

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

SUZY MARY LIMA DE FLORENTIN

**CARACTERIZAÇÃO DE FORRAGEIRAS QUANTO À TOLERÂNCIA AO  
ESTRESSE HÍDRICO**

Campo Grande – MS  
20 de Abril de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

SUZY MARY LIMA DE FLORENTIN

**CARACTERIZAÇÃO DE FORRAGEIRAS QUANTO À TOLERÂNCIA AO  
ESTRESSE HÍDRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Vegetal (Fisiologia Vegetal) da  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)  
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Valdemir Antônio Laura (UFMS/EMBRAPA)  
Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Soares de Arruda (UFMS/UFMT)

Campo Grande – MS  
20 de Abril de 2019

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar força, saúde e perseverança por esses dois anos em meio as dificuldades e alegrias.

À minha família, meus pais, José Carlos e Cleide, e irmãos Carlinhos e Maysa, e ao meu esposo, Diego, pelo apoio emocional e financeiro nessa jornada. É a eles que dedico este trabalho, fruto do esforço de todos que me auxiliaram neste caminho.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Valdemir e Prof. Dr. Rafael pelo apoio, incentivo e principalmente, aprendizado.

Aos meus amigos, tanto do mestrando quanto fora dele, pelo apoio quando precisei. Em especial, meu agradecimento à Caroline Stritar, Dianny Quadrado, Diego Rezende, Romário Oliveira pelo apoio e companheirismo durante o mestrado. Obrigada!

Também agradeço às estagiárias Damaris Elias Vera, Luzia Barcelos Deknes e Giovana Tetsuya pelo auxílio no fim dos experimentos.

E por fim, agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) pelo mestrado, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa, a Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA) pelo fornecimento do espaço e dos materiais e a UNIPASTO pelo apoio financeiro para execução dos experimentos.

# **CARACTERIZAÇÃO DE FORRAGEIRAS QUANTO À TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO**

SUZY MARY LIMA DE FLORENTIN

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE EM  
BIOLOGIA VEGETAL.

Aprovada em: 29 de abril de 2019.

---

Prof. Dr. Valdemir Antônio Laura  
Orientador (UFMS/Embrapa)

---

Prof. Dr. Rafael Soares de Arruda  
Co-Orientador (UFMS/UFMT)

---

Profa. Dra. Liana Baptista de Lima  
Membro (UFMS)

---

Dr. Marcelo Lattarulo Campos  
Membro (UFMT)

---

Dr. Mateus Figueiredo Santos  
Membro (Embrapa)

## SUMÁRIO

1. RESUMO
2. ABSTRACT
3. INTRODUÇÃO GERAL
4. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO SOB SUSPENSÃO DA IRRIGAÇÃO EM GENÓTIPOS DE *Megathyrsus maximus* (JACQ.) B.K.SIMON & S.W.L.JACOBS
5. AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Megathyrsus maximus* (JACQ.) B.K.SIMON & S.W.L.JACOBS AO ESTRESSE HÍDRICO COM POLIETILENO GLICOL 6000 (PEG-6000)
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

## RESUMO

A escassez de água é o principal fator abiótico responsável pela baixa produtividade, entretanto, as mudanças climáticas terão impactos para a sociedade e a biodiversidade causando a diminuição da produção agrícola, aumento dos vetores de diversas doenças e a extinção de animais e plantas. Neste trabalho, teve-se por objetivo avaliar duas cultivares e sete genótipos de *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs quanto a tolerância ao estresse hídrico, por meio de duas metodologias distintas: suspensão da irrigação por 18 dias consecutivos e, aplicação de Polietileno glicol 6000 (PEG-6000) por 12 dias consecutivos. No momento de supressão do fornecimento de água e aos dias múltiplos de três de interrupção da irrigação e aos dias múltiplos de quatro para solução com PEG-6000 foi estimado o teor de clorofila presente nas folhas, anotado o número de folhas e a altura do colmo. A taxa de fotossíntese, transpiração, condutância estomática e temperatura das folhas foram obtidos com um analisador de gás infravermelho e também, determinamos a biomassa da parte aérea após o estresse e após a reidratação. Os dados foram submetidos a ANOVA e foram padronizados pelo comando *decostand*. As cultivares BRS Tamani e Massai e os genótipos, PM19, PM20 e PM21 foram as mais tolerantes, altura e condutância estomática não foram significativas em relação ao tempo e a interação tempo cultivar. Os destaques são as cultivares Massai e BRS Tamani que, embora afetadas pelo estresse hídrico, obtiveram 100% de rebrota e conservaram todas as suas atividades metabólicas podendo inferir que estas realocaram seus nutrientes para as raízes a fim de aguardar melhores condições de crescimento. Na segunda metodologia, entretanto, destacou-se PM44, seguido pelas cultivares Massai e BRS Tamani.

Palavras-chave: Estresse Hídrico; *Panicum maximum*; Seca; Suspensão da Irrigação, PEG-6000.

## ABSTRACT

Water scarcity is the main abiotic factor responsible for low productivity; however, climate change will have impacts on society and biodiversity, causing a decrease in agricultural production, an increase in the vectors of various diseases and the extinction of animals and plants. In this work the aims to was evaluate two cultivars and seven genotypes of *Megathyrus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs for water stress tolerance, through two different methodologies: suspension of irrigation for 18 consecutive days and by applying Polyethylene Glycol 6000 (PEG-6000) for 12 consecutive days. At the moment of suppression of the water supply and the multiple days of three of interruption of the irrigation and the multiple days of four for solution with PEG-6000 the chlorophyll content in the leaves was estimated, noting the number of leaves and the height of the stem. The rate of photosynthesis, transpiration, stomatal conductance and leaf temperature were obtained with an infrared gas analyzer and also, we determined the shoot biomass after stress and after rehydration. The data were submitted to ANOVA and were standardized by the decostand command. The cultivars BRS Tamani and Massai and the genotypes, PM19, PM20 and PM21 were the most tolerant, height and stomatal conductance were not significant in relation to time and cultivar time interaction. The highlight are the cultivars *P. maximum* cv. Massai and *P. maximum* cv. BRS Tamani, which although affected by water stress, obtained 100% regrowth and retained all their metabolic activities, and it can be inferred that they relocated their nutrients to the roots in order to wait for better survival conditions. In the second methodology, however, PM44 was highlighted, followed by cultivars Massai and BRS Tamani.

**Keywords:** Water stress; *Panicum maximum*; Dry; Suspension of Irrigation, PEG-6000.

## INTRODUÇÃO GERAL

As plantas forrageiras tropicais pertencem a família botânica *Poaceae* e têm grande importância econômica devido sua utilização na produção agropecuária, além de seu destaque com os cultivos, base da alimentação mundial, como o arroz, trigo, milho, sorgo, dentre outras. Entretanto, as mudanças climáticas ocasionadas pela poluição e o aumento demográfico dos seres humanos tem causado drásticas alterações no clima, principalmente nos regimes hidrológicos e na temperatura média anual.

Por isso, tem-se discutido em painéis e conferências do clima, atitudes que os governos devem tomar para mitigar essas mudanças. O Painel Intergovernamental de Mudanças do Clima (IPCC, 2014) já alerta que muitas dessas alterações podem ser consideradas irreversíveis, principalmente no que tange a biodiversidade.

A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) é a empresa governamental que desenvolve melhoramento genético de cultivos para maximizar a produção em menores áreas com qualidade e segurança do ambiente, e com isso, possui um dos programas mais avançados do mundo para as regiões tropicais.

Neste trabalho procurou-se validar protocolos de avaliação de acessos, híbridos e cultivares para tolerância a seca, capazes de se adaptar às mudanças climáticas, às secas sazonais e alterações de regimes pluviométricos. Este trabalho de dissertação de Mestrado faz parte do Projeto da Embrapa Gado de Corte o qual visa desenvolver cultivares de *Panicum maximum* com elevada produção e qualidade, resistentes a *Bipolaris maydis* e cigarrinhas das pastagens, e com adaptação a pelo menos um estresse edafoclimático, que permitam uma maior diversificação, sustentabilidade e intensificação das pastagens.

Com isto, no primeiro capítulo avaliamos os nove genótipos de *P. maximum* sob suspensão da irrigação por 18 dias consecutivos em casa-de-vegetação sob condições controladas. No segundo capítulo utilizamos os mesmos nove genótipos, entretanto, em solução nutritiva com cultivo hidropônico adicionando Polietileno glicol 6000 (PEG-6000) para provocar o estresse hídrico controlado em casa-de-vegetação.

E ao final, como uma conclusão geral apresentamos um panorama da eficiência dos métodos para seleção de genótipos, acessos e híbridos para tolerância a seca a fim de permitir um protocolo de avaliação. Também apontamos possíveis itens a serem considerados nos próximos trabalhos.

**Avaliação do estresse hídrico sob suspensão da irrigação em genótipos de *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs**

FLORENTIN, SML; JANK, L; ARRUDA, R; LAURA, VA.

**Artigo a ser submetido à revista Crop Breeding and Applied Biotechnology**

# Avaliação do estresse hídrico sob suspensão da irrigação em genótipos de *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs

Suzy Florentin<sup>1</sup>, Liana Jank<sup>2</sup>, Rafael Arruda<sup>3</sup> and Valdemir Laura<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; suzy.mls@hotmail.com

<sup>2</sup> Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (Embrapa);

<sup>3</sup> Universidade Federal de Mato Grosso; rsarruda@ufmt.br

\* Correspondence: valdemir.laura@embrapa.br; Tel.: +55-67-3367-2079

**Resumo:** As escassezes de água agravada pelas mudanças climáticas terão impactos para a sociedade e a biodiversidade causando a diminuição da produção agrícola, aumento dos vetores de doenças e extinção de animais e plantas. Por isso, temos por objetivo avaliar nove genótipos de *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs para tolerância à seca mediante a suspensão da irrigação visando identificar os genótipos mais tolerantes ao estresse hídrico. No momento de supressão do fornecimento de água e aos dias múltiplos de três, ou seja, até o 18º dia de avaliação, foi estimado o teor de clorofila presente nas folhas, o número de folhas, altura do colmo e o grau de perda de folhas. E ainda, a taxa de fotossíntese, transpiração, condutância estomática e temperatura das folhas foram obtidos com um analisador de gás infravermelho. Também determinamos a biomassa da parte aérea após o estresse e após a reidratação das plantas pela irrigação. Os dados foram submetidos a Anova e teste de Tukey (5%). As cultivares BRS Tamani e Massai e os genótipos PM19, PM20 e PM21 foram as mais tolerantes, apenas altura e condutância estomática não foram significativos em relação ao tempo e a interação tempo x genótipo.

**Palavras-chave:** *Panicum maximum*; Tolerância ao estresse; Seca.

---

## 1. Introdução

O Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) [1] mostrou que poderá ocorrer um aumento na concentração global de CO<sub>2</sub> atmosférico podendo chegar a 720 µmol mol<sup>-1</sup> o que poderá causar um aumento da temperatura de até 3°C, e terá como consequência direta mudanças nos regimes hidrológicos [2, 3]. A escassez de água é o principal fator abiótico responsável pela baixa produtividade e baixo crescimento vegetal e é a causa mais comum de escassez severa de alimentos no mundo [4]. Essa escassez ainda pode ser muito mais severa em função de mudanças climáticas.

As mudanças climáticas terão impactos para a sociedade e na biodiversidade causando, na América Latina a diminuição da produção agrícola, aumento dos vetores de diversas doenças e a extinção de animais e plantas devido a longos períodos de estiagem e a mudança nos regimes hídricos [5, 6]. Com isto, é esperado, no futuro, um cenário de clima mais extremo com secas, inundações e ondas de calor mais frequentes. Estas alterações no clima irão causar impactos negativos na produtividade agropecuária e na qualidade de vida humana, uma vez que a combinação de vários estresses às plantas será maior que o previsto inicialmente [3, 7].

O estresse é definido como “um desvio de forma significativa das condições normais para a vida da planta, o que pode originar mudanças e respostas aos níveis do organismo” [8], e Lambers *et al.* [9] o definem como “uma mudança nos fatores ambientais que reduzem a taxa dos processos fisiológicos”.

É por isso que as plantas podem responder ao estresse de diversas maneiras, variando de segundos a dias, o que pode resultar no declínio do crescimento e desenvolvimento. Esse declínio levará a aclimação, na qual a planta se ajustará as modificações ambientais a fim de sobreviver, demonstrando então sua tolerância ao estresse. É diferente da adaptação, pois esta é considerada em escala evolutiva por causar mudanças genéticas [9]. Larcher [10] explica que esse ajuste depende das plantas e entre os

mais comuns está a diminuição da lâmina foliar, controle da abertura estomática, aumento de solutos nas folhas para impedir a perda de água para o ambiente, diminuição do número de folhas, dentre outras.

*Megathyrus maximus* é uma *Poaceae* também conhecida pelo seu sinônimo *Panicum maximum* Jacq. [11], e é uma das gramíneas forrageiras mais recomendadas para os sistemas agropecuários em regiões tropicais e subtropicais devido a sua alta produtividade, qualidade e palatabilidade. Além disso, ocorre como pioneira de áreas desmatadas e nas margens de florestas, e devido sua alta adaptabilidade genética, possui mais de 12 cultivares registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) detém o banco de germoplasma com mais de 426 acessos [12, 13, 14]. A espécie é amplamente utilizada em áreas de pastagens no Brasil, sendo encontrados estudos com relação a tolerância a luminosidade e ao alagamento [13, 15], por exemplo, sendo identificadas cultivares de *M. maximus* tolerantes ao alagamento (cv. Massai e cv. Mombaça) e a 50% de diminuição de luminosidade, indicando uma ampla plasticidade. Por isso, nós temos por objetivo avaliar a tolerância à seca mediante a suspensão da irrigação em nove genótipos de *M. maximus* (acessos oriundos da África, híbridos e cultivares comerciais) em casa-de-vegetação, visando identificar os genótipos mais tolerantes ao estresse hídrico.

O método de suspensão da irrigação é indicado para determinar tolerância ao estresse hídrico porque simula as condições do ambiente, porém em ambiente controlado, sem a influência das intempéries garantindo uma avaliação mais precisa [16, 17]. A nossa hipótese é que as variáveis altura, número de folhas, índice SPAD de clorofila (clorofilômetro), dados fisiológicos (fotossíntese, transpiração, condutância estomática e temperatura foliar) serão diferentemente afetados pelo tempo de suspensão da irrigação, e poderão ser identificados os genótipos de *M. maximus* mais tolerantes ao estresse hídrico.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1 Local de Estudo e Delineamento Amostral*

O experimento foi realizado em casa-de-vegetação na Embrapa Gado de Corte (20°27'04" S e 54°42'57" W), com controle de temperatura máxima diária (33°C ± 2°C) e de umidade relativa mínima (35% ± 1%). O delineamento experimental foi em esquema fatorial de nove genótipos x sete níveis de estresse hídrico a partir do tempo de suspensão da irrigação individual (zero, três, seis, nove, 12, 15 e 18 dias), com quatro repetições e parcelas de três plantas por vaso, com irrigação e identificação individual. O vaso utilizado era de 15,0 cm de altura, com capacidade de 0,7 L, com 8,0 cm x 8,0 cm de abertura superior, 6,5 cm x 6,5 cm de base inferior (Figura S1).

### *2.2. Preparação das Sementes e do Solo*

As sementes de cada um dos nove genótipos, oriundos do programa de Melhoramento Genético da Embrapa, foram germinadas no dia 16 de maio de 2018 (Tabela S1) em bandejas de poliestireno expandido, preenchidas com areia e, 10 dias após a emergência, selecionadas a partir da padronização do tamanho da parte aérea e sistema radicular, e então as plântulas, no dia 26 de maio de 2018 foram transplantadas para os vasos plásticos, com o solo na capacidade de campo, determinada pelo método do funil [33].

O solo latossolo vermelho foi seco ao ar, previamente peneirada em peneira de 2,0 mm de diâmetro e acondicionada nos vasos. Este solo foi adubado e sua acidez foi corrigida de acordo com o resultado

da análise de solo (Tabela S4). O tempo da irrigação diária, para o estabelecimento das plântulas, foi de 5 minutos, por gotejamento, em cada vaso, as 08:00 horas (Figura S2).

As plântulas, após o transplante para os vasos, foram semanalmente adubadas com 100 mL de solução nutritiva [34] até o início da suspensão da irrigação [6, 26, 29] (Tabela S2 e S3). O solo nos vasos foi mantido em 90% da capacidade de campo até 60 dias de estabelecimento, quando houve a supressão no fornecimento de água para os tratamentos com estresse hídrico a partir de sorteio aleatório dos vasos. O solo nos vasos sem o estresse hídrico foi mantido durante todo o período em 90% da capacidade de campo [35].

### 2.3. Avaliação das Plantas sob Estresse Hídrico

No momento de supressão do fornecimento de água e aos dias múltiplos de três, ou seja, aos dias zero (controle), três, seis, nove, 12, 15 e 18 dias, foi estimado o teor de clorofila presente nas folhas com um clorofilômetro (SPAD-502 - *Soil Plant Analysis Development*), e avaliados o número de folhas (NF) e altura do colmo (AC).

Também avaliamos a taxa de fotossíntese (A), transpiração (E), condutância estomática (gS) e temperatura das folhas (T) obtidos com um analisador de gás infravermelho (*Infra Red Gas Analyser* – IRGA, LICOR – 6400) mensuradas no período de 09:30 às 12:00 h, com fluxo luminoso fotossintético a 1000  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e 400  $\mu\text{mol}$  de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) até os 15 dias de tratamento de suspensão da irrigação [6].

A determinação da biomassa seca da parte aérea foi realizada cortando-se as plantas rente ao solo. O material fresco foi acondicionado em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada de ar, por 72 horas, a 65°C até atingir o peso constante [26, 30]. Para avaliação da rebrota, reestabelecemos a irrigação, o que Freitas [6] denomina reidratação, da parte radicular após a remoção da parte aérea. Após o período de 23 dias, determinamos novamente a biomassa seca da parte aérea produzida após a reidratação (biomassa da rebrota) (Tabela S5).

### 2.4. Análise dos Dados

Nós construímos modelos de ANOVA para identificar as diferenças médias significativas para cada variável escolhida para representar o estresse hídrico. Essas variáveis foram consideradas todas como resposta em nossos modelos. A ANOVA foi escolhida para a modelagem pois o desenho experimental foi relativamente simplificado no controle das variáveis de interesse, e principalmente pela quantidade de repetições para garantir graus de liberdade para controlar possíveis erros do tipo I (falso positivo em relação à hipótese nula) e erros do tipo II (falso negativo em relação à hipótese nula).

Todas as variáveis resposta foram padronizadas para média zero e variância unitária com a função *decostand* (método “standardize”) pelo pacote *vegan* [36]. Para a ANOVA nós usamos a função *aov* do pacote “stats” básico do R [37]. Todas as análises e gráficos (função *ggplot*, pacote *ggplot2*) [37] foram feitos em ambiente R [38].

## 3. Resultados

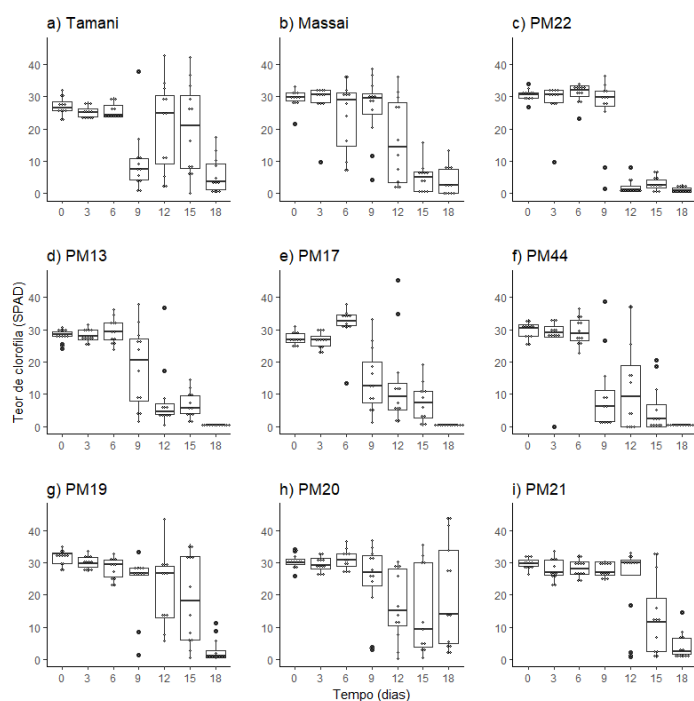
Todos os sete genótipos e as duas cultivares avaliadas apresentaram sintomas severos de estresse com a utilização de diversos mecanismos para retardar a senescência e morte celular. Os resultados corroboram a nossa hipótese, sendo possível constatar que o estresse hídrico influenciou diretamente os parâmetros fisiológicos avaliados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Probabilidades de significância associadas às variáveis fisiológicas em função dos genótipos e do tempo de estresse.

| Variáveis                   | Fonte de variação | gL  | F       | P                    |     |
|-----------------------------|-------------------|-----|---------|----------------------|-----|
| Teor de Clorofila (SPAD)    | Genótipo          | 8   | 10.53   | 5.19e <sup>-14</sup> | *** |
|                             | Tempo             | 6   | 171.67  | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Genótipo x Tempo  | 48  | 4.67    | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Resíduo           | 693 |         |                      |     |
| Fotossíntese                | Genótipo          | 8   | 8.94    | 4.09e <sup>-10</sup> | *** |
|                             | Tempo             | 5   | 101.24  | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Genótipo x Tempo  | 40  | 1.92    | 0.002                | **  |
|                             | Resíduo           | 162 |         |                      |     |
| Transpiração                | Genótipo          | 8   | 11.04   | 2.21e <sup>-12</sup> | *** |
|                             | Tempo             | 5   | 88.80   | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Genótipo x Tempo  | 40  | 2.11    | < 0.001              | *** |
|                             | Resíduo           | 162 |         |                      |     |
| Temperatura foliar          | Genótipo          | 8   | 30.16   | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Tempo             | 5   | 1550.66 | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Genótipo x Tempo  | 40  | 16.26   | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Resíduo           | 162 |         |                      |     |
| Condutância estomática      | Genótipo          | 8   | 2.01    | 0.039                | *   |
|                             | Tempo             | 5   | 5.58    | 9.11e <sup>-05</sup> | *** |
|                             | Genótipo x Tempo  | 40  | 1.02    | 0.437                | ns  |
|                             | Resíduo           | 162 |         |                      |     |
| Altura do colmo             | Genótipo          | 8   | 101.46  | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Tempo             | 6   | 0.40    | 0.88                 | ns  |
|                             | Genótipo x Tempo  | 48  | 0.63    | 0.98                 | ns  |
|                             | Resíduo           | 680 |         |                      |     |
| Número de Folhas            | Genótipo          | 8   | 20.43   | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Tempo             | 6   | 124.41  | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Genótipo x Tempo  | 48  | 4.56    | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Resíduo           | 680 |         |                      |     |
| Biomassa seca após Estresse | Genótipo          | 8   | 25.76   | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Tempo             | 6   | 9.55    | 4.21e <sup>-10</sup> | *** |
|                             | Genótipo x Tempo  | 48  | 1.75    | 0.002                | **  |
|                             | Resíduo           | 692 |         |                      |     |
| Biomassa seca da Rebrotada  | Genótipo          | 8   | 28.57   | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Tempo             | 6   | 9.80    | 2.37e <sup>-10</sup> | *** |
|                             | Genótipo x Tempo  | 48  | 12.77   | < 2e <sup>-16</sup>  | *** |
|                             | Resíduo           | 645 |         |                      |     |

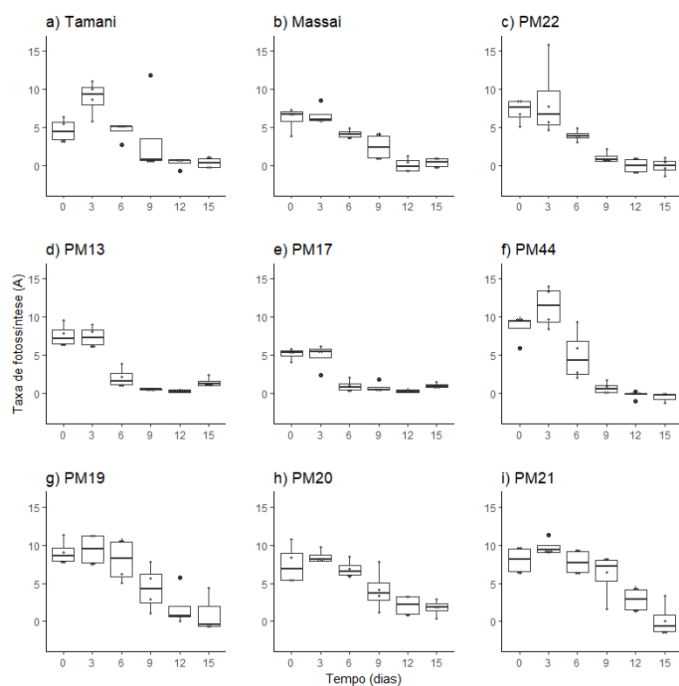
Legenda: Valor do P: \*\*\*< 0.001 / \*\*< 0.01 / \*< 0.05 / ns- não significativo.

O teor de clorofila estimado a partir do índice SPAD (Tabela 1) foi significativo para todos os genótipos avaliados, entretanto, PM22, PM13, PM17 e PM44 obtiveram índices próximos a zero aos 18 dias de estresse consecutivos (Figura 1), enquanto que o PM20 aos 18 dias foi o genótipo com maior índice; a cv. Massai e o cv. BRS Tamani, PM19 e PM21 também apresentaram os teores mais elevados aos 18 dias inferindo-se que o aparelho fotossintético ainda estava ativo e que o período de 18 dias não foi suficiente para atingir o estresse severo, ou seja, o Ponto de Murcha Permanente e a morte das células das folhas (Figura 1).



**Figura 1.** Estimativa do teor de clorofila ao longo do tempo de estresse por genótipo.

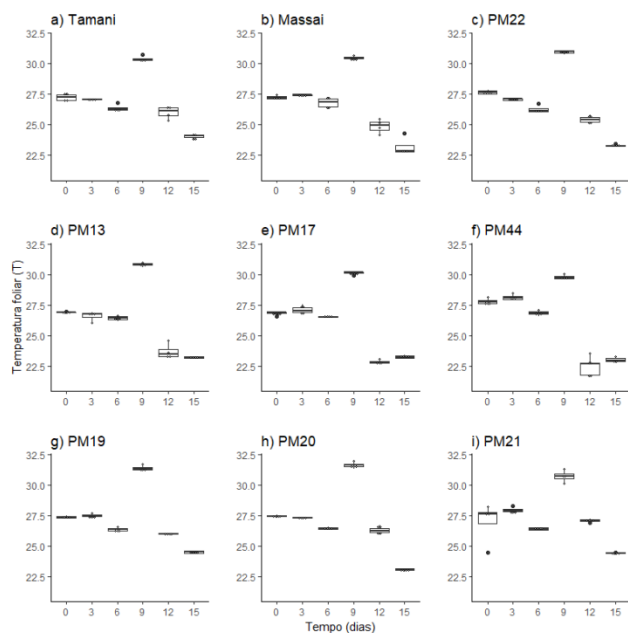
Houve diferenças entre os genótipos, o tempo de duração do estresse e sua interação para a taxa de fotossíntese, transpiração e temperatura foliar (Tabela 1), porém para condutância estomática, houve diferenças apenas entre os genótipos e o tempo. A taxa de fotossíntese, aos nove dias de estresse, aproximou-se de zero para a maioria dos genótipos (Figura 2), exceto para PM19, PM20 e PM21.



**Figura 2.** Taxa de Fotossíntese ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) ao longo do tempo de estresse por genótipo.

A temperatura foliar é apontada como um bom indicador de estresse hídrico uma vez que tende a aumentar quando a planta detecta o estresse. Percebe-se que aos nove dias da suspensão da irrigação

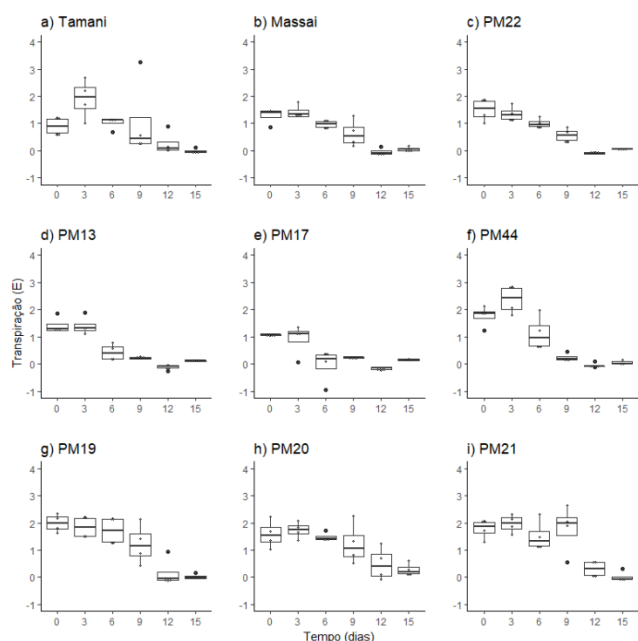
consecutivos os genótipos demonstraram resposta ao estresse com o aumento da temperatura (Figura 3), superior a média máxima do ambiente (28°C) no período de desenvolvimento dos tratamentos (obtido a partir do IRGA-6400 e no Climatempo [18]) e a partir daí buscaram outras formas de contornar a escassez de água, economizando-a, bem como os nutrientes e energia, diminuindo suas atividades metabólicas e o protegendo o aparelho fotossintético, considerado então o marco do ajustamento ao estresse.



**Figura 3.** Temperatura foliar (°C) ao longo do tempo de estresse por genótipo.

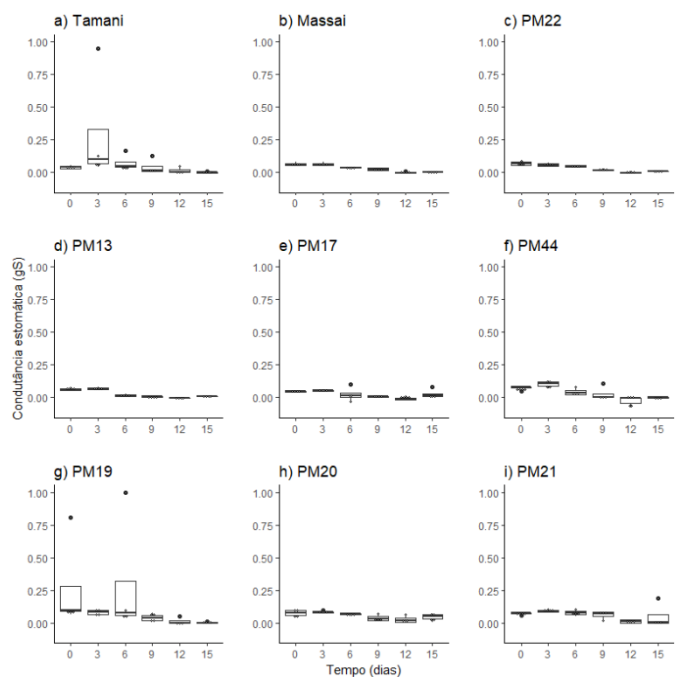
Conforme se observa na Figura 3, em comparação dos genótipos pelo tempo de suspensão da irrigação, PM19, PM20, PM21, BRS Tamani e Massai foram os que apresentaram maior temperatura foliar aos 15 dias de estresse bem como o teor de clorofila, o que indica presença de atividades metabólicas enquanto que PM22, PM13, PM17 e PM44 os valores estavam próximos de zero, ou seja, em ponto crítico de estresse, indicando serem sensíveis ao déficit hídrico.

A Figura 4 apresenta os dados da transpiração no período avaliado e ratifica as respostas obtidas para a taxa de fotossíntese, temperatura foliar e teor de clorofila, e ainda, demonstra o efeito da suspensão da irrigação nas plantas, com a queda da transpiração ao longo do tempo. Pode-se destacar que aos nove dias de suspensão de irrigação já é possível identificar genótipos mais sensíveis ao déficit hídrico, ou seja, PM13, PM17 e PM44 que já apresentaram taxas de transpiração próximas a zero.



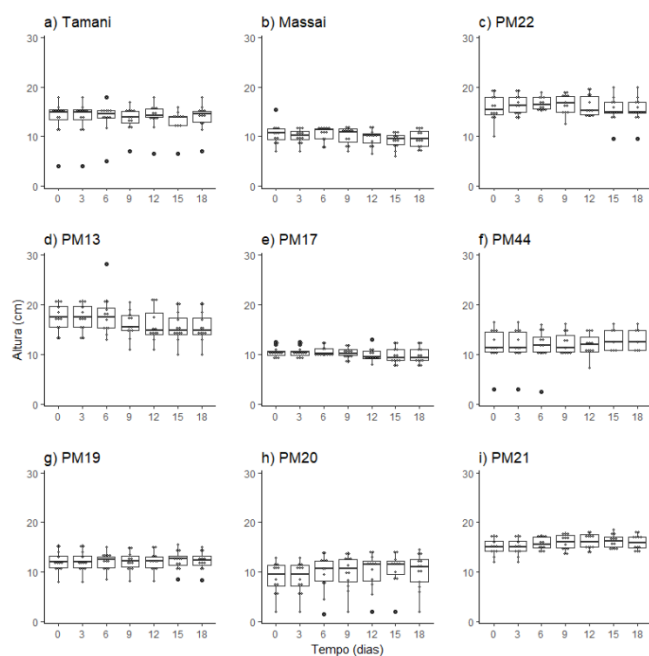
**Figura 4.** Transpiração (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) ao longo do tempo de estresse por genótipo.

A figura 5 apresenta a comparação entre as condutâncias estomáticas registradas por genótipo ao longo do tempo de avaliação do estresse, sendo que a interação entre esses dois fatores não foi significativa (Tabela 1) porém, os resultados por genótipo e com relação aos tempos de estresse foram significativos, o mesmo encontrado para o teor de clorofila, fotossíntese e transpiração.



**Figura 5.** Condutância estomática (mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) ao longo do tempo de estresse por genótipo.

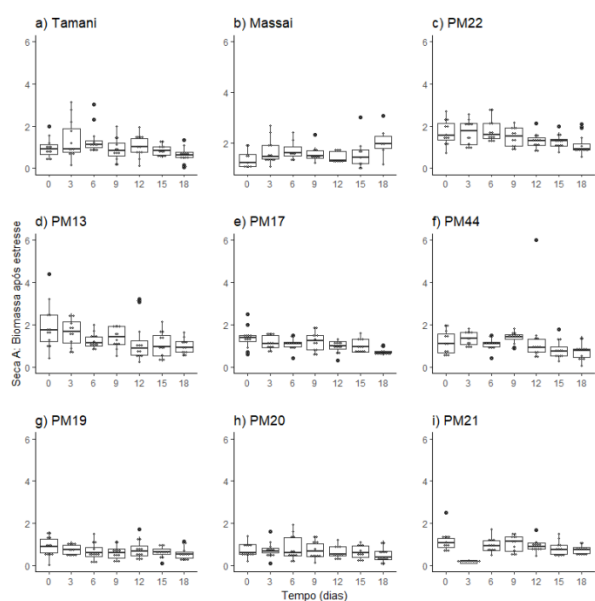
Em relação à altura do colmo, houve interação entre genótipos (Figura 6), porém não em relação ao tempo de suspensão da irrigação (Tabela 1). Isso foi distinto do número de folhas que foi afetado pelo tempo de suspensão da irrigação.



**Figura 6.** Altura do colmo (cm) ao longo do tempo de estresse por genótipo.

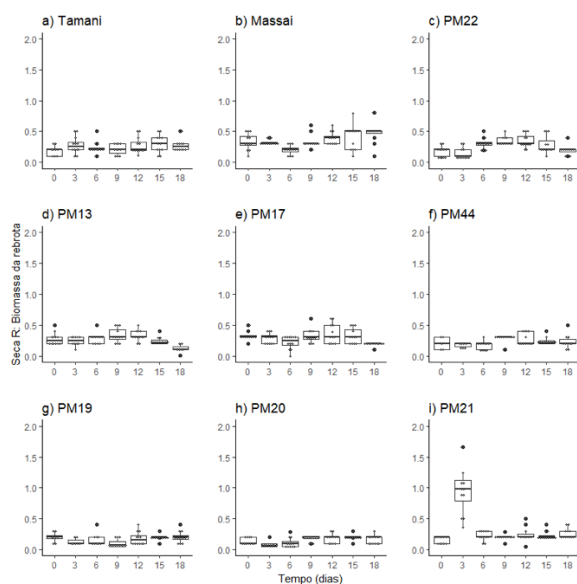
O número de folhas por planta principal (desconsiderando os demais perfilhos) foi significativo e acompanhou o déficit hídrico, bem como a diminuição do teor de clorofila e demais taxas fisiológicas. Isto acontece devido ao enrolamento foliar, que foi observado e é um mecanismo utilizado para reduzir a perda de água para o ambiente.

A biomassa seca da parte aérea foi obtida após a suspensão da irrigação (Figura 7), variou significativamente entre os genótipos, entre o tempo de suspensão de irrigação e sua interação (Tabela 1).



**Figura 7.** Produção de Biomassa Seca (g) ao longo do tempo de estresse por genótipo.

Houve ainda, variação na produção de biomassa seca de rebrota, após 23 dias do reestabelecimento da irrigação (Figura 8), porém, os resultados foram significativos apenas para os genótipos. Entretanto, cv. Massai e PM19 obtiveram produção de biomassa seca de rebrota após o estresse de 18 dias maiores do que a testemunha (sem estresse) e estresse de três dias, por exemplo, o que pode ser explicado como um fator de tolerância desses genótipos aos períodos sem água. Embora não tenha ocorrido diferenças na sobrevivência das plantas, pois, a rebrota foi de 100% em seis genótipos, quando restabeleceu-se a irrigação aos 18 dias de suspensão da irrigação, PM44, PM22 e PM13 foram os mais sensíveis ao estresse e obtiveram menor taxa de rebrota quando comparadas.



**Figura 8.** Produção de Biomassa seca (g) da rebrota após suspensão do estresse por diferentes períodos de estresse por genótipo.

Por isso, comparando-se as Figuras 7 e 8 percebemos que os genótipos foram afetados significativamente pelo tempo de suspensão de irrigação, contudo, conseguiram sobreviver e retomar o crescimento após cessar o estresse, ou seja, toleraram o estresse, sendo que cv. Massai, BRS Tamani, PM19, PM20 e PM21 podem ser considerados os mais aptos em suportar as condições de seca, aqui simuladas.

#### 4. Discussão

O teor de clorofila nas folhas está diretamente relacionado a fotossíntese, pois a fotossíntese é o processo pelo qual os organismos autótrofos fixam o  $\text{CO}_2$  com a utilização de energia proveniente da luz solar, sendo o  $\text{O}_2$  o resíduo liberado juntamente com a síntese de carboidratos, fonte de energia para os autótrofos [09, 10]. Nas plantas, de modo geral, 40% de sua biomassa seca é constituída por carbono fixado diretamente da fotossíntese, processo que permitiu a vida na terra conforme a conhecemos [9, 19].

Em genótipos de algodão (*Gossypium hirsutum* (L.)) sensíveis à seca, a taxa de fotossíntese líquida caiu enquanto que a temperatura foliar aumentou e ainda, a Rubisco (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase) mostrou menor atividade em comparação com as tolerantes a seca, testadas nas mesmas

condições [3], reduzindo ainda mais a fixação de CO<sub>2</sub> atmosférico. Em *Lippia alba* o teor estimado de clorofila obtido pelo clorofilômetro (Índice SPAD), aos 15 dias de estresse não diferiu do controle [6]. O mesmo não ocorreu em nossos dados pois, os teores de clorofila em nosso experimento foram significativos tanto para os genótipos quanto em relação ao tempo de tratamento, sendo que destes, PM20 foi o genótipo com maior índice, seguido pela cv. Massai, cv. BRS Tamani, PM19 e PM21 aos 18 dias consecutivos de suspensão da irrigação.

Freitas [6] avaliando *Lippia alba* em zero, cinco, dez e 15 dias de suspensão do fornecimento de água, percebeu que o regime que mais a afetou foi o de 15 dias, enquanto que para nós, foi aos 18 dias; porém, a maior temperatura foliar foi registrada aos nove dias sendo que, com *L. alba*, esse registro ocorreu aos 15 dias. O estresse hídrico em *L. alba* também causou redução na taxa de fotossíntese, transpiração e condutância estomática ocasionando uma queda na média de quase cinco vezes no período de 15 dias em relação ao controle [6].

Com a diminuição do teor de clorofila, pigmento responsável pela captação de luz solar, a taxa de fotossíntese também decai e, por conseguinte, a taxa de transpiração [9, 10]. Contudo, Araújo *et al.* [19] avaliando três genótipos de capim-elefante não perceberam a diminuição da condutância estomática e da transpiração devido a indisponibilidade hídrica, porém, a taxa fotossintética foi mais elevada em comparação aos nove genótipos de *M. maximus* por nós avaliados, o que pode ser explicado, em nosso ensaio, pelo controle de temperatura e umidade bem como pela diminuição da radiação solar que adentra a casa-de-vegetação.

A taxa de transpiração (Figura 4) está relacionada diretamente com o balanço hídrico das plantas, cujo conceito foi proposto por Montfort (1922) e Maximov (1929), definido como a relação entre a quantidade de água absorvida pelas raízes e a taxa de água perdida na transpiração. Isto está relacionado então, a todo o balanço homeostático da planta e seu déficit pode afetar direta ou indiretamente seu crescimento e desenvolvimento, podendo causar até a morte [10, 20].

A redução da transpiração ocorre como uma estratégia de economizar água, sendo o fechamento estomático o principal, porém, há um custo metabólico, pois reduz a transpiração, diminuindo a capacidade de refrigeração da folha e aumentando a temperatura foliar bem como reduz as taxas fotossintéticas e, por conseguinte a produção de nutrientes e energia [10, 19]. Ahmed *et al.* [21] em estudo com a cevada (*Hordeum vulgare* L.) sob estresse hídrico relatam a diminuição do crescimento, do conteúdo de clorofila e da taxa fotossintética que, metabolicamente estão inter-relacionados.

No nosso experimento a condutância estomática de *M. maximus* foi afetada pelo estresse hídrico diferentemente do que foi relatado por Freitas [6] para *L. alba*. Em *M. maximus*, houve variação significativa da condutância estomática entre os genótipos, mas não entre os tratamentos, enquanto que em para *L. alba*, aos 15 dias de estresse consecutivos houve uma queda drástica em comparação ao controle. Winter [22] discute que a principal resposta das plantas à seca (estresse hídrico) é a mudança na abertura estomática visando controlar o fluxo de CO<sub>2</sub>, a temperatura foliar e a perda de água por evaporação para o ambiente, entretanto, isso não ocorreu nos genótipos de *M. maximus*, cuja mudança na condutância estomática embora significativa entre genótipos, não variou ao longo do período de estresse.

Sánchez *et al.* [23] avaliando *Arundo donax* L., uma planta de metabolismo C<sub>3</sub> e *Panicum virgatum*, uma C<sub>4</sub>, não constatarem diferença na taxa fotossintética de ambas, entretanto, foi encontrado queda na taxa de fotossíntese e condutância estomática, assim como em nosso trabalho (Figura 5), e, os teores de clorofila em *A. donax* não foram significativos. Isto difere de nossos dados pois o teor de clorofila foi

significativo ( $p > 0,05$ ) com exceção da interação genótipo pelo tempo para condutância estomática o que pode ajudar a explicar a tolerância ao estresse desses genótipos.

Seixas *et al.* [25] citam os experimentos de Mattos *et al.* [26], os quais avaliaram as características morfológicas, fisiológicas e produtivas de espécies de *Urochloa*, em que as taxas fotossintéticas de todas as espécies foram reduzidas, o mesmo encontrado em todos os genótipos de *M. maximus* por nós avaliados.

Nossos dados diferem dos estudos de Carlin & Santos [27] sobre indicadores fisiológicos de estresse em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), pois eles perceberam que o crescimento foi reduzido drasticamente, mesmo com a detecção do aumento de solutos nas células. Um destaque, entretanto, é que cv. Massai, cv. BRS Tamani, PM19, PM20 e PM21 produziram mais biomassa seca após a suspensão do estresse de 18 dias (rebrotam após o estresse) do que a testemunha e das plantas submetidas apenas a três dias de estresse, por exemplo.

Uma possível explicação é uma tolerância desses genótipos aos períodos sem água, com a ocorrência de ajustamento osmótico, conforme explicou Turner [28], que as plantas realocam nutrientes e solutos nas células para responder ao déficit hídrico conservando o turgor celular e por conseguinte, dos órgãos, como raízes e folhas.

Martins *et al.* [29] em um trabalho com leguminosas de potencial forrageiro, em suspensão de irrigação por 18 dias encontraram aumento do conteúdo de açúcares totais, prolina e extravasamento de eletrólitos, mecanismos descritos como compensadores de estresse [28] pois, impedem a perda de água para o ambiente economizando-a. Por isso, *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb, *Vigna luteola* Jacq e *Desmodium incanum* DC podem tolerar a restrição hídrica acumulando osmólitos, açúcares solúveis e prolina em raízes e folhas.

A suspensão da irrigação também afetou a biomassa seca uma vez que esta está diretamente relacionada à taxa de fotossíntese, mostrando a necessidade de produção de espécies menos sensíveis às mudanças climáticas [26, 30]. Porém, nos tratamentos realizados por Mattos *et al.* [26], considerando o fato de que a recuperação completa do estresse, em termos fisiológicos não tenha ocorrido, é possível inferir que as espécies de *Urochloa* (*sin. Brachiaria*) por eles estudadas, ao restabelecerem suas atividades fotossintéticas normais, foram hábeis em tolerar a falta de água no solo, e por isso, os vegetais possuem um ponto em que podem se reestabelecer completamente após sofrer um estresse hídrico. O mesmo pode ser considerado para os genótipos de *M. maximus* que após a suspensão do estresse rebrotaram 100% (Figura 9), com exceção do genótipo PM44, considerado um dos mais sensíveis, onde aproximadamente 20% das plantas não rebrotaram.

Para os três genótipos de capim elefante avaliados por Araújo *et al.* [19], a taxa fotossintética caiu a partir do quinto dia de suspensão da irrigação, o que corrobora com nossos dados, pois, há evidências de que o estresse hídrico danifica o metabolismo do mesófilo, sendo, muitas vezes, mais importante que a limitação de água no tecido vegetal [27]. Esse pode ter sido o caso do genótipo PM44, o qual apresentou menor rebrota após o estresse, mas, não houve danos nos demais genótipos avaliados, o que indica que podem ter realocado nutrientes orgânicos e minerais nas raízes para aguardar melhores condições de sobrevivência [10], justamente por as raízes serem os principais sensores de estresse hídrico [31].

Contudo, com a reidratação de *L. alba* por 24 horas, esta já apresentou recuperação das atividades fotossintéticas demonstrando sua rápida regulação estomática [6], assim como os genótipos aqui estudados. Sobre a reidratação, Blum & Tuberosa [32] expõem que o traço de sobrevivência das plantas à dissecação (ou desidratação), base do sucesso evolucionário, é a conservação do aparelho fotossintético, o qual em plantas de ressurreição é uma característica particularmente notável pois, recuperam-se após a reidratação, retornando muito rapidamente à fixação de CO<sub>2</sub> e demais atividades metabólicas.

## 5. Conclusões

De acordo com nossos resultados podemos identificar o genótipo PM44 como o mais sensível ao estresse hídrico, enquanto os outros genótipos demonstraram maior adaptação ao estresse sendo que, 18 dias de suspensão da irrigação foram suficientes para diferenciá-los em tolerantes e não tolerantes ao déficit hídrico. Destacam-se as cultivares Massai e BRS Tamani que, embora afetadas pelo estresse hídrico, obtiveram 100% de rebrota e conservaram todas as suas atividades metabólicas, o que nos permite inferir que estas plantas realocaram seus nutrientes para as raízes a fim de aguardar melhores condições de crescimento.

Quadro 1. Ordenação dos genótipos avaliados pelo grau de tolerância.

| Genótipo       | Classificação | Variável destaque       |
|----------------|---------------|-------------------------|
| cv. BRS Tamani | Tolerante     | SPAD, PA Seca, Rebrotas |
| cv. Massai     | Tolerante     | SPAD, PA Seca, Rebrotas |
| PM21           | Tolerante     | SPAD, PA Seca, Rebrotas |
| PM20           | Tolerante     | SPAD, PA Seca, Rebrotas |
| PM19           | Tolerante     | SPAD, PA Seca, Rebrotas |
| PM22           | Sensível      | PA Seca, Rebrotas       |
| PM17           | Sensível      | Rebrotas                |
| PM13           | Sensível      | Rebrotas                |
| PM44           | Sensível      | Rebrotas                |

Os genótipos destaque foram PM19, PM20 e PM21 que não apresentaram redução nos teores de clorofila após 18 dias de estresse e, portanto, sem danos ao aparelho fotossintético e nem atingiram o ponto de murcha permanente. Deste modo, podemos identificar os mais tolerantes e os mais sensíveis no período avaliado (Quadro 1). Entretanto acreditamos que um tempo maior de avaliação é necessário para garantir que a tolerância não foi somente em relação as condições avaliadas por nós. Concluímos ainda, que este método é eficiente em discriminar os genótipos tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico possibilitando uma fenotipagem rápida, eficiente e em larga escala.

**Contribuição dos autores:** Suzy Florentin, Liana Jank; Valdemir Laura e Rafael Arruda pela redação do artigo, Suzy Florentin e Rafael Arruda pelas análises estatísticas e elaboração dos gráficos; Valdemir Laura e Liana Jank pelo design experimental e métodos utilizados; Liana Jank pela doação das sementes utilizadas.

**Financiamento:** Este artigo recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e UNIPASTO.

**Agradecimentos:** Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PPGBV), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA) e a UNIPASTO pelo apoio financeiro, logístico e intelectual.

**Conflitos de Interesse:** "Os autores declaram não haver conflito de interesse."

## Referencias

1. IPCC. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. 2014. Available online: <<https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg2/>> (accessed on 30 Ago 2017).

2. Grandis, A.; Godoi, S.; Buckeridge, MS. (2010) Respostas fisiológicas de plantas amazônicas de regiões alagadas às mudanças climáticas globais. **Revista Brasileira de Botânica**, **33**, 1, 1-12, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042010000100002>.
3. Zandalinas, S.I.; Mittler, R.; Balfagón, D.; Arbona, V.; Gómez-Cadenas, A. (2018) Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, **162**, 01, 2-12, DOI: 10.1111/ppl.12540.
4. Baldoni, E.; Genga, A.; Cominelli, E. (2015) Plant MYB Transcription Factors: Their Role in Drought Response Mechanisms. **Int. J. Mol. Sci.**, **16**, 15811-15851, DOI: 10.3390/ijms160715811.
5. Maroun, M.R. Adaptação às Mudanças Climáticas: uma proposta de documento de Concepção de Projeto (DCP) no âmbito do mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL). Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 2007.
6. Freitas, J.C.E. (2018) Ecofisiologia em poliploides de *Lippia alba* sob diferentes regimes hídricos. Dissertação de Mestrado, Juiz de Fora, Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).
7. Ryan, R.G. (1991) Effects of Climate Change on Plant Respiration. **Ecological Applications**, **1**, 2, 157-167, DOI: <https://doi.org/10.2307/1941808>.
8. Seixas, A.A.; Gomes, V.M.; Serafim, V.F.; Viana, W.A. (2015) Déficit Hídrico em Plantas Forrageiras – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, **8**, 1-14;
9. Lambers, H.; Chapin III, E.S.; Pons, T.L. (2008) **Plant Physiological Ecology**. 2nd ed.; Springer, 591 p., ISBN 978-0-387-78341-3.
10. Larcher, W. (2006) **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 550 p., ISBN 85-86552-03-8.
11. Filgueiras, T.S. (2015) *Megathyrsus* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Available online: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB86869>>. (accessed on 05 Jul 2018).
12. Valentim, J.F.; Carneiro, J. da C.; Moreira, P.; Jank, L.; Sales, M.F.L. (2001) Capim Massai (*Panicum maximum* Jacq.): nova forrageira para a diversificação de pastagens no Acre. **Circular Técnica**, 1 ed., n. 41, Rio Branco, 16 p., Rio Branco, AC, Outubro, ISSN 0100-9915.
13. Victor, D.M.; Jank, L.; Lempp, B.; Simeão, R.M.; Resende, M.D.V. de; Gonçalves, M.C. (2015) Selection of full-sib families of *Panicum maximum* Jacq under low light conditions. **Revista Ceres**, **62**, 2, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201562020010>.
14. Caldeira, R.R. (2016) Período de crescimento e idade de corte sobre a produção e a qualidade do capim *Panicum maximum* cv. Massai. Dissertação de Mestrado, Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 58 p.
15. Silva, A.S.; Laura, V.A.; Jank, L. (2009) Soil flood tolerance of seven genotypes of *Panicum maximum* Jacq. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, **52**, 6, p. 1341-1348, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000600004>.
16. Blum, A. (2011) Drought resistance – is it really a complex trait? **Functional Plant Biology**, **38**, 753–757, DOI: <https://doi.org/10.1071/FP11101>.
17. Blum, A. (2017) Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant, Cell & Environment**, **40**, p 1-7, DOI: 10.1111/pce.12800.
18. Climatempo. (2019) Climatologia Campo Grande em 2018.. Available on: <<https://www.climatempo.com.br/climatologia/212/campogrande-ms>> (accessed on 01 Feb 2019).
19. Kramer, P.J.; Boyer, J.S. (1995) **Water Relations of Plants and Soils**. 1 ed. Academic Press, 495 p.;
20. Araújo, S.A. do C.; Vasquez, H.M.; Campostrini, E.; Netto, A.T.; Deminicis, B.B.; Lima, E. da S. (2010) Características fotossintéticas de genótipos de capim-elefante anão (*Pennisetum purpureum* Schum.), em estresse hídrico. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, **32**, 1, 1-7, DOI: 10.4025/actascianimsci.v32i1.8961.
21. Ahmed, I.M.; Dai, H.; Zheng, W.; Cao, F.; Zhang, G.; Sun, D.; Wu, F. (2013) Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. **Plant. Physiol. Biochem.**, **63**, 49–60, DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.11.004.
22. Winter, E.J. (1976) **A água, o solo e a planta**. São Paulo, SP: E.P.U., 169 p.;

23. Sanchez, E.; Gil, S.; Azcón-Bieto, J.; Nogués, S. (2016) The response of *Arundo donax* L. (C3) and *Panicum virgatum* (C4) to different stresses. **Biomass and Bioenergy**, **85**, 335-345, DOI: 10.1016/j.biombioe.2015.12.021.
24. Kramer, P.J. (1988) Changing concepts regarding plant water relations. **Plant, Cell and environment**, **11**, 565-568, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1988.tb01796.x>.
25. Seixas, AA; Gomes, V.; Serafim, VF; Viana, WA. (2015) Déficit Hídrico em Plantas Forrageiras – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, **8**, 1-14, ISSN: 1679-7353.
26. Mattos, J.L.S.; Gomide, J.A.; Huaman, C.A.M. (2005) Crescimento de espécies do gênero *Brachiaria*, sob déficit hídrico, em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, **31**, 03, p. 746-754, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982005000300005>.
27. Carlin, S.D.; Santos, D.M.M. (2009) Indicadores fisiológicos da interação entre déficit hídrico e acidez do solo em cana-de-açúcar. **Pesq. agropec. bras.**, **44**, 9, 1106-1113, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009000900006>.
28. Turner, N.C. (2018) Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress. **Journal of Experimental Botany**, **69**, 13, 3223–3233, DOI: 10.1093/jxb/ery181.
29. Martins, A.C.; Larré, C.F.; Bortolini, F.; Borella, J.; Eichholz, R.; Delias, D.; Amarante, L. (2018) Tolerância ao déficit hídrico: adaptação diferencial entre espécies forrageiras. **Iheringia**, Série Botânica, **73**, 3, 228-239.
30. Pezzopane, C.G.; Santos, P.M.; Cruz, P.G.; Altoé, J.; Ribeiro, F.A.; Valle, C.B. (2014) Estresse por deficiência hídrica em genótipos de *Brachiaria brizantha*. **Ciência Rural**, Online, **45**, 5, 871-876, DOI: 10.1590/0103-8478cr20130915.
31. Chaves, M.M. (1991) Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, **42**, 234, 1-16, DOI: 10.1093/jxb/42.1.1;
32. Blum, A.; Tuberosa, R. (2018) Dehydration survival of crop plants and its measurement. **Journal of Experimental Botany**, **69**, 5, 975–981, DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erx445>.
33. Luchese, E.B.; Favero, L.O.B.; Lenzi, E. (2001) **Fundamentos da química do solo**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 182 p.
34. Melo, H.C.; Castro, E.M.; Soares, A.; Melo, L.A., Alves, J.D. (2007) Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Revista Hoehnea**, **34**, 2, p. 145-153, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062007000200003>.
35. Oksanen, J.; Blanchet, F. G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlinn, D.; Minchin, P.R.; O'Hara, R. B.; Simpson, G.L.; Solymos, Stevens, P.M.H.H.; Szoecs, E.; Wagner, H. (2017) **vegan**: Community Ecology Package. R package version 2.4-4. Available online: <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>. (accessed on 20 Set 2018).
36. R Core Team. (2018) **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, Available online:<<https://www.R-project.org/>>. (accessed on 20 Oct 2018).
37. Wickham, H. (2009) **ggplot2**: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York,

## Material Suplementar

### Avaliação de sete genótipos e duas cultivares de *Megathyrsus maximus* ao estresse hídrico sob método tradicional

Suzy Florentin<sup>1</sup>, Liana Jank<sup>2</sup>, Rafael Arruda<sup>3</sup> and Valdemir Laura<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; suzy.mls@hotmail.com

<sup>2</sup> Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (Embrapa);

<sup>3</sup> Universidade Federal de Mato Grosso;

\* Correspondence: valdemir.laura@embrapa.br.

**Tabela S1.** Cronograma completo de desenvolvimento dos experimentos.

| Genótipos     | Descrição das sementes<br>Embrapa                        | Germinação<br>(I) | Germinação<br>(II) | Transplante | Início do<br>Estresse | Término do<br>Estresse e<br>Reidratação | Término da<br>Rebrota |
|---------------|----------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------|-----------------------|-----------------------------------------|-----------------------|
| BRS<br>Tamani | 07/04/2017 L10 P9                                        | 16/05/2018        |                    | 25/05/2018  | 20/07/2018            | 07/08/2018                              | 28/08/2018            |
| PM44          | (I) 2010; (II) 2013                                      | 16/05/2018        | 30/05/2018         | 08/06/2018  | 20/07/2018            | 07/08/2018                              | 28/08/2018            |
| Massai        | 27/04/2017 L13 P4                                        | 16/05/2018        |                    | 25/05/2018  | 20/07/2018            | 07/08/2018                              | 28/08/2018            |
| PM22          | 08/05/2013                                               | 16/05/2018        |                    | 25/05/2018  | 20/07/2018            | 07/08/2018                              | 28/08/2018            |
| PM13          | 19/04/2013                                               | 16/05/2018        |                    | 25/05/2018  | 20/07/2018            | 07/08/2018                              | 28/08/2018            |
| PM17          | 01/04/2011                                               | 16/05/2018        |                    | 25/05/2018  | 20/07/2018            | 07/08/2018                              | 28/08/2018            |
| PM20          | (I) 25/04/2017 L8 P8;<br>(II) 25/04/2017 L8 P8<br>Rep 02 | 16/05/2018        | 30/05/2018         | 08/06/2018  | 20/07/2018            | 07/08/2018                              | 28/08/2018            |
| PM21          | (I) 13/04/2017 L6 P1;<br>(II) 25/04/2017 L1 P1<br>Rep 01 | 16/05/2018        | 30/05/2018         | 08/06/2018  | 20/07/2018            | 07/08/2018                              | 28/08/2018            |

**Tabela S2.** Solução nutritiva para estabelecimento. Adaptado de Hoagland & Arnon, 1950.

| Quantidade | Diluição                                                                                                              | Reagente                                                                  | Nutriente                                                                |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 136,09g    | 1000 mL água destilada                                                                                                | $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>Fosfato de Potássio Monobásico                |                                                                          |
| 101,11g    | 66,07 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sulfato de amônio) + 74,55 g KCL (Cloreto de potássio) = 1000 mL água destilada | $\text{KNO}_3$<br>Nitrato de potássio                                     | Macro nutrientes –<br>Cálcio, Fósforo,<br>Ferro Potássio e<br>Nitrogênio |
| 236,16 g   | 1000 mL água destilada                                                                                                | $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$<br>Nitrato de Cálcio |                                                                          |
| 247,47 g   | 24,747 g x 100 mL água destilada                                                                                      | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$<br>Sulfato de Magnésio          |                                                                          |
| 1,5 mL     | Diluído diretamente na solução                                                                                        | Solução de Ferro quelatizado                                              |                                                                          |
| 2,86 g     | 150 mL água destilada                                                                                                 | $\text{H}_3\text{BO}_3$<br>Ácido bórico                                   |                                                                          |
| 1,81 g     | 150 mL água destilada                                                                                                 | $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$<br>Cloreto de Manganês          |                                                                          |
| 0,22 g     | 150 mL água destilada                                                                                                 | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$<br>Sulfato de Zinco             | Micronutrientes –<br>Boro, Cobre, Zinco,<br>Manganês, Sódio              |
| 0,08 g     | 150 mL água destilada                                                                                                 | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$<br>Sulfato de Cobre             |                                                                          |
| 0,26 g     | 0,18 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (molibdato de amônio) 150 mL água destilada                          | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Molibdato de Sódio    |                                                                          |

**Tabela S3.** Solução nutritiva aplicada para estabelecimento (100 mL por vaso a cada sete dias).

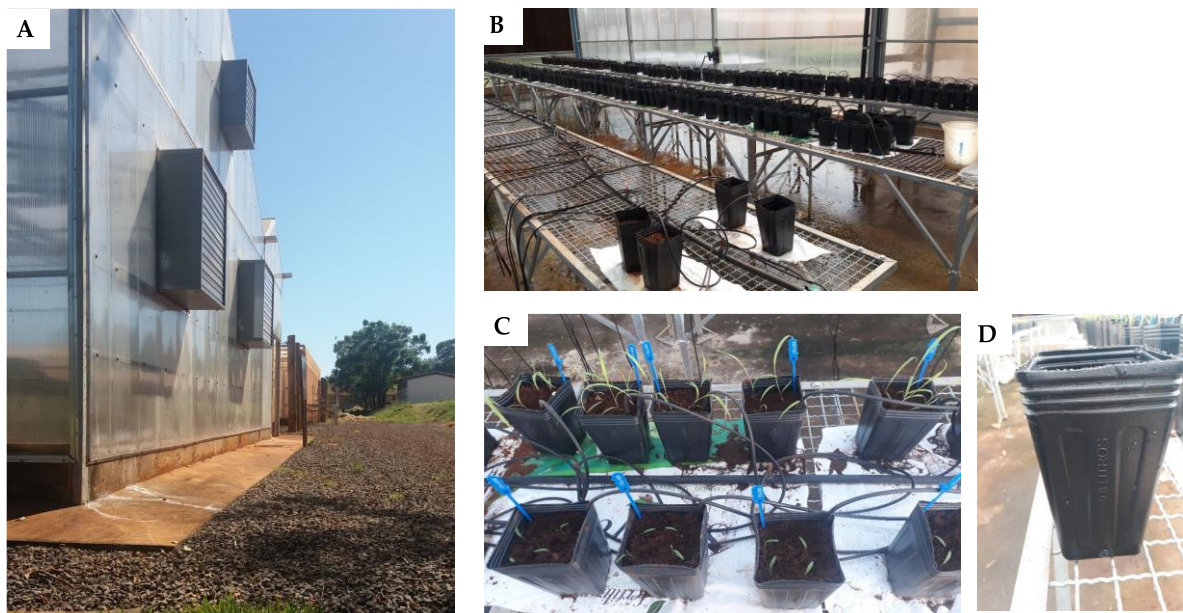
| Volume | Reagente                                                                  | Solução Resultante   |
|--------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 20 mL  | $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>Fosfato de Potássio Monobásico                |                      |
| 100 mL | $\text{KNO}_3$<br>Nitrato de potássio                                     |                      |
| 100 mL | $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$<br>Nitrato de Cálcio | 20 L de água tratada |
| 40 mL  | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$<br>Sulfato de Magnésio          |                      |
| 1,5 mL | Solução de Ferro quelatizado                                              |                      |
| 20 mL  | Micronutrientes                                                           |                      |

**Tabela S4.** Resultados da análise do solo usado nos experimentos. Laboratório de Análise de solos e consultoria LTDA/EMBRAPA, 14 de ago. de 2017.

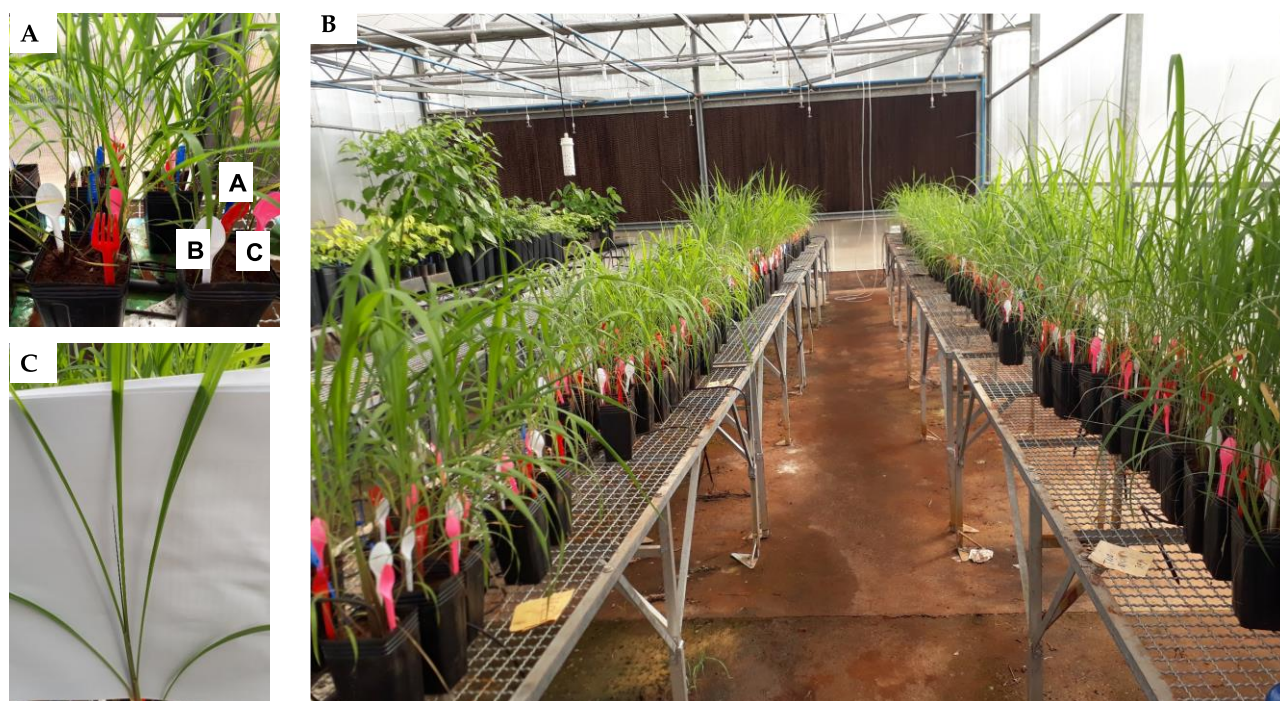
| Análise Química do Solo |                         |                         |                           |                            |                            |                            |                       |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|
| pH<br>água              | pH<br>CaCl <sub>2</sub> | P<br>mg/dm <sup>3</sup> | K<br>cmol/dm <sup>3</sup> | Ca<br>cmol/dm <sup>3</sup> | Mg<br>cmol/dm <sup>3</sup> | Al<br>cmol/dm <sup>3</sup> |                       |
| 4,79                    | 4,19                    | 0,60                    | 0,10                      | 1,00                       | 0,50                       | 0,39                       |                       |
| Relações                |                         |                         |                           |                            |                            |                            |                       |
| Ca/Mg                   |                         | Ca+Mg/K                 |                           | Ca/K                       |                            | Mg/K                       |                       |
| 2,00                    |                         | 15,00                   |                           | 10,00                      |                            | 5,00                       |                       |
| Micronutrientes         |                         |                         |                           |                            |                            |                            |                       |
| Fe mg/dm <sup>3</sup>   |                         | Zn mg/dm <sup>3</sup>   |                           | Cu mg/dm <sup>3</sup>      |                            | B mg/dm <sup>3</sup>       | Mn mg/dm <sup>3</sup> |
| 165,58                  |                         | 119,92                  |                           | 2,11                       |                            | 8,73                       | 0,16                  |
| Análise Física          |                         |                         |                           |                            |                            |                            |                       |
| Areia g/kg              |                         |                         | Silte g/kg                |                            | Argila g/kg                |                            |                       |
| 550                     |                         |                         | 120                       |                            | 330                        |                            |                       |

**Tabela S5.** Parâmetros biológicos e morfológicos analisados e equipamentos utilizados para a análise.

| Descritor morfológico   | Unidade de medida                                     | Equipamento                             |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Teor de clorofila       | µg.cm <sup>-2</sup>                                   | Clorofilômetro SPAD-502                 |
| Número de folhas        | Uni.                                                  | Contagem manual                         |
| Altura do colmo         | Cm                                                    | Régua                                   |
| Fotossíntese            | µmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>  | IRGA-6400                               |
| Condutância estomática  | mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>  | IRGA-6400                               |
| Intensidade luminosa    | µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>                  | IRGA-6400                               |
| Transpiração            | mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> | IRGA-6400                               |
| Temperatura foliar      | °C                                                    | IRGA-6400                               |
| Biomassa da parte aérea | G                                                     | Estufa de secagem e balança de precisão |



**Figura S1.A.** Casa-de-vegetação utilizada no experimento na Embrapa Gado de Corte. **Figura S1.B.** Esquema do arranjo espacial dos vasos com irrigação individual em casa-de-vegetação. **Figura S1.C.** Transplante e estabelecimento dos genótipos. **Figura S1.D.** Detalhe do vaso utilizado no experimento.



**Figura S2.A.** Demonstração da identificação das plântulas por vaso, sendo: A: vermelho, B: branco, C: rosa. **Figura S2.B.** Arranjo espacial dos genótipos estabelecidos em casa-de-vegetação. **Figura S2.C.** Esquema utilizado para contagem das folhas na planta principal do genótipo.

## **ARTIGO 2**

**Avaliação de Genótipos de *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs ao Estresse Hídrico com Polietileno Glicol 6000 (PEG-6000)**

FLORENTIN, SML; JANK, L; ARRUDA, R; LAURA, VA.

**Artigo a ser submetido à revista Journal of Plant Physiology**

# Avaliação de genótipos de *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs ao Estresse Hídrico com Polietileno Glicol 6000 (PEG-6000)

Suzy Florentin<sup>1</sup>, Liana Jank<sup>2</sup>, Rafael Arruda<sup>3</sup> and Valdemir Laura<sup>1,2,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul;

<sup>2</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA);

<sup>3</sup> Universidade Federal de Mato Grosso;

<sup>4</sup> Universidade Anhanguera Uniderp;

\* Correspondence: valdemir.laura@embrapa.br; Tel.: +55-67-3368-2079

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Drought

Compensation

Physiology

PEG-6000

## ABSTRACT

O estresse abiótico, em especial e mais comum, o estresse hídrico, é umas das principais causas da perda de produtividade no mundo e tem sido agravada pelas mudanças climáticas. Por isso, temos por objetivos avaliar nove genótipos de *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs do banco de germoplasma do programa de melhoramento genético da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) para tolerância à seca mediante Polietileno glicol 6000 (PEG-6000) visando identificar os mais tolerantes ao estresse hídrico. A nossa hipótese é de que frente as outras metodologias, esta será eficaz em ser uma rápida avaliação demonstrando que os genótipos responderão diferentemente ao estresse, sendo o Teor de Clorofila, Taxa de Fotossíntese, Transpiração, Condutância estomática, número de folhas, altura e biomassa seca após estresse e após reidratação variáveis que permitirão identificar os mais tolerantes ao estresse simulado. No momento de supressão do fornecimento de água e aplicação de solução nutritiva com PEG-6000 para atingir os potenciais de zero, -0,5 MPa, -1,0 MPa e -1,5 MPa e aos dias múltiplos de quatro, ou seja, até o 12º dia de avaliação, foi estimado o teor de clorofila presente nas folhas, o número de folhas, altura do colmo e o grau de perda de folhas. E ainda, a taxa de fotossíntese, transpiração, condutância estomática e temperatura das folhas foram obtidos com um analisador de gás infravermelho. Também determinamos a biomassa da parte aérea após o estresse e após a reidratação das plantas pela irrigação. Os dados foram submetidos a Anova e teste de Tukey (5%). As cultivares BRS Tamani e Massai e os genótipos PM44, PM19, PM20 e PM21 foram as mais tolerantes quando comparados aos demais, significativamente afetados pelo estresse hídrico. O potencial -1,5 MPa foi considerado o ponto de murcha permanente e o potencial -1,0 MPa o ideal para identificar os genótipos tolerantes ao estresse hídrico.

Corresponding authors.

E-mail addresses [suzy.mls@hotmail.com](mailto:suzy.mls@hotmail.com), [liana.jank@embrapa.br](mailto:liana.jank@embrapa.br), [rsarruda@ufmt.br](mailto:rsarruda@ufmt.br), [valdemir.laura@embrapa.br](mailto:valdemir.laura@embrapa.br).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this study.

## 1. Introdução

O estresse abiótico, em especial e mais comum, o estresse hídrico, é uma das principais causas da perda de produtividade no mundo e tem sido agravada pelas mudanças climáticas, entretanto, uma solução a isto tem recebido uma atenção maior para erradicar seus efeitos sobre as plantas (Basu *et al.*, 2016; Masoabi *et al.*, 2017). Contudo, Sutcliffe (1980) aponta que a disponibilidade de água exerce efeito na distribuição da vegetação ao redor do planeta, ou seja, ambientes com regimes hídricos constantes terão maior riqueza e diversidade que ambientes desérticos, por exemplo. Maroun (2007) e o IPCC (2014) explicam que as mudanças climáticas terão impactos a sociedade e a biodiversidade causando à América Latina a diminuição da produção agrícola, aumento dos vetores de diversas doenças e a extinção de animais e plantas.

E com isto, os pesquisadores esperam um cenário de clima mais extremo com secas, inundações e ondas de calor frequentes (Salati *et al.*, 2002), o que causará impactos negativos na produtividade agropecuária e na qualidade de vida humana uma vez que a combinação de vários estresses as plantas serão maiores que o previsto inicialmente (Ryan, 1991; Zandalinas *et al.*, 2017).

E por isso, a compreensão das respostas das plantas ao déficit hídrico é de fundamental importância para quantificar a capacidade de armazenamento de água no solo e analisar a influência dos mecanismos de adaptação das plantas à redução da disponibilidade de água no ambiente (Santos & Carlesso, 1998; IPCC, 2014; Pezzopane *et al.*, 2014). Basu *et al.* (2016) explicam que a “Resistencia a Seca” pode ser aplicada as plantas que conseguem burlar, escapar e tolerar os efeitos do estresse hídrico, sobrevivendo a ele. Entretanto, para burlar estas condições, as plantas variam as respostas de acordo com suas condições morfofisiológicas, sendo o ajustamento osmótico o principal, pois, com o acúmulo de diversos compostos orgânicos como açúcares, aminoácidos e sais inorgânicos como cátions de potássio e magnésio, e ânions como cloretos e nitratos conseguem tolerar o estresse a seca (Blum, 2016; Turner, 2018).

Além disso, as plantas desenvolvem mecanismos de adaptação à seca como o fechamento estomático e por consequência, diminuição da condutância estomática e da concentração interna de CO<sub>2</sub>, ajustamento da parede celular, produção de folhas menores, redução da área e potencial hídrico foliar e aumento na densidade e profundidade de raízes, principal evidência da resistência à seca (Klar *et al.*, 1978; Kano *et al.*, 1999; Chaves, 1991; Barker *et al.*, 1993; Neumann, 1995; Shao *et al.*, 2008; Seixas *et al.*, 2015). A irreversibilidade das modificações dos cultivos depende do genótipo, da duração, da severidade e do estágio de desenvolvimento da planta (Marin, 2008).

Contudo, avaliar as respostas morfofisiológicas das plantas ao estresse em seu ambiente natural é complexo, uma vez que não é possível controlar todas as variáveis como umidade, chuvas, vento etc. Neste sentido, o Polietileno Glicol 6000 (PEG-6000) foi indicado para experimentos controlados pela primeira vez num artigo publicado na revista *Science* em 1961 (Lagerwerff *et al.*, 1961) onde demonstrava sua capacidade de alterar o potencial osmótico de soluções nutritivas e permitir avaliar as plantas submetidas ao estresse em ambientes controlados como as casas-de-vegetação. Em 1971, Michel & Kaufmann publicaram um artigo com a indicação da quantidade de PEG-6000 utilizado levando em consideração a viscosidade da solução em relação a temperatura do ambiente. E então, em 1991, Villela *et al.* publicaram um artigo completo com uma tabela a ser seguida da quantidade por litro de PEG-6000 em relação a temperatura ambiente para produção de soluções para simular condições de estresse hídrico devido os potenciais negativos ocasionados pelo PEG-6000 que impedem a absorção da água pelas raízes.

E então, diversos métodos utilizando o PEG-6000 foram publicados e revisados posteriormente com inúmeras espécies vegetais, tais como o trigo (*Triticum* sp.) mediante uma câmara escura para avaliação das raízes (Nelson & Oliver, 2017), em estudo *in vitro* com cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) constatou-se a eficiência da avaliação para identificar as respostas morfológicas e fisiológicas do estresse hídrico (Masoabi *et al.*, 2017), e ainda, com estudos hidropônicos, em que se utilizando variadas concentrações de PEG-6000 (Villela *et al.*, 1991) é possível avaliar sua

capacidade de tolerância a seca bem como as alterações morfofisiológicas e o ajustamento osmótico com inúmeras espécies (Mohammadkhani & Heidari, 2008; Castañeda-Castro *et al.*, 2015; Robyn *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2018a; Souza *et al.*, 2018b).

Esta metodologia que emprega o PEG-6000 é eficaz, pois, é um polímero não tóxico e que não reage com as substâncias orgânicas presentes nos sistemas biológicos vegetais e, por isso, estudos tem sido realizado para simular as condições ambientais de seca à qual as plantas estão sujeitas no ambiente, uma vez que impede a absorção de água pelas raízes e permite uma avaliação rápida e precisa (Mohammadikhani & Heidari, 2008; Castañeda-Castro *et al.*, 2015; Nelson & Oliver, 2017).

As plantas forrageiras são aquelas cultivadas tendo em vista a produção de pastagens para a nutrição da pecuária bovina (Karam *et al.*, 2009), dentre as quais, a maioria pertence aos gêneros *Urochloa* sin. *Brachiaria* spp., *Panicum* sin. *Megathyrsus* spp. e *Andropogon* (Pereira & Herling, 2016). Constituem-se na principal fonte de alimento e em elemento crucial para a competitividade das cadeias produtivas da carne e do leite bovinos brasileiras no mercado mundial. Por isso, temos por objetivos avaliar nove genótipos de *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs do banco de germoplasma do programa de melhoramento genético da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) para tolerância à seca mediante PEG-6000 visando identificar os mais tolerantes ao estresse hídrico. A nossa hipótese é de que frente às outras metodologias, esta será eficaz em ser uma rápida avaliação demonstrando que os genótipos responderão diferentemente ao estresse, sendo o Teor de Clorofila, Taxa de Fotossíntese, Transpiração, Condutância estomática, número de folhas, altura e biomassa seca após estresse e após reidratação variáveis que permitirão identificar os mais tolerantes ao estresse simulado.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Local de estudo

O experimento foi realizado em casa-de-vegetação instalada na Embrapa Gado de Corte em Campo Grande, Mato Grosso do Sul (20°27'04" S e 54°42'57" W), sem controle de temperatura e umidade, entretanto, foram obtidos os dados de Precipitação Pluvial, Temperatura e Radiação a partir do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2018) para o período de desenvolvimento desta pesquisa (março a agosto de 2018) (Apêndice A do material suplementar).

O delineamento experimental possui quatro repetições e parcelas de uma planta por tubete em um esquema fatorial de nove (genótipos) x quatro (níveis de estresse hídrico: zero, -0,5 MPa, -1,0 MPa, -1,5 MPa induzido por PEG-6000 (Tabela 2.1) x três (épocas de colheita - aos dias múltiplos de quatro, ou seja, aos quatro, oito e 12 dias após a indução ao estresse). Foram utilizadas 432 plantas estabelecidas, devidamente etiquetadas e identificadas selecionadas por sorteio, e divididas entre os quatro tratamentos conforme o nível de estresse sorteado.

**Tabela 2.1.** Quantidade de PEG-6000 para diferentes níveis de estresse hídrico.

| Temperatura | Zero | -0,5 MPa    | -1,0 MPa    | -1,5 MPa    |
|-------------|------|-------------|-------------|-------------|
| 30 °C       | Zero | 212,564 g/L | 308,434 g/L | 382,082 g/L |

Fonte: Villela *et al.*, 1991.

O PEG-6000 foi dissolvido em um litro de solução nutritiva descrita no material suplementar (Anexo B), e, portanto, apenas a solução para obtenção do controle (Zero) não possuía PEG-6000 dissolvido. As quantidades determinadas por temperatura e potencial a ser obtido seguiram o artigo de Villela *et al.* (1991) conforme Tabela 2.1.

## 2.2. Preparação das sementes e do solo

As sementes de cada genótipo (Anexo A, Tabela S1, S2 e S3 do material suplementar) oriundas do programa de Melhoramento Genético da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) foram germinadas no dia 16 de maio de 2018 em bandejas de poliestireno expandido preenchidas com areia e, 10 dias após a emergência, selecionadas a partir da padronização do tamanho da parte aérea e sistema radicular, e então, no dia 29 de maio de 2018, foram iniciados os transplantes para os tubetes de 290 cm<sup>3</sup>.

Foram utilizadas 48 plântulas por genótipo, sendo duas cultivares de *M. maximus*, a cv. Massai e cv. BRS Tamani e os genótipos PM13, PM17, PM44, PM19, PM20, PM21 e PM22 estabelecidas em tubetes devidamente adubadas com solução nutritiva (Anexo A do material suplementar) durante o período de estabelecimento e crescimento de 60 dias e, somente então, os testes de estresse de acordo com o método em meio aquoso (hidropônico) foram iniciados no dia 17 de julho de 2018 (Mattos *et al.*, 2005; Pezzopane *et al.*, 2014; Carloto, 2016).

O substrato utilizado para preencher os tubetes foi a areia, uma manta de bedim fixada na extremidade inferior para impedir a perda de seu conteúdo conforme o Anexo D do material suplementar.

## 2.3. Avaliação do Estresse Hídrico

Após o estabelecimento das plantas, foram sorteadas e colocadas em caixas com circulação de solução nutritiva para aeração e fornecido para o Zero (controle) apenas com solução nutritiva, enquanto que os potenciais -0,5 MPa, -1,0 MPa e -1,5 MPa foi utilizado PEG-6000 diluído na solução nutritiva conforme descrição da Tabela 1 e do material suplementar (Anexo B).

As avaliações dos parâmetros biológicos (Tabela 2.2) foram realizadas a cada quatro dias após o início do estresse. Foi estimado o teor de clorofila presente nas folhas com um clorofilômetro (SPAD-502 - *Soil Plant Analysis Development*), anotado o número de folhas (NF) e altura do colmo (AC) (Carloto, 2016).

Além disso, com um analisador de gás infravermelho (*Infra Red Gas Analyser* – IRGA, LI – 6400) foram obtidas a taxa de fotossíntese (A), de condutância estomática (gS), transpiração (E) e temperatura foliar (T) mensuradas no período de 09:30 h às 12:30 h aos quatro e 12 dias de estresse consecutivos para o controle e -1,5 MPa, (os demais foram obtidos medidas apenas no primeiro dia de avaliação), com fluxo luminoso fotossintético a 1000  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e 400  $\mu\text{mol}$  de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) até os 12 dias de tratamento (Freitas, 2018) conforme descrição detalhada na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Parâmetros biológicos e morfológicos analisados e equipamentos utilizados para a análise.

| Descritor morfológico   | Unidade de medida                                  | Equipamento                             |
|-------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Teor de clorofila       | $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$                       | Clorofilômetro SPAD-502                 |
| Número de folhas        | Uni.                                               | Contagem manual                         |
| Fotossíntese            | $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ | IRGA-6400                               |
| Condutância estomática  | $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$     | IRGA-6400                               |
| Intensidade luminosa    | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$              | IRGA-6400                               |
| Transpiração            | $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$    | IRGA-6400                               |
| Temperatura foliar      | °C                                                 | IRGA-6400                               |
| Biomassa da parte aérea | g                                                  | Estufa de secagem e balança de precisão |
| Altura do colmo         | cm                                                 | Régua                                   |

Também foi determinada a biomassa da parte aérea (folhas e caules) (MSPA) logo após o período de estresse com o seu acondicionamento em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada de ar, por 72 horas, a 65°C até atingir o peso constante, em seguida, realizada a pesagem em balança de precisão (Pezzopane *et al.*, 2014).

Com relação a avaliação da Rebrota, após reidratação das plantas submetidas ao estresse (Freitas, 2018), reintroduzimos os indivíduos que sofreram estresse em solução nutritiva, sem PEG-6000, por oito dias, apenas para avaliar a qualidade da rebrota e determinar novamente a biomassa após estresse. A determinação da biomassa seca da parte aérea foi realizada cortando-se as plantas rente ao solo.

#### 2.4. Análise dos Dados Estatísticos

Nós construímos modelos de ANOVA para determinar as diferenças médias significativas para cada variável escolhida para representar o estresse hídrico. Essas variáveis (Teor de Clorofila, Taxa de Fotossíntese, Transpiração, Condutância estomática, número de folhas, altura e biomassa seca após estresse e após reidratação) foram consideradas todas como resposta em nossos modelos. A ANOVA foi escolhida para a modelagem pois o desenho experimental foi relativamente simplificado no controle das variáveis de interesse, e principalmente pela quantidade de repetições para garantir graus de liberdade para controlar possíveis erros do tipo I (falso positivo em relação à hipótese nula) e erros do tipo II (falso negativo em relação à hipótese nula). Todas as variáveis resposta foram padronizadas para média zero e variância unitária com a função *decostand* (método “standardize”) pelo pacote *vegan* (Oksanen, 2017). Para a ANOVA nós usamos a função *aov* do pacote “stats” básico do R (R Core Team, 2018). Todas as análises e gráficos (função *ggplot*, pacote *ggplot2*) (Wickham, 2009) foram feitos em ambiente R (R Core Team, 2018).

### 3. Resultados

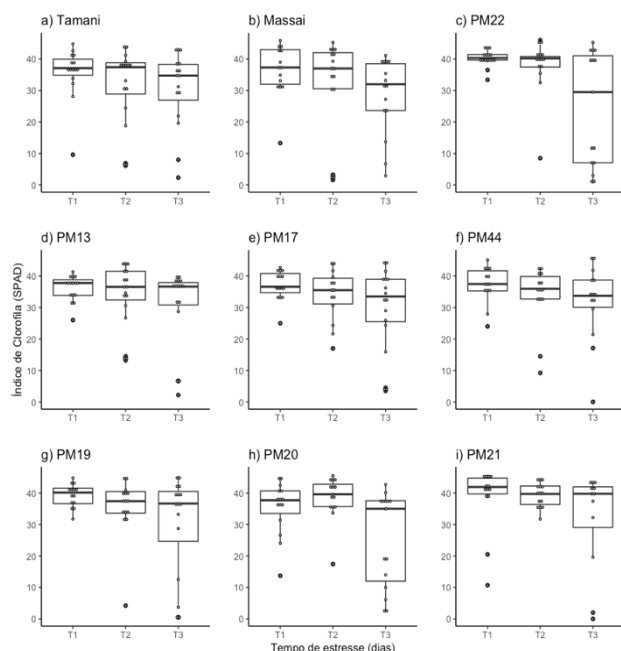
Com relação ao teor de clorofila estimado pelo clorofilômetro, podemos constatar conforme a Tabela 3.1 (Figura 1) que a cultivar BRS Tamani e o genótipo PM17 não foram afetados pelo tempo de estresse aqui simulados, entretanto, Massai obteve valores significativos com relação ao genótipo. Os genótipos PM13 e PM44 também foram pouco afetados pelo tempo de estresse, sendo significativo apenas para o genótipo e com relação aos potenciais; os demais tiveram índices de clorofila significativamente afetados pelo estresse.

**Tabela 3.1.** Probabilidades associadas à variável fisiológica Teor de Clorofila (SPAD) em função dos genótipos e do potencial de estresse.

| Genótipos  | Fonte de variação | gL | F      | P                    |     |
|------------|-------------------|----|--------|----------------------|-----|
| Massai     | Genótipo          | 3  | 3.355  | 0.0294               | *   |
|            | Tempo             | 2  | 2.053  | 0.1431               | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.812  | 0.5679               | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |        |                      |     |
| BRS Tamani | Genótipo          | 3  | 1.545  | 0.220                | ns  |
|            | Tempo             | 2  | 1.403  | 0.259                | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.466  | 0.829                | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |        |                      |     |
| PM13       | Genótipo          | 3  | 3.332  | 0.0301               | *   |
|            | Tempo             | 2  | 2.005  | 0.1491               | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.821  | 0.5613               | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |        |                      |     |
| PM17       | Genótipo          | 3  | 1.544  | 0.2199               | ns  |
|            | Tempo             | 2  | 2.529  | 0.0938               | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.240  | 0.9601               | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |        |                      |     |
| PM19       | Genótipo          | 3  | 13.336 | 5.22e <sup>-06</sup> | *** |
|            | Tempo             | 2  | 8.572  | 0.000902             | *** |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 5.974  | 0.000208             | *** |
|            | Resíduo           | 36 |        |                      |     |
| PM20       | Genótipo          | 3  | 1.717  | 0.18075              | ns  |
|            | Tempo             | 2  | 7.212  | 0.00232              | **  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 3.042  | 0.01644              | *   |
|            | Resíduo           | 36 |        |                      |     |
| PM21       | Genótipo          | 3  | 5.641  | 0.00283              | **  |
|            | Tempo             | 2  | 0.850  | 0.43570              | ns  |

|                                                                               |                |    |        |                      |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|----------------|----|--------|----------------------|-----|
|                                                                               | Genótipo*Tempo | 6  | 2.591  | 0.03438              | *   |
|                                                                               | Resíduo        | 36 |        |                      |     |
| PM22                                                                          | Genótipo       | 3  | 6.216  | 0.00163              | **  |
|                                                                               | Tempo          | 2  | 12.643 | 6.93e <sup>-05</sup> | *** |
|                                                                               | Genótipo*Tempo | 6  | 4.088  | 0.00316              | **  |
|                                                                               | Resíduo        | 36 |        |                      |     |
| PM44                                                                          | Genótipo       | 3  | 3.666  | 0.021                | *   |
|                                                                               | Tempo          | 2  | 0.810  | 0.453                | ns  |
|                                                                               | Genótipo*Tempo | 6  | 0.607  | 0.723                | ns  |
|                                                                               | Resíduo        | 36 |        |                      |     |
| Legenda: Valor do P: ***- 0.001 / **- 0.01 / *- 0.05 / ns- não significativo. |                |    |        |                      |     |

Com relação a Figura 1, podemos constatar que quando comparadas com as avaliações de quatro, oito e 12 dias, PM13 e PM44 não foram afetadas pelo tempo de estresse, entretanto quando comparadas com a distribuição dos potenciais, no meio de concentração -1,0 MPa as afetou diretamente quando comparadas aos demais. Contudo, o potencial -1,5 MPa foi aquele em que as plantas atingiram maior grau de estresse.



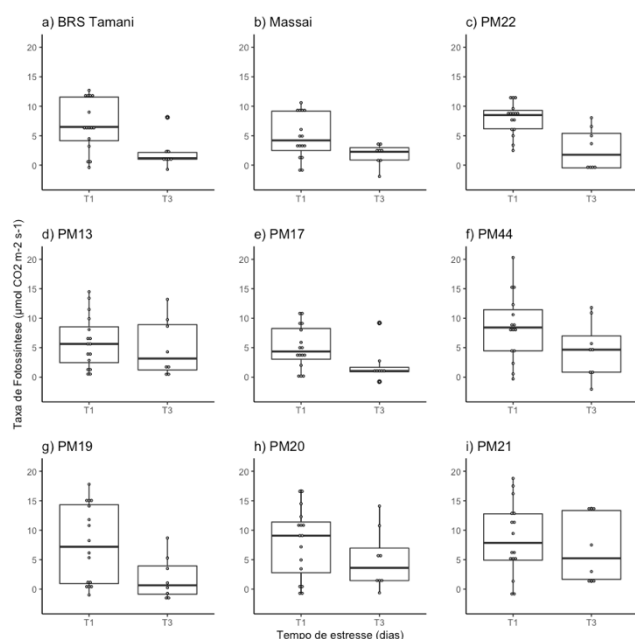
**Figura 1.** Teor de Clorofila (SPAD) em função dos genótipos e do potencial de estresse. Legenda: T1 (4 dias), T2 (8 dias) e T3 (12 dias).

A Tabela 3.2 (Figura 2) mostra os dados de taxa de fotossíntese obtidos a partir do Analisador de Gás Infravermelho (IRGA 6400), sendo que mesmo com as avaliações no período inicial e final é possível perceber que foram significativamente afetadas pelo estresse com exceção para PM44 que não obteve nenhum índice significativo, entretanto, o teor de clorofila (SPAD) foi afetado, as quais são funções fisiológicas dependentes uma vez que a clorofila é o pigmento responsável por captar a luz solar. As cultivares foram afetadas, porém, BRS Tamani não apresentou diferenças na relação do tratamento com o potencial avaliado.

**Tabela 3.2.** Probabilidades associadas à variável fisiológica Fotossíntese (A) em função dos genótipos e do potencial de estresse.

| Genótipos                                                                     | Fonte de variação | gL | F      | P                    |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----|--------|----------------------|-----|
| Massai                                                                        | Genótipo          | 3  | 7.468  | 0.00188              | **  |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 3.758  | 0.06840              | *   |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 3.193  | 0.09082              | *   |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |        |                      |     |
| BRS Tamani                                                                    | Genótipo          | 3  | 9.053  | 0.000716             | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 3.385  | 0.082342             | *   |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 1.172  | 0.207198             | ns  |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |        |                      |     |
| PM13                                                                          | Genótipo          | 3  | 18.345 | 1.04e <sup>-05</sup> | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 1.646  | 0.2157               | ns  |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 3.644  | 0.0723               | *   |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |        |                      |     |
| PM17                                                                          | Genótipo          | 3  | 4.407  | 0.0172               | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 1.907  | 0.1843               | ns  |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 0.445  | 0.5130               | ns  |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |        |                      |     |
| PM19                                                                          | Genótipo          | 3  | 14.189 | 5.45e <sup>-05</sup> | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 8.720  | 0.00851              | **  |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 5.673  | 0.02847              | *   |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |        |                      |     |
| PM20                                                                          | Genótipo          | 3  | 13.972 | 6e <sup>-05</sup>    | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 0.391  | 0.539                | ns  |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 1.538  | 0.231                | ns  |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |        |                      |     |
| PM21                                                                          | Genótipo          | 3  | 28.611 | 4.58e <sup>-07</sup> | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 1.743  | 0.2033               | ns  |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 3.250  | 0.0882               | *   |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |        |                      |     |
| PM22                                                                          | Genótipo          | 3  | 9.521  | 0.000548             | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 29.735 | 3.52e <sup>-05</sup> | *** |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 1.411  | 0.250358             | ns  |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |        |                      |     |
| PM44                                                                          | Genótipo          | 3  | 1.467  | 0.257                | ns  |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 0.496  | 0.490                | ns  |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 1.102  | 0.308                | ns  |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |        |                      |     |
| Legenda: Valor do P: ***- 0.001 / **- 0.01 / *- 0.05 / ns- não significativo. |                   |    |        |                      |     |

Observando a figura 2 podemos concluir que a Taxa de fotossíntese foi diferentemente afetada pelo tempo e pelos potenciais utilizados, entretanto PM44 sobressaiu-se frente aos demais, uma vez que embora houve redução da produção fotossintética esta continuou ativa no período de 12 dias de estresse consecutivos. Dentre as cultivares cv. Massai obteve melhor resposta em -1,0 MPa quando comparada ao controle por exemplo. PM13, PM17, PM20 e PM21, ao contrário dos demais, não sentiram os efeitos do tempo de estresse, porém, podemos constatar uma queda drástica entre os pontos quando comparados o controle aos tratamentos, principalmente entre o controle e -1,5 MPa.



**Figura 2.** Taxa de Fotossíntese em função dos genótipos e do potencial de estresse. Legenda: T1 (4 dias) e T3 (12 dias).

A Tabela 3.3 (Figura 3) apresenta os resultados com relação a transpiração das plantas obtidos com o IRGA 6400, onde percebemos que Massai obteve melhor resposta que BRS Tamani, uma vez que o efeito ocorreu apenas no genótipo enquanto que BRS Tamani houve relação com o tempo de avaliação. Nos demais, PM19 e PM21 foram os mais afetados pelo déficit da transpiração foliar, entretanto, enquanto PM44 não foi afetado com relação ao teor de clorofila e fotossíntese, a transpiração foi, tanto com relação ao genótipo como em relação ao tempo de avaliação.

**Tabela 3.3.** Probabilidades associadas à variável fisiológica Transpiração ( $E$ ) em função dos genótipos e do potencial de estresse.

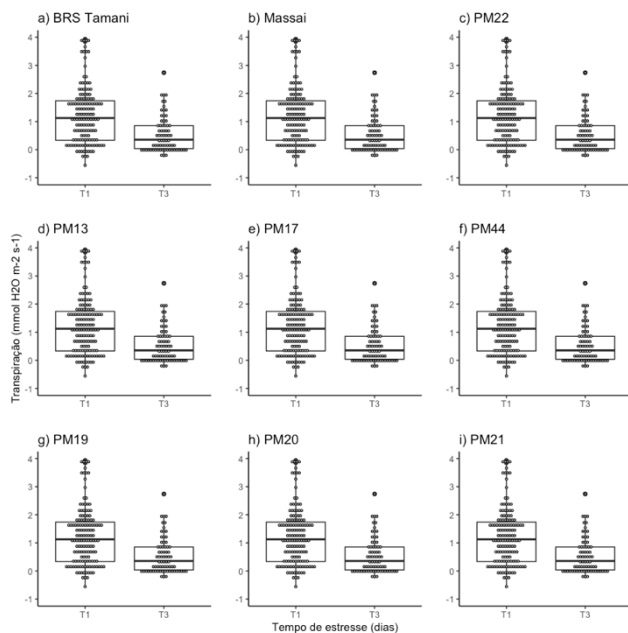
| Genótipos  | Fonte de variação | gL | F      | P             |     |
|------------|-------------------|----|--------|---------------|-----|
| Massai     | Genótipo          | 3  | 7.468  | 0.00188       | **  |
|            | Tempo             | 1  | 3.758  | 0.06840       | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 3.193  | 0.09082       | ns  |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |
| BRS Tamani | Genótipo          | 3  | 4.070  | 0.0227        | *   |
|            | Tempo             | 1  | 6.981  | 0.0166        | *   |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 2.883  | 0.1068        | ns  |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |
| PM13       | Genótipo          | 3  | 15.657 | $2.94e^{-05}$ | *** |
|            | Tempo             | 1  | 2.176  | 0.157         | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 0.904  | 0.354         | ns  |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |
| PM17       | Genótipo          | 3  | 5.252  | 0.00885       | **  |
|            | Tempo             | 1  | 7.111  | 0.01572       | *   |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 0.418  | 0.52615       | ns  |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |
| PM19       | Genótipo          | 3  | 16.63  | $1.99e^{-05}$ | *** |
|            | Tempo             | 1  | 18.78  | 0.000400      | *** |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 17.30  | 0.000589      | *** |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |
| PM20       | Genótipo          | 3  | 4.716  | 0.0134        | *   |
|            | Tempo             | 1  | 0.905  | 0.3542        | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 0.487  | 0.4942        | ns  |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |
| PM21       | Genótipo          | 3  | 23.033 | $2.19e^{-06}$ | *** |

|      |                |    |        |                      |     |
|------|----------------|----|--------|----------------------|-----|
|      | Tempo          | 1  | 18.451 | 0.000435             | *** |
|      | Genótipo*Tempo | 1  | 7.904  | 0.011550             | *   |
|      | Resíduo        | 18 |        |                      |     |
| PM22 | Genótipo       | 3  | 8.613  | 0.000927             | *** |
|      | Tempo          | 1  | 88.784 | 2.21e <sup>-08</sup> | *** |
|      | Genótipo*Tempo | 1  | 0.275  | 0.606462             | ns  |
|      | Resíduo        | 18 |        |                      |     |
| PM44 | Genótipo       | 3  | 6.207  | 0.0044               | **  |
|      | Tempo          | 1  | 7.010  | 0.0164               | *   |
|      | Genótipo*Tempo | 1  | 0.836  | 0.3726               | ns  |
|      | Resíduo        | 18 |        |                      |     |

Legenda: Valor do P: \*\*\*- 0.001 / \*\*- 0.01 / \*- 0.05 / ns- não significativo.

Quando comparamos os dados estatísticos da Tabela 3.3 e a Figura 3, concluímos que PM44 utilizou todas os mecanismos fisiológicos disponíveis para garantir a Transpiração pois, embora tenha sido significativo para o genótipo e o tempo de tratamento, não há grande variação entre as médias para os potenciais avaliados. Entretanto, para todos os genótipos, as maiores reduções na taxa de transpiração foram obtidas no potencial -1,5 MPa o que indica que este potencial provocou o maior estresse, próximo ao ponto de murcha permanente.

Com relação as cultivares, nota-se que a cv. Massai demonstrou melhor resposta quando comparada a cv. BRS Tamani, o que pode significar que esta possui melhores condições fisiológicas para responder ao estresse hídrico uma vez que quando comparados os valores de -0,5 MPa e o controle, podemos perceber valores próximos, indicando uma ligeira diferença, mas que não afeta significativamente estas plantas.



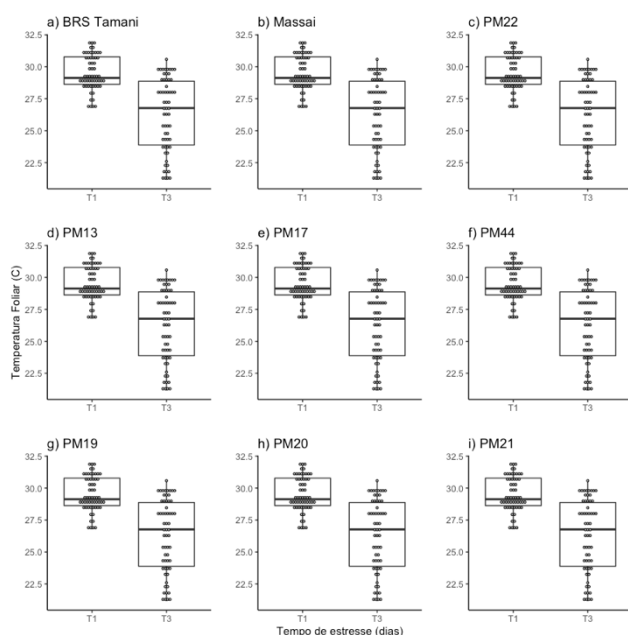
**Figura 3.** Transpiração em função dos genótipos e do potencial de estresse. T1 (4 dias) e T3 (12 dias).

A Tabela 3.4 (Figura 4) apresenta os resultados com relação a Temperatura Foliar das plantas obtidos com o IRGA 6400, e todos apresentaram diferenças significativas na temperatura foliar, principalmente com relação as cultivares e aos genótipos PM19, PM20 e PM22. Para PM13, PM17, PM21 e PM44 não foram encontradas relação com tempo de estresse e potencial osmótico aplicado. Entretanto, podemos ressaltar que todos os nove genótipos sofreram estresse hídrico uma vez que o aumento da temperatura foliar é o principal indicador de estresse.

**Tabela 3.4.** Probabilidades associadas à variável fisiológica Temperatura Foliar em função dos genótipos e do potencial de estresse.

| Genótipos                                                                     | Fonte de variação | gL | F        | P             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----|----------|---------------|-----|
| Massai                                                                        | Genótipo          | 3  | 1750.18  | $< 2e^{-16}$  | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 2405.40  | $< 2e^{-16}$  | *** |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 10.48    | 0.00457       | **  |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |          |               |     |
| BRS Tamani                                                                    | Genótipo          | 3  | 446.26   | $< 2e^{-16}$  | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 672.77   | $1.04e^{-15}$ | *** |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 77.54    | $6.09e^{-08}$ | *** |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |          |               |     |
| PM13                                                                          | Genótipo          | 3  | 34.271   | $1.19e^{-07}$ | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 27.364   | $5.65e^{-15}$ | *** |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 0.366    | 0.553         | ns  |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |          |               |     |
| PM17                                                                          | Genótipo          | 3  | 5.252    | 0.00885       | **  |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 7.111    | 0.01572       | *   |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 0.418    | 0.52615       | ns  |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |          |               |     |
| PM19                                                                          | Genótipo          | 3  | 419.882  | $< 2e^{-16}$  | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 966.734  | $< 2e^{-16}$  | *** |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 8.465    | 0.00935       | **  |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |          |               |     |
| PM20                                                                          | Genótipo          | 3  | 1420.01  | $< 2e^{-16}$  | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 1060.69  | $< 2e^{-16}$  | *** |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 10.27    | 0.00491       | **  |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |          |               |     |
| PM21                                                                          | Genótipo          | 3  | 107.412  | $1.12e^{-11}$ | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 84.622   | $3.18e^{-08}$ | *** |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 0.667    | 0.425         | ns  |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |          |               |     |
| PM22                                                                          | Genótipo          | 3  | 2161.80  | $< 2e^{-16}$  | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 18598.44 | $< 2e^{-16}$  | *** |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 16.34    | 0.000765      | *** |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |          |               |     |
| PM44                                                                          | Genótipo          | 3  | 592.088  | $< 2e^{-16}$  | *** |
|                                                                               | Tempo             | 1  | 1262.050 | $< 2e^{-16}$  | *** |
|                                                                               | Genótipo*Tempo    | 1  | 0.001    | 0.975         | ns  |
|                                                                               | Resíduo           | 18 |          |               |     |
| Legenda: Valor do P: ***- 0.001 / **- 0.01 / *- 0.05 / ns- não significativo. |                   |    |          |               |     |

Todos os genótipos foram afetados pelo estresse hídrico e isto foi indicado pela diferença na temperatura foliar mensurados aos quatro e 12 dias de estresse (Figura 4), entretanto, a temperatura acima da média ambiente foi registrada nos potenciais -0,5 MPa.



**Figura 4.** Temperatura foliar em função dos genótipos e do potencial de estresse. T1 (4 dias) e T3 (12 dias).

A Tabela 3.5 (Figura 5) apresenta os resultados com relação a condutância estomática das plantas obtidos com o IRGA 6400, e, o genótipo PM21 não foi afetado, entretanto, as demais variáveis fisiológicas foram. PM13, PM20 e PM44 resultaram de efeitos sobre o genótipo e os demais foram diretamente afetados pela diminuição da condutância estomática conforme aumentou o tempo de estresse. As cultivares foram afetadas, entretanto, BRS Tamani se sobressaiu na resposta a esse estresse.

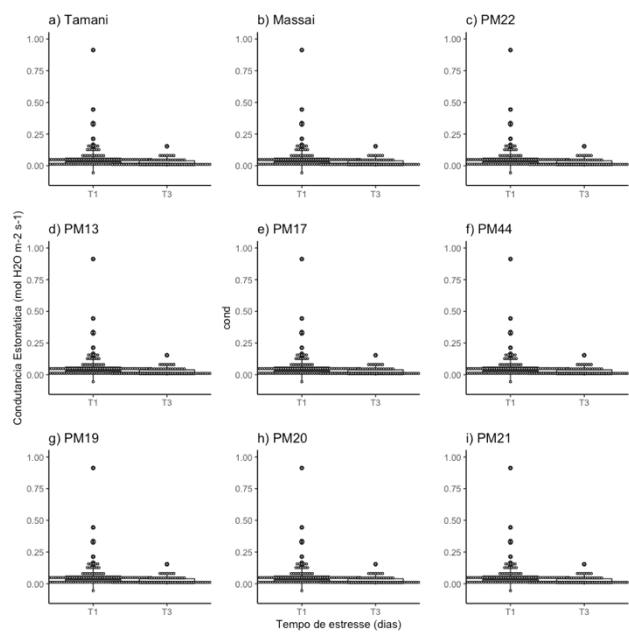
**Tabela 3.5.** Probabilidades associadas à variável fisiológica Condutância Estomática ( $g_s$ ) em função dos genótipos e do potencial de estresse.

| Genótipos  | Fonte de variação | gL | F      | P             |     |
|------------|-------------------|----|--------|---------------|-----|
| Massai     | Genótipo          | 3  | 24.816 | $1.29e^{-06}$ | *** |
|            | Tempo             | 1  | 21.911 | 0.000186      | *** |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 8.052  | 0.010920      | *   |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |
| BRS Tamani | Genótipo          | 3  | 3.398  | 0.0404        | *   |
|            | Tempo             | 1  | 6.110  | 0.0236        | *   |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 3.196  | 0.0907        | ns  |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |
| PM13       | Genótipo          | 3  | 28.633 | $4.55e^{-07}$ | *** |
|            | Tempo             | 1  | 0.633  | 0.437         | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 2.602  | 0.174         | ns  |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |
| PM17       | Genótipo          | 3  | 7.633  | 0.00170       | **  |
|            | Tempo             | 1  | 13.819 | 0.00158       | **  |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 5.782  | 0.02717       | *   |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |
| PM19       | Genótipo          | 3  | 20.683 | $4.63e^{-06}$ | *** |
|            | Tempo             | 1  | 7.515  | 0.01342       | *   |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 14.624 | 0.00124       | **  |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |
| PM20       | Genótipo          | 3  | 14.782 | $4.23e^{-05}$ | *** |
|            | Tempo             | 1  | 3.907  | 0.0636        | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 2.811  | 0.1109        | ns  |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |
| PM21       | Genótipo          | 3  | 1.820  | 0.180         | ns  |
|            | Tempo             | 1  | 2.333  | 0.144         | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 1  | 2.129  | 0.162         | ns  |
|            | Resíduo           | 18 |        |               |     |

|      |                |    |        |         |    |
|------|----------------|----|--------|---------|----|
| PM22 | Genótipo       | 3  | 5.627  | 0.00669 | ** |
|      | Tempo          | 1  | 13.406 | 0.00179 | ** |
|      | Genótipo*Tempo | 1  | 1.693  | 0.20962 | ns |
|      | Resíduo        | 18 |        |         |    |
| PM44 | Genótipo       | 3  | 4.183  | 0.0206  | *  |
|      | Tempo          | 1  | 0.962  | 0.3396  | ns |
|      | Genótipo*Tempo | 1  | 0.194  | 0.6645  | ns |
|      | Resíduo        | 18 |        |         |    |

Legenda: Valor do P: \*\*\*- 0.001 / \*\*- 0.01 / \*- 0.05 / ns- não significativo.

Com relação a condutância estomática observando os dados da Tabela 3.5 e Figura 5 podemos constatar com base nas taxas de fotossíntese e transpiração que estas plantas possuem mecanismos fisiológicos para burlar e tolerar o estresse hídrico uma vez que embora, temos variações nas médias amostradas, estas plantas praticamente não alteraram a abertura estomática, sendo que PM21 não sentiu os efeitos do estresse nessa variável. Contudo, vendo a distribuição dos dados em relação ao tempo de estresse de quatro ou 12 dias, há uma ligeira diminuição na condutância estomática demonstrando que houve um ajuste osmótico das folhas para proteger o aparato fotossintético.



**Figura 5.** Condutância Estomática (gS) em função dos genótipos e do potencial de estresse. T1 (4 dias) e T3 (12 dias).

A Tabela 3.6 apresenta os resultados com relação a Altura das plantas obtidos durante os tratamentos e este, foi afetado significativamente entre genótipos e tratamentos, onde a cultivar BRS Tamani obteve a melhor resposta quando comparada com a cv. Massai, entretanto, PM44 sentiu os efeitos do estresse com relação a altura entre tratamentos. O genótipo PM13 foi afetado, porém, as relações tratamento e tempo não foram afetadas pelo estresse.

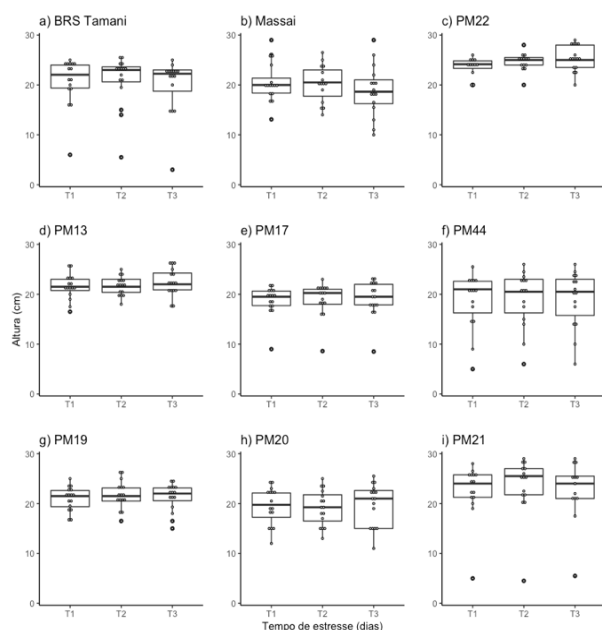
**Tabela 3.6.** Probabilidades associadas à variável fisiológica Altura em função dos genótipos e do potencial de estresse.

| Genótipos  | Fonte de variação | gL | F     | P        |     |
|------------|-------------------|----|-------|----------|-----|
| Massai     | Genótipo          | 3  | 7.543 | 0.000486 | *** |
|            | Tempo             | 2  | 4.111 | 0.024656 | *   |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 1.691 | 0.151406 | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |       |          |     |
| BRS Tamani | Genótipo          | 3  | 4.462 | 0.00916  | **  |
|            | Tempo             | 2  | 4.412 | 0.01933  | *   |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.479 | 0.81945  | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |       |          |     |
| PM13       | Genótipo          | 3  | 4.887 | 0.00596  | **  |
|            | Tempo             | 2  | 2.434 | 0.10199  | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.925 | 0.48906  | ns  |

|      |                |    |        |          |     |
|------|----------------|----|--------|----------|-----|
|      | Resíduo        | 36 |        |          |     |
| PM17 | Genótipo       | 3  | 3.25   | 0.03289  | *   |
|      | Tempo          | 2  | 6.75   | 0.00324  | **  |
|      | Genótipo*Tempo | 6  | 1.00   | 0.44039  | ns  |
|      | Resíduo        | 36 |        |          |     |
| PM19 | Genótipo       | 3  | 9.613  | 8.45e-05 | *** |
|      | Tempo          | 2  | 8.758  | 0.000796 | *** |
|      | Genótipo*Tempo | 6  | 3.274  | 0.011302 | *   |
|      | Resíduo        | 36 |        |          |     |
| PM20 | Genótipo       | 3  | 11.667 | 1.73e-05 | *** |
|      | Tempo          | 2  | 8.706  | 0.000824 | *** |
|      | Genótipo*Tempo | 6  | 6.196  | 0.000155 | *** |
|      | Resíduo        | 36 |        |          |     |
| PM21 | Genótipo       | 3  | 4.889  | 0.00594  | **  |
|      | Tempo          | 2  | 5.033  | 0.01182  | *   |
|      | Genótipo*Tempo | 6  | 1.789  | 0.12914  | ns  |
|      | Resíduo        | 36 |        |          |     |
| PM22 | Genótipo       | 3  | 5.741  | 0.00257  | **  |
|      | Tempo          | 2  | 12.111 | 9.5e-05  | *** |
|      | Genótipo*Tempo | 6  | 1.741  | 0.13971  | ns  |
|      | Resíduo        | 36 |        |          |     |
| PM44 | Genótipo       | 3  | 2.000  | 0.13137  | ns  |
|      | Tempo          | 2  | 5.250  | 0.00998  | **  |
|      | Genótipo*Tempo | 6  | 1.566  | 0.18548  | ns  |
|      | Resíduo        | 36 |        |          |     |

Legenda: Valor do P: \*\*\*- 0.001 / \*\*- 0.01 / \*- 0.05 / ns- não significativo.

Com relação a altura apresentada na Figura 6, percebemos que há uma redução significativa na altura das plantas entre os potenciais osmóticos avaliados, sendo que, para PM17, PM19 e PM22 são as mais evidentes. As cultivares cv. Massai e BRS Tamani, nesta variável, BRS Tamani obteve a melhor resposta assim como PM13 e PM44.



**Figura 6.** Altura em função dos genótipos e do potencial de estresse. T1 (4 dias), T2 (8 dias) e T3 (12 dias).

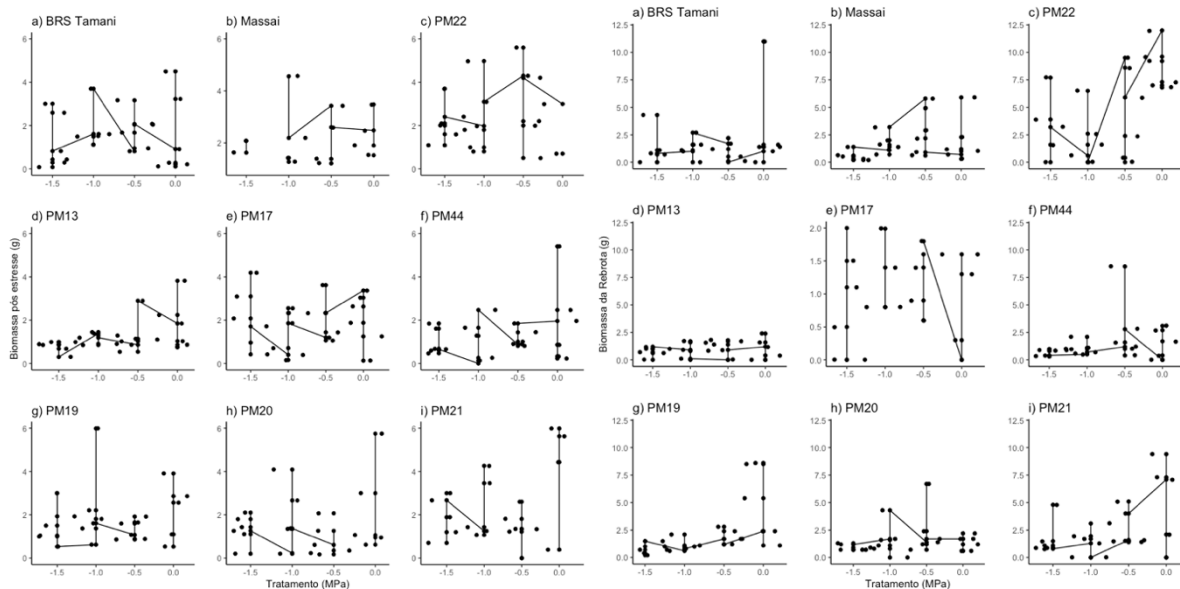
A Tabela 3.7 apresenta os resultados com relação a número de folhas das plantas obtidos durante os tratamentos e percebe-se que afetou apenas os genótipos em Massai, BRS Tamani, PM13, PM20, PM22 e PM44. Os demais não sofreram danos na perda de número de folhas nem pelo tempo de estresse de 12 dias e nem pelo potencial osmótico empregado (Tabela 1).

**Tabela 3.7.** Probabilidades associadas à variável fisiológica Número de Folhas (*NF*) em função dos genótipos e do potencial de estresse.

| Genótipos  | Fonte de variação | gL | F     | P        |     |
|------------|-------------------|----|-------|----------|-----|
| Massai     | Genótipo          | 3  | 2.868 | 0.0499   | *   |
|            | Tempo             | 2  | 0.908 | 0.4124   | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.218 | 0.9684   | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |       |          |     |
| BRS Tamani | Genótipo          | 3  | 4.075 | 0.0137   | *   |
|            | Tempo             | 2  | 0.128 | 0.8800   | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.088 | 0.9971   | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |       |          |     |
| PM13       | Genótipo          | 3  | 8.119 | 0.000294 | *** |
|            | Tempo             | 2  | 0.910 | 0.411577 | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.803 | 0.574014 | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |       |          |     |
| PM17       | Genótipo          | 3  | 0.989 | 0.409    | ns  |
|            | Tempo             | 2  | 0.059 | 0.943    | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.081 | 0.998    | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |       |          |     |
| PM19       | Genótipo          | 3  | 0.771 | 0.518    | ns  |
|            | Tempo             | 2  | 0.296 | 0.745    | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.478 | 0.820    | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |       |          |     |
| PM20       | Genótipo          | 3  | 4.084 | 0.0136   | *   |
|            | Tempo             | 2  | 0.095 | 0.9099   | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.158 | 0.9860   | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |       |          |     |
| PM21       | Genótipo          | 3  | 2.087 | 0.119    | ns  |
|            | Tempo             | 2  | 0.193 | 0.825    | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.053 | 0.999    | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |       |          |     |
| PM22       | Genótipo          | 3  | 3.199 | 0.0348   | *   |
|            | Tempo             | 2  | 0.020 | 0.9800   | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.405 | 0.8707   | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |       |          |     |
| PM44       | Genótipo          | 3  | 7.442 | 0.000532 | *** |
|            | Tempo             | 2  | 0.057 | 0.944222 | ns  |
|            | Genótipo*Tempo    | 6  | 0.097 | 0.996225 | ns  |
|            | Resíduo           | 36 |       |          |     |

Legenda: Valor do P: \*\*\*- 0.001 / \*\*- 0.01 / \*- 0.05 / ns- não significativo.

Com relação a Figura 7 (Anexo C, figuras A e B anexas do material suplementar), podemos constatar que BRS Tamani respondeu melhor aos tratamentos quando comparada a cultivar Massai, principalmente nos tratamentos -1,0 MPa e -1,5 MPa, com relação ao teor de biomassa seca de folhas e caules o que se refere a taxa de fotossíntese líquida produzida pela planta. Já os genótipos, PM22, PM17, PM19, PM20 e PM21 e PM44 tiveram melhores resultados quando comparados ao controle. PM13 obteve os menores índices e foi considerada a mais sensível ao estresse.



**Figura 7.** Biomassa seca após estresse e Biomassa Seca após a Rebrotar em função do potencial de estresse.

Com relação a reidratação por oito dias consecutivos podemos constatar que a cultivar BRS Tamani obteve melhor resposta, ou seja, conseguiu se reestabelecer rapidamente e reconstruir toda a parte aérea no período avaliado quando comparada a cv. Massai. Além disso, PM22, PM17 e PM21 também foram destaques na rebrota, entretanto, nota-se que as plantas que estavam antes embebidas na solução de -1,5 MPa em PM13, PM19, PM20, PM44 praticamente não obtiveram teor de matéria seca após reidratação o que significa que este potencial é o ponto de murcha permanente.

#### 4. Discussão

A diminuição do teor de clorofila obtido com o clorofilômetro (SPAD-502) (Tabela 3.1, Figura 1) é esperada, pois, com o aumento do estresse hídrico, onde tende a transpiração exceder a absorção de água, as plantas buscam economizar os recursos e o primeiro, é proteger o aparelho fotossintético, e se necessário, reaproveitar os pigmentos fotossintéticos, dos quais a clorofila é o principal (Bray, 1997; Larcher, 2006), entretanto, a cultivar BRS Tamani e o genótipo PM17 não foram afetados pelos tempos de estresse aqui simulados, o que pode estar diretamente relacionado ao ajustamento osmótico (Turner, 2018).

O ajustamento osmótico descrito por Turner (2018) é o aumento nas concentrações de proteínas solúveis totais, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido, o qual Melo *et al.* (2007) descrevem esse ajuste em raízes e em folhas de plantas de *Paspalum paniculatum* (L.) e setária (*Setaria anceps* (Stapf ex Broun & R.E. Massey.)) submetidos a 11 dias de déficit hídrico. Isto “indica o consumo destes açúcares para a manutenção da sobrevivência das plantas e os aminoácidos presentes nas folhas podem contribuir no ajustamento osmótico” bem como a produção de proteínas específicas para a proteção do aparato celular, principalmente da dissecação (Bray, 1997; Melo *et al.*, 2007; Turner, 2018).

Contudo, Melo *et al.* (2007) explicam que o aumento na densidade estomática e diminuição no tamanho dos estômatos é uma alternativa ao suprimento adequado de CO<sub>2</sub> necessário à fotossíntese, sem que haja excessiva perda de água. Além disso, Pezzopane *et al.* (2014) citam também que a baixa disponibilidade de água no solo ocasiona a desidratação, redução do crescimento, aceleração da senescência dos tecidos, comprometendo o crescimento por reduzir as taxas de expansão foliar e fotossíntese (Seixas *et al.*, 2015).

A eficiência bioquímica da fotossíntese durante o estresse hídrico depende principalmente de ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) e a atividade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, ou seja, a enzima Rubisco, uma vez

que ela, uma parte importantíssima do metabolismo  $C_4$  auxilia na economia de água, reduz a fotorrespiração e maximiza a absorção de  $CO_2$  durante a abertura estomática (Basu *et al.*, 2016). Entretanto, a primeira resposta das plantas a seca é o fechamento estomático, que consequentemente reduz a absorção de  $CO_2$  e com isto, a redução na transpiração, que é a perda de vapor de água para o ambiente quando os estômatos abertos para obtenção de  $CO_2$  necessário a fotossíntese. Sob condições de estresse hídrico pode também pode ser alcançado através de derramamento de folhas (isto é, seca), bem como diminuir o número de folhas, tamanho de folhas e ramificações (Larcher, 2006; Basu *et al.*, 2016).

Isto está diretamente relacionado com a diminuição na queda da taxa fotossintética (Tabela 3.2, Figura 2), uma vez que com a diminuição dos pigmentos fotossintéticos não há captação de luz solar e consequentemente, sem produção de energia (Larcher, 2006). Zandalinas *et al.* (2017) expõe que mudanças na abertura estomática são uma resposta primária e rápida ao ambiente seco, pois, regular o fluxo de  $CO_2$ , a temperatura foliar (via transpiração), a qual é a principal indicadora de estresse uma vez que todos os genótipos de *M. maximus* aqui avaliados indicaram aumento de a temperatura foliar (Tabela 3.3).

Consequentemente, a perda de vapor de água para o ambiente durante a abertura estomática consiste na transpiração (Tabela 3.4) e com isso, os estômatos absorvem  $CO_2$  da atmosfera, processo denominado condutância estomática (Tabela 3.5). Estas atividades fisiológicas são as primeiras a demonstrar índices negativos quando em estresse hídrico, entretanto, PM21 não foi afetado pelo estresse entre os quatro e 12 dias de avaliação ali comparados (Tabela 3.5). Além disso, a condutância estomática, significativa entre os demais genótipos não houve grande variação e, portanto, as plantas realizam outros ajustes fisiológicos além da abertura estomática como forma de economizar a água (Larcher, 2006).

A redução no crescimento é um dos mais notáveis efeitos da restrição hídrica nas plantas (Tabela 3.6), principalmente causada por uma inibição da elongação da folha e caule quando o potencial hídrico decresce, sendo esse efeito diferente entre espécies, contudo, corrobora com nossos dados, pois foram afetadas pelo estresse e houve diminuição significativa na altura entre tratamentos no genótipo PM44, PM17, PM19 e PM20, além das cultivares Massai e BRS Tamani (Mattos *et al.*, 2005; Pezzopane *et al.*, 2014).

Com relação a diminuição de folhas nos genótipos Massai, BRS Tamani, PM13, PM20, PM22 e PM44 (Tabela 3.7), Shao *et al.* (2008) expõem que devido o estresse hídrico a área foliar total por planta diminuiu significativamente em *Eragrostis curvula* e *Oryza sativa*, o que auxilia no controle do uso da água. Em *Sorghum* sp., a área foliar reduziu significativamente sob estresse hídrico e isto é explicado por que ocorreu uma diminuição da condutância estomática na área foliar viável restante e também pode explicar por que estes genótipos perderam folhas entre genótipos quando, nos demais avaliados, não houve diferenças significativas.

Turner (2018) conclui que a expansão foliar é ainda mais sensível ao déficit hídrico que a fotossíntese, o que difere de nossos dados, pois, com exceção de PM44, todos os genótipos tiveram a taxa fotossintética afetada pelo estresse hídrico (Tabela 3.2) enquanto o número de folhas apenas Massai, BRS Tamani, PM13, PM20, PM22 e PM44 (Tabela 3.7).

Monfared (2016) em trabalho de germinação e condições de casa-de-vegetação descreve que em três espécies de *Poa* spp. sob estresse hídrico provocado por PEG-6000 apenas *P. bulbosa* é tolerante uma vez que o estresse tem efeitos negativos na germinação e desenvolvimento vegetal para as espécies *P. annua* e *P. fratsensis*, já com relação a *M. maximus* avaliados em condições de crescimento vegetativo, podemos perceber que *M. maximus* cv. BRS Tamani se destaca em relação a outra cultivar cv. Massai, o que pode ser explicado pelo alto grau de adaptabilidade ao clima tropical e diversidade genética (Tabela 3.7).

Nelson & Oliver (2017) estudaram o efeito do estresse hídrico em raízes de trigo (cultivar Zak), uma vez que é uma das poáceas de maior importância na agricultura, e perceberam que o estresse simulado com PEG-8000 afeta mais a parte aérea que a parte radicular das plântulas enquanto que o estudo de Robin *et al.* (2015) constatou a perda nove vezes o diâmetro de pelos radiculares em 13 cultivares de trigo submetidas a 0,6% de PEG-6000 quando comparadas com o controle (0%).

Contudo, Ming *et al.* (2012) em estudo com *O. sativa* expõem que com a aplicação de Silício em soluções hidropônicas com PEG-6000 a 8,5% por sete dias não provocou o estresse hídrico, mas sim, auxiliou na manutenção da turgescência, no aumento do potencial hídrico e que poderia melhorar parcialmente o conteúdo de água total, livre e osmólitos em folhas e raízes, que foram todos diminuídos sob estresse hídrico. Entretanto, este não é o nosso caso, pois, mesmo com a solução completa de nutrientes, conseguimos garantir o fornecimento de nutrientes sem impedir que ocorra o estresse hídrico ocasionado por PEG-6000.

Em relação aos dados da biomassa seca da parte aérea após 12 dias consecutivos de estresse (Figura 7), constatamos o já avaliado por Souza *et al.* (2018a) quando compararam quatro cultivares de *M. maximus* (Mombaça, BRS Zuri, BRS Tamani e Massai) em soluções de solução nutritiva de PEG-6000 de -0,5 MPa, Mombaça apresentou a maior inibição de crescimento (80,3% a), Zuri (73,5% b) e Massai (70,6% b) não diferiram entre si; Tamani apresentou a menor inibição de crescimento (12,4% c). Em -1,0 MPa todos diferiram: Mombaça (91,6%a), Zuri (86,3% b), Massai (67,6% c), Tamani (20,8 %d) e concluíram que BRS Tamani foi o mais tolerante em -0,5 MPa e em -1,0 MPa.

Em outro trabalho, com as cultivares de *M. maximus* cv. Massai e BRS Tamani e os genótipos T110 e T60 quando comparados os índices SPAD de clorofila e a biomassa seca após o estresse apenas apresentou teste significativo ( $p>3,5871$ ) para a variação do teor de clorofila e também para o peso seco ( $p>3,8621$ ) ao longo período e tratamentos avaliados, considerando os demais, nas duas variáveis analisadas tolerantes (Souza *et al.*, 2018b).

O resultado das plantas que retornaram para reidratação por oito dias consecutivos em solução nutritiva sem PEG-6000 nos mostra que PM17, PM20 e PM22 foram destaques na rebrota, entretanto, nota-se que as plantas que estavam antes embebidas na solução de -1,5 MPa em PM13, PM19, PM20, PM44 praticamente não produziram matéria seca após reidratação.

## 5. Conclusões

De acordo com nossos resultados podemos diferenciar o genótipo PM44 como um dos mais tolerantes aos potenciais hídricos aqui utilizados e simulados em casa-de-vegetação, entretanto, outros genótipos como o PM22, PM13, PM17 obtiveram respostas significativas em outras variáveis que também são importantes para tolerar a seca. Destacam-se os genótipos cv. Massai e BRS Tamani que embora afetadas pelo estresse hídrico, ambos apresentam um aparato morfofisiológico capaz de suportar condições de seca prolongadas, mesmo as extremas como a simulada com o potencial de -1,5 MPa.

Quadro 1. Ordenação dos genótipos avaliados pelo grau de tolerância.

| Genótipo       | Tolerância | Variável destaque                                   |
|----------------|------------|-----------------------------------------------------|
| PM44           | Tolerante  | SPAD, MSPA Seca, A, gS, T, E, Altura, NF            |
| cv. BRS Tamani | Tolerante  | SPAD, MSPA Seca, A, gS, T, E, Altura, MSPA Rebrotas |
| cv. Massai     | Tolerante  | SPAD, PA Seca, Rebrotas, NF, A, gS, E, T, Altura    |
| PM21           | Tolerante  | SPAD, PA Seca, Rebrotas, A, gS, T, E                |
| PM20           | Tolerante  | SPAD, PA Seca, Rebrotas, A, gS, T, E                |
| PM19           | Tolerante  | SPAD, PA Seca, Rebrotas                             |
| PM22           | Sensível   | PA Seca, Rebrotas                                   |

|      |          |         |
|------|----------|---------|
| PM17 | Sensível | Rebrota |
| PM13 | Sensível | Rebrota |

Além disso, ressaltamos que embora os quatro potenciais foram úteis para a identificação dos materiais sensíveis e tolerantes, os mais importantes a serem levados em consideração quando instalar um experimento como este para a família botânica *Poaceae* é o potencial -1,0 MPa que permitiu diferir entre os tolerantes e não tolerantes.

**Financiamento:** Este trabalho foi financiado com o apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, FUNDECT, UFMS, Unipasto e EMBRAPA.

**Agradecimentos:** Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PPGBV), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA) e a UNIPASTO pelo apoio financeiro, logístico e intelectual.

## 6. Referencias

Basu, S.; Ramegowda, V.; Kumar, A.; Pereira, A., 2016. Plant adaptation to drought stress. [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research*, 5 (F1000 Faculty Rev), 1554;

Blum, A., 1989. Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. *Crop Science*, 29, 230-233.;

Blum, A., 2017. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant Cell Environment*. 40, 1, 4–10;

Bray, E. A., 1997. Plant Responses to water deficit. *Trends in Plant Science.*, 2, 2, 48-53;

Burin, P. C., 2018. Produtividade e valor nutricional de cinco forrageiras implantadas em diferentes modalidades de cultivo. Tese (Doutorado em Agronomia, Produção Vegetal). Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, f 93;

Casteñada-Castro, O.; Gómez-Merino, F. C.; Trejo-Téllez, L. I.; Pastelín-Solano, M. C., 2015. Osmotic Stress induced by Polyethylene-Glycol alters Macronutrient Concentrationsb in Sugarcane (*Saccharum* spp.) Plants in vitro. *Agrociencia*. 49, 8, 859-873;

Cecato, U., Machado, A.O., Martins, E.N., Pereira, L.A.F., Barbosa, M.A.A.L. de F., Santos, G.T. dos, 2000. Avaliação da Produção e de Algumas Características da Rebrota de Cultivares e Acessos de *Panicum maximum* Jacq. sob duas Alturas de Corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 29, 3, 660-668;

Costa, N. de L., Jank, L., Fogaça, F.H. dos S., Magalhães, J.A., Bendahan, A.B., Santos, F.J. de S., Rodrigues, B.H.N., 2018. Rendimento de forragem, composição química e morfogênese de *Megathyrus maximus* cv. Tanzânia-1 sob frequências de desfolhação. *PUBVET*. 12, 4, 67, 1-7;

Gomes-Cadenas, A., Vives, V., Zandalinas, S.I., Manzi, M., Sanchez-Perez, A.M., Perez-Clemente, R.M.; Arbona, V., 2015. Absciscic Acid: a versatile Phytohormone in Plant Signaling and Beyond. *Current Protein & Peptide Science*. 16, 5;

Hoagland, D.R.; Arnon, D.I., 1950. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p.;

INMET, 2018. Estações Automáticas: gráficos. Disponível em: <[http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_auto\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf)>. Acesso em: 06.Set.2018;

IPCC, 2014. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Disponível em: <<https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg2/>>. Acesso em: 30.Ago.2017;

Kramer, P.J., 1988. Changing concepts regarding plant water relations: opinion. *Plant Cell Environment*. 115, 7, 565–568;

Larcher, W., 2006. Physiological Plant Ecology. 3rd ed, Springer press, London, 322 pp.;

Lagerwerff, J.V., Ogata, G., Eagle, H.E., 1961. Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene glycol. *Science*. 133, 3463, 1486-1487;

Masoabi M., Lloyd, J., Kossmann, J., Van Der Vyver, C., 2017. Ethyl Methanesulfonate Mutagenesis and In Vitro Polyethylene Glycol Selection for Drought Tolerance in Sugarcane (*Saccharum* spp.). *Sugar Tech.* 20, 1, 50–59;

Ming, D. F.; Pei, Z. F.; Naeem; M. S., Gong, H. J.; Zhou, W. J., 2012. Silicon Alleviates PEG-Induced Water-Deficit Stress in Upland Rice Seedlings by Enhancing Osmotic Adjustment. *J. Agronomy & Crop Science.*, 198, 14-26;

Mohammadikhani, N.; Heidari, R., 2008. Water stress induced by Polyethylene glycol 6000 and Sodium Chloride in two maize cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 11, n. 01, p. 92-97;

Monfared, S.H., 2016. The Effects of Metabolism in Response to Water Stress of three *Poa* species under Germinator and Greenhouse Conditions. *IIOABJ.* 7, 2, 376–382;

Nelson, S.K., Oliver, M.J., 2017. A Soil-Plate based Pipeline for Assessing Cereal Root Growth in Response to Polyethylene Glycol (PEG)-Induced Water Deficit Stress. *Frontiers in Plant Science.*, 8, 1272;

Pereira, L.E.T.; Herling, V.R., 2016. A dinâmica do crescimento de plantas forrageiras e o manejo das pastagens. Disponível em: <<http://www.prp.usp.br/wp-content/uploads/sites/134/2014/05/Apostila-A-din%C3%A2mica-do-crescimento-de-plantas-forrageiras-e-o-manejo-das-pastagens.pdf>>. Acesso em 09.Jan.2016;

Pezzopane, C.G., Santos, P.M., Cruz, P.G., Altoé, J., Ribeiro, F.A., Valle, C.B., 2014. Estresse por deficiência hídrica em genótipos de *Brachiaria brizantha*. *Ciência Rural*, Online. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/2014nahead/0103-8478-cr-00-00-cr20130915.pdf>>. Acesso em: 11.Jan.2016;

Pimentel, C., 1998. Metabolismo de carbono na agricultura tropical. Seropédica: Edur, 150 p.;

Nepumoceno, A. L.; Oosterhuis, D. M.; Stewart, J. W., 1998. Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol. *Environmental and Experimental Botany.* 40, 29–41;

REFLORA. 2017. *Poaceae* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB86786>>. Acesso em: 26.Jul.2017;

Ryan, R.G., 1991. Effects of Climate Change on Plant Respiration. *Ecological Applications.* 01, 02, 157-167;

Robin, A. H. K.; Uddim, M. J.; Bayazid, K. N., 2015. Polyethylene Glycol (PEG)-Treated Hydroponic Culture Reduces Length and Diameter of Root Hairs of Wheat Varieties *Agronomy.* 5, 506-518;

Salati, E.; Santos, A.A. dos; Nobre, C. 2002. As mudanças climáticas globais e seus efeitos nos ecossistemas brasileiros. Disponível em: <[www.comciencia.br/reportagens/clima/clima14.htm](http://www.comciencia.br/reportagens/clima/clima14.htm)> Acesso em: 25 Jul. 2017;

Sánchez, E., Gil, S., Azcón-Bieto, J., Nogués, S., 2016. The response of *Arundo donax* L. (C3) and *Panicum virgatum* (C4) to different stresses. *Biomass and Bioenergy.* 85, 335–345;

Santos, P.M., Cruz, P.G. da, Araujo, L.C. de, Pezzopane, J.R.M., Valle, C.B. do, Pezzopane, C. de G., 2013. Response mechanisms of *Brachiaria brizantha* cultivars to water deficit stress. *Brazilian Journal of Animal Science.* 42, 767-773;

Santos, R.F., Carlesso, R., 1998. Déficit hídrico e os Processos Morfológico e Fisiológico das plantas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.* 52, 3, 287-294;

Seixas, A.A.; Gomes, V.M.; Serafim, V.F.; Viana, W.A., 2015. Déficit Hídrico em Plantas Forrageiras – revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.* 8, 1-14;

Shao, H.; Chu, L.; Jaleel, C. A.; Zhao, C., 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C. R. Biologies.*, 331, 215-225;

Souza, S. M. L.; Jank, L.; Laura, V. A., 2018a. Evaluación preliminar de cuatro cultivares de *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B. K. Simon & S. W. L. Jacobs al estrés hídrico en solución nutritiva. In: REUNIÓN ARGENTINA DE FISILOGÍA VEGETAL, 32.; CONGRESO LATINOAMERICANO DE FISILOGÍA VEGETAL, XVI., Córdoba, Argentina. Conocimiento para el desarrollo sustentable, equitativo y soberano: libro de resúmenes... Córdoba, Argentina: Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal - SAFV, 2018.;

Souza, S. M. L.; Jank, L.; Silva, M. F.; Laura, V. A., 2018b. Avaliação de dois genótipos e duas cultivares de *Megathyrsus maximus* ao estresse hídrico sob polietileno glicol 6000 (peg-6000). In: JORNADA CIENTÍFICA

EMBRAPA GADO DE CORTE, 14., 2018, Campo Grande - MS. [Resumos dos trabalhos]. Brasília, DF, Embrapa, 115 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 258).;

Sutcliffe, J.F., 1980. As Plantas e a Água. São Paulo: EPU, Ed. Da Universidade de São Paulo, Temas para Biologia, 23, 126 p.;

Turner, N.C., 2018. Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress. *Journal of Experimental Botany*. 69, 13, 3223–3233;

Violet-Chanbrand, S.; Dreyer, E.; Brendel, O., 2013. Performance of a new dynamic model for predicting diurnal time courses of stomatal conductance at the leaf level. *Plant Cell Environ.* 36, 1529–1546;

Villela, F.A.; Filho, L.D.; Sequeira, E.L., 1991. Tabela de Potencial Osmótico em função da concentração de Polietileno Glicol 6000 e da Temperatura. *Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 26, 1957-1968;

Zandalinas, S.I.; Mittler, R.; Balfagón, D.; Arbona, V.; Gómez-Cadenas, A., 2017. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum*. 162, 01, 2-12;

Oksanen, J.; Blanchet, F. G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlinn, D.; Minchin, P.R.; O'Hara, R. B.; Simpson, G.L.; Solymos, Stevens, P.M.H.H.; Szoecs, E.; Wagner, H. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.4-4, 2017. Available online: <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>. (accessed on 20 Set 2018).

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018. Available online:<<https://www.R-project.org/>>. (accessed on 20 Out 2018).

Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2009.

Wang, W.; Zong, Y.; Zhang, S., 2016. Hydraulic regulation strategies for whole-plant water balance of two maize inbred lines differing in drought resistance under short-term osmotic stress. *Acta. Physiol. Plant.* 38, 1.

## Avaliação de genótipos de *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs ao Estresse Hídrico com Polietileno Glicol 6000 (PEG-6000)

Suzy Florentin<sup>1</sup>, Liana Jank<sup>2</sup>, Rafael Arruda<sup>3</sup> and Valdemir Laura<sup>1,2,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul;

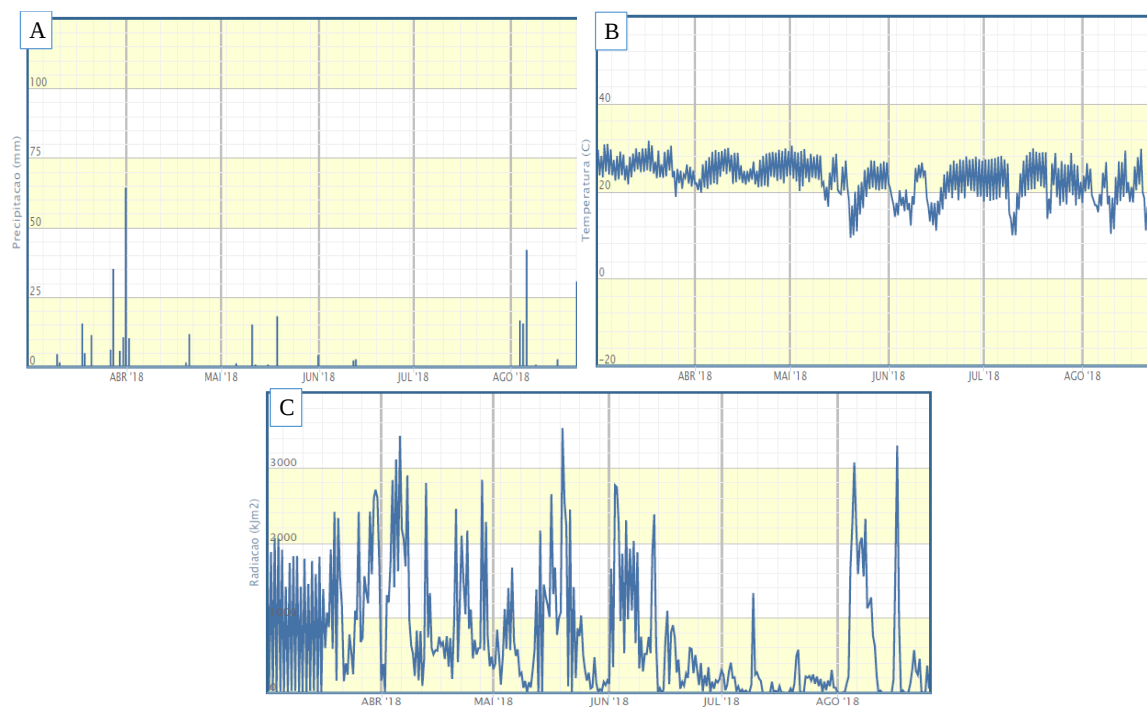
<sup>2</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA);

<sup>3</sup> Universidade Federal de Mato Grosso;

<sup>4</sup> Universidade Anhanguera Uniderp;

\* Correspondence: valdemir.laura@embrapa.br; Tel.: +55-67-3368-2079

### Apêndice A – Dados climatológicos durante o Experimento.



**Figura 1.** Dados climatológicos no período de avaliação. Fonte: INMET, 2018. Legenda A); Precipitação (mm); B) Temperatura (°C); C) Radiação (kJm<sup>2</sup>).

## Anexo A

**Tabela S1.** Genótipos e cultivares utilizadas no experimento.

| Genótipo/Cultivar                     | Data transplante | Data/Lote         |
|---------------------------------------|------------------|-------------------|
| PM13                                  | 29/05/2018       | 19/04/2013        |
| PM44                                  | 08/06/2018       | 18/04/2011        |
| PM22                                  | 29/05/2018       | 08/05/2013        |
| PM17                                  | 29/05/2018       | 01/04/2011        |
| <i>Panicum maximum</i> cv. Massai     | 29/05/2018       | 27/04/2017 L13 P4 |
| <i>Panicum maximum</i> cv. BRS Tamani | 29/05/2018       | 07/04/2017 L10 P9 |
| PM20                                  | 29/05/2018       | 25/04/2017 L8 P8  |
| PM21                                  | 29/05/2018       | 13/04/2017 L6 P1  |
| PM19                                  | 29/05/2018       | 25/04/2017 L2 P47 |

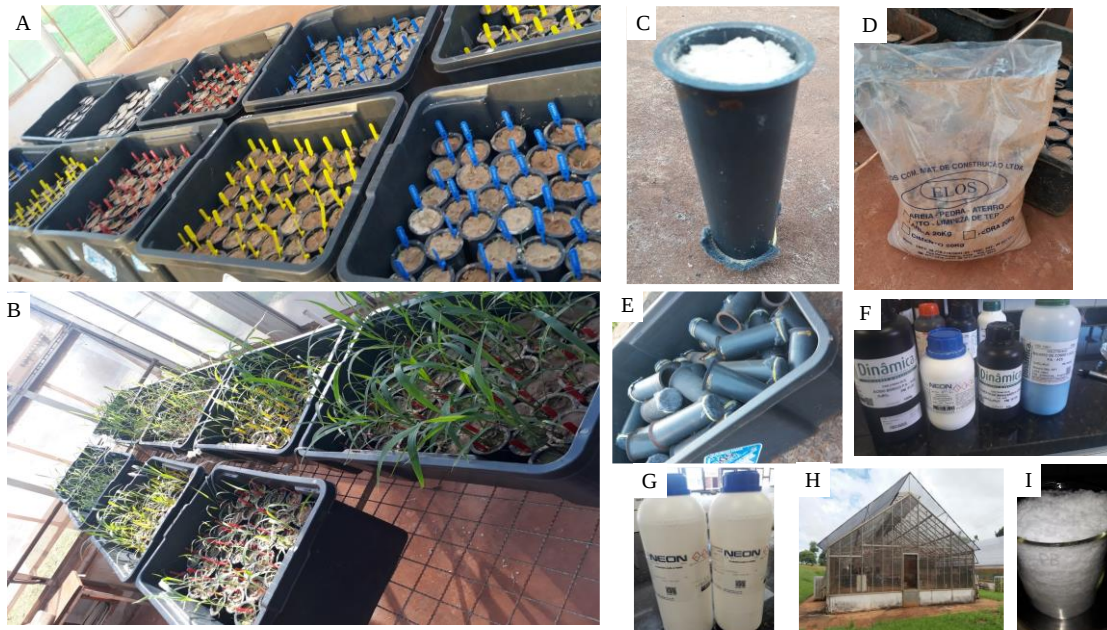
**Tabela S2.** Solução nutritiva para estabelecimento. Note: Adaptado de Hoagland & Arnon, 1950.

| Quantidade | Diluição                                                                                                              | Reagente                                                                  | Nutriente                                                                   |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 136,09g    | 1000 ml água destilada                                                                                                | $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>Fosfato de Potássio<br>Monobásico             | Macro<br>nutrientes –<br>Cálcio, Fósforo,<br>Ferro Potássio e<br>Nitrogênio |
| 101,11g    | 66,07 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sulfato de amônio) + 74,55 g KCL (Cloreto de potássio) = 1000 ml água destilada | $\text{KNO}_3$<br>Nitrato de potássio                                     |                                                                             |
| 236,16 g   | 1000 ml água destilada                                                                                                | $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$<br>Nitrato de Cálcio |                                                                             |
| 247,47 g   | 24,747 g x 100 ml água destilada                                                                                      | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$<br>Sulfato de Magnésio          |                                                                             |
| 1,5 ml     | Diluído diretamente na solução                                                                                        | Solução de Ferro quelatizado                                              |                                                                             |
| 2,86 g     | 150 ml água destilada                                                                                                 | $\text{H}_3\text{BO}_3$<br>Ácido bórico                                   | Micronutrientes<br>– Boro, Cobre,<br>Zinco, Manganês,<br>Sódio              |
| 1,81 g     | 150 ml água destilada                                                                                                 | $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$<br>Cloreto de Manganês          |                                                                             |
| 0,22 g     | 150 ml água destilada                                                                                                 | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$<br>Sulfato de Zinco             |                                                                             |
| 0,08 g     | 150 ml água destilada                                                                                                 | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$<br>Sulfato de Cobre             |                                                                             |
| 0,26 g     | 0,18 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (molibdato de amônio) 150 ml água destilada                          | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Molibdato de Sódio    |                                                                             |

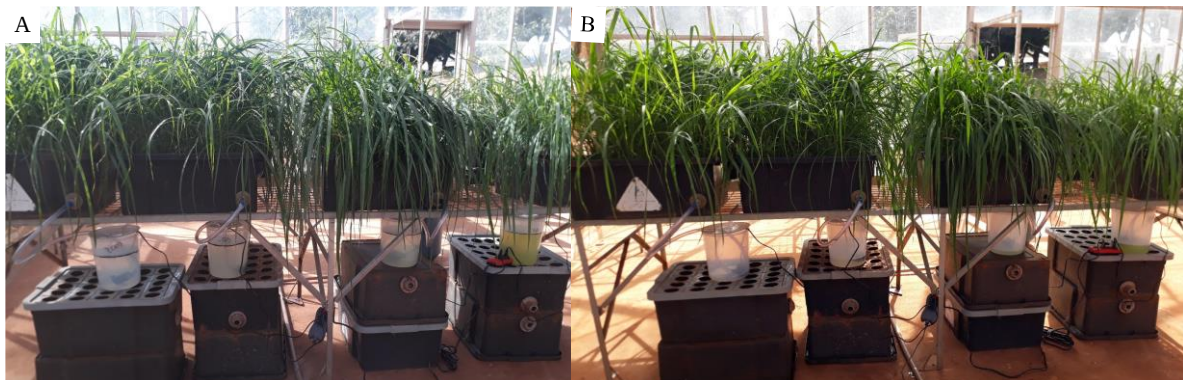
**Tabela S3.** Solução nutritiva aplicada para estabelecimento (100 ml por vaso a cada sete dias).

| Volume | Reagente                                                                  | Solução Resultante        |
|--------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 20 ml  | $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>Fosfato de Potássio Monobásico                |                           |
| 100 ml | $\text{KNO}_3$<br>Nitrato de potássio                                     |                           |
| 100 ml | $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$<br>Nitrato de Cálcio | 20 litros de água tratada |
| 40 ml  | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$<br>Sulfato de Magnésio          |                           |
| 1,5 ml | Solução de Ferro quelatizado                                              |                           |
| 20 ml  | Micronutrientes                                                           |                           |

## Anexo B



**Legenda:** **Figura A.** Nove genótipos – 48 tubetes x 1 indivíduo – 4 tratamentos– medições cada quatro dias. (432 plantas estabelecidas). **Figura B.** Estabelecimento das plântulas. **Figura C.** Tubete utilizado. **Figura D.** Substrato utilizado. **Figura E.** Tubetes com manta de bedim. **Figura F.** Sais utilizados na solução nutritiva de estabelecimento. **Figura G.** Polietileno Glicol 6000. **Figura H.** Casa-de-vegetação utilizada para os experimentos. **Figura I.** Vista do PEG-6000 antes da diluição.



**Legenda:** **Figura A.** Execução dos tratamentos da esquerda para a direita – zero, -0,5 MPa, -1,0 MPa, -1,5 MPa. **Figura B.** Circulação da solução nutritiva por tratamento.

**Anexo C – Análise Estatística (Teste Tukey) e Figuras Complementares para Biomassa Seca após Estresse e após a Rebrotada dos genótipos avaliados.**

Figura A – Análise complementar da Biomassa Seca pós estresse por potencial.

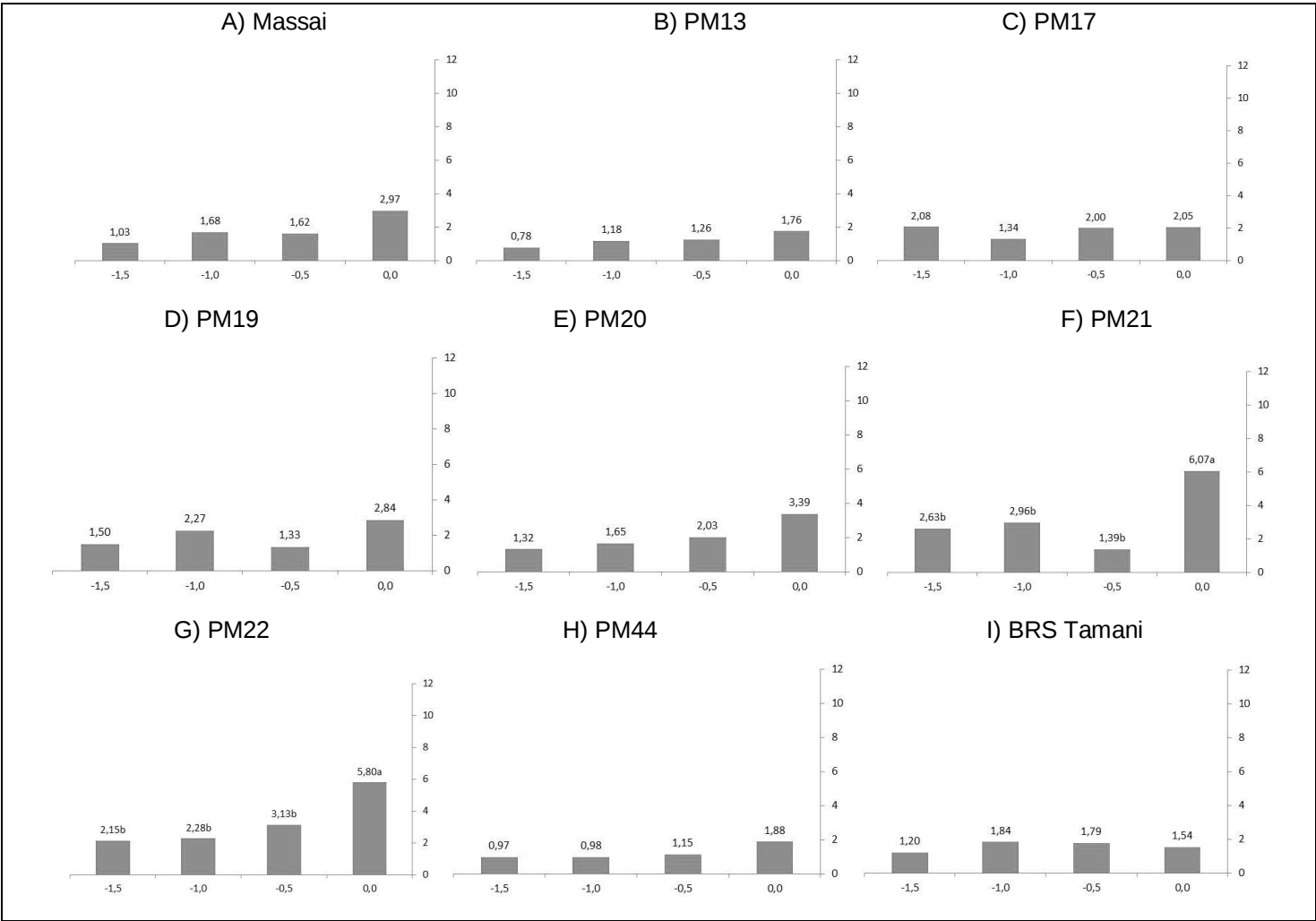
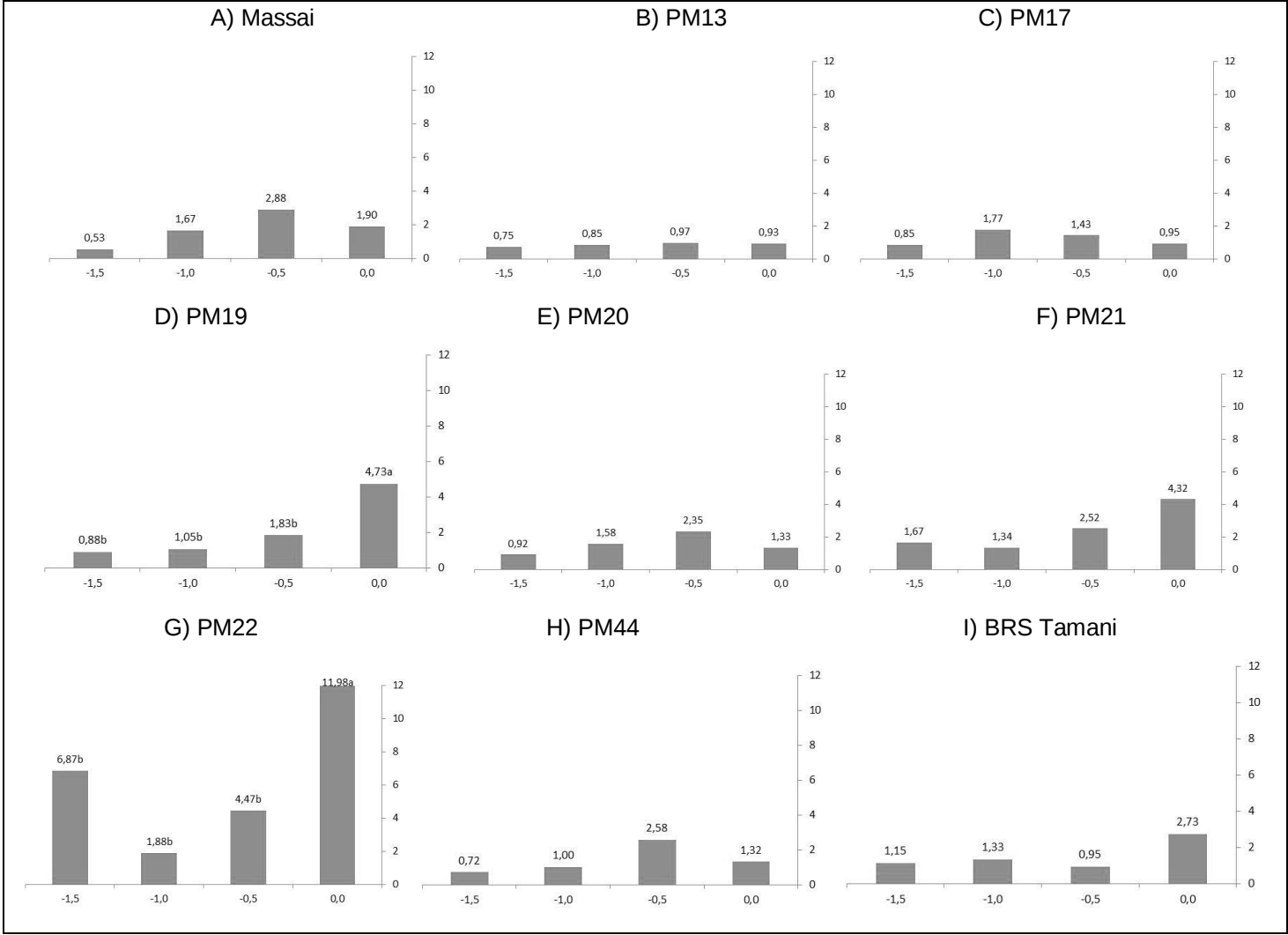


Figura B – Análise complementar da Biomassa Seca pós rebrota por potencial.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a condução dos dois experimentos e comparando os dados de literatura, podemos concluir:

- As cultivares já lançadas comercialmente pela Embrapa cv. Massai e cv. BRS Tamani foram consideradas tolerantes ao estresse hídrico nas condições aqui simuladas. Os genótipos PM19, PM20, PM21 e PM44 (embora no primeiro trabalho tenha sido considerado o mais sensível ao estresse) foram considerados tolerantes ao estresse, e, portanto, indicados ao programa de melhoramento para produção de cultivares tolerantes a seca.
- Ambas as metodologias empregadas aqui são eficientes na avaliação do estresse hídrico, entretanto, a metodologia com utilização de PEG-6000 pode ser considerada mais rápida, segura e eficiente mesmo sem o controle da temperatura pois, impede a absorção de água de qualquer fonte, incluindo a utilizada na diluição da solução nutritiva.
- Com relação ao uso destas metodologias, ambas são como passo-a-passo, uma vez que se compreenda a maneira como fazer, basta executá-las. Portanto, depende da necessidade do pesquisador para empregá-las. Além disso, o tempo de duração do estresse depende do pesquisador, utilizamos 18 dias para o capítulo um e 12 dias para o capítulo dois como uma média do tempo utilizado em outros trabalhos, mas, dependendo da necessidade e das plantas utilizadas, a metodologia pode ser expandida.
- As variáveis fisiológicas utilizadas foram essenciais e devem ser seguidas claramente, entretanto, sugiro avaliar também o número de perfilhos por plantas e marcar sempre que possível o maior número de dados possíveis do IRGA 6400 além dos que consideramos aqui, como a concentração de carbono interno (CI) e razão do carbono interno da câmara subestomática e carbono externo (CI/CA), por exemplo.