Teor de clorofila Total (A) e carotenoides (B) em plantas de *Vigna luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....38

CAPÍTULO 2

FIGURA 1: Teores de açúcares solúveis totais em folhas (A) e raízes (B) de *Macroptilium lathyroides* L. submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....52

FIGURA 2: Teores de açúcares solúveis totais em folhas (A) e raízes (B) de *Desmodium incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....53

FIGURA 3: Teores de açúcares solúveis totais em folhas (A) e raízes (B) de *Vigna luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....54

FIGURA 4: Teores de prolina livre em folhas (A) e raízes (B) de *Macroptilium lathyroides* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....55

FIGURA 5: Teores de prolina livre em folhas (A) e raízes (B) de *Desmodium incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....56

FIGURA 6: Teores de Prolina livre em folhas (A) e raízes (B) de *Vigna luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....57

FIGURA 7: Extravasamento de eletrólitos em folhas (A) e raízes (B) de *Macroptilium lathyroides* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....58

FIGURA 8: Extravasamento de eletrólitos em folhas (A) e raízes (B) de *Desmodium incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....59

FIGURA 9: Extravasamento de eletrólitos em folhas (A) e raízes (B) de *Vigna luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade..... 60

FIGURA 10: Teores de MDA (Malondialdeído) em folhas (A) e raízes (B) de *Macroptilium lathyroides* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....61

FIGURA 11: Teores de MDA (Malondialdeído) em folhas (A) e raízes (B) de *Desmodium incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....62

FIGURA 12: Teores de MDA (Malondialdeído) em folhas (A) e raízes (B) de *Vigna luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....63

FIGURA 13: Teores de H₂O₂ em folhas (A) e raízes (B) de *Macroptilium lathyroides* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....64

FIGURA 14: Teores de H₂O₂ em folhas (A) e raízes (B) de *Desmodium incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.....65

Figura 15: Teores de H₂O₂ em folhas (A) e raízes (B) de *Vigna luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade..... 66

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPÍTULO 1	21
Avaliação de parâmetros de crescimento em leguminosas com potencial forrageiro no Rio Grande do Sul em condições de restrição hídrica	21
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS	22
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO.....	39
CONCLUSÕES.....	43
CAPÍTULO 2	45
Caracterização de mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na tolerância ao déficit hídrico em leguminosas com potencial forrageiro.....	45
INTRODUÇÃO.....	45
MATERIAIS E MÉTODOS	47
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO.....	67
CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

INTRODUÇÃO GERAL

Os campos do sul do Brasil estão distribuídos entre os Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, nos biomas Mata Atlântica e Pampa (EMBRAPA 2011). As pastagens naturais da Região Sul do Brasil apresentam grande importância sócio econômica e ecológica, em função da utilização como fonte de alimento volumoso para bovinos, ovinos e outras espécies animais, assim como pela contribuição para a conservação de outros recursos naturais, tais como o solo, a água e a fauna.

A substituição das áreas campestres por cultivos agrícolas e/ou florestais e estratégias de manejo do pastejo inadequadas reduziu drasticamente a área de campos no Sul do Brasil com consequente diminuição da capacidade produtiva dos campos, acarretando na formação de extensas áreas degradadas.

A aplicação de herbicidas sobre a vegetação campestre para introdução de espécies forrageiras cultivadas, a introdução de lavouras para produção de grãos ou para obtenção de celulose, o manejo inadequado com alta carga animal, o qual seleciona espécies adaptadas ao mesmo e o uso sistematizado do fogo, são os principais responsáveis pela destruição deste ecossistema natural (PILLAR *et al.*, 2009).

Todos estes fatores têm levado a um aumento da compactação e da perda dos nutrientes do solo pela falta de cobertura, com consequente diminuição da capacidade produtiva dos campos, chegando ao ponto de se tornarem areais, acarretando na formação de extensas áreas degradadas, implicando inclusive na perda da cultura regional associada à prática pecuária e exploração sustentável do campo natural. A conservação e a importância dos campos têm sido negligenciadas e a taxa de desaparecimento tem alcançado 130.000 ha/ano nos últimos 40 anos (NABINGER, 2002).

Embora o nível de conhecimento tenha aumentado, há muito ainda por fazer para o melhor aproveitamento e preservação das pastagens naturais, pois o nível de

agressão também está aumentando consideravelmente. Neste sentido o bioma é constituído de uma flora campestre com grande biodiversidade, que é encontrada em todo o Cone Sul (Sul do Brasil, Argentina e Uruguai), mas com pouca informação sobre as forrageiras que compõem esse ecossistema (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

A importância da ocorrência de leguminosas nas pastagens é conhecida tanto pela incorporação e ciclagem de nitrogênio no solo, efeito na biota servindo como ativador dos fungos micorrízicos, bem como pelo efeito que o sistema radicular provoca na estrutura física do solo, entre outros, além do aumento dos teores de proteína e minerais na dieta animal (PRIMAVESI, 1999).

Os campos naturais sul-americanos apresentam várias espécies nativas com grande potencial forrageiro, que podem servir para o desenvolvimento de novos materiais cultivados adaptados e mais produtivos, tais como, *Macroptilium lathyroides* L., *Vigna luteola* Jacq. e *Desmodium incanum* DC.

O *Macroptilium lathyroides* L., espécie anual ou bienal de estação quente, é boa produtora de matéria seca, pouco exigente em fertilidade além de tolerar precipitações abaixo de 475 mm anuais, parecendo ser uma espécie com excelentes características para ser utilizada em áreas com ocorrência de secas. Além desses atributos, a espécie apresenta heliotropismo, um mecanismo adaptativo de resposta ao estresse ambiental (SANTOS *et al.*, 2006). *M. lathyroides* L é conhecido por diferentes nomes populares: figo-de-pombo (VASCONCELOS *et al.*, 2011), feijão-dos-arrozais (FERREIRA *et al.*, 2004) ou feijão de rola (BASILE *et al.*, 2007). As vagens desta espécie se desidratam ao atingirem a maturação e se rompem, lançando as sementes a distâncias consideráveis.

A *Vigna luteola* Jacq é uma leguminosa anual de estação quente, com alta palatabilidade. Planta estival, volúvel, trepadeira com talo único na parte basal e bastante ramificado na superior, com hastes de 1-1,5 m de altura, possuindo tricomas esbranquiçados, amarelo pálido e outras vezes dourado. Possuem vagens pilosas, retas ou levemente arqueadas, deiscentes, onde são encontradas as sementes escuras, elípticas de 4-7 mm de comprimento 3-4 mm de largura (SKERMAN; CARMERON; RIVEROS, 1991; IZAQUIRRE; BUJHAUT, 1997).

Desmodium incanum DC, popularmente conhecido como "pega-pega", é a leguminosa nativa mais abundante no campo natural do Rio Grande do Sul, com ampla distribuição. Espécie perene, estival, com hábito de crescimento prostrado ou ascendente, apresentando boas características bromatológicas como forrageira,

sendo bem aceita pelos animais (MEDEIROS *et al.*, 2006). Embora a degradação dos campos nativos, causada pela alta carga animal e pela invasão dos mesmos por cultivos têm provocado redução na ocorrência de muitas espécies campestres, se essa espécie persistisse em meio ao cultivo, poderia se tomar uma "espécie-chave" na regeneração da flora (BUISSON *et al.*, 2002), em casos de rotação com pastagens nos sistemas de integração lavoura-pecuária.

Segundo BOLDRINI (1993), dentre as leguminosas, *D. incanum* DC é a espécie mais frequente no campo, ocorre em todas as regiões do estado (OLIVEIRA, 1993). De acordo com suas características de frequência, ciclo de vida produtividade e aceitação pelos animais é considerada ótima forrageira. Adapta-se aos mais variados tipos de solo, crescendo bem em solos de média acidez, porém se desenvolve melhor naqueles muito ácidos (pH entre 4,0 e 4,5) de baixa fertilidade (SCHWALBERT *et al.*, 2014).

Os períodos de estiagens limitam a sobrevivência de algumas espécies no Rio Grande do Sul. Durante o verão esta condição climática é determinada pelo fenômeno *La Niña*. Por isso é de extrema importância que algumas espécies sejam tolerantes à seca.

A resposta das plantas ao déficit hídrico consiste no decréscimo da produção da área foliar, no fechamento dos estômatos, na aceleração da senescência e na abscisão das folhas (TAIZ & ZEIGER 2009). Quando as plantas são expostas a situações de déficit hídrico exibem, frequentemente, respostas fisiológicas que resultam de modo indireto, na conservação da água no solo, como se estivessem economizando para períodos posteriores.

O estresse é considerado como um desvio significativo das condições ótimas para a vida, induzindo mudanças em todos os níveis funcionais do organismo, as quais, em princípio, podem ser reversíveis, mas podem tornar-se permanentes (LARCHER, 2004). O estresse por déficit hídrico é produzido tanto por deficiência de água no solo quanto por perda excessiva pela transpiração em relação à absorção feita pelas raízes, sendo esses processos influenciados por fatores ambientais e por características da própria planta (SANT'ANNA, 2009).

Nos vegetais, a tolerância à falta de água pode ocorrer em maior ou menor grau a depender da espécie, do genótipo, da duração, severidade, da idade, estágio de desenvolvimento da planta, do órgão, tipo de célula e do comportamento sub-celular. Dessa forma, as plantas podem apresentar tolerância quando sobrevivem às

adversidades ou suscetibilidade, quando sofrem redução em seu crescimento, podendo chegar à morte, dependendo da intensidade do estresse ao qual a planta é submetida (CAMBRAIA, 2005). A capacidade das plantas de se manterem túrgidas é uma característica necessária para a garantia da produção, em locais onde ocorre o déficit hídrico (NOGUEIRA *et al.*, 2001). Para Pimentel e Perez (1999), a adaptação à seca é uma função mutagênica e, portanto, depende de várias características morfológicas e fisiológicas, levando as plantas a modificações que permitem, em geral, o desenvolvimento de estratégias que envolvem mecanismos para a conservação do conteúdo relativo de água favorável à manutenção dos processos metabólicos.

Todo processo vital é afetado pelo declínio do potencial hídrico. Inicialmente há perda de turgor celular, seguido da redução de crescimento; ocorrem limitações no metabolismo de aminoácidos e proteínas com reflexo na divisão celular. As alterações hormonais levam a regulações no funcionamento do aparato estomático, reduzindo as trocas de dióxido de carbono (CO₂), antecipação do processo reprodutivo e aceleração da senescência. Também, baixos valores de potencial hídrico impedem o processo fotossintético, tanto por prejuízo causado ao transporte de elétrons e à fotofosforilação acíclica, como pelo fechamento dos estômatos (LARCHER 2004).

Um dos principais fatores que provocam estresse e afetam sobremaneira a produtividade e persistência de espécies forrageiras é o déficit hídrico. É comum durante o crescimento das plantas, tendo como consequência a redução temporária do crescimento e da biomassa, ocorrendo principalmente durante a estação de seca, quando a água do solo não está disponível para a planta por dias, semanas ou até meses, causando um decréscimo nas atividades fisiológicas. Algumas espécies apresentam sinais visíveis de déficit hídrico, como murchamento, e enrolamento das folhas (BARRETO; BARBOSA, 2001).

Decréscimos do potencial osmótico devido ao acúmulo de solutos solúveis nas células constituem outra resposta ao estresse hídrico. O ajustamento osmótico produz um potencial hídrico foliar mais negativo, ajudando assim a manter o movimento de água para as folhas e, conseqüentemente, favorecendo a turgescência das mesmas (SILVA *et al.*, 2014). Plantas sob estresse hídrico mostram um aumento na concentração de potássio, de açúcares redutores, prolina, e um decréscimo no conteúdo de açúcares não reduzidos.

Dentre os solutos envolvidos no processo de ajustamento osmótico, a prolina tem sido amplamente descrita na literatura como um aminoácido particularmente sensível ao estresse (MARTINEZ; MORENO, 1992; HOPKINS, 1995, LARCHER, 2000). Um marcado acúmulo de prolina livre é observado em muitas espécies vegetais submetidas ao estresse hídrico (MARTINEZ; MORENO, 1992) Este acúmulo pode representar um mecanismo de sobrevivência ao período de estresse, em função de melhor ajustamento osmótico induzido por esse aminoácido. Quando em situação de baixa disponibilidade de água no solo, como ocorre durante o período de seca, as plantas necessitam reduzir o potencial hídrico de suas células para a manutenção da turgescência celular e esse ajuste se dá, especialmente, através do acúmulo de substâncias orgânicas que ajudam na osmorregulação, sendo a prolina uma das principais substâncias (SILVA *et. al.*, 2004).

A prolina (Pro) é um aminoácido formado por meio da reação entre a carboxila gama do glutamato e o ATP resultando no composto denominado glutamato-5-fosfato, que é reduzido por NADPH a glutamato- 5- semialdeído que se torna cíclico espontaneamente formando o pirrolino-5-carboxilato, este sofre uma redução final que resulta na formação da Pro (CÂMARA *et al.*, 2000). Este aminoácido é utilizado como indicador da resposta ao estresse hídrico em várias espécies vegetais (WYN JONES; GORHAM, 1983) O acúmulo deste aminoácido está correlacionado à tolerância ao estresse, sendo a sua concentração, geralmente mais elevada nas plantas tolerantes do que nas sensíveis (ASHRAF; FOOLAD, 2007).

Na literatura são poucos os trabalhos direcionados à avaliação e caracterização das espécies vegetais nativas que possuem mecanismos de valor adaptativo à seca, incluindo as que apresentam potencial forrageiro. Em virtude da demanda constante por pesquisas nesta área, busca-se o avanço do conhecimento relacionado à tolerância dessas espécies aos estresses abióticos, especialmente a seca. Com isso, os resultados propiciarão o avanço do conhecimento em relação à caracterização dessas espécies quanto ao enfrentamento de condições ambientais adversas, inferindo-se suas respostas frente ao cenário de mudanças climáticas globais. Os resultados poderão contribuir para a valorização e uso da biodiversidade dos campos sul-brasileiros, contribuindo para produção de pecuária sustentável, gerando ganhos sócio econômicos e ambientais de grande impacto para a pecuária sulina e recuperação de áreas degradadas do Bioma Pampa, além do resgate da

cultura regional. Assim, o presente trabalho teve por objetivo estudar alguns mecanismos fisiológicos e bioquímicos de adaptação de leguminosas nativas dos campos sul-brasileiros, com potencial forrageiro, ao estresse causado por restrição hídrica no solo.

CAPÍTULO 1

Avaliação de parâmetros de crescimento em leguminosas com potencial forrageiro no Rio Grande do Sul em condições de restrição hídrica

Assessment of growth parameters in legumes with forage potential in Rio Grande do Sul under conditions of water restriction

INTRODUÇÃO

Os campos naturais sul-americanos apresentam várias espécies nativas com grande potencial forrageiro, que podem servir para o desenvolvimento de novos materiais cultivados adaptados e mais produtivos (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Dentre essas, destacam-se algumas leguminosas, como *Macroptilium lathyroides* L., *Vigna luteola* Jacq. e *Desmodium incanum* DC.

M. lathyroides. L é conhecido por diferentes nomes: figo-de-pombo (VASCONCELOS *et al.*, 2011), feijão-dos-arrozais (FERREIRA *et al.*, 2004) ou feijão de rola (BASILE *et al.*, 2007). Possui flores vermelho-violáceas ou azul-violáceas, é nativa das Guianas, Brasil e Paraguai, cultivado como forragem e adubo verde, possui ciclo anual ou bienal de estação quente. É uma boa produtora de matéria seca e pouco exigente em fertilidade (SKERMAN *et al.*, 1991),

A espécie *Vigna luteola* Jacq. é uma leguminosa anual de estação quente, com alta palatabilidade sendo consumida preferencialmente pastejada. O gênero *Vigna* ocorre nas regiões tropicais e subtropicais com uma ampla distribuição mundial (SOUZA ; SILVA; FREIRE FILHO, 1998).

O *Desmodium incanum* L., popularmente conhecido como "pega-pega", é a leguminosa nativa mais abundante nos campos nativos do Rio Grande do Sul, com ampla distribuição. É uma espécie perene, estival, com hábito de crescimento prostrado ou ascendente, apresentando boas características bromatológicas como forrageira, sendo bem aceita pelos animais (BOLDRINI, 1993).

Espécies, como as citadas, que se desenvolvem em estações mais quentes, estão sujeitas à alta incidência luminosa, altas temperaturas e baixa precipitação. Os períodos de estiagens limitam a sobrevivência de algumas espécies no Rio Grande do Sul, o que faz com que as mesmas, em alguns casos, alterem o metabolismo como forma de escapar ou tolerar a seca.

A deficiência hídrica, no solo e na atmosfera, juntamente com alta temperatura e radiação, têm sido citadas como as principais restrições à sobrevivência e as produtividades agrônômica e florestal (FLEXAS *et al.*, 2002). Dentre estas restrições, a água é considerada o fator mais limitante para sustentabilidade dos sistemas agrícolas (PAIVA *et al.*, 2005; CHAVES *et al.*, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2009), pois além de afetar as relações hídricas e alterar o metabolismo das plantas, a limitação em sua disponibilidade é fenômeno que ocorre em grandes extensões de áreas cultiváveis, causando redução severa na produtividade das culturas (NOGUEIRA *et al.*, 2001).

A redução no conteúdo de água no solo causa significativa variação na distribuição e desenvolvimento radicular, podendo variar ao longo período de disponibilidade e a quantidade de água disponível para as plantas. (RODRIGUES *et al.*, 2013). Algumas estratégias são utilizadas pelas plantas para auxiliar na tolerância contra a seca, como perda das folhas e/ou diminuição da área foliar, reduzindo com isso a transpiração (VILLAGRA; CAVAGNARO, 2006); perda das raízes superficiais e proliferação das profundas (REIS *et al.*, 2006) e ajustamento osmótico para manutenção do turgor celular (CARVALHO, 2005).

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo caracterizar alterações morfo-fisiológicas, em três espécies de leguminosas com potencial forrageiro, sob diferentes períodos de restrição hídrica e após a reidratação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Condições do experimento

O experimento foi desenvolvido em condições ideais de temperatura e luminosidade em casa de vegetação localizada no campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). As determinações analíticas foram realizadas no Departamento de Botânica e no Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) da UFPel. Foram utilizadas plântulas

obtidas a partir de sementes da EMBRAPA CLIMA TEMPERADO (ETB), coletadas a campo, de leguminosas das espécies: *Macropitilium lathyroides* L (feijão do campo), *Vigna luteola* Jacq (feijão da praia), e *Desmodium incanum* DC (pega-pega), cultivadas pela Embrapa Clima Temperado - Estação Experimental Terras Baixas, situada no município do Capão do Leão, RS, cujas coordenadas geográficas são: latitude Sul de 31° 52' 32", longitude oeste de Greenwich de 52° 21' 24" e altitude de 13 metros acima do nível do mar.

As sementes foram semeadas em bandejas multicelular de polipropileno expandido contendo substrato comercial (turfa fértil) e mantidas em condições de casa de vegetação, sob condições ideais de luz e temperatura. Após 49 dias da semeadura, as plantas foram transferidas para vasos plásticos, perfurados com capacidade de 3L, mantendo-se três plantas por vaso. O substrato utilizado foi constituído de turfa fértil e solo classificado como planossolo, na proporção de 1:1. A nutrição das plantas foi realizada pela aplicação de 150 mL de solução de Hoagland e Arnon (1938) por vaso, duas vezes por semana.

O tratamento com restrição hídrica foi iniciado 30 dias após o transplante por meio da suspensão da irrigação. O monitoramento do teor de umidade foi realizado por gravimetria. As plantas do tratamento controle foram mantidas na capacidade de campo. A quantidade de água adicionada em cada vaso foi calculada com base na pesagem dos vasos em balança analítica. A superfície do vaso foi coberta com filme plástico durante a execução do experimento para evitar perdas de água por evaporação.

Após o período de 18 dias de restrição hídrica, as plantas destinadas a recuperação foram irrigadas de forma a manter o solo na capacidade de campo. As avaliações foram realizadas aos quatro, onze e dezoito dias (4d-DH, 11d-DH e 18d-DH) após a suspensão da irrigação e aos dois, cinco e nove dias após a irrigação, considerado o período de recuperação (2d-R, 5d-R e 9d-R) .

Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3 x 2 x 6 (espécie, condição hídrica e períodos de avaliação) com quatro repetições, sendo a unidade experimental representada por um vaso contendo três plantas. Os dados foram submetidos a Análise de variância (ANOVA) e as médias

comparadas pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) através do programa Winstat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2007).

Determinações analíticas

As análises de crescimento e a extração e quantificação dos pigmentos fotossintetizantes das plantas foram realizados no Laboratório de Bioquímica Vegetal, do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas.

Em cada período de coleta as plantas foram separadas em órgãos (parte aérea e raiz). As raízes foram lavadas em água corrente, e o material vegetal foi acondicionado em sacos de plástico, mantidos em caixa de polipropileno, sob baixa temperatura até o momento das análises em laboratório.

Avaliação do crescimento

O crescimento das plantas foi determinado pelo acúmulo de massa seca da parte aérea e raízes. Após a aferição da massa fresca o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel pardo e seco em estufa de circulação de ar a $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, até peso constante para a determinação da massa seca em balança analítica. Os resultados expressos em g /planta:

Determinação da área foliar

A área foliar foi determinada levando em conta as lâminas verdes destacadas de cada unidade experimental, utilizando-se o medidor de área Li-Cor (Modelo Li-3100–Li-Cor In. NE USA) do Laboratório de Metabolismo Vegetal do Departamento de Botânica da UFPel e expressa em centímetros quadrados por planta ($\text{cm}^2/\text{planta}$).

Teor relativo de água

Para o Teor relativo de água (TRA), foram retirados seis discos foliares, com aproximadamente 0,5 cm cada, das folhas mais jovens e completamente expandidas. Os discos foram aferidos para a determinação da massa fresca, logo em seguida colocados em placas de Petri, imersos em água deionizada. Após 12h, em geladeira, foram novamente pesados para a obtenção do peso da massa túrgida e, posteriormente acondicionados em sacos de papel e levados à estufa de circulação forçada de ar a $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para determinação da massa seca.

De posse dos dados da massa fresca (MF), massa túrgida (MT) e massa seca (MS), foi calculado o teor relativo de água de acordo com a fórmula:

$$TRA = [(MF - MS / MT - MS)] \times 100$$

Extração e quantificação de pigmentos fotossintetizantes.

As determinações dos pigmentos fotossintetizantes foram realizadas em folhas jovens expandidas com base em método proposto por Wellburn (1994). As folhas foram coletadas e imediatamente acondicionadas em banho de gelo em caixa de polipropileno. Inicialmente, foram cortadas em pequenos segmentos, desprezando-se a nervura central e amostra de 0,02 g foi inserida em tubo de ensaio contendo 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) neutralizado com carbonato de cálcio 5%. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a temperatura de 65°C por 1 hora, ao abrigo da luz e após resfriados no escuro até atingirem temperatura ambiente para serem realizadas as leituras das absorvâncias a 480 nm, 649 nm e 665 nm em espectrofotometro (marca Biospectro, modelo SP-22).

Os teores de clorofila *a*, *b*, *total*, razão clorofila *a/b*, teores de carotenoides e razão clorofila total/carotenoides foram calculados com base nas equações: Clorofila *a* = (12,47 x A665) - (3,62 x A649); Clorofila *b* = (25,06 x A649) - (6,5 x A665); Clorofila total = clorofila *a* + clorofila *b*; Carotenoides = (1000 x A480) - (1,29 x clorofila *a*) - (53,78 x clorofila *b*) / 220. Os resultados foram expressos em mg g⁻¹ MF.

RESULTADOS

A área foliar de *M. lathyroides* L. foi influenciada significativamente pelos regimes hídricos e períodos dos tratamentos, sendo resultado da interação entre os dois fatores (Figura 1A). Nas plantas submetidas ao déficit hídrico houve redução na área foliar a partir de 11d-DH, não restabelecendo os valores iniciais após a reidratação. Quando comparadas ao tratamento controle, nas plantas submetidas à restrição hídrica foi evidenciada a redução na área foliar somente aos 18d-DH, mantendo a diferença até o final do período de avaliação.

Para o teor relativo de água nas folhas de *M. lathyroides* (Figura 1B), também foi evidenciada diferença significativa entre períodos e tratamentos, apresentando, da mesma forma que a área foliar, interação entre os dois fatores avaliados. Ao

longo do período avaliado as plantas submetidas ao déficit hídrico reduziram o conteúdo relativo de água, decrescendo significativamente do controle aos 18d-H e reestabelecendo o mesmo após a reidratação aos 5d-R.

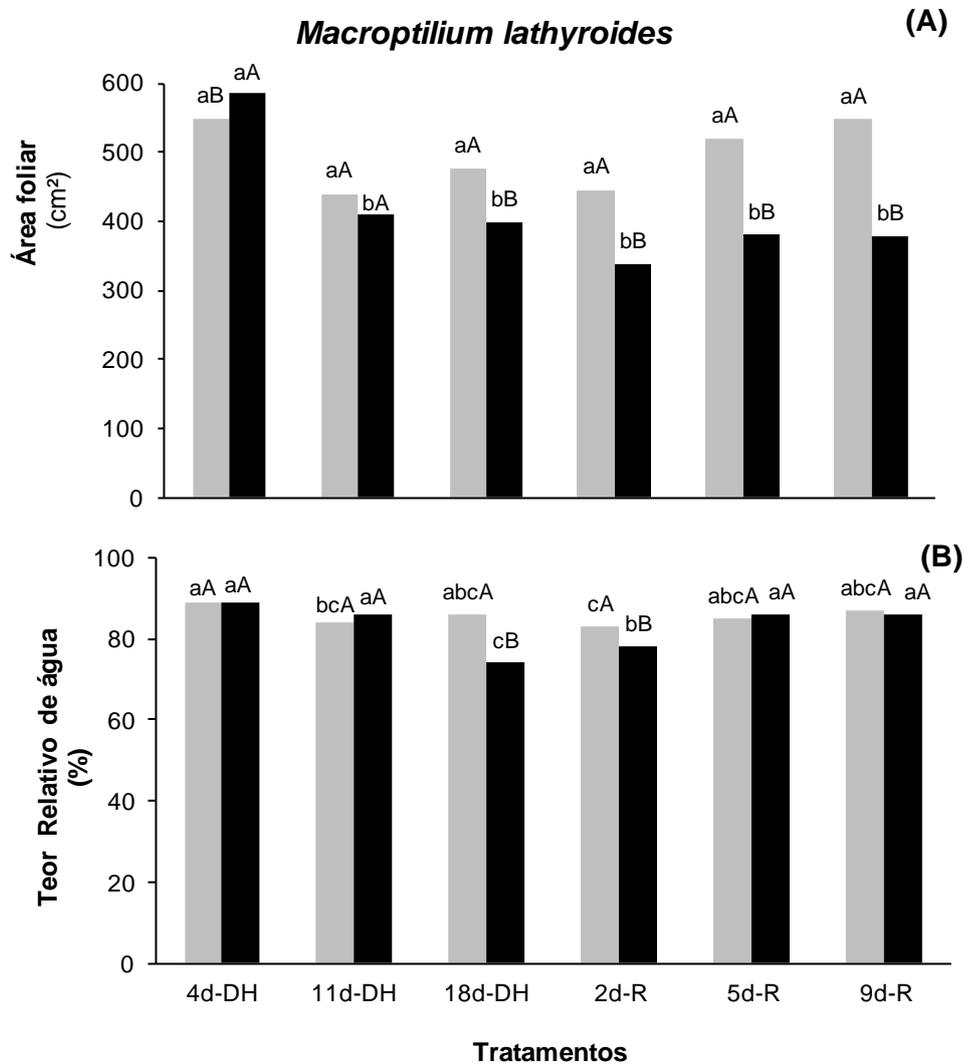


Figura 1: Área foliar (A) e Teor relativo de água (B) em plantas de *M. lathyroides* L submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Em *D. incanum*, os valores de área foliar observados demonstraram diferença significativa entre os tratamentos em todos os períodos avaliados (Figura 2A). No tratamento controle houve incremento de área foliar em função do tempo, enquanto nas plantas submetidas ao déficit hídrico foi evidenciada redução na área foliar aos 18d-DH e aos 2d-R. Após esse período foi observada aumento da área foliar, porém

não se igualando as plantas do tratamento controle até o final do período experimental.

O teor relativo de água, nesta mesma espécie, apenas apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos aos 18d-DH (Figura 2B). Foi observada, também, diferença entre os períodos de avaliação. As plantas submetidas ao déficit hídrico reduziram o teor relativo de água a partir do segundo período avaliado (11d-DH), mantendo valores inferiores ao primeiro período avaliado até o final do experimento.

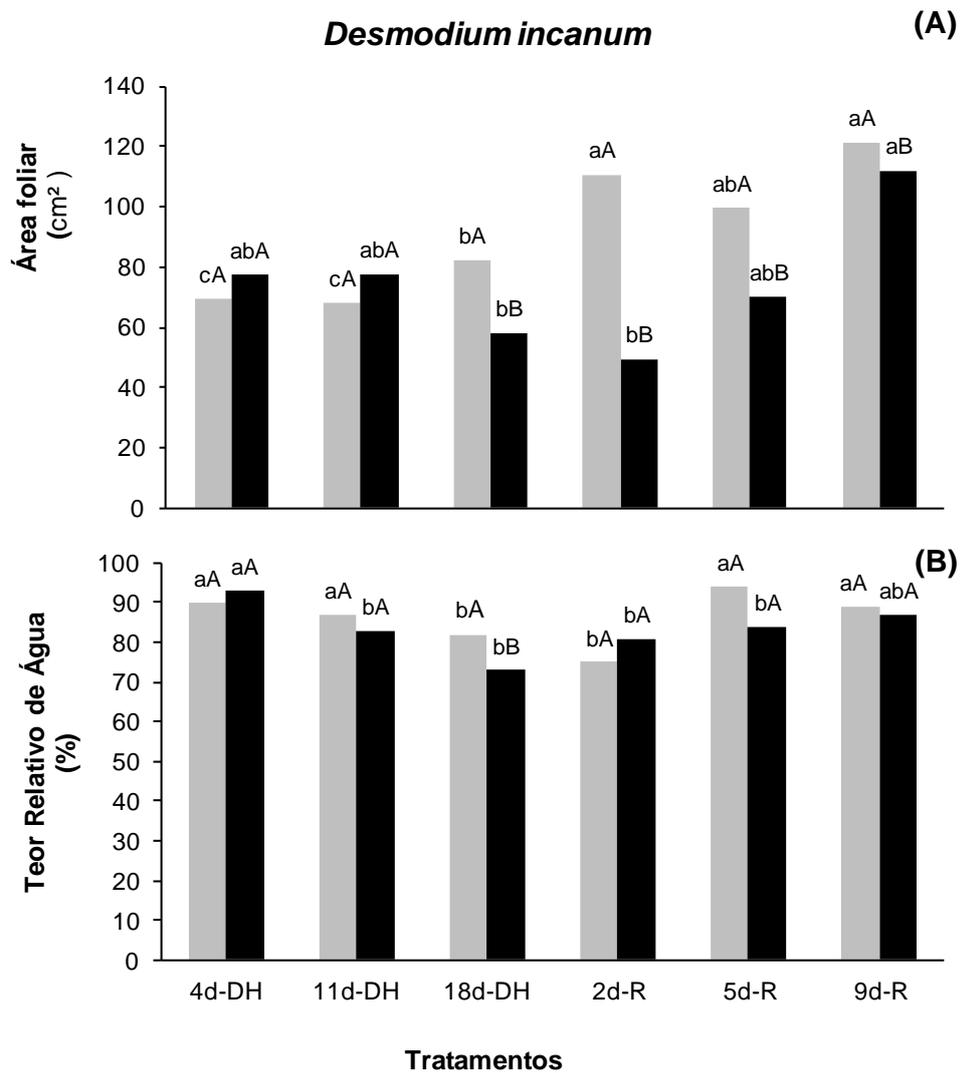


Figura 2: Área foliar (A) e Teor relativo de água (B) em plantas de *D. incanum* DC submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Em *V. luteola*, os valores obtidos na avaliação da área foliar mostraram diferença significativa entre períodos e tratamentos, apresentando interação entre os dois fatores (Figura 3A).

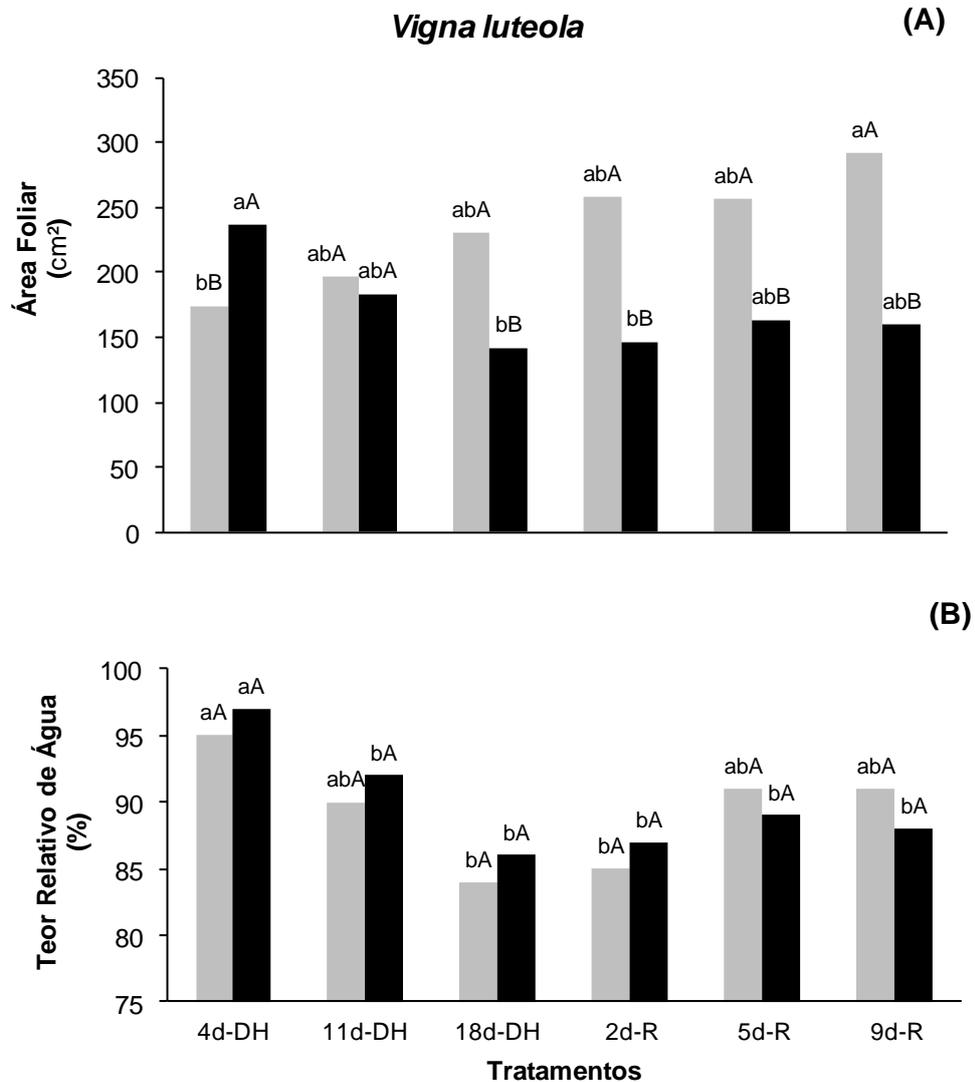


Figura 3: Área foliar (A) e Teor relativo de água (B) em plantas de *V. luteola* Jacq submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (□) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Nas plantas do tratamento controle os valores de área foliar foram incrementados ao longo do período estudado enquanto nas plantas sob deficiência

hídrica foi evidenciada redução nesta variável não sendo observada recuperação após a reidratação (Figura 3A).

Os resultados obtidos na avaliação do teor relativo de água em folhas de *V. luteola* não apresentaram diferença significativa entre tratamentos, apenas entre períodos avaliados, nos dois tratamentos (Figura 3B).

Os resultados obtidos para a variável massa seca da parte aérea (MSPA), de *M. lathyroides* L apresentaram diferença significativa entre os períodos avaliados nos dois tratamentos, com redução mais evidente aos 18 dias de restrição hídrica, onde foi observado diferença significativa em relação as plantas do tratamento controle. Logo após a irrigação, aos dois dias de recuperação, houve um incremento nos valores de massa seca não diferindo do tratamento controle até o final do período experimental (Figura 4A). Para a variável massa seca de raiz (MSR) de *M. lathyroides* L (Figura 4B), foi observada diferença significativa entre os períodos avaliados nos dois tratamentos. No tratamento controle foi observado acúmulo de matéria seca no último período avaliado em relação aos demais. Nas plantas submetidas ao déficit hídrico, porém, foi observado uma redução mais evidente nos valores de MSR nos períodos finais da restrição hídrica, e posterior acúmulo de matéria seca nos períodos de recuperação. Entretanto, em nenhum dos períodos avaliado houve diferença estatística entre os dois tratamentos.

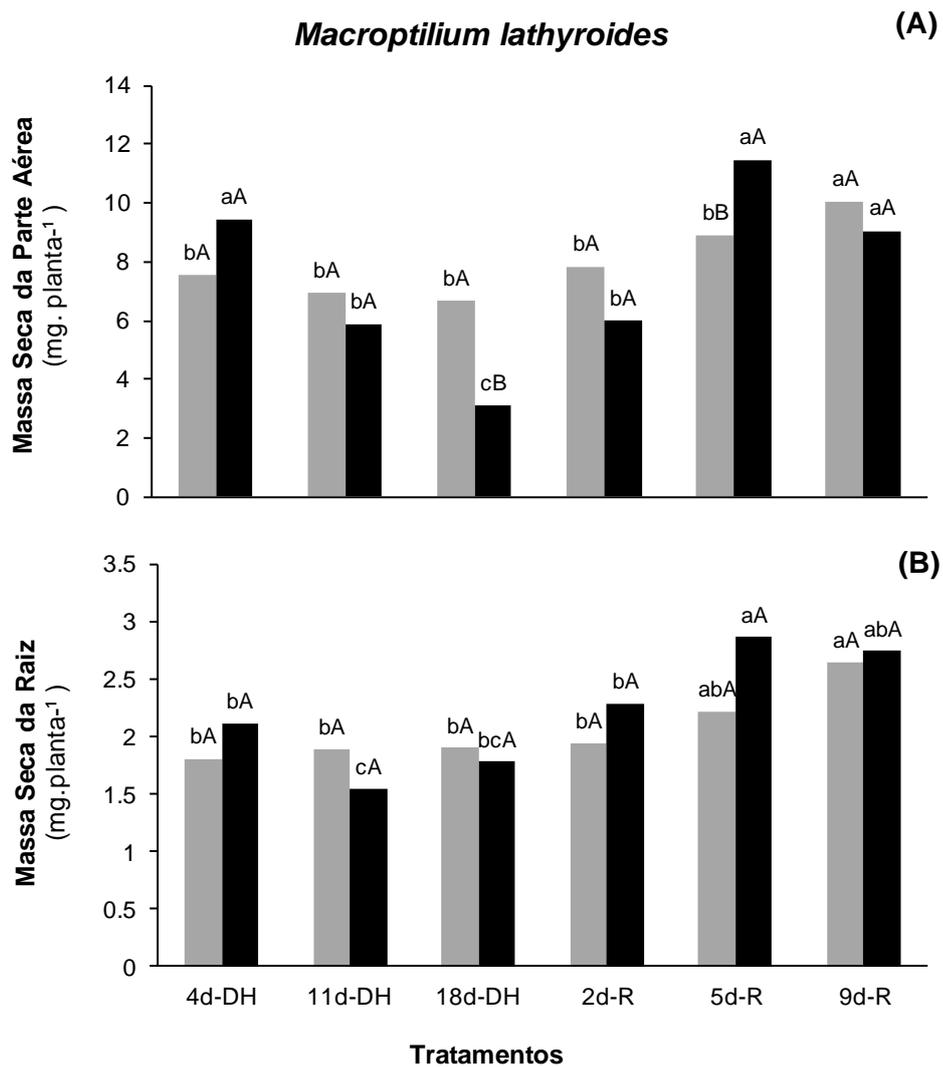


Figura 4: Massa seca de parte aérea e raiz de plantas de *M. lathyroides* L submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os resultados de MSPA das plantas de *D. incanum* DC estão representados na (Figura 5A). Não foi observada diferença estatística entre os períodos no tratamento controle, para esta variável. Em plantas sob déficit hídrico houve incremento de MSPA aos 18d-DH, diferindo dos períodos iniciais e das plantas controle.

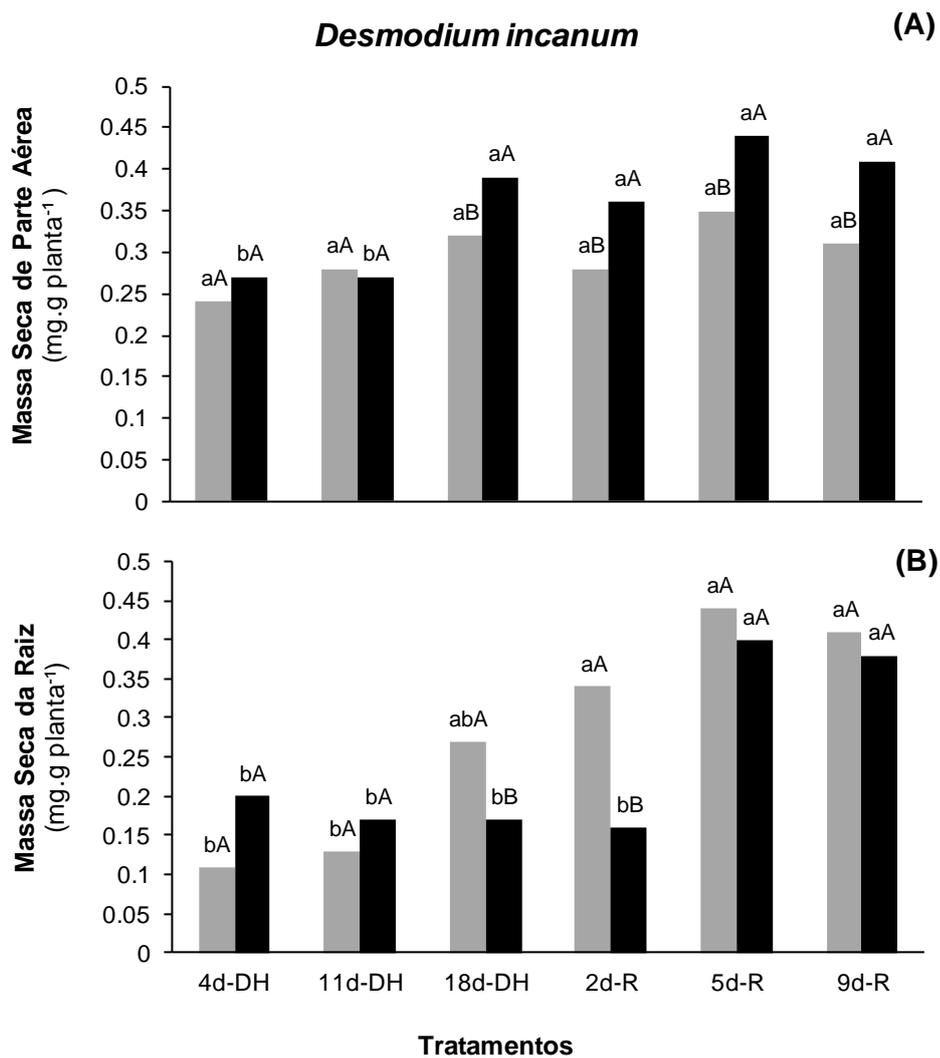


Figura 5: Massa seca de parte aérea (A) e raiz (B) de plantas de *D. incanum* DC submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Para a variável MSR desta espécie os resultados obtidos mostraram diferença significativa entre períodos e tratamentos (Figura 5B). Houve acúmulo de massa seca no tratamento controle ao longo do período experimental e nas plantas submetidas à restrição hídrica foi observado um investimento maior nesse acúmulo apenas nos dois períodos finais de avaliação, ou seja, após a reidratação (5d-R e 9d-R). A diferença entre as plantas do tratamento controle e as plantas submetidas ao déficit hídrico foi observada aos 18d-DH, persistindo aos 2d-R, com posterior

retomada do crescimento da raiz igualando-se ao controle nos dois últimos períodos (5d-R e 9d-R).

Os resultados de MSPA de *V. luteola* jacq, estão apresentados na Figura 6A. Não foi observado, para esta variável, diferença significativa entre tratamentos e entre os períodos avaliados. No entanto, para a variável MSR (Figura 6B), foi evidenciado diferença significativa entre períodos. Com maior incremento de MS nas raízes das plantas submetidas a restrição hídrica aos 11d-DH e 18d-DH, em relação às plantas controle.

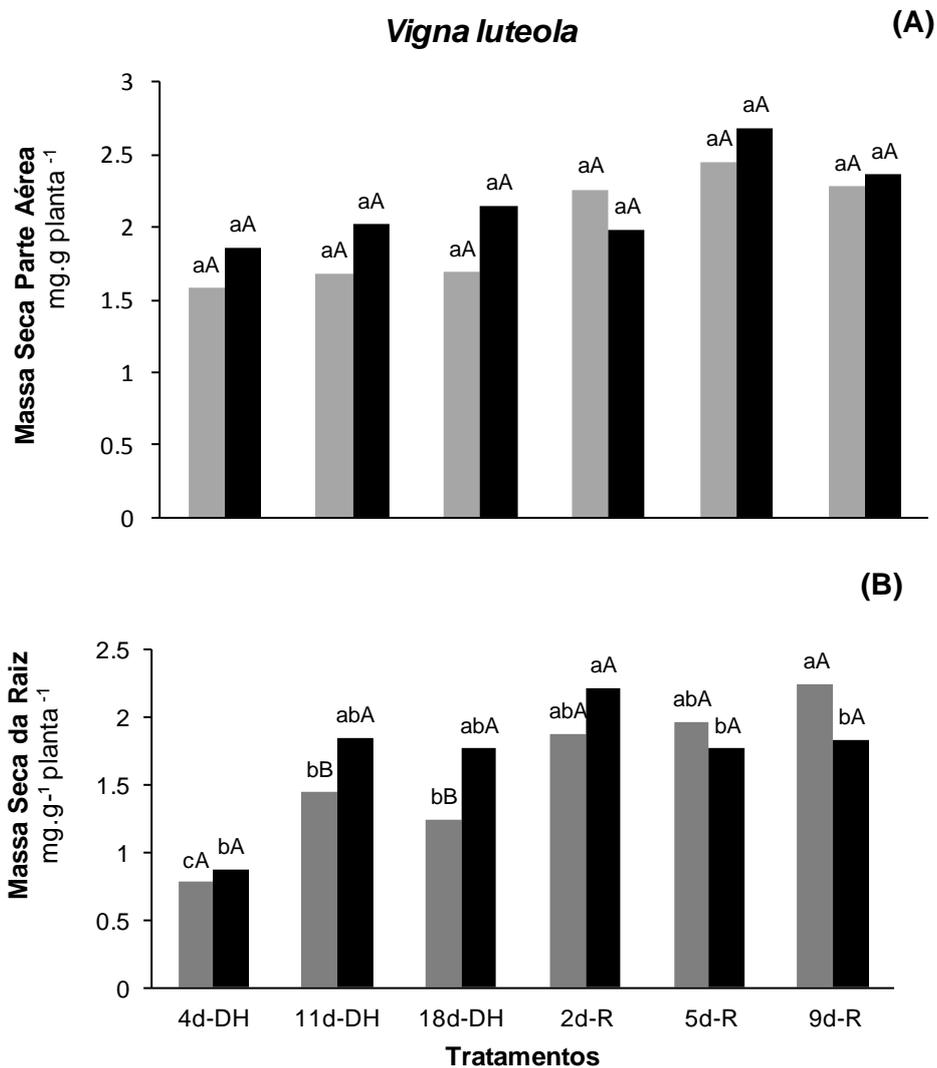


Figura 6: Massa seca de parte aérea (A) e raiz (B) de plantas de *V. luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os valores obtidos na quantificação de clorofila *a* em *M. lathyroides* L estão apresentados na Figura 7A. Foi observado diferença significativa entre períodos, apresentando redução mais evidente aos 11d-DH nas plantas impostas à restrição hídrica e aos 18d-DH e aos 2d-R nos dois tratamentos. No entanto, só foi evidenciada diferença significativa entre os tratamentos aos 11d-DH.

Diferindo da avaliação de clorofila *a*, os valores obtidos na quantificação de clorofila *b*, nesta mesma espécie, não mostraram diferença significativa entre períodos ou entre tratamentos (Figura 7B).

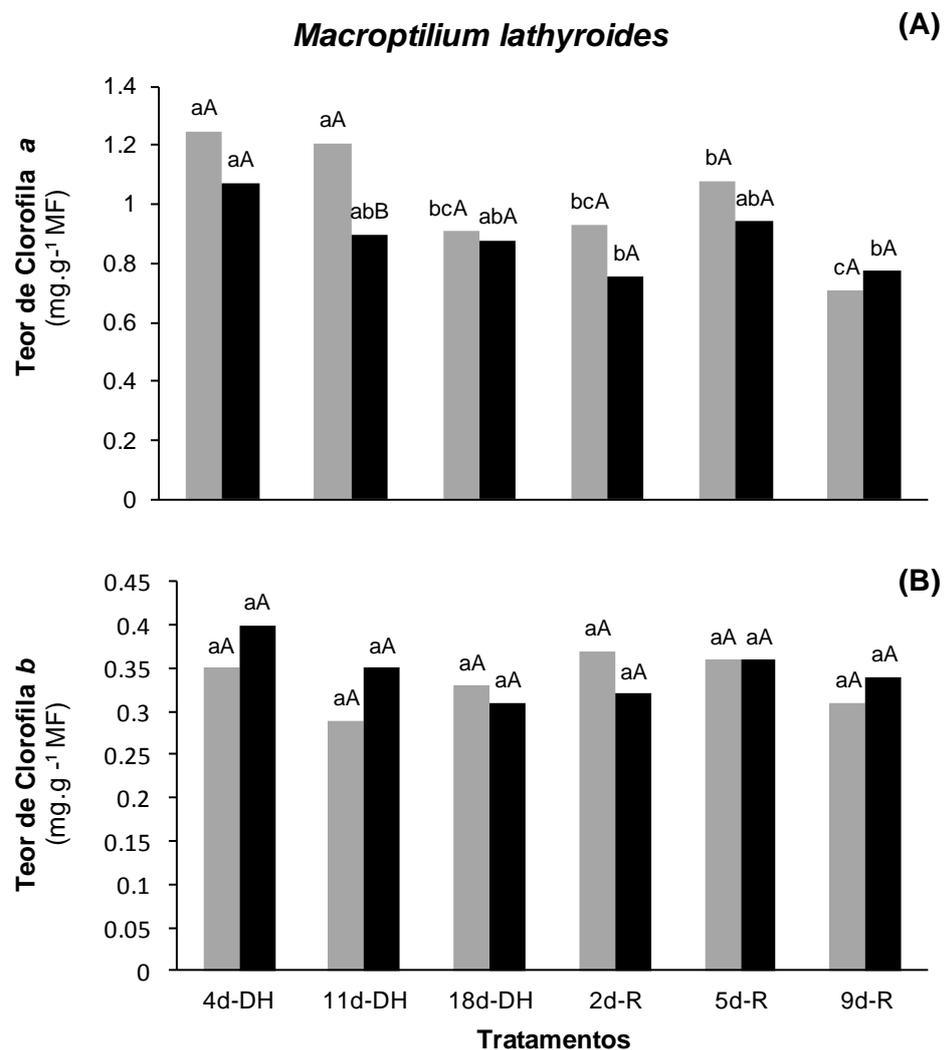


Figura 7: Teor de clorofila *a* (A) e clorofila *b* (B) em plantas de *M. lathyroides* L submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

O conteúdo de clorofila total, por sua vez, mostrou diferença significativa entre períodos e tratamentos (Figura 8A). Para essa variável, os menores valores foram observados aos 11d-DH e 18d-DH, quando comparados ao controle. Após os 2d-R houve incremento nessa variável igualando-se aos valores obtidos nas plantas controle ao final do período experimental. A quantificação de carotenoides nas plantas submetidas ao déficit hídrico apenas apresentaram diferença significativa aos 18d-DH, quando comparado ao tratamento controle (Figura 8B).

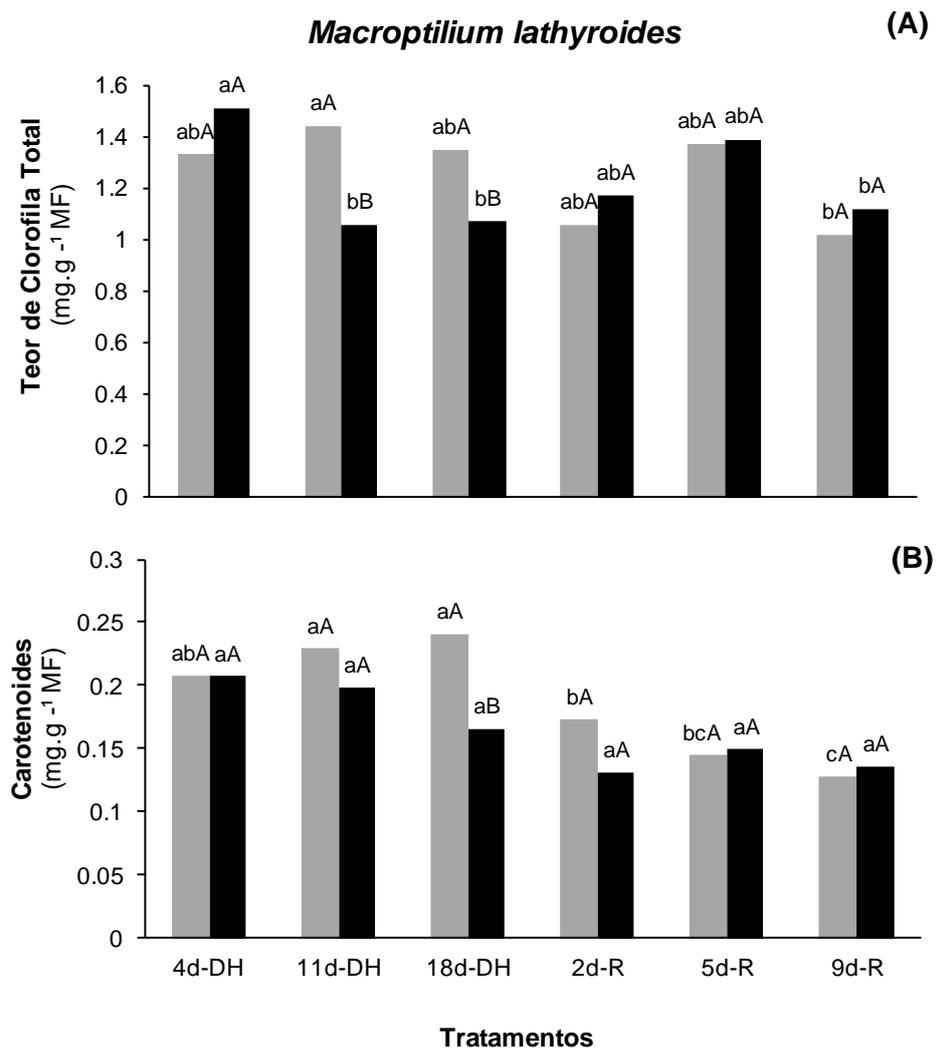


Figura 8: Teor de clorofila Total (A) e Carotenoides (B) em plantas de *M. lathyroides* L submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Em *D. incanum*, o teor de clorofila *a* diferiu entre períodos e tratamentos, apresentando interação entre esses fatores (Figura. 9A). Quando comparadas ao

controle, houve redução nos teores de clorofila *a* das plantas submetidas ao déficit hídrico durante os três períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH), sendo os valores, para esta variável, restabelecidos e iguais aos do tratamento controle a partir de 2d-R. Os teores de clorofila *b*, por sua vez, apresentaram significativo incremento a partir do primeiro período de avaliação (4d-DH), diferindo do tratamento controle até o final do período experimental (Figura . 9B).

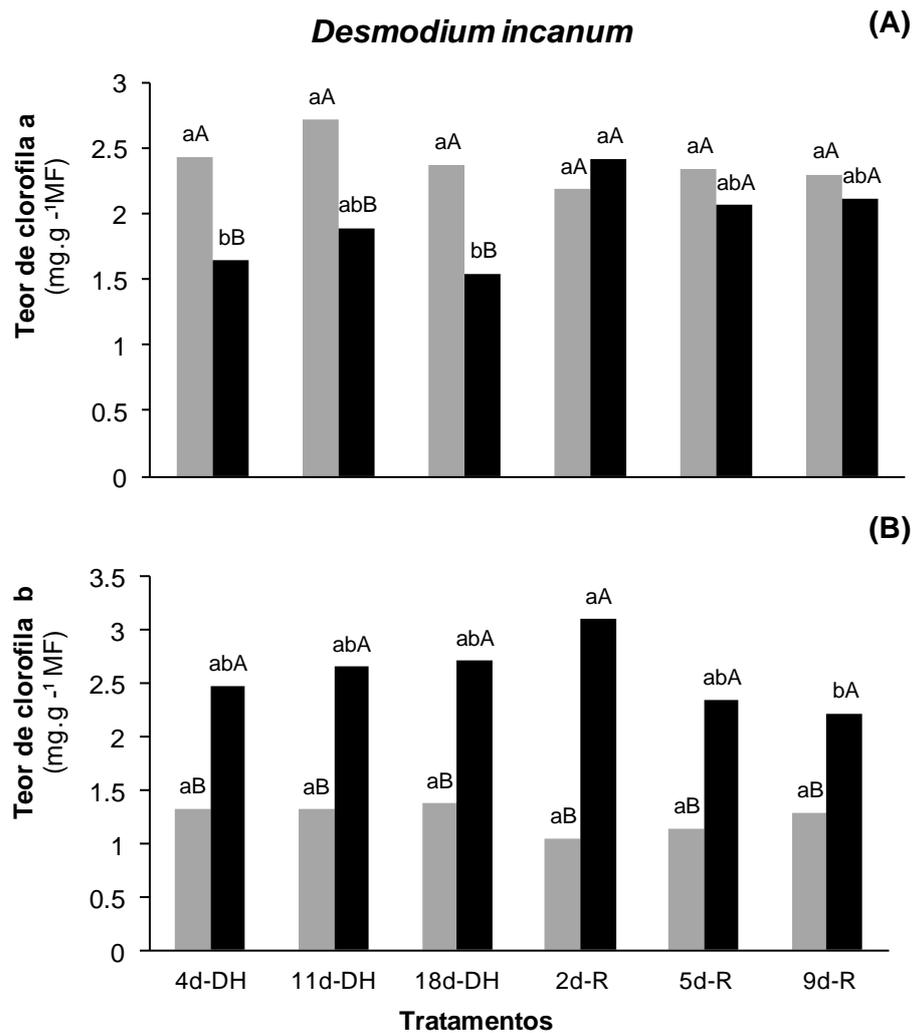


Figura 9: Teor de clorofila *a* (A) e clorofila *b* (B) em plantas de *D. incanum* DC submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Na (Figura 10A) estão apresentados os resultados da avaliação do teor de clorofila total, onde foi observado diferença entre os tratamentos, sendo que as

plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram incremento nos teores de clorofila total aos 2d-R, mantendo-se com valores superiores aos das plantas do tratamento controle até o final do período experimental, especialmente durante a recuperação ao estresse. Os resultados referentes aos teores de carotenoides demonstraram diferença significativa entre períodos e tratamentos, sendo que aos 4d-DH e aos 11d-DH foi evidenciado redução nos teores desse pigmento, porém a partir dos 18d-DH esses valores mantiveram-se igualados aos do tratamento controle (Figura 10B).

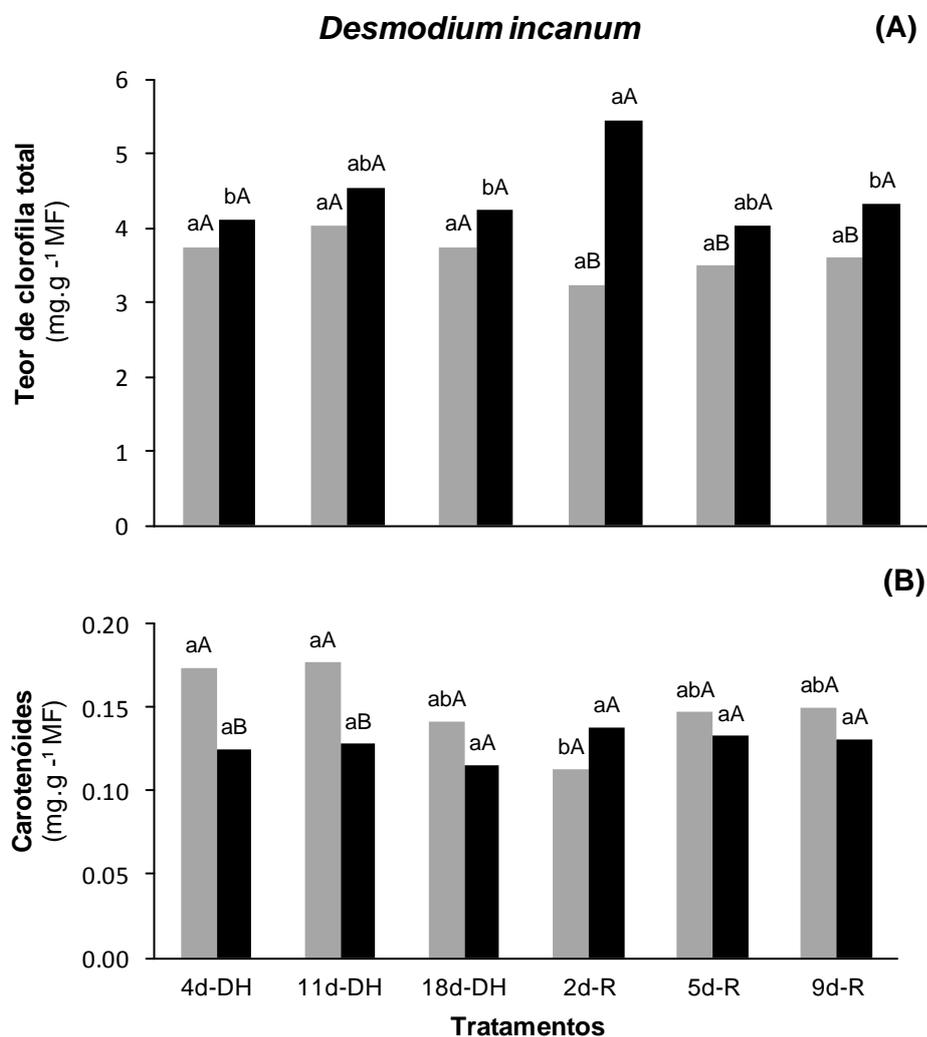


Figura 10: Teor de clorofila Total (A) e Carotenoides (B) em plantas de *D. incanum* DC submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Na figura 11 estão apresentados os resultados obtidos na quantificação de clorofila *a* (Figura 11A) e de clorofila *b* (Figura. 11B) de *V. luteola*. Apenas foi observada diferença significativa entre os tratamentos, para a variável clorofila *b*, onde as plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram valores muito superiores aos do tratamento controle.

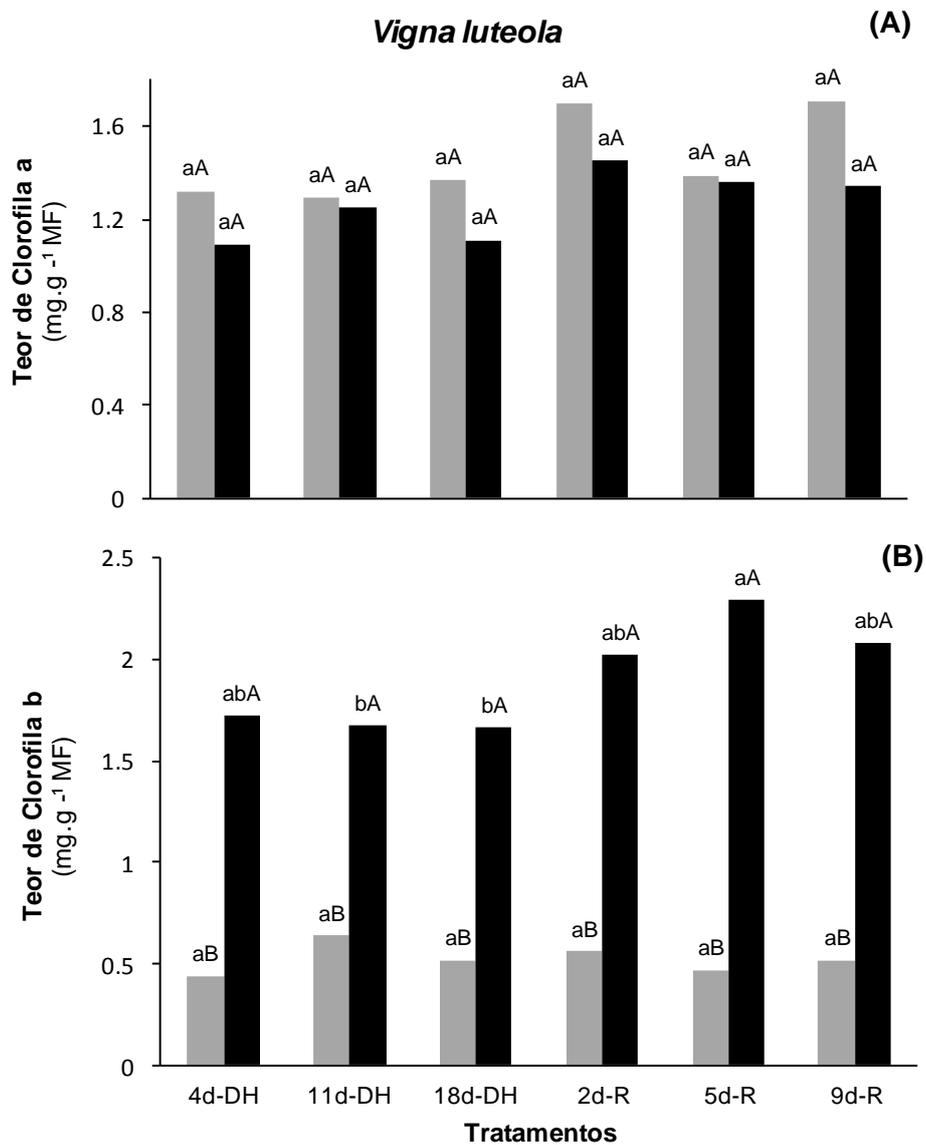


Figura 11: Teor de clorofila *a* (A) e clorofila *b* (B) em plantas de *V. luteola* Jacq submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Resultados similares foram observados para os teores de clorofila total, apresentando diferenças significativas apenas entre os tratamentos (Figura 12A).

Nos teores de carotenoides, para esta espécie, foi observada diferença entre períodos e tratamentos, sendo que nas plantas do tratamento controle houve um incremento em função do tempo, enquanto que nas plantas submetidas ao déficit hídrico não foi observado diferença entre os períodos avaliados (Figura 12B).

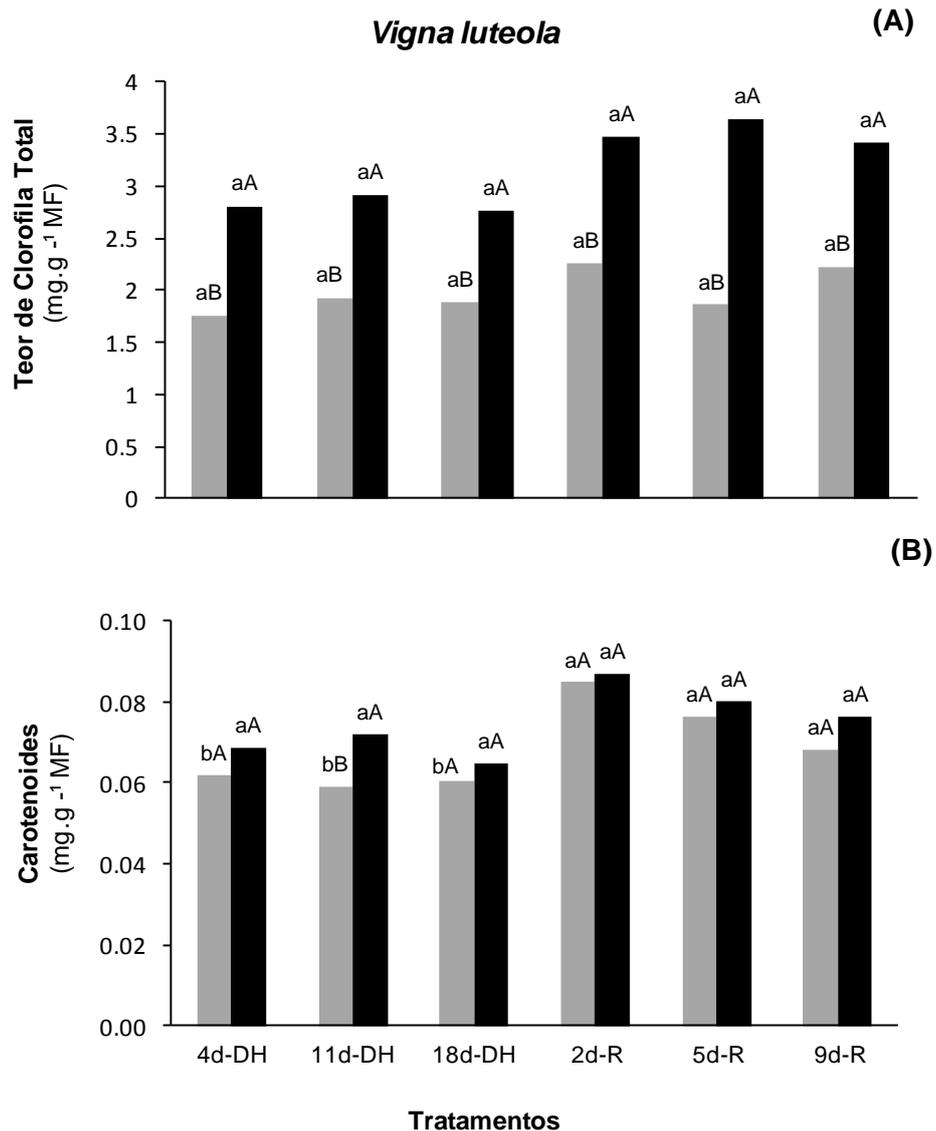


Figura 12: Teor de clorofila Total (A) e carotenoides (B) em plantas de *V. luteola* Jacq submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Entre os vários fatores limitantes da produção vegetal, a deficiência hídrica ocupa posição de destaque, pois além de afetar as relações hídricas nas plantas, alterando o metabolismo, é um fenômeno que ocorre em grandes extensões de áreas cultiváveis (NOGUEIRA *et al.*, 2001). O déficit hídrico ocasiona mudanças na fisiologia da planta, condicionando-as a desenvolver mecanismos de adaptação e resistência (SOUZA *et al.*, 2001). A avaliação dos efeitos do ambiente no crescimento, desenvolvimento e produtividade vegetal são essenciais nos diversos processos fisiológicos em espécies de importância econômica e ecológica, visto que a deficiência hídrica aumenta a resistência difusiva ao vapor d'água, mediante fechamento dos estômatos, reduzindo a transpiração, o suprimento de CO₂ para a fotossíntese, a expansão celular e a condutância estomática (CABRAL *et al.*, 2004; PIMENTEL, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009).

A redução da área foliar é comum em plantas sob estresse hídrico (PINTO *et al.*, 2008). Em plantas de *Vigna unguiculata* (L) (feijão de corda), a área foliar não foi afetada pela deficiência hídrica nos primeiros 15 dias de estresse. No entanto, à medida que foi aumentando o período de exposição ao estresse (30 e 45 dias), as reduções tornaram-se significativas (MAIA *et al.*, 2013). Resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho em *M. lathyroides*, *V. luteola* e *D. incanum* que tiveram redução nesta variável nas plantas sob deficiência hídrica após 15 dias (18d-DH) (Figuras 1, 2 e 3, respectivamente).

A diminuição no incremento de área foliar está associada, usualmente, ao desenvolvimento foliar das plantas em situações de déficit hídrico, podendo estar relacionada com a pequena redução no tamanho das folhas individuais, com a menor produção de novas folhas ou com o aumento na abscisão foliar (TAIZ ; ZEIGER, 2009).

A redução da área foliar pode estar associada também ao grau de turgescência foliar, ou seja, ao conteúdo relativo de água nas folhas. Em *M. lathyroides* e *D. incanum*, a redução da área foliar foi evidenciada nos mesmos períodos onde também foi observada a redução no teor relativo de água ou próximo a estes (Figuras 1 e 2). No entanto, mesmo após o restabelecimento no teor de água

nas folhas, após a reidratação, as três espécies mantiveram a área foliar reduzida, o que pode estar associado à redução da área exposta à radiação e, desta forma, reduzir a taxa de transpiração.

A inibição da expansão foliar é uma resposta precoce adaptativa ao déficit hídrico. Com a diminuição do conteúdo de água da planta, suas células tipicamente contraem-se e as paredes afrouxam. Esse decréscimo de volume celular resulta em pressão de turgor menor. Por ser a redução do turgor o mais precoce efeito biofísico significativo do estresse hídrico, as atividades dependentes do turgor, como a expansão foliar, são mais sensíveis aos déficits hídricos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Segundo Correia e Nogueira (2004), a redução da área foliar em plantas sob déficit hídrico pode ser traduzida como uma estratégia de sobrevivência com o intuito de reduzir a área disponível para transpiração.

Os resultados obtidos por Maia e colaboradores (2007), em duas cultivares milho (*Zea mays* L.), com relação ao conteúdo relativo de água, mostraram comportamento semelhante aos observados em *V. luteola* (Figura 3 B), não sendo influenciado pelo déficit hídrico.

No que se refere ao acúmulo de biomassa, pode-se observar que as espécies estudadas investiram energia no acúmulo de massa seca, em parte aérea ou raiz, de forma diferenciada. *M. lathyroides*, sofreu decréscimo no acúmulo de massa seca na parte aérea para manter o investimento nas raízes com a redução da disponibilidade hídrica, da mesma forma que as plantas controle (Figura 4).

Em contrapartida, as plantas de *D. incanum* mantiveram um incremento mais acentuado na massa seca da parte aérea mesmo sob deficiência hídrica, a partir dos 18d-DH, às custas de uma redução na massa seca das raízes, principalmente no período mais crítico de restrição hídrica, ou seja, 18d-DH (Figura 5B). Aumento da matéria seca na parte aérea em condições de redução no teor de água no solo, assim como verificado em *D. incanum* (Figura 5), também foi observado em alguns trabalhos de pesquisa. Paiva (2007) constatou em *Macrotyloma axillare* (E. Mey) Verdct., uma leguminosa herbácea, aumento de matéria seca de folhas, mesmo com redução de 35% a 60% no teor de água do solo. Da mesma forma, em *Myracrodunon urundeuva* (aroeira), planta que cresce naturalmente na região semi-árida, maior acúmulo de massa seca foliar foi observado em plantas crescidas em solo com 75% da capacidade de campo, comparadas ao controle. (FIGUERÔA *et al.*, 2004).

Em *V. luteola*, o investimento da maior parte de energia destinada ao crescimento foi direcionado para acumular massa seca nos tecidos radiculares (Figura 6B), o que alguns autores consideram uma estratégia de tolerância à seca através do crescimento em profundidade ou pelo aumento no número de raízes laterais como forma de ampliar a área de contato com o solo e, conseqüentemente, aumentar a absorção de água retida nestas partículas. Da mesma forma, esses resultados foram observados em *Milaleuca alternifolia* Cheel, nas mesmas condições (SILVA *et al.*, 2002).

Em contrapartida, Correia; Nogueira (2004), em amendoim (*Arachis hipogea* L. cv. 55437), submetido à suspensão total de rega, constataram redução de 71% da massa seca de folhas, em relação ao controle (com irrigação). Da mesma forma, a MSPA das plantas de *Gliricidia sepium*, foi reduzida com o déficit hídrico aos 15 dias, provavelmente devido à baixa produção de fotoassimilados causada pela redução na disponibilidade de água para as plantas (MATSUI; SINGH, 2003). Esses resultados estão de acordo com observados nessa pesquisa, em *M. lathyroides*, a partir dos 18d-DH (Figura 4A).

A redução na massa seca da raiz, diante da restrição hídrica, foi evidenciada em *Mimosa caesapiniifolia* Benth, (SANTIAGO, 2000), em alfafa (*Medicago sativa* L) (RASSINI; LEME 2001), em guandu (*Cajanus cajan* L.) (MARIN, 2003) e em *Macrotyloma axillare* E. Mey. (PAIVA, 2007). Esses resultados são similares aos obtidos neste trabalho, onde também foi verificada a diminuição da massa seca na raízes de *D. incanum* (Figura 5B).

O investimento de biomassa foi diferenciado entre as espécies e órgãos em cada uma delas. No entanto, foi evidenciado que, nas três espécies estudadas, a reidratação das plantas proporcionou o restabelecimento de biomassa ao mesmo nível das plantas controle, ao final do período experimental. Sugerindo que o período experimental de restrição hídrica utilizado não compromete a capacidade de retomada do crescimento.

Em relação ao investimento de MSR quando a umidade do solo está próxima da capacidade de campo, geralmente é observada uma demanda menor de água para esse órgão do que para a parte aérea, ou seja, sob condições adequadas de umidade do solo, a prioridade é o crescimento da parte aérea, uma vez que este órgão é responsável pela fotossíntese, o que acarreta na produção de biomassa (MATSUI; SINGH, 2003).

Neste contexto, cabe salientar que os pigmentos fotossintéticos são importantes para a absorção de fótons necessário para a realização do processo de fotossíntese.

O conteúdo de clorofilas nas folhas é uma variável fundamental para a compreensão de algumas respostas de adaptação das plantas a variações no ambiente em que ela está inserida.

Segundo Oliveira e colaboradores (2013), 40 dias de suspensão hídrica no cultivo de graviola, foi suficiente para promover um decréscimo nos teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides. Corroborando com resultados encontrados para *M. lathyroides* (Figuras 7 e 10), que apresentou redução mais evidente nos teores de clorofila *a*, clorofila total e carotenoides a partir dos 11 d-DH e para *D. incanum*, quando comparado o déficit hídrico ao controle houve uma redução nos teores de clorofila *a*, demonstrando este decréscimo durante os três períodos de déficit hídrico (Figuras 8A) e carotenoides nos dois primeiros períodos avaliados (Figura 11B).

Silva e colaboradores (2014) trabalhando com cultivares de cana-de-açúcar sob déficit hídrico constatou que, o conteúdo de clorofila *a* e carotenoides não apresentaram diferenças entre as cultivares e entre os regimes hídricos avaliados no período inicial de restrição hídrica. No entanto, aos 35d-DH, apenas uma, das quatro cultivares estudadas, não foi afetada pela deficiência hídrica. Segundo os autores, esses resultados indicam possíveis danos no sistema fotossintético devido à maior degradação da clorofila *a*. Tais resultados são similares aos resultados encontrados neste trabalho com a espécie *V. luteola* que apresentou aumento expressivo nos teores de clorofila *b* e total (Figuras 9B e 12A).

A degradação dos pigmentos fotossintéticos está relacionada com a degradação dos carotenoides, pois são pigmentos acessórios na absorção e transferência de energia radiante, e protetores da clorofila no processo de fotoxidação. O déficit hídrico induz a degradação do β -caroteno e a redução na formação de zeaxantina, reduzindo os teores de carotenoides (O'NEILL *et al.*, 2006). Portanto, é esperado que cultivares que mantenham maiores conteúdos desses pigmentos, sob deficiência hídrica, tenham melhor capacidade de tolerar essa condição, devido à estreita relação entre clorofilas, potencial fotossintético e produtividade

A limitação na área foliar pode ser considerada uma primeira reação das plantas ao deficit hidrico, (TAIZ; ZEIGER, 2004). A área foliar é um importante fator

da produção e determina o uso da água pela planta, e seu potencial de produtividade é severamente inibido quando exposta ao déficit hídrico. Em muitas espécies, uma maior atividade de crescimento é observada durante o período noturno, devido ao aumento do potencial hídrico e do turgor causado pela redução da atividade estomática (SCHURR, 1998). Normalmente espera-se que plantas submetidas a um estresse apresentem características como baixas taxas de crescimento e de fotossíntese, elevada razão raiz/parte aérea, menor capacidade de aquisição de recursos e de renovação de tecidos. Estes fatores juntos conferem às plantas maior resistência para se desenvolverem em ambientes extremos (LAMBERS; PORTER 1992; CHAPIN *et al.*, 1993; RAMOS *et al.*, 2004).

Desta forma, como consequência da redução na disponibilidade de água no solo, tem-se a associação de diversos fatores, que juntos atuam como estratégia ao escape ou tolerância a essa condição que, dependendo do período em que ocorre e da duração pode caracterizar-se como um estresse irreversível.

Uma consequência do déficit hídrico é a redução da área foliar, fato que ocorre como mecanismo de defesa das plantas contra a deficiência hídrica; com a área foliar menor a transpiração é reduzida, conservando o suprimento de água limitado do solo por um período maior. No entanto, essa redução limita a produtividade em virtude da limitação na absorção de CO₂ e na interceptação de luz (MATTOS *et al.*, 2005). A clorofila, por sua vez, principal pigmento de captação de energia luminosa utilizada no processo da fotossíntese, constitui um dos principais fatores relacionado à eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente, ao crescimento e a adaptabilidade das plantas às diversas condições ambientais.

Desta forma, é possível inferir que, em plantas de *M. lathyroides* e *D. incanum* há uma relação direta entre o crescimento, caracterizado pelo acúmulo de massa seca na parte aérea e raiz respectivamente, o potencial de água nas folhas, a área foliar e o teor de clorofila total. Relação esta que não foi observada em *V. luteola*, levando em consideração as variáveis estudadas durante o período experimental.

CONCLUSÕES

Embora a redução da expansão da área foliar tenha sido uma resposta comum entre as espécies e não reversível durante o período experimental avaliado, os resultados referentes ao acúmulo de massa seca na parte aérea e raízes, teor

relativo de água e de pigmentos fotossintéticos, pode-se inferir que as três leguminosas apresentam mecanismos distintos de adaptação ao estresse causado por restrição hídrica, nas condições em que o experimento foi conduzido.

CAPÍTULO 2

Caracterização de mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na tolerância ao déficit hídrico em leguminosas com potencial forrageiro

Characterization of physiological and biochemical mechanisms of tolerance to water deficit in legumes with pasture potential

INTRODUÇÃO

A investigação do potencial forrageiro das espécies é de grande importância, pois proporciona conhecimento sobre a base agrônômica, possibilitando a realização de planejamento forrageiro adequado de acordo com as condições de solo e clima (BORÉM; MIRANDA, 2005).

Algumas espécies nativas dos campos sul brasileiros podem apresentar elevado potencial de desempenho agrônômico e aptidão para uso como forrageira na recuperação de pastagens degradadas para a utilização em sistemas pecuários sustentáveis. Destacando-se dentre estas espécies três leguminosas: *Macropitilium lathyroides* L., *Desmodium incanum* DC e *Vigna luteola* Jacq.

Macropitilium lathyroides L., conhecido como feijão dos arrozais, é uma espécie que apresenta regeneração pelo banco de sementes do solo e rebrotação após a colheita de sementes da primeira floração, o que possibilita, quando as condições climáticas são favoráveis, a obtenção de uma segunda colheita de sementes, além de apresentar altos rendimentos de forragem (MONKS *et al.*, 2006; GUERRA *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2011).

Desmodium incanum DC, é uma leguminosa nativa, perene, de clima estival, popularmente conhecida como “pega-pega”. É considerada a leguminosa mais

frequente nos campos, segundo BOLDRINI (1993), ocorrendo em todas as regiões do estado do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA, 1993). De acordo com suas características de frequência, ciclo de vida, produtividade e aceitação pelos animais, é apontada como ótima forrageira. (SCHWALBERT *et al.*, 2014).

Vigna luteola Jacq, também conhecida como “feijão da praia” é uma forrageira amplamente difundida na África e América tropical, nativa do Brasil, encontrada com frequência em beira de praias, restingas e margens de cursos d’água (MOREIRA, 1997).

O efeito da deficiência hídrica sobre as plantas é complexo, e as mesmas respondem através de vários processos adaptativos, não havendo, para tanto, mecanismo universal de resistência à seca, mas sim certos tipos de adaptações dentro de cada grupo ecofisiológico que as permitem resistirem à escassez de água (NOGUEIRA *et al.*, 2005). A resposta do vegetal ao déficit hídrico é fortemente influenciada pelo tempo, intensidade, duração e frequência do estresse, além das diversas interações planta-solo-atmosfera e das condições climáticas (SAINT PIERRE *et al.*, 2012; DRIEVER; KROMDIJK, 2013). A redução do teor de água na planta, a diminuição do potencial hídrico foliar e a perda de turgor, fechamento dos estômatos e diminuição do crescimento celular constituem respostas de uma planta submetida ao estresse hídrico (JALEEL *et al.*, 2009). O monitoramento do estresse hídrico é essencial para determinar o impacto no desenvolvimento e na produtividade das espécies.

Porém as respostas ao déficit hídrico podem variar quando ocorre em diferentes fases de crescimento das plantas (BÜRLING *et al.*, 2013), além de que é conhecido que o estresse por déficit hídrico provoca alterações em diversas características fisiológicas, morfológicas e bioquímicas de modo que também promove a síntese de solutos osmoprotetores (MISHRA *et al.*, 2012).

Estudos têm mostrado que, em resposta à deficiência hídrica, muitas plantas sintetizam e acumulam açúcares, tais como sacarose, sorbitol e aminoácidos como prolina (TAJI *et al.*, 2002, SHULAEV *et al.*, 2008).

A alteração nos teores de lipoperóxidos é considerado um indicador de prevalência de dano oxidativo nos tecidos, causado por fatores como o estresse hídrico. Em plantas submetidas ao estresse hídrico mais severo, aumentam os teores de lipoperóxidos (CATANEO *et al.*, 2005).

Assim o presente trabalho teve por objetivo caracterizar algumas das alterações metabólicas que possam auxiliar no entendimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na tolerância ao estresse por déficit hídrico em três espécies de leguminosas com potencial forrageiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Condições do Experimento

O experimento foi desenvolvido em condições naturais de temperatura e luminosidade em casa de vegetação localizada no campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). As determinações analíticas foram realizadas no Departamento de Botânica e no Laboratório de Bioquímica Vegetal do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) da UFPel. Foram utilizadas plântulas obtidas a partir de sementes coletadas a campo, de leguminosas das espécies: *M. lathyroides* L. (feijão do campo), *V. luteola* Jacq. (feijão da praia), e *D. incanum* DC. (pega-pega), cultivadas pela Embrapa Clima Temperado - Estação Experimental Terras Baixas, situada no município do Capão do Leão, RS, cujas coordenadas geográficas são: latitude Sul de 31^o 52' 32", longitude oeste de Greenwich de 52^o 21' 24" e altitude de 13 metros acima do nível do mar.

As sementes foram semeadas em bandejas de polipropileno contendo substrato comercial (turfa fértil) e mantidas em condições de casa de vegetação, sob condições naturais de luz e temperatura.

Após germinação e estabelecimento, foram transplantadas para vasos plásticos perfurados, com capacidade de 3 L, mantendo-se três plantas por vaso. O substrato utilizado foi constituído de turfa fértil e solo, classificado como planossolo, que se caracteriza por apresentar um horizonte B textural e condições de encharcamento, pela dificuldade de drenagem natural (Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004), na proporção de 1:1. A nutrição das plantas foi realizada por meio da aplicação de 150 mL de solução de Hoagland e Arnon (1938) duas vezes por semana.

O tratamento com déficit hídrico foi iniciado 30 dias após o transplante através da suspensão da irrigação e o teor de umidade foi monitorado por gravimetria. As plantas do tratamento controle foram mantidas na capacidade de campo. A

quantidade de água adicionada em cada vaso foi calculada com base na pesagem dos vasos em balança analítica. A superfície do vaso foi coberta com filme plástico durante a execução do experimento para evitar perdas de água por evaporação.

Após o período de 18 dias de déficit hídrico, as plantas destinadas a recuperação foram irrigadas de forma a manter o solo na capacidade de campo. As avaliações foram realizadas aos quatro, 11 e 18 dias (4d-DH, 11d-DH e 18d-DH) após a suspensão da irrigação e aos dois, cinco e nove dias após a irrigação, considerado o período de recuperação (2d-R, 5d-R e 9d-R) .

Delineamento experimental e análises estatísticas

Os tratamentos foram dispostos em blocos ao acaso, com quatro repetições, sendo a unidade experimental representada por um vaso contendo três plantas. Os dados foram submetidos a Análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) através do programa Winstat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2007).

Determinações analíticas

As análises de extravasamento de eletrólitos, extração e quantificação prolina, açúcares solúveis totais e determinação dos teores de peróxido e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (peroxidação lipídica) da parte aérea e raízes das plantas foi realizada no Laboratório de Bioquímica Vegetal do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) da UFPel. Em cada período de avaliação, foram coletadas amostras de folhas e raízes as quais foram armazenadas em ultra-freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores determinações bioquímicas.

Extravasamento de eletrólitos

A estabilidade das membranas em tecidos radiculares e foliares foi avaliada por meio da técnica do extravasamento de eletrólitos (BAJJI *et al.*, 2001). De cada unidade experimental, foram coletados dez discos foliares, com aproximadamente 0,5 cm cada, e dez segmentos de raízes, coletados na região mediana, desprezando-se a região do ápice radicular. As amostras foram lavadas em água destilada para retirada do conteúdo de células rompidas durante a remoção de outros eletrólitos aderidos aos folíolos. Após a lavagem as amostras foram secas em papel absorvente e colocadas em frascos contendo 10 mL de água milli Q a 25°C

por 24 horas. Após este período, a condutividade elétrica do meio, onde estavam embebidas as amostras, foi medida (C1) e os frascos com os discos e os segmentos foliares foram colocados em banho-maria a 90°C por 2 h. Após o equilíbrio da temperatura a condutividade elétrica máxima foi medida (C2) e o extravasamento de eletrólitos calculado através da fórmula e expresso em porcentagem:

$$\text{Extravasamento de Eletrólitos} = (C1/C2) \times 100$$

Extração e quantificação de prolina

A metodologia utilizada para a determinação de prolina livre foi proposta por Bates *et al.* (1973), modificada por Bezerra Neto e Barreto (2011). Amostras com 0,250 g de folhas e raízes frescas foram trituradas em N₂ líquido, seguida da adição de 2 mL de ácido sulfossalicílico a 3% em homogeneizador. O extrato obtido foi centrifugado por 10 minutos a 1.000 g. Após a centrifugação, em cada tubo de ensaio rosqueável foi adicionado 1,0 mL do sobrenadante; 2,0 mL de ninhidrina ácida (30mL de ácido acético glacial e 20mL de ácido fosfórico 6M em agitador); 2,0 mL de ácido acético glacial e 2,0 mL de água destilada. Em seguida os tubos foram tampados e colocados em banho-maria, por uma hora a 100°C e, posteriormente, transferidos para banho de gelo. Após esse procedimento, foram acrescentados 4,0 mL de tolueno e agitados vigorosamente, por 20 segundos, para a separação das fases. O sobrenadante foi aspirado da fase aquosa, para ser feita a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm. A concentração de prolina foi determinada usando-se a curva padrão, preparada com concentrações conhecidas de prolina: 0; 0,10; 0,25; 0,50; 1, 1,50 e 2 mg L⁻¹.

Teores de peróxido de hidrogênio e teor de malondialdeído

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinado, em folhas e raízes, conforme metodologia descrita por Velikova *et al.* (2000). O material vegetal, 200 mg por amostra, foi macerado em 2 mL de uma solução a 0,1% (w/v) de ácido tricloacético (TCA) e o homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4°C. A seguir, 300µL da amostra foram adicionados a 700µL de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7.0) e 1 mL de iodeto de potássio 1 M. As leituras de absorvância a 390 nm foram registradas utilizando espectrofotômetro marca Biospectro, modelo SP-22.

O conteúdo de H₂O₂ foi calculado a partir de uma curva padrão de H₂O₂ com concentrações de 20 µL, 40µL, 60µL, 80µL, 100µL.

A peroxidação de lipídios foi determinada através da medição da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Amostras de 200 mg de folhas e raízes foram maceradas em N₂ líquido acrescido de 20% de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) e homogeneizadas em ácido tricloacético (TCA) 0,1 % (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. A seguir, 250 µL do sobrenadante foram adicionados a 1 mL da solução contendo 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (p/v) de TCA. O meio de reação foi incubado a 95°C por 30 minutos mantendo os tubos fechados, paralisando a reação por resfriamento rápido em banho de gelo e água. A absorbância das TBARS formadas foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação:

$[MDA] = (A_{535} - A_{600})/(\xi \cdot b)$, onde: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e b : (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em nmol de MDA g⁻¹ de matéria fresca.

Extração e dosagem de açúcares solúveis totais, em folhas e raízes

Os extratos para dosagem de açúcares solúveis totais (AST) em raízes e folhas foram obtidos conforme metodologia de Bielecki e Turner (1966) com modificações. As amostras, cerca de 1 g de material vegetal, foram maceradas com N₂ líquido em gral e homogeneizadas com 10 mL de solução extratora MCW (metanol: clorofórmio: água; proporção de 12:5:3). Após 24 h, os extratos foram centrifugados a 600 g por 30 min. Recuperou-se a fração sobrenadante e para cada 4 mL, acrescentou-se 1,0 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água e centrifugou-se novamente para a separação de fases. O sobrenadante contendo os metabólitos foi coletado e transferido para banho-maria a 38°C, permanecendo por cerca de 30 h para eliminação do resíduo de clorofórmio e concentração das amostras para as análises de açúcares.

A dosagem de AST foi realizada com base em Graham; Smydzuk (1965). Coletou-se 1 mL de cada amostra, de um branco (água) e dos padrões (10-150 µg de glicose mL⁻¹), em tubos de ensaio, mantidos em gelo. Adicionou-se 3 mL de

solução de antrona (0,15% p/v em ácido sulfúrico concentrado) resfriada a cada tubo e cobriu-se imediatamente com bolinhas de vidro. Após 15 min, agitaram-se os tubos e incubou-se em banho-maria a 90°C por 20 min. Em seguida, mantiveram-se os tubos no escuro até a atingir temperatura ambiente. Os tubos foram novamente agitados e a densidade óptica (D.O) dos padrões, foi medidas em espectrofotômetro a 620 nm (marca Biospectro, modelo SP-22).

RESULTADOS

Os resultados obtidos pela quantificação dos teores de açúcares na parte aérea e raízes de *M. lathyroides* estão apresentados na Figura 1. Na parte aérea não foi observada diferença estatística entre períodos ou entre tratamentos (Figura 1A). No entanto, a avaliação na raiz evidenciou diferença significativa entre períodos e tratamentos com interação entre os dois fatores (Figura 1B). Os níveis de AST mais elevados foram observados aos 18d-DH, sendo os mesmos reduzidos após a reidratação, chegando ao final do experimento, com níveis iguais aos das plantas controle.

Em *D. incanum*, os teores de açúcares solúveis totais na parte aérea apresentaram diferença significativa entre períodos e tratamentos (Figura 2 A). Os resultados obtidos para esta variável demonstraram um aumento nos teores de AST, aos 11d-DH e 18d-DH, retomando a valores próximos aos encontrados nas plantas do tratamento controle a partir de 2d-R. Nas raízes, os teores de AST foram reduzidos, comparados aos das plantas controle, desde o início do período experimental (4d-DH) até o final do período de restrição hídrica (18d-DH), sendo os mesmo aumentados aos níveis do controle a partir do primeiro período de recuperação (2d-R) até o final do experimento (Figura 2B).

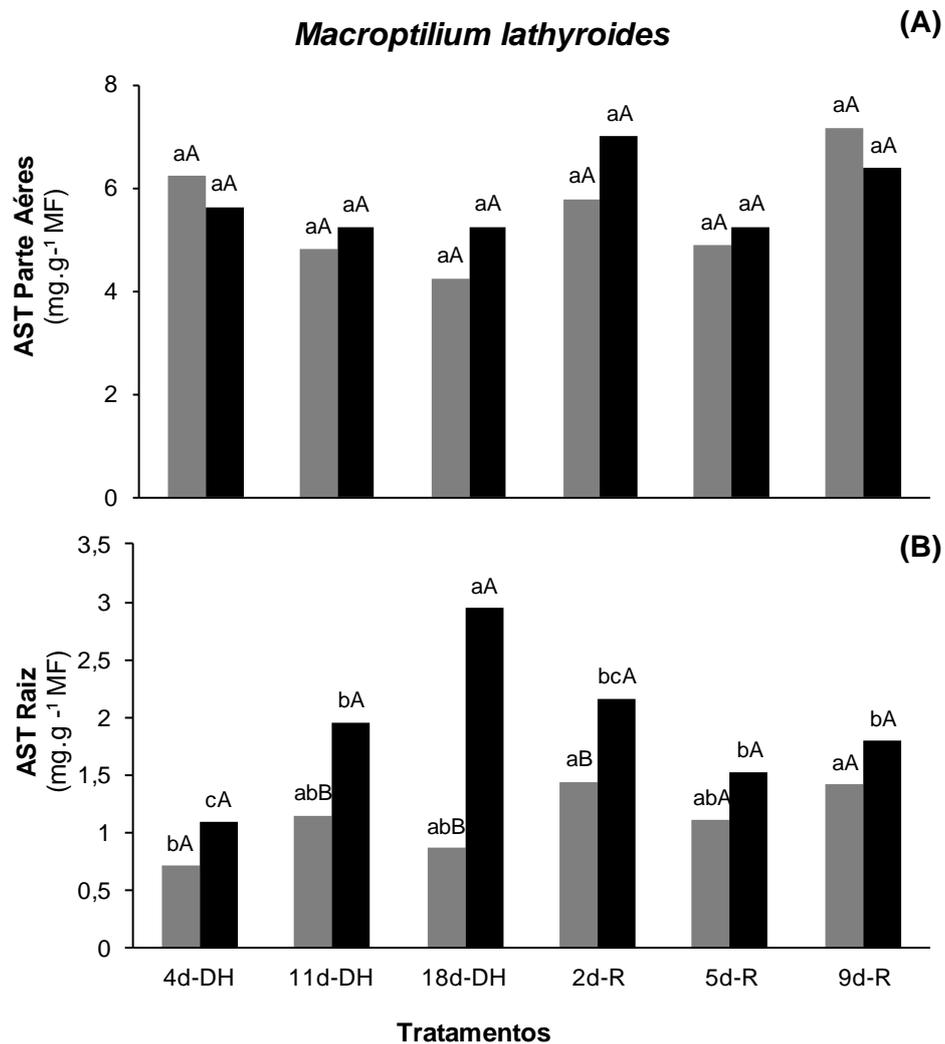


Figura 1: Teores de açúcares solúveis totais em folhas (A) e raízes (B) de *M. lathyroides* L. submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

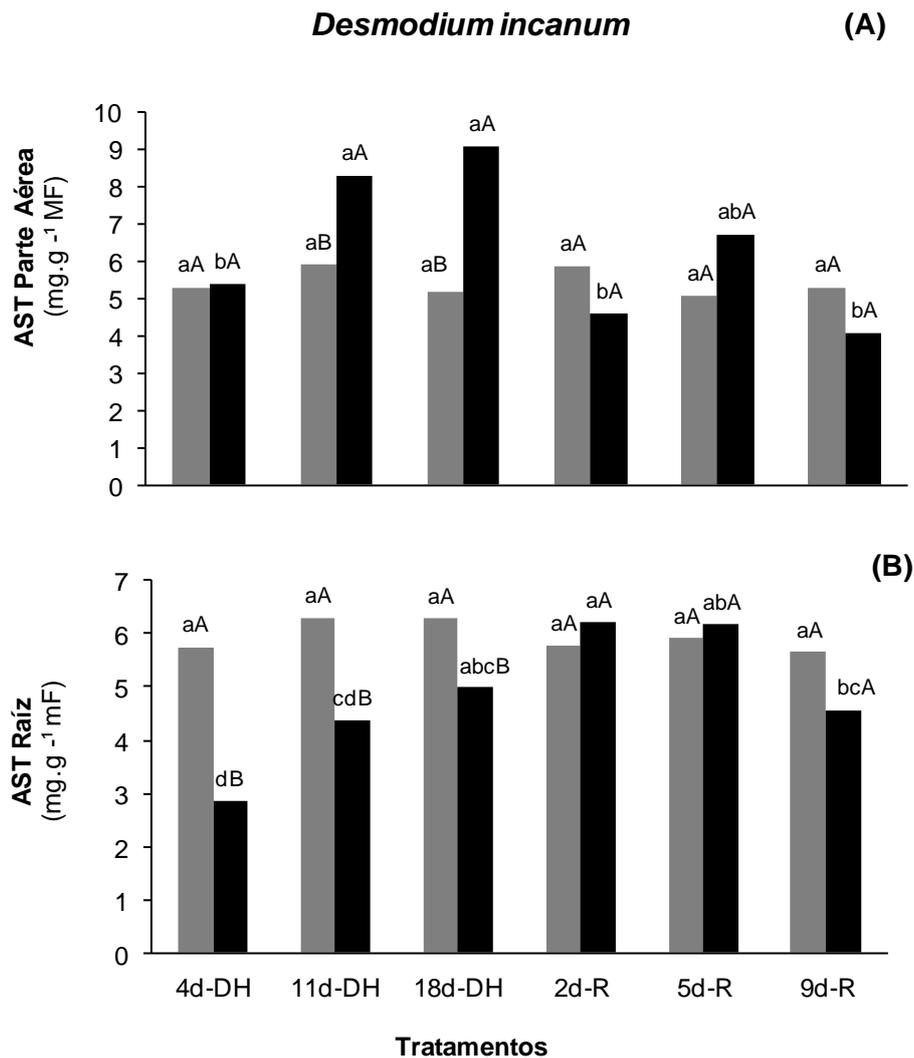


Figura 2: Teores de açúcares solúveis totais em folhas (A) e raízes (B) de *D. incanum* DC submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos em *V. luteola* não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos quando foram avaliados na parte aérea (Figura 3 A). Os resultados foram significativos apenas quando comparados os períodos. No entanto, nas raízes foi evidenciada diferença significativa entre os tratamentos, sendo que os níveis mais acentuados foram observados aos 18d-DH, retomando à níveis próximos do tratamento controle após a reidratação (Figura 3B).

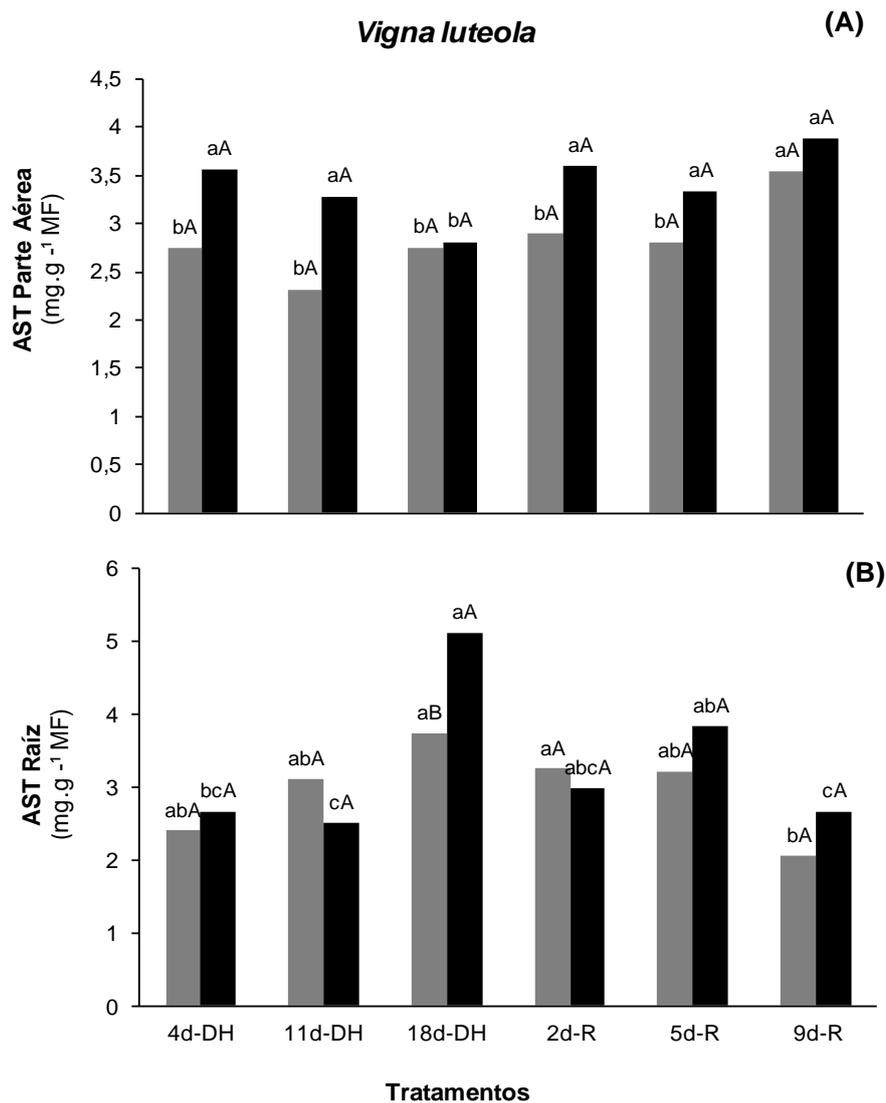


Figura 3: Teores de açúcares solúveis totais em folhas (A) e raízes (B) de *V. luteola* Jacq submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos na quantificação de prolina em *M. lathyroides* apresentaram diferença significativa entre períodos e tratamentos, tanto na parte aérea como na raiz (Figuras 4A e 4B, respectivamente). Nos tecidos foliares os teores de prolina, em plantas sob restrição hídrica, foram incrementados aos 11d-DH com aumento crescente até os 2d-R, sendo os mesmos reduzidos ao final do período experimental, com valores equivalentes aos do controle (Figura 4A).

Nas raízes das plantas de *Macroptilium* sob deficiência hídrica, os teores de prolina, foram superiores aos das plantas do controle, aos 11 d-DH até 5d-R,

evidenciando-se os níveis mais altos de prolina nas raízes aos 18d-DH. No , no último período avaliado (9d-R) os valores observados não diferiram das plantas controle (Figura 4B).

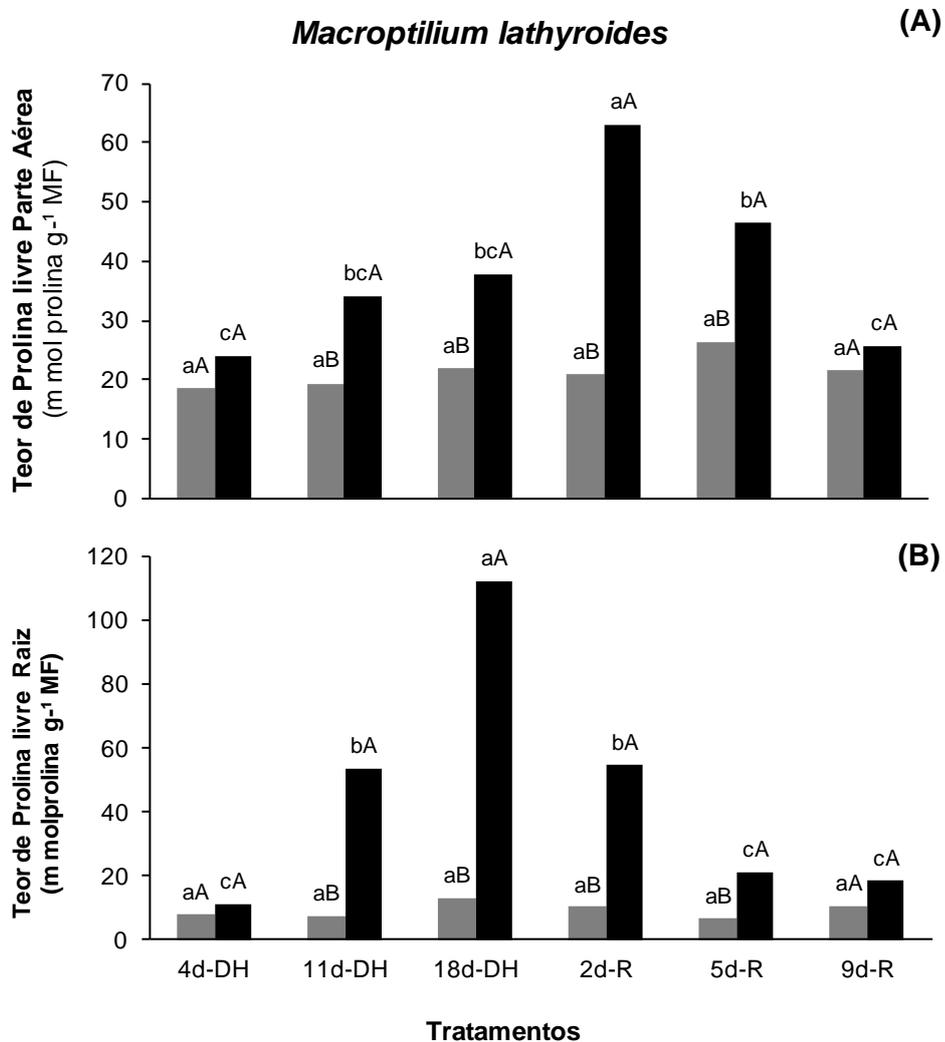


Figura 4: Teores de prolina livre em folhas (A) e raízes (B) de *M. lathyroides* L submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam o período de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam controle (■) e DH ou R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os teores de prolina na parte aérea de *D. incanum*, aumentaram aos 11d-DH e aos 18d-DH, na condição de déficit hídrico, diferindo significativamente em relação ao controle e período de tratamento (Figura 5A). Nas raízes, foi observada diferença significativa, com o maior incremento nos níveis de prolina aos 11d-DH, mantendo-

se superior ao controle aos 18d-DH e 2d-R, igualando-se aos níveis das plantas controle nos períodos subsequentes (Figura 5B).

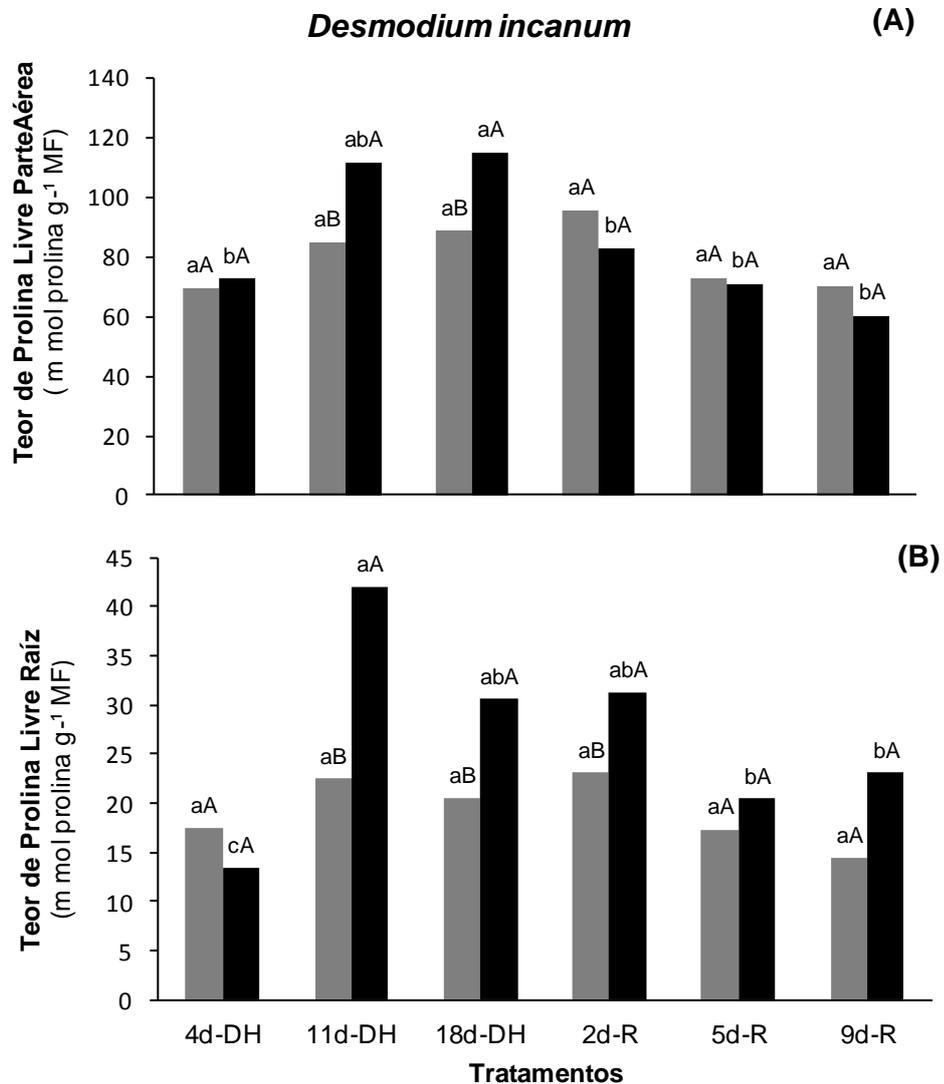


Figura 5: Teores de prolina livre em folhas (A) e raízes (B) de *D. incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam períodos de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam regime hídrico: controle (■) e déficit hídrico DH ou reidratação, R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Em *V. luteola*, foi evidenciado incremento nos níveis de prolina, nas plantas submetidas à restrição hídrica, desde o primeiro período avaliado, tanto em tecidos foliares (Figura 6A) como nas raízes (Figura 6B). Nas raízes, no entanto, houve redução nos níveis de prolina igualando-se aos níveis do controle no último período avaliado (9d-R), o que não foi observado nos tecidos aéreos.

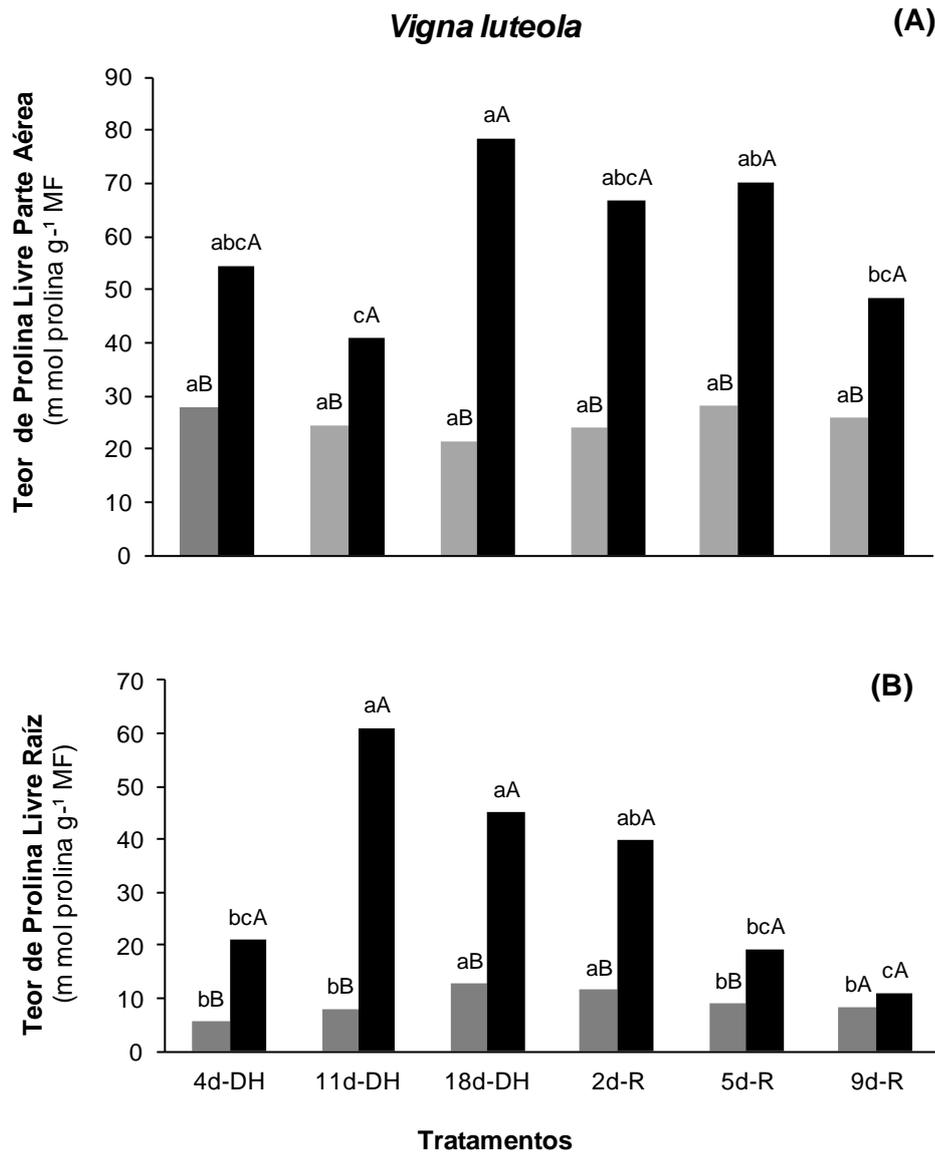


Figura 6: Teores de Prolina livre em folhas (A) e raízes (B) de *V. luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam períodos de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam regime hídrico: controle (■) e déficit hídrico DH ou reidratação, R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos na avaliação do extravasamento de eletrólitos nas folhas de *Macroptilium* demonstraram aumento nessa variável, quando considerado os períodos de avaliação, tanto nas plantas controle quanto nas submetidas ao déficit hídrico (Figura 7A). No entanto, aos 11d-DH e aos 18d-DH, foi observado aumento mais drástico desses valores nas plantas sob restrição hídrica, diferindo significativamente das plantas do tratamento controle.

Nas raízes, os resultados obtidos para o extravasamento de eletrólitos mostraram diferença significativa entre os tratamentos a partir de 4d-DH mantendo-se até aos 18d-DH, período onde foram observados os maiores valores para esta variável (Figura 7B). Após a reidratação (2d-R) houve restabelecimento desses valores igualando-se ao controle até o final do período experimental.

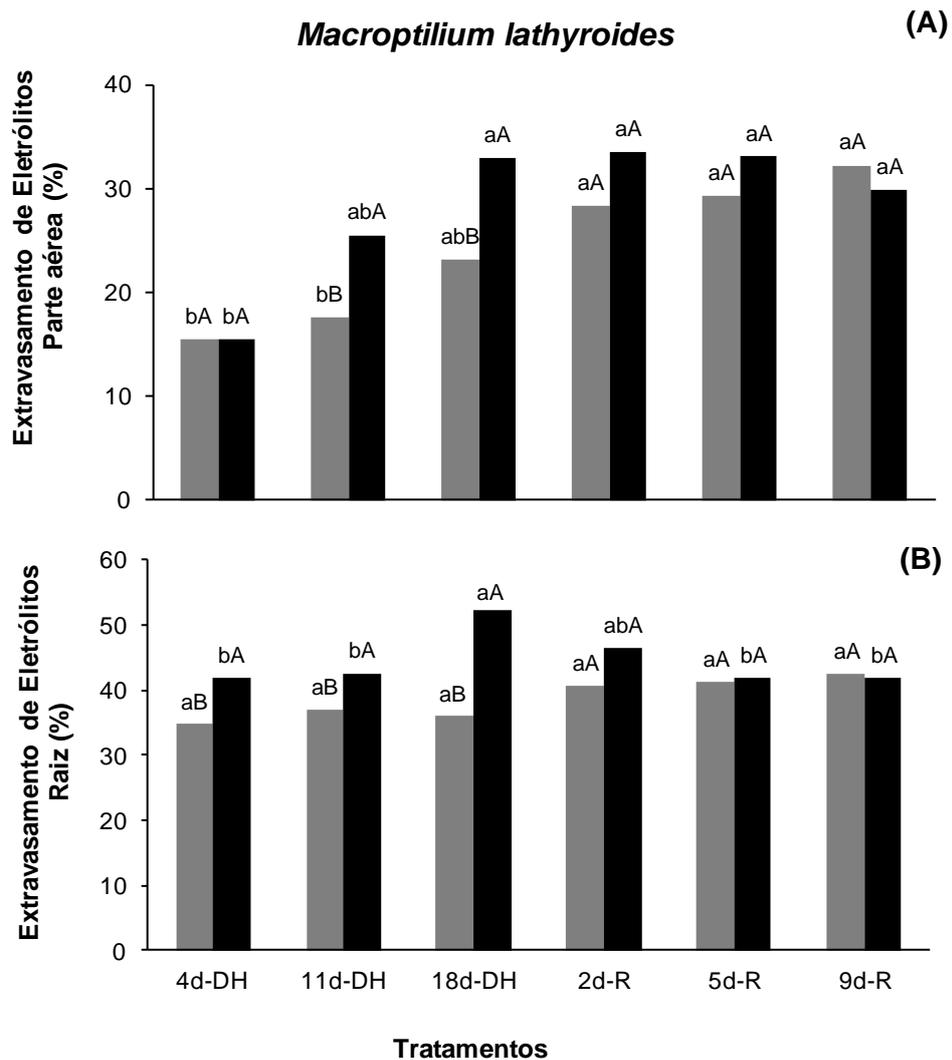


Figura 7: Extravasamento de eletrólitos em folhas (A) e raízes (B) de *M. lathyroides* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam períodos de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam regime hídrico: controle (■) e déficit hídrico DH ou reidratação, R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Em plantas de *D. incanum*, nas folhas não foram observadas diferença significativa entre os tratamentos, apenas entre períodos (Figura 8A). Nos dois

regimes hídricos houve incremento dessa variável ao longo do período experimental. No entanto, nas raízes os resultados demonstraram diferença entre períodos e tratamentos, mostrando interação entre os fatores. Os maiores valores foram observados aos 18d-DH, diferindo das plantas controle até 5d-R, após esse período os valores foram restabelecidos aos níveis das plantas controle (Figura 8B).

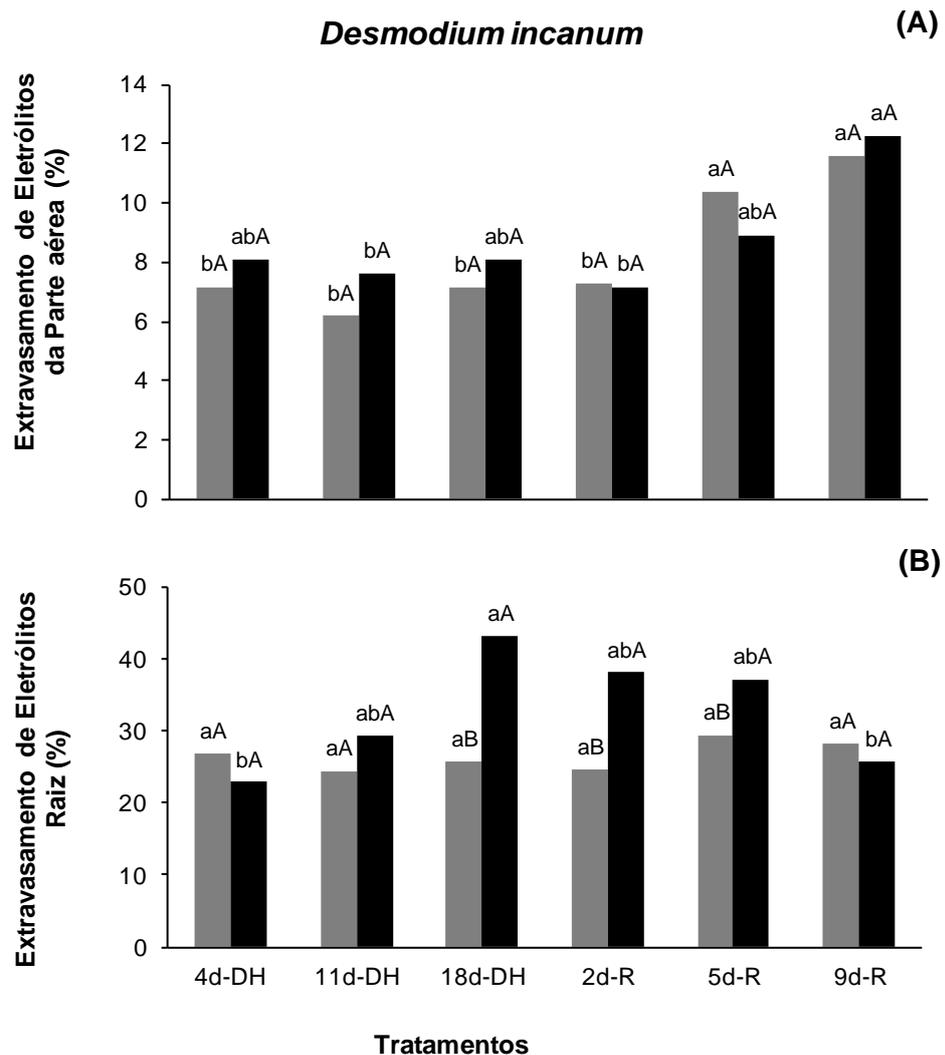


Figura 8: Extravasamento de eletrólitos em folhas (A) e raízes (B) de *D. incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam períodos de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam regime hídrico: controle (■) e déficit hídrico DH ou reidratação, R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Na Figura 9 estão apresentados os resultados do extravasamento de eletrólitos em folhas (9A) e raízes (9B) de *V. luteola*. Em folhas os resultados evidenciaram diferença significativa entre períodos e regime hídrico. As plantas

submetidas ao déficit hídrico apresentaram valores superiores aos 18d-DH; 2d-R e aos 5d-R, diferindo, nesses períodos, das plantas do tratamento controle.

Nas raízes os resultados obtidos apresentaram diferença significativa entre períodos e tratamentos, com interação entre os dois fatores. Os níveis de extravasamento nas raízes nas plantas sob restrição hídrica também foram superiores aos obtidos nas plantas controle, sobretudo aos 18d-DH e aos 2d-R.

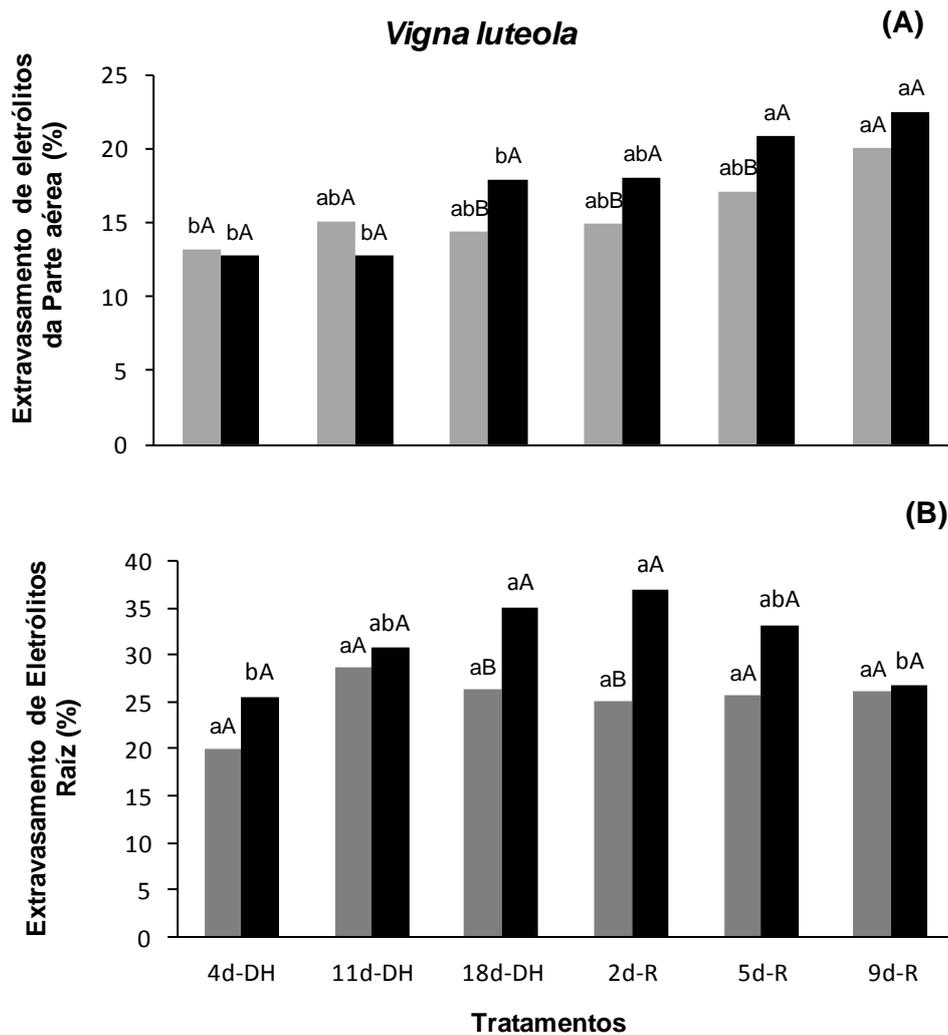


Figura 9: Extravasamento de eletrólitos em folhas (A) e raízes (B) de *V. luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam períodos de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam regime hídrico: controle (■) e déficit hídrico DH ou reidratação, R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Em relação aos teores de malondialdeído (MDA) nos tecidos foliares de *Macroptilium*, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ou períodos (Figura 10A). Nas raízes, os níveis de MDA em plantas submetidas ao

déficit hídrico, foram superiores aos 2d-R e aos 5d-R, quando comparados aos das plantas controle (Figura 10B), apresentando diferença significativa entre períodos .

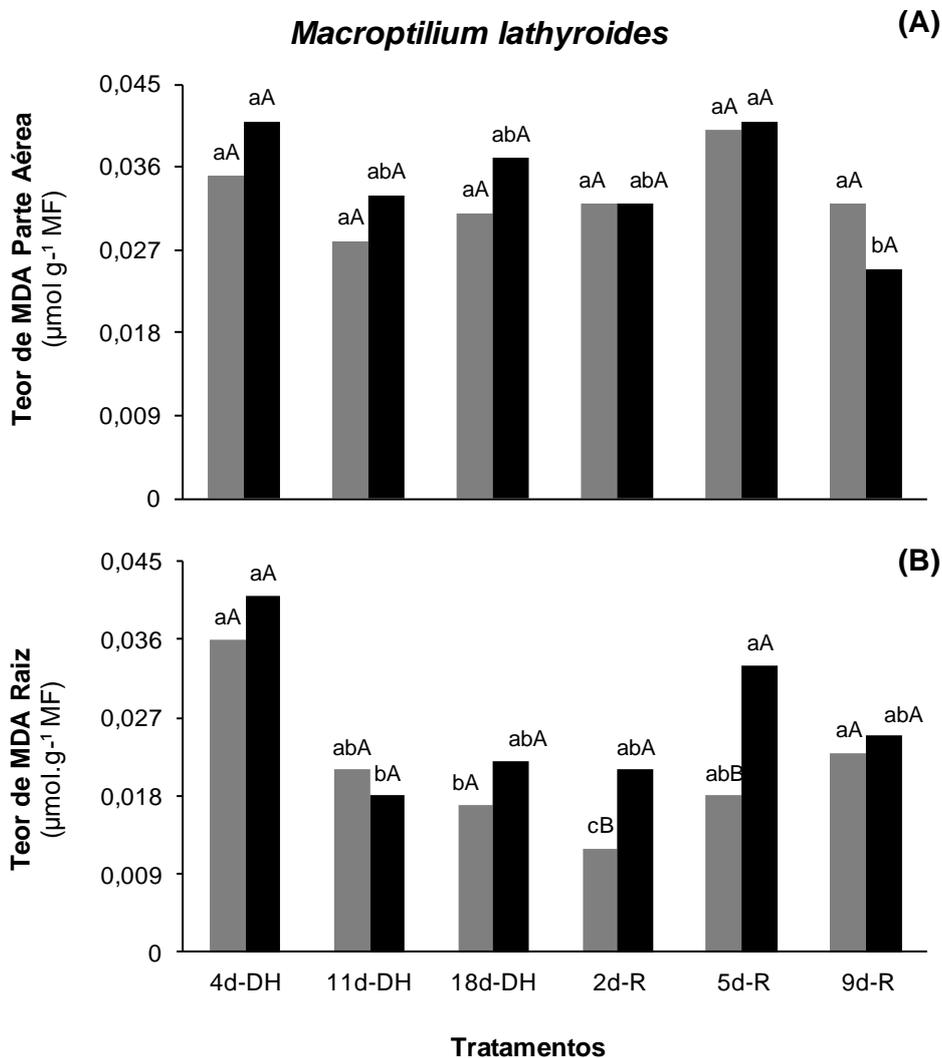


Figura 10: Teores de MDA (Malondialdeído) em folhas (A) e raízes (B) de *M. lathyroides* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam períodos de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam regime hídrico: controle (■) e déficit hídrico DH ou reidratação, R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos em *D. incanum*, não mostraram diferença significativa nos tecidos foliares (Figura 11A). No entanto, nas raízes os níveis de MDA diferiram entre os tratamentos e períodos. Foi observado, nas plantas tratadas sob restrição hídrica, aumento nos níveis de MDA aos 11d-DH e aos 18d-DH, retomando, nos períodos posteriores, a níveis próximos aos observados nas plantas controle (Figura 11B).

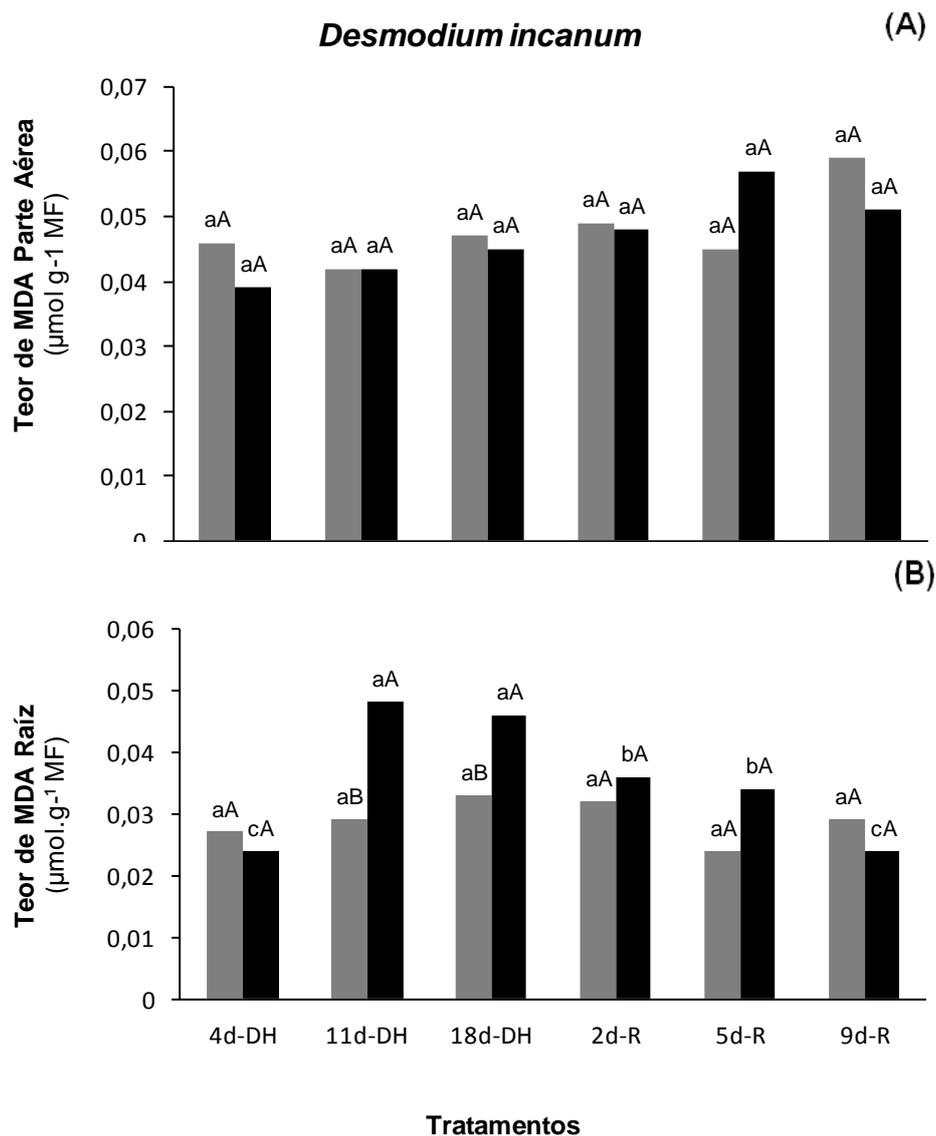


Figura 11: Teores de MDA (Malondialdeído) em folhas (A) e raízes (B) de *D. incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam períodos de tratamento (controle ou restrição hídrica e recuperação). Letras maiúsculas comparam regime hídrico: controle (■) e déficit hídrico DH ou reidratação, R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os teores de MDA em plantas de *V. luteola* apresentaram diferença significativa para regime hídrico e período, tanto nos tecidos foliares como nas raízes (Figura 12A e 12 B). Houve um incremento nos níveis de MDA, nos dois órgãos, aos 11d-DH até os 5d-R. Porém, ao final do período experimental os níveis de MDA nas plantas submetidas ao déficit hídrico se igualaram às das plantas controle, tanto na parte aérea como nas raízes.

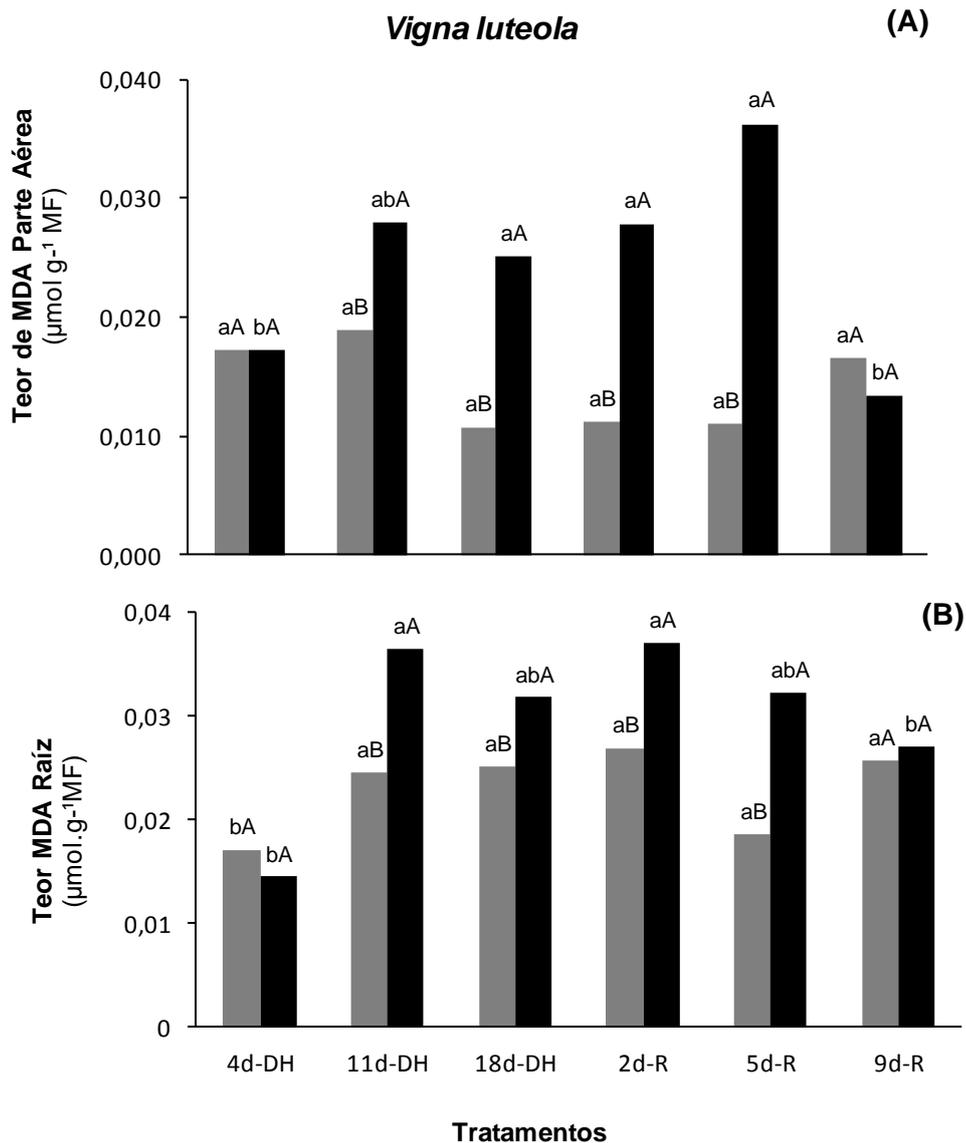


Figura 12: Teores de MDA (Malondialdeído) em folhas (A) e raízes (B) de *V. luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam períodos. Letras maiúsculas comparam regime hídrico: controle (■) e déficit hídrico DH ou reidratação, R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos na quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em plantas de *Macroptilium*, mostraram diferença significativa entre períodos e regime hídrico, tanto na parte aérea como nas raízes (Figura 13A e 13B). Os maiores níveis de H_2O_2 nas folhas, das plantas submetidas ao déficit hídrico, foram observados aos 18d-DH, mantendo superiores aos das plantas controle até 5d-R, e igualando-se apenas no último período avaliado (9d-R) (Figura 13 A).

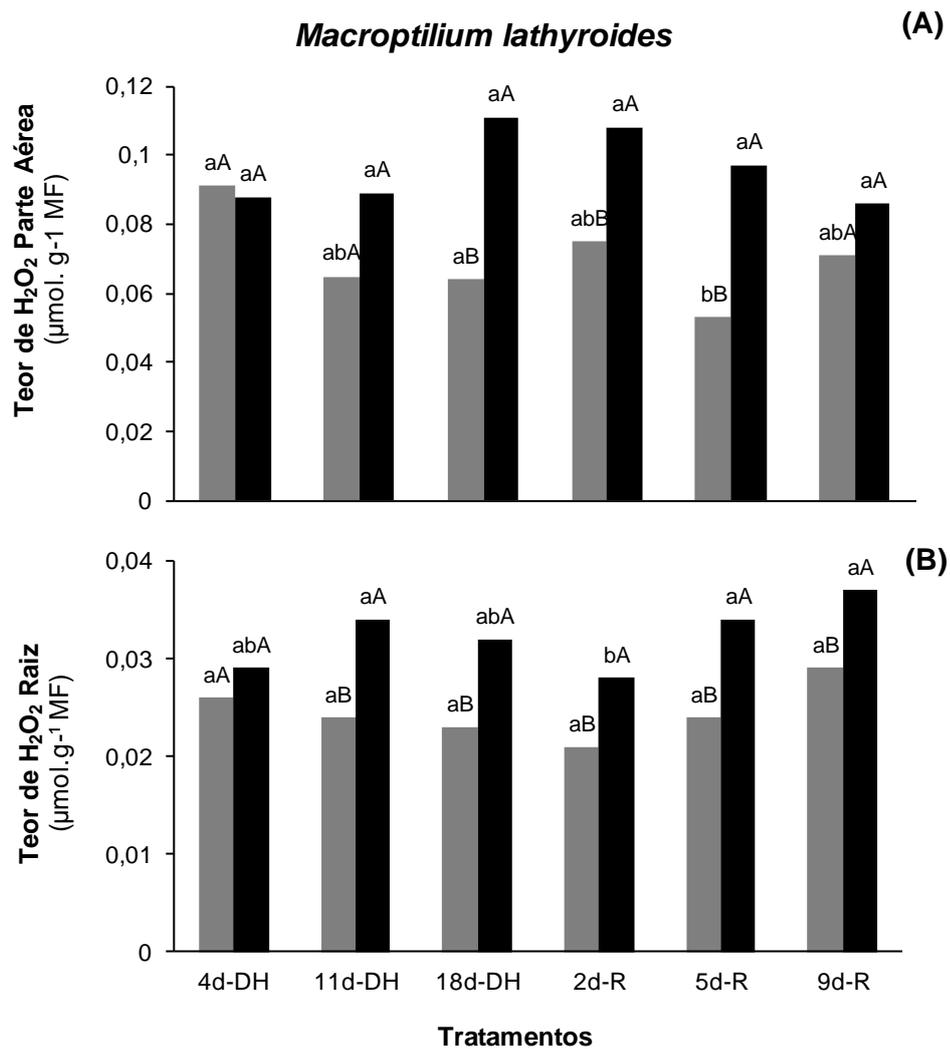


Figura 13: Teores de H₂O₂ em folhas (A) e raízes (B) de *M. lathyroides* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam períodos. Letras maiúsculas comparam regime hídrico: controle (■) e déficit hídrico DH ou reidratação, R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Nas raízes, as plantas sob restrição hídrica apresentaram acréscimo nos níveis de H₂O₂ a partir dos 11d-DH não restabelecendo valores equivalentes aos do controle até o final do período experimental (Figura 13B).

Na Figura 14 (A e B) estão apresentados os resultados da quantificação de H₂O₂ em plantas de *Desmodium*. Nas folhas não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, apenas entre períodos, evidenciado maiores teores de H₂O₂ aos 4d-DH, nos dois regimes hídricos (Figura 14A). No entanto, nas raízes, foi evidenciada diferença significativa entre períodos e tratamentos (Figura 14B). Aos 11d-DH, 18d-DH e 2d-R foram observados os maiores níveis de H₂O₂

nas plantas submetidas à restrição hídrica quando comparadas aos níveis das plantas controle. Ao final do período experimental esses valores se igualaram.

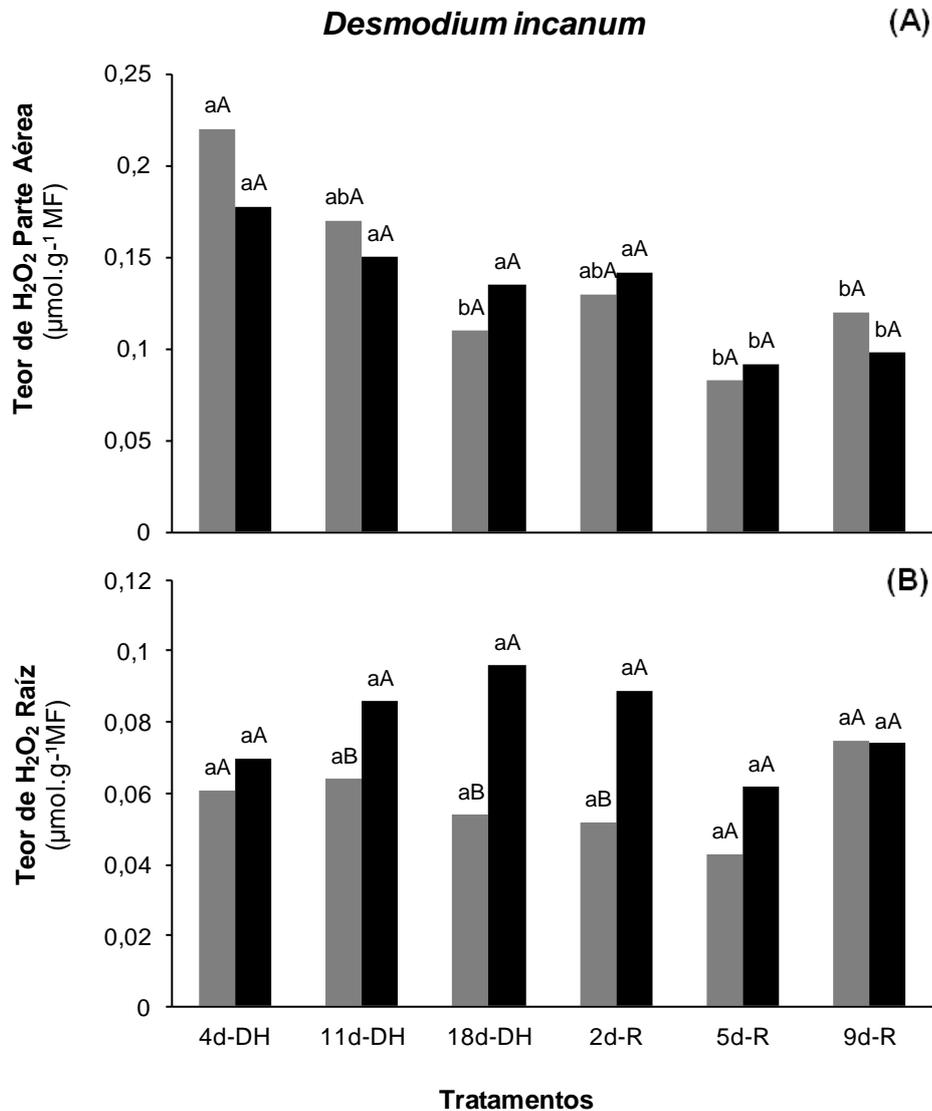


Figura 14: Teores de H₂O₂ em folhas (A) e raízes (B) de *D. incanum* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam períodos. Letras maiúsculas comparam regime hídrico: controle (■) e déficit hídrico DH ou reidratação, R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os níveis de peróxido de hidrogênio nas folhas de plantas de *V. luteola* submetidas ao déficit hídrico não apresentaram diferenças significativas entre os

tratamentos quando comparadas ao nível nas plantas controle (Figura 15A). Nas raízes, os níveis de H_2O_2 também não diferiram das plantas controle, quanto ao regime hídrico. Porém, quando comparados os períodos foi observado um incremento nos valores de H_2O_2 , nos dois regimes hídricos, aos 18d-DH, com pequena redução após esse período.

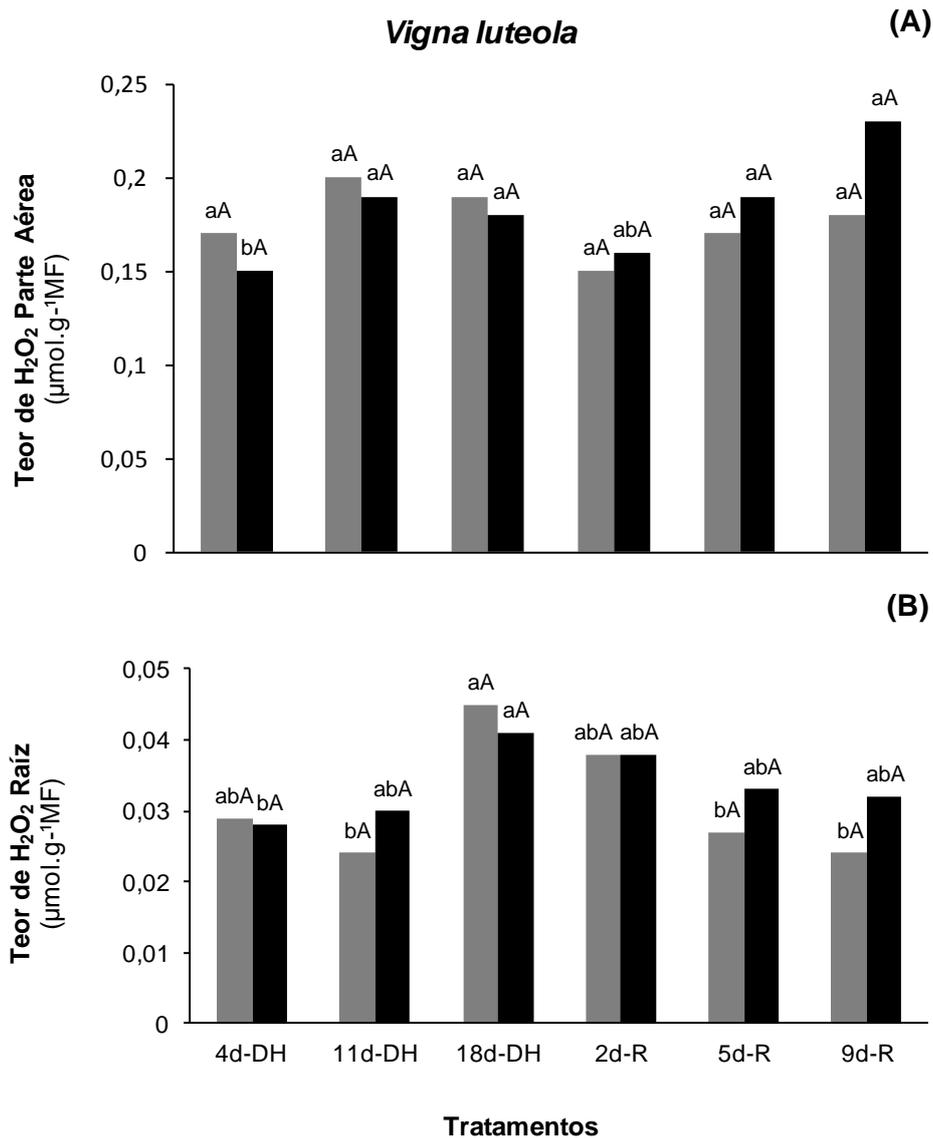


Figura 15: Teores de H_2O_2 em folhas (A) e raízes (B) de *V. luteola* submetidas a diferentes períodos de déficit hídrico (4d-DH; 11d-DH e 18d-DH) e posterior recuperação (2d-R; 5d-R e 9d-R). Letras minúsculas comparam períodos. Letras maiúsculas comparam regime hídrico: controle (■) e déficit hídrico DH ou reidratação, R (■). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

O estresse hídrico desencadeia um conjunto de respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas, que desenvolvem mecanismos de adaptação às circunstâncias ambientais limitantes, variando de acordo com a intensidade, com o tempo de estresse, com a interação com outros tipos de estresse, com o estágio de desenvolvimento e o genótipo (MENESES *et al.* 2006).

A maioria dessas modificações visa manter o crescimento e a reprodução da planta em ambientes com limitações na disponibilidade de água. Uma das mais bem documentadas respostas fisiológicas ao déficit hídrico em plantas é a habilidade de algumas espécies de ajustar osmoticamente suas células. Durante a seca, plantas superiores ativamente acumulam açúcares, ácidos orgânicos e íons no citosol para diminuir o potencial osmótico e, conseqüentemente, manter o potencial hídrico e o turgor de suas células próximo do nível ótimo (MAIA *et al.*, 2007).

Em algumas plantas, que apresentam fortes reduções na condutância estomática e na transpiração quando expostas ao déficit hídrico, a ascensão de seiva via xilema pode ser favorecida pela síntese ou pelo acúmulo de solutos (orgânicos e inorgânicos) osmoticamente ativos no citosol celular (NEPOMUCENO *et al.*, 2001).

O acúmulo desses compostos nas folhas diminui o potencial hídrico foliar (Ψ_w), o que aumenta a capacidade de absorção de água das plantas e atenua os efeitos do déficit hídrico no conteúdo relativo de água da planta (PAGTER *et al.*, 2005).

As espécies estudadas apresentaram respostas diferenciadas quanto aos teores de açúcares solúveis totais (AST) e quanto ao órgão preferencial de síntese e/ou acúmulo deste. *M. lathyroides* (Figura 1B) apresentou aumento nos teores de açúcares solúveis totais a partir dos 11d-DH, mantendo-se superior até o início do período de recuperação (2d-R) e *V. luteola* (Figura 3B), apenas aos 18d-DH. Enquanto, *D. incanum* reduziu os teores de AST em raízes a partir dos 4d-DH e, em contrapartida, aumentaram esses níveis na parte aérea ao 11 e 18 d-DH (Figura 2 A e B). Sugerindo que em *Macroptilium* e *Vigna* a resposta à imposição do estresse

hídrico ocorre nas raízes, órgão diretamente afetado pela restrição hídrica. No entanto, as três espécies, após a reidratação reduzem a concentração de AST ao mesmo nível das plantas controle, independente do órgão onde o mesmo foi acumulado.

Maia (2007) estudando cultivares de milho, submetidos a estresse hídrico, verificou a elevação da concentração de AST nas folhas a partir de cinco dias, aumentando significativamente. Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de *Gossypium hirsutum* L. (Marur, 1998), em *Medicago sativa* (IRIGOYEN *et al.*, 1992) e em *Schizolobium parahyba* (Vell.) S.F. Blake (CARVALHO, 2005), sob condições de estresse hídrico, que apresentaram níveis de açúcares aumentados, assemelhando-se aos resultados obtidos na em parte aérea da espécie *D. incanum*

Aumentos significativos nos teores de açúcares solúveis em raízes também foram encontrados por Souza *et al.* (2004) e Oliveira Neto *et al.* (2006) em experimentos realizados com as cultivares de *Vigna unguiculata* Vita-7 e Sempre Verde, respectivamente. Após reidratação, as plantas irrigadas e as que sofreram deficiência hídrica apresentaram teores de açúcares solúveis semelhantes ao controle, corroborando com os mesmo resultados encontrados com *M. lathyroides* e *V. luteola*, que apresentaram, níveis altos de AST aos 18d-DH (Figuras 1B e 3B), retomando seus níveis quando reidratadas. Esse acúmulo serve de reserva de carbono para a imediata retomada de crescimento, assim que ocorre o balanço hídrico apropriado.

Acúmulos de prolina foram encontrados em feijão vigna submetidos a estresse hídrico, sendo esse osmólito considerado um marcador bioquímico do estresse hídrico para os genótipos de ciclo intermediário, diferenciando-os dos genótipos de ciclo tardio (SANTOS *et al.*, 2010).

Neste trabalho também foram observados aumentos expressivos nos teores de prolina nas três espécies estudadas, tanto nos tecidos foliares como nos radiculares (Figuras 4, 5 e 6). Da mesma forma como foi observado em diversas espécies submetidas ao déficit hídrico, como em feijão-mungo (HAMIDOU *et al.*, 2007), em *Carapa guianensis* (SILVA, 2009), em mogno-africano (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013)

Dentre os solutos envolvidos no processo de ajustamento osmótico, a prolina tem se destacado na literatura como sendo um soluto compatível que ocorre em plantas em resposta a estresses ambientais. A prolina se acumula em uma

variedade de espécies de plantas em resposta a estresses como seca, salinidade, temperaturas extremas, radiação ultravioleta e metais pesados (SIRIPORNADULSIL *et al.*, 2002). Esse acúmulo está correlacionado à tolerância ao estresse, sendo a concentração deste aminoácido, geralmente encontrada em níveis mais elevados nas plantas tolerantes que nas sensíveis (ASHRAF; FOOLAD, 2007). Sua principal função na planta é atuar como agente osmorregulador em diversas espécies vegetais, sendo utilizada como indicador da resposta a estresse hídrico (GIANNAKOULA *et al.*, 2008).

De acordo com Costa (2009), além do aumento expressivo de prolina em folhas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), essas plantas, expostas à restrição hídrica, apresentaram percentuais mais elevados de extravasamento de eletrólitos. Da mesma forma, Carvalho (2010), observou que, o extravasamento de eletrólitos aumentou com a diminuição da disponibilidade hídrica no cultivo de mamoeira. Corroborando com os resultados encontrados neste trabalho com as espécies *M. lathyroides* e *V. luteola* que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos a partir dos 11 e 18d-DH, respectivamente, tanto em folhas como em raízes (Figuras 7 e 9). Diferente dos resultados encontrados em folhas de *D. incanum* (Figura 8A), onde não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, apesar de ter aumentado os níveis de extravasamento de eletrólitos nas raízes dessa espécie. No entanto, até o final do período experimental pode-se observar que as três espécies apresentaram resultados semelhantes às plantas controle, evidenciando a recuperação do sistema de membranas nos órgão afetados pelo estresse.

O extravasamento de eletrólitos observado sob a maior deficiência hídrica pode ser atribuído a uma consequência da limitação da fotossíntese imposta pelo estresse hídrico intenso que resulta na ruptura da integridade de membrana, por exemplo, devido à produção de formas reativas de oxigênio, ROS. Estes compostos altamente reativos diminuem a atividade de enzimas, causam peroxidação de lipídios e afetam praticamente todos os componentes fotossintéticos (TORRES NETO, 2005).

Danos em membranas a nível foliar podem ser um dos primeiros sinais ao estresse (BAJJI *et al.*, 2001). Em folhas de milho da linhagem L13.1.2 o estresse hídrico induziu um aumento de 23% na concentração de MDA em relação ao controle (VIANA, *et al.*, 2002). Junior e colaboradores (2011), estudando andirobeira

em função do status hídrico, pôde observar que a concentração de MDA não diferiu significativamente entre plantas irrigadas e plantas não irrigadas. No entanto, a concentração de MDA foi sempre superior sob déficit hídrico, associando o estresse à peroxidação de lipídios.

Esses resultados corroboram com os encontrados neste trabalho para a espécie *V. luteola* que apresentou diferenças significativas na parte aérea e raiz, onde o incremento de MDA ocorreu a partir dos 11d-DH (Figura 12), assim como em raízes de *Macroptilium* (Figura 10B) e *Desmodium* (Figura 11B), onde também foi observado aumento nos teores de MDA. Nestas duas espécies, porém, não houve acréscimo nos níveis de MDA em folhas, quando relacionados ao controle.

Em aroeira-do-sertão níveis elevados de peroxidação lipídica foram registrados sob deficiência hídrica, no entanto estes níveis foram revertidos logo após a reidratação (QUEIROZ *et al.*, 2002), assim como verificado em *Desmodium* (Figura 11B).

A concentração de MDA e H_2O_2 foi avaliada em folhas de tomate como um indicador de estresse oxidativo (RODRIGUES *et al.*, 2010). Em plantas de trigo também foi verificado o aumento na concentração de H_2O_2 e de MDA sob deficiência hídrica (ESFANDIARI, *et al.*, 2007). Nesse sentido, baixas concentrações de H_2O_2 e MDA foram associadas com a tolerância ao estresse hídrico em plantas de ervilha (SAIRAM *et al.*, 2000) e de trigo (ESFANDIARI *et al.*, 2007). Verificou-se nesse experimento significativo aumento nos níveis de MDA nas raízes das três espécies estudadas, sob condições de estresse, sugerindo danos nas membranas celulares (Figuras, 10, 11 e 12). Esses resultados podem estar diretamente relacionados com os observados na avaliação de extravasamento de eletrólitos no mesmo órgão (Figuras 7, 8 e 9) e com o aumento nos níveis de H_2O_2 nas raízes de *Macroptilium* e *Desmodium*. Em *Vigna*, no entanto, não foi evidenciada alterações nos níveis de H_2O_2 em raízes ou folhas.

O H_2O_2 desempenha um papel duplo em plantas: em baixas concentrações, atua como uma molécula envolvida na tolerância ao desencadear mecanismos de sinalização para a aclimação a vários estresses bióticos e abióticos. H_2O_2 também é citado como um regulador chave em uma ampla variedade de processos fisiológicos, tais como a senescência, fotorrespiração e fotossíntese, movimento dos estômatos, ciclo celular e no crescimento e desenvolvimento (GILL; TUTEJA, 2010).

De acordo com que foi observado, plantas de *V. luteola*, não apresentaram alterações nos níveis de H_2O_2 durante o período experimental. No entanto, foi evidenciado que, nesta espécie, houve um acúmulo de prolina desde o primeiro período avaliado mantendo-se mesmo após a reidratação, o que pode ter contribuído para reduzir danos oxidativos.

A prolina, tem sido considerada uma molécula com potencial antioxidante e potente inibidor da morte celular programada. Osmólitos como sorbitol, manitol e prolina tem sido testados na eliminação de radicais OH^\cdot . Portanto, prolina não é apenas uma molécula importante na sinalização redox, mas também um eficaz supressor de espécies reativas de oxigênio (EROS) produzidos em plantas sob condições de estresses como salinidade e desidratação (SMIRNOFF, CUMBES 1989).

Baseando-se nos resultados obtidos nesse trabalho é possível afirmar que todas as espécies estudadas, mostraram alterações metabólicas expressivas em tecidos foliares e/ou radiculares, como forma de adaptação à condição de restrição hídrica imposta durante o período avaliado. No entanto, *V. luteola* foi a única espécie que não apresentou alterações nos níveis de H_2O_2 em nenhum dos órgãos avaliados. Esses resultados podem evidenciar que o aumento de H_2O_2 nas demais espécies pode estar associado à um processo de sinalização através dessa molécula, o qual contribui na ativação de outros mecanismos, além dos avaliados nesta pesquisa, que pode ter contribuído para o restabelecimento das membranas reduzindo, desta forma, maiores percentuais de extravasamento de eletrólitos em *Macroptilium* e *Desmodium*, quando comparados aos observados em *Vigna*, nos mesmos períodos.

Baseado nos resultados obtidos pode-se inferir que as espécies estudadas são capazes de tolerar a restrição hídrica, na condição experimental utilizada. No entanto, cada espécie é capaz de se ajustar através de mecanismos fisiológicos diferenciados e de retomar a condição inicial logo após a reidratação.

CONCLUSÕES

O acúmulo de osmólitos como açúcares solúveis e prolina em raízes e folhas em resposta à restrição hídrica, constitui resposta metabólica adaptativa comum às leguminosas estudadas. O período de resposta e a diferença na concentração destes solutos durante o período de estresse imposto e de recuperação sugerem mecanismos diferenciados ao déficit de água no solo.

O estresse oxidativo imposto causado pela restrição hídrica, embora resposta comum entre as leguminosas estudadas e reversível com a reidratação do substrato, também é resultante de mecanismos adaptativos diferenciados entre espécies, considerando as variáveis extravasamento de eletrólitos, teores de malondiadeído e acúmulo de peróxido de hidrogênio em raízes e folhas.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. P. F.; MORAES, F. K. C; SANTOS, R. I. N; CASTRO, G. L. S de; RAMOS E. M. L. S e PINHEIRO, H. A. Ecofisiologia de plantas jovens de mogno-africano submetidas a deficit hídrico e reidratação **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.48, n.1, p.9-16, jan. 2013.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.59, p.206-216, 2007.
- BAJJI, M., KINET, J. M., LUTTS, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. **Plant Growth Regulation**, 0, p.1-10 . 2001
- BARRETO, A.F.; BARBOSA, J. K. A. Mecanismos de resistência à seca que possibilitam a produção em condições do semi.árido nordestino. In: **Simpósio brasileiro de captação de água de chuva no semi-árido**, 3., 2001, Campina Grande, PB. Campina Grande: Embrapa Algodão; Petrolina, PE: Embrapa Semi-Arido, 2001. p.7.
- BASILE, A. G. *et al.* Controle químico de feijão-de-rôla (*Macroptilium lathyroides*) com glyphosate. In: Simpósio internacional sobre glyphosate, 1., 2007, Botucatu. **Anais**. Botucatu: FCA, UNESP, 2007. 1 CD-ROM.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil, The Hague**, v.39, p.205-207, 1973.

BEZERRA NETO, E.; BARRETO, L. P. **Análises Químicas e Bioquímicas em Plantas**. Recife: Editora Universitária da UFRPE, 2011. 267 p.

BOLDRINI, I.I. **Dinâmica de vegetação de uma pastagem natural sob diferentes níveis de oferta de forragem e tipos de solos**, Depressão Central, RS. Porto Alegre, 1993. 262f. Tese (doutorado em Zootecnia). Faculdade de Agronomia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BORÉM, A. MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2005. p.115-124.

BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.17, p.278- 293, 1966.

BUISSON, E.; DUTOIT, T.; TATONI, T. Establishment Mode of Keystone Species in Plant Communities: Application to Restoration Ecology. In: **symposium of the international association for vegetation Science**, 45., 2002, Porto Alegre. Abstracts. Porto Alegre: IAVS, 2002.

BÜRLING, K.; CEROVIC, Z. G.; CORNIC, G.; DUCRUET, J-M.; NOGA, G.; HUNSCHE, M. Fluorescence-based sensing of drought-induced stress in the vegetative phase of four contrasting wheat genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v.89, p.51–59, 2013.

CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. A., SIMABUKURO, E. A. Crescimento de plantas jovens de *Tabebuia áurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore submetidas a estresse hídrico. **Acta botanica brasílica**, v.18, n. 2, p.241-251, 2004.

CÂMARA, T. R.; et al. Efeito do stress salino e da prolina exógena em calos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, n.2, p.146-155, 2000.

CAMBRAIA, J. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas. In: NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. **Estresses ambientais:**

danos e benefícios em plantas. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária. p.95-105. 2005.

CARVALHO, M. Variações morfológicas e eficiência do uso da água em *Ricinus communis* L. submetida ao déficit hídrico regulado. Ilhéus – BA. 2010. 95p, **Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal).** Universidade estadual de Santa Catarina.

CATANEO, A.C.; CHAMMA, K. L.; FERREIRA, L. C.; DÉSTRO, G. F. G.; SOUSA, D. C. F. Atividade de Superóxido Dismutase em Plantas de Soja (*Glycine max* L.) Cultivadas Sob Estresse Oxidativo Causado por Herbicida. **Revista Brasileira de Herbicida**, v.4, n. 2, 2005.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany, London**, v.103, p.551–560, 2009.

CHAPIN III, F.S., AUTUNM, K., PUGNAIRE, F. Evolution of suites of traits in response to environmental stress. **American Naturalist** 142(supplement): 79-92. 1993.

CORREIA, K. G.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Avaliação do crescimento do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) submetido a déficit hídrico. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.4, s.p., 2004.

COSTA, M. A. **Ocorrência de danos celulares e capacidade de defesa antioxidante em mudas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) sob duas condições de déficit hídrico e após reidratação.** 2009, 36 p, Dissertação (Mestrado em Agronomia) UFRA.

DRIEVER, S. M.; KRORMDIJK, J. Will C3 crops enhanced with the C4 CO₂-concentrating mechanism live up to their full potential (yield)? **Journal of Experimental Botany**, v.64 p.3925-3935, 2013.

ESFANDIARI, E. O., M.R. Shakiba, S.A. Mahboob, Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling, **Journal Food Agricultural Environment** 5. 149–153. 2007.

EMBRAPA. **Valorização e uso de recursos naturais dos campos sul-brasileiros para produção pecuária sustentável e recuperação de pastagens nativas degradadas no Bioma Pampa**. 2011

FERREIRA, O. G. L. *et al.* Efeito do corte da parte aérea e de épocas de colheita sobre o rendimento e qualidade das sementes de feijão-dos-arrozais. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n.2, p.175-178, 2004.

FIGUERÔA, J. M.; BARBOSA, D. C. A.; SIMAKUBURO, E. A. Crescimento de plantas jovens de *Miracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) sob diferentes regimes hídricos. **Acta Botânica Brasileira**, v.18, n. 3, p 573-580, 2004.

FLEXAS, J. *et al.* Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions. **Functional Plant Biology**, Dordrecht: Kluwer, 2002. p.461-471.

GIANNAKOULA, A. *et al.* Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p.385-396, 2008.

GILL, S. S; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. 48 (2010) 909-930.

GRAHAM, D.; SMYDZUC, J. Use of anthrone in the quantitative determination of hexose phosphates. **Analytical Biochemistry**, v.11, p.246-255, 1965.

GUERRA, J.G.M. *et al.* Desempenho de leguminosas tropicais perenes como plantas de cobertura do solo. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2007. 22 p.

(Embrapa Agrobiologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 20).

HAMIDOU, F.; ZOMBRE, G.; DOIUF, O.; DIOP, N.N.; GUINKO, S.; BRACONNIER, S. Physiological, biochemical and agromorphological responses of five cowpea genotypes (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to water deficit under glasshouse conditions. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v.11, p.225-234, 2007.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experimental Station. Circ. n.347, 1938

HOPKINS, W. G. **Introduction to plant physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1995. 464 p.

IZAQUIRRE, P. & BUJHAUT, R. **Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas**. Parte 1. Editorial Hemisfério Sur, 1997.

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 Agricultural Biology*, 11, p.100–105, 2009.

JUNIOR D. D S. da; CARVALHO S. K da; FUJIYAMA, B. S; CASTRO, G. L. S de; PINHEIRO, H. A. **Ação antioxidante e peroxidação lipídica em função do status hídrico e radiação diurna na andirobeira**. Anais do 9º Seminário Anual de Iniciação Científica, 19 a 21 de outubro de 2011.

LAMBERS, H., POORTER, H. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. **Advances in Ecological Research**, v.23, p.187-261, 1992

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA, 2000. 531 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**, São Carlos, SP: Rima artes, 2004. 531p.

MAIA, P. S. P; NETO, C. F de O; CASTRO, D da S; FREITAS, J. M. N de; LOBATO, A. K. da S; COSTA; R. C. L da - **Conteúdo Relativo de Água, Teor de Prolina e Carboidratos Solúveis Totais em Folhas de Duas Cultivares de Milho submetidas a Estresse Hídrico** - Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p.918-920, jul. 2007.

MAIA, A. J; PEREIRA, P. S; FROTA; R.D. G da; TÁVORA, F. J. F e BARROS; L .M. Efeito do estresse hídrico no crescimento de plantas de feijão de corda. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 2013.

MARTINEZ, C. A.; MORENO, U. Expresiones fisiológicas de resistencia a la sequia en dos variedades de papa sometidas a stress hidrico em condiciones de campo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, DF, v.4, n. 1, p.33-38, 1992.

MARIN, A. **Infl uência associada do estresse hídrico e do alumínio na germinação e crescimento inicial do guandu (Cajanus cajan(L.) Millsp.)**. 2003. 87p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal

MARUR, C.J. Fotossíntese e translocação de carboidratos em algodoeiros submetidos a déficit hídrico após a aplicação de cloreto de mepiquat. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Brasília, v.10,n.1,p.59-64,1998.

MATTOS, J. L. S.; GOMIDE, J. A.; HUAMAN, C. A. M. Crescimento de espécies do gênero *Brachiaria*, sob déficit hídrico, em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.746-754, 2005.

MATSUI, T.; SINGH, B. B. Roots characteristics in cowpea related to drought tolerance at the seedling stage. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v.39, n.1, p. 29-38, 2003

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

MATSUI, T.; SINGH, B. B. Roots characteristics in cowpea related to drought tolerance at the seedling stage. *Experimental Agriculture*, Cambridge, v. 39, n.1, p. 29-38, 2003.

MEDEIROS, R. B. de; FAVRETO, R; FERREIRA , O. C. L e SIEWERDT, L. Persistência de *Desmodium incanum* DC. ("pega-pega") em meio a cultivos agrícolas estabelecidos sobre campo nativo. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.12, n.1-2, p.37-44, 2006.

MENESES, C.H.S.G. *et al.* Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.10, n. 1/2, p. 1039-1072, 2006.

MISHRA, *et al.* Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. **Plant Science**, v.182, p.79-86, 2012.

MONKS, P.L. *et al.* Produção e qualidade de sementes de *Macroptilium lathyroides* (L.). Urb. sob diferentes espaçamentos e épocas de colheita. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.36, n.2, p.107-112, 2006.

MORAN, J.F., BECANA, M I. Iturbe-Ormaetxe, S. Frechilla, R.V. Klucas, P. Aparicio-Tejo, Drought induces oxidative stress in pea plants, **Planta** 194 (1994) 346–352.

MOREIRA, J.L.A. **Estudo taxonômico da sub tribo Phaseolinae Benth. (Leguminosae, Papilionoideae) no sudeste e centro-oeste do Brasil.** Universidade Estadual de Campinas, Brasil, Dissertação de Mestrado. 1997.

NABINGER, C. Manejo da desfolha. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 19., 2002, Piracicaba. **Inovações tecnológicas no manejo de pastagens: anais.** Piracicaba: ESALQ, 2002. p. 133-158. Editado por Aristeu Mendes Peixoto, José Carlos de Moura, Vidal Pedroso de Faria.

NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.23, p.12-18, 2001.

NOGUEIRA, R. J. M. C. *et al.* Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p.75-87, 2001.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; ALBUQUERQUE, M. B.; SILVA, E. C. da. **Aspectos ecofisiológicos da tolerância à seca em plantas da caatinga**. In: NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p.22-31. 2005.

OLIVIERA, M. A. A. Estudo Taxonômico do Gênero *Desmodium* Desv. (Leguminosae, Faboideae, Desmo-deae). **Iheringia Série Botânica**, Porto Alegre, v.31. p.37-104, 1993.

OLIVEIRA, J. C. P.; DUTRA, G. M.; MORAES, C. O. C. **Alternativas forrageiras para sistemas de produção pecuária**. Bagé: Embrapa- CPPSUL, 2001. 33 p. (Embrapa-CPPSUL. Documentos. 29).

OLIVEIRA-NETO, C. F.; LOBATO, A. K. S. e COSTA, R. C. L. Teor de carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de feijão-caupi sob estresse hídrico. Congresso Nacional de Feijão-Caupi: Tecnologias para o agronegócio: anais / CONAC, **I Congresso Nacional de Feijão-Caupi**, VI Reunião Nacional de Feijão-Caupi, Teresina, PI, 2006. CD-ROM.

OLIVEIRA, L. M de; SILVA, J. N da; COELHO, C. C. R; NEVES M. G; SILVA, R. T. L. da e Oliveira, N. C. F. de. **Pigmentos fotossintetizantes, aminoácidos e Proteínas em plantas jovens de graviola submetida ao Déficit hídrico**. Agroecossistemas, v.5, n. 1, p.39-44, 2013.

O'NEILL, P.M.; SHANAHAN, J.F.; SCHEPERS, J.S. Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. **Crop**

Science, Madison, v.46, n. 2, p.681-687, 2006.

PAGTER, M.; BRAGATO, G.; BRIX, H. Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. **Aquatic Botany**, v.81, p.285-299, 2005.

PAIVA, A. S. et al. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.25, n.1, p. 161-169, 2005.

PAIVA, A. S. de. **Disponibilidade hídrica na germinação de sementes e no crescimento de plântulas da leguminosa forrageira *Macrotyloma axillare* (E. Mey) Verdc. cv Java**. 2007. 85f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP. 2007.

PILLAR, V.P.de; MÜLLER, S. C; CASTILHOS, Z. M de SOUZA, JACQUES, A. V. A. Campos sulinos. Conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília. MMA, 2009. 403p.

PIMENTEL, C.; PEREZ, A. J. L. C. Estabelecimento de parâmetros para avaliação da tolerância à seca, em genótipos de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n. 1, p.31-39, 1999.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropédica: Rio de Janeiro: Edur, 2004.

PINTO, C. M. *et al.* Crescimento, distribuição do sistema radicular em amendoim, gergelim e mamona a ciclos de deficiência hídrica. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 39, n. 03, p.429-436, 2008.

PRIMVESI, A. **Manejo Ecológico de Pastagens Tropicais e Subtropicais**. Ed. Nobel, São Paulo. 1999.

QUEIROZ, C. G. S; GARCIA Q. S e FILHO, J. P. L. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídiosde membrana em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse

hídrico e após reidratação. **Brazilian Journal Plant Physiologiae.**, v.14, n.1, p: 59-63, 2002

RAMOS, K.M.O., FELFILI, J.M., FAGG, C.W., SOUSA-SILVA, J.C., FRANCO, A.C., 2004. Desenvolvimento inicial e repartição de biomassa de *Amburana cearensis* (Allemao) A.C. Smith, em diferentes condições de sombreamento. *Acta bot. Brás.* v.18 n.2 p.351-358.

RAMOS. K. SAIRAM, P.S. DESHMUKH, D.C. SAXENA, Increased antioxidant activity under elevated temperatures: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes, **Biology Plantarum.** p. 245–251, 2000.

RASSINI, J.B.; LEME, E.J.A. Water management for establishment of alfalfa (*Medicago sativa*). In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONFERENCE, 19., 2001, Piracicaba. **Proceedings.** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários "Luiz de Queiroz", 2001. p.591

REIS, M. G. F.; FONTAN, I. C. I.; MONTE, M. A.; GOMES, A. N.; OLIVEIRA, C. H. R. Crescimento de raízes e da parte aérea de clones de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e de *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus* spp submetidos a dois regimes de irrigação no campo. **Revista Árvore**, v. 30, n. 6, p. 921-931, 2006.

RODRIGUES, R. R; PIZETTA, S. C; HOTT, M de; REIS E. F dos e Graças, T. A das. Desenvolvimento inicial de brócolis em diferentes Disponibilidades hídricas. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p.2013.

RODRIGUEZ, E. S; WILHELMI M. M. R; LUIS M; CERVILLA, B. B., JUAN J. R, ROSALES, M. A; ROMERO, L; RUIZ J. M. - Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants **Plant Science.** 2010. p.30–40.

SAINT PIERRE, C.; CROSSA, J. L.; BONNETT, D.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; REYNOLDS, M. Phenotyping transgenic wheat for drought resistance. **Journal**

Experimental Botany, v.63, p.1799-1808, 2012.

SANT' ANNA, H. L. S. **Aspectos fisiológicos de variedades de citros submetidas à deficiência hídrica progressiva**. 2009. 84p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2009.

SANTIAGO, A. M. P. **Aspectos do crescimento do sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em função da disponibilidade de água no solo**. 2000. 64 f. Dissertação de mestrado em Botânica-UFRPE, Recife.

SANTOS, A.M.; ROSA, L.M.G.; NABINGER, C; FRANKE,L.B; ABREU,JB de influência da orientação foliar e da disponibilidade hídrica na interceptação da radiação solar e no teor de clorofila da folha em *Macroptilum lathyroides* (L.) Urban , **Rev. Univ. Rural**, Sér. Ci. da Vida, RJ, EDUR. v.26, 2006.

SANTOS, C. F.; LIMA, G. P. P.; MORGADO, L. B. Tolerância e caracterização bioquímica em feijão-caupi submetido a estresse hídrico na pré-floração. *Naturalia*, Rio Claro, SP, v.33, p.34-44, 2010.

SCHURR, U. Growth physiology: approaches to a spatially and temporally varying problem. **Progress in Botany**, v.3, p.355-373, 1998

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J. BARBOSA, L. C. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum.Agronomy**, v. 24, n. 5, p.1363-1368, 2002.

SILVA, E. C. da; NOGUEIRA, R. J. M. C.; AZEVEDO NETO, A. D. de et AL Aspectos ecofisiológicos de dez espécies em uma área de caatinga **IHERINGIA**, Sér. Bot., Porto Alegre, v.59, n. 2, p.201-205. 2004.

SILVA, J. R. R. **Comportamento ecofisiológico de plantas jovens de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) sob dois regimes hídricos**. 2009. 40f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2009.

SILVA, A. M. de; SANTOS, C.M dos, SANTOS, V. H dose LIMA. R. A. F de. Pigmentos fotossintéticos e índice spad como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em canade-Açúcar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p.173-181. 2014.

SIRIPORNADULSIL, S; TRAINA, S; SAYRE. R. T. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. **Plant Cell**, Rockville, v.14, p.2837–2847, 2002.

SMIRNOFF, N., & CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, 28, p1057-1060, 1989.

SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGOA, A. M. M. A; SILVEIRA., J. A. G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**. v.51, p.45–56, 2004.

SOUZA e SILVA, S.M. e FREIRE FILHO, F.R., 1998. Proteínas de Feijão Caupi [*Vigna unguiculata*(L.)]: Caracterização e aplicação nutricional, **Embrapa, Teresina, Piauí**.

SOUZA, C. R.; SOARES, A. M.; REGINA, M. A. Trocas gasosas de mudas de videira, obtidas por dois porta-enxertos, submetidas à deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p.1221-1230, 2001.

SHULAEV, V. et al. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 132, p.199-208, 2008.

SCHWALBERT. R; MALDANER. J; AITA, M. F; AMARAL, G. A do e TAROUCO, A. K. Concentrações de sais do meio ms no cultivo in vitro de *Desmodium incanum*. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p.2014

SKERMAN, P. J.; CARMERON, D.G.; RIVEROS, F. **Leguminosas forrageras tropicales**. Colección FAO: Producción y protección vegetal. Roma, p.498-503. 1991.

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

TAJI, T. et al. Important roles of drought - and cold – inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant**, v. 29, p.417-426, 2002.

TORRES NETO. A. **Atributos fisiológicos e relações hídricas em genótipos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na fase juvenil**. 2005. 116p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro UENF, Campos dos Goytacazes RJ, 2005.

VASCONCELOS, W.A.; SANTOS, E.M.; ANDRADE, A.P.; BRUNO, R.L.A.; EDVAN, R.L. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de figo de pombo (*Macroptilium lathyroides*). *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, Chapadinho, v. 5, n. 1, p. 3-11, 2011.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Science**, v.151, p.59-66, 2000.

VIANA, MARIA. CELUTA M; QUEIROZ, CRISTINA G. S. DURÃES, FREDERICO O. M., SOUZA, ISABEL R. P., ALBUQUERQUE, PAULO E. P. e MACHADO, ROGÉRIO A. F. Alterações em Pigmentos e Danos em Membranas de Milho Submetido ao Déficit Hídrico. Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

VILLAGRA, P. E.; CAVAGNARO, J. B. Water stress effects on the seedling growth of *Prosopis argentea* and *Prosopis alata*. **Journal of Arid Environments**, v. 64, p. 390-400, 2006.

WYN JONES, R.G.; GORHAM, J. Osmoregulation. In: LANGE, D.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B.; ZIEGLER, H. *Encyclopedia of plant physiology: physiological plant*

ecology III – Response to chemical and biological environment. Berlin: Springer-Verlag, 1983. p.35-58.