

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS – AGRONOMIA

INTEGRAÇÕES MORFO-FISIOLÓGICAS DE RAIZ E PARTE  
AÉREA CONFEREM TOLERÂNCIA À SECA EM PLANTAS  
DE *Crambe abyssinica* Hochst E *Raphanus sativus* L.

Autora: Luciana Minervina de Freitas Moura  
Orientador: Prof. Dr. Alan Carlos Costa

Rio Verde – GO  
Agosto – 2019

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS – AGRONOMIA

INTEGRAÇÕES MORFO-FISIOLÓGICAS DE RAIZ E PARTE  
AÉREA CONFEREM TOLERÂNCIA À SECA EM PLANTAS  
DE *Crambe abyssinica* Hochst E *Raphanus sativus* L.

Autora: Luciana Minervina de Freitas Moura  
Orientador: Prof. Dr. Alan Carlos Costa

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Área de concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

Rio Verde – GO  
Agosto -2019

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

MM929i Moura, Luciana Minervina de Freitas  
Integrações morfo-fisiológicas de raiz e parte  
aérea conferem tolerância à seca em plantas de *Crambe  
abyssinica* Hochst e *Raphanus sativus* L. / Luciana  
Minervina de Freitas Moura; orientador Alan Carlos  
Costa; co-orientadora Caroline Müller. -- Rio Verde,  
2019.  
95 p.

Tese ( em Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Agrárias - Agronomia) -- Instituto Federal Goiano,  
Campus Rio Verde, 2019.

1. Brassicaceae. 2. Limitação hídrica. 3.  
Mecanismos adaptativos. 4. Arquitetura de raízes. 5.  
Biodiesel. I. Costa, Alan Carlos, orient. II. Müller,  
Caroline , co-orient. III. Título.

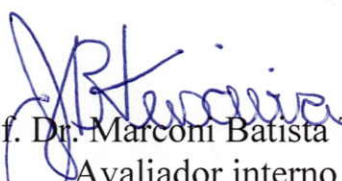
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS-AGRONOMIA

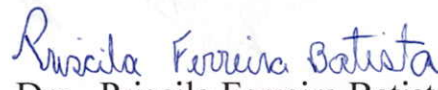
INTEGRAÇÕES MORFO-FISIOLÓGICAS DE RAIZ  
E PARTE AÉREA CONFEREM TOLERÂNCIA À SECA  
EM PLANTAS DE *Crambe abyssinica* Hochst E  
*Raphanus sativus* L.

Autora: Luciana Minervina de Freitas Moura  
Orientador: Dr. Alan Carlos Costa

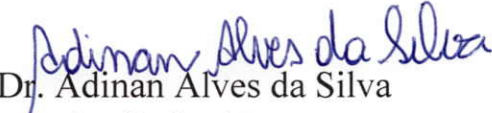
TITULAÇÃO: Doutorado em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de  
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado


APROVADO em 30 de agosto de 2019.

  
Prof. Dr. Marcom Batista Teixeira  
Avaliador interno  
IF Goiano – Campus Rio Verde

  
Dra. Priscila Ferreira Batista  
Avaliadora interna  
IF Goiano – Campus Rio Verde

  
Prof.ª Dra. Suelisla Lopes Rezende Silva  
Avaliadora externa  
UFG - Jataí

  
Dr. Adinan Alves da Silva  
Avaliador interno  
IF Goiano – Campus Rio Verde

  
Prof. Dr. Alan Carlos Costa  
Presidente da banca  
IF Goiano – Campus Rio Verde

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, minha fortaleza, meu guia e fonte de para todos os momentos

A minha família, meus pais Vera Lúcia e Adenício e meus irmãos Luciano e Ana Paula, por serem a razão do meu viver, meu abrigo, minha alegria, minha inspiração e exemplos de honestidade, trabalho e amor. Em especial a minha irmã, por ser parceira, amiga e sempre me apoiar.

A minha amiga, Rhaianna de Carvalho Lima pelo carinho, incentivo, apoio, conselhos e pelas horas de descontração e alegria e por estar presente em todos os momentos.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias Agronomia, pela oportunidade de qualificação profissional e, indiretamente, desenvolvimento pessoal, graças ao ensino público e de qualidade oferecido aos estudantes, desde os cursos técnicos a pós-graduação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pela concessão da bolsa de formação, que possibilitou a dedicação exclusiva ao desenvolvimento da tese, e as demais agências de fomento (CAPES, CNPq, FINEP), pelo apoio financeiro para a execução dos projetos de pesquisa.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, Prof. Frederico Antônio Loureiro Soares, pela oportunidade e pelo trabalho de excelência desenvolvido em prol do PPGCA-AGRO.

Ao meu orientador, professor Dr. Alan Carlos Costa, por estar presente na minha formação acadêmica, desde meu ingresso na iniciação científica até o doutorado. Grata

pela oportunidade, confiança, ensinamentos e amizade e por ser um exemplo de profissional e de pessoa.

Aos meus coorientadores, ao longo desta trajetória acadêmica e de vida, Prof.<sup>a</sup> Dra. Clarice Aparecida Megguer e Dra. Júlien da Silva Lima (Iniciação Científica), Prof. Dr. Marconi Batista Teixeira, Dra. Kelly Juliane Telles Nascimento (Mestrado), Dra. Caroline Müller (Mestrado e doutorado) e Dr. Adinan Alves da Silva (Doutorado), por compartilhar seus conhecimentos, pela disponibilidade em ensinar e por todos os conselhos, incentivos e amizade.

Aos membros da banca, Prof.<sup>a</sup> Dra. Sueisla Lopes Rezende Silva, Prof. Dr. Marconi Batista Teixeira, Prof. Dr. Adinan Alves da Silva e Prof.<sup>a</sup> Dra. Priscila Ferreira Batista, pelas sugestões e contribuições para a melhoria deste trabalho.

A Vanilda Maria Campos, secretária do PPGCA-AGRO, por ser sempre atenciosa, gentil e solícita em nos atender e, especialmente, pela amizade e pelas palavras de incentivo e conselhos.

A todos os colegas, egressos e/ou atuais integrantes do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal “LECO”, Adinan Silva, Ariana Carnevale, Camila Vasconcelos, Daniela Ataídes, Gabriel Almeida, Yasmin Barros, Roberto Vital, Verônica Junqueira, Priscila Batista, Dheyne Vieira, Emily Duarte, Mariela Melo e Maria Fernanda, por todos os momentos de aprendizagem, pelo apoio na execução do projeto e atividades do grupo e pela oportunidade de fazer amigos.

Em especial, ao meu amigo e colega de pós-graduação, Roberto Gomes Vital, cuja ajuda foi essencial para a execução deste trabalho, e também pelas longas conversas, incentivo e conselhos.

Ao meu colega de pós-graduação e amigo, Lucas Loram Lourenço, pelo apoio e momentos de aprendizagem e descontração.

Caroline Müller, que além de minha coorientadora, é um exemplo de dedicação, profissionalismo e humildade, uma amiga para toda a vida.

A todos os integrantes do Laboratório de Hidráulica e Irrigação, coordenados pelos professores Marconi Batista Teixeira e Frederico Antônio Loureiro Soares, pelo suporte e parceria durante todos estes anos. Em especial aos meus colegas e amigos, desde a graduação, Fabiano José de Campos Bastos, Fernando Nobre Cunha e Nelmício Furtado da Silva. Ao Prof. Marconi, cujo incentivo, apoio e confiança foram cruciais para o início desta jornada científica que culminou com o doutorado.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, coordenado pelo Prof. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho, em especial aos colegas de pós-graduação e parceiros de pesquisa, Arthur Almeida Rodrigues e Douglas Almeida Rodrigues. Ao Laboratório de Pós-colheita de Produtos Vegetais, coordenado pelo professor Osvaldo Resende, e ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, coordenado pelo professor Fabiano Guimarães Silva, por disponibilizar a infraestrutura e a equipe.

A todos os professores que contribuíram, direta ou indiretamente, para a minha formação acadêmica, desde o curso técnico até o doutorado, serei eternamente grata pela oportunidade de agregar conhecimentos e valores essenciais para a minha formação profissional e pessoal.

## BIOGRAFIA DA AUTORA

LUCIANA MINERVINA DE FREITAS MOURA, filha de Vera Lúcia Lima de Freitas Moura e Adenício Alves Moura, nasceu dia 21 de agosto de 1981, na cidade de Rio Verde, Goiás.

Em junho de 2008, ingressou no curso de Bacharelado em Agronomia pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – Goiás, graduando-se em maio de 2013.

Em agosto de 2013, iniciou no curso de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, concluindo em agosto de 2015.

Em agosto de 2015, ingressou no Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, sob a orientação do professor Alan Carlos Costa, concluindo com a defesa da tese em 2019.



## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	1
Referências Bibliográficas .....	3
2. OBJETIVOS .....	6
CAPÍTULO I.....	7
<b>Morpho-physiological Traits and Oil Quality in Drought-Tolerant <i>Raphanus sativus</i>L. for Biofuel Production .....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 Introduction.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2 Materials and methods .....</b>	<b>9</b>
3.2.1. <i>Experimental conditions and design .....</i>	<i>9</i>
3.2.2. <i>Water relations .....</i>	<i>11</i>
3.2.3. <i>Gas exchange.....</i>	<i>11</i>
3.2.4. <i>Chlorophyll a fluorescence .....</i>	<i>12</i>
3.2.5. <i>Electrolyte leakage rate.....</i>	<i>12</i>
3.2.6. <i>Chloroplast pigments.....</i>	<i>13</i>
3.2.7. <i>Proline .....</i>	<i>13</i>
3.2.8. <i>Sugars and starch .....</i>	<i>13</i>
3.2.9. <i>Productivity components .....</i>	<i>14</i>
3.2.10. <i>Chemical characterization of R. sativus crude oil .....</i>	<i>15</i>
3.2.11. <i>Statistical analysis .....</i>	<i>15</i>
<b>3.3 Results .....</b>	<b>16</b>

3.3.1. <i>Water relations</i> .....	16
3.3.2. <i>Physiological traits</i> .....	17
3.3.3. <i>Biochemical traits</i> .....	22
3.3.4. <i>Component production and crude oil characterization</i> .....	24
<b>3.4 Discussion</b> .....	26
<b>3.5 Conclusion</b> .....	29
<b>3.6 References</b> .....	30
CAPÍTULO II.....	35
<b>Raízes muito finas conferem tolerância ao déficit hídrico em <i>Crambe abyssinica</i> Hochst e <i>Raphanus sativus</i> L. e contribuem com a recuperação após a reidratação</b> .....	35
Resumo .....	35
4.1. Introdução .....	36
<b>4.2 Material e Métodos</b> .....	38
4.2.1. Material vegetal e condições de cultivo .....	38
4.2.2. Relações hídricas .....	39
4.2.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	39
4.2.4. Pigmentos fotossintéticos .....	40
4.2.5. Danos celulares.....	40
4.2.6. Atividades das enzimas SOD, CAT e POX.....	41
4.2.7. Análise morfológica da parte aérea e do sistema radicular .....	42
4.2.8. Caracterização micromorfométrica foliar.....	43
4.2.9. Análise estatística .....	43
4.3 Resultados .....	44
4.3.1. Relações hídricas .....	44
4.3.2. Trocas gasosas .....	46
4.3.4. Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	48
4.3.5. Pigmentos cloroplastídicos.....	50
4.3.6. Taxa de liberação de eletrólitos e conteúdo de malondialdeído.....	52
4.3.7. Atividades das enzimas antioxidante SOD, CAT e POX.....	52
4.3.8. Características morfológicas da parte aérea .....	54
4.3.9. Alocação de biomassa .....	56
4.3.10. Características morfológicas do sistema radicular .....	58
4.3.11. Proporção de raízes por classes de diâmetro no CTR, AST e VTR .....	60
4.3.12. Análises morfológicas da parte aérea e do sistema radicular .....	61
4.3.13. Características micromorfométrica foliares .....	64
4.4 Discussão.....	66
4.6. Referências .....	70
5. Conclusão Geral.....	75

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>Chapter I. Morpho-physiological Traits and Oil Quality in Drought-Tolerant <i>Raphanus sativus</i> L. for Biofuel Production.....</b>	<b>7</b>
<i>Table 1. Chemical and physical-water characteristics of the soil in the experimental area. Rio Verde, GO, Brazil.....</i>	<i>10</i>
<b>Capítulo II. Raízes muito finas conferem tolerância ao déficit hídrico em <i>Crambe abyssinica</i> Hochst e <i>Raphanus sativus</i> L. e contribuem com a recuperação após a reidratação.....</b>	<b>37</b>
Tabela 1. Profundidade radicular (PR, cm), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento de raiz muito fina (CRMF, cm), comprimento de raiz fina (CRF, cm), comprimento de raiz grossa (CRG, cm), comprimento total de raiz (CTR, cm), área de superfície de raiz muito fina (ASRMF, cm <sup>2</sup> ), área de superfície de raiz fina (ASRF, cm <sup>2</sup> ), área de superfície de raiz grossa (ASRG, cm <sup>2</sup> ), área de superfície total de raiz (AST, cm <sup>2</sup> ), volume de raiz muito fina (VRMF, cm <sup>3</sup> ), volume de raiz fina (VRF, cm <sup>3</sup> ), volume de raiz grossa (VRG, cm <sup>3</sup> ) e volume total de raiz (VTR, cm <sup>3</sup> ) em plantas de <i>Crambe abyssinica</i> e <i>Raphanus sativus</i> submetidas as condições de plena irrigação (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias, após imposição dos tratamentos (DAT). Raízes muito finas (RMF, Ø inferior a 0,5 mm), raízes finas (RF, 0,5 < Ø < 2,0 mm) e raízes grossas (RG, Ø > 2,0 mm).....	59
Tabela 2. Área foliar específica (AFE, m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> ), razão de área foliar (RAF, m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> ), razão raiz/parte aérea (R/PA), razão comprimento total de raiz/massa seca da parte aérea (CTR/MSPA, cm g <sup>-1</sup> ), comprimento específico de raiz (CER, cm g <sup>-1</sup> ), finura de raiz (FR, cm cm <sup>-3</sup> ), densidade de tecido radicular (DTR, g cm <sup>-3</sup> ), razão área radicular/área foliar (A <sub>R</sub> /A <sub>F</sub> , m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> ), área de superfície específica (ASE, cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ) e densidade de comprimento de raiz (DCR, cm cm <sup>-3</sup> ) em plantas de <i>Crambe abyssinica</i> e <i>Raphanus sativus</i> submetidas as condições de plena irrigação (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT).....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

### **Chapter I. Morpho-physiological Traits and Oil Quality in Drought-Tolerant *Raphanus sativus* L. for Biofuel Production.....7**

**Fig. 1** Predawn leaf water potential ( $\Psi_w$ ) [A, B], leaf osmotic potential ( $\Psi_s$ ) [C], and relative water content (RWC) [D] in *Raphanus sativus* plants subjected to three water levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity and at three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Bars represent means  $\pm$  SE [ $n = 4$  (C),  $n = 12$  (A, B, D)]. Means followed by different letters, uppercase for water replacements and lowercase for development stages, differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).....16

**Fig. 2** Net photosynthetic assimilation rate ( $A$ ) [A], stomatal conductance ( $g_s$ ) [B], transpiratory rate ( $E$ ) [C], the ratio between internal and external  $CO_2$  concentration ( $C_i/C_a$ ) [D], instantaneous carboxylation efficiency ( $A/C_i$ ) [E], and the water use efficiency (WUE) [F, G] in *Raphanus sativus* plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity and at three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Bars represent means  $\pm$  SE [ $n = 4$  (A, B, C, E),  $n = 12$  (D, F, G)]. Means followed by the same letter, uppercase for water replacements and lowercase for development stages, differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).....18

**Fig. 3** Minimum fluorescence ( $F_0$ ) [A], potential quantum yield of PSII ( $F_v/F_m$ ) [B], effective quantum yield of PSII ( $\Delta F/F_m'$ ) [C], non-photochemical quenching coefficient (NPQ) [D], apparent ETR [E], and the ratio between ETR and photosynthetic assimilation rate (ETR/ $A$ ) [F] in *Raphanus sativus* plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity and at three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Bars represent means  $\pm$  SE [ $n = 4$  (B, D, E, F),  $n = 12$  (A, C)]. Means followed by the same letter, uppercase for water replacements and lowercase for development stages, differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).....20

**Fig. 4** Electrolyte leakage rate (ELR) in *Raphanus sativus* plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity and at three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Bars represent means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ).....21

**Fig. 5** Chlorophyll *a* (Chla) [A], chlorophyll *b* (Chlb) [B], total carotenoids (*Car*) [C], and total chlorophyll (Chla+b) [D] concentration in *Raphanus sativus* plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity and at three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Bars represent means  $\pm$  SE [ $n = 4$  (B, D),  $n = 12$  (A, C)]. Means followed by the same letter, uppercase for water replacements and lowercase for development stages, differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).....22

**Fig. 6** Free proline (Pro) content [A, B], total soluble sugars (TSS) [C], reducing sugars (RS) [D], non-reducing sugars (NRS) [E], starch (Sta) [F], and total non-structural carbohydrate (TNC) [G] in *Raphanus sativus* plants subject to three water levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity and at three different phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Bars represent means  $\pm$  SE [ $n = 4$  (A, B, C, D),  $n = 12$  (E, F, G)]. Means followed by the same letter, uppercase for water replacements and lowercase for development stages, differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).....23

**Fig. 7** Correlation between free proline (Pro) content and osmotic potential ( $\Psi_s$ ) [A] and free proline (Pro) content and electrolyte leakage rate (ELR) [B] in *Raphanus sativus* plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity during three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF).....24

**Fig. 8** Total pod matter (TPM) [A], bark matter (BM) [B], and grain matter of 100 pods (GM) [C] and grain yield (GY) [D] in *Raphanus sativus* plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity. Bars represent means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Means followed by the same letter differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).....25

**Fig. 9** Grain oil content (OC) [A] and acid value (AV) [B], peroxide value (PV) [C], and iodine value (IV) [D] of the *Raphanus sativus* oil from plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity. Bars represent means  $\pm$  SE [ $n = 8$  (A),  $n = 12$  (B, C, D)]. Means followed by the same letter differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).....26

**Capítulo II. Raízes muito finas conferem tolerância ao déficit hídrico em *Crambe abyssinica* Hochst e *Raphanus sativus* L. e contribuem com a recuperação após a reidratação.....35**

Figura 1. Potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) [A; E], potencial osmótico foliar ( $\Psi_{sf}$ ) [B; F], potencial osmótico radicular ( $\Psi_{sr}$ ) [C; G] e conteúdo relativo de água foliar (CRA) [D; H] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).....45

Figura 2. Taxa fotossintética (A) [A; F], condutância estomática ( $g_s$ ) [B; G], taxa transpiratória (E) [C; H], relação entre concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ) [D; I] e eficiência do uso da água instantânea (EUA) [E; J] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).....47

Figura 3. Rendimento quântico potencial do FSII ( $F_v/F_m$ ) [A; F], rendimento quântico efetivo do FSII ( $\Delta F/F_m'$ ) [B; G], coeficiente de dissipação não-fotoquímico (NPQ) [C; H], taxa de transporte de elétrons (ETR) [D; I] e a razão entre o transporte de elétrons e a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> ( $ETR/A$ ) [E; J] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).....49

Figura 4. Concentração de clorofila *a* (Chl *a*) [A; E], clorofila *b* (Chl *b*) [B; F], clorofila total (Chl *a+b*) [C; G] e carotenoides (*Car*) [D; H] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).....51

Figura 5. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE) [A; C] e conteúdo de malondialdeído (MDA) [B; D] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).....52

Figura 6. Atividade da dismutase do superóxido (SOD) [A; D], catalase (CAT) [B; E] e peroxidase (POX) [C; F] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).....53

Figura 7. Altura de planta (AP) [A; F], diâmetro de caule (DC) [B; G], número de nós (NN) [C; H], número de folhas (NF) [D; I] e área foliar (AF) [E; J] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).....55

Figura 8. Massa seca de folhas (MSF) [A; F], massa seca de caule (MSC) [B; G], massa seca de raiz (MSR) [C; H], massa seca da parte aérea (MSPA) [D; I] e massa seca total (MT) [E; J] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após

imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).....57

Figura 9. Proporção de raízes muito finas, finas e grossas no comprimento total radicular (CTR) [A; D], área de superfície radicular (ASR) [B; E] e volume total radicular (VTR) [C; F] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias ( $n = 5$ ). Classes de diâmetros: raízes muito finas (RMF,  $\varnothing < 0,5$  mm), raízes finas (RF,  $0,5 < \varnothing < 2,0$  mm) e raízes grossas (RG,  $\varnothing > 2,0$  mm).....61

Figura 10. Espessura da epiderme adaxial (Ep Ad) [A; G], epiderme abaxial (Ep Ab) [B; H], parênquima paliçádico (PP) [C; I], parênquima esponjoso (PE) [D; J], mesofilo (MS) [E; K] e espessura foliar (EF) [F; L] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).....65

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

A	Taxa fotossintética	( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
AF	Área foliar	$\text{m}^2$
AFE	Área foliar específica	$\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$
AM	Amido	$\text{mg g}^{-1} \text{ MF}$
ANR	Açúcares não redutores	$\text{mg g}^{-1} \text{ MF}$
AP	Altura da planta	(cm)
AR	Açúcares redutores	$\text{mg g}^{-1} \text{ MF}$
$A_R/A_F$	Razão entre área radicular e área foliar	$\text{m}^2 \text{ m}^2$
ASE	Área de superfície específica	$\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$
ASRF	Área de superfície de raízes finas	$\text{cm}^2$
ASRG	Área de superfície de raízes grossas	$\text{cm}^2$
ASRMF	Área de superfície de raízes muito finas	$\text{cm}^2$
AST	Área de superfície total	$\text{cm}^2$
AST	Açúcares solúveis totais	$\text{mg g}^{-1} \text{ MF}$
CC	Capacidade de campo	
CE	Comprimento específico de raiz	$\text{cm g}^{-1}$
$C_i/C_a$	Relação entre concentração interna e externa de $\text{CO}_2$	
CRA	Conteúdo relativo de água	%
CRF	Comprimento de raízes finas	cm
CRG	Comprimento de raízes grossas	cm
CRMF	Comprimento de raízes muito finas	cm
CT	Carboidratos totais	$\text{mg g}^{-1} \text{ MF}$
CTR	Comprimento total de raiz	cm
DAP	Dias após plantio	
DAT	Dias após aplicação dos tratamentos	
DC	Diâmetro do caule	(mm)
DCR	Densidade de comprimento radicular	$\text{cm cm}^{-3}$
DMR	Diâmetro médio radicular	mm



DTR	Densidade de tecido radicular	$\text{g cm}^{-3}$
$E$	Taxa transpiratória	$(\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})$
Ep Ab	Espessura da epiderme abaxial	$\mu\text{m}$
Ep Ad	Espessura da epiderme adaxial	$\mu\text{m}$
ETR	Taxa de transporte de elétrons	$(\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1})$
EUA	Eficiência instantânea do uso da água	$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O})$
FR	Finura de raiz	$\text{cm cm}^{-1}$
FSII	Fotossistema II	
$F_v/F_m$	Rendimento quântico potencial do fotossistema II	
$g_s$	Condutância estomática	$(\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})$
IA	Índice de acidez	$(\text{mg KOH g}^{-1} \text{ óleo})$
II	Índice de iodo	$(\text{g I}_2 \text{ 100 g}^{-1} \text{ óleo})$
IP	Índice de peróxido	$(\text{mEq kg}^{-1} \text{ óleo})$
MC	Massa seca da casca	$\text{g}$
MG	Massa seca de grãos	$\text{g}$
MS	Espessura do mesofilo	$\mu\text{m}$
MSC	Massa seca do caule	$(\text{g planta}^{-1})$
MSF	Massa seca da folha	$(\text{g planta}^{-1})$
MSPA	Massa seca da parte aérea	$\text{g}$
MSR	Massa seca da raiz	$(\text{g planta}^{-1})$
MST	Massa seca total	$\text{g}$
MTV	Massa seca total de vagens	$\text{g}$
NF	Número de folhas	
NN	Número de nós	
NPQ	Coefficiente de extinção não fotoquímica	
PE	Espessura do parênquima esponjoso	$\mu\text{m}$
PP	Espessura do parênquima paliçádico	$\mu\text{m}$
PR	Profundidade radicular	$\text{cm}$
PRO	Prolina	$(\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ MF})$
R/PA	Razão entre raízes e parte aérea	
RAF	Razão de área foliar	$\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$
TLE	Taxa de liberação de eletrólitos	$\%$
TO	Teor de óleo	$\%$
VRF	Volume de raízes finas	$\text{cm}^3$
VRG	Volume de raízes grossas	$\text{cm}^3$
VRMF	Volume de raízes muito finas	$\text{cm}^3$
VTR	Volume total de raízes	$\text{cm}^3$
$\Delta F/F_m'$	Rendimento quântico efetivo do fotossistema II	$\text{cm}^3$
$\Psi_{sf}$	Potencial osmótico foliar	$(\text{MPa})$
$\Psi_{sr}$	Potencial osmótico da raiz	$(\text{MPa})$
$\Psi_w$	Potencial hídrico foliar antemanhã	$(\text{MPa})$

## RESUMO

MOURA, LUCIANA MINERVINA DE FREITAS. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2019. **Integrações morfo-fisiológicas de raiz e parte aérea conferem tolerância à seca em plantas de *Crambe abyssinica* Hochst e *Raphanus sativus* L.** Orientador: DSc. Alan Carlos Costa. Coorientadores: DSc. Caroline Müller, DSc. Adinan Alves da Silva.

A precocidade, rusticidade, boa produtividade e alto teor de óleo são atributos que viabilizam o cultivo de *Raphanus sativus* e *Crambe abyssinica* no período de entressafra na região Centro-Oeste do Brasil. A ocorrência de déficit hídrico, no entanto, pode ser limitante ao cultivo destas culturas, pois a época de plantio coincide com a estação seca nesta região. A escassez de informações, na literatura, acerca da ecofisiologia destas espécies expostas à condição de estresse torna essencial a execução de estudos neste sentido. Deste modo, objetivou-se avaliar os efeitos do déficit hídrico nas características da parte aérea e do sistema radicular de *C. abyssinica* e *R. sativus* e identificar quais destas características estão relacionadas com a tolerância à seca destas espécies. No estudo I, plantas de *Raphanus sativus* L. foram cultivadas, em campo, sob os tratamentos compostos pelas reposições hídricas de 100% (controle), 66% e 33% da capacidade de campo (déficit hídrico), nos estádios fenológicos de crescimento vegetativo, florescimento e enchimento de grãos. O experimento foi conduzido sob delineamento de blocos ao acaso, em esquema de parcelas subdivididas, com quatro repetições. Foram avaliadas as características fisiológicas, bioquímicas, os componentes de produção e a qualidade físico-química do óleo bruto extraído das sementes. Os resultados demonstraram a tolerância fisiológica de *Raphanus sativus* ao déficit hídrico durante a

fase de crescimento vegetativo e sensibilidade durante o estágio de enchimento de grãos. No estudo II, plantas de *Crambe abyssinica* e *Raphanus sativus* foram cultivadas em citrovasos, em casa de vegetação climatizada, nas condições de plena irrigação (controle, 90% da capacidade de campo), déficit hídrico (DH, 40% da capacidade de campo) com duração de 7, 14 e 21 dias, e reidratação (RT), para avaliação da capacidade de recuperação das plantas após 48 horas de restabelecimento da rega. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com cinco repetições. Após cada período de imposição do déficit hídrico e de reidratação foram avaliadas as relações hídricas, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, conteúdo de pigmentos cloroplastídicos, taxa de liberação de eletrólitos, conteúdo de malondialdeído, atividade das enzimas antioxidantes, micromorfometria foliar e características morfológicas da parte aérea e sistema radicular. Os resultados indicaram maior sensibilidade de *Crambe abyssinica* e *Raphanus sativus* ao déficit hídrico com duração de 14 e 21 dias, porém, com ativação de mecanismos adaptativos da parte aérea e do sistema radicular. As respostas de tolerância ao estresse envolveram a manutenção do turgor celular, aumento da atividade das enzimas antioxidantes e menor diâmetro radicular. *Raphanus sativus* demonstrou maior tolerância ao déficit hídrico e recuperação rápida das plantas, principalmente, devido a eficiência do sistema radicular.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Brassicaceae*, limitação hídrica, mecanismos adaptativos, arquitetura de raízes, biodiesel.

## ABSTRACT

MOURA, LUCIANA MINERVINA DE FREITAS. Goiano Federal Institute - Campus Rio Verde – GO, August 2019. **Morphophysiological root and shoot integrations confer drought tolerance on *Crambe abyssinica* Hochst and *Raphanus sativus* L. plants.** Advisor: DSc. Alan Carlos Costa. Coadvisor: DSc. Caroline Müller, DSc. Adinan Alves da Silva.

Precocity, rusticity, good productivity and high oil content are attributes that enable the cultivation of *Raphanus sativus* and *Crambe abyssinica* during the off-season in the Central regions of Brazil. The water deficit occurrence, however, may be limiting these crops cultivation, since the planting season coincides with the dry season in the region. The literature information scarcity about the ecophysiology of these species exposed to stress conditions turn essential to carry out studies in this direction. Thus, the objective was to evaluate the water deficit effects on shoot and root system characteristics of *Crambe abyssinica* and *Raphanus sativus* as well as to identify which of these characteristics are related to drought tolerance of these species. In study I, plants of *Raphanus sativus* L. were cultivated in field under treatments composed by 100% (control), 66% and 33% of field capacity (water deficit), in the phenological development stages of vegetative, flowering and grain filling. The experimental was a randomized block design in a split plot scheme, with four replicates. Physiological, biochemical traits, production components and physicochemical quality of crude oil extracted from seeds were evaluated. Results demonstrated the *Raphanus sativus* physiological tolerance to water deficit during the vegetative growth stage and sensitivity during the grain filling

stage. In study II, *Crambe abyssinica* and *Raphanus sativus* were cultivated in citrus plants in a greenhouse under full irrigation conditions (control, 90% of field capacity), water deficit (WD, 40% of field capacity), 7, 14 and 21 days, and rehydration (RT), to evaluate the plants' recovery capacity after 48 hours of irrigation restoration. Experimental design was randomized blocks, with five replications. After each period of water deficit and rehydration imposition, the water relations, gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, chloroplast pigment content, electrolyte release rate, malondialdehyde content, antioxidant enzyme activity, leaf micromorphometry and morphological traits of the shoot and root system were evaluated. Results indicated higher sensitivity of *Crambe abyssinica* and *Raphanus sativus* to water deficit lasting 14 and 21 days, however, with activation of adaptive mechanisms of the shoot and root system. Stress tolerance responses evolved maintenance of cell turgor, increased activity of antioxidant enzymes and smaller root diameter. *Raphanus sativus* demonstrated higher tolerance to water deficit and rapid plant recovery, mainly due to the root system efficiency.

**KEYWORDS:** Brassicaceae, water limitation, adaptive mechanisms, root architecture, biodiesel.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda por fontes alternativas de energia renovável, como o biodiesel, em substituição aos combustíveis de origem fóssil, tem ampliado a busca por oleaginosas destinadas ao fornecimento de óleo para a indústria química (Junginger et al. 2019). No Brasil, as oleaginosas são as matérias-primas mais utilizadas para a produção de biodiesel. Com grandes extensões territoriais e clima propício para a atividade agrícola, a produção de oleaginosas com fins energéticos coloca o país em posição de destaque no mercado mundial de biodiesel (André Cremonez et al. 2015). Vários fatores, no entanto, podem afetar a cadeia produtiva dessas matérias-primas, daí a necessidade do estabelecimento de espécies mais viáveis para cada região do país (Bhuiya et al. 2016). Dentre os fatores que podem comprometer a produção agrícola, tem-se a limitação hídrica (Cheeseman 2016).

Devido às mudanças climáticas, eventos extremos de seca estão se tornando cada vez mais frequentes e severos, em várias regiões do mundo, e tem causado impactos negativos substanciais no crescimento e desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, na produtividade das culturas (Berger et al. 2016). A extensão dos danos no rendimento de grãos depende do estágio fenológico em que ocorre o estresse. Para a maioria das culturas o estágio reprodutivo constitui a fase mais crítica ao déficit hídrico, especialmente durante o enchimento de grãos, pela elevada atividade fisiológica (Farooq et al. 2016). O déficit hídrico afeta diversos processos fisiológicos, levando as plantas a responderem, rapidamente, mediante fechamento estomático, que embora aumente a resistência difusiva ao vapor de água, reduz a transpiração, diminuem o suprimento de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese, a dissipação da energia térmica, o transporte de

nutrientes por fluxo de massa (Krasensky and Jonak 2012; Flexas et al. 2018), a dissipação fotoquímica da energia absorvida pelo complexo antena (Pilon et al. 2018; Dong et al. 2019), entre outros. Muitos destes mecanismos refletem estratégias adaptativas da planta em resposta a condição de estresse (Chen et al. 2016).

A capacidade de ajustar-se e de sobreviver à situação de deficiência hídrica, além da recuperação após cessada esta condição, depende dos mecanismos de adaptação morfofisiológicos das plantas (Rivas et al. 2016; Abid et al. 2018). Dentre as características adaptativas da parte aérea, tem-se redução da área foliar (Sallam et al. 2019), alterações anatômicas nos tecidos foliares (Zheng et al. 2017; Cruz et al. 2019), controle estomático (Chaves et al. 2016), eficiência no uso da água (Violet-Chabrand et al. 2016), turgescência celular (Hu and Xiong 2014), ajustamento osmótico (Turner 2018), estabilidade da membrana celular e mecanismos de defesa antioxidante (Swapna and Shylaraj 2017). Características morfológicas radiculares também estão envolvidas na adaptação da planta às condições de seca (Saidi et al. 2010; Vadez 2014). A arquitetura e a função do sistema radicular exercem importante papel na absorção de água, e nutrientes, em condições hídricas limitantes (Fry et al. 2018; Lynch 2018). Assim, quando integradas, as respostas adaptativas da parte aérea e do sistema radicular determinam o grau de tolerância à seca das espécies (Berger et al. 2016; Stoddard and Acosta-gallegos 2019).

O interesse na produção de óleo vegetal com fins energéticos, associado à necessidade de consolidar um mercado sustentável de energia renovável, tem ampliado a busca por culturas destinadas a este fim (da Silva César et al. 2019; Taghizadeh-Hesary et al. 2019). O cultivo de *Crambe abyssinica* (Crambe) e *Raphanus sativus* L. (Nabo forrageiro), neste caso, tem-se destacado pelo potencial destas culturas para o fornecimento de óleo para a indústria química (Bassegio et al. 2016; Silveira et al. 2019). Atribui-se este potencial a alta produtividade das culturas e ao elevado teor de óleo nas sementes, assim como, características físico-químicas adequadas para a produção de biodiesel (Chammoun et al., 2013; Phoo et al., 2014). Soma-se a isso os atributos de precocidade e rusticidade, que aumentam o potencial de uso de *C. abyssinica* e *R. sativus* nos sistemas de rotação de cultura, em sucessão às culturas da soja e milho, durante a safra de inverno (março/abril) (Falasca et al. 2010; Cremonez et al. 2013).

A restrição hídrica, comum na região Centro-Oeste do Brasil durante o período de inverno, pode constituir fator limitante ao cultivo destas espécies. Como há escassez

de estudos informando sobre as alterações causadas pelo déficit hídrico nas características das sementes de oleaginosas, que pode afetar a qualidade do óleo, torna-se relevante a execução de trabalhos neste sentido. Além disso, gerar informações sobre as respostas morfofisiológicas destas espécies ao déficit hídrico, principalmente na identificação das características, da parte aérea e do sistema radicular, que constituam estratégias de tolerância à seca, mostra-se crucial para a consolidação do cultivo de *C. abyssinica* e *R. sativus* no sistema de produção, especialmente, em áreas sujeitas a limitações hídricas.

Diante do exposto, neste estudo, trabalhando com a hipótese de que *C. abyssinica* e *R. sativus* possuem características morfológicas radiculares, que associadas com ajustamentos fisiológicos da parte aérea, constituem os principais mecanismos que conferem tolerância à seca a estas plantas.

#### Referências Bibliográficas

- Abid M, Ali S, Qi LK, et al (2018) Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sci Rep* 8:1–15. doi: 10.1038/s41598-018-21441-7
- André Cremonez P, Feroldi M, César Nadaleti W, et al (2015) Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. *Renew Sustain Energy Rev* 42:415–428. doi: 10.1016/j.rser.2014.10.004
- Bassegio D, Zanotto MD, Santos RF, et al (2016) Oilseed crop crambe as a source of renewable energy in Brazil. *Renew Sustain Energy Rev* 66:311–321. doi: 10.1016/j.rser.2016.08.010
- Berger J, Palta J, Vadez V (2016) Review: An integrated framework for crop adaptation to dry environments: Responses to transient and terminal drought. *Plant Sci* 253:58–67. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.09.007
- Bhuiya MMK, Rasul MG, Khan MMK, et al (2016) Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel - Part: 1 selection of feedstocks, oil extraction techniques and conversion technologies. *Renew Sustain Energy Rev* 55:1109–1128. doi: 10.1016/j.rser.2015.04.163
- Chaves MM, Costa JM, Zarrouk O, et al (2016) Controlling stomatal aperture in semi-arid regions—The dilemma of saving water or being cool? *Plant Sci* 251:54–64. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.06.015
- Cheeseman J (2016) Food Security in the Face of Salinity, Drought, Climate Change, and Population Growth. Elsevier Inc.
- Chen D, Wang S, Cao B, et al (2016) Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. *Front Plant Sci* 6:1–15. doi: 10.3389/fpls.2015.01241
- Cremonez PA, Feiden A, Cremonez FE, et al (2013) Nabo Forrageiro: Do Cultivo a Produção De Biodiesel. *Acta Iguazu* 2:64–72



- Cruz Y da C, Scarpa ALM, Pereira MP, et al (2019) Growth of *Typha domingensis* as related to leaf physiological and anatomical modifications under drought conditions. *Acta Physiol Plant* 41:1–9. doi: 10.1007/s11738-019-2858-1
- da Silva César A, Conejero MA, Barros Ribeiro EC, Batalha MO (2019) Competitiveness analysis of “social soybeans” in biodiesel production in Brazil. *Renew Energy* 133:1147–1157. doi: 10.1016/j.renene.2018.08.108
- Dong S, Jiang Y, Dong Y, et al (2019) Saudi Journal of Biological Sciences A study on soybean responses to drought stress and rehydration. *Saudi J Biol Sci*. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.08.005
- Falasca SL, Flores N, Lamas MC, et al (2010) *Crambe abyssinica*: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. *Int J Hydrogen Energy* 35:5808–5812. doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.02.095
- Farooq M, Gogoi N, Barthakur S, Baroowa B, Bharadwaj N, Alghamdi SS, Siddique KHM (2016) Drought stress in grain legumes during reproduction and grain filling. *J Agron Crop Sci* 203:81–102. doi.org/10.1111/jac.12169
- Flexas J, Carriquí M, Nadal M (2018) Gas exchange and hydraulics during drought in crops: Who drives whom? *J Exp Bot* 69:3791–3795. doi: 10.1093/jxb/ery235
- Fry EL, Evans AL, Sturrock CJ, et al (2018) Root architecture governs plasticity in response to drought. *Plant Soil* 433:189–200. doi: 10.1007/s11104-018-3824-1
- Hu H, Xiong L (2014) Genetic Engineering and Breeding of Drought-Resistant Crops. *Annu Rev Plant Biol* 65:715–741. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040000
- Junginger HM, Mai-Moulin T, Daiglou V, et al (2019) The future of biomass and bioenergy deployment and trade: a synthesis of 15 years IEA Bioenergy Task 40 on sustainable bioenergy trade. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 13:247–266. doi: 10.1002/bbb.1993
- Krasensky J, Jonak C (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp Bot* 63:1593–1608. doi: 10.1093/jxb/err460
- Lynch JP (2018) Rightsizing root phenotypes for drought resistance. *J Exp Bot* 69:3279–3292. doi: 10.1093/jxb/ery048
- Pilon C, Snider JL, Sobolev V, et al (2018) Assessing stomatal and non-stomatal limitations to carbon assimilation under progressive drought in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *J Plant Physiol* 231:124–134. doi: 10.1016/j.jplph.2018.09.007
- Rivas R, Falcão HM, Ribeiro R V., et al (2016) Drought tolerance in cowpea species is driven by less sensitivity of leaf gas exchange to water deficit and rapid recovery of photosynthesis after rehydration. *South African J Bot* 103:101–107. doi: 10.1016/j.sajb.2015.08.008
- Saidi A, Ookawa T, Hirasawa T (2010) Responses of root growth to moderate soil water deficit in wheat seedlings. *Plant Prod Sci* 13:261–268. doi: 10.1626/pps.13.261
- Sallam A, Alqudah AM, Dawood MFA, et al (2019) Drought stress tolerance in wheat and barley: Advances in physiology, breeding and genetics research. *Int J Mol Sci* 20:. doi: 10.3390/ijms20133137
- Silveira EG, Barcelos LFT, Perez VH, et al (2019) Biodiesel production from non-edible forage turnip oil by extruded catalyst. *Ind Crops Prod* 139:111503. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111503
- Stoddard FL, Acosta-gallegos JA (2019) Association of Shoot and Root Responses to Water Deficit in Young Faba Bean (*Vicia faba* L.) Plants. 10:1–10. doi: 10.3389/fpls.2019.01063
- Swapna S, Shylaraj KS (2017) Screening for Osmotic Stress Responses in Rice Varieties under Drought Condition. *Rice Sci* 24:253–263. doi: 10.1016/j.rsci.2017.04.004

- Taghizadeh-Hesary F, Rasoulinezhad E, Yoshino N (2019) Energy and Food Security: Linkages through Price Volatility. *Energy Policy* 128:796–806. doi: 10.1016/j.enpol.2018.12.043
- Turner NC (2018) Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress. *J Exp Bot* 69:3223–3233. doi: 10.1093/jxb/ery181
- Vadez V (2014) Root hydraulics: The forgotten side of roots in drought adaptation. *F Crop Res* 165:15–24. doi: 10.1016/j.fcr.2014.03.017
- Vialet-Chabrand S, Matthews JSA, Brendel O, et al (2016) Modelling water use efficiency in a dynamic environment: An example using *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 251:65–74. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.06.016
- Zheng H, Zhang X, Ma W, et al (2017) Morphological and physiological responses to cyclic drought in two contrasting genotypes of *Catalpa bungei*. *Environ Exp Bot* 138:77–87. doi: 10.1016/j.envexpbot.2017.02.016

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar os efeitos do déficit hídrico nas características morfofisiológicas da parte aérea e do sistema radicular de *Crambe abyssinica* e *Raphanus sativus* e identificar quais destas características estão relacionadas com a tolerância à seca destas espécies.

### 2.2 Específicos

Avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas, componentes de produção e qualidade do óleo de plantas de *Raphanus sativus*, em diferentes estádios de desenvolvimento, cultivadas sob condições de déficit hídrico.

Identificar alterações na morfologia das raízes de *Crambe abyssinica* e *Raphanus sativus* cultivadas sob déficit hídrico, com subsequente reidratação, além de caracterizar as respostas de tolerância dessas espécies à seca.

## CAPÍTULO I

### **Morpho-physiological Traits and Oil Quality in Drought-Tolerant *Raphanus sativus* L. for Biofuel Production**

Artigo aprovado na qualificação em 28 de setembro de 2018, revisado pela empresa American Manuscript Editors e submetido para publicação a revista *Acta Physiologiae Plantarum*

#### **Abstract**

*Raphanus sativus* L. is a promising potential source of raw material for biodiesel fuel because of the high oil content in its grains. In Brazil, the species is cultivated during the off-season when rainfall is reduced, limiting crop productivity. In the present study, we characterized the effects of water restriction on physiological and biochemical responses, production components, and oil quality of *R. sativus* at various development stages. The treatments consisted of water replacement of 100% (control), 66%, and 33% of field capacity during the phenological stages of vegetative growth, flowering, and grain filling. The characteristics of water relations, gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, chloroplast pigment, proline, and sugar content were evaluated. At the end of the crop cycle, production components and oil chemical traits were also determined. The results suggested that, mainly in the vegetative growth stage, drought-tolerance of *R. sativus* was mediated by adjustments in its photosynthetic metabolism, the stability of its photochemical efficiency, increased proline concentrations, and maintenance of tissue

hydration. The grain filling was the most sensitive to water limitation, showing reductions in yield and oil content. Nevertheless, the chemical composition of the oil was not altered by the water deficit. This allows characterization of *R. sativus* species as drought-tolerant.

**Keywords:** Water deficit, Forage turnip, Adaptive strategies, Biodiesel

### 3.1 Introduction

The forage turnip (*Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg.) is a Brassicaceae oilseed crop, cultivated in the southern and central regions of Brazil as a winter crop following major crops such as soybean and corn (Oliveira et al. 2015). For a long time, *R. sativus* has been used for green manure, soil cover, nutrient recycling (Crusciol et al. 2005), soil decompression, crop rotation (Guedes Filho et al. 2013), and apiculture pasture (Ávila and Sondré 2012). Its high levels of erucic acid make it toxic and unfit for human consumption as a food crop (Chammoun et al. 2013). However, recent studies have identified *R. sativus* as a potential supply of raw material for the chemical industry (Shah et al. 2013; Vasconcelos et al. 2018). Its grains have high oil content (40–54%), possessing physicochemical characteristics important for biodiesel production (Chammoun et al. 2013; Oliveira et al. 2015). The predominance of fatty acids such as oleic acid confers greater oxidative stability than those of soybean and sunflower oils and reduces solid residue formation in biodiesel (Oliveira et al. 2015; Zhu et al. 2016). The low viscosity of the oil also improves engine performance, a feature of great importance for biodiesel production (Ávila and Sodr e 2012). Furthermore, reduced pollutant emission is an advantage of using vegetable oils as an alternative and renewable source of energy (Zhu et al. 2016).

As with other crop plants, grain yield depends on genotype, as well as adequate light, temperature, and water. Of these factors, water deficit is principally responsible for low crop yields (Martins et al. 2017). This concern has been aggravated by increasing climatic instability that has intensified longer drought periods in agricultural areas (Lobell and Gourdj i 2012).

Under limiting water conditions, responses such as stomatal closure, inhibition of CO<sub>2</sub> fixation-related enzyme activity (Chaves et al. 2009), reduction of photochemical activity (Baker 2008) and cell damage (Swapna and Shylaraj 2017) can occur. These

factors compromise plant growth and productivity (Ali and Anjum 2016) and alter the content and quality of the oil (Wang and Frei 2011).

The negative effects of water restriction depend on the duration, intensity, severity, and timing, in addition to the plant's genotype (Farooq et al. 2016; Zegaoui et al. 2017). To deal with this situation, plants trigger processes that prevent dehydration, including osmotic adjustment (Blum 2017) and root system growth (Hasibeder et al. 2015). Electron dissipation (Campos et al. 2014) and increased antioxidant enzymatic activity (Abedi and Pakniyat 2010; Hassan et al. 2017) are also important for preventing and mitigating cell damage. Therefore, the ability to perceive the stimulus and to trigger physiological and biochemical stress responses are essential for plant survival under drought conditions (Joshi et al 2016).

The use of *R. sativus* in industrial oil production depends on the technical, economic, and socioenvironmental competitiveness of the crop (Chammoun et al. 2013). Furthermore, agronomic factors (e.g., plant productivity, seasonality, adaptation capacity) also affect the commodification of this species as an energy crop.

Considering a gap in the current state of knowledge between the water deficit and the oil quality in this species, the present study aimed to evaluate the physiological and biochemical responses, production components, and oil quality of *R. sativus* plants at various development stages, cultivated under conditions of water deficit.

## **3.2 Materials and methods**

### *3.2.1. Experimental conditions and design*

The experiment was conducted at the Experimental Station of Goiano Federal Institute of Science and Technology - Campus Rio Verde, Goiás, Brazil (17°48'28" S, 50°53'57" W) from June to October 2014. The regional climate is classified as tropical savanna (Aw; Köppen 1931) with two well-defined seasons: rainy summer (November to April) and dry winter (May to October). The annual average temperature and precipitation range from 20 °C to 35 °C and from 1,200 to 1,800 mm, respectively.

The soil was classified as dystroferric Red Latosol (LVdf) with medium texture (Embrapa 2013). The soil's chemical and physical-water characteristics at 0.00–0.20 m and 0.20–0.40 m are described in Table 1. The liming and soil fertilization were based on chemical analysis and the nutrient requirements of the species (Souza and Lobato 2004).

Table 2. Chemical and physical-water characteristics of the soil in the experimental area. Rio Verde, GO, Brazil.

Chemical characteristics											
Depth (m)	pH H <sub>2</sub> O	O.M. (g kg <sup>-1</sup> )	P (mg dm <sup>-3</sup> )	K	Ca	Mg	Al	H+Al	S (mg dm <sup>-3</sup> )	CEC (cmolc dm <sup>-3</sup> )	V (%)
0.00 – 0.20	6.2	63.42	7.06	2.04	20.4	16.8	0.0	57.75	41.80	99.55	41.99
0.20 – 0.40	6.6	44.47	2.65	4.09	14.4	13.2	0.0	44.55	31.69	76.24	41.57

Physical-water characteristics								
Depth (m)	Granulometry (g kg <sup>-1</sup> )			$\theta_{FC}$ (%)	$\theta_{PWP}$ (%)	Sd (g cm <sup>-3</sup> )	TP (cm <sup>-3</sup> cm <sup>-3</sup> )	Textural classification
	Sand	Silte	Clay					
0.00 – 0.20	458.3	150.2	391.5	51.83	30.50	1.27	0.55	Franco Argiloso
0.20 – 0.40	374.9	158.3	466.8	55.00	31.33	1.28	0.51	Clay

$\theta_{FC}$ , field capacity (10 kPa);  $\theta_{PWP}$ , permanent wilting point (1.500 kPa); Sd, soil density; TP, total porosity; pH values in distilled water, P and K, Mehlich<sup>-1</sup> extractor; O.M., organic matter; CEC, cation exchange capacity; V, base saturation (SB/CEC ratio).

To create appropriate plant stands, 20 seeds of *R. sativus* cultivar CATIAL 1000 were distributed per linear meter of furrow at a depth of 0.02 m. After crop establishment (28 days after planting – DAP), irrigation was suspended until the soil reached a critical tension of 20 kPa, at which point the treatments were initiated, consisting of water replacement at 100% (control), 66%, and 33% of soil moisture at field capacity (FC). The culture was irrigated using a drip line model with a nominal flow rate of 1.0 L h<sup>-1</sup> and drip spacing of 0.5 m. The irrigation need was determined based on pre-established critical tension and was monitored using digital puncture tensiometry. The tensiometers were installed at depths of 0.10 m, 0.20 m, and 0.30 m parallel to the planting row, with daily soil matrix reading ( $\Psi_m$ ). The physical and hydraulic characteristics of the soil were determined using the soil water retention curve according to Van Genuchten (1980). During the experimental period, crop management practices were carried out when necessary. Environmental conditions, including the mean of maximum (33.8 °C) and minimum (14.2 °C) temperatures, relative air humidity (51.6%) and absence of precipitation were recorded.

The experiment was conducted using a randomized block design, in a temporal split-plot scheme, with four replicates. The treatments were three levels of water replacement: 100% (Control), 66%, and 33% of FC, in the subplots during three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Experimental plots with an area of 8.0 m<sup>2</sup> (2.0 x 4.0 m) were composed of four sowing rows with 0.50-m spacing each, where only the two central rows were considered for measurement, thereby avoiding border effects.

Water relations, gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, chloroplast pigment, sugar, and proline (Pro) content analyses were performed during the VE (36 DAP), FL (50 DAP), and GF (57 DAP) developmental stages. The physiological and biochemical evaluations were carried out on three plants randomly selected within the useful area of each experimental unit. At the end of the crop cycle (90 DAP) the production components and chemical characteristics of the oil were evaluated.

### 3.2.2. Water relations

The predawn leaf water potential ( $\Psi_w$ ) was measured using a Scholander pressure chamber (3005-1412, Soilmoisture Equipment Corp., Goleta, CA, US). The leaf osmotic potential ( $\Psi_s$ ) was evaluated according Pask et al. (2012) using a vapor pressure osmometer (5600, Vapro, Wescor, USA). The  $\Psi_s$  values were obtained using the Van't Hoff equation:  $\Psi_s = -R \times T \times C_s$ , where *R* is the universal gas constant (0.08205 L atm mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>), *T* is the temperature in degrees Kelvin ( $T \text{ }^\circ\text{K} = T \text{ }^\circ\text{C} + 273$ ) and *C<sub>s</sub>* is the solute concentration (M), usually expressed in atmospheres and converted to MPa (0.987 ≈ 1 atm = 0.1 MPa). The relative water content (RWC) was evaluated by weighing fresh matter (FM), turgid matter (TM) and dry matter (DM) of leaf discs, calculated as  $\text{RWC (\%)} = (\text{FM} - \text{DM}) / (\text{TM} - \text{DM}) \times 100$ , according Barrs and Weatherley (1962). The  $\Psi_w$  and RWC were measured between 0400 h and 0600 h and the leaves for  $\Psi_s$  measurement were collected between 09h and 10h.

### 3.2.3. Gas exchange

Gas exchange was measured in fully-expanded leaves in the middle third of the plant to determine the net photosynthetic assimilation rate (*A*, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), stomatal



conductance ( $g_s$ , mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), transpiratory rate ( $E$ , mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) and the ratio between internal and external CO<sub>2</sub> concentration ( $C_i/C_a$ ). The water use efficiency was calculated as  $WUE = A/E$  and the instantaneous carboxylation efficiency was calculated as  $A/C_i$  (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>) (Machado et al. 2005). The measurements were performed between 08h and 11h using an infrared gas analyzer (IRGA, LI-6400XTR, Licor®, Nebraska, EUA), under constant photosynthetically-active radiation (1000 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), and at environmental atmospheric CO<sub>2</sub> concentration ( $C_a$ ) (~430 μmol mol<sup>-1</sup>), temperature (~25 °C) and relative air humidity (48–65 %).

#### 3.2.4. Chlorophyll *a* fluorescence

Chlorophyll *a* fluorescence variables were measured in the same leaf used for gas exchange measurements, using a pulse-amplitude-modulation fluorometer (MINI-PAM, Walz, Effeltrich, Germany). Initially, in dark-adapted leaves, minimum ( $F_0$ ) and maximum ( $F_m$ ) fluorescence were recorded and the potential quantum yield of PSII was calculated ( $F_v/F_m = [F_m - F_0]/F_m$ ) (Van Kooten and Snel 1990). After the previous exposure to light, a saturation pulse was applied and the maximum fluorescence ( $F_m'$ ), steady-state fluorescence ( $F_s$ ), and initial fluorescence in light-adapted leaves ( $F_0' = F_0/[F_m - F_0/F_m] + [F_0/F_m']$ ) and the effective quantum yield of PSII ( $\Delta F/F_m' = [F_m' - F]/F_m'$ ; Genty et al. 1989) were obtained.  $\Delta F/F_m'$  was also used to estimate the apparent electron transport rate ( $ETR = \Delta F/F_m' \cdot PAR \cdot 0.84 \cdot 0.5$ ; Bilger et al. 1995), where PAR is the photon flux (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) on the leaves; 0.84 is the absorbed fraction of light incident on leaves (Ehleringer 1981) and 0.5 is the excitation energy fraction directed to PSII (Laisk and Loreto 1996). From these data, it was possible to calculate the non-photochemical quenching coefficient ( $NPQ = [F_m - F_m']/F_m'$ ; (Bilger and Björkman 1990) and the estimation of the ratio between ETR and photosynthetic assimilation rate ( $ETR/A$ ; Ribeiro et al. 2009). Measurements were performed between 07h and 11h.

#### 3.2.5. Electrolyte leakage rate

Cell membrane stability was measured using the electrolyte leakage rate (ELR) in leaf discs. The samples were immersed in ultrapure water and the initial conductivity (IC, μS/cm) was measured after 24 h using a conductivity meter (CD-850, Instruthern,

São Paulo, Brazil). Then, the samples were dried in an oven at 100 °C for 1 h to obtain the total conductivity (TC,  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). The ELR was calculated as  $\text{ELR (\%)} = [(\text{IC}/\text{TC}) \times 100]$ , according to Pimentel et al. (2002). Leaf discs were collected at 06h.

### 3.2.6. Chloroplast pigments

Pigment concentrations were determined by leaf extraction with dimethylsulfoxide (DMSO) saturated with calcium carbonate according to Ronen and Galun (1984). Leaf discs were incubated in DMSO solution at 65 °C water bath for 24 h. The sample solution was read at 480, 649 and 665 nm using a UV-VIS spectrophotometer (Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). The concentration of chlorophyll *a* ( $\text{Chla} = 12,19A_{665} - 3,45A_{649}$ ), *b* ( $\text{Chlb} = 21,99A_{649} - 5,32A_{665}$ ) and total carotenoids ( $\text{Car} = (1000A_{480} - 2,14C_a - 70,16C_b)/220$ ) were calculated according Wellburn (1994) and expressed by area. The leaf discs were collected between 04h and 06h.

### 3.2.7. Proline

Free proline concentration was analyzed according Bates et al. (1973), with modifications. Fresh leaf material was homogenized in 80% ethanol to obtain the crude extract. The reaction solution composed by the crude extract, ninhydrin acid solution (ninhydrin, glacial acetic acid and 6M orthophosphoric acid, 1.25:30:20 m/v/v), glacial acetic acid and 125 mM glycine was incubated at 90 °C. After 35 min, the reaction was stopped in an ice bath and toluene was added for complete separation of proline. The supernatants were used for reading at 515 nm in a UV-VIS spectrophotometer and the absorbances were compared to the proline standard curve (0 to 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The results were expressed as  $\mu\text{mol mg}^{-1}$  fresh matter (FM).

### 3.2.8. Sugars and starch

Leaf material was immersed in 80% ethanol, incubated at 65 °C for 30 min and then homogenized. The final extracts obtained from the supernatants after three extraction washes of the leaf material were used to determine the contents of total soluble

sugars, reducing sugars, and non-reducing sugars. The pellet was oven-dried at 65 °C for 72 h for starch content determination.

The total soluble sugars (TSS) were determined using the phenol-sulfuric method according to DuBois et al. (1956). The reaction solution containing ethanolic extract, 5% phenol and sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) was maintained in a 30 °C water bath for 20 min. Upon reaching room temperature, the solution was read at 490 nm in a UV-VIS spectrophotometer and TSS was calculated using a standard sucrose curve (0 - 40 µg) and expressed as mg g<sup>-1</sup> FM.

Reducing sugars (RS) were determined using the dinitrosalicylic acid method according to Miller (1959). The reaction solution containing potassium sodium tartrate, sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>), sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), copper sulfate (CuSO<sub>4</sub>), ammonium molybdate (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, sodium arsenate (Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was read at 540 nm in a UV-VIS spectrophotometer. RS content was calculated using a glucose standard curve (0–50 µg) and expressed by fresh matter (mg g<sup>-1</sup> FM). Non-reducing sugars (NRS) were calculated using the differences between total and reducing sugars content.

Starch (Sta) content was determined according McCready et al. (1950). The dried pellet obtained after sugar extraction was resuspended in 52% perchloric acid and maintained for 30 min for later reading at 490 nm. Starch content was calculated using a sucrose standard curve (0–50 µg) and expressed as mg g<sup>-1</sup> FM. The total non-structural carbohydrate (TNC) content was calculated as TNC=TSS+Sta, according to Silva et al. (2010).

### 3.2.9. Productivity components

The total pod matter (TPM), bark matter (BM) and grain matter (GM) of 100 pods were evaluated. In order to determine the grain yield (GY), plants of a 1-m<sup>2</sup> area of each plot were manually collected and oven air dried. The GY was extrapolated to kg ha<sup>-1</sup>.

### 3.2.10. Chemical characterization of *R. sativus* crude oil

The oil was extracted from dried and milled grains (~100 g) using hexane PA in a Soxhlet extractor after heating for 8 h according to Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). The extracted oil was separated from the solvent under reduced pressure on a rotary evaporator (TE-210, Tecnal, Piracicaba, Brazil). The oil content was calculated from the oil matter (OM) and ground grain matter (GM) as OC (%) = [(OM/GM) x 100].

The chemical properties of the crude oil were analyzed using volumetry, including acid value (AV), peroxide value (PV), and iodine value (IV) according to AOCS (2003) and IAL (2008). The measurements were performed in triplicate and a blank was read for each analysis.

The AV was determined from 1.5 g of oil using the formula: AV (mg KOH g<sup>-1</sup> oil) = [(V x M x 56.1) / w], where V indicates the volume of potassium hydroxide (KOH) titrant used (mL); M represents the molarity of the KOH titrant (mol L<sup>-1</sup>); 56.1 is the molecular weight of KOH; and w is the weight of the oil sample (g). The KOH solution was standardized using dry potassium biphthalate as the primary standard.

The PV was determined from 1.0 g of oil using the equation: PV (mEq kg<sup>-1</sup> sample) = [(V x M x 100) / w], where V indicates the volume of sodium thiosulphate (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) titrant used (mL); M is the molarity of the Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> titrant; and w is the weight of the oil sample (g). The titrant solution was standardized with potassium dichromate in acidic medium.

The IV was determined in 0.1 g of oil using the Hanus method: IV (g I<sub>2</sub> 100 g<sup>-1</sup> oil) = [(V x C x 12.69) / w], where V indicates the difference between the titrant volumes (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, mL) used for the blank and sample analyses; C represents the titrant concentration (mol L<sup>-1</sup>); and w is the sample weight (g). The titrant solution was standardized using potassium dichromate in acidic medium.

### 3.2.11. Statistical analysis

The data were subjected to variance analyses using the F test ( $p < 0.05$ ) and averages were compared using Tukey's test ( $p < 0.05$ ) using the Variance Analysis System software (SISVAR<sup>®</sup>, v. 5.3, Lavras, Brazil). Pearson's coefficients were calculated to determine correlations between the physiological variables.

### 3.3 Results

#### 3.3.1. Water relations

Lower values of leaf water potential ( $\Psi_w$ ) were observed as a function of the water availability decrease in the soil (Fig. 1A) and in the vegetative and grain filling stages, independently (Fig. 1B). The lowest  $\Psi_w$  values were obtained in 33% FC-water deficit plants, at the GF stage.

The osmotic potential ( $\Psi_s$ ) was similar between treatments, except during the GF stage, with higher values in 66% FC-treated plants (Fig. 1C). The relative water content (RWC) was maintained above 80% in all treatment conditions, although with lower values during the FL and GF developmental stages (Fig. 1D).

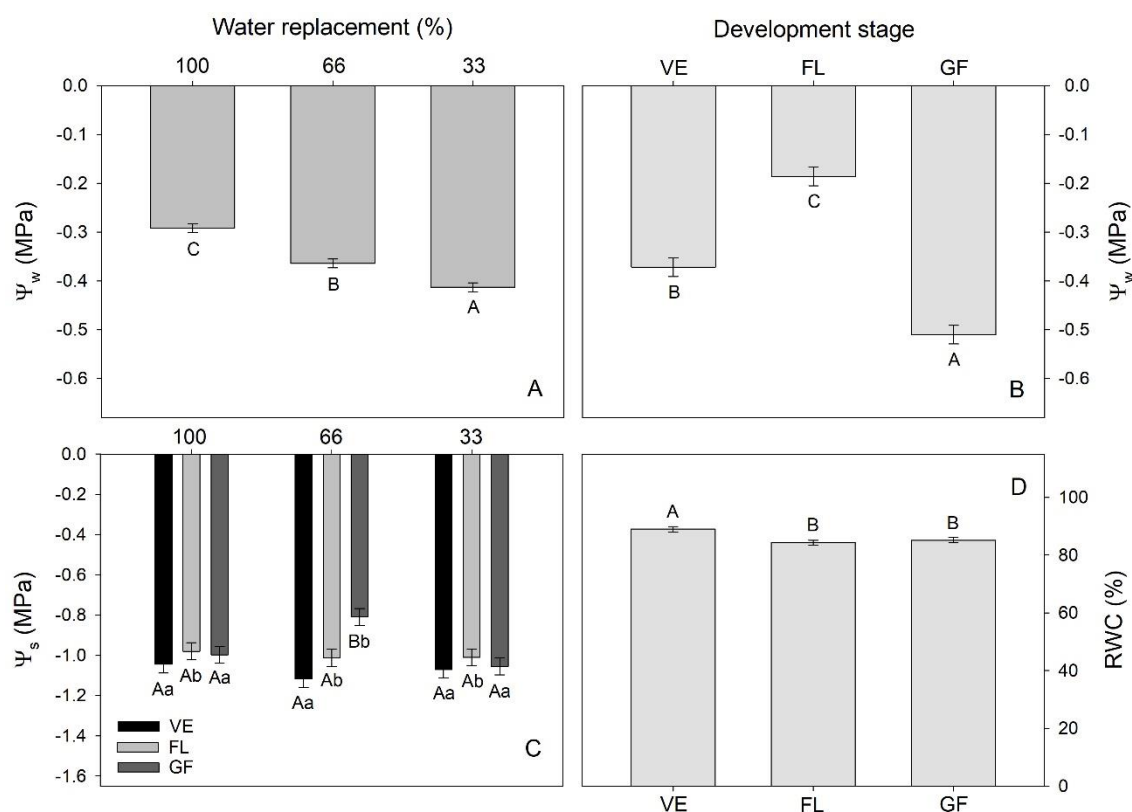


Figure 1. Predawn leaf water potential ( $\Psi_w$ ) [A, B], leaf osmotic potential ( $\Psi_s$ ) [C], and relative water content (RWC) [D] in *Raphanus sativus* plants subjected to three water levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity and at three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Bars represent means  $\pm$  SE [ $n = 4$  (C),  $n = 12$  (A, B, D)]. Means followed by different letters, uppercase for water replacements and lowercase for development stages, differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ )

### 3.3.2. Physiological traits

The water deficit affected gas exchange in all evaluated phenological stages (Fig. 2). In the GF stage, photosynthetic rate ( $A$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiratory rate ( $E$ ), and carboxylation efficiency ( $A/C_i$ ) were lower in the 33% FC-water deficit plants (Fig. 2A-C, 2E). Values of  $g_s$  and  $E$  were also lower in the 66% FC-treated plants at the GF stage than in the control plants.

The ratio between the internal and external CO<sub>2</sub> concentration ( $C_i/C_a$ ) varied only as a function of the phenological stage, with the highest values observed during the FL phase (Fig. 2D). Water use efficiency (WUE) was higher in the FL stage (Fig. 2F) and in the 33% FC-water replacement (Fig. 2G).

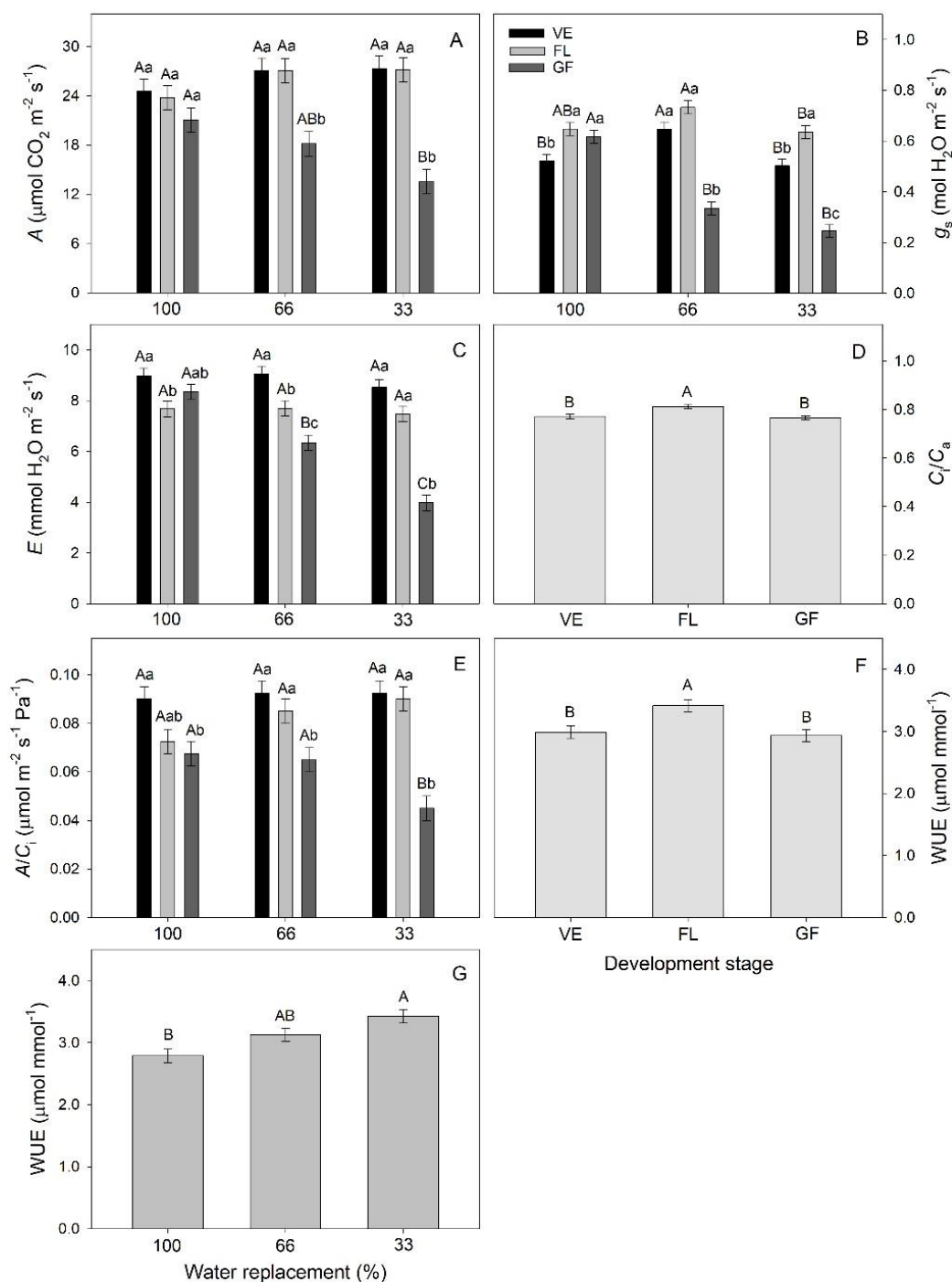


Figure 2. Net photosynthetic assimilation rate ( $A$ ) [A], stomatal conductance ( $g_s$ ) [B], transpiratory rate ( $E$ ) [C], the ratio between internal and external  $\text{CO}_2$  concentration ( $C_i/C_a$ ) [D], instantaneous carboxylation efficiency ( $A/C_i$ ) [E], and the water use efficiency (WUE) [F, G] in *Raphanus sativus* plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity and at three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Bars represent means  $\pm$  SE [ $n = 4$  (A, B, C, E),  $n = 12$  (D, F, G)]. Means followed by the same letter, uppercase for water replacements and lowercase for development stages, differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

The minimum fluorescence ( $F_0$ ) varied as a function of the phenological stage, with the lowest values obtained during the FL and GF stages (Fig. 3A). The potential quantum yield of PSII ( $F_v/F_m$ ) was not affected by the treatments, with an average of 0.81 throughout the experiment (Fig. 3B). In the GF stage, there was a reduction in the effective quantum yield of PSII ( $\Delta F/F_m'$ ) (Fig. 3C).

Plants in the VE and GF stages showed lower non-photochemical quenching coefficients (NPQ) under 33% FC-water deficit conditions than in 66% FC-treated plants (Fig. 3D). The apparent electron transport rate (ETR) was lower in plants exposed to 33% and 66% FC water deficit conditions during the VE stage, higher in 66% FC-treated plants in the FL stage, and did not differ in the GF stage relative to their respective controls (Fig. 3E). Water deficit prompted reductions in the ETR/A during the VE stage but increases in the same variable in the 33% and 66% FC-treated plants in the GF stage compared to values in control plants (Fig. 3F).



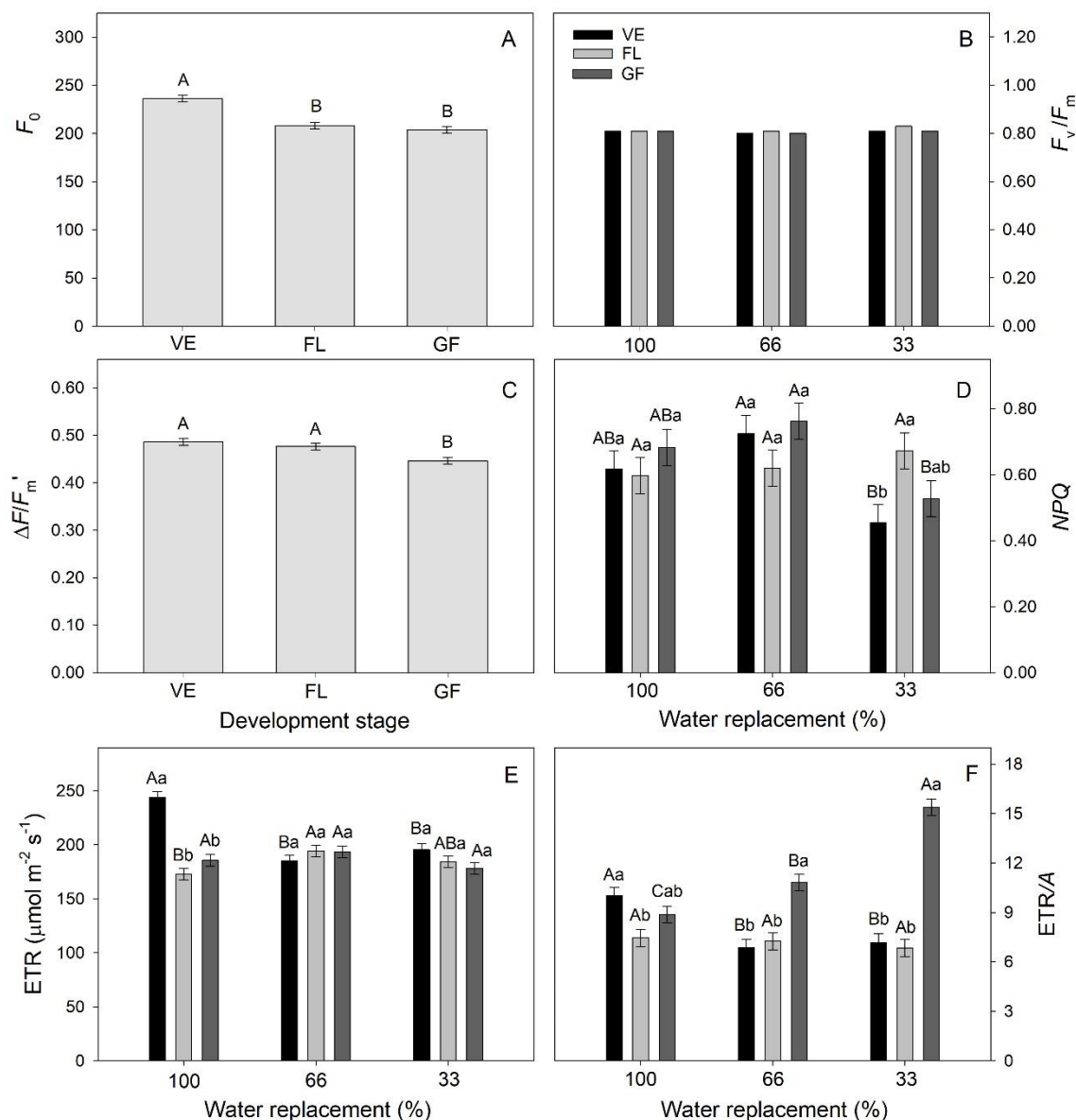


Figure 3. Minimum fluorescence ( $F_0$ ) [A], potential quantum yield of PSII ( $F_v/F_m$ ) [B], effective quantum yield of PSII ( $\Delta F/F_m'$ ) [C], non-photochemical quenching coefficient (NPQ) [D], apparent ETR [E], and the ratio between ETR and photosynthetic assimilation rate (ETR/A) [F] in *Raphanus sativus* plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity and at three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Bars represent means  $\pm$  SE [ $n = 4$  (B, D, E, F),  $n = 12$  (A, C)]. Means followed by the same letter, uppercase for water replacements and lowercase for development stages, differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

The ELR was affected only as a function of the phenological stage, with the highest values observed during the FL and GF stages (Fig. 4). The chlorophyll *a* (Chl*a*) and carotenoid (*Car*) concentrations increased in the FL stage, regardless of water replacement (Fig. 5A, 5C), while the chlorophyll *b* (Chl*b*) concentration did not differ according to treatment (Fig. 5B). The water deficit reduced the total chlorophyll concentration (Chl*a*+*b*) in the 66% FC-treated plants in the GF stage (Fig. 5D).

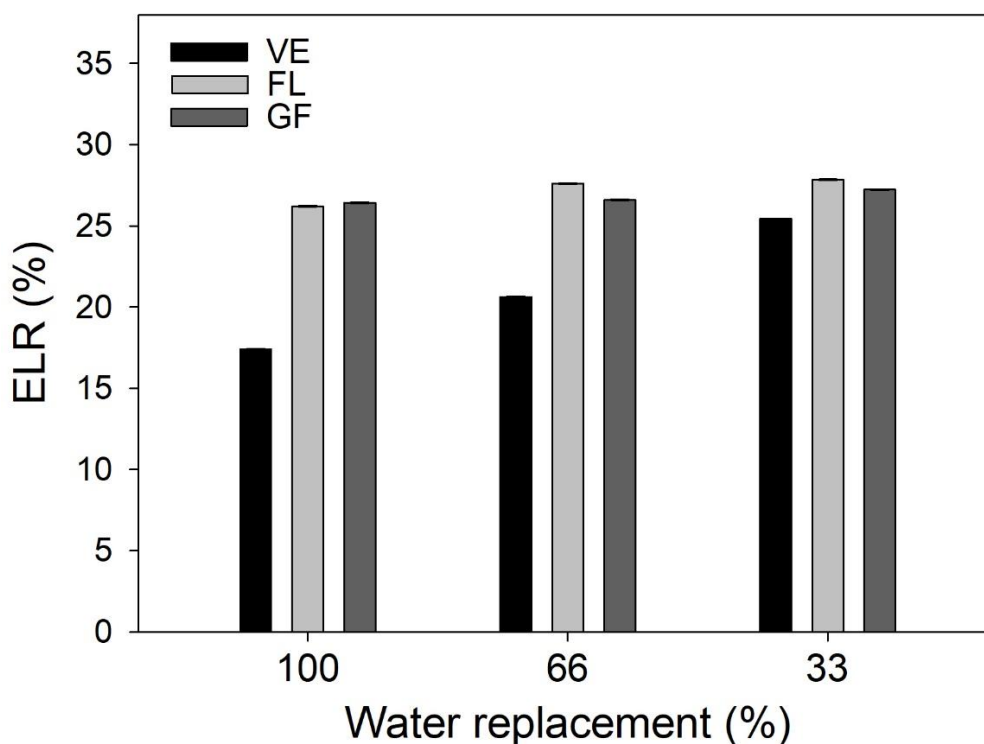


Figure 4. Electrolyte leakage rate (ELR) in *Raphanus sativus* plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity and at three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Bars represent means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ).

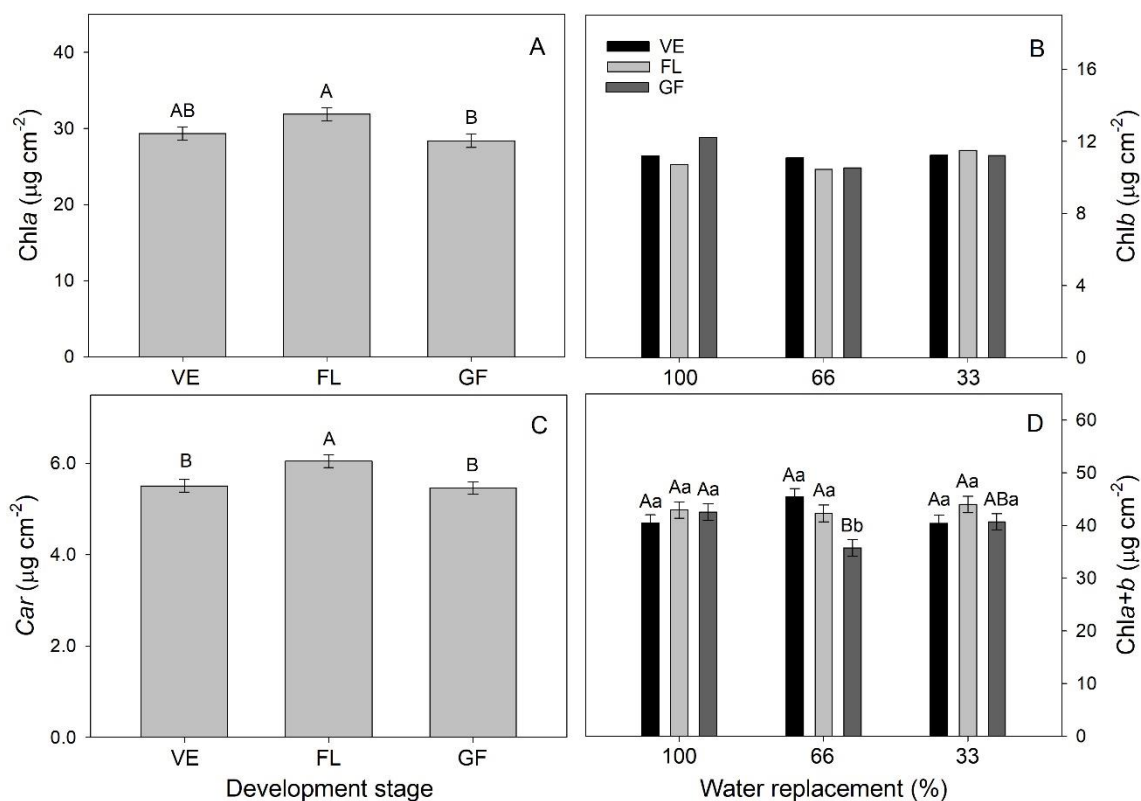


Figure 5. Chlorophyll *a* (Chla) [A], chlorophyll *b* (Chlb) [B], total carotenoids (*Car*) [C], and total chlorophyll (Chla+b) [D] concentration in *Raphanus sativus* plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity and at three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Bars represent means  $\pm$  SE [ $n = 4$  (B, D),  $n = 12$  (A, C)]. Means followed by the same letter, uppercase for water replacements and lowercase for development stages, differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.3.3. Biochemical traits

Water deficit prompted increases in Pro content, mainly in the VE stage (Fig. 6A-B). The total soluble sugars (TSS) and reducing sugars (RS) were affected only by the phenological stages, being higher in the FL stage (Fig. 6C- D). The non-reducing sugar content (NRS) was lower in the VE (66% FC), FL (33% and 66% FC), and GF (33% FC) stages relative to the respective controls (Fig. 6E). Starch (Sta) content and total non-structural carbohydrate (TNC) were lower during the VE, FL, and GF stages in the 33% FC-water deficit plants than in the 66% FC-treated plants (Fig. 6F-G). A negative correlation between Pro and  $\Psi_s$  (Fig. 7A) and Pro and ELR (Fig. 7B) was found.

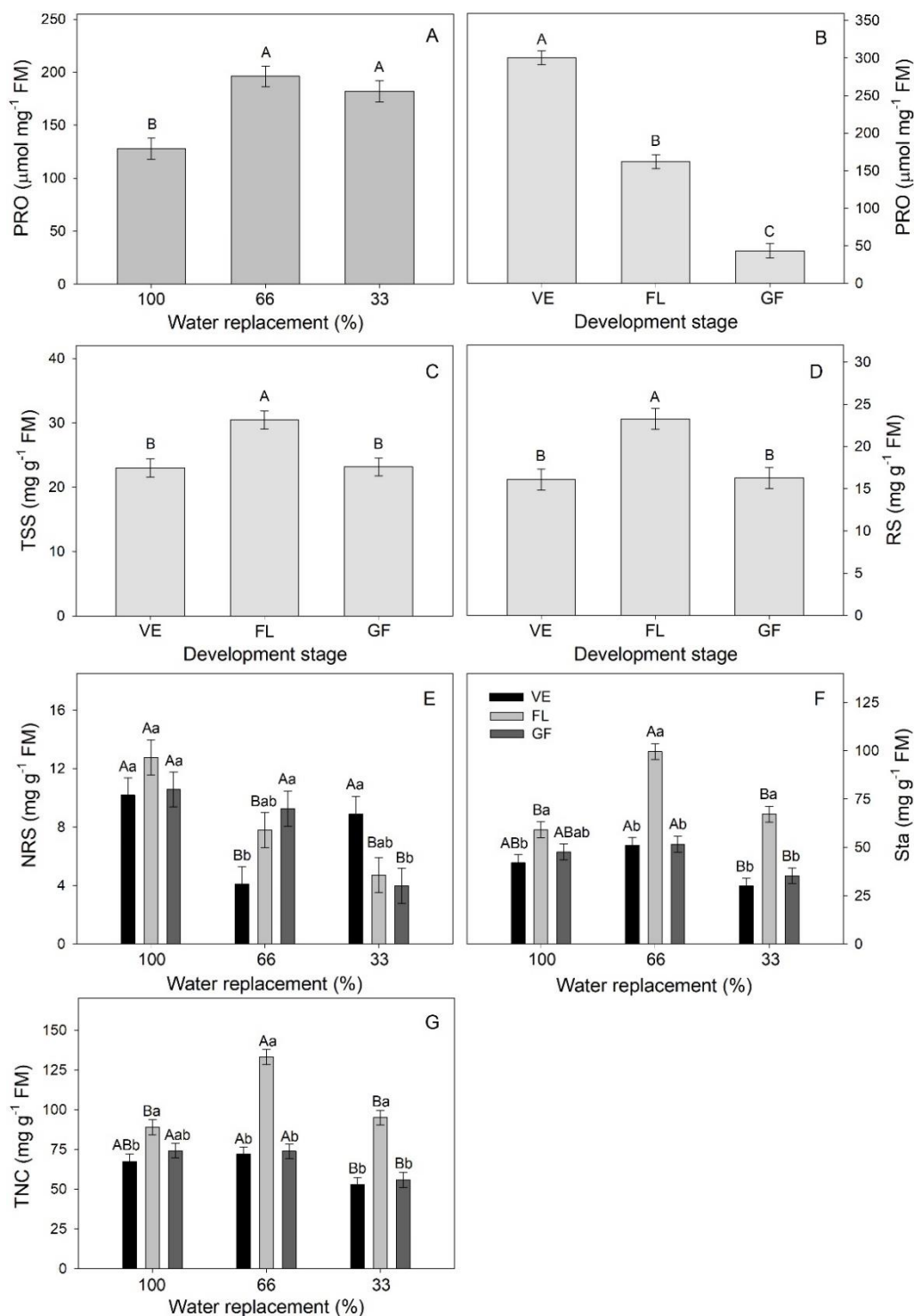


Figure 6. Free proline (Pro) content [A, B], total soluble sugars (TSS) [C], reducing sugars (RS) [D], non-reducing sugars (NRS) [E], starch (Sta) [F], and total non-structural carbohydrate (TNC) [G] in *Raphanus sativus* plants subject to three water levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity and at three different phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF). Bars represent means  $\pm$  SE [n = 4 (A, B, C, D), n = 12 (E, F, G)]. Means followed by the same letter, uppercase for water replacements and lowercase for development stages, differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

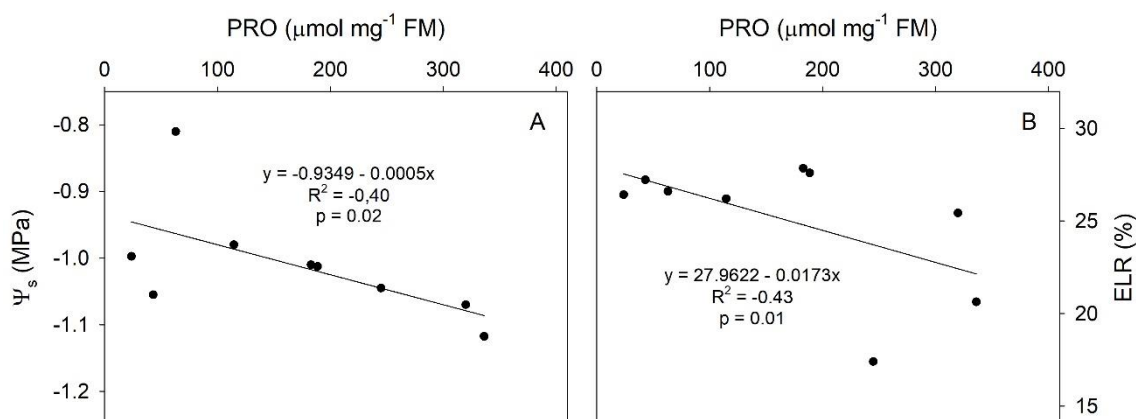


Figure 7. Correlation between free proline (Pro) content and osmotic potential ( $\Psi_s$ ) [A] and free proline (Pro) content and electrolyte leakage rate (ELR) [B] in *Raphanus sativus* plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity during three phenological development stages: vegetative (VE), flowering (FL), and grain filling (GF).

#### 3.3.4. Component production and crude oil characterization

The total pod matter (TPM) and the bark matter (BM) of 100 pods were not affected by the treatments (Fig. 8A-B). However, reductions in grain matter (GM) and grain yield (GY) in the 33% and 66% FC-treated plants were found (Fig. 8C-D).

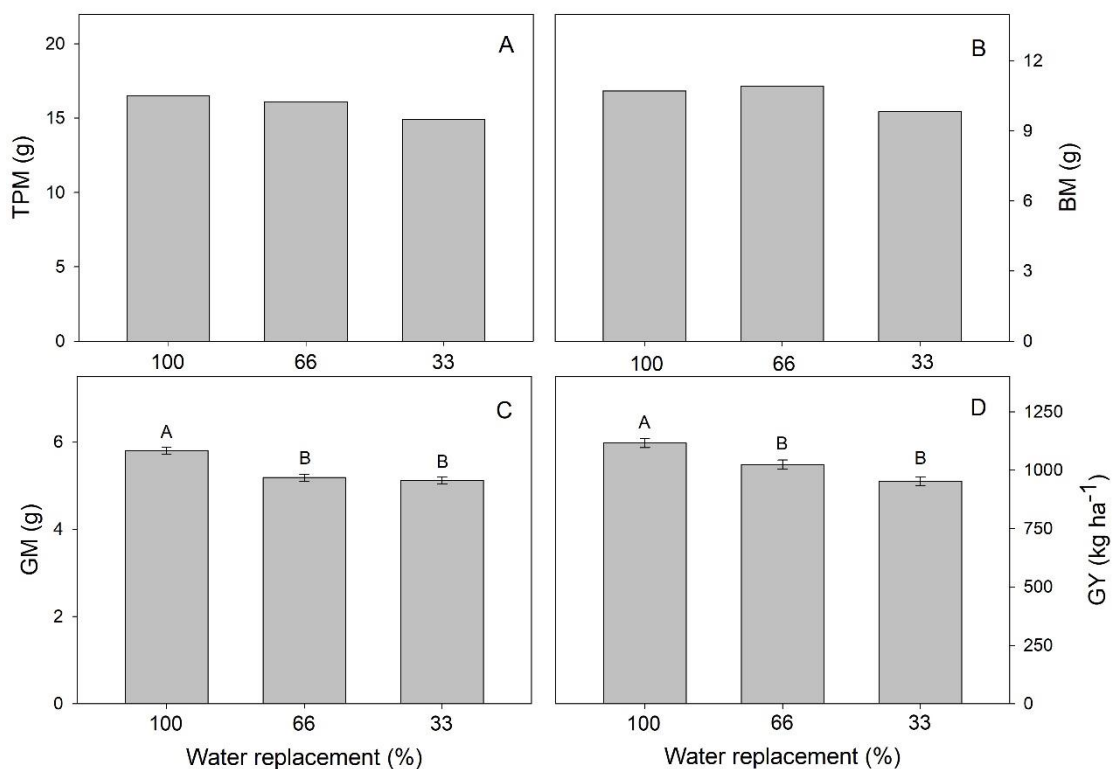


Figure 8. Total pod matter (TPM) [A], bark matter (BM) [B], and grain matter of 100 pods (GM) [C] and grain yield (GY) [D] in *Raphanus sativus* plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity. Bars represent means  $\pm$  SE (n = 4). Means followed by the same letter differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ )

The grain oil content was reduced by the water deficit. The lowest values were obtained from the 33% FC-treated plants compared to the control (Fig. 9A). Water deficit did not affect the AV (Fig. 9B), PV (Fig. 9C), or IV (Fig. 9D) of *R. sativus* crude oil.

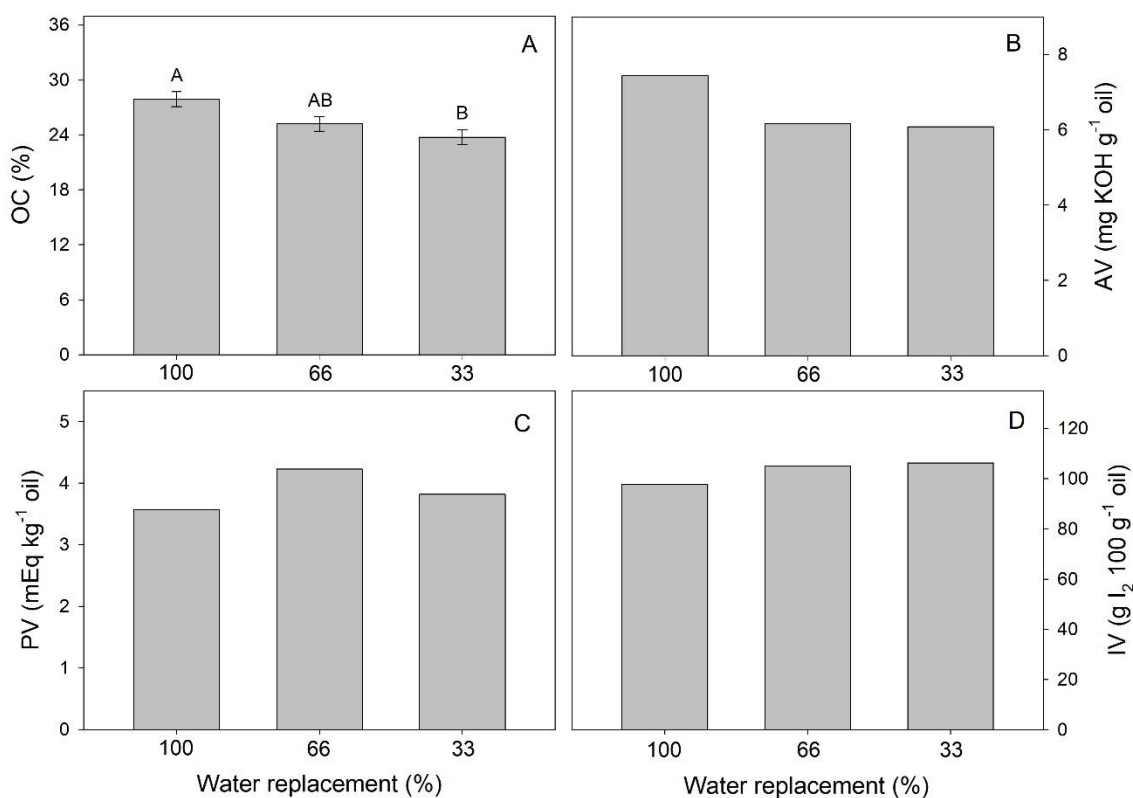


Figure 9. Grain oil content (OC) [A] and acid value (AV) [B], peroxide value (PV) [C], and iodine value (IV) [D] of the *Raphanus sativus* oil from plants subjected to three water replacement levels: 100% (CC – control), 66%, and 33% of field capacity. Bars represent means  $\pm$  SE [n = 8 (A), n = 12 (B, C, D)]. Means followed by the same letter differ significantly according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.4 Discussion

*R. sativus* plants maintained physiological processes even under conditions of water restriction. This ability to adapt physiologically in response to drought can be decisive for survival, growth and, consequently, crop yields in areas with limited water (Ali and Anjum 2016).

Under conditions of water stress, reduced leaf water potential is usually accompanied by a reduction in stomatal conductance to minimize water loss through transpiration (Campos et al. 2014). However, this was not observed in *R. sativus* plants, where stomatal conductance and transpiratory rate were not altered in the initial phase of the stress and the plants were able to maintain high relative water content in the leaves. Water potential and relative water content are important physiological indicators of a

plant's water status (Yan et al. 2016). Plants that are more resistant to water deficit are described as having a higher WUE than sensitive ones (Zegaoui et al. 2017), because this allows for higher photosynthetic rates with the lowest amount of water loss (Chaves et al. 2009), as observed in *R. sativus* cultivated under low water conditions. The absence of photochemical damage is also related to maintenance of hydration by *R. sativus* leaves. Zivcak et al. (2013) observed a correlation between the reduction in the relative water content and reduction in electron transport and increased non-photochemical extinction in wheat plants cultivated under limited water conditions.

Turgor maintenance under water stress occurs, among other factors, because of osmotic adjustment by the increase in Pro synthesis and the protection of cell membranes against dehydration (Blum 2017; Turner 2018). The Pro accumulation observed in *R. sativus* leaves suggests its performance as a compatible solute, also reported in chickpea plants (Kaur et al. 2017), fava beans (Ammar et al. 2015), and soybeans (Akita Devi and Giridhar 2015). It also suggests a role in antioxidant defense, as was described in wheat (Vendruscolo et al. 2007) and rice (Swapna and Shylaraj 2017). In *R. sativus*, this was demonstrated by the negative correlations between Pro and osmotic potential and ELR. Furthermore, the increased energy demand in the reproductive stage explains the reduction in Pro content throughout the developmental stages of *R. sativus*.

Oxidative stress is usually described as a secondary effect of several abiotic stresses that cause photosynthetic pigment oxidation (Anjum et al. 2011; Hassan et al. 2017), acting on the antenna complex and the photosystem's reaction centers. Associated with photosynthetic rates, the maintenance of the potential quantum yield of PSII, ETR, photosynthetic pigments, and ELR were observed, suggesting the absence of oxidative damage and demonstrating the physiological drought-tolerance of *R. sativus*. With high photochemical activity, the production of carbohydrates was maintained, contributing to the growth and productivity of *R. sativus* plants, even under limited water conditions.

During the GF stage, despite the higher WUE in stressed-plants, the stress along the crop cycle promoted a reduction in photosynthetic rates caused by both stomatal (initially) and non-stomatal limitations, the last one as indicated by  $C_i/C_a$  value maintenance and reduction in carboxylation efficiency. Similar responses were observed in beans (Magalhães et al. 2017) and tomato plants (Borba et al. 2017) cultivated in low water conditions. These changes may occur because of several factors associated with limitations of the enzymatic activity of RuBisCo, Calvin cycle enzymes (Lawlor and



Tezara 2009), or even because of the depletion of ATP and NADPH in the photochemical phase (Campos et al. 2014).

The increase in the ETR/A ratio suggests electron dissipation by alternative sinks such as cyclic electron flow (Yamori and Shikanai 2016) or the water-water cycle (Weng et al. 2007), because the quantum efficiency of PSII was maintained, but less ATP and reducing power was produced and used in the Calvin cycle for CO<sub>2</sub> fixation.

Despite the decrease in photosynthetic activity, photoinhibition was not observed as evidenced by the maintenance  $F_v/F_m$  ratio values and the absence of a significant increase in thermal dissipation or minimum fluorescence throughout the stress period. Thermal dissipation is directly related to the xanthophyll cycle, where the activation of the violaxanthin *de*-epoxidase in the conversion of violaxanthin to zeaxanthin acts by avoiding PSII overexcitation and protection against damage caused by excess light (Maxwell and Johnson 2000; Jin et al. 2003).

Furthermore, there is a greater requirement of photoassimilates during the reproductive stage because of the high demands of flower and fruit production (Lemione et al. 2013). We observed the maintenance of total and reducing soluble sugar levels in *R. sativus* leaves even under water deficit conditions. The maintenance or increase of sugars under drought conditions results from starch degradation (Thalmann and Santelia 2017) that provides energy and carbon to the plants (Chaves et al. 2009). The carbon, obtained from the carbohydrate breakage in the GF stage, was probably directed toward grain production (Farooq et al. 2016; Kaur et al. 2017) because the bark dry matter and total pod dry matter of drought-treated *R. sativus* plants was maintained at similar values as those of the control plants. Bark avoids premature seed death by protecting them against stress and serving as assimilates sources for the seeds (Kaur et al. 2017).

Photoassimilate translocation to the pods and remobilization of the pods for grain development are vital mechanisms for water deficit adaptation (Rao et al. 2013). Nevertheless, the decline in leaf photoassimilate production and plant carbon partition alteration during the GF stage affected the fractionation of carbohydrates between the organs, thereby causing reductions in the matter of 100 grains and the productivity of *R. sativus* in water deficit conditions. Damage to grain size, weight, and yield were also observed in soybean plants in response to water deficit during the GF period (Rotundo and Westgate 2010). Therefore, the sensitivity of *R. sativus* plants to water

restriction is more pronounced during reproductive development, a critical phase also described as hypersensitive in other crops (Pushpavalli et al. 2014; Farooq et al. 2016).

The oil content of the *R. sativus* grains decreased with the imposition of the water deficit; however, their chemical composition was maintained. Water deficit has been reported to cause changes in the content and chemical characteristics of the oil (Wang and Frei 2011; Enjalbert et al. 2013), thereby influencing biodiesel quality (Ramos et al. 2009). The acid, peroxide, and iodine content of *R. sativus* oil were maintained even under limited water conditions. The PV and IV were similar to those observed by Ávila and Sodr  (2012), Chammoun et al. (2013), and Oliveira et al. (2015) in the Brassicaceae species and are in accordance with the standards of the National Agency of Petroleum, Natural Gas, and Biofuels (ANP 2005). According to the ANP, the maximum limits for acid, peroxide, and iodine in crude oil for biodiesel production are 0.50 mg KOH g<sup>-1</sup>, 10 mEq kg<sup>-1</sup>, and 120 g I<sub>2</sub> 100 g<sup>-1</sup>, respectively. In this study, the AV, PV, and IV remained around 7 mg KOH g<sup>-1</sup>, 4 mEq kg<sup>-1</sup>, and 106 g I<sub>2</sub> 100 g<sup>-1</sup>, respectively even in plants under water restriction. AV levels, considered higher than the recommended value for biodiesel use, can be attributed to the presence of large amounts of polyunsaturated fatty acids contained in the oil of the *R. sativus* seeds (Ávila and Sodr  2012). The chemical instability and susceptibility of vegetable oils with unsaturated fatty acids to hydrolysis results in free fatty acid release (Oliveira et al. 2015).

Vegetable oils with free fatty acids, high degrees of unsaturation, and high viscosity are undesirable for fuel production because of the transfer of these characteristics to biodiesel (Ramos et al. 2009). The quality of the oil from *R. sativus* plants under water restriction was not compromised by this stress, illustrating the potential of this species for biodiesel production, even when cultivated in regions with low rainfall.

### 3.5 Conclusion

*R. sativus* plants showed drought-tolerance primarily during their vegetative stage as a result of photosynthetic metabolism adjustment that allowed high stability of PSII and complex antenna and, consequently, the photochemical processes. Increasing Pro content was employed to avoid membrane damage and to maintain tissue hydration. The GF stage was the most sensitive to water stress. Nevertheless, even with a slight

reduction in grain yield and oil content, the oil produced by *R. sativus* showed adequate chemical characteristics, suggesting its potential usefulness for biodiesel production.

### 3.6 References

- Abedi T, Pakniyat H (2010) Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Czech J Genet Plant Breed 46:27–34. <https://doi.org/10.17221/67/2009-CJGPB>.
- Akita Devi MK, Giridhar P (2015) Variations in physiological response, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities, proline and isoflavones content in soybean varieties subjected to drought stress. Proc Natl Acad Sci Section B Biol Sci 1:35–44. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0244-0>.
- Ali N, Anjum MM (2016) Drought stress: major cause of low yield and productivity. Austin Environ Sci.1:1012.
- Ammar MH, Anwar F, El-Harty EH, Migdadi HM, Abdel-Khalik SM, Al-Faifi SA, Farooq M, Alghamdi SS (2015) Physiological and yield responses of faba bean (*Vicia faba* L.) to drought stress in managed and open field environments. J Agro Crop Sci 201:280–287. <https://doi.org/10.1111/jac.12112>.
- Anjum SA, Xie X-y, Wang L-c, Saleem MF, Man C, Lei W (2011) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. Afr J Agric Res 6:2026–2032. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.027>.
- ANP – Brazilian National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels (2005) Resolution N° 42, 19/April/2005. Available from: <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2004/novembro&item=rangep-42--2004>. Accessed January 2019. [in Portuguese]
- AOCS – American Oil Chemists Society (2003) Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist’s Society. 5 ed. AOCS: Champaign, USA.
- Ávila RD, Sodré JR (2012) Physical-chemical properties and thermal behavior of fodder radish crude oil and biodiesel. Ind Crops Prod 38:54–7. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.007>.
- Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. Annu Rev Plant Biol 59:89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>.
- Barrs HD, Weatherley PE (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Aust J Biol Sci 15:413–428. <https://doi.org/10.1071/BI9620413>.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ED (1973) Rapid determination of free proline for stress studies. Plant Soil 39:205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>.
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. Photosynth Res 25:173–185. <https://doi.org/10.1007/BF00033159>.
- Bilger W, Schreiber U, Bock M (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical of chlorophyll fluorescence in the field. Oecologia 102:425–432. <https://doi.org/10.1007/BF00341354>.
- Blum A (2017) Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. Plant Cell Environ 40:4–10. <https://doi.org/10.1111/pce.12800>.
- Borba MEA, Maciel GM, Fraga Júnior EF, Machado Júnior CS, Marquez GR, Silva IG, Almeida RS (2017) Gas exchanges and water use efficiency in the selection of tomato

- genotypes tolerant to water stress. *Genet Mol Res* 16:2–9. <https://doi.org/10.4238/gmr16029685>.
- Campos H, Trejo C, Peña-Valdivia C, García-Nava R, Conde-Martínez FV, Cruz-Ortega MR (2014) Stomatal and non-stomatal limitations of bell pepper (*Capsicum annum* L.) plants under water stress and re-watering: Delayed restoration of photosynthesis during recovery. *Environ Exp Bot* 98:56–64. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.10.015>.
- Chammoun N, Geller DP, Das KC (2013) Fuel properties, performance testing and economic feasibility of *Raphanus sativus* (oilseed radish) biodiesel. *Ind Crops Prod* 45:155–9. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.029>.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot* 103(4):551–60. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>.
- Crusciol CA, Cottica RL, Lima ED, Andreotti M, Moro E, Marcon E (2005) Persistence and nutrients release of forage turnip straw utilized as mulching in no-tillage crop system. *Pesqui Agropecu Bras* 40(2):161–8. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005000200009>.
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Ehleringer J (1981) Leaf absorptances of Mohave and Sonoran Desert plants. *Oecologia* 102:366–370.
- Embrapa - Brazilian Agricultural Research Corporation (2013) Brazilian System of Soil Classification, third ed. Brasília, Brazil. 353 p. [in Portuguese]
- Enjalbert JN, Zheng S, Johnson JJ, Mullen JL, Byrne PF, Mckay JK (2013) Brassicaceae germplasm diversity for agronomic and seed quality traits under drought stress. *Ind Crops Prod* 47:176–185. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.037>.
- Farooq M, Gogoi N, Barthakur S, Baroowa B, Bharadwaj N, Alghamdi SS, Siddique KHM (2016) Drought stress in grain legumes during reproduction and grain filling. *J Agron Crop Sci* 203:81–102. <https://doi.org/10.1111/jac.12169>.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990:87–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9).
- Guedes Filho O, Da Silva AP, Giarola NF, Tormena CA (2013) Structural properties of the soil seedbed submitted to mechanical and biological chiseling under no-tillage. *Geoderma* 204:94–101. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.04.017>.
- Hasibeder R, Fuchslueger L, Richter A, Bahn M (2015) Summer drought alters carbon allocation to roots and root respiration in mountain grassland. *New Phytol* 205:1117–1127. <https://doi.org/10.1111/nph.13146>.
- Hassan MA, Chaura J, Donat-Torres M, Boscaiu M, Vicente O (2017) Antioxidant responses under salinity and drought in three closely related wild monocots with different ecological optima. *AoB Plants* 9:plx009. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plx009>.
- IAL – Adolfo Lutz Institute (2008) Physicochemical methods for food analysis, fourth edition. São Paulo, Brazil, 1141 p. [in Portuguese]
- Jin E, Yokthongwattana K, Polle JEW, Melis A (2003) Role of reversible xanthophyll cycle in the PSII damage and repair cycle in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* 132(1):352–64. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019620>.
- Joshi R, Wani SH, Singh B, Bohra A, Dar ZA, Lone AA, Pareek A, Singla-Pareek SL (2016) Transcription factors and plants response to drought stress: current

- understanding and future directions. *Front Plant Sci* 7:1029. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01029>.
- Kaur D, Grewal SK, Kaur J, Singh S (2017) Differential proline metabolism in vegetative and reproductive tissues determine drought tolerance in chickpea. *Biol Plant* 61:359–366. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0695-2>.
- Köppen WP (1931) *Outline of Climate Science*. Berlin: W. Gruyter. [in German].
- Laisk A, Loreto F (1996) Determining photosynthetic parameters from leaf CO<sub>2</sub> exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol* 110:903–912. <https://doi.org/10.1104/pp.110.3.903>.
- Lawlor DW, Tezara W (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of process. *Ann Bot* 103:561–579. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn244>.
- Lemione R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain JL, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, Faucher M, Girousse C, Lemonnier P, Parrila J, Durand M (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front Plant Sci* 4:272. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00272>.
- Lobell DB, Gourdji SM (2012) The influence of climate change on global crop productivity. *Plant Physiol* 160(4):1686–97. <https://doi.org/10.1104/pp.112.208298>.
- Machado EC, Schmidt PT, Medina CL, Ribeiro RV (2005) Photosynthetic responses of three citrus species to environmental factors. *Pesq Agropec Bras* 40:1161–1170. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005001200002>.
- Magalhães ID, Lyra GB, Souza JL, Teodora I, Cavalcante CA, Ferreira RA, Souza RC (2017) Physiology and grain yield of common beans under evapotranspired water reposition levels. *Irrigat Drainage Sys Eng* 6:183. <https://doi.org/10.4172/2168-9768.1000183>.
- Martins RF, Souza AF, Pitol C, Falqueto AR (2017) Physiological responses to intense water deficit in two genotypes of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst.). *Aust J Crop Sci* 11(7):821. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.07.pne469>.
- Maxwell C, Johnson GM (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J Exp Bot* 51:659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>.
- McCready RM, Guggolz J, Silveira V, Owens HS (1950) Determination of starch and amylose in vegetables. *Anal Chem* 22:1156–1158. <https://doi.org/10.1021/ac60045a016>.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Oliveira IP, Souza AF, Lescano CH, Caires AR, Muzzi RM (2015) Thermal oxidation analysis of forage turnip (*Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg.) oil. *J Am Oil Chem Soc* 92(3):403–8. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2606-7>.
- Pask AJD, Pietragalla J, Mullan DM, Reynolds MP (2012) Physiological Breeding II: A Field Guide to Wheat Phenotyping, in: Pierre, C.S., Arce, V.T. (Eds.), *Osmotic adjustment*. D.F.: CIMMYT, México, pp. 21-24.
- Pimentel C, Sarr B, Diouf O, Abboud ACS, Roy-Macauley H (2002) Leaf protoplasmic tolerance to drought, in two cowpea genotypes cultivated at the field. *Rev Univ Rural Série Ciênc Vida* 22:7–14. [in Portuguese]
- Pushpavalli R, Zaman-Allah M, Turner NC, Baddam R, Rao MV, Vadez V (2014) Higher flower and seed number leads to higher yield under water stress conditions imposed during reproduction in chickpea. *Funct Plant Biol* 42:162–174. <https://doi.org/10.1071/FP14135>.

- Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L, Pérez Á (2009) Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour Technol* 100:261–268. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.039>.
- Rao I, Beebe SE, Polania J, Ricaurte, J, Cajiao C, Garcia R, Rivera M (2013) Can tepary bean be a model for improvement of drought resistance in common bean? *Afr Crop Sci J* 21:265–281.
- Ribeiro RV, Machado EC, Santos MG, Oliveira RF (2009) Seasonal and diurnal changes in photosynthetic limitation of young sweet orange trees. *Environ Exp Bot* 66:203–211. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.03.011>.
- Ronen R, Galun M (1984) Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environ Exp Bot* 24:239–245. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(84\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0098-8472(84)90004-2).
- Rotundo JL, Westgate ME (2010) Rate and duration of seed component accumulation in water stressed soybean. *Crop Sci* 50:676–684. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.05.0240>.
- Shah SN, Iha OK, Alves FC, Sharma BK, Erhan SZ, Suarez PA (2013) Potential application of turnip oil (*Raphanus sativus* L.) for biodiesel production: physical–chemical properties of neat oil, biofuels and their blends with ultra-low sulphur diesel (ULSD). *Bioenergy Res* 6(2):841–50. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9310-y>.
- Silva L, Marchiori PER, Maciel CP, Machado EC, Ribeiro RV (2010) Photosynthesis, water relations and growth of young coffee plants according to phosphorus availability. *Pesq Agropec Bras* 45:965–972b. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000900005>. [in Portuguese]
- Souza DMG, Lobato E (2004) Cerrado: soil correction and fertilization, second ed. Embrapa Cerrados: Brasília, Brazil. 416 p. [in Portuguese]
- Swapna S, Shylaraj KS (2017) Screening for osmotic stress responses in rice varieties under drought condition. *Rice Science* 24(5):253–63. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2017.04.004>.
- Thalmann M, Santelia D (2017) Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytol* 214:943–951. <https://doi.org/10.1111/nph.14491>.
- Turner NC (2018) Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress. *J Exp Bot* 69:3223–3233. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery181>.
- Van Genuchten MT (1980) A closed form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. *Soil Sci Soc Am J* 44:892–898. <https://doi.org/10.2136/sssaj1980.03615995004400050002x>.
- Van Kooten O, Snel JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth Res* 25:147–150. <https://doi.org/10.1007/BF00033156>.
- Vasconcelos MD, Passos WE, Lescanos CH, Pires de Oliveira I, Trindade MA, Caires AR, Muzzi RM (2018) Fluorescence spectroscopy applied to monitoring biodiesel degradation: correlation with acid value and UV absorption analyses. *J Anal Methods Chem* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4175843>.
- Vendruscolo ECG, Schuster I, Pileggi M, Scapim CA, Molinari HBC, Marur CJ, Vieira LGE (2007) Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *J Plant Physiol* 164:1367–1376. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.001>.
- Wang Y, Frei M (2011) Stressed food – The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agric Ecosyst Environ* 141:271–286. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.03.017>.

- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144:307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).
- Weng XY, Zheng CJ, Xu HX, Sun JY (2007) Characteristics of photosynthesis and functions of the water–water cycle in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to potassium deficiency. *Physiol Plant* 131:614–621. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00978.x>.
- Yamori W, Shikanai T (2016) Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth. *Annu Rev Plant Biol* 67:81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112002>.
- Yan W, Zhong Y, Shangguan Z (2016) A meta-analysis of leaf gas exchange and water status responses to drought. *Sci Rep* 6:20917. <https://doi.org/10.1038/srep20917>.
- Zegaoui Z, Planchais S, Cabassa C, Djebbar R, Belbachir OA, Carol P (2017) Variation in relative water content, proline accumulation and stress gene expression. In two cowpea landraces under drought. *J Plant Physiol* 218:26–34. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.07.009>.
- Zhu LH, Krens F, Smith MA, Li X, Qi W, Van Loo EN, Iven T, Feussner I, Nazareus TJ, Huai D, Taylor DC (2016) Dedicated industrial oilseed crops as metabolic engineering platforms for sustainable industrial feedstock production. *Sci Rep* 6:22181. <https://doi.org/10.1038/srep22181>.
- Zivcak M, Brestic M, Balatova Z, Drevenakova P, Olsovska K, Kalaji HM, Yang X, Allakhverdiev SI (2013) Photosynthetic electron transport and specific photoprotective response in wheat leaves under drought stress. *Photosynth Res* 117:529–546. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9885-3>.

## CAPÍTULO II

### **Raízes muito finas conferem tolerância ao déficit hídrico em *Crambe abyssinica* Hochst e *Raphanus sativus* L. e contribuem com a recuperação após a reidratação**

(Normas de acordo com a revista *Acta Physiologiae Plantarum*)

#### Resumo

Estudos anteriores têm demonstrado que as espécies *Crambe abyssinica* e *Raphanus sativus* são fisiologicamente tolerantes ao déficit hídrico, no entanto, não há informações sobre os mecanismos responsáveis por essa tolerância relacionados às características morfológicas radiculares. Diante disso, objetivou-se identificar as alterações na morfologia das raízes de *Crambe abyssinica* e *Raphanus sativus* cultivadas sob déficit hídrico, com subsequente reidratação, além de caracterizar as respostas de tolerância dessas espécies à seca. Experimentos independentes, para cada espécie, foram conduzidos, em casa de vegetação climatizada, em delineamento de blocos ao acaso, com cinco repetições. As plantas de *C. abyssinica* e *R. sativus*, foram cultivadas em citrovasos e, 28 dias após o plantio, expostas aos tratamentos controle (CONT; 90% da capacidade de campo) e déficit hídrico (DH; 40% da capacidade de campo). As plantas foram mantidas sob DH por 7, 14 e 21 dias, sendo a reidratação realizada logo após cada episódio de déficit hídrico. As avaliações de relações hídricas, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, pigmentos cloroplastídicos, permeabilidade de membranas, atividade de enzimas antioxidantes, anatomia foliar e características morfológicas foliares e do sistema radicular foram realizadas após cada período de déficit hídrico e 48 horas



após a reidratação. A maior sensibilidade ao déficit hídrico foi observada pela imposição dos estresses por 14 e 21 dias. Mesmo assim, nas avaliações realizadas após esse período observou-se a manutenção do comprimento total de raízes, com menor diâmetro radicular, que possivelmente contribuiu para a tolerância dessas espécies ao déficit hídrico. Associado às características morfológicas de raiz, observou-se também elevado conteúdo relativo de água e aumento da atividade das enzimas catalase e peroxidase, o que permitiu a manutenção da estabilidade do fotossistema II e das membranas celulares. A reidratação posterior ao déficit hídrico com duração de 14 e 21 dias não foi efetiva na recuperação das taxas fotossintéticas das plantas de *C. abyssinica*. Assim, verificou-se que *R. sativus* possui maior tolerância ao déficit hídrico, em comparação à *C. abyssinica*, principalmente pela maior proporção de raízes muito finas.

**Palavras-chave:** Crambe, nabo forrageiro, seca, morfologia de raiz, resistência à seca, rega.

#### 4.1. Introdução

*Crambe abyssinica* Hochst e *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* são culturas não alimentares consideradas fontes potenciais de óleo para a indústria química (Qui et al., 2018; Vasconcelos et al., 2018). No Brasil, são cultivadas no extremo sul e na região central do país em sucessão as principais culturas de verão, como a soja e milho (Oliveira et al., 2015a; Martins et al., 2017). As sementes dessas espécies contêm de 20% (*R. sativus*) a 60% (*C. abyssinica*) de ácido erúico no óleo, que as tornam matérias-primas com alto valor industrial (Donadon et al., 2015; Oliveira et al., 2015b; Silveira Junior et al., 2019). Além disso, a produção e o uso de fontes renováveis de energia constituem vantagem ambiental pela redução na emissão de gases poluentes (Zhu, 2016).

Assim como outras culturas, os rendimentos de grãos de *C. abyssinica* e de *R. sativus* estão sujeitas à intensidade e severidade da limitação hídrica nas diversas regiões de cultivo (Boiago et al., 2018; Stagnari et al., 2018). Apesar de já ter sido observada a tolerância fisiológicas dessas plantas à seca (Moura et al., 2018; Moura et al., 2019), longos períodos de déficit hídrico podem causar reduções significativas no crescimento e desenvolvimento da planta (Basu et al., 2016; Abid et al., 2018) e, conseqüentemente, na produção agrícola (Rivas et al., 2016). Em condições de restrição hídrica, processos

fisiológicos, como a fotossíntese e o crescimento, divisão e expansão celular são afetados, comprometendo, inclusive a sobrevivência das plantas (Osmolovskaya et al., 2018). Assim, além da frequência e severidade, a duração do déficit hídrico (Basu et al., 2016) e a capacidade da planta de manter suas funções fisiológicas após a suspensão do estresse dependem de mecanismos adaptativos da parte aérea e/ou sistema radicular (Chen et al., 2016; Bristiel et al., 2019) e são cruciais/fundamentais para manter a produtividade da cultura.

Dentre as estratégias utilizadas pelas plantas destacam-se as de evitação e tolerância à seca, que permite a manutenção da hidratação dos tecidos em níveis adequados para a continuidade das atividades metabólicas durante longos períodos de déficit hídrico (Osmolovskaya et al., 2018). A maior eficiência no uso da água (Yan et al., 2016; Ali e Anjum, 2016) é uma das principais estratégias de defesa observadas nas plantas, a qual é decorrente de eficiente controle estomático (Campos et al., 2014; Chaves et al., 2016), ajuste osmótico (Silva et al., 2010; Blum, 2017) e aumento no metabolismo antioxidante (Yi et al., 2016; Guo et al., 2018). Porém, quando se trata de mecanismos adaptativos envolvendo a morfologia das raízes são poucos os estudos relacionados com a tolerância à seca em comparação com respostas da parte aérea das plantas (Wasaya et al., 2018). Entender o papel da arquitetura do sistema radicular e das funções das raízes é crucial para a escolha de espécies melhor adaptadas para o cultivo em regiões sujeitas a ocorrência de seca (Lynch, 2015).

Um sistema radicular robusto e bem desenvolvido determina a sobrevivência e a produtividade das culturas em condições hídricas limitantes (Koevoets et al., 2016; Ramamoorthy et al., 2017), visto ser o órgão responsável pela absorção de água e nutrientes (Comas et al., 2013; Vadez, 2014; Lynch, 2015). Além do comprimento específico de raiz (CE), a área de superfície específica de raiz (ASE), razão entre a área radicular e área foliar ( $A_R/A_F$ ), densidade de tecido radicular (DTR), densidade de comprimento radicular (DCR), o menor diâmetro radicular e o maior investimento na produção de raízes constituem algumas das estratégias de adaptação ao déficit hídrico envolvendo modificações na arquitetura do sistema radicular (Comas et al., 2013; Awad et al., 2018; Wasaya et al., 2018).

Vários autores afirmam que o sistema radicular confere tolerância à seca a *C. abyssinica* e *R. sativus* (Falasca et al., 2010; Cremones et al., 2013; Dias et al., 2015; Bassegio et al., 2016; Zanetti et al., 2016), porém estudos indicando quais características

radiculares, de fato, estão envolvidas na adaptação destas espécies ao déficit hídrico são escassos. Assim, este estudo foi realizado para elucidar quais características morfológicas radiculares estão relacionadas com a tolerância à seca em *C. abyssinica* e *R. sativus*. Trabalhando com a hipótese de que (I) ajustes adaptativos na morfologia de raízes das espécies *C. abyssinica* e *R. sativus*, aumentam a tolerância ao déficit hídrico e a capacidade de recuperação das plantas após o estresse e (II) a proporção de raízes finas é determinante na diferenciação do nível de tolerância ao déficit hídrico entre as espécies estudadas.

Diante disso, objetivou-se identificar as alterações na morfologia das raízes de *Crambe abyssinica* e *Raphanus sativus* cultivadas sob déficit hídrico, com subsequente reidratação, além de caracterizar as respostas de tolerância dessas espécies à seca.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Experimentos independentes para cada espécie foram conduzidos em casa de vegetação climatizada do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, Goiás, Brasil, durante o período de março a maio de 2018. Plantas de *Crambe abyssinica* Hochst (FMS Brilhante, safra 2017/2017) e de *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Mertzg (IPR 116, safra 2017/2017) foram cultivadas em bandejas de polietileno e, posteriormente, transplantadas em citrovasos reto (14,0 x 10,2 x 35,5 cm), preenchidos com 4,5 kg de substrato obtido a partir de uma mistura de solo do tipo Latossolo Vermelho (LVdf) e areia (2:1).

O substrato utilizado apresentava as seguintes características químicas: P – 0,7 mg dm<sup>-3</sup>; K – 13,0 mg dm<sup>-3</sup>; Ca – 1,54 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg – 0,22 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al – 0,05 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al – 1,3 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; S – 3,5 mg dm<sup>-3</sup>; B – 0,8 mg dm<sup>-3</sup>; Cu – 1,0 mg dm<sup>-3</sup>; Fe – 37,8 mg dm<sup>-3</sup>; Mn – 13,2 mg dm<sup>-3</sup>; Zn – 0,1 mg dm<sup>-3</sup>; Na – 6,0 mg dm<sup>-3</sup>; pH CaCl<sub>2</sub> – 5,6; SB – 58%; CTC – 3,1 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; matéria orgânica – 109%. O substrato total, equivalente a 0,60 m<sup>3</sup>, foi adubado com 82,8 kg do formulado NPK 4-14-08 e 2,4 kg de calcário dolomítico “filler” para elevação da saturação por bases para 60%. A capacidade de retenção de água do substrato foi determinada por meio da saturação dos vasos e a umidade foi monitorada diariamente pelo método gravimétrico para a manutenção da capacidade de campo (CC). A imposição dos tratamentos iniciou 28 dias após o plantio

(DAP), quando as plantas apresentavam entre três e quatro pares de folhas definitivas, sendo: em condições de plena irrigação (CONT; 90% CC) e déficit hídrico (DH; 40% CC) com duração de 7, 14 e 21 dias. As avaliações foram realizadas após cada período de déficit hídrico e 48 horas após o restabelecimento da irrigação para a avaliação da capacidade de recuperação das plantas (Reidratação – RT). Assim, os tratamentos foram constituídos por T1: CONT7D; T2: DH7D; T3: DH7D+RT; T4: CONT14D; T5: DH14D; T6: DH14D+RT; T7: CONT21D; T8: DH21D; T9: DH21D+RT.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento de blocos ao acaso, com 5 repetições. Cada unidade experimental foi composta por uma planta por vaso.

#### 4.2.2. Relações hídricas

O potencial hídrico foliar na antemãhã ( $\Psi_w$ ) foi mensurado usando uma bomba de pressão do tipo Scholander (Modelo 3005-1412, Soilmoisture Equipment Corp., Goleta, CA, USA). Os potenciais osmóticos foliar ( $\Psi_{sf}$ ) e radicular ( $\Psi_{sr}$ ) foram avaliados com um osmômetro de pressão de vapor (VAPRO 5600, Wescor, EUA), conforme Pask et al. (2012). Os valores de potencial osmótico foram calculados pela equação de Van't Hoff:  $\Psi_s = -R \times T \times C_s$ , em que R é a constante universal dos gases ( $0,08205 \text{ L atm mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), T é a temperatura em °K ( $T \text{ °K} = T \text{ °C} + 273$ ) e  $C_s$  a concentração do soluto (M), normalmente expressos em atmosferas, e convertidos em MPa ( $0,987 \approx 1 \text{ atm} = 0,1 \text{ MPa}$ ). O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado a partir dos dados de massa fresca (MF), massa túrgida (MT) e massa seca (MS) obtidos pela pesagem de discos foliares e calculados como  $\text{CRA (\%)} = (MF-MS) / (MT-MS) \times 100$  (Barrs e Weatherley, 1962). As mensurações do  $\Psi_w$  e CRA e as coletas para avaliação do  $\Psi_s$  foliar ocorreram entre 04 e 06 horas.

#### 4.2.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

As trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram mensuradas com um analisador de gases ao infravermelho (LI-6400XTR, Licor<sup>®</sup>, Lincoln, Nebraska, EUA), as variáveis de taxa fotossintética ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), taxa transpiratória ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e a relação entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) foram mensuradas em folhas completamente expandidas no terço médio da planta, obtidas sob radiação fotossinteticamente ativa ( $PAR$ ) constante ( $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração

atmosférica de CO<sub>2</sub> ( $C_a$ ) ( $\sim 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ), temperatura ( $\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e umidade (48 – 65 %). O rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), rendimento quântico efetivo do fotossistema II ( $\Delta F/F_m'$ ), coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) constituíram as características de fluorescência da clorofila *a* mensuradas. A partir desses dados foram estimados a eficiência do uso da água instantânea ( $EUA = A/E$ ) e o dreno alternativo de elétrons ( $ETR/A$ ) (Ribeiro et al., 2009). As medições foram realizadas entre 08 e 11 horas em casa de vegetação.

#### 4.2.4. Pigmentos fotossintéticos

A concentração de pigmentos cloroplastídicos foi determinada por meio de extração com dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), segundo metodologia descrita por Ronen e Galun (1984). Discos foliares (0,59 cm<sup>2</sup>) foram incubados em 5 mL de solução de DMSO por 24 h a 65 °C, em banho-maria. A solução foi utilizada para leitura a 480, 649,1 e 665,1 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA). As concentrações de clorofila *a* ( $C_a = 12,47A_{665,1} - 3,62A_{649,1}$ ), *b* ( $C_b = 25,06A_{649,1} - 6,5A_{665,1}$ ) e carotenoides totais ( $C_t = (1000A_{480} - 1,29C_a - 53,78C_b)/220$ ) foram calculadas de acordo com Wellburn (1994) e expressos por área. A coleta foi realizada entre 20 h e 22 horas.

#### 4.2.5. Danos celulares

Os danos celulares foram avaliados em discos foliares (1,96 cm<sup>2</sup>) pela taxa de liberação de eletrólitos (TLE) obtida com o auxílio de um condutivímetro digital portátil (CD-850, Instruthern, São Paulo, Brasil) de acordo com a metodologia adaptada descrita por Silva et al. (2014). Os discos foliares foram imersos em 30 mL de água desionizada em frascos de vidro âmbar e mantidos em repouso. Após 6 horas foi mensurada a condutividade livre (CL,  $\mu\text{S/cm}$ ). Em seguida, os frascos foram colocados em estufa a 100°C por 1 hora para obtenção da condutividade total (CT,  $\mu\text{S/cm}$ ). Com a fórmula TLE (%) = [(CL/CT) x 100] foi calculada a TLE. A coleta dos discos foliares foi realizada entre 20 e 22 horas.

A peroxidação lipídica foi determinada através da quantificação do teor de malondialdeído (MDA) pelo método do ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Heath e Packer (1968), com algumas adaptações, em folhas coletadas ao meio dia e previamente armazenadas em ultrafreezer.

#### 4.2.6. Atividades das enzimas SOD, CAT e POX

As atividades das enzimas do sistema antioxidante, dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) foram determinadas a partir de  $\pm 0,3$  g de tecido foliar macerados em almofariz com nitrogênio líquido contendo 2 mL do seguinte meio de extração: tampão fosfato de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,8), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 0,1 mM), fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF, 1 mM) e polivinilpirrolidona (PVP, 2%). O extrato enzimático foi centrifugado a 12000 g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como extrato bruto.

A atividade da SOD foi determinada a partir da metodologia proposta por Del Longo et al. (1993) mediante a mensuração da capacidade da enzima em reduzir fotoquimicamente o azul de nitrotetrazólio (NBT). A mistura de reação consistiu de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8), metionina (13 mM), NBT (0,075 mM), EDTA (0,1 mM) e riboflavina (0,002 mM). A reação foi iniciada após a adição 50  $\mu$ L do extrato enzimático em 1,95 mL da mistura da reação. A reação ocorreu a 25°C sob exposição de uma lâmpada de 15 W. Depois de 10 min de exposição à luz, a luz foi interrompida e a produção de formazana azul, resultado da fotorredução do NBT, foi determinada a 560 nm em espectrofotômetro (Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA) de acordo com Giannopolitis & Ries (1977). As amostras controle foram mantidas no escuro durante 10 min e medida a absorvância a 560 nm. Os valores obtidos do branco das amostras foram subtraídos dos valores das amostras de cada uma das repetições de cada tratamento exposto à luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

A atividade da CAT foi determinada pela velocidade da degradação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 240 nm durante 3 min a 25°C (Havir, & Mc Hale, 1987), com algumas modificações. A reação foi iniciada após adição de 10  $\mu$ L do extrato bruto enzimático em 990  $\mu$ L do meio de reação contendo tampão de fosfato de potássio (25 mM, pH 7,0) e  $H_2O_2$  (2,5 mM). O coeficiente de extinção molar de  $36 M^{-1} cm^{-1}$  (Anderson et al., 1995) foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

A atividade da POX foi determinada de acordo com Kar & Mishra (1976). A reação consistiu de 100  $\mu$ L do extrato enzimático bruto e 1,9 mL da mistura da reação contendo fosfato de potássio (25mM; pH 6,8), pirogalol (20mM) e peróxido de

hidrogênio (20 mM). A absorvância foi mensurada a 420 nm em espectrofotômetro UV-Vis por 1 min a 25°C. O coeficiente de extinção de  $0,00247 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  foi usado para calcular a atividade da POX, que foi expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade das enzimas foi expressa com base em proteína, cuja concentração foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976). As amostras foram coletadas ao meio dia, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer até o momento das análises.

#### 4.2.7. Análise morfológica da parte aérea e do sistema radicular

Para as análises morfológicas, as plantas foram coletadas para avaliação de altura da planta (AP, cm), diâmetro de caule (DC, mm), número de nós (NN) e número de folhas (NF). A área foliar (AF,  $\text{m}^2$ ) foi calculada pelo software ImageJ (Processamento e Análise de Imagens em Java, v. 1.52d, EUA). A massa seca de folhas (MSF, g), massa seca de caule (MSC, g) e massa seca de raiz (MSR, g) foi obtida após secagem do material em estufa de circulação de ar a 65°C até peso constante, permitindo, ainda, a obtenção da massa seca da parte aérea (MSPA = MSF + MSC) e massa seca total (MST = MSPA + MSR). A partir dos dados de área foliar e massa seca da planta foram calculados a área foliar específica (AFE), razão de área foliar (RAF) e razão raiz/parte aérea (R/PA).

O sistema radicular foi avaliado pelo método de análise de imagens, com adaptações, utilizando o software Safira v1.1 (Sistema de Análise de Fibras e Raízes, Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Paulo, Brasil), e pelo método de raízes lavadas. As imagens obtidas por câmera digital (6MP; 3264x1836px) a partir do perfil do solo retirado dos vasos foram utilizadas para a quantificação das raízes. Posteriormente, uma subárea de cada imagem foi selecionada para análise das raízes. Após obtenção das imagens, as raízes foram lavadas sobre peneira para determinação do comprimento da maior raiz (PR, cm) e alocação de biomassa no sistema radicular (MSR).

As raízes foram classificadas em três classes de diâmetro: raízes muito finas ( $\emptyset < 0,5 \text{ mm}$ ), raízes finas ( $0,5 < \emptyset < 2,0 \text{ mm}$ ) e raízes grossas ( $\emptyset > 2,0 \text{ mm}$ ), segundo critério proposto por Böhm (1979). A partir dos dados obtidos pelo processamento de imagens foram determinadas as características morfológicas de diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento de raiz muito fina (CRMF, cm), comprimento de raiz fina (CRF, cm), comprimento de raiz grossa (CRG, cm), comprimento total de raiz (CTR, cm), área de superfície de raiz muito fina (ASRMF,  $\text{cm}^2$ ), área de superfície de

raiz fina (ASRF,  $\text{cm}^2$ ), área de superfície de raiz grossa (ASRG,  $\text{cm}^2$ ), área de superfície total de raiz (AST,  $\text{cm}^2$ ), volume de raiz muito fina (VRMF,  $\text{cm}^3$ ), volume de raiz fina (VRF,  $\text{cm}^3$ ), volume de raiz grossa (VRG,  $\text{cm}^3$ ), volume total de raiz (VTR,  $\text{cm}^3$ ), razão CTR/MSPA ( $\text{cm g}^{-1}$ ), comprimento específico de raiz, CE (CTR/MSR,  $\text{cm g}^{-1}$ ), finura de raiz, FR (CTR/VTR,  $\text{cm cm}^{-3}$ ), densidade de tecido radicular, DTR (MSR/VTR,  $\text{g cm}^{-3}$ ), razão  $A_R/A_F$  (AST/AF,  $\text{m}^2 \text{m}^{-2}$ ), área de superfície específica, ASE (AST/MSR,  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ) e densidade de comprimento de raiz, DCR (CTR/ $V_{\text{solo}}$ ,  $\text{cm cm}^{-3}$ ).

#### 4.2.8. Caracterização micromorfométrica foliar

Amostras foliares de cada repetição ( $n=5$ ), para todos os tratamentos ( $n=9$ ), foram coletadas para a análise micromorfométrica. As amostras foram coletadas na região central de folhas totalmente expandidas situadas no terço médio das plantas e fixadas em Karnovsky (1995), por 24 horas. Após este período, o material vegetal foi pré-lavado em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2), desidratado em série etílica crescente (30% a 100%), pré-infiltrado e infiltrado em historesina (Leica, Alemanha), conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras foram seccionadas transversalmente em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logenscientific, China) a 5  $\mu\text{m}$  de espessura e os cortes corados com azul de toluidina – coloração policromática (0,05% tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) (O'Brien et al., 1964). As imagens foram obtidas a partir de fotografias tiradas em microscópio óptico (BX61, Olympus, Tokyo, Japão), acoplada a uma câmera DP-72 usando a opção de campo claro. As medidas de micromorfometria foram realizadas com o auxílio do software ImageJ (Processamento e Análise de Imagem em Java, v. 1.52d, EUA). Os dados foram obtidos a partir da média de cinco campos mensurados por repetição. As características micromorfométrica foliares de espessura da epiderme adaxial (Ep Ad,  $\mu\text{m}$ ), epiderme abaxial (Ep Ab,  $\mu\text{m}$ ), parênquima paliçádico (PP,  $\mu\text{m}$ ), parênquima esponjoso (PE,  $\mu\text{m}$ ), mesofilo (MS,  $\mu\text{m}$ ) e espessura foliar total (EF,  $\mu\text{m}$ ) foram determinadas.

#### 4.2.9. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância pelo teste F ( $P \leq 0,05$  e  $P \leq 0,01$ ) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ) utilizando o programa Sistema de Análise de Variância (SISVAR<sup>®</sup>, versão 5.3).



## 4.3 Resultados

### 4.3.1. Relações hídricas

O déficit hídrico diminuiu o  $\Psi_w$  em *C. abyssinica*, sendo essa resposta intensificada de acordo com a duração do estresse (Figura 1A). O conteúdo relativo de água diminuiu com a duração prolongada do déficit hídrico, porém, ainda assim, os valores se mantiveram em torno de 80%. (Figura 1D). Com a reidratação, todas as características de relações hídricas avaliadas foram recuperadas se igualando ao controle. A exceção foi o potencial osmótico radicular que, comparado às plantas controle e sob déficit hídrico, diminuiu nas plantas reidratadas (RT) logo após os 7 dias do estresse (Figura 1C).

De modo geral, como esperado, a duração da restrição hídrica promoveu reduções no *status* hídrico das plantas de *R. sativus*, o que foi observado por meio do potencial hídrico foliar, potencial osmótico da raiz e folha e do conteúdo relativo de água aos 21 dias após início do estresse. Com a reidratação, essas características atingiram valores similares aos do controle, em todos os tempos avaliados. O potencial osmótico radicular, por outro lado, diminuiu aos 7 DAT, nas plantas reidratadas de *R. sativus* (Figura 1G).

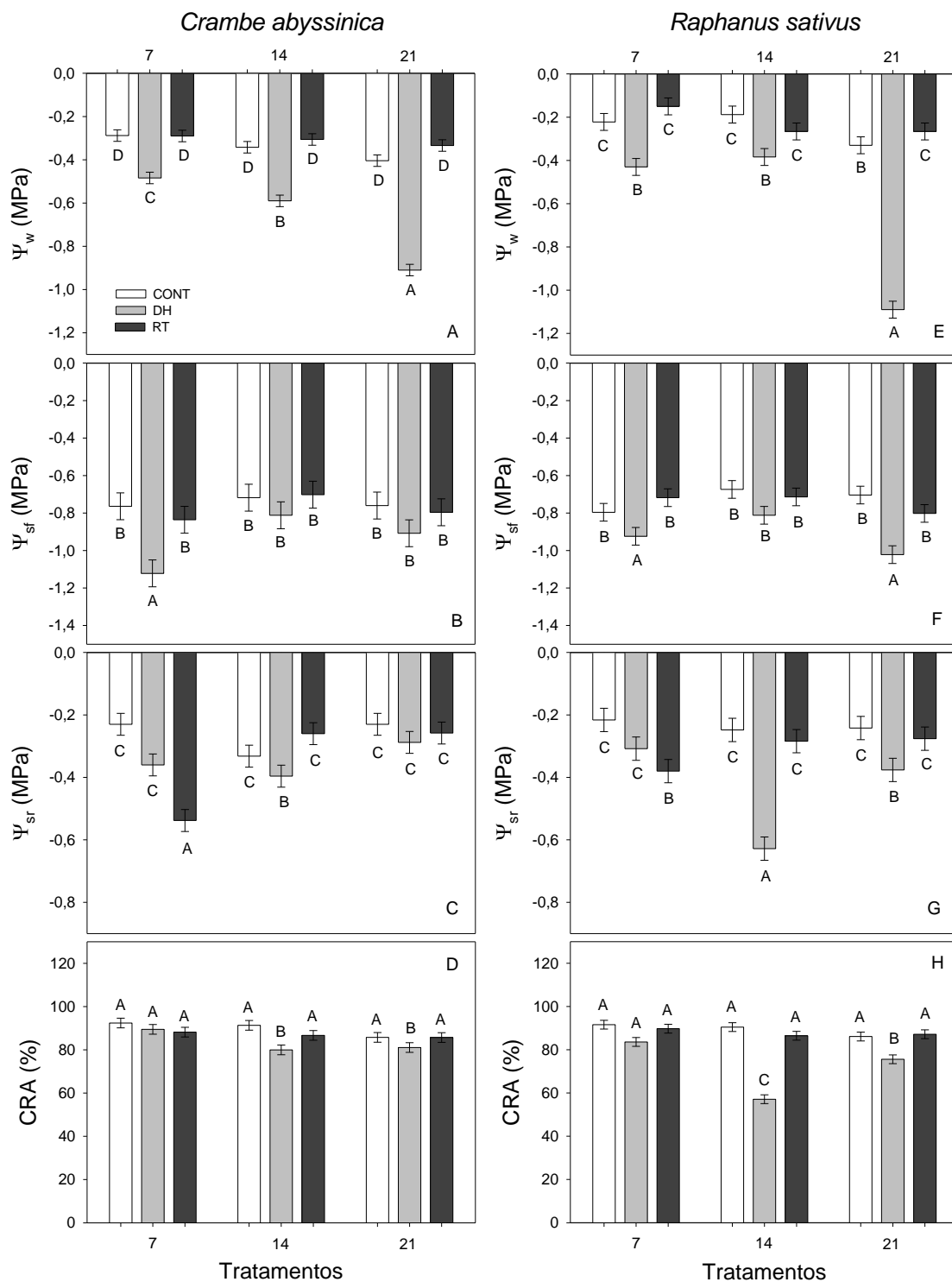


Figura 1. Potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) [A; E], potencial osmótico foliar ( $\Psi_{sf}$ ) [B; F], potencial osmótico radicular ( $\Psi_{sr}$ ) [C; G] e conteúdo relativo de água foliar (CRA) [D; H] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.2. Trocas gasosas

Com a persistência do déficit hídrico, reduções da taxa fotossintética e relação  $C_i/C_a$  foram observadas nas plantas de *C. abyssinica* (Figura 2A e D). A condutância estomática diminuiu, apenas, nas plantas expostas a 14 dias de estresse, em comparação ao controle (Figura 2B). Após a reidratação, o efeito do estresse sobre a taxa fotossintética e condutância estomática não foram revertidos (Figura 2A e B).

Em *R. sativus*, o déficit hídrico causou reduções na condutância estomática, taxa transpiratória e na relação  $C_i/C_a$  (Figura 2G, H e I), o que por sua vez, promoveu aumento na eficiência do uso da água instantânea aos 21 dias após o início do estresse (Figura 2J). Com a reidratação, após o período de 14 dias sob déficit hídrico, interessante foi observado aumento da taxa fotossintética, mas com menor condutância estomática nas plantas de *R. sativus* (Figura 2F e G). Após o estresse de 21 dias, a condutância estomática não foi totalmente recuperada, enquanto, a taxa transpiratória aumentou em comparação ao controle (Figura 2 G e H).

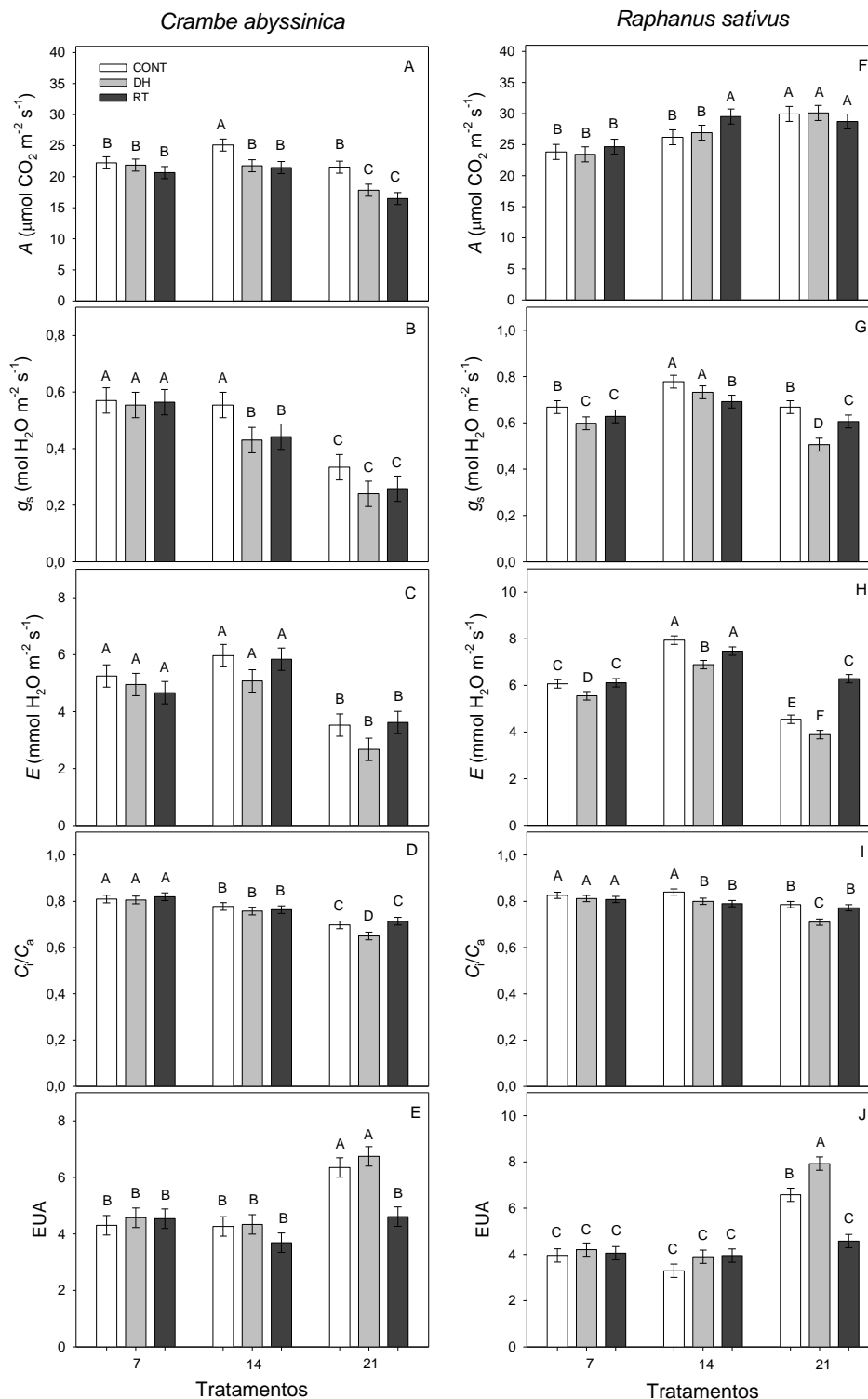


Figura 2. Taxa fotossintética (A) [A; F], condutância estomática ( $g_s$ ) [B; G], taxa transpiratória ( $E$ ) [C; H], relação entre concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ) [D; I] e eficiência do uso da água instantânea (EUA) [E; J] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.4. Fluorescência da clorofila *a*

O déficit hídrico, de modo geral, promoveu poucas alterações nas características de fluorescência da clorofila *a* nas duas espécies estudadas. Os valores da razão  $F_v/F_m$ , em *C. abyssinica* e *R. sativus*, permaneceram próximos a 0,80, independente da condição hídrica (Figura 3A e F). Com prolongamento do estresse, o aumento da razão  $ETR/A$  foi observado nas plantas de *C. abyssinica* (Figura 3 E). Após a reidratação, o coeficiente de dissipação não-fotoquímica aumentou nas plantas anteriormente sob déficit hídrico com duração de 7 e 21 dias (Figura 3C). Já o rendimento quântico efetivo do fotossistema II e da taxa de transporte de elétrons, diminuíram após a reidratação, porém, nas plantas que foram expostas a 14 dias de déficit hídrico (Figura 3B e D).

Em *R. sativus*, após os 14 dias de déficit hídrico foi observado aumento do rendimento quântico efetivo do fotossistema II e da taxa de transporte de elétrons, que se manteve com a reidratação (Figura 3G e I). Após os 7 dias de estresse, a reidratação promoveu aumento do rendimento quântico efetivo do fotossistema II e da taxa de transporte de elétrons, porém, as plantas de *R. sativus* sob déficit hídrico não foram afetadas (Figura 3G e I).

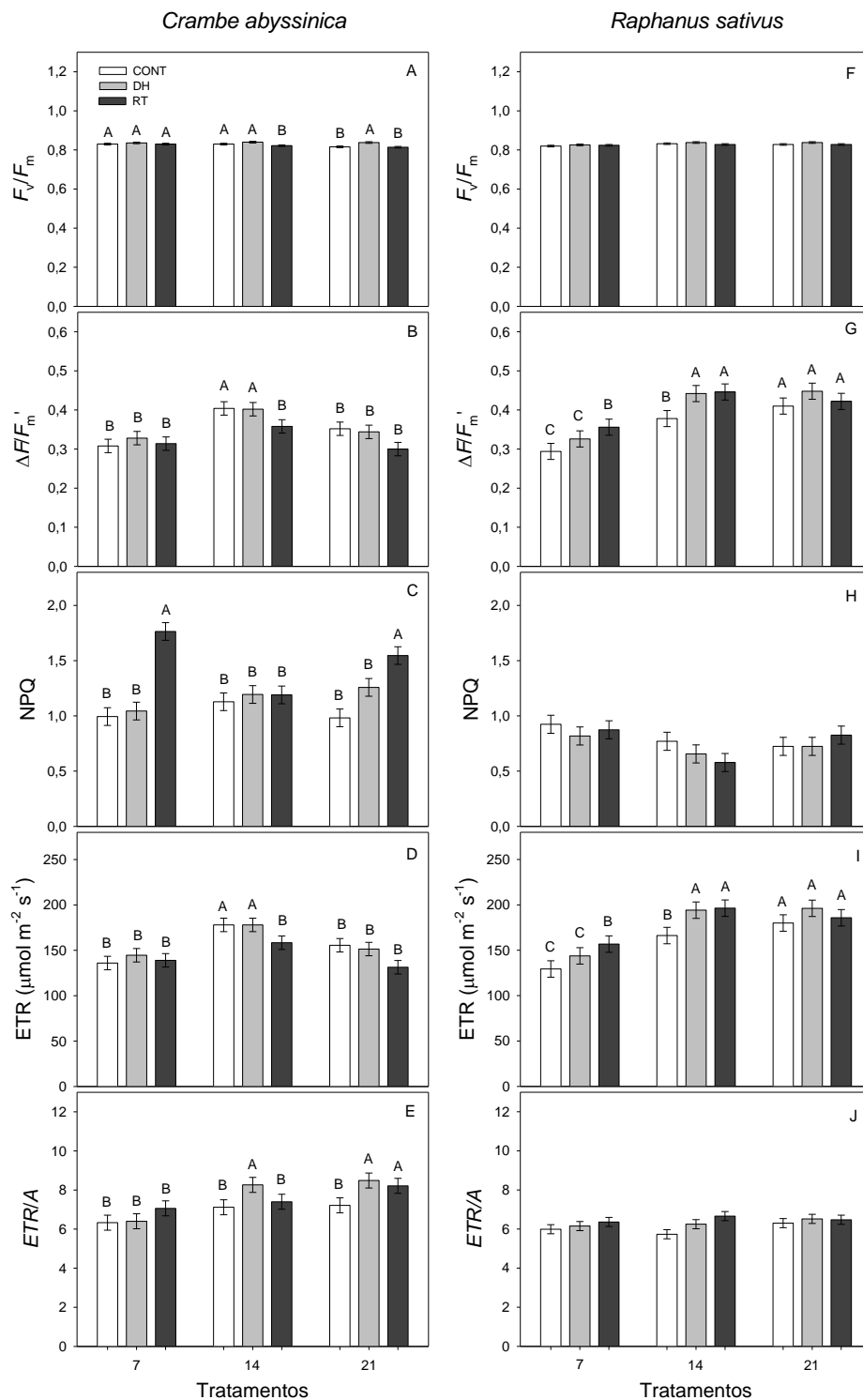


Figura 3. Rendimento quântico potencial do FSII ( $F_v/F_m$ ) [A; F], rendimento quântico efetivo do FSII ( $\Delta F/F_m'$ ) [B; G], coeficiente de dissipação não-fotoquímica (NPQ) [C; H], taxa de transporte de elétrons (ETR) [D; I] e a razão entre o transporte de elétrons e a taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $ETR/A$ ) [E; J] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.5. Pigmentos cloroplastídicos

O déficit hídrico, durante a fase inicial, aumentou as concentrações de clorofila *a* e clorofila total nas plantas de *C. abyssinica* (Figura 4 A e C). Após a reidratação, das plantas sob déficit hídrico por 14 dias, as concentrações de clorofila *a*, *b* e total diminuíram.

Em *R. sativus*, o déficit hídrico promoveu aumento das concentrações de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides (Figura 4), no entanto, após a reidratação, os valores destas características diminuíram nas plantas anteriormente sob 7 e 21 dias de estresse. A exceção ocorreu apenas após os 14 dias em que as plantas reidratadas mantiveram o aumento das concentrações de clorofila *a*, *b* e total, em comparação ao controle (Figura 4E, F e G).

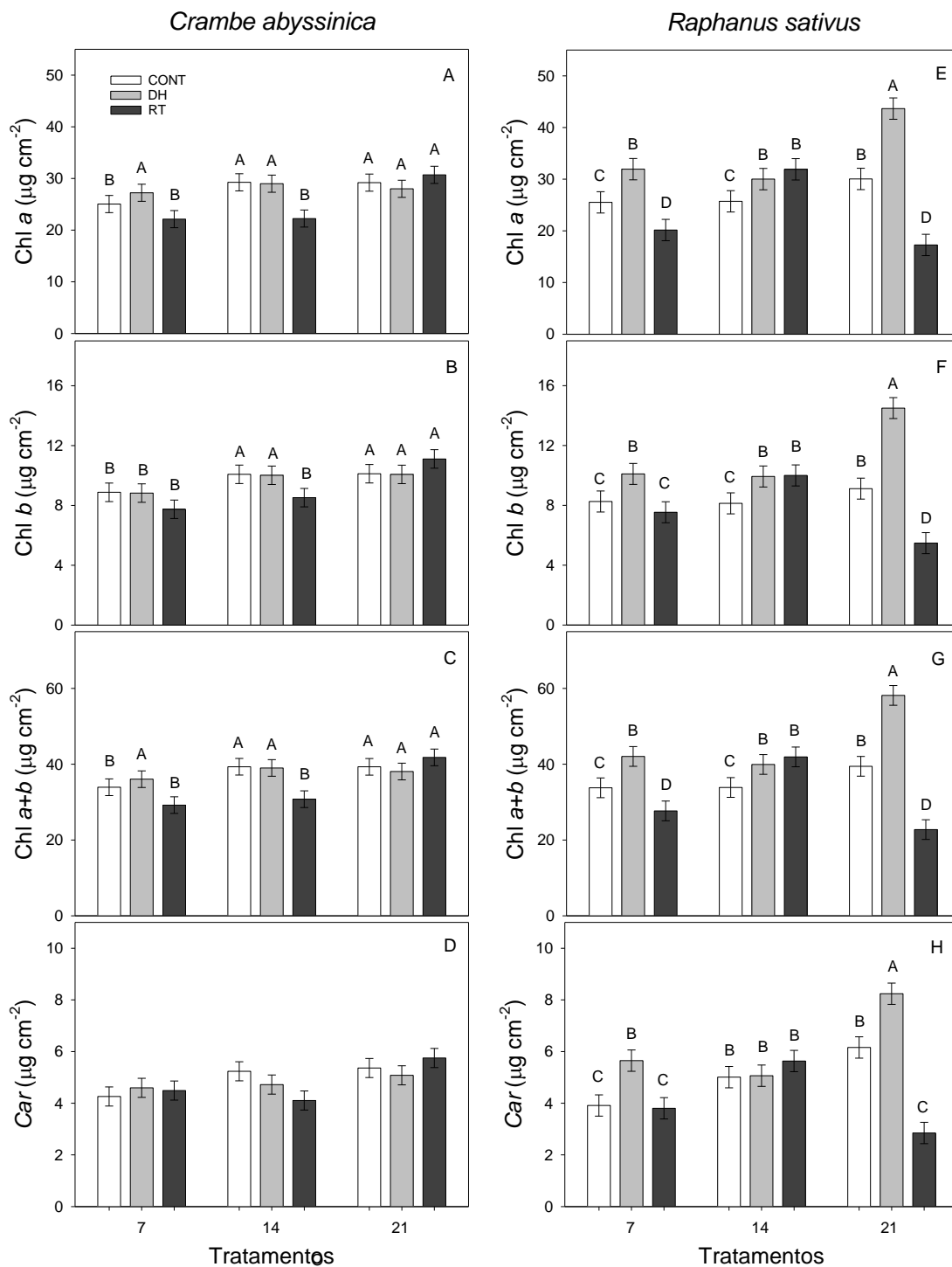


Figura 4. Concentração de clorofila *a* (Chl *a*) [A; E], clorofila *b* (Chl *b*) [B; F], clorofila total (Chl *a+b*) [C; G] e carotenoides (*Car*) [D; H] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).



#### 4.3.6. Taxa de liberação de eletrólitos e conteúdo de malondialdeído

Ao contrário do esperado, o déficit hídrico não causou danos na membrana celular, conforme observado pela ausência de efeitos do estresse na taxa de liberação de eletrólitos e no conteúdo de malondialdeído nas plantas de *C. abyssinica* e *R. sativus* (Figura 5).

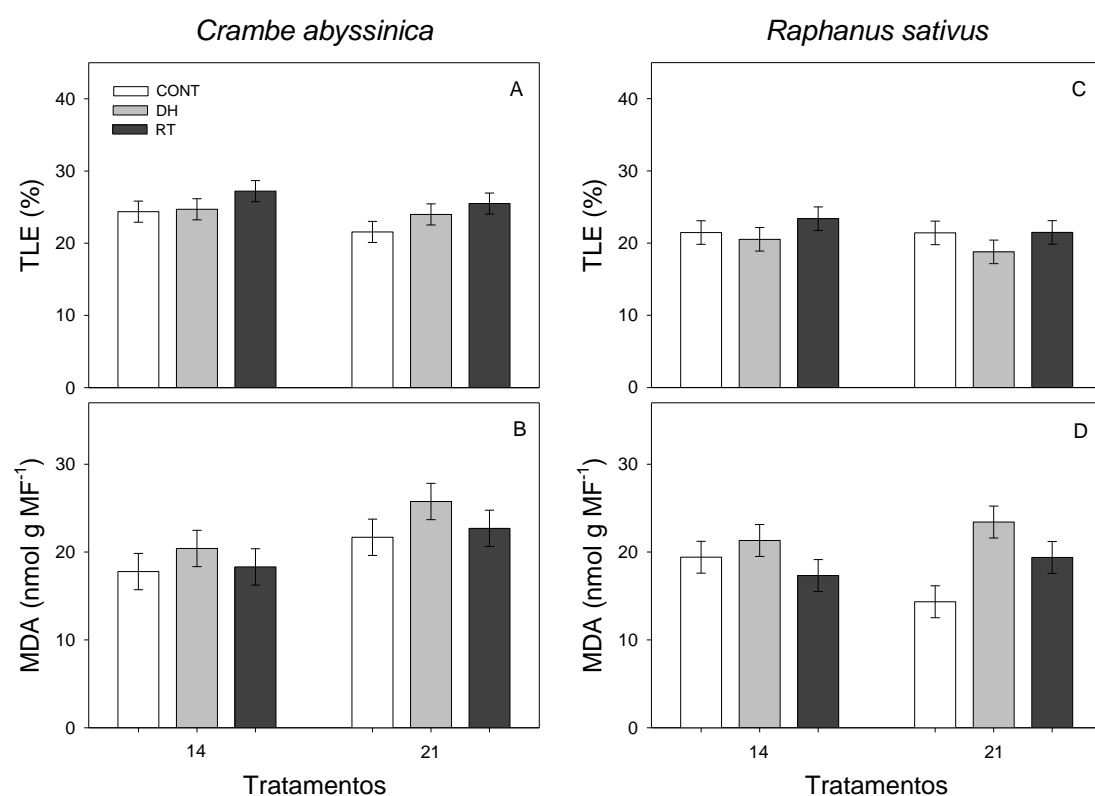


Figura 5. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE) [A; C] e conteúdo de malondialdeído (MDA) [B; D] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ).

#### 4.3.7. Atividades das enzimas antioxidante SOD, CAT e POX

A maior atividade da catalase nas plantas de *C. abyssinica* foi observada tanto em plantas sob déficit hídrico (Figura 6A), quanto em plantas reidratadas do déficit após os 21 dias (Figura 6B). O incremento na atividade da peroxidase ocorreu apenas quando a duração do estresse foi prolongada (Figura 6C).

Em *R. sativus*, o déficit hídrico induziu aumento na atividade das enzimas catalase (Figura 6E) e peroxidase (Figura 6F). Mesmo após a reidratação das plantas aos 21 dias de estresse, a atividade da peroxidase permaneceu elevada em comparação ao controle (Figura 6F). Interessantemente, a atividade da dismutase do superóxido foi reduzida nas plantas reidratadas, após o período de 14 dias de estresse (Figura 6A).

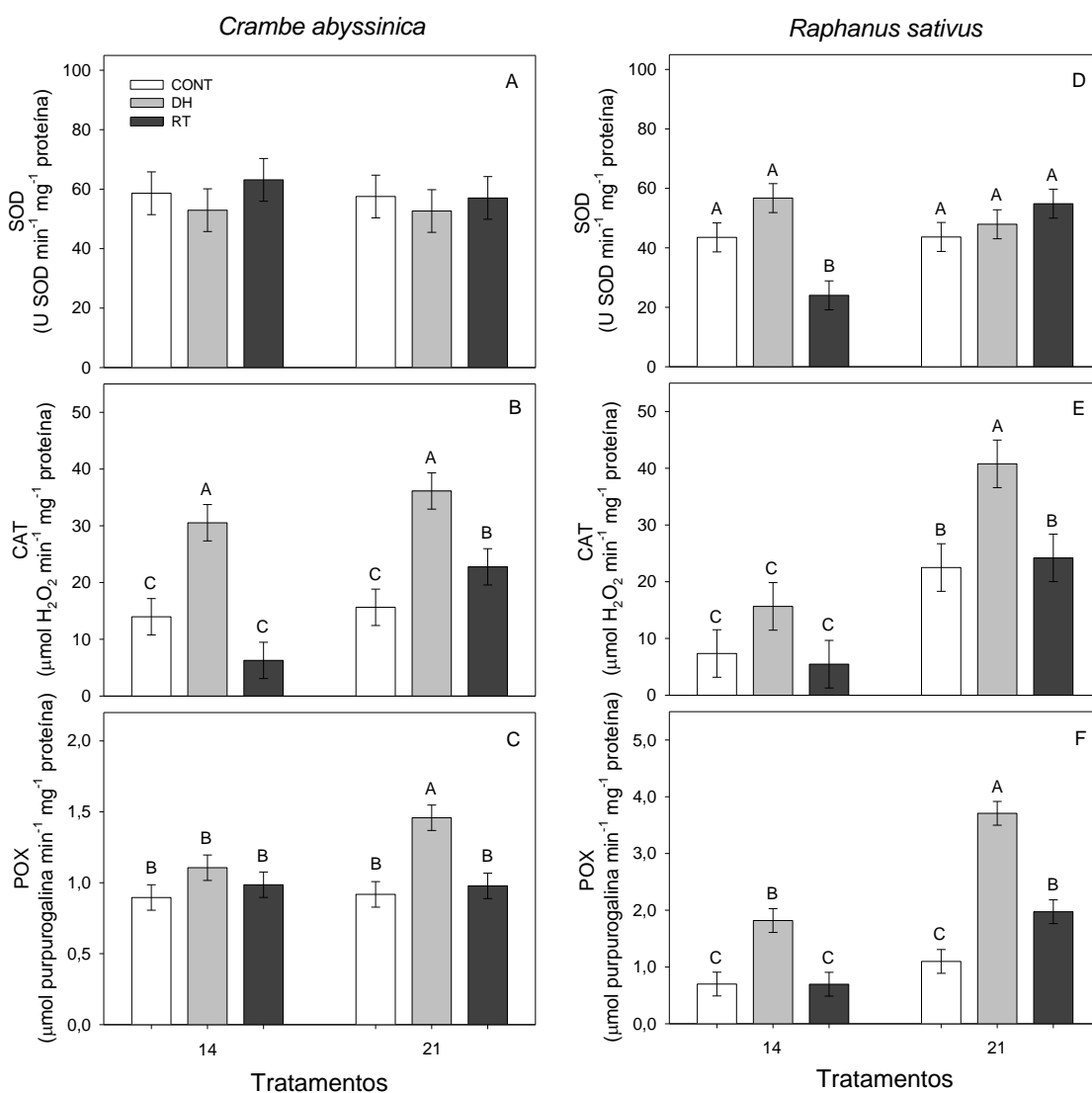


Figura 6. Atividade da dismutase do superóxido (SOD) [A; D], catalase (CAT) [B; E] e peroxidase (POX) [C; F] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias ± EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.8. Características morfológicas da parte aérea

A duração prolongada do déficit hídrico inibiu o crescimento das plantas de *C. abyssinica*, como observado pelas reduções na altura, diâmetro de caule e número de nós (Figura 7). Após 7 e 14 dias do início do estresse, foram observadas reduções na área foliar (Figura 7E). Enquanto, o número de folhas diminuiu somente após o período de 14 dias de déficit hídrico (Figura 7D). Com a reidratação, de modo geral, as plantas de *C. abyssinica* não demonstraram recuperação das características morfológicas (Figura 7).

O déficit hídrico, com duração de 14 dias, causou reduções no diâmetro de caule, número de nós e de folhas, e a área foliar em plantas de *R. sativus*. Com a persistência do estresse, a redução do diâmetro de caule e da área foliar foi mantida nas plantas estressadas. Após a reidratação, o efeito do estresse de 21 dias sobre o diâmetro de caule e a área foliar não foram revertidos (Figura 7G e J).

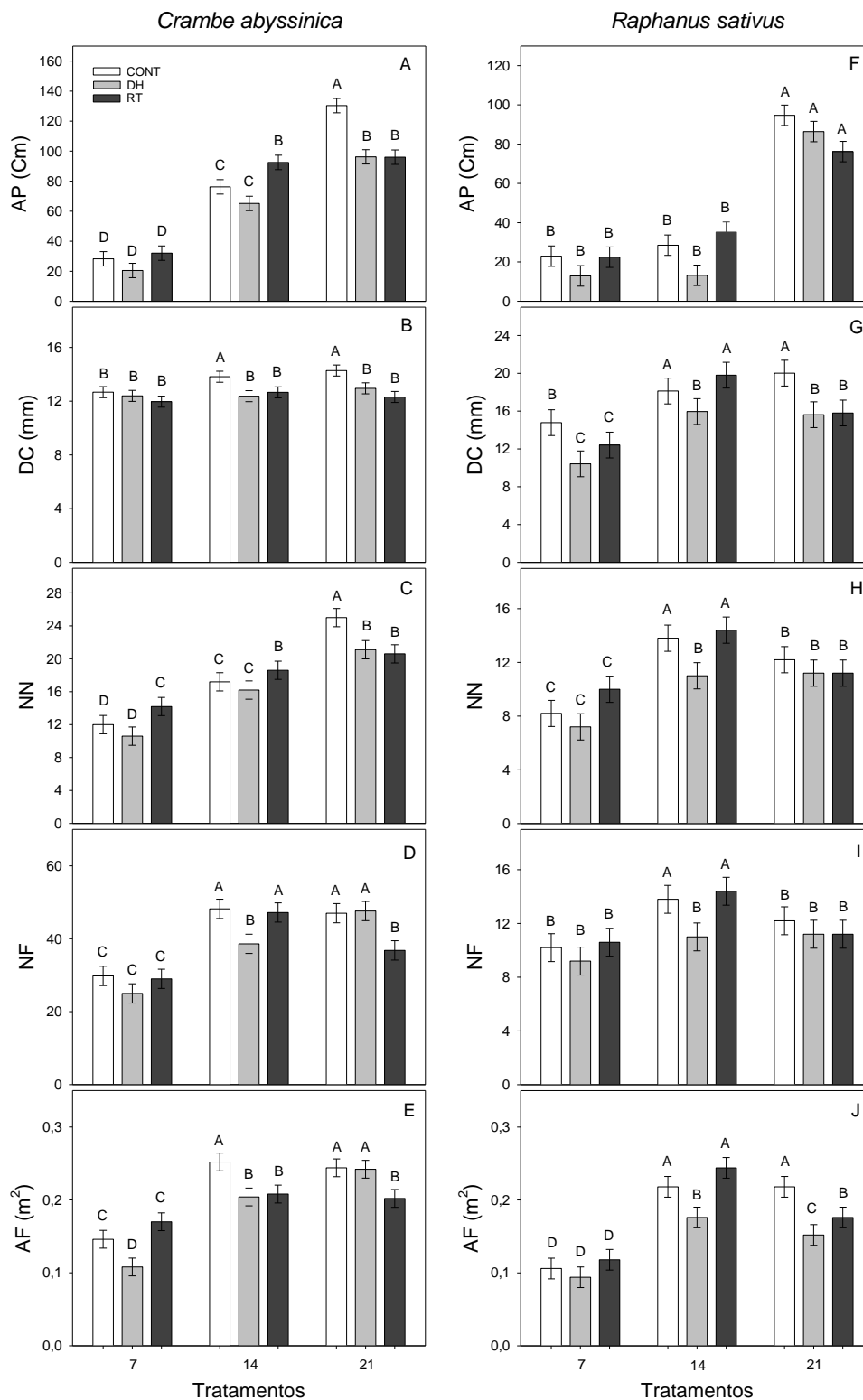


Figura 7. Altura de planta (AP) [A; F], diâmetro de caule (DC) [B; G], número de nós (NN) [C; H], número de folhas (NF) [D; I] e área foliar (AF) [E; J] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.9. Alocação de biomassa

De modo geral, durante a fase inicial do estresse foram observadas reduções na alocação de biomassa das plantas de *C. abyssinica*. À medida que o déficit hídrico foi prolongado, apenas a massa seca do caule, da parte aérea e total foram reduzidas nas plantas estressadas (Figura 8). Com a reidratação, os valores de massa seca de *C. abyssinica*, após os 21 dias de estresse, foram inferiores aos do controle.

Em *R. sativus*, a duração prolongada do déficit hídrico inibiu a alocação de biomassa nas folhas, caule, parte aérea e total. Após a reidratação, as plantas de *R. sativus* expostas aos 21 dias de estresse não demonstraram recuperação da massa seca de caule, parte aérea e total (Figura 8).

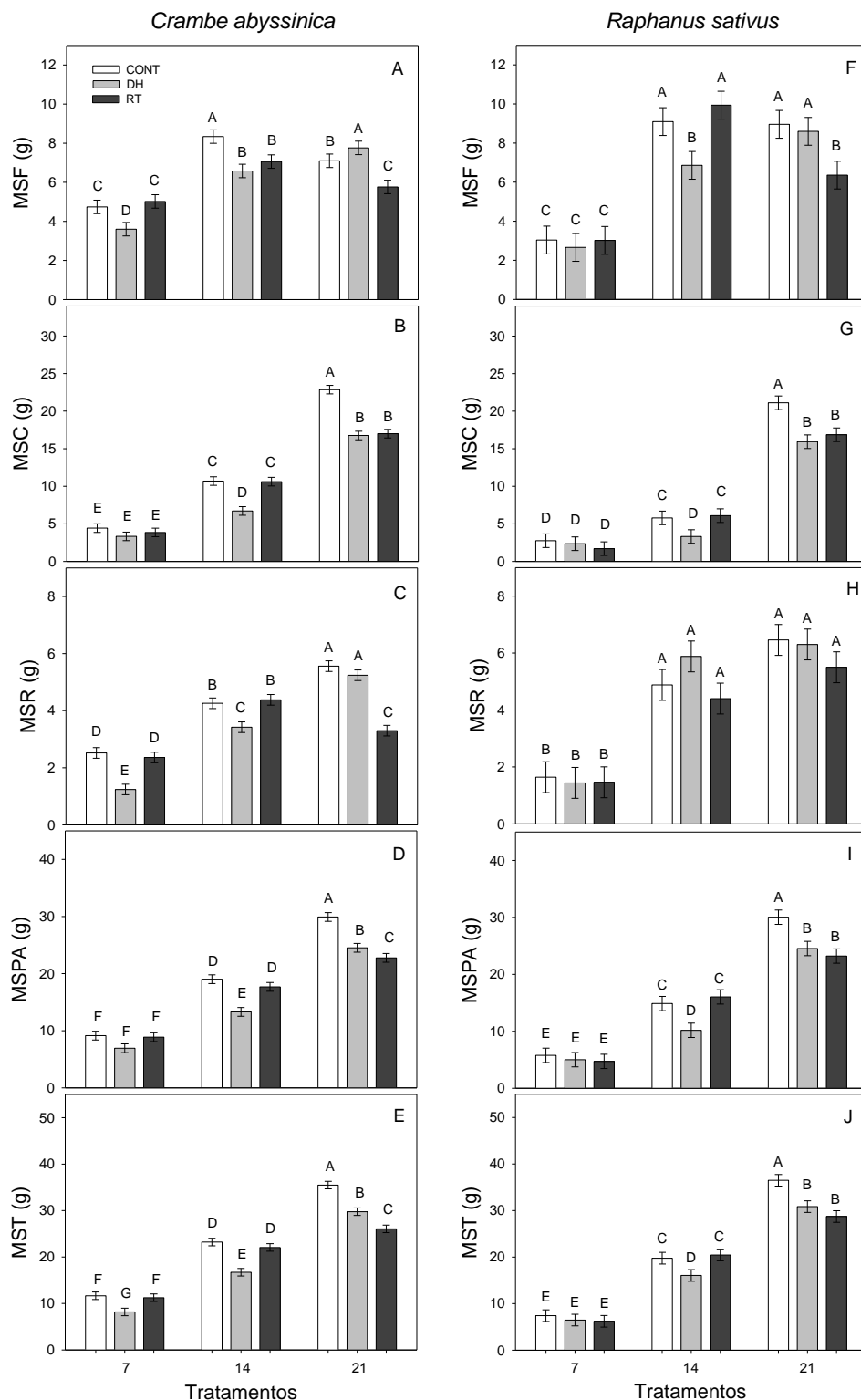


Figura 8. Massa seca de folhas (MSF) [A; F], massa seca de caule (MSC) [B; G], massa seca de raiz (MSR) [C; H], massa seca da parte aérea (MSPA) [D; I] e massa seca total (MT) [E; J] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.10. Características morfológicas do sistema radicular

O déficit hídrico promoveu alterações na arquitetura do sistema radicular de *C. abyssinica* e *R. sativus* (Tabela 1). Nas plantas de *C. abyssinica*, aos 7 dias após o início do déficit hídrico, foi observado aumento na área de superfície e volume de raízes muito finas, assim como, nas plantas reidratadas. Reduções no diâmetro médio de raiz e aumento no comprimento de raízes finas foram observados após 14 dias de estresse. Aos 21 dias, a profundidade radicular diminuiu nas plantas de *C. abyssinica* sob déficit hídrico. O diâmetro médio radicular, o volume de raízes finas e o volume total de raízes aumentou, após 14 dias de estresse, nas plantas reidratadas. O comprimento, a área de superfície e o volume de raízes grossas aumentou com a reidratação após 21 dias de déficit hídrico (Tabela 1).

O déficit hídrico diminuiu o diâmetro médio radicular aos 7 e 14 dias de duração do estresse nas plantas de *R. sativus*. O comprimento de raízes finas e grossas, assim como, a área de superfície e o volume de raízes muito finas, finas, grossas e total foram reduzidos após 14 dias do início do déficit hídrico. O comprimento de raízes muito finas, finas e total, a área de superfície de raízes muito finas e total e o volume de raízes muito finas aumentaram aos 21 dias nas plantas sob déficit hídrico. Após a reidratação, o comprimento, a área de superfície e o volume de raízes finas e grossas, assim como, o volume total de raízes aumentou nas plantas reidratadas após 7 dias de estresse. Ainda na condição de reidratação, após 14 dias de estresse, foi observado aumento do diâmetro médio radicular e do volume de raízes muito finas, finas e total, em comparação ao controle. A reidratação após o estresse de 21 dias causou reduções no comprimento de raízes finas, na área de superfície de raízes finas e no volume de raízes muito finas, finas, grossas e total, em comparação ao controle (Tabela 1).

Tabela 1. Profundidade radicular (PR, cm), diâmetro médio de raiz (DMR, mm), comprimento de raiz muito fina (CRMF, cm), comprimento de raiz fina (CRF, cm), comprimento de raiz grossa (CRG, cm), comprimento total de raiz (CTR, cm), área de superfície de raiz muito fina (ASRMF, cm<sup>2</sup>), área de superfície de raiz fina (ASRF, cm<sup>2</sup>), área de superfície de raiz grossa (ASRG, cm<sup>2</sup>), área de superfície total de raiz (AST, cm<sup>2</sup>), volume de raiz muito fina (VRMF, cm<sup>3</sup>), volume de raiz fina (VRF, cm<sup>3</sup>), volume de raiz grossa (VRG, cm<sup>3</sup>) e volume total de raiz (VTR, cm<sup>3</sup>) em plantas de *Crambe abyssinica* e *Raphanus sativus* submetidas às condições de plena irrigação (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Raízes muito finas (RMF, Ø inferior a 0,5 mm), raízes finas (RF, 0,5 < Ø < 2,0 mm) e raízes grossas (RG, Ø > 2,0 mm).

<i>Crambe abyssinica</i>															
DAT	RH	PR	DMR	CRMF	CRF	CRG	CTR	ASRMF	ASRF	ASRG	AST	VRMF	VRF	VRG	VTR
7	CONT	50,8 A	0,58 D	266 A	56,6 C	2,2 C	325 B	44,3 B	19,4 B	1,57 C	65,3 B	0,62 B	0,61 C	0,09 B	1,31 D
	DH	50,3 A	0,59 D	301 A	64,4 C	2,4 C	367 B	53,8 A	22,6 B	1,79 C	78,3 B	0,77 A	0,72 C	0,08 B	1,57 D
	RT	51,2 A	0,57 D	297 A	54,7 C	2,3 C	354 B	51,8 A	20,9 B	1,77 C	74,4 B	0,71 A	0,57 C	0,08 B	1,37 D
14	CONT	54,1 A	0,83 B	0,00 B	511 B	5,9 A	517 A	0,00 C	135 A	3,92 A	139 A	0,00 C	2,95 B	0,19 A	3,15 B
	DH	49,0 A	0,72 C	0,00 B	668 A	1,0 D	669 A	0,00 C	158 A	0,65 D	158 A	0,00 C	3,10 B	0,04 C	3,13 B
	RT	51,5 A	0,91 A	0,00 B	503 B	3,8 B	507 A	0,00 C	150 A	2,90 B	152 A	0,00 C	3,61 A	0,17 A	3,78 A
21	CONT	50,9 A	0,70 C	0,00 B	596 A	0,5 D	597 A	0,00 C	133 A	0,35 D	133 A	0,00 C	2,35 B	0,02 C	2,37 C
	DH	43,7 B	0,69 C	0,00 B	587 A	0,5 D	587 A	0,00 C	144 A	0,32 D	144 A	0,00 C	2,67 B	0,02 C	2,69 C
	RT	43,2 B	0,71 C	0,00 B	615 A	1,8 C	617 A	0,00 C	144 A	1,23 C	145 A	0,00 C	2,81 B	0,07 B	2,88 C
<i>Raphanus sativus</i>															
7	CONT	39,1 B	0,62 D	401,9 C	70,5 C	3,2 D	475,6 C	71,1 D	27,5 C	2,59 C	101 D	1,32 F	0,89 D	0,15 D	2,36 E
	DH	28,8 C	0,67 C	329,9 C	77,3 C	3,1 D	410,4 C	62,4 D	31,2 C	2,38 C	96,0 D	0,92 F	1,03 D	0,16 D	2,10 E
	RT	45,0 A	0,58 D	402,1 C	165 A	14 B	580,9 C	70,5 D	66,1 B	12,5 B	149 D	0,98 F	2,18 C	0,64 B	3,81 D
14	CONT	51,7 A	0,79 B	1287 A	157 A	24 A	1468 A	318 A	77,3 A	20,7 A	416 A	6,34 B	3,49 B	1,53 A	11,4 B
	DH	48,2 A	0,68 C	1243 A	85,1 C	8,1 C	1336 A	243 B	32,6 C	6,38 C	282 B	3,99 C	1,28 D	0,35 C	5,62 C
	RT	48,1 A	0,91 A	1220 A	156 A	5,5 D	1382 A	344 A	91,7 A	5,05 C	441 A	7,74 A	4,85 A	0,66 B	13,3 A
21	CONT	49,3 A	0,72 C	640,9 B	115 B	5,3 D	760,7 B	170 C	53,1 B	5,27 C	229 C	2,81 D	2,19 C	0,41 C	5,41 C
	DH	54,7 A	0,66 C	1230 A	147 A	3,4 D	1381 A	242 B	61,4 B	3,70 C	307 B	3,92 C	2,53 C	0,22 D	6,68 C
	RT	43,0 A	0,68 C	627,8 B	80,2 C	4,6 D	712,6 B	141 C	36,2 C	3,43 C	180 C	2,20 E	1,44 D	0,22 D	3,87 D

\*Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos, nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ); RH: Reposições hídricas.



#### 4.3.11. Proporção de raízes por classes de diâmetro no CTR, AST e VTR

Em *C. abyssinica*, considerando o comprimento, a área de superfície e o volume total de raízes, em todas as condições hídricas, observou-se maior proporção de raízes muito fina durante a fase inicial do estresse e ausência com a persistência do déficit hídrico. Por outro lado, as proporções de raízes aumentaram com a duração prolongada do estresse (Figura 9A, B e C).

*R. sativus* demonstrou maior proporção de raízes muito finas, em comparação com as raízes finas e grossas, em todos os períodos avaliados (Figura 9D, E e F). Nesta espécie, observou-se ainda, aumento de raízes muito finas nas condições de déficit hídrico e reidratação aos 14 e 21 dias. Nas duas espécies foram obtidas baixas proporções de raízes grossas.

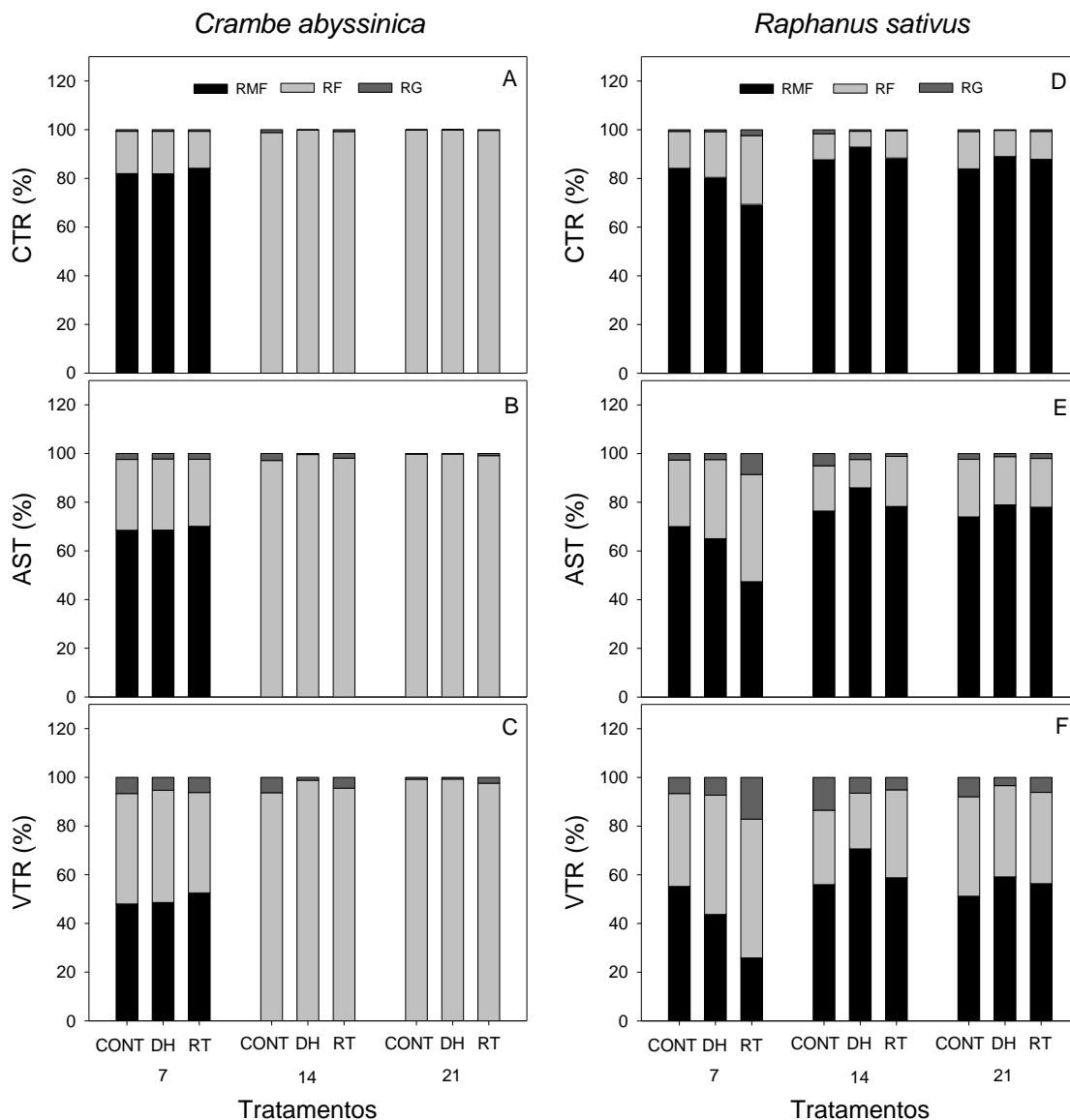


Figura 9. Proporção de raízes muito finas, finas e grossas no comprimento total radicular (CTR) [A; D], área de superfície radicular (ASR) [B; E] e volume total radicular (VTR) [C; F] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias ( $n = 5$ ). Classes de diâmetros: raízes muito finas (RMF,  $\varnothing < 0,5$  mm), raízes finas (RF,  $0,5 < \varnothing < 2,0$  mm) e raízes grossas (RG,  $\varnothing > 2,0$  mm).

#### 4.3.12. Análises morfológicas da parte aérea e do sistema radicular

Em *C. abyssinica*, o déficit hídrico promoveu aumento da razão CTR/MSPA, comprimento específico de raiz,  $A_R/A_F$  e área de superfície específica, enquanto, reduções na finura de raiz e densidade do tecido radicular foram observadas após 7 dias do início do estresse. Para a razão R/PA, CTR/MSPA, comprimento específico de raiz, finura de raiz,  $A_R/A_F$  e área de superfície específica houve aumento com a aplicação do déficit

hídrico de 14 dias. O aumento da razão R/PA e a redução da finura de raiz foi observada, aos 21 dias, nas plantas sob déficit hídrico. Com a reidratação após 14 dias de estresse, a razão R/PA e  $A_R/A_F$  permaneceram com valores superiores aos do controle. O aumento do comprimento específico de raiz, da  $AR/AF$  e da área de superfície específica, assim como, a redução da densidade de tecido radicular foram observadas nas plantas de *C. abyssinica* reidratadas após 21 dias de estresse (Tabela 2).

Em *R. sativus*, a duração do déficit hídrico de 14 dias aumentou a razão R/PA, CTR/MSPA, finura de raiz e a densidade de tecido radicular, porém, a área de superfície específica diminuiu nas plantas estressadas. Aos 21 dias de déficit hídrico foi observado aumento do comprimento específico de raiz, finura de raiz,  $A_R/A_F$ , área de superfície específica e densidade de comprimento radicular, assim como, a redução da densidade de tecido radicular. A reidratação após o estresse de 7 dias promoveu incremento na razão de área foliar, CTR/MSPA, comprimento específico de raiz e área de superfície específica em comparação ao controle. O efeito do estresse sobre as demais características radiculares foi revertido após a reidratação (Tabela 2).

Tabela 2. Área foliar específica (AFE,  $m^2 kg^{-1}$ ), razão de área foliar (RAF,  $m^2 kg^{-1}$ ), razão raiz/parte aérea (R/PA), razão comprimento total de raiz/massa seca da parte aérea (CTR/MSPA,  $cm g^{-1}$ ), comprimento específico de raiz (CER,  $cm g^{-1}$ ), finura de raiz (FR,  $cm cm^{-3}$ ), densidade de tecido radicular (DTR,  $g cm^{-3}$ ), razão área radicular/área foliar ( $A_R/A_F$ ,  $m^2 m^{-2}$ ), área de superfície específica (ASE,  $cm^2 g^{-1}$ ) e densidade de comprimento de raiz (DCR,  $cm cm^{-3}$ ) em plantas de *Crambe abyssinica* e *Raphanus sativus* submetidas às condições de plena irrigação (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT).

<i>Crambe abyssinica</i>											
DAT	RH	AFE	RAF	R/PA	CTR/MSPA	CE	FR	DTR	$A_R/A_F$	ASE	DCR
7	CONT	31,3 A	12,7 B	0,28 A	35,7 C	133 C	256 A	2,05 A	0,04 B	27,0 C	0,15 B
	DH	29,8 A	13,4 B	0,18 C	52,8 A	307 A	232 B	0,79 B	0,07 A	65,5 A	0,16 B
	RT	33,9 A	15,2 A	0,26 A	39,9 B	151 C	259 A	1,76 A	0,05 B	31,7 C	0,16 B
14	CONT	30,6 A	10,9 B	0,23 B	27,2 C	122 C	165 C	1,38 B	0,06 B	32,7 C	0,23 A
	DH	31,0 A	12,3 B	0,26 A	51,5 A	196 B	215 B	1,13 B	0,08 A	46,4 B	0,30 A
	RT	29,7 A	9,53 C	0,25 A	29,0 C	116 C	134 C	1,16 B	0,07 A	34,8 C	0,23 A
21	CONT	35,1 A	6,93 C	0,19 C	20,2 C	108 C	256 A	2,42 A	0,05 B	24,1 C	0,27 A
	DH	31,3 A	8,13 C	0,21 B	24,0 C	114 C	222 B	2,02 A	0,06 B	27,8 C	0,26 A
	RT	35,2 A	7,70 C	0,15 C	27,2 C	189 B	214 B	1,15 B	0,07 A	44,3 B	0,27 A
<i>Raphanus sativus</i>											
7	CONT	37,5 A	14,2 B	0,29 B	86,0 B	292 B	203 B	0,71 C	0,10 B	62,4 B	0,21 C
	DH	35,1 A	13,9 B	0,30 B	88,3 B	290 B	195 B	0,69 C	0,12 B	67,9 B	0,18 C
	RT	40,3 A	19,1 A	0,33 B	129 A	401 A	153 C	0,39 C	0,13 B	103 A	0,26 C
14	CONT	24,0 B	11,1 C	0,34 B	101 B	308 B	130 C	0,43 C	0,20 A	87,1 A	0,65 A
	DH	25,9 B	11,1 C	0,57 A	135 A	255 B	235 A	1,08 B	0,17 A	52,7 B	0,59 A
	RT	24,9 B	11,9 C	0,28 B	88,2 B	314 B	105 D	0,34 C	0,19 A	100 A	0,61 A
21	CONT	24,7 B	5,98 D	0,22 B	25,3 C	125 C	145 C	1,28 A	0,10 B	37,8 C	0,34 B
	DH	18,3 B	4,91 D	0,27 B	57,7 C	227 B	210 B	0,97 B	0,20 A	50,4 B	0,61 A
	RT	28,6 B	6,25 D	0,24 B	30,7 C	131 C	184 B	1,50 A	0,10 B	33,2 C	0,32 B

\*Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos, nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ); RH: Reposições hídricas.

#### 4.3.13. Características micromorfométrica foliares

O déficit hídrico promoveu alterações nas características anatômicas foliares de *C. abyssinica* e *R. sativus* (Figura 10). Na fase inicial do déficit hídrico houve aumento na espessura do parênquima paliçádico, do mesofilo e da folha nas plantas de *C. abyssinica*. Porém, à medida que a duração do estresse foi prolongada, a espessura da epiderme adaxial, abaxial e espessura da folha diminuíram nas plantas sob déficit hídrico. Com a reidratação após 21 dias de estresse as espessuras da epiderme adaxial, abaxial e da folha mantiveram valores inferiores aos do controle (Figuras 10A, B e E).

Em *R. sativus*, o déficit hídrico prolongado promoveu aumento na espessura do parênquima paliçádico, parênquima esponjoso, mesofilo e espessura foliar. Com a reidratação, essas características permaneceram com valores superiores aos do controle, nas plantas de *R. sativus* após 21 dias de estresse (Figura 10).

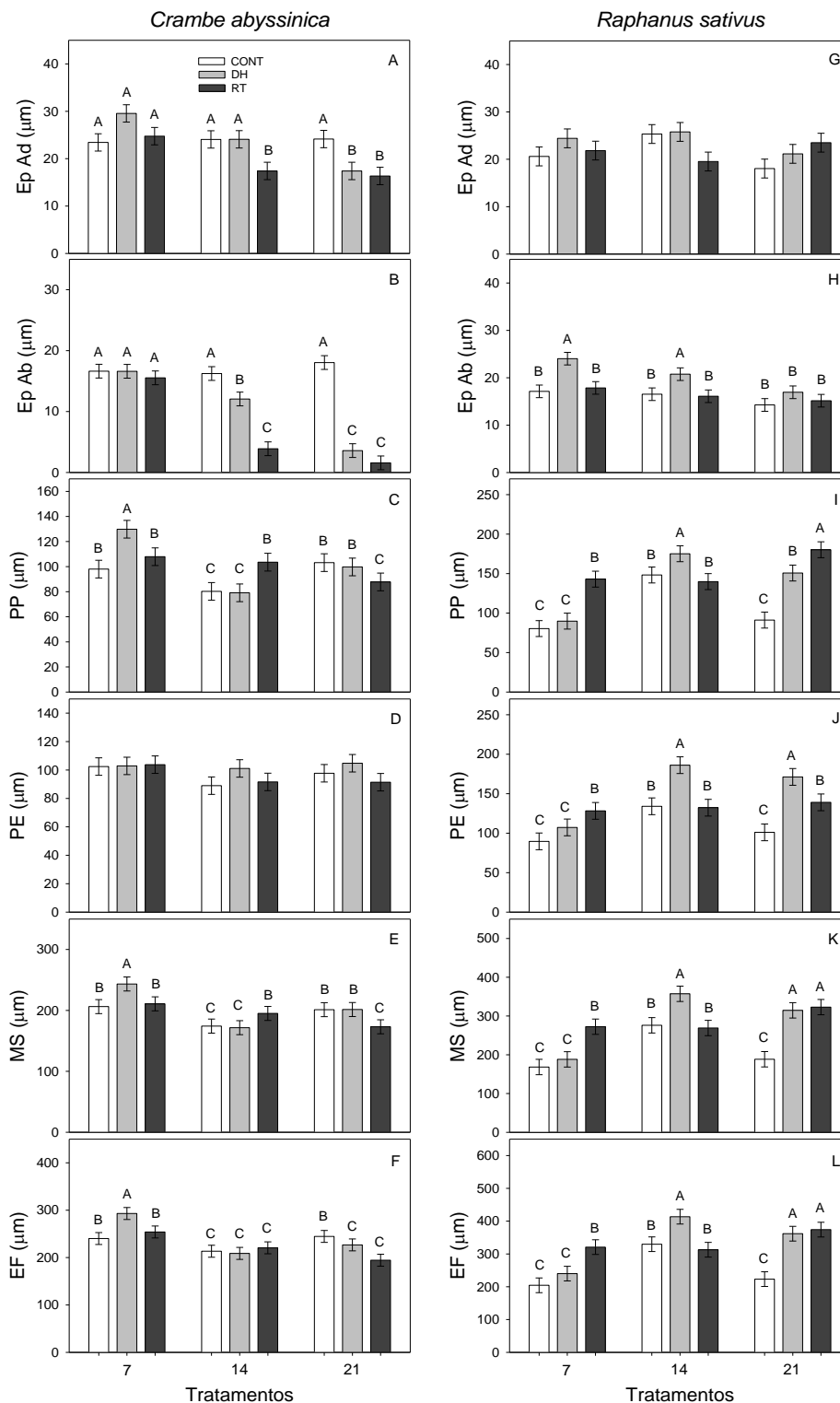


Figura 10. Espessura da epiderme adaxial (Ep Ad) [A; G], epiderme abaxial (Ep Ab) [B; H], parênquima paliçádico (PP) [C; I], parênquima esponjoso (PE) [D; J], mesófilo (MS) [E; K] e espessura foliar (EF) [F; L] em plantas de *C. abyssinica* e *Raphanus sativus* nas condições hídricas de controle (CONT), déficit hídrico (DH) e reidratação (RT) aos 7, 14 e 21 dias após imposição dos tratamentos (DAT). Barras representam as médias  $\pm$  EP ( $n = 5$ ). Médias seguidas de letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4 Discussão

As oleaginosas *C. abyssinica* e *R. sativus* demonstraram mecanismos diferenciais relacionados ao sistema radicular e à parte aérea, na tolerância ao déficit hídrico e, ou na capacidade de recuperação das plantas após a reidratação. Os resultados apontaram que *R. sativus* possui maior tolerância ao déficit hídrico, além de apresentar recuperação das características fisiológicas mais rápida, pela maior eficiência do sistema radicular.

A duração do déficit hídrico afetou as características morfofisiológicas de *C. abyssinica* e *R. sativus*, em diferentes níveis, e a recuperação foi determinada pela capacidade de ajuste, destas espécies, à situação de estresse. Durante o déficit hídrico de 7 DAT, a manutenção do *status* hídrico de *C. abyssinica* e *R. sativus* pode ser atribuída, principalmente, à formação de raízes mais finas e longas. As raízes finas compõem grande parte do sistema radicular, aumentando a área de superfície para extração de água (McCormack et al., 2015; Wasaya et al., 2018). Em *C. abyssinica*, além do aumento na área de superfície, foram observados maior comprimento específico e volume de raízes de muito finas, estas características estão associadas a maior eficiência na absorção de água, sendo relatadas como estratégias de tolerância à seca em plantas de grão-de-bico (Ramamoorthy et al., 2017) e genótipos de trigo (Awad et al., 2018). Além disso, o investimento de *C. abyssinica* em raízes mais finas e com maior comprimento radicular, associado com a manutenção do alto conteúdo de água nas folhas, sugere o ajuste entre comprimento e diâmetro radicular como mecanismo para aumentar a captação de água na fase inicial do estresse (Comas et al., 2013).

A maior  $A_R/A_F$ , em *C. abyssinica*, corrobora o aumento na aquisição de água, enquanto a maior espessura das folhas e menor área foliar, associada com a manutenção das taxas transpiratórias, evidenciam características de evitação da perda de água. Plantas capazes de manter o equilíbrio entre a captação de água pelo sistema radicular e a perda de água pela transpiração são mais tolerantes ao déficit hídrico (He et al., 2017; Tardieu et al., 2017). Além disso, a manutenção da AFE e da RAF, observadas em *C. abyssinica*, indicam que o desempenho da planta não foi prejudicado, mesmo sob déficit hídrico, resposta corroborada pela manutenção da fotossíntese (Wellstein et al., 2017). Ao mesmo tempo que, a maior CTR/MSPA, apontam as raízes como o principal dreno dos fotoassimilados produzidos durante o estresse, a redução da DTR, demonstra a rápida

expansão do sistema radicular, porém com baixo investimento em matéria seca (Birouste et al., 2014). A DTR controla o comprimento específico da raiz e a área de superfície específica, aumentando o desempenho na absorção de água sob déficit hídrico (Wasaya et al., 2018). Após a reidratação, *C. abyssinica* restabeleceu as funções fisiológica e morfológicas.

Em *R. sativus*, a fotossíntese e o crescimento não foram comprometidos pelo déficit hídrico de 7 DAT, possivelmente pela manutenção da hidratação dos tecidos foliares, como observado pelo maior CRA, característica de plantas tolerantes ao déficit hídrico (Zegaoui et al., 2017). Com a reidratação, o aumento no comprimento, área de superfície e volume de raízes finas demonstraram maior eficiência na absorção de água em *R. sativus*, anteriormente sob déficit hídrico 7 DAT (Bristiel et al., 2018).

Durante o déficit hídrico de 21 DAT, embora a hidratação dos tecidos foliares tenha se mantido, a fotossíntese foi limitada em *C. abyssinica*, como observado pela redução da taxa fotossintética. A manutenção do *status* hídrico, neste caso, está associado ao maior investimento em raízes, corroborados pela maior R/PA e CRF, características morfológicas radiculares que contribuem para a tolerância ao déficit hídrico através da eficiência na aquisição e uso da água (Koevoets et al., 2016). Além disso, é bem conhecido, que o fechamento estomático é importante estratégia para evitar a perda de água pelas plantas (Chaves et al., 2016; Yan et al., 2016). Assim como a redução da AF, também relatada como estratégia para minimizar a perda de água (He et al., 2017; Cruz et al., 2019). Por outro lado, *R. sativus*, apesar da redução no CRA das folhas, manteve a fotossíntese, sugerindo que o conteúdo de água nos tecidos foi o suficiente para sustentar o metabolismo fotossintético com a persistência do déficit hídrico (Ali e Anjum, 2016). A maior espessura do PP e PE, observados em *R. sativus*, permitiram maior fixação e armazenamento de CO<sub>2</sub>, conseqüentemente, melhor desempenho da fotossíntese em condição de estresse, sendo, portanto, as modificações na anatomia das folhas importantes indicadores do nível de tolerância ao déficit hídrico (Souza et al., 2018). Assim como, a AFE e a RAF, mantidas durante o déficit hídrico de 14 DAT e 21 DAT, que constituem características morfofisiológicas indicativas de genótipos tolerantes à seca, como observado em plantas de grão-de-bico (Ramamoorthy et al., 2016; Wellstein et al., 2017).

Os mecanismos utilizados por *R. sativus* para a manutenção do *status* hídrico, durante o déficit hídrico de 14 DAT e 21 DAT, envolveram também o aumento da



espessura EF e do MS e redução da AF e do diâmetro radicular. A manutenção da MSR, observada em *R. sativus* (sob déficit hídrico de 14 DAT e 21 DAT) e *C. abyssinica* (sob déficit hídrico de 21 DAT), indica a capacidade de tolerância destas plantas ao estresse, uma vez que a capacidade de desenvolver raízes e/ou mantê-las está associada a maior adaptação a condições de seca (Comas et al., 2013; Koevoets et al., 2016). Além disso, durante o déficit hídrico de 14 DAT, o aumento da DTR, concomitante a redução da ASE e manutenção da PR, observadas em *R. sativus*, demonstram a ocorrência de raízes mais espessas e com maior longevidade radicular, porém sem aumento do volume de solo explorado, o que pode estar associado com a conservação de água como estratégia para tolerar à seca (Luke McCormack et al., 2012). Em contrapartida, a redução da DTR e o aumento da ASE e DCR, aliado a manutenção da PR, observado durante o déficit hídrico de 21 DAT em *R. sativus*, evidenciam o desenvolvimento de raízes com baixo custo metabólico, porém com maior volume de solo explorado, apontando a aquisição de água como estratégia de prevenção da desidratação (White e Snow, 2012; Bristiel et al., 2018). As alterações radiculares de *R. sativus*, neste caso, demonstraram o uso de diferentes estratégias adaptativas em resposta à durabilidade do déficit hídrico.

Considerando as características fisiológicas, verificou-se decréscimos na taxa fotossintética de *C. abyssinica*, porém com ausência de fotoinibição, como demonstrado pela manutenção dos valores  $F_v/F_m$ ,  $\Delta F/F_m'$  e ETR (Martins et al., 2017). O uso de rotas alternativas para dissipação do excesso de elétrons, como observado pelo aumento da  $ETR/A$ , pode ter contribuído para a proteção da maquinaria fotossintética ao déficit hídrico (Yi et al., 2014), como estratégia para evitar a foto-oxidação e prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio e/ou os danos oxidativo (Sreeharsha et al., 2019). *R. sativus* manteve a taxa fotossintética e a razão  $F_v/F_m$ , além de aumentar o  $\Delta F/F_m'$  e o ETR sob déficit hídrico, evidenciando a alta estabilidade do fotossistema II desta espécie (Kalaji et al., 2016; Yi et al., 2016). A manutenção (*C. abyssinica*) e o aumento (*R. sativus*) dos pigmentos fotossintéticos, acompanhados da manutenção da TLE e MDA, evidencia a ausência de danos nas membranas celulares, indicando a presença de um eficiente mecanismo de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo, atribuído ao aumento na atividade das enzimas antioxidantes, CAT e POX, em ambas as espécies (Mafakheri et al., 2011; Guo et al., 2018).

A similaridade entre os mecanismos adaptativos empregados por *C. abyssinica* e *R. sativus* para controlar o uso da água e, conseqüentemente, manter a atividade

fisiológica sob déficit hídrico, indicam que as características das raízes foram as mais determinantes para diferenciar o nível de tolerância das espécies, dentre elas, principalmente, o diâmetro radicular (Koevoets et al., 2016; Awad et al., 2018). Raízes mais finas normalmente estão associadas ao maior volume de solo explorado pela maior superfície das raízes (Carminati et al., 2017; Ahmed et al., 2018). Além disso, as raízes mais finas possuem maior permeabilidade e atividade metabólica, permitindo o aumento da eficiência na aquisição e utilização da água (McCormack et al., 2015; Wasaya et al., 2018). O que favorece a melhor adaptação das plantas às condições de seca (Pierret et al., 2007; Bristiel et al., 2019), como foi observado em *R. sativus*.

*C. abyssinica*, após restabelecidas as condições hídricas, não foi capaz de recuperar a fotossíntese, apesar do emprego de estratégias radiculares para aumentar a aquisição de água, resposta similar foi observada em plantas de feijão expostas a três durações de déficit hídrico e posterior reidratação (Widuri et al., 2018). *R. sativus*, porém, além de tolerar o déficit hídrico de 14 DAT e 21 DAT, também demonstrou maior taxa de recuperação das plantas após o estresse. O crescimento foi parcialmente recuperado nas duas espécies estudadas.

A capacidade de ajuste da arquitetura do sistema radicular é determinada por características intrínsecas de cada espécie, porém define o desempenho das plantas em condições de estresse (Adu et al., 2019). Neste estudo, o comportamento distinto do diâmetro radicular, com formação de raízes finas em *C. abyssinica* e raízes muito finas em *R. sativus*, constituiu o ponto-chave para a diferenciação no desempenho fisiológico entre as duas espécies (McCormack et al., 2015; Ramamoorthy et al., 2016).

#### 4.5 Conclusões

As espécies *C. abyssinica* e *R. sativus* responderam de forma diferente a duração do déficit hídrico e a taxa de recuperação das plantas foi influenciada pela duração do estresse, principalmente com 14 e 21 dias, nas condições deste estudo. Os principais mecanismos envolvidos nas respostas de tolerância ao déficit hídrico das duas espécies foram o nível de conteúdo relativo de água, a atividade de enzimas antioxidantes, o menor diâmetro radicular e comprimento total de raízes muito finas. O nível de tolerância à seca entre as espécies foi determinado pela maior proporção de raízes muito finas, conferindo

a *R. sativus* maior tolerância ao déficit hídrico e recuperação mais rápida das funções fisiológicas após a reidratação em relação a *C. abyssinica*.

#### 4.6 Referências

- Abid M, Ali S, Qi LK, et al (2018) Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sci Rep* 8:1–15. doi: 10.1038/s41598-018-21441-7
- Adu MO, Asare PA, Yawson DO, et al (2019) Identifying key contributing root system traits to genetic diversity in field-grown cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes. *F Crop Res* 232:106–118. doi: 10.1016/j.fcr.2018.12.015
- Ahmed MA, Passioura J, Carminati A (2018) Hydraulic processes in roots and the rhizosphere pertinent to increasing yield of water-limited grain crops: A critical review. *J Exp Bot* 69:3255–3265. doi: 10.1093/jxb/ery183
- Ali N, Mm A (2016) Drought Stress : Major Cause of Low Yield and Productivity. 1:2384
- Anderson M D, Prasad TK, Stewart C R (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* 109:1247-1257.
- Awad W, Byrne PF, Reid SD, et al (2018) Great Plains winter wheat varies for root length and diameter under drought stress. *Agron J* 110:226–235. doi: 10.2134/agronj2017.07.0377
- Barrs HD, Weatherley PE, (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 15:413-428.
- Bassegio D, Zanotto MD, Santos RF, et al (2016) Oilseed crop crambe as a source of renewable energy in Brazil. *Renew Sustain Energy Rev* 66:311–321. doi: 10.1016/j.rser.2016.08.010
- Basu S, Ramegowda V, Kumar A, Pereira A (2016) Plant adaptation to drought stress [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research* 5:1–10. doi: 10.12688/F1000RESEARCH.7678.1
- Beauchamp C, Fridovich I, (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44:276-287.
- Birouste M, Zamora-Ledezma E, Bossard C, et al (2014) Measurement of fine root tissue density: A comparison of three methods reveals the potential of root dry matter content. *Plant Soil* 374:299–313. doi: 10.1007/s11104-013-1874-y
- Blum A (2017) Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant Cell Environ* 40:4–10. doi: 10.1111/pce.12800
- Böhm W (1979) *Methods of studying root systems*. New York: Springer-Verlag 188p.
- Boiago NP, Fortes AMT, Coelho SRM, et al (2018) Morphophysiological and nutritional characteristics of *Crambe abyssinica* Hochst under hydric restriction in different phenological stages. *Acta Physiol Plant* 40:0. doi: 10.1007/s11738-018-2678-8
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bristiel P, Roumet C, Violle C, Volaire F (2019) Coping with drought: root trait variability within the perennial grass *Dactylis glomerata* captures a trade-off between dehydration avoidance and dehydration tolerance. *Plant Soil* 434:327–342. doi: 10.1007/s11104-018-3854-8

- Campos H, Trejo C, Peña-Valdivia C, et al (2014) Stomatal and non-stomatal limitations of bell pepper (*Capsicum annum* L.) plants under water stress and re-watering: Delayed restoration of photosynthesis during recovery. *Environ Exp Bot* 98:56-64. doi:10.1016/j.envexpbot.2013.10.015
- Carminati A, Passioura JB, Zarebanadkouki M, et al (2017) Root hairs enable high transpiration rates in drying soils. *New Phytol* 771-781. doi: 10.1111/nph.14715
- Chaves MM, Costa JM, Zarrouk O, et al (2016) Controlling stomatal aperture in semi-arid regions—The dilemma of saving water or being cool? *Plant Sci* 251:54-64. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.06.015
- Chen D, Wang S, Cao B, et al (2016) Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. *Front Plant Sci* 6:1-15. doi: 10.3389/fpls.2015.01241
- Comas LH, Becker SR, Cruz VM V., et al (2013) Root traits contributing to plant productivity under drought. *Front Plant Sci* 4:1-16. doi: 10.3389/fpls.2013.00442
- Cremonese PA, Feiden A, Cremonese FE, et al (2013) Nabo Forrageiro: Do Cultivo a Produção De Biodiesel. *Acta Iguazu* 2:64-72
- Cruz Y da C, Scarpa ALM, Pereira MP, et al (2019) Growth of *Typha domingensis* as related to leaf physiological and anatomical modifications under drought conditions. *Acta Physiol Plant* 41:1-9. doi: 10.1007/s11738-019-2858-1
- Del Longo OT, González CA, Pastori, GM, et al (1993) Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol* 3:1023-1028.
- Dias PP, Secco D, Santos RF, et al (2015) Soil compaction and drought stress on shoot and root growth in crambe (*Crambe abyssinica*). *Aust J Crop Sci* 9:378-383
- Donadon JR, Bessa JFV, Resende O, et al (2015) Storage of crambe seeds in different containers and environments: Part II—Chemical quality. *Rev Bras Eng Agric* 19:231-237.
- Falasca SL, Flores N, Lamas MC, et al (2010) *Crambe abyssinica*: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. *Int J Hydrogen Energy* 35:5808-5812. doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.02.095
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59:309-314.
- Guo YY, Tian SS, Liu SS, et al (2018) Energy dissipation and antioxidant enzyme system protect photosystem II of sweet sorghum under drought stress. *Photosynthetica* 56:861-872. doi: 10.1007/s11099-017-0741-0
- Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol*, 84:450-455.
- He J, Du YL, Wang T, et al (2017) Conserved water use improves the yield performance of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under drought. *Agric Water Manag* 179:236-245. doi: 10.1016/j.agwat.2016.07.008
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189-198.
- Kalaji HM, Jajoo A, Oukarroum A, et al (2016) Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiol Plant* 38:. doi: 10.1007/s11738-016-2113-y
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* 57:315-319.
- Karnovsky MJA (1965) Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137-138.

- Koevoets IT, Venema JH, Elzenga JTM, Testerink C (2016) Roots withstanding their environment: Exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. *Front Plant Sci* 7:1–19. doi: 10.3389/fpls.2016.01335
- Luke McCormack M, Adams TS, Smithwick EAH, Eissenstat DM (2012) Predicting fine root lifespan from plant functional traits in temperate trees. *New Phytol* 195:823–831. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04198.x
- Lynch JP (2015) Root phenes that reduce the metabolic costs of soil exploration: Opportunities for 21st century agriculture. *Plant, Cell Environ* 38:1775–1784. doi: 10.1111/pce.12451
- Mafakheri A, Siosemardeh A, Bahramnejad B, et al (2011) Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *Aust J Crop Sci* 5:1255–1260
- Martins RFA, Souza AFC, Pitol C, Falqueto AR (2017) Physiological responses to intense water deficit in two genotypes of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst.). *Aust J Crop Sci* 11:821–827. doi: 10.21475/ajcs.17.11.07.pne469
- McCormack ML, Dickie IA, Eissenstat DM, et al (2015) Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *New Phytol* 207:505–518. doi: 10.1111/nph.13363
- Moura LM.F, Costa AC, Müller C, et al (2018) Drought tolerance in potential oilseed plants for biofuel production. *Aust J of Crop Sci* 12:289-298.
- Oliveira IP, Souza AF, Lescano CH, et al (2015a) Thermal oxidation analysis of forag turnip (*Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg.) oil. *J Am Oil Chem Soc* 92:403-408.
- Oliveira RC, Reis ACCS, Agriar CG, et al (2015b). *Agroindustrialização do Crambe*. 2nd ed. Assoeste, Paraná, Brazil.
- Osmolovskaya N, Shumilina J, Kim A, et al (2018) Methodology of drought stress research: Experimental setup and physiological characterization. *Int J Mol Sci* 19:. doi: 10.3390/ijms19124089
- Pask AJD, Pietragalla J, Mullan DM, et al (2012) Physiological Breeding II: A Field Guide to Wheat Phenotyping, in: Pierre CS, Arce VT (Eds.), *Osmotic adjustment*. D.F.: CIMMYT, México, 21-24.
- Pierret A, Doussan C, Capowiez Y, et al (2007) Root functional architecture: A framework for modeling the interplay between roots and soil. *Vadose Zo J* 6:269–281. doi: 10.2136/vzj2006.0067
- Qi W, Tinnenbroek-Capel IEM, Salentijn EMJ, et al (2018) Genetically engineering *Crambe abyssinica*—A potentially high-value oil crop for salt land improvement. *L Degrad Dev* 29:1096–1106. doi: 10.1002/ldr.2847
- Ramamoorthy P, Lakshmanan K, Upadhyaya HD, et al (2017) Root traits confer grain yield advantages under terminal drought in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *F Crop Res* 201:146–161. doi: 10.1016/j.fcr.2016.11.004
- Ramamoorthy P, Lakshmanan K, Upadhyaya HD, et al (2016) Shoot traits and their relevance in terminal drought tolerance of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *F Crop Res* 197:10–27. doi: 10.1016/j.fcr.2016.07.016
- Ribeiro RV, Machado EC, Santos MG, et al (2009) Seasonal and diurnal changes in photosynthetic limitation of young sweet orange trees. *Environ Exp Bot* 66:203-211.
- Rivas R, Falcão HM, Ribeiro R V., et al (2016) Drought tolerance in cowpea species is driven by less sensitivity of leaf gas exchange to water deficit and rapid recovery of photosynthesis after rehydration. *South African J Bot* 103:101–107. doi: 10.1016/j.sajb.2015.08.008

- Ronen R, Galun M (1984) Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environ Exp Bot* 24:239-245.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, et al (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148:339-346.
- Silva FB, Costa AC, Alves RRP, et al (2014) Chlorophyll fluorescence as an indicator of cellular damage e by glyphosate herbicide in *Raphanus sativus* L. plants. *Am J Plant Sci* 5:2509-2519.
- Silva L, Marchiori PER, Maciel CP, et al (2010) Fotossíntese, relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. *Pesq Agropec Bras* 45:965-972.
- Silveira EG, Barcelos LFT, Perez VH, et al (2019) Biodiesel production from non-edible forage turnip oil by extruded catalyst. *Ind Crops Prod* 139:111503. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111503
- Souza PU, Lima LKS, Soares TL, et al (2018) Biometric, physiological and anatomical responses of *Passiflora* spp. to controlled water deficit. *Sci Hortic (Amsterdam)* 229:77–90. doi: 10.1016/j.scienta.2017.10.019
- Sreeharsha RV, Mudalkar S, Sengupta D, et al (2019) Mitigation of drought-induced oxidative damage by enhanced carbon assimilation and an efficient antioxidative metabolism under high CO<sub>2</sub> environment in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynth Res* 139:425-439.
- Stagnari F, Galieni A, D'Egidio S, et al (2018) Responses of radish (*Raphanus sativus*) to drought stress. *Ann Appl Biol* 172:170–186. doi: 10.1111/aab.12409
- Tardieu F, Draye X, Javaux M (2017) Root water uptake and ideotypes of the root system: Whole-plant controls matter. *Vadose Zo J* 16:1–10. doi: 10.2136/vzj2017.05.0107
- Vadez V (2014) Root hydraulics: The forgotten side of roots in drought adaptation. *F Crop Res* 165:15–24. doi: 10.1016/j.fcr.2014.03.017
- Vasconcelos MS, Passos WE, Lescanos CH, et al (2018) Fluorescence spectroscopy applied to monitoring biodiesel degradation: correlation whith acid value and UV absorption analyses. *J Anal Methods Chem* 11.
- Wasaya A, Zhang X, Fang Q, Yan Z (2018) Root phenotyping for drought tolerance: A review. *Agronomy* 8:1–19. doi: 10.3390/agronomy8110241
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144:307-313.
- Wellstein C, Poschlod P, Gohlke A, et al (2017) Effects of extreme drought on specific leaf area of grassland species: A meta-analysis of experimental studies in temperate and sub-Mediterranean systems. *Glob Chang Biol* 23:2473–2481. doi: 10.1111/gcb.13662
- White TA, Snow VO (2012) A modelling analysis to identify plant traits for enhanced water-use efficiency of pasture. *Crop Pasture Sci* 63:63–76. doi: 10.1071/CP11250
- Widuri LI, Lakitan B, Sodikin E, et al (2018) Shoot and root growth in Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) exposed to gradual drought stress. *J Agric Sci* 40:442-452. doi: 10.17503/agrivita.v40i0.1716.
- Yan W, Zhong Y, Shanguan Z (2016) A meta-analysis of leaf gas exchange and water status responses to drought. *Sci Rep* 6:1–9. doi: 10.1038/srep20917
- Yi XP, Zhang YL, Yao HS, et al (2016) Rapid recovery of photosynthetic rate following soil water deficit and re-watering in cotton plants (*Gossypium herbaceum* L.) is related to the stability of the photosystems. *J Plant Physiol* 194:23–34. doi: 10.1016/j.jplph.2016.01.016
- Zanetti F, Scordia D, Vamerali T, et al (2016) *Crambe abyssinica* a non-food crop with

- potential for the Mediterranean climate: Insights on productive performances and root growth. *Ind Crops Prod* 90:152–160. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.06.023
- Zegaoui Z, Planchais S, Cabassa C, et al (2017) Variation in relative water content, proline accumulation and stress gene expression in two cowpea landraces under drought. *J Plant Physiol* 218:26–34. doi: 10.1016/j.jplph.2017.07.009
- Zhu LH (2016) *Crambe* (*Crambe abyssinica*). AOCS Press.

## 5. Conclusão Geral

Diante de um cenário de mudanças climáticas globais, com previsão da ocorrência de déficit hídrico frequente, prolongado e severo, aumentando o risco para a agricultura, torna-se essencial a busca por espécies tolerantes à seca. Neste estudo, os resultados obtidos demonstraram que as espécies *C. abyssinica* e *R. sativus* usam estratégias morfológicas, externas e internas, fisiológicas e bioquímicas para sobreviver em condições de déficit hídrico. A espécie *R. sativus*, mesmo sendo afetada pela limitação hídrica durante todas as fases fenológicas, especialmente a de pleno florescimento e enchimento de grãos, ainda assim, manteve adequada produção de grãos e qualidade do óleo bruto, evidenciando tolerância ao déficit hídrico. Além disso, a integração das respostas raiz-parte aérea foram determinantes para maior tolerância ao estresse de *C. abyssinica* e *R. sativus*, nas condições deste estudo. As alterações na morfologia das raízes foi o principal aspecto para a diferenciação do nível de tolerância entre as espécies estudadas e para a recuperação das funções fisiológicas após os períodos de déficit hídrico.