

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**CARACTERÍSTICAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE TREVO BRANCO
(*Trifolium repens* L.), ASSOCIADAS À TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO**

FERNANDO HORACIO SANTIÑAQUE GIMENEZ
Engenheiro Agrônomo (Universidad de la República – Uruguay)

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Zootecnia
Área de Concentração Plantas Forrageiras

Porto Alegre (RS), Brasil
Agosto de 2004

AGRADECIMENTOS

Ao professor Carlos Nabinger pela sua orientação e apoio, estímulo amistoso, otimista e compreensão permanente.

Ao professor Luis Mauro pela grande ajuda, apoio e disposição recebida em todo momento.

Ao professor Ibanor Anghinoni pela grande disposição, ajuda e estímulo.

A Elena por compartilhar uma parte de nosso caminho juntos.

A meus pais, por todo o apoio durante minha vida.

A meus filhos Federico Fernando, Florencia, Verónica, Matías, María, Carolina e Federico Nicolás.

A Faculdade de Agronomia do Uruguai pela oportunidade para poder realizar os estudos de pós-graduação.

A Faculdade de Agronomia da UFRGS, pela oportunidade de realizar a pós-graduação e melhorar minha formação acadêmica.

A CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus companheiros da Unidade de Pastagens da EEMAC pelo apoio recebido.

A todos os professores do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia.

Ao pessoal de secretaria do Departamento especialmente Rogério.

A meus colegas de aula por haver compartilhado o privilégio de voltar a ser estudante novamente e junto com eles.

A todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE TREVO BRANCO (*Trifolium repens* L.), ASSOCIADAS À TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO¹

Autor: Fernando Santiñaque Gimenez

Orientador: Prof. Carlos Nabinger

Co-orientador: Prof. Luis Mauro Gonçalves Rosa

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar características morfológicas ou fisiológicas de trevo branco que, associadas à tolerância ao déficit hídrico, possam ser utilizadas em programas de melhoramento que visem a maior persistência da espécie. O estudo foi realizado em vasos, em casa-de-vegetação, utilizando-se duas condições hídricas do solo (80% e 60% da capacidade de campo) e três genótipos de trevo branco, dispostos num arranjo fatorial 3 x 2 com 4 repetições, num delineamento completamente casualizado. Os genótipos utilizados foram: Zapicán, cultivar com folhas intermédias, Regal, cultivar de tipo ladino e Seleção 2 (Sel. 2), progênie de plantas selecionados em condição de seca. O tamanho da folha não se revelou uma característica discriminante dos genótipos ($P > 0,05$) reduzindo-se, com o déficit hídrico ($P < 0,05$), mas igualmente entre eles. O peso específico da folha aumentou com o déficit hídrico, mas de forma mais acentuada para Sel. 2, selecionada por tolerância à seca, mostrando ser esta uma característica passível de ser usada na seleção de tipos tolerantes. Esta característica esteve associada à manutenção de maior ($P < 0,05$) taxa fotossintética neste material, tanto em condição de déficit como sem déficit hídrico, sendo que nesta última condição, a transpiração não apresentou diferenças entre os materiais estudados, indicando uma maior capacidade de acúmulo de carbono das plantas de Sel. 2 sob estresse. Sugere-se que o peso específico da folha seja uma característica, que aliada a um balanço positivo entre transpiração e fotossíntese, possa ser utilizada em etapas precoces de seleção de materiais tolerantes ao déficit hídrico.

¹ Dissertação de mestrado em Zootecnia – Plantas Forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (104p.) Junho, 2004.

MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF DIFFERENT WHITE CLOVER (*Trifolium repens* L.) GENOTYPES, ASSOCIATED WITH WATER DEFICIT TOLERANCE¹

Author: Fernando Santiñaque
Adviser: Prof. Carlos Nabinger
Co-adviser: Prof. Luis Mauro Gonçalves Rosa.

ABSTRACT

The aim of this trial was to detect morphological and physiological characteristics of white clover, to be utilized in preliminary selection of genotypes, in breeding programs for drought tolerance and persistence. This trial was conducted in pots at a glass-house, utilizing two soil water conditions (80% and 60% of field capacity) and three different genotypes of white clover, arranged as a 3 x 2 factorial design, with four replicates completely randomized. The genotypes tested were: Zapican (intermediate leaf type), Regal (ladino type) and Sel. 2 (intermediate type, progeny of plants surviving to drought periods in Uruguay). The leaf type was not a good discriminator for genotype drought tolerance because the studied materials were not different ($P > 0,05$) and reduced ($P < 0,05$) individual leaf area in a same way with water deficit. Specific leaf weight was greater ($P < 0,05$) in water deficit conditions but the response was significantly ($P < 0,05$) more important for Sel. 2, a type selected as drought tolerant. This characteristic was associated with better photosynthetic rate of this material, mainly in water deficit conditions. As the studied genotypes didn't modify their transpiration rate in this condition, there is an indication that Sel. 2 can continue to accumulate carbon in drought conditions that can be an important strategy to drought tolerance. These results suggest that specific leaf weight can be a characteristic that, in addition to a positive balance between transpiration and photosynthesis, can be utilized in preliminary trials to select white clover genotypes with better tolerance to water deficit

¹ Master of Science dissertation in Animal Production – Forage Plants, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (104 p.) June, 2004.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Origem e tipos de trevo branco.....	4
2.2. Adaptação a condições de déficit hídrico.....	5
2.3. Crescimento e produção.	11
2.4. Persistência vegetativa e ressemeadura natural.....	15
2.5. Características gerais da resposta à deficiência hídrica.....	18
2.5.1 Respostas morfológicas e anatômicas.....	18
2.5.1.1. Tamanho, número e características anatômicas das folhas.....	18
2.5.1.2. Senescência e morte de folhas.....	22
2.5.1.3. Densidade e características anatômicas dos estolões	23
2.5.1.4. Floração e produção de sementes.....	24
2.5.1.5. Raízes e estresse hídrico.....	25
2.5.2. Respostas fisiológicas ao déficit hídrico.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.	31
3.1. Local.....	31
3.2. Características do solo e acondicionamento	31
3.3. Tratamentos e delineamento experimental.....	32
3.3.1. Tratamentos.....	32
3.3.2. Delineamento experimental.....	33
3.4. Condução do experimento e determinações das variáveis de resposta.....	33
3.4.1. Variáveis de resposta.....	35
3.5. Índice de estresse.....	37
3.5. Análises estatísticas.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39

4.1. Evolução do conteúdo de água no solo.....	39
4.2. Resposta das plantas ao conteúdo de água no solo.....	41
4.2.1. Matéria seca produzida durante todo o período experimental.....	41
4.2.1.1. Biomassa total e biomassa total viva.....	41
4.2.1.2. Biomassa aérea viva: rendimento de forragem total.....	42
4.2.2. Primeiro período de crescimento.....	47
4.2.2.1. Rendimento de matéria seca total e verde.....	47
4.2.2.2. Peso seco de folhas verdes, senescentes, mortas e inflorescências.....	48
4.2.2.3. Número de folhas.....	54
4.2.3. Segundo período de crescimento (rebrotas).....	56
4.2.3.1. Biomassa aérea e biomassa total.....	56
4.2.3.2. Relação raízes/parte aérea.....	57
4.2.3.3. Produção de estolões e raízes.....	61
4.2.3.4. Peso de inflorescências.....	64
4.2.3.5. Material morto.....	65
4.2.3.6. Produção de folhas expandidas e em expansão.....	67
4.2.3.7. Área foliar verde.....	69
4.2.3.8. Peso específico de folhas verdes.....	72
4.2.3.9. Tamanho de folíolos.....	75
4.2.3.10. Números de folhas verdes.....	76
4.2.3.11. Relação folhas/estolões.....	77
4.2.3.12. Respostas fisiológicas: fotossíntese, transpiração e condutância estomática.....	79
4.2.3.12.1. Fotossíntese por unidade de área foliar.....	79
4.2.3.12.2. Transpiração e condutância estomática por unidade de área foliar.....	81
4.2.3.12.3. Eficiência de uso da água.....	82
4.2.3.12.4. Fotossíntese, transpiração e eficiência de uso da água por vaso.....	83
5. CONCLUSÕES.....	89
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
8. APÊNDICES.....	97

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Efeito do déficit hídrico sobre a biomassa total, biomassa total viva e biomassa aérea viva, produzidas durante todo o experimento (31/10/02 a 09/04/03) e índice de estresse em trevo branco. Médias de três genótipos e soma de dois cortes.....	42
2. Biomassa aérea, biomassa aérea viva e índice de estresse em trevo branco com e sem déficit hídrico, ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Médias de três genótipos.....	47
3. Peso seco de folhas verdes, folhas em senescência e folhas mortas, e índice de estresse em trevo branco com e sem déficit hídrico, ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Médias de três genótipos.....	48
4. Número de folhas verdes, número total de folhas e índice de estresse em trevo branco com e sem déficit hídrico, ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Médias de três genótipos.....	54
5. Efeito da condição hídrica do solo sobre a biomassa aérea (folhas, em expansão, estolões, inflorescências e material morto), biomassa total (biomassa aérea e raízes), biomassa total viva e índice de estresse (IE) no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.....	56
6. Efeito da condição hídrica do solo sobre a relação raízes/parte aérea viva e índice de estresse, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.....	58
7. Efeito da condição hídrica do solo sobre a relação entre peso seco de raízes por vaso e o peso seco de parte aérea viva por vaso e índice de estresse, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.....	62
8. Efeito da condição hídrica do solo sobre a produção de estolões e de raízes, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.....	65

9. Efeito da condição hídrica do solo sobre massa seca de material morto, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.....	66
10. Efeito da condição hídrica do solo sobre peso seco de folhas vivas, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.....	67
11. Efeito da condição hídrica do solo sobre a área foliar por vaso, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.....	70
12. Efeito da condição hídrica do solo sobre tamanho médio dos folíolos, no rebrote (24/01/03 al 09/04/03). Médias de três genótipos.....	75
13. Efeito da condição hídrica do solo sobre o número de folhas verdes por vaso, no rebrote (24/01/03 al 09/04/03). Médias de três genótipos.	77
14. Efeito da disponibilidade de água no solo sobre a relação peso seco de folhas/peso seco de estolões por vaso de trevo branco, e índice de estresse no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.....	78
15. Efeito da disponibilidade de água no solo sobre a transpiração e a condutância estomática de trevo branco e índice de estresse, no final do rebrote (09/04/03). Médias de três genótipos.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
CC	Capacidade de campo
C/D	Com déficit hídrico
cv	Cultivar
EUA	Eficiência de uso da água
IE	Índice de estresse hídrico
LE	Linhagem experimental
MPa	Mega Pascal
MS	Matéria seca
°C	Graus centígrados
R/PA	Relação raiz-parte aérea
S/D	Sem déficit hídrico
Sel.2	Seleção dois
W	Watt
μmol	Micro mol

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Evolução do conteúdo de água gravimétrica do solo durante o período experimental (31/10/02 a 09/04/03) (S/D sem déficit e C/D com déficit)... 40
2. Biomassa aérea viva total por vaso, de três genótipos de trevo branco com (C/D) e sem (S/D) déficit hídrico, ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Histogramas com letras distintas dentro da mesma condição hídrica indicam diferenças significativas ($p < 0.01$)..... 46
3. Peso seco de inflorescências de três genótipos de trevo branco com (C/D) e sem (S/D) déficit hídrico, ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Histogramas com letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0.01$)..... 52
4. Número de folhas verdes por vaso, de três genótipos de trevo branco ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Médias de duas condições hídricas. Histogramas com letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0.05$)..... 55
5. Número total de folhas de três genótipos de trevo branco com (C/D) e sem (C/D) déficit hídrico, ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Médias de duas condições hídricas. Histogramas com letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)..... 55
6. Peso seco de folhas em expansão de três genótipos de trevo branco com (C/D) e sem (S/D) déficit hídrico, ao final do rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Histogramas com letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0.01$)..... 68
7. Área foliar por vaso de três genótipos trevo branco no segundo corte (24/01/03 a 09/04/03). Médias de duas condições hídricas. Histogramas com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0,10$)..... 70
8. Peso específico de folhas verdes de trevo branco no segundo corte (24/01/03 a 09/04/03), com déficit (C/D) e sem déficit (S/D) hídrico.

Médias de três genótipos. Histogramas com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0.10$).....	74
9. Número de folhas verdes por vaso de três genótipos de trevo branco no segundo corte (24/01/03 a 09/04/03). Médias de duas condições hídricas. Histogramas com letras distintas diferem entre si ($p < 0,10$).....	77
10. Relação peso seco de folhas/peso seco de estolões por vaso de três genótipos trevo branco, no segundo corte (24/01/03 a 09/04/03). Médias de duas condições hídricas. Histogramas com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0,05$).....	78
11. Fotossíntese líquida por unidade de área de folha de trevo branco, em dois níveis de água, (S/D sem déficit e C/D com déficit). Período 24/01/03 al 09/04/03, medição do 09/04/03. Histogramas com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0.10$).....	80
12. Fotossíntese líquida por vaso de três genótipos trevo branco, em duas condições hídricas do solo, (S/D sem déficit e C/D com déficit), ao final do rebrote (09/04/03). Histogramas com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0,01$).....	84
13. Transpiração por vaso de três genótipos de trevo branco, sob duas condições hídricas (S/D sem déficit e C/D com déficit), ao final do rebrote (09/04/03). Histogramas encimados por letras distintas são diferentes entre si ($p < 0.05$).....	85

1. INTRODUÇÃO

O trevo branco (*Trifolium repens* L.) é uma leguminosa forrageira perene cujo ciclo de crescimento ocorre principalmente no período outono-primavera, diminuindo marcadamente sua produção durante o verão. Esta queda no crescimento é devido à deficiência de água no solo e sua interação com alta temperatura. Estas condições do ambiente de verão determinam a morte de estolões e compromete, a persistência desta espécie na pastagem. Esta baixa tolerância à associação de deficiência hídrica com altas temperaturas constitui a principal causa para que o trevo branco se comporte como espécie perene de vida curta (dois a três anos), na região sul do Rio Grande do Sul e Uruguai.

Existe carência de informações sobre o comportamento fisiológico e morfológico de diferentes cultivares ou ecótipos desta espécie sob condições de seca, e de sua relação com a persistência. Isto impede o desenvolvimento de critérios precisos para serem aplicados no melhoramento genético assim como na implementação de técnicas de manejo no sentido amplo (intensidade de desfolha, fertilização, irrigação, etc.), que tenham por objetivo o aumento da produtividade e persistência das pastagens em que esta espécie seja um dos constituintes.

O conhecimento dos mecanismos de escape (ciclo curto e produção

de sementes), e/ou de tolerância (capacidade de sobrevivência a baixos potenciais de água no solo), adotados por uma espécie em particular, torna-se importante, principalmente em plantas de crescimento indeterminado, como o trevo branco, porque permite explicar sua capacidade de sobrevivência ou mesmo de recuperação ao déficit hídrico. Do ponto de vista da produtividade, esta adaptação pode ter suas limitações, por exemplo, quando estes mecanismos estão mais associados à sobrevivência do que à produção de forragem, direcionando aqueles recursos mais escassos para órgãos que garantam sua preservação. As plantas na natureza estão, em geral, mais adaptadas a sobreviver, contrastando com objetivos agronômicos de maior produtividade. Além disso, a produção pode ser afetada pela velocidade e pelo grau de recuperação ao estresse e pela interação competitiva com as gramíneas associadas, que apresentem mecanismos contrastantes de escape ou de tolerância.

Indicadores morfológicos tais como a taxa de alongação foliar por estolão (taxa de aparecimento + taxa de expansão foliar), taxa de extensão do entre nó, comprimento final do mesmo, diâmetro e tamanho final da folha, associados a parâmetros fisiológicos como transpiração, condutância estomática e fotossíntese líquida por unidade de área de folha, podem constituir ferramentas úteis para auxiliar na busca de materiais capazes de manter o crescimento foliar sob estresse hídrico ou sobreviver e recuperar-se ao mesmo. Poucas informações sobre esse assunto são conhecidas para trevo branco, tanto em disponibilidade hídrica para desenvolvimento potencial, como em condições de limitação hídrica.

O presente trabalho objetivou identificar as possíveis diferenças em algumas características morfológicas e mecanismos fisiológicos de materiais genéticos trevo branco que resultam na maior tolerância ao estresse hídrico da espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Origem e tipos de trevo branco

O centro de origem do trevo branco (*Trifolium repens* L.), provavelmente seja a região mediterrânea, e sua área indígena inclui o resto da Europa, Ásia Central e parte do norte de África. Embora seja uma espécie de clima temperado, o trevo branco está amplamente adaptado a regiões que vão desde o Ártico até os sub-trópicos, desde que a umidade do solo seja adequada para o crescimento. Além disso, é encontrado numa ampla gama de altitudes, podendo ser encontrado a mais de 6000m no Himalaia Range da Índia. Tem sido introduzida em outras áreas do mundo como, por exemplo, na Nova Zelândia, costa sudeste da Austrália, a maior parte dos EUA, parte de Canadá e Alasca. Na América do Sul e Central sua utilização se restringe às regiões temperadas (em altas altitudes na Guatemala, Costa Rica, Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia), mas é mais comum no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile (Williams, 1987).

Os cultivares de trevo branco se classificam em diferentes tipos, considerando-se principalmente características morfológicas, como tamanho de folhas e densidade de estolões. Conforme Williams (1987), as diferenças de

tamanho de folhas e densidade de estolões se devem a características genéticas e ambientais. Com base no tamanho da folha, é possível identificar três grupos conforme apresentem folha pequena, intermediária ou grande (Carámbula, 1977). Caradus et al., (1989), categorizaram a espécie em quatro grupos, levando em conta principalmente o tamanho da folha, a cianogênese e uma combinação de ambas. O grupo I inclui cultivares de folha pequena e prostrados; o grupo II inclui a maioria dos cultivares de tamanho intermediário de folhas com níveis relativamente baixos de cianogênese (glicídios que por hidrólise enzimática liberam ácido cianídrico, que é considerado um mecanismo de defesa das plantas contra herbívoros predadores; normalmente não origina problemas para os animais em pastoreio); o grupo III inclui os cultivares de folhas grandes e alto conteúdo cianogênico e; o grupo IV inclui cultivares de folhas grandes, do tipo ladino, sem cianogênese.

2.2. Adaptação a condições de déficit hídrico

Os caracteres relacionados ao tamanho da folha conferem aos distintos tipos características adaptativas diferentes com relação a distintos fatores ambientais e de manejo. Um forte desenvolvimento de raízes pivotantes está correlacionado em geral com a característica de folhas grandes, enquanto que o desenvolvimento de raízes predominantemente fibrosas e um hábito de crescimento mais prostrado estão relacionados a tipos de folhas pequenas (Harris, 1987). É bem conhecido que populações de trevo branco adaptadas ao pastejo intenso e freqüente com ovinos tendem a ser prostradas, terem folhas pequenas e alta densidade de estolões e conseqüentemente de folhas,

enquanto aquelas adaptadas a pastejos menos intensos e freqüentes com bovinos, ou conduzidas com manejos de cortes pouco freqüentes para feno, são mais eretas, apresentando folhas maiores. Além disso, apresentam geralmente um hábito mais aberto e com menor densidade de estolões (Williams, 1987). A evidência experimental também é clara com respeito à adaptação dos diferentes tipos de trevo branco a diferentes temperaturas. Aparentemente, a região mediterrânea oferece uma diversidade de habitats apropriados para trevo branco, enquanto que o nordeste da Europa (e grandes altitudes) é marginal para a espécie e a adaptação a determinados fatores ambientais, particularmente às baixas temperaturas de inverno, dominam a estrutura genética destas populações (Williams, 1987).

Conforme Williams (1987), populações de regiões frias se caracterizam por apresentar folhas pequenas e alta densidade de estolões. Neste sentido, em regiões frias (nordeste da Escandinávia, Finlândia e nordeste de Rússia), para sobreviver ao inverno, as plantas entram em dormência e, ao mesmo tempo, passam a apresentar hábito mais prostrado e folhas pequenas e improdutivas. Em contraste, populações da região mediterrânea (Espanha, Israel, Itália, Marrocos, Portugal, etc.), que são geralmente ativas durante o inverno, podem mostrar dormência no verão, presumivelmente em resposta a altas temperaturas e secas prolongadas. Estas populações apresentam folhas grandes, pecíolos largos e estolões grossos. Ainda assim, existe alta variabilidade nas populações da região mediterrânea. Assim, por exemplo, tipos de folhas pequenas são encontrados em condições de pastejo severo em zonas de altitude, assim como tipos de folhas grandes,

também são observados nas zonas irrigadas e ao longo de cursos d'água.

Williams (1987) postulou que as populações de trevo branco adaptadas a diferentes condições adversas (ex; pastejo severo, baixa fertilidade do solo e invernos frios), geralmente apresentam folhas pequenas e alta densidade de estolões finos, provavelmente porque estas características estão associadas diretamente com entrenós curtos. Ainda segundo este autor, entrenós curtos, por sua vez, geralmente estão relacionados com maior ramificação dos estolões e muitos nós por unidade de área de solo. Como cada nó é um meristema potencial para o crescimento de outro estolão e raízes ou uma inflorescência, quanto mais nós houver, maior pode ser a chance de a planta manter certo número destes vivos e, a partir daí, assegurar sua persistência.

Muitos trabalhos realizados com trevo branco têm tratado de relacionar estas características morfológicas dos distintos "tipos" de cultivares com a tolerância ao déficit de água no solo durante o verão, com o objetivo de melhorar a sobrevivência e, como conseqüência, a persistência da pastagem (Woodfield e Caradus, 1987; Caradus e Williams, 1989; Matches, 1989; Caradus et al., 1990; Barker et al., 1993; García, 1993; Brock e Kim, 1994; Barbour et al., 1996; García, 1996; Caradus e Woodfield, 1997; Brink e Pederson, 1998; Arana e Piñeiro, 1999; Arana et al., 2000; Santiñaque, 2001; Annicchiarico e Piano, 2004).

Annicchiarico e Piano (2004) resumiram estes estudos e seus alcances e limitações, separando duas situações: estação seca prolongada e estação seca com chuvas intermitentes. Em ambientes com prolongado

período seco durante o verão, pode-se melhorar sua adaptação por seleção para alta habilidade de ressemeadura. Desta forma se selecionaria germoplasma que escape à seca através de um comportamento anual (Williams, 1987). A seleção para sistema radicular mais profundo e extenso tem sido recomendada para melhor tolerância a estresses provocados por secas menos severas e intermitentes como é o caso na maioria das regiões de maior cultivo da espécie. Alguns trabalhos têm verificado uma melhor adaptação de cultivares de raízes pivotantes mais profundas (como nos tipos ladinos), a secas moderadas e intermitentes de verão (Caradus e Williams, 1989; Caradus et al., 1990). Por exemplo, Caradus et al. (1990) verificaram que populações de trevo branco coletadas em zonas secas (menos de 700 mm de chuva anual), de pastagens da Nova Zelândia, apresentavam folhas grandes, eram mais eretos e com raízes pivotantes de maior diâmetro e peso do que populações de zonas úmidas (acima de 1400 mm de chuva anual). Estas populações foram comparadas com a cultivar "Grassland Huia", classificada como de tipo de folha intermédia (Caradus e Woodfield, 1997), um material de propósito geral selecionado de coletas realizadas em pastagens de zonas baixas e que, resultou num tipo com folhas maiores, mais ereto, e com raízes pivotantes mais profundas que todas as linhas comparadas. Baseados em evidências de estudos comparativos de híbridos de milho e cultivares de trigo que demonstraram que sistemas radiculares profundos e extensivos são efetivos em manter o potencial de água da folha durante períodos secos, os autores concluíram que plantas com raízes mais profundas poderiam ser mais tolerantes à seca que plantas com raízes mais superficiais e que isto poderia

ser uma importante característica adaptativa de genótipos de trevo branco mais tolerantes à seca.

A seleção para raízes mais profundas e desenvolvidas se baseia na existência de grande variação genética e herdabilidade moderadamente alta da característica comprimento de raízes (Ennos, 1985). Não obstante, segundo Annicchiarico e Piano (2004), a relação entre desenvolvimento radicular e tolerância à seca é contraditória em trevo branco. Germoplasmas com folhas grandes, que possuam raízes mais desenvolvidas, tem apresentado, sob condições de seca, um comportamento relativamente melhor que materiais de folhas médias, em alguns estudos, mas não em outros (Brock e Kim, 1994; Barbour et al., 1996; Brink e Pederson, 1998).

É importante levar em consideração as variações nas condições experimentais dos citados trabalhos. É difícil interpretar corretamente as diferenças entre os estudos acima citados, uma vez que não existe uma adequada caracterização do déficit hídrico, pelo menos através de variáveis como conteúdo de água disponível no solo e a evolução do esgotamento ao longo do tempo. Essa informação permitiria conhecer com melhor precisão a duração e severidade do déficit nos distintos experimentos. Por outro lado, as variáveis de resposta que se estudam, geralmente dão mais ênfase a características demográficas e morfológicas das plantas do que à condição hídrica das mesmas durante o estresse. Além disso, talvez as diferenças entre os distintos trabalhos se expliquem pelo fato de que a tolerância à seca não depende de maneira independente do tamanho do sistema radicular, mas também da proporção de parte aérea (especialmente folhas) da planta. Isto é

devido a que as raízes seriam o órgão que abastece de água a planta, representando, portanto uma “oferta”, enquanto que as folhas que transpiram seriam a "demanda" de água da planta. Como assinalam distintos trabalhos, a redução da área foliar é o primeiro mecanismo de defesa frente ao déficit hídrico (Turner e Begg, 1978; Jones, 1988; Taiz e Zeiger, 1998; Barker e Caradus, 2001). Em função disso, seria desejável terem-se plantas com raízes profundas e com relativamente pouca área foliar durante os períodos secos para minimizar as perdas de água por transpiração. No caso do trevo branco, a variabilidade expressa em tamanho de folhas está correlacionada positivamente com o desenvolvimento de raízes, de tal modo que as cultivares com raízes mais profundas e desenvolvidas tem também maior tamanho de folhas e maior área foliar transpirante, o que reduziria a vantagem do maior desenvolvimento radicular. No entanto, alguns trabalhos preliminares realizados na Nova Zelândia por Woodfield e Caradus (1987), demonstram que esta correlação é modificável por seleção natural. Avaliando 125 genótipos de trevo branco, os autores verificaram que aquelas populações de zonas secas e as sobreviventes de uma severa e prolongada seca, coletadas de sítios onde apenas a cultivar "Grassland Huia" ou seu antecessor "Certified Mother" (sobreviventes de uma severa e prolongada seca) haviam sido semeados, em geral apresentaram morfologias radiculares similares às da cultivar Huia (de folha intermediária), mas tiveram menor tamanho de folhas. As populações de zonas secas parecem ter-se adaptado ao estresse hídrico retendo a estrutura da cultivar Huia, mas com um menor tamanho de folha e menor rendimento da parte aérea. Também é importante destacar que em outras regiões do mundo,

com verões quentes e com deficiências de água no solo, a avaliação de populações de ecótipos naturalizados de trevo branco e sua comparação com cultivares selecionados e com germoplasma melhorado têm apresentado resultados interessantes.

Aqueles ecótipos, coletados em várias pastagens do sudeste dos EUA, persistem apesar das condições adversas de ambiente e de manejo. Estudo conduzido por Brink et al. (1999) comparou o crescimento, morfologia e persistência vegetativa de ecótipos de folhas pequenas a médias, com cultivares selecionados de folhas grandes (cvs. Osceola e Regal) e germoplasma melhorado sob pastejo contínuo (gado bovino, mantendo um resíduo de 5cm de altura), em quatro estados do sudeste dos EUA. O comprimento de estolões dos ecótipos geralmente superou o comprimento dos estolões dos cultivares e germoplasma em todas as localidades. Ao final do experimento, os ecótipos mostraram maior ramificação de estolões, que os cultivares e germoplasmas (1580 vs 320 ramificações.m⁻²). O maior crescimento vegetativo dos ecótipos foi devido a uma maior proporção de nós de estolões que se ramificaram e formaram raízes adventícias, particularmente durante o verão. A proporção de nós enraizados dos ecótipos foi sensivelmente maior do que as cultivares e um germoplasma, praticamente durante todo o período experimental. Esses ecótipos de trevo branco representam uma fonte valiosa de germoplasma para incorporar em programas de melhoramento.

2.3. Crescimento e produção

A alta sensibilidade do trevo branco ao déficit hídrico determina que

se possa, conforme o ambiente, detectar importantes respostas em crescimento e produção de forragem. Em um estudo em condições de campo realizado em La Estanzuela, Uruguai, encontrou-se resposta positiva para produção de forragem utilizando irrigação freqüente, com baixos volumes de água durante a primavera, verão e outono, numa pastagem de trevo branco associado com festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.) (Arana e Piñeiro, 1999). O objetivo da irrigação não foi maximizar a produção de forragem, mas sim reduzir períodos de déficit hídrico superficial que provocasse a morte de estruturas vegetativas (estolões), e limitasse a sobrevivência do trevo branco. Estes autores separam a resposta à irrigação em uma resposta em curto prazo, direta, melhorando o crescimento e produção de forragem e uma resposta em longo prazo, aumentando a persistência produtiva da pastagem. Considerando todos os dados do experimento, o impacto sobre a produção de forragem mais interessante, foi a evolução da produção anual de trevo branco durante os quatro anos de avaliação sob condições de estresse hídrico ou sob irrigação (médias de cultivares e manejos da desfolha). Neste sentido, a produção de trevo branco foi de aproximadamente 3000, 5000, 1700 e 400 kg MS.ha⁻¹ para o primeiro, segundo, terceiro e quarto ano respectivamente, na condição sem irrigação, enquanto para a pastagem irrigada os rendimentos foram de 5500, 7200, 6800 e 3000 kgMS.ha⁻¹ (Arana et al., 2000). Os autores também interpretam a diferente resposta entre anos como consequência da diferente composição da pastagem no que se refere ao predomínio de plantas mãe no primeiro verão e ao predomínio plantas originadas de estolões no segundo verão.

Em relação ao efeito do estresse hídrico sobre as variedades avaliadas no estudo acima referido (Zapicán e uma linha experimental "LE 2" de tipo ladino derivada em parte do cultivar Regal), no primeiro ano não foram encontradas diferenças entre as variedades. Durante o segundo ano, o rendimento de LE 2 foi superior a Zapicán tanto com irrigação como sem irrigação (38 e 20%). As diferenças se produziram na primavera e verão, quando os estolões predominam na pastagem. As diferenças em rendimento a favor de LE 2 foram atribuídas ao comportamento individual dos estolões já que não se encontrou diferenças entre ambos cultivares no número de estolões nem de pontos de crescimento por unidade de superfície, que pudessem explicar os aumentos de produção de LE 2 durante o segundo ano. Como conclusão mais relevante do trabalho se destaca que a irrigação foi o fator de maior impacto em comparação com as variedades e os manejos da desfolha, determinando um aumento na produção de forragem da pastagem em 3 t MS.ha⁻¹.ano⁻¹.

Santiñaque (2001) colocou em evidência o efeito do estresse hídrico sobre o crescimento e a produção de trevo branco em condições controladas, com dois níveis de água (não limitante e limitante), dois cultivares de trevo branco (Zapicán e Regal) e dois manejos da desfolha. Neste trabalho o rendimento de forragem de verão (25/01 a 29/03), média de cultivares e manejos foi de 10 e 20 g MS.vaso⁻¹ para o tratamento com déficit e sem déficit hídrico, respectivamente, demonstrando uma relação de rendimento ou índice de estresse (IE), de 0,50. Para compreender melhor as bases fisiológicas dos efeitos dos fatores em estudo, também se mediu o efeito sobre outras

variáveis. Neste sentido, além do efeito do déficit de água sobre o rendimento de forragem, detectou-se um efeito depressivo do déficit de água sobre o peso de raízes e sobre a evapotranspiração (ET), os quais interagiram com o manejo da desfolha. Sem deficiência de água o manejo aliviado (cortes a cada 40 dias a 3cm) rendeu 54% mais forragem, produziu 123% mais raízes e utilizou 24% mais água por evapotranspiração, em comparação com o manejo freqüente (cortes cada 20 dias a 3cm). Em contraste, com déficit de água o manejo aliviado não produziu mais forragem que o corte freqüente, mas rendeu 143% mais raízes e despendeu 11% mais água. Estes resultados evidenciam que a resposta das plantas de trevo branco ao déficit de água no solo pode variar em função do manejo da desfolha, que provoca mudanças na proporção de raízes em relação à parte aérea das plantas. Neste trabalho se detectou efeito de cultivares, sobre o rendimento de forragem, peso de raízes e ET e estes efeitos foram independentes do manejo e do nível de água no solo (interações cultivar x manejo e cultivar x nível de água, não significativas). Regal (tipo ladino) rendeu 33% mais forragem, 16% mais raízes e evapotranspirou 6,3% mais água que a cultivar Zapicán (de folha intermediária). As diferenças entre variedades se explicariam pelas características morfofisiológicas de ambos tipos de trevo branco. A ausência de interação com os níveis de água no solo indicaria que estas características dos distintos tipos, não teriam relação com a tolerância ao déficit hídrico como postulam vários trabalhos (Annicchiarico e Piano, 2004).

Com relação aos tipos de trevo branco (cultivares de folhas pequenas, cultivares de folhas de tamanho intermediário e cultivares de folhas

grandes), Carámbula (1977) propõe que os cultivares de folhas grandes de tipo ladino são de muito boa produção em condições úmidas, desde que a desfolha não seja intensa. Além disso, o autor postulou que embora geralmente se atribua a este grupo uma maior resistência à seca, parece que este caráter não é um atributo de cada grupo em si, mas que este pode modificar-se amplamente pela umidade, fertilidade do solo e pelo manejo da desfolha. Consequentemente, cada tipo se comportaria com a mesma sensibilidade ao estresse hídrico e, provavelmente, o mais importante seja a variabilidade existente ou as possibilidades de criá-la por seleção, ou manejo num sentido amplo, dentro de cada tipo, como tem sido demonstrado nos trabalhos de coleta e avaliação de ecótipos locais, como aqueles desenvolvidos nos EUA e Nova Zelândia (Woodfield e Caradus, 1987; Brink et al., 1999). Estes trabalhos verificaram vantagem em termos de adaptação e persistência dos ecótipos submetidos à seleção natural, os quais “adotaram” características que, de certo modo, combinaram os atributos morfológicos dos diferentes tipos de trevo branco, inclusive modificando os coeficientes de proporcionalidade entre as diferentes partes das plantas.

2.4. Persistência vegetativa e ressemeadura natural

A persistência das plantas de trevo branco nas pastagens depende da população e da funcionalidade das plantas originadas de sementes (plantas mães), da produção de estolões a partir das mesmas, e da continuação do processo de ramificação e formação de novos estolões e de novas plântulas nascidas por ressemeadura natural. A importância relativa destes mecanismos

depende principalmente do ambiente, podendo persistir como anual ou perene (Archer e Robinson, 1989). A raiz original das plantas mães possui vida curta (uno ou um ano e meio, conforme a cultivar e o ambiente) (Westbrooks e Tesar, 1955), e o contínuo crescimento de estolões é o principal mecanismo para a persistência da planta. O crescimento de estolões seria o principal mecanismo de persistência de trevo branco em ambientes temperados, enquanto que em ambientes com verões secos de algumas regiões subtropicais, como o sudeste dos EUA, a sobrevivência de estolões é menos comum e a persistência do trevo branco se deve à regeneração de plantas por ressemeadura natural (Archer e Robinson, 1989). Estes autores realizaram estudos durante cinco anos na região sudeste da Austrália (NSW), e verificaram que o trevo branco persistiu essencialmente como perene (por estolões), mas com uma marcada diminuição da frequência de plantas durante o final do verão, dependendo do esgotamento da água disponível do solo. Esta interação entre a sobrevivência de estolões e a umidade do solo determinou que a combinação crítica, na qual a frequência de estolões foi adversamente afetada, foi quando a água disponível do solo (57mm em uma profundidade de 60cm), diminuiu a menos de 35mm e a temperatura máxima semanal superou os 20°C. Assim, a 35°C a probabilidade de sobrevivência de estolões foi 1,0 para um conteúdo de água do solo de 55 e 45mm de água disponível, e 0,7, 0,3 e 0,1 para 25, 15 e 5mm de água disponível. Durante um período prolongado de deficiência hídrica na segunda primavera e verão deste estudo, todas as plantas morreram. A regeneração foi devida a germinação de sementes e ao estabelecimento de plântulas, as quais persistiram

posteriormente como perenes.

Os estudos realizados no Uruguai sobre a produção e persistência de trevo branco, que envolveram manejo da desfolha e deficiência hídrica, com diferentes materiais genéticos (Arana e Piñero, 1999; Arana et al., 2000) corroboram os resultados acima discutidos. Estes trabalhos demonstram que, a partir da primavera do segundo ano, a estrutura predominante na pastagem de trevo branco corresponde ao conjunto de estolões de diferente idade e hierarquia, pertencentes a cada planta. Ocorrem ciclos anuais de diminuição (primavera-verão) e aumento (outono-inverno) na densidade de estolões, estando esta diminuição associada aos déficits de água no solo e, provavelmente, também com altas temperaturas.

Arana e Piñero (1999) e Arana et al. (2000) verificaram importantes diferenças no efeito do déficit hídrico sobre o funcionamento dos distintos mecanismos de persistência (estolões e ressemeadura). Em condições de seca, em cada ciclo anual, a emissão de novos estolões.m⁻² não compensou a diminuição por mortalidade, determinando uma redução progressiva da produção de forragem. Entretanto, a irrigação freqüente e em doses apenas suficientes para reduzir o déficit superficial de água durante a primavera e, especialmente, durante o verão (microaspersores 2,6mm/hora aplicando 15mm para aumentar o conteúdo de água no solo nos primeiros 10cm, quando este foi deficiente), permitiu restabelecer a população de estolões, logrando manter o rendimento de forragem estável ao longo do período experimental (1996, 1997, 1998 e 1999). A ressemeadura natural não foi efetiva e ainda que se tenha contabilizado um número importante de plântulas germinando

anualmente no outono-inverno, estas não sobreviveram além do período primavera-verão. Não foi possível explicar este comportamento com as medições realizadas neste estudo. Para solos com história agrícola, a ressemeadura efetiva dependeria da combinação de verões muito secos seguidos de outono-inverno com altas precipitações. Os manejos de cortes e os diferentes tipos morfológicos (intermediário e ladino) não apresentaram diferenças na dinâmica do número de estolões. Destaca-se que tampouco para as características demográficas se detectaram diferenças entre cultivares de folhas intermediárias (Zapicán) e de folhas grandes de tipo ladino (Regal), em resposta ao déficit hídrico.

A investigação da variação nas repostas fisiológicas ao déficit hídrico entre cultivares de trevo branco poderia permitir seleção e melhoramento de cultivares tolerantes ao estresse, e a possibilidade de identificar genes para inclusão em materiais suscetíveis (Barker et al., 1993).

2.5. Características gerais da resposta à deficiência hídrica

2.5.1. Respostas morfológicas e anatômicas

2.5.1.1 Tamanho, número e características anatômicas de folhas

No início de uma deficiência hídrica, o processo fisiológico mais sensível é a expansão celular, a qual afeta a taxa de expansão foliar e, conseqüentemente, a área foliar e a taxa de crescimento da pastagem se o índice de área foliar é sub-ótimo (Hsiao e Acevedo, 1974; Turner e Begg, 1978; Jones, 1988; Taiz e Zeiger, 1998). Assim, segundo, Taiz e Zeiger, (1998), a

diminuição da expansão foliar é a primeira linha de defesa das plantas frente ao déficit hídrico, uma vez que uma menor área foliar transpira menos água, conservando a limitada quantidade de água no solo para utilizar num período mais longo.

Outras mudanças nas folhas em resposta ao estresse hídrico tem relação com a anatomia e a fisiologia das mesmas. O aumento do peso específico das folhas é uma das respostas adaptativas para reduzir a transpiração das folhas durante o déficit de água (Larcher, 1995). Assim, por exemplo, genótipos de alfafa com folhas de maior peso específico apresentam maior taxa de fotossíntese líquida por unidade de área de folha (Delaney e Dobrenz, 1974).

Angelocci (2002) realizou uma revisão sobre os principais aspectos da estrutura da estrutura anatômica das folhas em relação com o déficit hídrico. A estrutura anatômica das folhas varia bastante entre espécies, mas também pode haver variações de estrutura entre folhas de uma mesma planta, induzidas pelo nível de irradiância a que estão submetidas durante sua formação, sendo típicas as diferenças entre "folhas de sol" e "folhas de sombra". As primeiras contêm uma camada a mais de células paliçádicas, que se apresentam muito mais "compactas" do que as folhas de sombra, tendendo a ter sistema vascular mais desenvolvido e cutícula mais espessa. As folhas de sol são normalmente menores e mais grossas que as de sombra. Em função dessas diferenças anatômicas, folhas de ambientes secos possuem características xeromórficas, em oposição às mesomórficas, típicas de ambientes sem deficiência hídrica acentuada. As xeromórficas tem

características que se aproximam daquelas das folhas "de sol" e as mesomórficas daquelas "de sombra". Folhas de sol não são obrigatoriamente xeromórficas, mas podem apresentar estas características dependendo das condições do ambiente. As xeromórficas apresentam uma alta relação entre suas superfícies interna e externa, tendo extensões ligando o feixe vascular à epiderme, e cutícula espessa.

Embora se assuma que as folhas mesomórficas devam perder mais água que as xeromórficas sob determinada condição ambiental, por terem maior volume de espaços internos de ar e cutícula menos espessa, verifica-se que, em condições hídricas satisfatórias, a densidade de fluxo de vapor d'água de certas espécies com folhas de caráter xeromórfico é da mesma magnitude e até maior do que as espécies com folhas de tipo mesomórfico.

A maior economia de água das xeromórficas manifesta-se, em condições de estresse hídrico, quando os estômatos se fecham e as perdas hídricas através da cutícula espessa tornam desprezíveis as perdas de vapor. A adaptação das folhas ao estresse hídrico é acompanhada por um aumento no peso específico e por uma diminuição no tamanho. A folha menor transpira mais por unidade de área devido ao fato de que diminui a espessura da camada limite e, portanto, de sua resistência difusiva. Essa maior perda pode, após algum tempo, levar mais rapidamente a certo grau de déficit hídrico na folha, que causa diminuição da abertura estomática, regulando a maior perda de água.

A adaptação anatômica das folhas ao déficit hídrico, tem, além das vantagens assinaladas quanto à economia da água, outras vantagens em

relação a sua capacidade fotossintética. Segundo Sharkey (1985), os espaços entre as células paliçádicas formam largos canais que podem atuar como condutores da luz (fibras óticas), permitindo que passe mais luz através do parênquima paliçádico. Portanto, o arranjo de células em colunas no parênquima paliçádico reduzirá a quantidade de luz absorvida neste tecido permitindo que mais luz, especialmente vermelha e azul, alcance o parênquima esponjoso da folha, no qual ocorre uma maior dispersão de luz, uma vez que esta alcança as superfícies celulares em ângulos diversos. Esta maior dispersão da luz determina que a mesma passe através de muito mais tecido antes de sair da folha. Por esta razão, a clorofila do mesófilo esponjoso tem uma maior absorvância relativa que a clorofila do tecido paliçádico. Em cultivares de trevo branco estas características estão muito pouco estudadas, encontrando-se apenas estudos que concluem que a espécie não controla eficientemente a perda de água através das folhas.

A resistência difusiva das folhas aumenta com o aumento da intensidade do estresse hídrico, mas não o suficiente para prevenir que a transpiração continue (Hart, 1987). Não está claro se a falta de controle da transpiração é provocada pela inabilidade para fechar os estômatos ou por baixa resistência cuticular. Cox e Boersma (1967) encontraram uma interação entre estresse de água no solo e temperatura do solo para fechamento estomático em trevo branco cv. Dutch. Segundo os autores, o fechamento diminuiu com o aumento da temperatura (numa amplitude de 10 e 26,7°C), não havendo fechamento dos estômatos ao aumentar o déficit de água do solo quando a temperatura do solo foi de 26,7°C. Pequenas diminuições na abertura

estomática foram detectadas em toda a gama de estresse hídrico para temperaturas do solo de 15,6 e 21,1⁰C. Para a temperatura do solo de 10⁰C, foi evidente uma progressiva diminuição na abertura estomática, na gama de estresse hídrico avaliada.

2.5.1.2. Senescência e morte de folhas

A senescência e morte de folhas são mecanismos para evitar a perda da água da planta por transpiração. Este processo ocorre na seqüência de respostas morfofisiológicas como a redução na expansão foliar, aumento no crescimento relativo de raízes em relação com a parte aérea, ajuste osmótico, fechamento estomático etc. Na medida em que continua a desenvolver-se o estresse hídrico, a senescência de folhas e a morte por dessecação, são mecanismos que em geral aparecem nas plantas quando o estresse hídrico já é bastante severo (Hsiao e Acevedo, 1974; Jones, 1988). Em trevo branco, o mecanismo de senescência e morte de folhas é, aparentemente mais importante e de ocorrência mais antecipada, em relação a outras espécies, em função da escassa capacidade de controle da perda de água que a planta apresenta (Hart, 1987). Em condições secas as folhas de trevo branco senescem rapidamente e a incapacidade de controle da perda de água pode explicar a baixa eficiência de uso da água pelo trevo branco, nesta condição (Johns e Lazenby, 1973; Hart, 1987). A senescência de folhas como meio para prevenir a excessiva desidratação é um fenômeno bem evidenciado no trabalho acima citado, particularmente nos meses mais quentes do ano, quando mais de 70% das folhas morreram nos tratamentos sem irrigação

contra 20% nos tratamentos irrigados.

De uma forma geral, pode-se inferir através da literatura, que quando o estresse hídrico se torna mais severo para o trevo branco, a redução da área foliar se realiza por aceleração da taxa de senescência das folhas fisiologicamente mais velhas e de seu desprendimento da planta. O nível de estresse hídrico que determina o início da senescência é provavelmente dependente da nutrição nitrogenada (características do rizóbio associado), do estágio de desenvolvimento e dos genótipos, embora não haja suficiente evidência experimental a este respeito (Jones, 1988). Particularmente para o trevo branco, o processo de início da senescência de folhas é completamente diferente de outras espécies como festuca ou alfafa, que apresentam melhor controle da perda de água pelas folhas que o trevo branco (Hart, 1987).

2.5.1.3. Densidade e características anatômicas dos estolões

Carámbula (1977) sustenta que a razão principal da baixa persistência de pastagens de trevo branco no Uruguai é a alta taxa de mortalidade dos estolões durante o período estival, em consequência do déficit hídrico e das altas temperaturas características desta estação do ano.

Hart (1987) em uma revisão sobre o crescimento e desenvolvimento dos estolões considera que o componente estrutural básico da planta adulta de trevo branco é o estolão. Sua forma final é o resultado da iniciação, crescimento e desenvolvimento da folha, gema axilar e primórdio do entrenó na gema apical. Do ponto de vista das relações hídricas em trevo branco, é importante que em cada nó existam dois primórdios radiculares, dos quais

apenas um deles terá potencialidade de desenvolver uma raiz nodal. Os processos pelos quais existem dois primórdios radiculares e apenas um deles forma uma raiz não estão esclarecidos. Quando o primórdio de raiz nodal está em contacto com um substrato úmido, este inicia o crescimento e forma uma raiz nodal. Cada raiz nodal se ramifica para produzir um sistema radicular que tem conexões vasculares com a gema axilar desse nó. Normalmente então, existe potencialmente uma raiz nodal por nó, já que dos dois primórdios apenas um se desenvolve e forma raiz. A formação de raízes nos nós é altamente dependente de um suficiente nível de umidade do solo, do contrário esse nó não produzirá raiz. Além da umidade do solo, a umidade do ar é importante para a formação das raízes nodais. A formação das raízes nodais não só é importante para a absorção de água, como, além disso, cada raiz nodal que se forme gera um efeito promotor sobre a gema axilar, a qual começa a crescer e formar um novo estolão. Se a raiz não se forma, por causa da falta de umidade na superfície do solo, não haverá raiz nesse nó para absorver água e tampouco a gema axilar iniciará seu crescimento e formação de um novo estolão (Hart, 1987). Outro efeito inibitório sobre a gema axilar é dado pela dominância apical desenvolvida pela gema apical ou primórdio foliar do estolão, que tem influência sobre os primeiros nós, mas este efeito é minimizado em condições de alta disponibilidade de água e nutrientes minerais para a planta.

2.5.1.4. Floração e produção de sementes

Uma vez que ocorram as condições de temperatura e fotoperíodo que determinam a indução floral, cada gema axilar pode desenvolver uma

inflorescência. Com isto se elimina a possibilidade de que este meristema forme um novo estolão (Carámbula,1977). Este processo é responsável, nas pastagens de trevo branco, pela produção de sementes, que poderão germinar e formar novas plântulas por ressemeadura natural, e/ou formará o banco de sementes no solo. Em condições de manejo de cortes simulando pastejo intermitente interrompido desde o final da primavera até o final do verão para permitir a ressemeadura natural, a produção de sementes variou entre 26 e 83 kg.ha⁻¹ conforme o regime hídrico e o genótipo (cv. Zapicán e LE 2 de tipo ladino), (Arana e Piñeiro, 1999). Apesar destes valores de produção, a ressemeadura natural não foi efetiva já que as plântulas não conseguiram sobreviver ao verão. As causas deste comportamento não estão esclarecidas e merecem estudos para tratar de melhorar este mecanismo alternativo de persistência de trevo branco.

2.5.1.5. Raízes e estresse hídrico

Em geral, a resposta das plantas ao déficit de água no solo se traduz, no médio prazo, por um aumento na relação raiz/parte aérea, como forma de minimizar a demanda da parte aérea e, proporcionalmente, captar mais água. Em trevo branco, muitos trabalhos relatam este comportamento (Caradus, 1990; Santiñaque, 2001). Caradus (1990) reportou a variação da relação raiz/parte aérea em linhas e cultivares de trevo branco. O ponto central destas variações são os mecanismos responsáveis pela partição de biomassa entre raízes e parte aérea. A alteração na prioridade de alocação de carbono para estes dois “compartimentos” resulta do ajuste osmótico na parte aérea (folhas), e da acumulação e translocação de solutos tais como íons

inorgânicos, ou orgânicos como prolina e carboidratos solúveis como pinitol, para as raízes. Estes são capazes de provocar uma diminuição no potencial osmótico e uma queda no potencial total dos tecidos da raiz (Barker et al., 1993; McManus et al., 2000). Como consequência, há a entrada de água na raiz devido a que as células das zonas de crescimento diminuem seu potencial de água em relação ao do solo, e esta é capaz de seguir crescendo por aumento na turgidez (Jones, 1988). Além disto, existem vários mecanismos importantes que permitem à planta regular seu desenvolvimento em função do conteúdo da água no solo. Conforme Davies e Zhang (1991), as raízes “percebem” quando o solo começa a secar-se, ainda antes que o nível de água torne-se crítico, e enviam “sinais” à parte aérea, para que esta inicie o controle estomático. Por exemplo, a diminuição da disponibilidade de água no solo, afeta a turgidez dos tecidos das raízes, o volume celular e a pressão sob as membranas, isto afeta o crescimento e desenvolvimento radicular e substâncias como ácido abscísico (ABA) são translocadas para a parte aérea como sinais. Como pode haver menos absorção de nutrientes, como NO_3^- , muda a relação cátions/ânions no xilema e o pH aumenta provocando uma alteração na forma de ABA protonado (ABAH), para a forma dissociada ABA^- e, como resultado, menos ABA é tomado pelas células do mesófilo e mais ABA alcança a células guarda dos estômatos (Taiz e Zeiger, 1998). Além do efeito de “sinais” como ABA sobre o fechamento estomático, ocorrem outras respostas deste tipo nas folhas como a condutância, expansão e estado hídrico foliar (Davies e Zhang, 1991). Estes processos estão muito pouco estudados em trevo branco.

2.5.2. Respostas fisiológicas ao déficit hídrico

A redução na turgidez das folhas afeta o funcionamento estomático e causa o enrolamento das folhas (ou murcha). Estes processos aumentam a resistência estomática, reduzem a entrada de CO_2 e aumentam a temperatura da folha (Barker e Caradus,2001). Ou seja, o déficit de água afeta direta ou indiretamente a fotossíntese, a relação entre os fluxos de vapor de H_2O e CO_2 e a temperatura das folhas. Estas variáveis por sua vez estão estreitamente relacionadas.

Para evitar ou reduzir a perda de água, o fechamento dos estômatos inevitavelmente reduz também, o fluxo de CO_2 para o interior da folha. No início do déficit de água, reduz-se mais a perda de água, o que faz aumentar a eficiência de uso (mais CO_2 é absorvido por unidade de H_2O transpirada) uma vez que o fechamento estomático inibe mais a transpiração do que a diminuição na concentração de CO_2 intercelular. A desidratação das células do mesófilo inibe a fotossíntese. Quando o estresse se torna mais severo, a eficiência de uso da água geralmente diminui (Taiz e Zeiger,1998). A efetividade das plantas em moderar a perda de água permitindo suficiente absorção de CO_2 para a fotossíntese, pode ser quantificada por um parâmetro chamado relação de transpiração. Este valor é definido como a quantidade de água transpirada pela planta, dividido pela quantidade de CO_2 assimilado na fotossíntese. Para plantas C_3 aproximadamente 500 moléculas de água são perdidas para cada molécula de dióxido de carbono fixado pela fotossíntese (Taiz e Zeiger,1998). O inverso deste coeficiente é a eficiência de uso da água (EUA) para plantas C_3 , sendo este valor de 0,002 (1/500). A grande diferença

no fluxo de água em comparação com CO_2 depende de dois fatores: a) o maior gradiente de concentração de vapor de água em comparação com o de CO_2 e; b) o dióxido de carbono difunde 1,6 vezes mais lento através do ar que o vapor de água (a molécula de CO_2 é maior que a de H_2O e tem um menor coeficiente de difusão).

Em relação ao efeito da temperatura, pode-se definir uma resposta geral da fotossíntese, porém as temperaturas onde as mudanças ocorrem podem variar, a faixa operacional para as plantas varia entre -10 e $+50$ $^{\circ}\text{C}$. Na amplitude entre 20 e 30 $^{\circ}\text{C}$, a fotossíntese é limitada pela disponibilidade de CO_2 e, em plantas C_3 , pela fotorrespiração.

Em trevo branco, a fotossíntese e a transpiração são afetadas pelo escasso controle que a espécie tem sobre as perdas de água. Se este processo se deve ao pouco controle do fechamento dos estômatos, a resposta inicial, quando começa um déficit de água, será a de predominar o processo de perda de água enquanto a fotossíntese poderá manter-se até que a desidratação das células do mesófilo e a alta temperatura a afetem negativamente. Os trabalhos realizados por Blaikie e Martin (1987) e Blaikie et al. (1988), através de uma abordagem morfofisiológica levam às seguintes conclusões: nesta espécie, a diminuição na taxa de expansão foliar começa a ocorrer com déficits muito menores do que para outras espécies e se a dessecação continua, diminui o potencial hídrico da folha e finalmente há fechamento dos estômatos, reduzindo então a transpiração, mas também a fotossíntese. Isto ocorre para trevo branco quando o potencial hídrico da folha alcança cerca de $-2,0$ MPa, em contraste com outras espécies como *Paspalum*

dilatatum, em que isto ocorre com - 2,5MPa. A isto se soma o fato de que o estado hídrico das plantas modifica a resposta à temperatura, uma vez que a restrição de água reduz a condutividade estomática e, portanto limita a capacidade da planta em dissipar calor, podendo ocorrer que a temperatura da folha chegue a ser bem maior do que a do ar. Estes resultados justificam os efeitos da interação água/temperatura, verificada por Archer e Robinson (1989) sobre a sobrevivência de estolões de trevo branco.

Por outro lado, se tem observado que quando a água não é limitante, para o crescimento de trevo branco, a fotossíntese líquida da pastagem é pouco sensível ao aumento da temperatura entre 20 e 40°C (Blaikie et al., 1988). Segundo os autores, a fotossíntese líquida aumentou com o nível de radiação solar de 100 até 1000 W.m⁻², sendo que a variação na taxa de fotossíntese líquida neste último nível foi apenas 15% na faixa de temperaturas entre 24 a 38°C, sendo máxima ao redor de 29 - 30°C. Em contraste, *Lolium perenne* mostrou uma grande depressão da fotossíntese com o aumento da temperatura.

Estes dados ressaltam que as relações hídricas de trevo branco são complexas e existem diferenças entre os distintos trabalhos. Por exemplo, Blaikie e Martin (1987) e Blaikie et al. (1988) demonstraram que o trevo branco teve capacidade de regular a perda de água por fechamento estomático ainda que a diminuição da fotossíntese líquida tenha começado com um potencial de água nas folhas mais elevado do que para *L. perenne*. Por outro lado, é importante a interação temperatura/água, a qual se manifesta em diferentes processos como a fotossíntese, sobrevivência de estolões e crescimento das

plantas, entre outros.

Em todos os casos quando a água não é limitante, estes processos não são limitados por altas temperaturas. Os processos fisiológicos das plantas em condições de altas temperaturas dependem da condição hídrica do solo e da planta.

Outro aspecto importante nas relações hídricas em trevo branco é a diferença na condutância estomática entre plantas submetidas ao estresse hídrico e plantas com água não limitante. Nas últimas operam fatores de curto prazo alterando sensivelmente os valores de condutância, devido a mudanças nos fatores que durante o dia modificam a abertura estomática (temperatura, déficit de saturação do ar e nuvens). Por outro lado, em plantas submetidas a déficit de água no solo, a condutância estomática e, conseqüentemente, a transpiração são menos dependentes dos fatores de curto prazo e dependem do potencial da água do solo. Por tanto, neste caso, é de se esperar menor variabilidade nos valores estimados num dado momento, em comparação com plantas sem estresse (Schulze, 1986; Bono et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento foi conduzido em vasos, em casa-de-vegetação do Departamento de Solos, na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

3.2 Características e acondicionamento do solo

Utilizou-se solo proveniente da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, caracterizado como Argissolo Vermelho distrófico típico (Unidade de Mapeamento São Jerônimo) (EMBRAPA, 1999). O local vinha sendo utilizado como lavoura há vários anos e a correção química do mesmo havia sido realizada a menos de um ano.

Após a coleta do solo, o mesmo foi seco na casa-de-vegetação até obter-se um conteúdo mínimo de umidade que permitisse a sua peneiragem. Depois de peneirado, o solo foi amostrado para análises químicas e para a determinação do conteúdo de umidade gravimétrica. Esta foi determinada através de pesagem do solo úmido e seco em estufa a 100⁰C durante 24h. A porcentagem de água no solo foi estimada posteriormente conforme o seguinte cálculo: $(\text{peso de solo úmido} - \text{peso de solo seco}) / \text{peso de solo seco} \times 100$. O

conteúdo de umidade no momento do enchimento dos vasos foi de 5% H₂O (p/p). O solo foi acondicionado em cada vaso de forma a se obter uma densidade aparente homogênea de 1,3 g/cm³, resultando numa massa de 12kg de solo (com 5% H₂O) ou seja, 11 kg de solo seco por vaso. A capacidade dos vasos foi de 8,4L (0,30 m de diâmetro) e não foram furados.

Em função dos resultados de análise (Apêndice 1), adicionou-se adubo fosfatado solúvel em água (0-18-0), necessário para assegurar uma disponibilidade não limitante de nutrientes. A quantidade adicionada foi equivalente a 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅ uniformemente misturado com o solo.

Para o controle da evolução da água no solo durante o experimento se utilizou a curva característica de umidade, determinada para este solo (Apêndice 2).

3.3 Tratamentos e delineamento experimental:

3.3.1 Tratamentos

Cultivares de trevo branco: foram utilizados três genótipos considerados morfologicamente contrastantes. Os cultivares Regal e Zapicán são classificados como tipos de folha grande e intermediária respectivamente, enquanto o terceiro genótipo, denominado Seleção 2 (Sel. 2), possui folhas de tamanho intermediário. Este genótipo foi obtido a partir de plantas sobreviventes de uma pastagem do cv. Zapicán semeada em 1997 e que sofreu uma prolongada e severa seca no verão 1999-2000. Estas plantas sobreviventes foram transplantadas para uma nova área isolada de outros materiais de trevo branco e policruzadas. Foram coletadas todas as sementes

de todas as plantas do policruzamento, que formaram então a Sel. 2

Disponibilidade hídrica: Após o estabelecimento das plantas (início de desenvolvimento do primeiro estolão) foram mantidos dois níveis de umidade no solo: um nível “não limitante”, em média 77% da capacidade de campo (S/D) e um nível limitante, representado pela manutenção da água no solo em média a 57% da capacidade de campo (C/D). Em média, estes níveis de umidade foram em base gravimétrica de 14,1% (S/D) e 10,4% (C/D). Os tratamentos S/D e C/D foram duas faixas de conteúdo da água no solo já que a perda diária da água por evapotranspiração constitui o nível mínimo de cada tratamento e a irrigação diária o nível máximo em cada dia. O seja que, por exemplo, para o tratamento C/D a determinação da manhã, devido à perda de água foi muitas vezes de aproximadamente 45% de CC, mas com a irrigação se elevava a 60% da CC.

3.3.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi um fatorial 3×2, com quatro repetições, com distribuição completamente casualizada. A unidade experimental foi constituída por cada vaso contendo oito plantas distribuídas de forma igualmente espaçada. Semanalmente, os vasos foram mudados de posição sobre a mesa, afim de casualizar possíveis efeitos de variações de temperatura e luminosidade na casa-de-vegetação.

3.4 Condução do experimento e determinações das variáveis de resposta

A semeadura das diferentes cultivares foi efetuada sobre papel “germitest” em caixas “gerbox”, e colocadas a germinar em condições ideais (09/10/02), conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Após a germinação as plântulas foram transplantadas (em casa-de-vegetação) para pequenos vasos de polietileno expandido, em um substrato em base de turfa onde passaram o número suficiente de dias para completar o desenvolvimento para o transplante aos vasos definitivos. Neste substrato as plantas foram inoculadas com uma solução de *Rhizobium trifolii* específico para trevo branco.

O transplante para os vasos foi realizado quando a maioria das plântulas atingiu um tamanho de radícula e parte aérea de cerca de 5 cm, o que ocorreu em 31/10/02.

Adicionou-se água em volume necessário para permitir uma adequada condição de umidade do solo para o transplante das plântulas. Uma vez finalizado o transplante, os vasos foram irrigados até completar a capacidade de campo. O nível de água no solo foi mantido próximo à capacidade de campo através de pesagens e reposição diária, de forma uniforme para todos os tratamentos até que se observou o início da emissão de estolões na maioria das plântulas. Após este momento, que ocorreu, em média em 02/12/02, iniciou-se a aplicação dos tratamentos S/D e C/D. Para a avaliação do conteúdo de água e para o cálculo da necessidade de reposição, os vasos foram pesados diariamente, e calculada a quantidade da água necessária para atingir o nível pretendido. Com estes valores se obteve o conteúdo médio diário de umidade e a evolução do mesmo ao longo do período experimental. O período de déficit hídrico foi mantido até 15/03/03, data a partir

da qual se aumentou a quantidade de água até o final do experimento (09/04/03). Isto foi realizado com o objetivo de manter as folhas estivessem túrgidas e sem enrolamento devido às características do equipamento para medir fotossíntese e transpiração. Portanto, ao final do experimento se estimou a recuperação do estresse nos tratamentos com déficit, que vinha sendo mantido durante o período de estresse hídrico (25 dias de recuperação), passando-se o conteúdo de água neste tratamento de 7% (ao final do estresse) a 12% o último dia.

3.4.1 Variáveis de resposta

As medições agronômicas realizadas durante o período experimental foram de três tipos: no solo como já foi descrito (evolução do conteúdo de umidade), morfológicas e produtivas (nos dois cortes realizados) e fisiológicas (ao final do período experimental). O primeiro corte foi realizado no dia 24/01/03 (a 86 dias do transplante), quando se efetuou a colheita da parte aérea de todas as plantas, deixando-se uma altura residual para o rebrote das plantas, de 3cm. Na segunda colheita, 75 dias depois do primeiro corte, ao final do experimento (09/04/03), os vasos foram desmanchados e as plantas foram separadas individualmente em folhas, estolões e raízes, separando estas últimas do solo mediante lavagem com água sob pressão e peneiras.

a) Variáveis morfológicas e produtivas

Nos dois cortes realizados foram obtidos os seguintes dados:

- Rendimento de forragem seca total e verde (nos 2 cortes)

- Peso seco de folhas em expansão, completamente expandidas, senescentes e mortas (nos 2 cortes)
- Peso de inflorescências (nos 2 cortes)
- Número de folhas verdes e número total de folhas (nos 2 cortes)
- Peso de estolões e raízes (no 2^o corte)
- Peso de material morto (nos 2 cortes)
- Peso de folhas em expansão (nos 2 cortes)
- Área foliar por vaso (no 2^o corte)
- Peso específico de folíolos (no 2^o corte)
- Superfície de folíolos (no 2^o corte)
- Relação raízes/parte aérea (no 2^o corte)
- Relação folhas/estolões (no 2^o corte)

A partir dos dados obtidos determinou-se:

- Biomassa total: massa de matéria seca aérea e subterrânea.
- Biomassa total viva: Biomassa total menos material morto.
- Biomassa aérea: massa de matéria seca aérea.
- Biomassa aérea viva: Biomassa aérea menos material aéreo morto

A medição da matéria seca de forragem e total produzida foi realizada ao final de cada colheita com base na massa de matéria seca de folhas, pecíolos, inflorescências (1^o e 2^o cortes) e estolões, raízes e nódulos (no 2^o corte), de todas as plantas por vaso, determinado em estufa com ar forçado a 60°C até peso constante.

O tamanho médio de folíolos e a área foliar para determinar peso específico de folhas foram determinados ao final do período experimental em planímetro ótico Li-Cor, modelo Li-3000, medindo-se 10 a 15 folíolos das últimas folhas verdes e completamente expandidas das oito plantas de cada unidade experimental. Estas folhas foram secadas em estufa a 60⁰C até peso constante e, com base na área medida e no peso seco das folhas correspondentes, determinou-se o seu peso específico. A divisão da área foliar total destes, pelo número total de folhas medidas, permitiu calcular o tamanho médio do folíolo. A área foliar por vaso foi calculada a partir do peso específico das folhas e o peso seco total de folhas por vaso.

c) Variáveis fisiológicas

As medições fisiológicas foram realizadas no dia 09/04/03 e incluíram taxa de fotossíntese, taxa de transpiração e condutância estomática utilizando-se um analisador IRGA Li-Cor 6400. As medições foram realizadas entre 8.30 e 11.00 horas utilizando-se três repetições de cada combinação de tratamentos (18 vasos), medindo-se duas folhas por vaso escolhidas aleatoriamente. A área de cada folha medida foi desenhada sobre papel, o qual foi cortado posteriormente para o cálculo da área fotossintetizante de cada folha utilizada. Desta forma foi possível ajustar os dados obtidos, já que as folhas de trevo branco apresentavam, em geral, menor tamanho do que a câmara de medição.

3.5. Índice de estresse.

Para todas as variáveis estudadas, determinou-se um índice de estresse, calculado como o quociente entre o valor da variável obtido em condições hídricas não limitantes (sem déficit hídrico) menos o valor obtido em condição limitante (com déficit hídrico) e o valor da variável em condições não limitantes (sem déficit hídrico), ou seja, $IE = (S/D - C/D)/SD$. Quanto maior o valor do índice menor o valor da variável no tratamento C/D em comparação com S/D.

3.6 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado para a análise de variância foi de tipo completamente casualizado, com 4 repetições. Os tratamentos foram arranjos num esquema fatorial 2 x 3, com dois níveis de água e três genótipos, totalizando 6 tratamentos.

Os dados referentes às variáveis morfológicas assim como das fisiológicas foram analisadas através de ANOVA e suas médias comparadas através de teste de LSD utilizando-se como níveis de significância $p < 0,01$, $p < 0,05$ ou $p < 0,10$, conforme a variável analisada. Todas as análises foram realizadas com auxílio do aplicativo SAS (SAS Institute, 1996).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Evolução do conteúdo de água no solo

Os valores de porcentagem de água gravimétrica no solo durante o período experimental são apresentados na Figura 1. Na média de todo o período, o conteúdo de água no solo foi 15,1 e 11,9%, respectivamente, para os tratamentos sem e com deficiência hídrica. Até 02/12/02 a quantidade de água aplicada foi a mesma para todos os vasos, para permitir um adequado desenvolvimento inicial das plantas. A partir desta data, passou-se a aplicar quantidades diferenciadas, para provocar as distintas condições hídricas, as quais, a partir daí até o final do período experimental, foram de 14,1 e 10,4% (p/p) de umidade do solo para S/D e C/D, respectivamente. Os valores da curva de umidade do solo utilizado (Apêndice 2), demonstram que o conteúdo de água na capacidade de campo (CC), definido por valores de sucção mátrica entre -0,01 MPa e -0,03 MPa estariam em torno de 18,4%. Segundo os mesmos dados, o ponto de murcha permanente (PMP), é atingido com -1,5 MPa, correspondendo a um conteúdo de água no solo de 9,06%. Desta forma, conforme os dados obtidos, o tratamento S/D se manteve, em média, a 77% da CC, enquanto o tratamento C/D manteve-se em torno de 57% da CC. Este último valor médio evidencia a severidade do estresse imposto, uma vez que o

valor de 10,4% representa o esgotamento de aproximadamente 89% da água disponível.

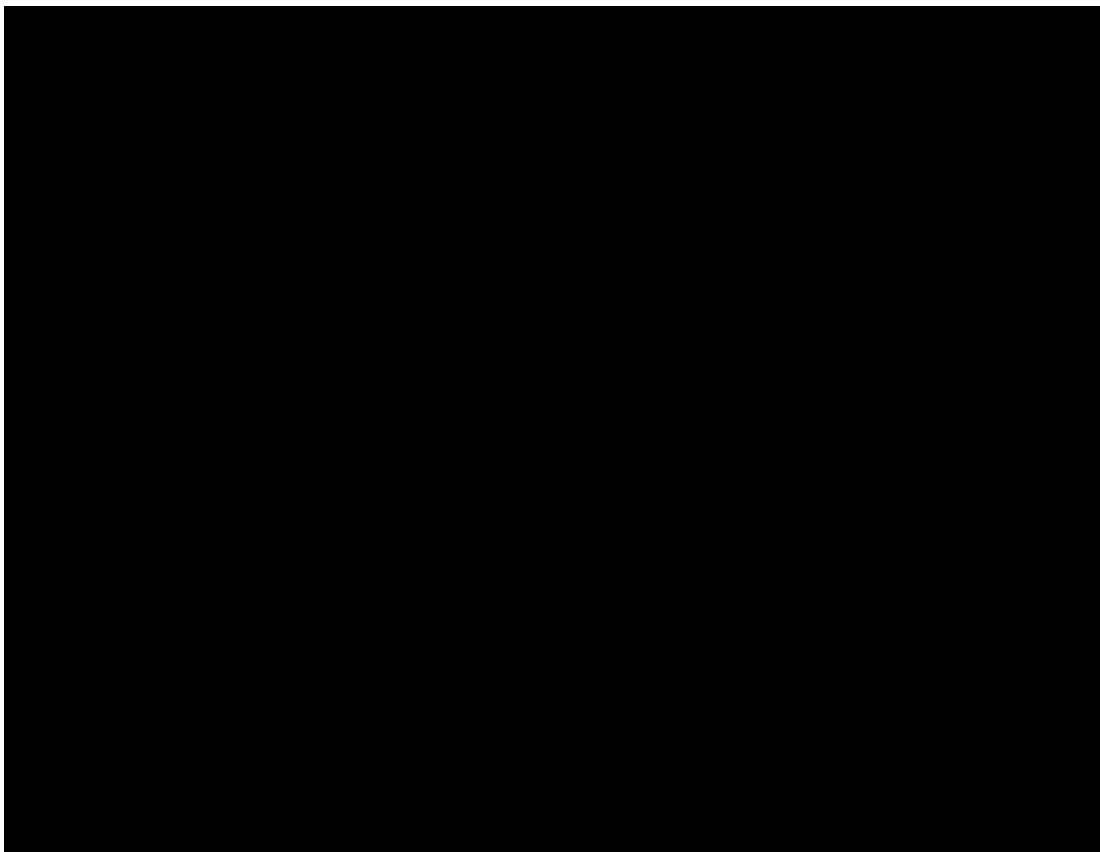


FIGURA 1. Evolução do conteúdo de água gravimétrica do solo durante o período experimental (31/10/02 a 09/04/03) (S/D sem déficit e C/D com déficit).

A evolução do conteúdo de água do tratamento C/D sofreu variações que determinaram diferenças na severidade do estresse. Ao final do período de avaliações, a partir de 15/03/03 até 09/04/03, o aumento imposto na disponibilidade de água determinou que o tratamento C/D tenha sofrido um relativo alívio do estresse, que se caracterizou por um aumento no conteúdo de água no solo de aproximadamente 60% (de 7,5% em 15/03/03 a 12% em 09/04/03). Em consequência, ao final do período experimental, o conteúdo de

água no solo dos dois tratamentos foi similar, embora também tenha concorrido para isto a alta evapotranspiração dos tratamentos S/D, os quais, em um dia diminuíram a umidade do solo de 15,2% em 08/04/03 a 12,4% em 09/04/03 (Figura 1). Este fato é importante de ser considerado quando se analisam as medidas realizadas no final do experimento, pois os resultados podem estar refletindo um apenas o efeito de recuperação ao estresse sofrido anteriormente.

4.2 Resposta das plantas ao conteúdo de água no solo

4.2.1 Matéria seca produzida durante todo o período experimental.

4.2.1.1 Biomassa total e biomassa total viva

A biomassa total produzida durante todo o experimento (31/10/02 a 09/04/03), inclui folhas verdes, folhas em expansão, folhas com sintomas de senescência, inflorescências, estolões, folhas mortas (biomassa aérea) e raízes na soma das duas avaliações realizadas. Para esta variável e para biomassa total viva e biomassa aérea viva se detectou um efeito significativo apenas do estresse hídrico, não se verificando diferenças entre genótipos nem interação entre estes fatores (Apêndices 3, 4 e 5). A Tabela 1 apresenta os efeitos da condição hídrica sobre a biomassa total viva, aérea viva e total, assim como o índice de estresse, independente do genótipo. O índice de estresse (IE) indica um efeito severo do déficit de água sobre o crescimento do trevo branco tanto para biomassa total como para biomassa total viva (0,61 e 0,63, respectivamente). Ou seja, a redução de biomassa como consequência

do estresse de água, foi de 61 e 63% para biomassa total e viva, respectivamente.

Embora sem significância estatística, no tratamento com déficit hídrico (C/D), verificou-se uma tendência de maior produção para os genótipos Sel.2 e Zapicán em comparação com Regal, sendo os valores de 26, 25 e 19 g MS/vaso, respectivamente. No tratamento sem déficit hídrico (S/D), os valores dos três genótipos foram praticamente idênticos (60, 61 e 60 g MS/vaso para Sel.2, Zapicán e Regal, respectivamente). Para biomassa total viva foi detectada tendência similar a favor dos genótipos Sel.2 e Zapicán no tratamento C/D, e maior IE que Regal.

TABELA 1. Efeito do déficit hídrico sobre a biomassa total, biomassa total viva e biomassa aérea viva, produzidas durante todo o experimento (31/10/02 a 09/04/03) e índice de estresse em trevo branco. Médias de três genótipos e soma de dois cortes.

Variável	Tratamento hídrico		
	Sem déficit	Com déficit	Índice de estresse
	Massa – g MS/vaso		
Biomassa total	60,35 a ¹	23,35 b	0,61
Biomassa total viva	51,97 a	19,20 b	0,63
Biomassa aérea viva	30,91 a	11,05 b	0,64

¹Valores na mesma linha, seguidos de distintas letras diferem significativamente entre si ($p < 0,01$).

4.2.1.2 Biomassa aérea viva (rendimento de forragem total)

A biomassa aérea viva corresponde o que se poderia considerar como forragem disponível (Tabela 1). Esta biomassa aérea viva produzida durante todo o período experimental somente foi afetada significativamente

pela deficiência hídrica. Os resultados obtidos não indicaram diferença entre genótipos nem interação destes com os níveis de água no solo (Apêndice 5).

O IE indica que esta variável resultou afetada na mesma proporção que a biomassa total (IE = 0,64). A causa da ausência de diferenças entre genótipos para estas variáveis durante todo o experimento, se explicaria, em parte, pelas condições em que foi realizado o experimento. Várias revisões sobre a metodologia destes trabalhos apresentam evidência do que em experimentos em casa-de-vegetação e com plantas em vasos, a velocidade do desenvolvimento do estresse hídrico é muito maior que em condições de campo, não dando tempo para a que as plantas possam desenvolver os mecanismos de tolerância (Turner e Begg, 1978; Jones, 1988). Isto é devido, em geral, ao pequeno volume de solo dos vasos, que associado a uma alta densidade de raízes (cm raiz/cm³ de solo), determina uma perda de água muito mais rápida que em condições de campo. Outro fator a levar em conta é a elevada temperatura durante o período experimental, e a interação com os níveis de água. Na casa-de-vegetação, na média de todo o período de déficit hídrico, a média das máximas absolutas diárias foi de 43,160C. O aumento da temperatura acima dos 300C afeta negativamente a fotossíntese das plantas C3 pelo aumento da fotorrespiração e estabilidade das membranas. Temperaturas ainda mais altas podem determinar a completa redução da assimilação do CO₂, reversível ou irreversível, conforme a planta sofra dano estrutural ou não (Larcher, 1995).

Além dos aspectos metodológicos descritos, a causa destes resultados é devida, provavelmente, ao tipo de desenvolvimento

morfofisiológico das plantas de trevo branco durante esta etapa de seu crescimento e desenvolvimento. Por um lado, se trata de uma espécie de lento crescimento inicial e, de acordo com vários estudos realizados no Uruguai e em outras regiões do mundo, o potencial de produção não se expressa durante o primeiro ano (Westbrooks e Tésar, 1955; García, 1996; Arana e Piñeiro, 1999), sendo o segundo ano o de maior potencial de produção. Além do mais, a data de semeadura reduz o período de crescimento do primeiro ano, em comparação com o segundo ano.

Neste sentido, García (1996), apresenta informação sobre a performance agrônômica de numerosos cultivares de trevo branco provenientes de distintas partes do mundo, de experimentos de avaliação realizados em La Estanzuela (Uruguai), durante 20 anos. Os dados demonstraram que na média de todos os materiais estudados, o rendimento de forragem do primeiro ano foi de 3,5 t MS/ha, enquanto que para o segundo ano este foi de 5,9 t MS/ha. Além disso, o desvio típico dos valores de rendimento foi de 0,87 t MS/ha e 1,42 t MS/ha para o primeiro e segundo ano, respectivamente, demonstrando que a variabilidade entre genótipos é sensivelmente menor no primeiro ano em comparação com o segundo.

O desenvolvimento morfofisiológico inicial das plantas de trevo branco determina que essas apresentem a estrutura de uma planta com raiz pivotante principal e formação de coroa (planta-mãe). Isto lhe confere maior tolerância à seca, em comparação com plantas mais desenvolvidas e que tenham perdido a raiz principal por morte da planta-mãe (devido a fatores fisiológicos nutricionais associados ao ataque de enfermidades fúngicas) e

dependem das raízes mais superficiais, que são geradas nos nós dos estolões da planta. Estas passam a ser as responsáveis pela absorção da água e manutenção do crescimento (Westbrooks e Tésar, 1955; Hollowel, 1960). Arana e Piñeiro (1999) postulam que, possivelmente, este seja o principal fator para explicar a boa sobrevivência estival de trevo branco durante o primeiro ano, no Uruguai.

Para esta estrutura radicular de plantas de primeiro ano (raiz pivotante), o estresse hídrico não seria tão limitante, em comparação com uma estrutura de planta exclusivamente estolonífera (segundo ano em diante). Como a sobrevivência das plantas-mãe é de aproximadamente um ano nas condições da região (Arana et al., 2000), este aspecto deve ser levado em conta em estudos de tolerância do trevo branco à deficiência hídrica. Neste sentido, nos estudos de Arana y Piñeiro (1999), os quais, avaliando dois genótipos contrastantes de trevo branco (cv. Zapicán e LE 2, linha de tipo ladino selecionada a partir da cultivar Regal para maior produção de sementes), não encontraram diferenças significativas entre os materiais, para rendimento de forragem no primeiro ano, tanto sob condições de déficit hídrico como sob condições de irrigação suplementar. A diferença de rendimento entre genótipos foi de 0,2% e 4% para déficit hídrico e irrigado, respectivamente. Entretanto, no segundo ano, o rendimento de LE 2 foi superior ao da cultivar Zapicán em 38% e 20%, respectivamente, para seco e irrigado. As diferenças de produção se produziram na primavera e verão do segundo ano, quando os estolões predominaram na pastagem. As diferenças entre cultivares foram atribuídas ao comportamento morfofisiológico da população de estolões já que

não foram detectadas diferenças demográficas entre os genótipos.

Os aspectos acima descritos explicariam a ausência de diferenças no rendimento entre genótipos, verificada no presente estudo (Figura 2). Sob condições de água não limitante, a ausência de diferenças entre genótipos indicaria que o potencial de rendimento dos mesmos no primeiro ano não difere muito.

Apesar de alguns trabalhos terem verificado diferenças entre genótipos com relação à tolerância ao déficit hídrico em etapas iniciais de crescimento (Barbour et al., 1996; Santiñaque, 2001), essas diferenças não seriam tão importantes como as que podem ser observadas no segundo ano, quando o mecanismo prioritário de persistência do trevo branco é a sobrevivência de seus estolões. Estes, por sua vez são os órgãos mais sensíveis à seca.

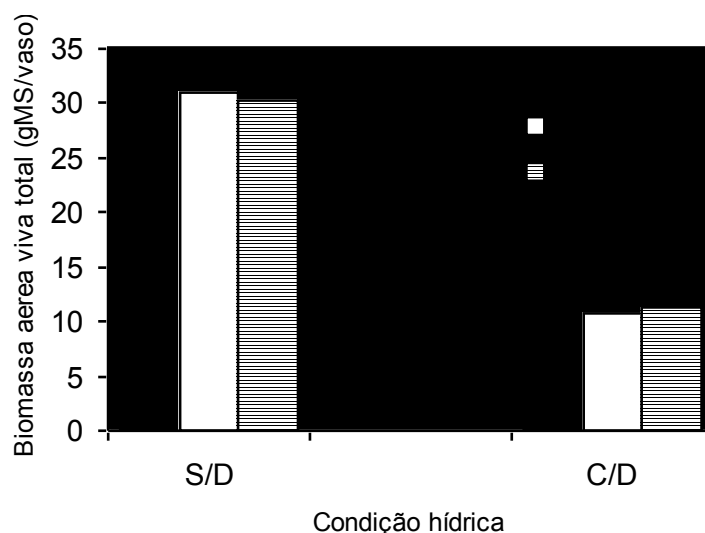


FIGURA 2. Biomassa aérea viva total por vaso, de três genótipos de trevo branco com (C/D) e sem (S/D) déficit hídrico, ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Histogramas com letras distintas dentro da mesma condição hídrica indicam diferenças significativas ($p < 0.01$)

4.2.2 Primeiro período de crescimento

4.2.2.1 Rendimento de matéria seca total e verde

O período inicial de crescimento compreende desde o transplante das plântulas para os vasos, até a primeira colheita (24/01/03), totalizando 86 dias. A partir de 02/12/02 até o primeiro corte, se realizou a aplicação dos tratamentos de irrigação diferencial determinando 55 dias com os tratamentos hídricos bem definidos (Figura 1). O estresse hídrico correspondeu, portanto, a 64% do período de crescimento.

O rendimento total (folhas verdes, inflorescências e folhas mortas), e o rendimento vivo (rendimento total menos folhas mortas) de trevo branco somente foram afetados pelos níveis de água no solo (Tabela 2 e Apêndices 6 e 7). Não se detectaram diferenças significativas entre genótipos nem interação entre estes e os níveis de água.

TABELA 2. Biomassa aérea, biomassa aérea viva e índice de estresse em trevo branco com e sem déficit hídrico, ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Médias de três genótipos.

Variável	Tratamento hídrico		Índice de estresse
	Sem déficit	Com déficit	
	Massa – g MS/vaso		
Biomassa aérea	11,74 a	5,40 b	0,54
Biomassa aérea viva	9,37 a	4,69 b	0,50

[†] Valores na mesma linha, seguidos de distintas letras diferem significativamente entre si ($p < 0,01$).

O índice de estresse (IE) demonstra que o rendimento sob déficit hídrico foi aproximadamente a metade daquele obtido nos tratamentos S/D

(0,54 e 0,50). Esta redução é menor que a detectada para o rendimento de forragem acumulado durante todo o período o qual teve um IE de 0,64 (Tabela 1). Para este primeiro período de crescimento é necessário salientar que o déficit ocorreu apenas durante 64% do tempo, uma vez que durante os 31 dias iniciais todos os tratamentos receberam a mesma quantidade de água, em níveis não limitantes.

4.2.2.2 Peso seco de folhas verdes, senescentes, mortas e inflorescências.

O peso seco de folhas verdes, senescentes e mortas foi afetado apenas pela condição hídrica do solo (Tabela 3). Não se detectou efeito significativo de genótipo nem da interação entre estes e a condição hídrica do solo (Apêndice 8).

TABELA 3. Peso seco de folhas verdes, folhas em senescência e folhas mortas, e índice de estresse em trevo branco com e sem déficit hídrico, ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Médias de três genótipos.

Variável	Tratamento hídrico		Índice de estresse
	Sem déficit	Com déficit	
	Massa – g MS/vaso		
Folhas verdes	5,29a	3,73b	0,29
Folhas senescentes	3,08a	0,88b	0,71
Folhas mortas	2,38a	0,71b	0,70
Total	10,75	5,32	0,49

¹Valores na mesma linha, seguidos de distintas letras diferem significativamente entre si (p<0,01)

Tanto no tratamento S/D como no C/D, o componente do rendimento correspondente a folhas verdes é o de maior contribuição no peso seco, especialmente no tratamento C/D. Em condições S/D as folhas verdes representam 49% do peso total de folhas enquanto as folhas senescentes correspondem a 29% e as folhas mortas a 22%. No tratamento C/D a contribuição de folhas verdes foi de 70%, enquanto que o de folhas senescentes foi de 17% e o de folhas mortas 13%. Os dados obtidos mostram que apesar das plantas de trevo branco terem reduzido o crescimento de folhas com o estresse hídrico, o componente folhas verdes foi o menos afetado, apresentando um IE = 0,29, enquanto para folhas em senescência e mortas o IE foi 0,71 e 0,70, respectivamente.

Neste sentido, para maximizar a utilização do meio, a planta estabelece uma hierarquia para a repartição do carbono fixado, entre os diferentes compartimentos que compõem a biomassa vegetal. Conforme Nabinger (1998), na ausência de limitações dos recursos temperatura, água, nitrogênio e luz a prioridade de alocação dos assimilados segue o seguinte sentido de maior para a menor prioridade: 1) folhas, 2) hastes, 3) ramificações, 4) raízes e reservas. Assim, na ocorrência de limitação de algum dos fatores que determinam diminuição na oferta de carbono, a intensidade de demanda de cada um dos compartimentos é alterada, priorizando-se os compartimentos mais baixos na linha de prioridade (raízes e reservas). Deste modo, aplicado a uma restrição hídrica, a mesma provocaria um aumento relativo na distribuição de assimilados em favor do crescimento das raízes como forma de aumentar o tamanho do mecanismo de captura deste recurso, enquanto diminui a emissão

de novas ramificações, a taxa de alongação foliar, a duração de vida da folha e, finalmente, a taxa de emissão de novas folhas. Este equilíbrio funcional na distribuição de assimilados entre os distintos órgãos das plantas em função dos recursos do meio ambiente tem sido relatado por numerosos autores (Davidson, 1978; Turner e Begg, 1978; Cornish, 1987; Jones, 1988; Morales et al., 1999). Embora, de acordo com o modelo descrito, em condições de limitação de algum fator do crescimento (temperatura, água, nitrogênio), a taxa de emissão de folhas por estolão seria o processo relativamente menos afetado da parte aérea da planta, em comparação com as hastes e ramificações. Na situação de deficiência a planta penaliza a alocação de assimilados para a formação da parte aérea, sobretudo das ramificações em favor das raízes (Nabinger, 1998). O maior crescimento relativo de raízes sob condições de restrição deste fator determina uma maior captura da "oferta" de água que será utilizada preferencialmente na expansão e crescimento foliar e, desta forma, minimizar o dano à fotossíntese da planta. Isto explicaria a baixa redução do peso de folhas verdes no tratamento C/D em relação ao S/D. Por outro lado, os dados obtidos são contraditórios com a evidência experimental que demonstra que à medida que o déficit de água aumenta, se reduz a área foliar pela aceleração da taxa de senescência das folhas fisiologicamente mais velhas e pelo seu desprendimento da planta. No entanto, há que se considerar que efeito deletério do nível de estresse hídrico seja, provavelmente, dependente da nutrição nitrogenada e do estágio de desenvolvimento da planta (Jones, 1988), além do suprimento de potássio (Shamsun-Noor et al., 1990). Estes últimos autores verificaram um forte efeito positivo do suprimento de

potássio sobre a atividade de redução do acetileno, o que determinou maior duração de vida das folhas sob condição de estresse hídrico.

Durante os meses quentes, qualquer estresse hídrico sobre as folhas seria rapidamente seguido por sua senescência e morte. Este mecanismo seria ou é a principal estratégia do trevo branco para evitar a perda de água por transpiração, dado que sua capacidade de controlar a mesma é inferior a outras espécies de leguminosas (Hart, 1987). A morte de folhas tem um efeito de regulação do índice de área foliar de acordo com a disponibilidade de água no solo durante os meses quentes e secos do ano. Isto pode ser inferido a partir dos resultados de Johns e Lazenby (1973), os quais verificaram valores de 20% de material morto nas pastagens de trevo branco irrigadas, contra mais de 70% nas pastagens não irrigadas. Os dados da Tabela 3 mostram que na condição sem déficit hídrico a porcentagem de folhas senescentes e mortas foi de 51%, enquanto na condição de déficit hídrico esta porcentagem alcançou 30%.

A interpretação das diferenças dos valores observados no presente trabalho, ao trabalho de Johns e Lazenby (1973), tanto na condição de déficit como sem déficit pode ser explicado pela diferença na intensidade do mesmo, por diferenças no estágio de desenvolvimento das plantas e pela prioridade das folhas na utilização dos assimilados em relação às hastes e ramificações. Além disso, outro fator que pode estar afetando a quantidade de folhas senescentes e mortas em ambos os tratamentos é o nível de biomassa aérea acumulada no dossel, que poderia ser maior no presente caso. Deste modo, a maior proporção de folhas mortas e senescentes no tratamento S/D poderia ser

devida ao excessivo crescimento de forragem, que provocaria uma diminuição na taxa de assimilação líquida devido ao auto-sombreamento de folhas, aumentando a taxa de senescência. Já no tratamento C/D, o menor desenvolvimento da área foliar não provocaria o efeito negativo mencionado.

Para o peso seco de inflorescências no primeiro corte, verificou-se diferença significativa dos níveis de água, dos genótipos e da interação água-genótipo (Figura 3 e Apêndice 8).

No tratamento S/D, os três genótipos apresentaram produções significativamente diferentes, sendo a cultivar Regal superior a Zapicán, o qual também foi superior à linhagem Sel. 2, que apresentou uma produção muito baixa. No tratamento C/D, o peso de inflorescências foi nulo para Zapicán, Sel. 2 manteve a mesma baixa produção, e Regal apresentou forte diminuição, embora ainda apresente alguma produção nestas condições.

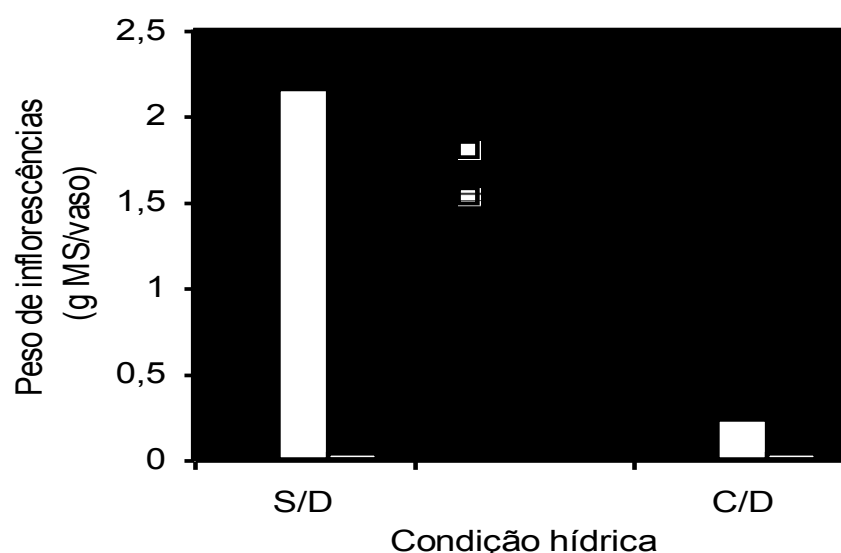


FIGURA 3. Peso seco de inflorescências de três genótipos de trevo branco com (C/D) e sem (S/D) déficit hídrico, ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Histogramas com letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0.01$)

As diferenças entre Regal y Zapicán com água não limitante, se explicam pelas diferenças fenológicas que determinariam diferentes épocas de floração destes materiais (mais tardia a cv. Regal), considerando o momento em que foi realizada a medição (24/01/03). Os baixos valores de peso de inflorescências da linhagem Sel. 2 podem ser atribuídos ao fato deste material constituir progênie de plantas (estolões) coletadas durante uma seca severa e prolongada, e que mostraram uma adaptação e sobrevivência por estolões e não por ressemeadura natural.

O déficit hídrico determinou uma marcada redução no peso de inflorescências dos cultivares Zapicán e Regal e a interação genótipo x água mostra que sob déficit hídrico não ocorreram diferenças significativas entre os genótipos. Isto ocorreu, provavelmente, porque a extrema sensibilidade desta variável reduziu de tal forma sua produção que os baixos valores e a alta variabilidade não permitiram detectar a significância das diferenças entre genótipos. Sob estresse hídrico, as cultivares Zapicán e Regal adotam uma estratégia de reduzir o dreno metabólico que representa o desenvolvimento da floração, para destinarem metabólicos a outros órgãos com funcionalidade mais importante para tolerar o déficit de água. Na ausência de limitação hídrica a produção de inflorescências se dá com detrimento da formação de novos estolões e, nesta época se produz um movimento unidireccional das reservas, as quais passam a mobilizar-se prioritariamente para as inflorescências (Carâmbula, 1977). Inversamente, sob déficit hídrico, estas estruturas deixam de ser prioritárias, redireccionando-se os metabólitos para a manutenção de raízes e sobrevivência dos estolões.

4.2.2.3 Número de folhas

Na Tabela 4 e Figuras 4 e 5 são apresentados os dados de número de folhas verdes e total por vaso correspondente ao primeiro corte. Para ambas variáveis se detectou um efeito significativo do estresse hídrico e dos genótipos, e não se detectou interação genótipo x água (Apêndice 9).

TABELA 4. Número de folhas verdes, número total de folhas e índice de estresse em trevo branco com e sem déficit hídrico, ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Médias de três genótipos.

Variável	Condição hídrica		
	Sem déficit	Com déficit	Índice de estresse
Massa – g MS/vaso			
Folhas verdes	151 a	118 b	0,22
Folhas totais	293 a	168 b	0,43

¹Valores na mesma linha, seguidos de distintas letras diferem significativamente entre si ($p < 0,01$).

O déficit hídrico provocou uma queda no número de folhas verdes e totais. O índice de estresse para folhas verdes foi menor que para folhas totais indicando que o número desta categoria de folhas foi menos afetado pelo déficit da água. Isto concorda com os dados para peso de folhas no primeiro corte (Tabela 3). O seja que além do peso total de folhas verdes por vaso, o número destas foi menos afetado pelo estresse hídrico. Provavelmente os elementos discutidos anteriormente em relação às prioridades de alocação de recursos em condições de limitação hídrica para as plantas de trevo branco, explique em parte estes resultados.

Observaram-se diferenças significativas entre genótipos para o número de folhas verdes e número total de folhas (Figuras 4 e 5 e Apêndice 9). Para ambas variáveis, os genótipos Zapicán e Sel. 2 mostraram maior número de folhas que o cv. Regal independentemente do nível de água.

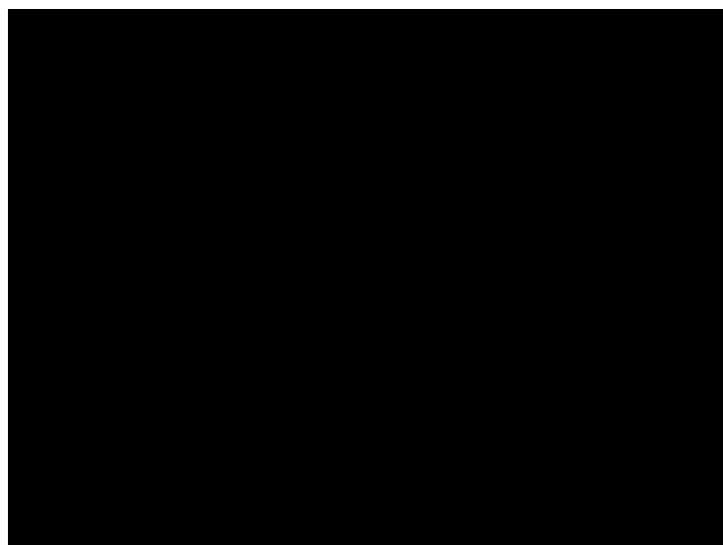


FIGURA 4. Número de folhas verdes por vaso, de três genótipos de trevo branco ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Médias de duas condições hídricas. Histogramas com letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0.05$)

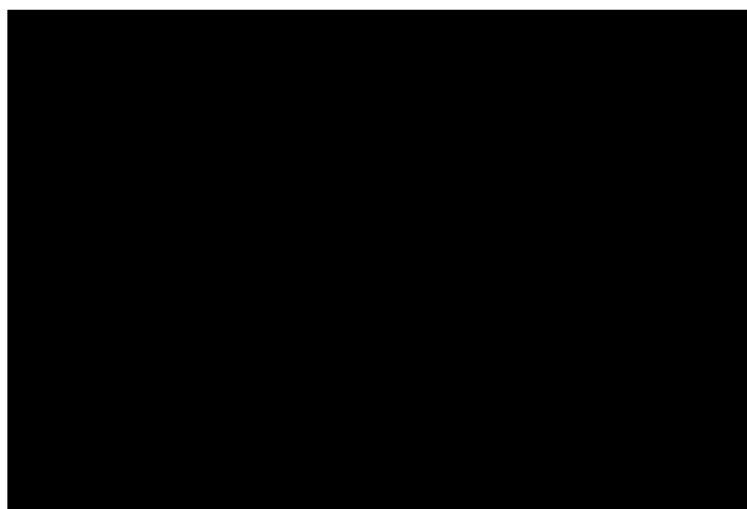


FIGURA 5. Número total de folhas de três genótipos de trevo branco com (C/D) e sem (C/D) déficit hídrico, ao final do primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03). Médias de duas condições hídricas. Histogramas com letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

4.2.3. Segundo período de crescimento (rebrotar)

Este período vai do primeiro corte (24/01/03) até o final do experimento, em 09/04/03, quando se realizou o segundo corte e as determinações destrutivas. Este período compreende 75 dias de crescimento. O tratamento C/D foi mantido até 15/03/03 (50 dias), correspondendo a 67% do segundo período já que nos últimos 25 dias o estresse foi aliviado.

4.2.3.1 Biomassa aérea e biomassa total

A biomassa aérea somente resultou afetada significativamente pelo nível de água no solo. Não foram detectados efeitos significativos dos genótipos nem da interação destes com os níveis de água no solo (Tabela 5 e Apêndice 10). O IE para esta variável foi de 0,64. Houve uma tendência no tratamento C/D de Zapicán e Sel. 2 produzirem maior biomassa aérea que Regal (11,30, 10,47 e 7,61 g MS/vaso para Zapicán, Sel. 2 e Regal, respectivamente).

TABELA 5. Efeito da condição hídrica do solo sobre a biomassa aérea (folhas, em expansão, estolões, inflorescências e material morto), biomassa total (biomassa aérea e raízes), biomassa total viva e índice de estresse (IE) no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.

Variável	Condição hídrica do solo		Índice de estresse
	Sem déficit	Com déficit	
	g MS/vaso		
Biomassa aérea	27,56 a ¹	9,79 b	0,64
Biomassa total	48,61 a	17,95 b	0,63
Biomassa total viva	42,60 a	14,51 b	0,66

¹Valores nas linhas, seguidos de distintas letras indicam diferenças significativas ($p < 0,01$).

A tendência entre os genótipos no tratamento C/D para biomassa aérea, se deveria às diferenças na quantidade de material morto entre eles (4,65, 3,94 e 1,72 g MS/vaso para Zapicán, Sel. 2 e Regal, respectivamente).

A biomassa total e biomassa total viva foram afetadas significativamente pelo nível de água no solo, e não se detectaram efeitos significativos dos genótipos nem da interação com água (Tabela 5 e Apêndices 10 e 11). Da mesma forma que para biomassa aérea, observou-se uma tendência, em condições de estresse hídrico, de maior peso seco de biomassa total e total viva para Zapicán e Sel.2 em comparação com Regal (20,10, 20,26 e 13,48 g MS/vaso na biomassa total e 15,46, 16,32 e 11,76 g MS/vaso na biomassa total viva para Zapicán, Sel. 2 e Regal, respectivamente). A magnitude das tendências é importante já que a diferença é da ordem de aproximadamente 30% mais biomassa para os genótipos Zapicán e Sel. 2.

4.2.3.2 Relação raízes/parte aérea

A relação raízes/parte aérea viva (folhas, folhas em expansão, estolões, inflorescências) foi afetada pelo nível de água no solo, detectando-se um aumento da relação com o déficit de água (Tabela 6 e Apêndice 11). O IE negativo indica o aumento desta relação em condições de déficit hídrico.

Foram verificadas importantes tendências quantitativas na relação raízes/parte aérea na condição de déficit hídrico. Nesta condição, Sel.2 e Zapicán tiveram maior relação raiz/parte aérea, em comparação com a cultivar Regal (1,31, 1,00 e 1,47 para Zapicán, Regal e Sel.2). Estas tendências se devem a diferenças no peso de raízes já que o peso da parte aérea viva foi

similar para os três genótipos (6,65, 6,53 e 5,88 g MS/vaso para Zapicán, Sel. 2 e Regal respectivamente). Conseqüentemente, quanto maior for a proliferação de raízes explorando o solo, maior será a absorção da água da planta. Isto pode determinar que a planta possa funcionar e sobreviver em menores potenciais de água no solo.

TABELA 6. Efeito da condição hídrica do solo sobre a relação raízes/parte aérea viva e índice de estresse, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.

Condição hídrica		
Sem déficit	Com déficit	Índice de estresse
Relação raízes/parte aérea viva		
0,99 a ¹	1,26 b	- 0,27

¹Valores seguidos de distintas letras diferem significativamente entre si ($p < 0,01$).

O aumento desta relação em condições de déficit hídrico é coerente com trabalhos que reportam mudanças na preferência da partição de assimilados para as raízes quando as plantas sofrem um estresse hídrico (Hsiao e Acevedo, 1974; Russell, 1977; Turner e Begg, 1978; Jones, 1988; Morales, 1999). O aumento na disponibilidade de assimilados devido à redução do tamanho do "dreno" na parte aérea permite o ajuste osmótico e crescimento extra das raízes (Hsiao e Acevedo, 1974; Jones, 1988). O crescimento preferencial das raízes, induzido por estresse hídrico pode constituir um mecanismo adaptativo já que é uma estratégia que depende do equilíbrio funcional entre a parte aérea e as raízes quando a fotossíntese é menos afetada pela seca (quando o estresse é leve ou está iniciando). Desta forma a planta prioriza o crescimento das raízes para aumentar o fornecimento de água

às folhas.

Segundo Angelocci (2002), a relação entre a área foliar e as dimensões do sistema radicular (densidade: cm raiz/cm³ do solo), como fator a afetar a transpiração é considerada mais importante do que a própria área foliar isoladamente, visto que há defasagem entre a absorção e a transpiração de água durante um dia. Se a relação área (ou densidade) de raízes - área foliar, for baixa, pode se desenvolver um déficit hídrico mais acentuado.

Em estudo em condições controladas, com vasos de tamanho similar aos deste trabalho, Santiñaque (2001), comparou, num período similar de crescimento, o comportamento dos cultivares Regal e Zapicán sob dois níveis de água no solo e dois manejos de desfolhação. Naquele estudo foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os genótipos em peso seco de raízes por vaso, produção de forragem estival e evapotranspiração (ET), independentemente do nível de água e do manejo da desfolha. Para Regal, na média dos níveis de água e de manejo, o peso seco de raízes foi 10 g MS/vaso, enquanto para Zapicán este foi de 8,8 g MS/vaso, ou seja, a cv. Regal produziu 14% mais peso de raízes que Zapicán. A produção de forragem de Regal foi 17,7 g MS/vaso e a de Zapicán foi de 13,0 g MS/vaso (+36%), entanto que a ET de Regal foi 6,70 mm/dia e a de Zapicán 6,25 mm/dia (+7% de ET diária). Além disso, foi detectada uma maior correlação entre peso de raízes e ET em condições de estresse hídrico ($r = 0,80$) do que entre produção de forragem e ET ($r=0,69$). Ou seja, que sob estresse hídrico, o peso de raízes foi o principal determinante da perda de água por ET. Sem déficit, tanto a produção de forragem como o peso de raízes tiveram altas correlações com ET

($r = 0,95$).

Estes dados seriam coerentes com as diferenças morfológicas entre cultivares de trevo branco de folha intermediária (Zapicán) e cultivares de tipo ladino (Regal) reportados na literatura (Caradus e Woodfield, 1997). Não obstante, existe contradição e carência de informação experimental sobre o comportamento fisiológico das relações hídricas de diferentes tipos de materiais de trevo branco que diferem em tipo de raízes e tamanho de folhas (Woodfield e Caradus, 1987; Barbour, et al. 1996; Annicchiarico e Piano, 2004).

Woodfield e Caradus (1987), reportam estudos prévios que mostraram uma forte correlação entre tipo de raízes e tipo de folhas, sendo que os genótipos com raízes predominantemente pivotante apresentaram folhas maiores do que os genótipos de raízes menores, não pivotantes e fibrosas. Estes autores demonstraram em um estudo preliminar que a correlação entre tamanho de parte aérea e raízes pode se alterar pela seleção natural. No trabalho dos referidos autores, populações coletadas em zonas secas ou que sobreviveram a um verão muito seco onde somente se havia semeado o cv. Grassland Huia, as plantas das populações mantiveram a estrutura radicular do cv. Huia, mas com folhas menores e menor rendimento de forragem. Os autores propõem que estes resultados poderiam ser utilizados pelos melhoristas para selecionar linhas com folhas pequenas a médias, com raízes pivotantes, mais profundas e freqüentes, para serem testadas em ambientes secos.

Em síntese, a relação R/PA por si não é uma característica que confira maior tolerância à seca em trevo branco. Uma alta relação R/PA pode

não ter demasiado valor para tolerar o déficit de água, pois, se o rendimento da parte aérea for muito elevado, a demanda da parte aérea por água também será elevada ainda que a planta tenha um amplo sistema radicular. Uma elevada relação R/PA com pouco crescimento de forragem durante o período de deficiência de água parece ser a estratégia mais adequada.

Os resultados aqui obtidos, que mostram uma tendência dos genótipos Zapicán e Sel. 2 apresentarem maior relação R/PA que a cv. Regal, ainda que à custa de maior redução da parte aérea necessita maior aprofundamento em futuros trabalhos. Neste sentido, espécies das pastagens nativas do Cone Sul, podem apresentar mecanismos ou estruturas que garantam sua sobrevivência às condições adversas como o déficit hídrico. Este pode ser, por exemplo, o caso de *Trifolium polymorphum*, que possui uma raiz pivotante profunda e com uma importante estrutura de reserva (xilopódio), além de mínimo ou nulo crescimento foliar durante a estação mais propícia ao estresse. No entanto, esta espécie tem como limitante seu baixo potencial de produção.

4.2.3.3 Produção de estolões e de raízes

O peso seco de estolões e o peso de raízes por vaso somente foram afetados pela condição hídrica. Não foram detectados efeitos de genótipos nem interação entre estes e a condição hídrica, para ambas as variáveis (Tabela 7 e Apêndice 12).

A massa de estolões no tratamento C/D diminuiu numa proporção de 0,62 em relação ao tratamento S/D. O déficit hídrico provoca a diminuição do

número de estolões por unidade de área em trevo branco (Archer e Robinson, 1989; Arana e Piñeiro, 1999). No entanto, no presente caso somente foi registrado o peso total de estolões por vaso sem mensuração de comprimento e diâmetro. Desta forma, pode-se apenas inferir que a diferença ou a falta dela em entre tratamentos (água e genótipos) possa ser devida a uma redução de crescimento em comprimento (número e tamanho de entrenós) e/ou em diâmetro. São, portanto, variáveis a considerar em trabalhos futuros.

TABELA 7. Efeito da condição hídrica do solo sobre a produção de estolões e de raízes, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.

Variável	Condição hídrica do solo		Índice de estresse
	Sem déficit	Com déficit	
	g MS/vaso		
Massa de estolões	7,97 a ¹	3,06 b	0,62
Massa de raízes	21,05 a	8,15 b	0,61

¹Valores nas linhas, seguidos de distintas letras diferem significativamente entre si ($p < 0,01$).

A massa de raízes por vaso também foi afetada somente pela condição hídrica do solo (Tabela 7). O IE reflete um efeito similar do estresse hídrico ao detectado para peso de estolões (0,62 e 0,61).

É importante destacar que apesar de não terem sido detectados efeitos significativos para genótipos e para sua interação com a condição hídrica, se observa tendência, sob condição de estresse hídrico, de maior peso de raízes em Zapicán e de Sel. 2, em comparação com Regal (8,80, 9,79 e

5,87 g MS/vaso, para Zapicán, Sel.2 e Regal, respectivamente). O peso seco de raízes pode, no entanto, não ser um bom estimador da fisiologia das raízes. Neste sentido, Santiñaque (dados não publicados), trabalhando com *Lotus corniculatus*, encontrou uma maior correlação entre o peso seco de raízes e a densidade (cm raiz/cm³ solo), em condições de estresse hídrico ($r=0,43$ sem déficit e $r = 0,89$ com déficit de água). Apesar de se ter verificado uma redução da massa de raízes sob déficit de água, é importante considerar que, provavelmente, estas explorem um maior volume de solo por unidade de massa de raiz que na a situação sem déficit. Por outro lado, apesar da redução na massa de raízes em condição de estresse, a relação raízes/parte área aumentou, indicando uma adaptação em termos funcionais, conforme discutido anteriormente.

Annicchiarico e Piano (2004) afirmam que a relação entre desenvolvimento de raízes e tolerância à seca, em trevo branco, é controversa. Assim, por exemplo, Caradus (1981) verificou que germoplasmas de folhas grandes, que possuem raízes mais desenvolvidas se comportaram relativamente melhor sob condições de seca do que materiais de folha intermédia em vários estudos, mas não em outros (Brock e Kim, 1994; Barbour, et al. 1996; Brink e Pedersen, 1998). Além disso, os distintos trabalhos mencionados comparam plantas de trevo branco de distintos cultivares no primeiro ano em alguns trabalhos (Barbour, et al. 1996; Brink e Pederson, 1998), e em estolões em estudos de mais longo prazo (Caradus, 1981; Brock e Kim, 1994), o que torna mais complexo o problema da interpretação dos diferentes estudos.

Em síntese, dos resultados obtidos no presente estudo (Tabela 7), a água foi o fator principal a modificar o peso seco de raízes, diminuindo consideravelmente em condições de deficiência, embora a redução da parte aérea viva de trevo branco (Tabela 5) tenha sido maior, o que determinou um aumento na relação raiz/parte aérea. Este mecanismo de adaptação concorda com o modelo descrito por Nabinger (1998), onde a ordem de prioridade para a alocação dos assimilados em condições limitantes, como foi o caso do estresse hídrico, é alterada em favor das raízes.

Apesar de que o presente trabalho não tenha detectado variabilidade significativa entre genótipos e, tampouco uma interação significativa destes com a condição hídrica, para esta variável, ainda assim, verificam-se tendências que mostram que os genótipos se comportam de maneira diferente. Em condição de déficit destaca-se a diferença no peso de raízes e na relação raízes/parte aérea a favor de Zapicán e Sel. 2, em comparação com a cv. Regal.

4.2.3.4 Peso de inflorescências

O peso de inflorescências neste período (Tabela 8) foi inferior ao obtido no primeiro período de crescimento (Figura 3), especialmente no tratamento C/D. Observou-se diferença significativa apenas para a condição hídrica, não se verificando efeito de sua interação com os genótipos (Apêndice 13).

A época correspondente ao segundo período caracterizou-se por temperaturas muito elevadas, que determinaram uma severa restrição à

expressão potencial de produção de inflorescências no tratamento com déficit hídrico e, praticamente não permitiu o florescimento no tratamento C/D. Além do mais, os dias mais curtos também contribuem para esta redução no florescimento, o que torna a análise desta variável de pouca importância nesta época do ano.

TABELA 8. Efeito da condição hídrica do solo sobre massa de inflorescências, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.

Condição hídrica		
Sem déficit	Com déficit	Índice de estresse
Massa de inflorescências (g MS/vaso)		
0,61 a ¹	0,011 b	0,98

¹Valores seguidos de letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,01$).

4.2.3.5 Material morto

O material morto total foi afetado apenas pela condição hídrica do solo, não se detectando efeito dos genótipos e, tampouco, da interação (Tabela 9 e Apêndice 12). A maior parte deste material corresponde à parte aérea das plantas, dada a dificuldade de separar adequadamente raízes funcionais daquelas mortas.

O peso seco de material morto diminuiu com o déficit hídrico, mas quando se considera a soma de folhas vivas (Tabela 13) e material morto no tratamento S/D, o peso total é 17,24 g MS/vaso e o percentual de material morto é de 35% enquanto no tratamento C/D o peso total é 6,24 g MS/vaso, com cerca de 55% de material morto.

TABELA 9. Efeito da condição hídrica do solo sobre massa seca de material morto, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.

Condição hídrica		
Sem déficit	Com déficit	Índice de estresse
Material morto (g MS/vaso)		
6,01 a ¹	3,44 b	0,43

¹Valores seguidos de distintas letras diferem significativamente entre si ($p < 0,01$).

O peso seco de material morto diminuiu com o déficit hídrico, mas quando se considera a soma de folhas vivas (Tabela 13) e material morto no tratamento S/D, o peso total é 17,24 g MS/vaso e o percentual de material morto é de 35% enquanto no tratamento C/D o peso total é 6,24 g MS/vaso, com cerca de 55% de material morto.

Isto é coerente com estudos realizados em trevo branco no qual a morte de folhas é um mecanismo muito importante para evitar a perda da água por transpiração (Johns e Lazenby, 1973; Hart, 1987). Johns e Lazenby (1973) propõem que a regulação da área foliar e não o comportamento estomático poderia ser o fator principal a prevenir a desidratação das plantas do trevo branco. Estas relações não foram verificadas no primeiro período de crescimento quando a porcentagem de material senescente e morto foi maior no tratamento S/D.

Observou-se uma tendência, sob condições de estresse hídrico, de maior massa de material morto em Zapicán e Sel. 2 em comparação com Regal. Destes resultados pode-se concluir que, sob estresse hídrico, apesar de haver menor massa de material morto, esta representa uma proporção maior do que sob condição de água não limitante, e isto poderia ser um dos

mecanismos que a espécie utilizaria para reduzir o gasto de água quando esta se torna limitante. Por outro lado, a partir das tendências verificadas, poder-se-ia a postular como hipótese, que esta resposta dependeria do genótipo e, como o peso de folhas vivas foi equivalente para os três materiais estudados, sob estresse hídrico Zapicán e Sel. 2 teriam maior porcentagem de material morto de que Regal.

4.2.3.6 Produção de folhas expandidas e em expansão

A produção de folhas vivas foi afetada somente pelo déficit de água. Não se detectou efeito significativo para genótipos nem para a interação destes com a condição hídrica (Tabela 10 e Apêndice14).

TABELA 10. Efeito da condição hídrica do solo sobre peso seco de folhas vivas, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.

Condição hídrica		
Sem déficit	Com déficit	Índice de estresse
Massa de folhas (g MS/vaso)		
11,23 a ¹	2,80 b	0,75

¹Valores seguidos de distintas letras diferem significativamente entre si ($p < 0,01$).

O índice de estresse demonstra que as folhas foram mais afetadas pelo déficit hídrico do que as raízes e estolões (Tabela 7). Para as folhas em expansão se detectou um efeito significativo da interação genótipo x água (Figura 6 e Apêndice15).

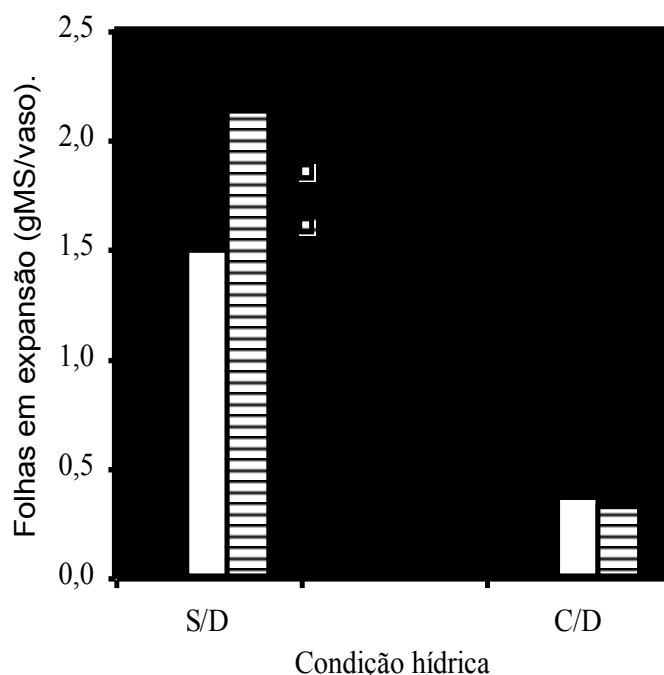


FIGURA 6. Peso seco de folhas em expansão de três genótipos de trevo branco com (C/D) e sem (S/D) déficit hídrico, ao final do rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Histogramas com letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0.01$)

Apesar da acentuada redução geral no peso de folhas em expansão provocada pelo déficit hídrico, os genótipos testados mostram respostas diferenciadas a esta variável. No tratamento S/D o genótipo Sel. 2 apresentou maior peso seco de folhas em expansão que Zapicán e Regal, mas em condições de estresse essas diferenças mudam e Sel. 2 e Regal apresentaram menor peso de folhas em expansão do que Zapicán. Isso indicaria que os genótipos que apresentaram menor massa de folhas em expansão sob estresse hídrico, ou seja, menor quantidade de tecidos em expansão, seriam os menos afetados (Regal e Sel.2), já que estes, como mecanismo de defesa, reduziram mais o peso de folhas em expansão com o déficit hídrico que o cv. Zapicán. Este genótipo mantém mais do que o dobro da massa de folhas em

expansão sob estresse hídrico em relação aos outros dois genótipos (Figura 6).

Regal e especialmente Sel. 2 (que apresentou maior quantidade de tecido em expansão no tratamento S/D), foram os que mais reduziram o peso de folhas em expansão quando foram submetidos a condições de déficit. Ou seja, o processo de diminuição da expansão foliar para reduzir a transpiração em condições de estresse hídrico foi mais efetivo nestes materiais em comparação com Zapicán que foi o cultivar que menos variou o peso de folhas em expansão (Figura 6). A diminuição do crescimento em extensão e do peso de folhas em expansão com o estresse pode ser atribuída à perda de turgidez (processo mais sensível quando se inicia o estresse).

O índice de estresse demonstra que as folhas foram mais afetadas pelo déficit hídrico do que as raízes e estolões (Tabelas 10 e 7). Isto concorda com o conceito que estabelece que com déficit de água a parte aérea das plantas se vê relativamente mais afetada que as raízes (Turner e Begg, 1978; Jones, 1988). Williams (1987) reporta resultados que demonstram uma alta correlação inversa entre rendimento colhível (predominantemente folhas) e peso de estolões em quatro cultivares de trevo branco sob diferentes manejos de desfolha e aporte de nitrogênio. No presente trabalho a proporção de raízes e de estolões em relação às folhas das plantas de trevo branco aumentou com o estresse hídrico.

4.2.3.7 Área foliar verde

A área foliar por vaso foi afetada significativamente pelos níveis de água e pelos genótipos (Figura 7 e Tabela 11), não se detectando interação

entre os fatores (Apêndice 16).

Os maiores níveis de área foliar por vaso em média dos tratamentos hídricos foram alcançados por Zapicán e Sel.2. O déficit hídrico afetou severamente a área foliar que apresentou um IE = 0,87 (Tabela 11).

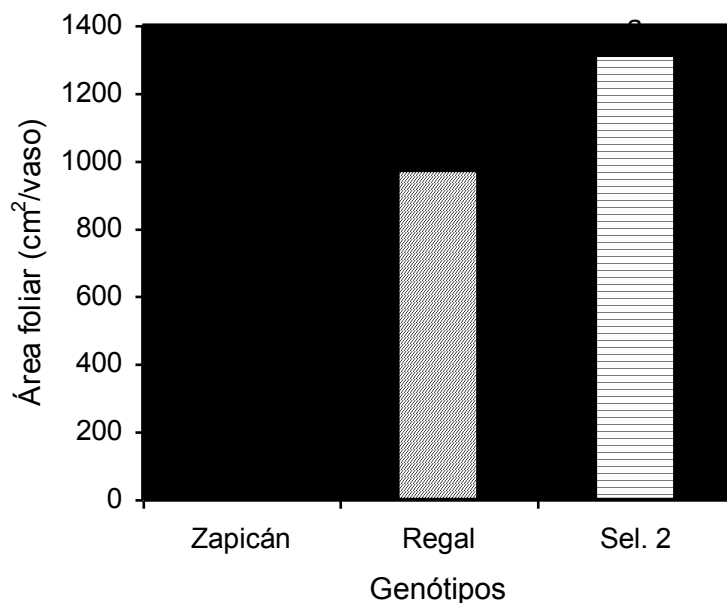


FIGURA 7. Área foliar por vaso de três genótipos trevo branco no segundo corte (24/01/03 a 09/04/03). Médias de duas condições hídricas. Histogramas com letras distintas são diferentes entre si ($P < 0,10$).

TABELA 11. Efeito da condição hídrica do solo sobre a área foliar por vaso, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.

Condição hídrica		
Sem déficit	Com déficit	Índice de estresse
Área foliar (cm ² folha/vaso)		
1900 a ¹	430 b	0.87

¹ Valores seguidos de distintas letras diferem significativamente entre si ($p < 0,01$).

A manutenção de área foliar durante períodos de estresse hídrico é uma característica de valor para qualquer planta e mais particularmente para o

trevo branco, já que indica certo grau de controle da transpiração e fotossíntese durante o déficit, e não apenas o mecanismo de senescência e morte de folhas, como regulador da transpiração. Neste sentido, Eagles et al., (1997) postulam que apesar de que todas as secas sejam únicas, pode-se considerar duas categorias básicas, que provocariam a manifestação dos respectivos mecanismos de adaptação das plantas forrageiras: a) secas moderadas ou espasmódicas, quando a chuva é variável de ano a ano, mas o déficit de umidade do solo é raramente suficientemente severo para matar a pastagem completamente (clima temperado marítimo) e, b) secas severas ou terminais, quando períodos de vários meses com zero ou quantidades triviais de chuva são comuns (climas mediterrâneos), e onde não há forragem disponível por longos períodos. Em relação ao primeiro tipo de seca, como as folhas são a principal parte econômica da planta, a condição hídrica da planta deve ser mantida, no mínimo, a um nível que permita algum grau de expansão foliar. Para fazer isto, as plantas devem possuir um vigoroso sistema radicular que explore os horizontes mais profundos do solo para absorver água. A profundidade de raízes por si só não conferiria às plantas maior resistência à seca, devendo-se também considerar a morfologia e tamanho da parte aérea, já que da relação entre ambas depende o balanço hídrico da planta. Segundo Eagles et al. (1997), uma limitação econômica da repartição de mais matéria seca para as raízes é que resta menos carbono disponível para produzir rendimento colhível. Mas isto não é necessariamente um problema para plantas forrageiras temperadas durante o verão, já que estas fixam geralmente mais carbono que o necessário para seu imediato crescimento e acumulam o

resto como frutanas (gramíneas) ou como amido (leguminosas). Isto é devido a que a que o processo da fotossíntese é muito menos sensível à seca que do o crescimento foliar, e depois de algumas semanas sem chuva os açúcares não consumidos começam a acumular-se. Para secas de tipo severo ou terminal a estratégia de sobrevivência das plantas é completamente diferente, passando o período seco em estado de dormência ou quase-dormência, mas com recuperação rápida assim que a chuva retorne. Em regiões subtropicais, como Uruguai e Rio Grande do Sul, as características das secas, muitas vezes, não correspondem com as características acima postuladas (Eagles et al., 1997), ocorrendo anos com secas de verão de tipo moderado e outros com secas de tipo severo. Além disso, existem solos com diferentes capacidades de acumulação da água disponível. Portanto, a situação é muito mais complexa e deve-se levar em consideração ambos tipos de mecanismos para definir um "modelo" de tolerância à seca nesta região, embora seja importante adicionar ainda ao modelo proposto, a capacidade de diferentes genótipos em manter área foliar verde sob condições de estresse hídrico.

4.2.3.8 Peso específico de folhas verdes

O peso específico de folhas verdes foi afetado significativamente pelos níveis de água, pelos genótipos e pela interação genótipo x água (Figura 8 e Apêndice 17).

Sem déficit de água Zapicán e Regal apresentaram folhas com maior peso específico do que Sel.2, enquanto que, com déficit hídrico, Regal e

Sel.2 produziram folhas com maior peso por unidade de superfície que Zapicán. Tanto Regal como Sel. 2 aumentaram o peso específico com o déficit hídrico: enquanto Regal incrementou 16%, Sel.2 aumentou 27%.

Larcher (1995) postulou a redução da transpiração como parte do mecanismo de sobrevivência ao déficit de água no solo. Neste sentido, uma adaptação modulativa é a fechamento dos estômatos. Uma mudança modificativa é quando as folhas crescendo em condições de deficiência da água desenvolvem estômatos mais pequenos, mas mais densamente distribuídos. As plantas genotipicamente adaptadas ao estresse hídrico têm folhas com as paredes das células da epiderme mais densamente cutinizadas, cobertas com camadas de cerosidade mais espessa e apresentam menor área foliar específica (cm^2/mg), [ou maior peso específico (mg/cm^2)]. Além disso, esta característica está relacionada positivamente com folhas de maior espessura e com mais parênquima paliçádico e uma maior capacidade fotossintética por unidade de área (Delaney e Dobrenz, 1974). Esta correlação está relacionada ao efeito peneira que provocam as células do parênquima paliçádico, que atuaria como canais de guia da luz (como nas fibras óticas) para permitir que mais luz atravessasse essas camadas. Deste modo, o arranjo destas células em colunas nesta camada de tecido em paliçada, reduzirá a quantidade de luz absorvida, permitindo que mais luz, especialmente luz vermelha e azul, alcance o tecido do parênquima esponjoso da folha (Sharkey, 1985). Este aumento do parênquima paliçádico e o efeito “peneira”, determinam que chegue mais luz na superfície das células do mesófilo (essencialmente interface ar - água), onde a luz se distribui mais facilmente

porque chega desde diversos ângulos passando por muito mais tecido antes de deixar a folha. Por esta razão a clorofila do tecido esponjoso do mesófilo tem maior absorvência relativa que a clorofila do tecido paliçádico (Sharkey, 1985; Angelocci, 2002).

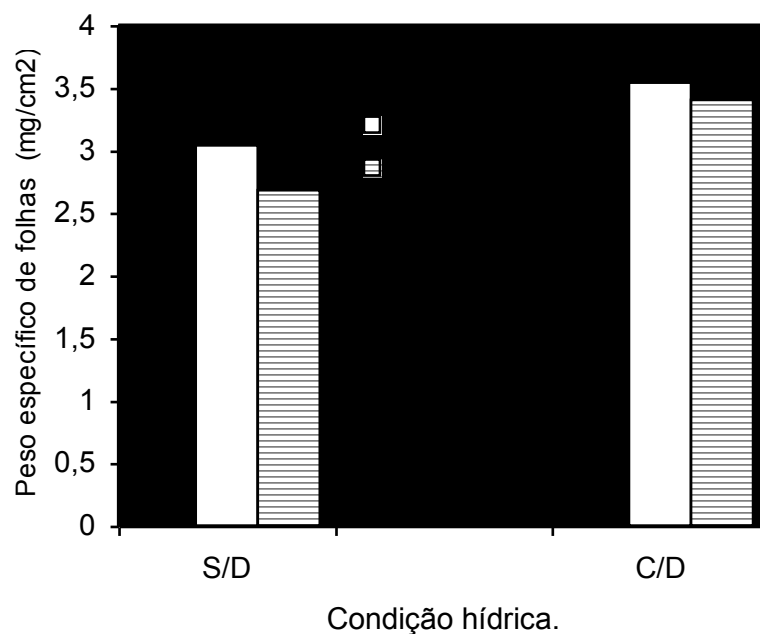


FIGURA 8. Peso específico de folhas verdes de trevo branco no segundo corte (24/01/03 a 09/04/03), com déficit (C/D) e sem déficit (S/D) hídrico. Médias de três genótipos. Histogramas com letras distintas são diferentes entre si ($P < 0.10$).

Angelocci (2002) comenta que a adaptação das folhas a ambientes secos determina que essas possuam mais camadas de células paliçádicas e se apresentam muito mais compactas tendendo a apresentar um sistema vascular mais desenvolvido e cutícula mais espessa. A maior economia de água destas adaptações manifesta-se em condições de déficit hídrico, quando os estômatos se fecham e as perdas de vapor d'água através da cutícula espessa se tornam desprezíveis.

Os dados obtidos demonstram que houve uma adaptação ao déficit de água, representada pelo aumento no peso específico das folhas nos genótipos Regal e Sel.2 (Figura 8). O aumento de peso específico com o déficit de água foi 27% e 16% para Sel.2 e Regal respectivamente, enquanto Zapicán não mostrou qualquer aumento nesta característica. A importância destes resultados não se restringe apenas ao valor desta variável como característica isolada para um genótipo, mas porque seu efeito é provavelmente somado ao de outras características que, como as diferenças em área foliar e o aumento da relação R/PA e do peso de raízes, demonstram a existência de variabilidade entre genótipos.

4.2.3.9 Tamanho de folíolos

Os distintos genótipos não apresentaram diferenças no tamanho médio dos folíolos, que somente foi afetado significativamente pela condição hídrica do solo (Tabela 12 e Apêndice 16).

TABELA 12. Efeito da condição hídrica do solo sobre tamanho médio dos folíolos, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.

Condição hídrica		
Sem déficit	Com déficit	Índice de estresse
Tamanho médio dos folíolos (cm ² /folíolo)		
2,65 a ¹	1,81 b	0,32

¹Valores seguidos de distintas letras diferem significativamente entre si (p < 0,01).

Isto indica que esta característica não se diferenciou, especialmente

entre Regal (tipo ladino) e os outros dois genótipos de folha intermediária. A principal causa para esta resposta está provavelmente ligada à forma como este dado foi obtido, ou seja, é uma média de todas as folhas vivas presentes por vaso, com exceção das folhas em expansão. Desta forma, folhas que se desenvolveram na sombra podem apresentar tamanho diferente e a proporção destas depende da condição do dossel, diferente para cada genótipo e para cada condição hídrica.

4.2.3.10 Número de folhas verdes

O número de folhas verdes por vaso foi afetado significativamente pelos níveis de água no solo e pelos genótipos, não ocorrendo interação entre os tratamentos (Tabela 13 e Apêndice 17).

Na média dos tratamentos de disponibilidade hídrica, o número de folhas verdes presentes ao final do período experimental foi maior para Sel.2 e Zapicán (Figura 9). Na falta de um acompanhamento da morfogênese, torna-se difícil atribuir estas diferenças a uma duração de vida das folhas diferente entre genótipos ou a uma maior densidade de fitômeros produzidos por vaso (número de estolões \times número de nós).

O estresse hídrico provocou uma diminuição no número de folhas verdes por vaso, indicando um índice de estresse de 0,67. Isto põe em evidência que o déficit de água reduz a capacidade de produzir estolões e/ou a taxa de emissão de folhas e sua duração de vida. Embora sem efeito significativo, analisando o comportamento sob estresse, o genótipo Sel.2 foi o que mostrou maior vantagem nesta variável.

TABELA 13. Efeito da condição hídrica do solo sobre o número de folhas verdes por vaso, no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.

Condição hídrica		
Sem déficit	Com déficit	Índice de estresse
Número de folhas verdes/vaso		
725,8 a ¹	237,2 b	0,67

¹ Valores seguidos de distintas letras diferem significativamente entre si ($p < 0,01$).

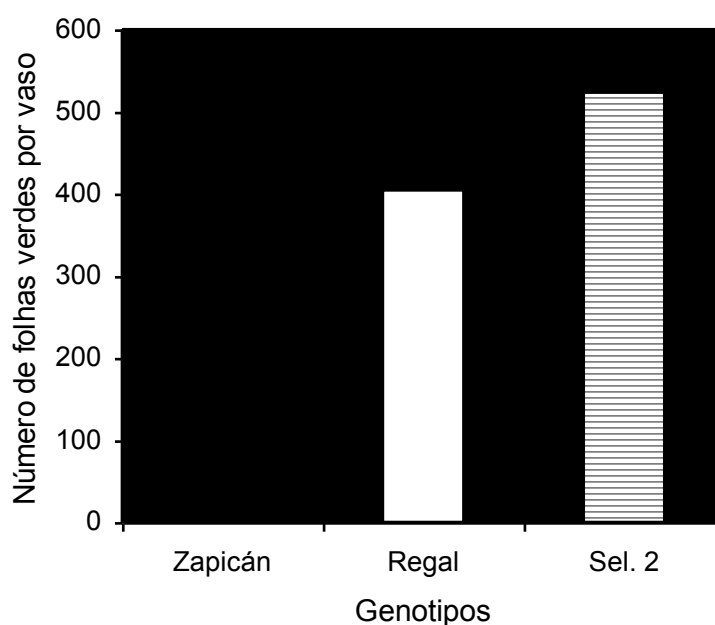


FIGURA 9. Número de folhas verdes por vaso de três genótipos de trevo branco no segundo corte (24/01/03 a 09/04/03). Médias de duas condições hídricas. Histogramas com letras distintas diferem entre si ($p < 0,10$).

4.2.3.11 Relação folhas/estolões

Para estudar a repartição de biomassa dentro da parte aérea, analisou-se a relação entre peso seco de folhas vivas incluindo aquelas em expansão, com o peso seco de estolões por vaso. Não houve interação entre

os fatores estudados (Apêndice 14), verificando-se efeito significativo do nível de água do solo (Tabela 14) e de genótipos (Figura 10) sobre esta variável.

TABELA 14. Efeito da disponibilidade de água no solo sobre a relação peso seco de folhas/peso seco de estolões por vaso de trevo branco, e índice de estresse no rebrote (24/01/03 a 09/04/03). Médias de três genótipos.

Condição hídrica		
Sem déficit	Com déficit	Índice de estresse
Relação folhas/estolões (g MS/vaso:g MS/vaso)		
1,66 a ¹	1,08 b	0,35

¹Valores seguidos de distintas letras indicam diferenças significativas ($p < 0,01$).

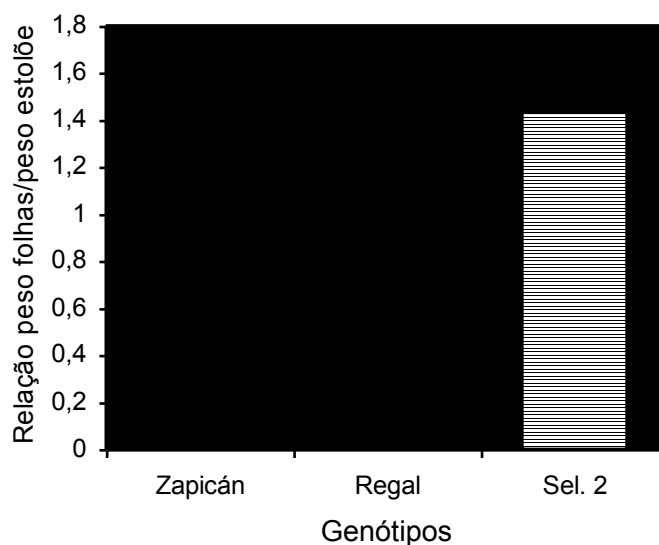


FIGURA 10. Relação peso seco de folhas/peso seco de estolões por vaso de três genótipos trevo branco, no segundo corte (24/01/03 a 09/04/03). Médias de duas condições hídricas. Histogramas com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0,05$).

Os genótipos Zapicán e Sel.2 tiveram maior relação folhas estolões em comparação com a cv. Regal. Além disso, apresentaram maior área foliar por vaso que a cultivar Regal.

É importante considerar que as medições destas variáveis foram feitas no final do experimento (09/04/03), depois de 25 dias de alívio do estresse hídrico (a partir do 15/03/03). Portanto, os resultados podem estar refletindo muito mais o grau de recuperação das plantas e não a condição das mesmas durante o período de déficit hídrico. Isto indicaria que, nestas condições, os genótipos Zapicán e Sel. 2 puderam realizar uma partição de assimilados mais favorável para recuperar a área foliar que Regal.

Em síntese, os genótipos Zapicán e Sel.2 apresentaram uma partição dos assimilados mais favorável para produzir área foliar, em relação com a massa de estolões, e provavelmente seja uma recuperação pós-estresse diferencial das folhas dos genótipos. É importante considerar conjuntamente, a tendência destes dois genótipos apresentar maior massa de raízes, em comparação com a cv. Regal.

4.2.3.12 Repostas fisiológicas: fotossíntese, transpiração e condutância estomática.

4.2.3.12.1 Fotossíntese por unidade de área foliar

É importante considerar novamente, que o momento da medição correspondeu a um aumento no conteúdo de água no solo no tratamento C/D (Figura 1), pelo que estes dados poderiam representar a recuperação dos genótipos ao estresse de água severo e prolongado que ocorreu durante a maior parte do período experimental (aproximadamente 4 meses).

A fotossíntese líquida por unidade de área de folha pós-estresse foi

afetada significativamente pelos níveis de água no solo, assim como pelos genótipos, mas também se verificou interação significativa entre ambos fatores (Figura 11 e Apêndice 18).

Sob condições hídricas não limitantes, Zapicán e Sel.2 tiveram maiores taxas fotossintéticas que Regal, enquanto no tratamento C/D Sel.2 e Regal apresentaram maior fotossíntese líquida por unidade de área de folha que Zapicán. Além disso, Regal não diminuiu a fotossíntese com o estresse de água, enquanto que Zapicán foi o genótipo mais afetado. Sel.2 mostrou uma situação mais estável neste aspecto.

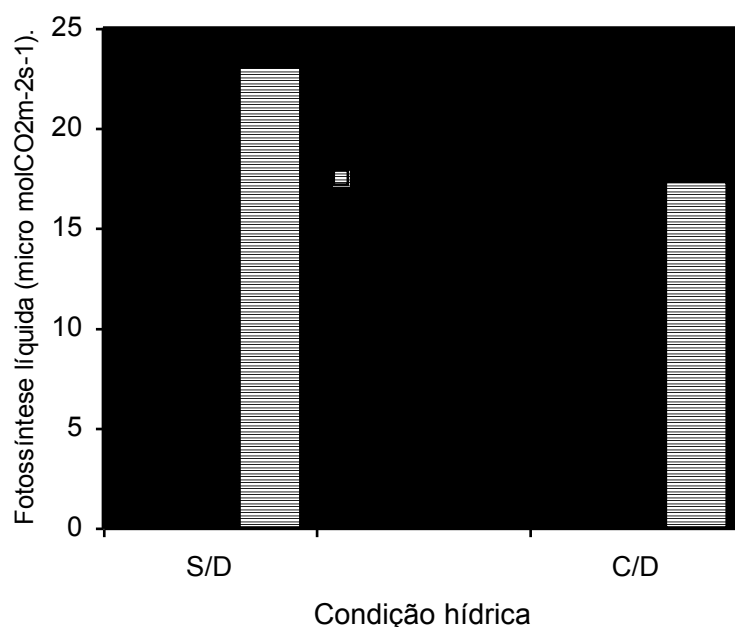


FIGURA 11. Fotossíntese líquida por unidade de área de folha de trevo branco, em dois níveis de água, (S/D sem déficit e C/D com déficit). Período 24/01/03 a 09/04/03, medição do 09/04/03. Histogramas com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0.10$).

Sob déficit hídrico os cultivares Regal e Sel.2 possuem o maior peso específico (Figura 8), desenvolvendo uma maior taxa de fotossíntese líquida. Foi realizado um análise de correlação e regressão entre peso específico e

fotossíntese líquida utilizando os dados dos três genótipos e suas repetições no tratamento C/D ($n = 9$), e não se detectou uma correlação significativa entre ambas variáveis ($r = 0,43$ N.S) nestas condições hídricas. É importante notar que os valores de fotossíntese, em média de genótipos, foram 15,14 e 20,30 $\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, o que denota relativamente pouca diferença entre as diferentes condições hídricas, e valores não muito baixos para plantas sofrendo déficit hídrico já que valores ótimos para plantas C3 estão na faixa de 20 - 25 $\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Nobel, 1991). Estes dados corroboram a afirmação acima, de que as medições feitas correspondem ao período de recuperação do estresse e mostra, possivelmente, diferenças na capacidade de recuperação dos genótipos ao déficit hídrico.

4.2.3.12.2 Transpiração e condutância estomática por unidade de área foliar

A transpiração e condutância estomática por unidade de área de folha somente foram afetadas pelo nível de água (Tabela 15 e Apêndice 18). Não se detectaram diferenças entre genótipos nem interação entre os fatores. A transpiração se reduziu com o estresse hídrico sendo o IE de 0,27 enquanto para a condutância estomática este indicador foi 0,48. No tratamento C/D se verificou uma tendência de maior transpiração (aproximadamente 43%) e maior condutância para os genótipos Sel.2 e Regal em comparação com Zapicán. Isto pode estar associado, em parte, à maior fotossíntese por unidade de área de folha destes dois genótipos sob estresse hídrico conforme fica demonstrado na Figura 11.

TABELA 15. Efeito da disponibilidade de água no solo sobre a transpiração e a condutância estomática de trevo branco e índice de estresse, no final do rebrote (09/04/03). Médias de três genótipos.

Condição hídrica		
Sem déficit	Com déficit	Índice de estresse
Transpiração (mmol H ₂ O.m ⁻² s ⁻¹)		
6,39 a ¹	4,68 b	0,27
Condutância estomática (mmol H ₂ O.m ⁻² s ⁻¹)		
610 a	320 b	0,48

¹Valores nas linhas, seguidos de distintas letras indicam diferenças significativas ($p < 0,10$ para transpiração e $p < 0,01$ para condutância estomática).

O coeficiente de regressão demonstrado pela análise de correlação e regressão entre os valores de peso específico e de transpiração para todos os dados do tratamento C/D ($n = 9$), foi $r = 0,60$ ($p < 0,05$). A relação positiva entre ambas variáveis indicaria ausência do déficit hídrico já que se houver estresse a relação entre peso específico e transpiração das folhas deveria ser negativa uma vez que o aumento do peso específico das folhas é uma adaptação para reduzir a perda de água durante o estresse (Larcher, 1995; Angelocci, 2002). Esta medição quantifica, possivelmente, o efeito residual do peso específico dos genótipos quando o estresse se alivia, e pode ser que as tendências de maior transpiração para Regal e Sel. 2 encontradas seja a consequência deste efeito residual do maior peso específico destes genótipos em comparação com Zapicán.

4.2.3.12.3 Eficiência de uso da água

Não foram encontradas diferenças significativas (Apêndice 20) na eficiência de uso de água (EUA = moles CO₂/moles H₂O) entre genótipos e tampouco para a condição hídrica ou sua interação, na medição realizada ao

final do experimento (09/04/03). Isto indica que a relação entre a fixação de carbono por fotossíntese e a perda de água por transpiração foi a mesma nos distintos tratamentos. Deve considerar-se, mais uma vez, que a medição não reflete todo o período de crescimento (24/01/03 al 09/04/03), mas se refere a um balanço "pontual" entre os fluxos durante a medição. De qualquer forma, seria de esperar uma maior EUA naqueles tratamentos com déficit hídrico, em comparação com os tratamentos sem déficit, devido a que o fechamento de estômatos reduz mais a perda de H₂O do que o fluxo de CO₂ para o interior das folhas (Taiz e Zeiger, 1998). Estes autores afirmam que o déficit hídrico afeta a condutância estomática e a atividade fotossintética na folha. Quando o estômato se fecha durante os estados iniciais do estresse hídrico, a EUA pode aumentar (mais CO₂ é absorvido por unidade de H₂O transpirada). Além disso, a desidratação das células do mesófilo inibe a fotossíntese. À medida que o estresse se torna mais severo, embora a EUA diminua, a inibição do metabolismo do mesófilo se faz mais severa. Embora, uma maior tolerância ao déficit hídrico não esteja sempre associada a uma maior EUA.

A melhora das condições hídricas a partir do 15/03/03 a 09/04/03 e a igualdade no conteúdo de água no solo nesta última data pode ter influenciado a ausência de diferenças de EUA entre tratamentos.

4.2.3.13 Fotossíntese, transpiração e eficiência de uso da água por vaso.

Os resultados obtidos mostram efeitos significativos da interação entre genótipo e condição hídrica (Apêndice 19), tanto para fotossíntese líquida

(Figura 12) como para transpiração (Figura 13).

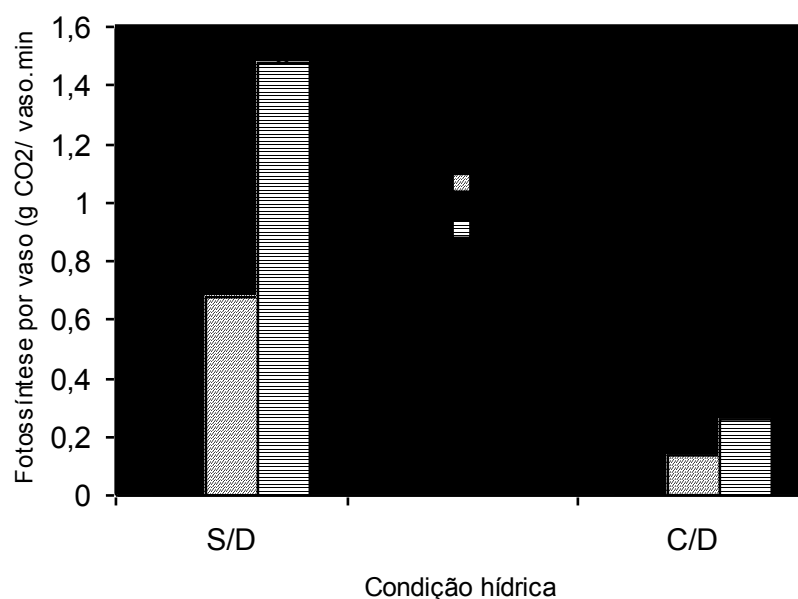


FIGURA 12. Fotossíntese líquida por vaso de três genótipos trevo branco, em duas condições hídricas do solo, (S/D sem déficit e C/D com déficit), ao final do rebrote (09/04/03). Histogramas com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0,01$)

A taxa de fotossíntese líquida diminuiu significativamente com o déficit hídrico, indicando que a severidade do mesmo foi importante e provocou a interação entre genótipos e a condição hídrica, já que a severidade do déficit (em média 80% de esgotamento da água disponível no solo), não permitiu que se expressassem possíveis diferenças entre genótipos. Na média dos genótipos, o déficit de água provocou uma diminuição na fotossíntese de 1,10 a 0,17 g CO₂/vaso/minuto. Ou seja, a relação entre o tratamento C/D e o S/D foi 0,85 (IE). Em condições de água não limitante, a maior fotossíntese ocorreu na Sel.2, Regal teve o menor valor e Zapicán ocupou um lugar intermediário entre ambos genótipos. A interação entre os fatores está dada neste caso porque o comportamento dos genótipos depende do nível da água e vice-versa. No nível

de água C/D não houve diferença significativa entre genótipos. Embora, se destaque o comportamento de Sel.2, o qual apresenta uma fotossíntese cerca de 50% maior que a média dos outros dois genótipos (Figura 12). Nos dados de transpiração por vaso o déficit hídrico provocou uma diminuição da transpiração de 1,41 a 0,23g H₂O/vaso/minuto. O IE indica a transpiração afetada tanto quanto a fotossíntese por vaso, apresentando um IE = 0,84.

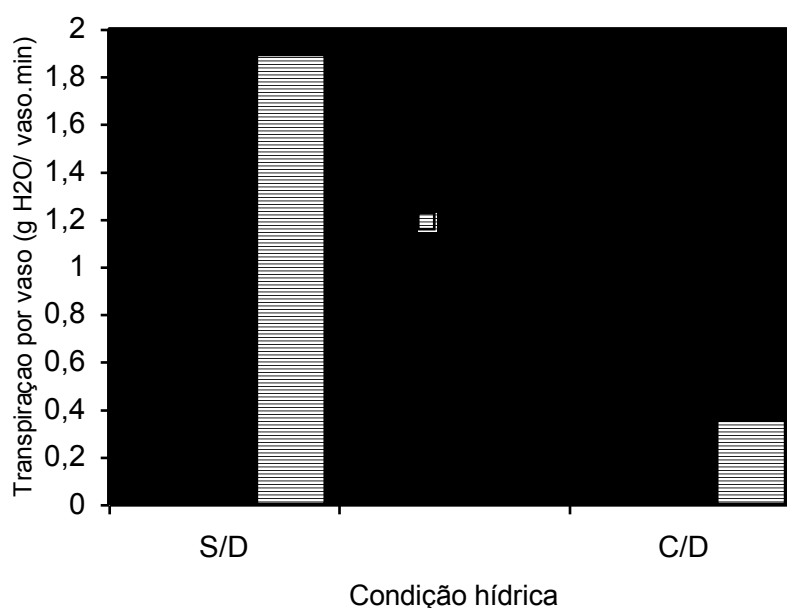


FIGURA 13. Transpiração por vaso de três genótipos de trevo branco, sob duas condições hídricas (S/D sem déficit e C/D com déficit), ao final do rebrote (09/04/03). Histogramas encimados por letras distintas são diferentes entre si ($p < 0.05$).

Da mesma forma que na fotossíntese, em condições hídricas não limitantes Sel.2 e Zapicán apresentaram maior transpiração, especialmente Sel.2, enquanto a cv. Regal foi o genótipo que apresentou menor transpiração. No tratamento C/D, apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas entre os genótipos, se destaca, da mesma forma que para fotossíntese, a tendência de Sel.2 apresentar maior transpiração, a qual quase

duplica em relação aos outros dois genótipos (Figura 13), sendo 53% maior que a média de Zapicán e Regal.

Não se detectou qualquer efeito significativo, seja dos genótipos seja da condição hídrica, sobre a eficiência de uso da água ($EUA = g\ CO_2/vaso/minuto$) (Apêndice 20).

Em síntese, Sel.2 e Regal realizam mais fotossíntese por vaso no tratamento de estresse hídrico que Zapicán, provavelmente devido ao maior peso específico da folha que lhes assegurou menor transpiração durante a deficiência hídrica. As vantagens de um maior peso específico da folha sobre a fotossíntese como um mecanismo para tolerar o déficit de água já foram discutidas quando tratamos os resultados obtidos com esta variável. Além disso, os dados obtidos mostram uma tendência para maior condutância estomática e transpiração sob déficit hídrico para Regal e Sel. 2, em comparação com Zapicán (4,94, 5,47 e 3,63 $mmol\ H_2O/m^2.s$ de transpiração para Regal, Sel. 2 e Zapicán respectivamente e 0,34, 0,38 e 0,25 $mmol\ H_2O/m^2s$ de condutância para Regal, Sel. 2 e Zapicán respectivamente) . A corroboração do que houve relação entre o peso específico durante o estresse e a recuperação dos genótipos ao final do período estaria dada pela correlação positiva e significativa verificada entre peso específico e transpiração no tratamento C/D.

Quando se considera a fotossíntese e transpiração por vaso, (Figuras 12 e 13), observa-se diferenças significativas entre genótipos apenas quando a água não foi limitante (interação genótipo x água significativa). A superioridade de Sel.2 se manteve sob estresse hídrico em comparação com

Zapicán e Regal mas não resultou significativa, apesar de ter sido quase o dobro para ambas variáveis.

A fotossíntese por vaso depende do produto da taxa de assimilação líquida (fotossíntese) e da superfície foliar. Neste sentido, os resultados obtidos mostraram uma maior área foliar para Sel.2 e Zapicán em comparação com Regal (Figura 7). Ou seja, apesar do Sel.2 ter apresentado maior taxa de fotossíntese por unidade de folha (da mesma forma que Regal) e maior área foliar (da mesma forma que Zapicán), a soma de ambos atributos não resultaram "suficientes" para que este genótipo apresentasse vantagens significativas na recuperação ao déficit hídrico do nível de fotossíntese e transpiração por vaso, ainda que os valores sejam sensivelmente superiores. No tratamento C/D no final do período experimental (pós-estresse), a recuperação da linhagem Sel.2 estaria mostrando este efeito aditivo de possuir os dois caracteres: a) maior fotossíntese por unidade de área e tendência de maior condutância estomática e transpiração por unidade de área de folha, da mesma forma que Regal e; b) maior área foliar e tendência a maior peso de raízes, da mesma forma que Zapicán. A maior área foliar de Sel.2 se deveria a diferenças na partição de matéria seca na parte aérea já que a relação folhas/estolões é significativamente maior para Sel.2 e Zapicán em comparação com Regal possivelmente devido a um maior crescimento foliar a partir do alívio do estresse já que o conteúdo de água do solo no tratamento C/D vinha aumentando desde o 15/03/03 (25 dias) (Figura 10).

Em síntese, resulta importante a identificação da característica "peso específico da folha", uma vez que a mesma poderia determinar maior tolerância

ao déficit hídrico em trevo branco, através da regulação da perda de água, sendo um atributo de fácil medição.

Além disso, caracteres relacionados com um maior exploração do solo pelas raízes e a manutenção de uma alta relação R/PA, seriam as principais características de importância que surgem deste estudo, que poderiam estar associadas à tolerância ao déficit hídrico em trevo branco.

5. CONCLUSÕES

A redução de biomassa total e aérea em função do déficit hídrico foi igual para os diferentes genótipos e foi mais acentuada no rebrote. Ainda assim, verifica-se que o déficit é percebido de forma diferente pelos genótipos o que permite concluir, com base nos dados deste trabalho, que a recuperação ao estresse hídrico dos diferentes genótipos esteve associado ao desenvolvimento de uma tolerância diferencial durante o déficit hídrico.

As principais adaptações estiveram relacionadas com um maior peso específico das folhas (em Regal e Sel. 2), para reduzir a perda d'água e possivelmente também com maior desenvolvimento de raízes e aumento na relação R/PA durante o estresse (se encontraram tendências a um maior valor para estas variáveis em Sel. 2 e Zapicán). A linhagem Sel. 2 teve vantagens em relação ao cv. Zapicán e ao cv. Regal, que pode estar relacionada com a sua tendência em duplicar a magnitude da fotossíntese e transpiração por vaso, relativamente a estes dois genótipos.

O peso específico das folhas depende do genótipo e aumenta com o déficit, sendo que Sel. 2 e Regal apresentam maior resposta enquanto a cv. Zapicán não responde. O maior peso específico durante o déficit hídrico pode ser a causa da melhor recuperação ao final do experimento quando se alivia o

estresse. Isto estaria demonstrado pela correlação significativa entre o peso específico de folhas e a transpiração por unidade de área de folha na condição de déficit hídrico.

Com base nos dados obtidos e na análise realizada, se conclui que um "modelo" de planta de trevo branco com maior tolerância à seca deveria apresentar durante o verão estolões com alta relação R/PA, e poucas folhas, com elevado peso específico (do tipo xeromórfico), para reduzir a perda de água por transpiração, mas mantendo esta função a um nível que permita evitar o aquecimento dos tecidos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resulta óbvia a importância de se realizar estudos em condições de campo e com plantas que perdurem mais do que o primeiro ano, de modo que a pastagem esteja constituída por estolões depois que as plantas mãe tenham desaparecido, e utilizando uma maior amplitude de variação de genótipos de trevo branco. Além disso, o potencial produtivo da espécie e, provavelmente, a maior variabilidade entre genótipos, se manifesta depois do primeiro ano.

A partir dos resultados obtidos pode-se propor como hipótese, um modelo de planta que possa apresentar, como principal característica, a capacidade de sobreviver vegetativamente às secas de verão, através dos estolões. Esta característica se basearia numa alta relação raiz/parte aérea, mas com folhas pequenas e com alto peso específico, com as vantagens assinaladas por Angelocci (2002) no que diz respeito à anatomia das folhas, e com baixo crescimento durante o verão, para minimizar as perdas de água por transpiração neste período, sem afetar o potencial de produção durante o resto do ano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELOCCI, L.R. Balanço hídrico da planta. In: ANGELOCCI, L.R. (Ed.) **Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera**: Introdução ao tratamento biofísico. Piracicaba: ESALQ/USP, 2002. p. 233-272.

ANNICCHIARICO, P; PIANO, E. Indirect selection for root development of white clover and implications for drought tolerance. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v.190, p.28-34, 2004.

ARANA, S.Y; PIÑEIRO, G. **Déficit hídrico y manejo, su influencia en la demografía y producción del trébol blanco**. 1999. 109 f. Monografía (Trabalho de Conclusão do Curso de Engenheiro Agrônomo) - Facultad de Agronomía, Universidade de la Republica del Uruguay, Montevideo, 1999.

ARANA, S.; PIÑEIRO, G. Riego y manejo en la productividad de pasturas con trébol blanco. In: INIA (ed.) **Jornada de trebol blanco**. Colonia, 2000. p.5-12. (Serie Actividades de Difusión, 241)

ARCHER, K.A.; ROBINSON, G.G. The role of stolons and seedlings in the persistence and production of white clover (*Trifolium repens* L. cv. Huia), in temperate pastures on the Northern Tablelands, New South Wales. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v.41, p.891-900, 1989.

BARBOUR, M.; CARADUS, J.R.; WOODFIELD, D.R. et al. Water stress and water use efficiency of ten white clover cultivars. **Grassland Research and Practice Series**, Palmerston North, v.6, p.159-162, 1996.

BARKER, D.J; CARADUS, J.R; McMANUS, M.T. Physiological responses of white clover genotypes to water deficit. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 17., 1993, Palmerston North. **Proceedings...** Palmerston North, 1993. p.67-68.

BARKER, D.J; CARADUS, J.R. Adaptation of forage species to drought. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, São Pedro, Brasil. **Proceedings...** Piracicaba, 2001. p.242-254.

BLAIKIE, S.J.; MARTIN, F.M. Limits to the productivity of irrigated pastures in south-east Australia. In: WHEELER, J.L.; PEARSON, C.J.; ROBARDS, G.E. (Eds.) **Temperate Pastures, their production, use and management**.

Melbourne: Australian Wool Corporation, 1987. p.119 - 122.

BLAIKIE, S.J.; MARTIN, F.M.; MASON, W.K. et al. Effects of soil water supply and temperature on the photosynthesis of white clover and *Paspalum* in irrigated pastures. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v.28, p.321-326, 1988.

BONO, L.; BERGAMASCHI, H.; ROSA, L.M. et al. Alterations in the pattern of stomatal responses to light in maize caused by water deficit. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.9, n.1, p. 27-34, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional da Defesa Agropecuária. Dept. Nacional Defesa Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.

BRINK, G.E.; PEDERSON, G.A. White clover response to a water-application gradient. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 771 - 775, 1998.

BRINK, G.E.; PEDERSON, G.A.; ALISON, M.W. et al. Growth of white clover ecotypes, cultivars and germplasms in the Southeastern USA. **Crop Science**, Madison, v.39, p.1809-1814, 1999.

BROCK, J.L.; KIM, M.C. Influence of stolon/soil surface interface and plant morphology on the survival of white clover during severe drought. **Proceedings of New Zealand Grassland Association**, Palmerston North, v.56, p.187-191, 1994.

CARADUS, J.R.; MACKAY, A.C.; WOODFIELD, D.R. et al. Classification of a world collection of white clover cultivars. **Euphitica**, New York, v.42, p.183-196, 1989.

CARADUS, J.R.; WILLIAMS, W.M. Breeding for legume persistence in New Zealand. In. TRILATERAL WORKSHOP, 1988, Honolulu. **Proceedings...** Hawaii, 1989. p.523-537.

CARADUS, J.R. The structure and function of white clover root systems. **Advances in agronomy**, Newark, v. 43, p.1-46, 1990.

CARADUS, J. R.; MACKAY, A.C.; CHARLTON, J.F.L. et al. Genecology of white clover (*Trifolium repens* L.) from wet and dry hill country pastures. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v.33, p.377-384, 1990.

CARADUS, J.R.; WOODFIELD, D.R. World checklist of white clover varieties II. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v.40, p.115-206, 1997.

CARAMBULA, M. **Producción y manejo de pasturas sembradas**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1977. 464 p.

CORNISH, P.S. Root growth and function in temperate pastures. In: WHEELER, J.L.; PEARSON, C.J.; ROBARDS, G.E. (Eds.) **Temperate pastures their production, use and management**. Melbourne: Australian Wool Corporation/CSIRO, 1987. p.79-92.

COX, L.M.; BOERSMA, L. Transpiration as a function of soil temperature and soil water stress. **Plant physiology**, Rockville, v. 42, p. 550 - 556, 1967.

DAVIDSON, R.L. Root systems - the forgotten component of pasture. In: WILSON, J.R. (Ed.) **Plant relations in pastures**. Melbourne: CSIRO, 1978. p.86-94,

DAVIES, W.J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual Review on Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.42, p.55-76, 1991.

DELANEY, R.H.; DOBRENZ, A.K. Morphological and anatomical features of alfalfa leaves as related to CO₂ exchange. **Crop Science**, Madison, v.14, p.444-447, 1974.

DÍAZ, J.E. **Estudios sobre la producción de forraje estacional y anual de leguminosas forrajeras**. 1995. 103 f. Monografía (Trabalho de Conclusão do Curso de Engenheiro Agrônomo) - Facultad de Agronomía, Universidade de la Republica del Uruguay, Montevideo, 1995.

EAGLES, C.F.; THOMAS, H.; VOLAIRE, F. et al. Stress physiology and crop improvement. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 18., 1997, Manitoba. **Proceedings...** Winnipeg: International Grassland Association, 1997. p.141-150.

ENNOS, R.A. The significance of genetic variation for root growth within a natural population of white clover (*Trifolium repens*). **Journal of Ecology**, London, v.73, p 615-624, 1985.

GARCÍA, J.A. Performance of white clover types in Uruguay. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 17., 1993, Palmerston North. **Proceedings...** Palmerston North, 1993. p.424-425.

GARCÍA J.A. **Variedades de trebol blanco**. Colonia: INIA La Estanzuela, 1996. 15 p. (Serie Técnica, 70)

HARRIS, W. Population dynamics and competition. In BAKER, M.J.; WILLIAMS, W.M. (Eds.) **White clover**. Wellington: CABI, 1987. p. 203-297.

HART, A.L. Physiology. In: BAKER, M.J.; WILLIAMS, W.M. (Eds.) **White clover**. Wellington: CABI, 1987. p.125-151.

HOLLOWELL, E.A. White clover, *Trifolium repens* L., annual or perennial? In.

INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 10., 1960, Helsinki. **Proceedings**.... Helsinki, 1960. p.184-187,

HSIAO, T.C.; ACEVEDO, E. Plant responses to water deficits, water - use efficiency, and drought resistance. **Agricultural Meteorology**, Orlando, v.14, p.59 - 84, 1974.

JOHNS, G.G.; LAZENBY, A. Defoliation, leaf area index, and the water use of four temperate pasture species under irrigated and dryland conditions. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v.24, p.783-95, 1973.

JONES, M.B. Water relations. In. JONES, M. B.; LAZENBY, A. (Eds.) **The grass crop**. London: Chapman and Hall, 1988. p. 205 – 241.

LARCHER, W. Carbon utilization and dry matter production In. LARCHER, W. (Ed.) **Physiological plant ecology**. Berlin: Springer Verlag, 1995. p.57-1665.

MAGALHAES, A.C. Fotossíntese. In. FERRI, M. (Ed.) **Fisiologia vegetal I**. São Paulo: EDUSP, 1985. p.117-116.

MATCHES, A.G. Root characteristics of legumes. In. TRILATERAL WORKSHOP, 1988, Honolulu. **Proceedings**... Hawaii: American Society of Agronomy, 1989. p.139-158.

NABINGER, C. Princípios de manejo e produtividade de pastagens. In: CICLO DE PALESTRAS EM PRODUÇÃO E MANEJO DE BOVINOS PARA CORTE. Manejo e Utilização Sustentável de Pastagens, 3., 1998, Canoas. **Anais**... Canoas, 1998. p.54-107.

NOBEL, P.S. Leaves and fluxes. In. NOBEL, P.S. (Ed.) **Physicochemical and environmental plant physiology**. New York: Academic Press, 1991. p.393-472.

PIANO, E.; ANNICCHIARICO, P. Persistence of ladino white clover ecotypes and its relationship with other agronomic traits. **Grass and Forage Science**, Gloucestershire, v.50, p.195-198, 1995.

PASSIOURA, J.B. Water collection by roots. In. PALEG, L.G.; ASPINALL, D. (Eds.) **The physiology and biochemistry of drought resistance in plants**. New York: Academic Press, 1981. p.39-53.

RUSSELL, R.S. **Plant Root Systems**: their function and interaction with the soil. New York: Mc Graw Hill, 1977. 298p.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. 4. ed. Belmont: Wadsworth, 1992. 682 p.

SANTIÑAQUE, F.H. Defoliation and water deficit: their influence on pasture

growth and water use of white clover. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., São Pedro, SP, Brasil. **Proceedings...** Piracicaba, 2001. p.58-59.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM – SAS. **SAS/STAT user's guide: statistics.** 4.ed. Version 6. Cary, 1996. v.2. 943p.

SCHULZE, E.D. Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and in the soil. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.37, p.247-274, 1986.

SCHULZE, E.D. Water and nutrient interactions with plant water stress. In. MOONEY, H.A.; WINNER, W.E.; PELL, E.J. (Eds.) **Responses of plant to multiple stresses.** San Diego: Academic Press, p.89-101, 1991.

SHARKEY, T.D. Photosynthesis in intact leaves of C3 plants: physics, physiology and rate limitations. **Botanical Review**, New York, v.51, p.53-105, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology.** 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 792p.

THOMAS, R.G. Vegetative growth and development. In: BARKER, M.J.; WILLIAMS, W.M. (Eds.) **White Clover.** Wallingford: CAB International, 1987. p.31-62.

TURNER, N.C.; BEGG, J.E. Responses of pasture plants to water deficits. In. WILSON, J.R. (Ed.) **Plant relation in pastures.** Melbourne: CSIRO, 1978. p.50-66.

WESTBROOKS, F.E.; TESAR, M.B. Tap root survival of ladino clover. **Agronomy Journal**, Madison, v. 47, p. 403-410, 1955.

WILLIAMS, W.M. Genetics and breeding. In. BAKER, M.J.; WILLIAMS, W.M. (Eds.) **White clover.** Wallingford: CABI, 1987. p.343-419.

WOODFIELD, D.R.; CARADUS, J.R. Adaptation of white clover to moisture stress. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, Palmerston North, v.48, p.143-149, 1987.

8. APÊNDICES

Apêndice 1. Resultado da análise do solo utilizado para o experimento.

Argila %	pH - H ₂ O	P mg /L	K mg /L	MO %	Al troc cm _g /L
35	5,7	7,8	182	3,1	0,0

Apêndice 2. Valores da curva característica de umidade do solo utilizado no experimento. Sucção mátrica em megapascal (MPa) vs percentagem de umidade gravimétrica (%U): 0 a 30 cm.

Sucção mátrica (Mpa)	0,007	0,01	0,03	0,04	0,07	0,10	0,40	0,90	1,50
Umidade gravimétrica (% U)	20,28	20,02	16,60	14,94	13,70	13,07	12,12	9,69	9,06

Apêndice 3. Dados originais de massa vegetal por vaso (g), utilizados nas análises de variância.

AGUA	GENOTIPO	REPET	Estolões	Raízes	Inflor	Mat Morto	fol e fol exp	Fol estol	Rend tot	Rend vivo	biomassa total	biom viva	Rend tot c1	Rend vivo c1	Rend vivo c1 + c2	RPA viva
1	1	1	8,5	26,9	2,1	8,6	14,9	1,7	34,1	25,5	60,9	52,3	11,5	9,8	35,3	1,1
1	1	2	5,8	23,2	0,4	3,8	12,3	2,1	22,3	18,5	45,5	41,7	10,8	8,6	27,1	1,3
1	1	3	8,3	12,8	1,2	6,4	10,7	1,3	26,6	20,2	39,4	33,0	12,9	10,9	31,1	0,6
1	1	4	7,4	23,5	0,2	4,2	16,1	2,2	28,0	23,7	51,4	47,2	11,3	8,9	32,6	1,0
1	2	1	8,6	31,2	0,8	3,2	10,7	1,2	23,3	20,1	54,5	51,3	12,7	10,3	30,4	1,5
1	2	2	6,9	11,1	0,9	6,9	10,0	1,5	24,7	17,8	35,8	28,9	13,1	10,1	27,9	0,6
1	2	3	9,9	15,0	0,3	6,7	13,1	1,3	30,1	23,4	45,1	38,4	11,2	9,2	32,6	0,6
1	2	4	9,2	21,8	0,7	10,6	13,6	1,5	34,2	23,6	56,0	45,4	12,1	9,6	33,2	0,9
1	3	1	8,3	23,7	0,3	5,5	16,1	1,9	30,2	24,8	53,9	48,4	10,3	8,1	32,9	1,0
1	3	2	8,9	21,0	0,0	9,6	15,9	1,8	34,3	24,8	55,3	45,8	10,2	8,2	33,0	0,8
1	3	3	8,2	23,4	0,0	3,9	10,9	1,3	23,0	19,1	46,4	42,5	11,7	8,7	27,8	1,2
1	3	4	5,7	19,3	0,3	2,6	11,2	2,0	19,7	17,2	39,0	36,5	13,1	10,0	27,2	1,1
2	1	1	2,5	5,9	0,0	6,5	2,5	1,0	11,5	5,0	17,4	10,9	5,5	4,5	9,5	1,2
2	1	2	2,3	8,2	0,0	4,0	3,7	1,6	10,0	6,0	18,2	14,2	6,0	5,0	11,0	1,4
2	1	3	3,8	12,5	0,0	5,1	5,2	1,3	14,1	9,0	26,6	21,5	4,3	3,8	12,8	1,4
2	1	4	3,1	8,6	0,0	2,9	3,5	1,1	9,6	6,6	18,1	15,2	5,2	4,7	11,3	1,3
2	2	1	3,5	6,9	0,0	1,5	2,7	0,8	7,8	6,3	14,7	13,2	5,7	5,1	11,4	1,1
2	2	2	3,5	6,1	0,0	1,5	2,8	0,8	7,8	6,3	13,9	12,4	4,7	4,2	10,5	1,0
2	2	3	3,3	5,3	0,0	2,1	2,7	0,8	8,1	6,0	13,4	11,3	5,5	5,0	11,0	0,9
2	2	4	2,4	5,2	0,0	1,7	2,6	1,1	6,7	5,0	11,9	10,1	6,2	5,1	10,1	1,0
2	3	1	3,4	7,7	0,0	3,1	4,5	1,3	10,9	7,9	18,6	15,5	6,1	5,2	13,1	1,0
2	3	2	3,2	17,1	0,0	5,4	4,5	1,4	13,2	7,7	30,2	24,8	5,4	4,8	12,5	2,2
2	3	3	2,6	5,0	0,0	4,5	2,3	0,9	9,4	4,9	14,4	9,8	4,6	4,1	9,0	1,0
2	3	4	3,2	9,4	0,1	2,7	2,4	0,7	8,4	5,7	17,8	15,1	5,6	4,8	10,5	1,7

Apêndice 3. Dados originais de massa vegetal por vaso, utilizados nas análises de variância (continuação).

AGUA	GENOTIP	REPET	Folhas	Folhas exp	Tot fol ver	Lamina foliar (gMS/vaso)	AFoliar	Pesp
1	1	1	13,424	1,430	14,854	6,377	0,207	3,08
1	1	2	10,718	1,576	12,294	5,18	0,176	2,94
1	1	3	9,498	1,238	10,736	4,824	0,157	3,07
1	1	4	13,999	2,074	16,073	6,597	0,233	2,83
1	2	1	9,197	1,525	10,722	4,321	0,142	3,05
1	2	2	8,536	1,489	10,025	4,016	0,134	2,99
1	2	3	11,799	1,327	13,126	5,697	0,186	3,07
1	2	4	11,982	1,633	13,615	5,519	0,180	3,06
1	3	1	13,897	2,184	16,081	6,744	0,263	2,56
1	3	2	12,903	2,980	15,883	6,303	0,227	2,78
1	3	3	9,142	1,786	10,928	5,321	0,206	2,58
1	3	4	9,626	1,568	11,194	4,691	0,167	2,81
2	1	1	2,041	0,469	2,510	1,179	0,039	3,01
2	1	2	2,461	1,215	3,676	1,118	0,035	3,24
2	1	3	4,325	0,830	5,155	2,268	0,087	2,62
2	1	4	2,954	0,574	3,528	1,307	0,042	3,09
2	2	1	2,518	0,220	2,738	1,186	0,036	3,29
2	2	2	2,323	0,453	2,776	1,148	0,032	3,57
2	2	3	2,307	0,399	2,706	1,173	0,031	3,84
2	2	4	2,243	0,354	2,597	1,162	0,034	3,44
2	3	1	4,157	0,341	4,498	1,996	0,049	4,06
2	3	2	4,329	0,219	4,548	2,248	0,076	2,95
2	3	3	1,842	0,425	2,267	0,908	0,025	3,69
2	3	4	2,097	0,295	2,392	1,034	0,036	2,91

Apêndice 4. Análise de variância para biomassa total (BT) acumulada no período experimental (31/10/02 a 09/04/03)

Causas de variação	GL	QM BT	P>F
Água	1	8215,88	< 0,0001
Genótipo	2	31,65	0,5008
AxG	2	26,09	0,5633
Erro	18	44,04	
CV		15,86	

Apêndice 5. Análise de variância para biomassa total viva (BTV), acumulada no período experimental (31/10/02 a 09/04/03)

Causas de variação	GL	QM BTV	P>F
Água	1	6440,48	< 0,0001
Genótipo	2	21,66	0,5832
AxG	2	5,23	0,8753
Erro	18	38,98	
CV		17,55	

Apêndice 6. Análise da variância para a biomassa aérea viva (BAV) acumulada no período experimental (31/10/02 a 09/04/03)

Causas de variação	GL	QM (BAT)	P>F
Água	1	2367,11	< 0,0001
Genótipo	2	0,81	0,865
AxG	2	1,27	0,797
Erro	18	5,54	
CV		11,21	

Apêndice 7. Análise de variância para biomassa aérea total (BAT), acumulada no primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03)

Causas de variação	GL	QM (BAT)	P>F
Água	1	241,30	< 0,0001
Genótipo	2	0,66	0,4442
AxG	2	1,36	0,6334
Erro	18	0,77	
CV		10,27	

Apêndice 8. Análise da variância para a biomassa aérea viva (BAV), acumulada no primeiro período de crescimento (31/10/02 a 24/01/03)

Causas de variação	GL	QM BA	P>F
Água	1	131,13	< 0,0001
Genótipo	2	0,69	0,247
AxG	2	0,64	0,272
Erro	18	0,46	
CV		9,61	

Apêndice 9. Análise da variância para biomassa (gMS/vaso) de folhas verdes (FV), folhas senescentes (FS), folhas mortas (FM) e inflorescências (I), no primeiro período (31/10/02 a 24/01/03).

Causas de variação	G L	QM FV	P>F	QM FS	P>F	QM FM	P>F	QM I	P>F
Água	1	14,73	< 0,0001	29,04	< 0,0001	16,67	< 0,0001	4,95	< 0,0001
Genótipo	2	0,69	0,31	0,30	0,39	0,11	0,45	2,82	< 0,0001
AxG	2	1,22	0,14	0,49	0,23	0,18	0,27	1,87	< 0,0001
Erro	18	0,55		0,30		0,13		0,12	
CV		16,38		27,62		23,19		63,13	

Apêndice 10. Análise da variância para número de folhas verdes (FV), senescentes (FS), mortas (FM) e (FT) por vaso no primeiro período (31/10/02 a 24/01/03).

Causas de variação	G L	QM FV	P>F	QM FS	P>F	QM FM	P>F	QM FT	P>F
Água	1	6534,0	0,0005	13442,66	< 0,0001	11837,04	< 0,0001	93375,38	< 0,0001
Genótipo	2	3655,04	0,0013	539,29	0,1536	87,79	0,5718	6267,79	0,0008
AxG	2	868,88	0,1244	264,54	0,3800	262,04	0,2070	435,37	0,4880
Erro	18	370,42		258,94		152,24		583,01	
CV		14,29		30,85		28,23		10,47	

Apêndice 11. Análise da variância para biomassa aérea total (BAT; folhas, estolões, inflorescências e folhas mortas) e biomassa aérea viva (BAV; BAT - folhas mortas), no segundo período de crescimento, 24/01/03 a 09/04/03.

Causas de variação	G L	QM BAT	P>F	QM BAV	P>F
Água	1	1892,95	< 0,0001	1383,96	< 0,0001
Genótipo	2	5,59	0,724	1,18	0,835
AxG	2	11,10	0,533	0,11	0,83
Erro	18	17,01		6,47	
CV		22,08		18,23	

Apêndice 12. Análise da variância para biomassa total (BT; Biomassa aérea total + biomassa de raízes) e relação raiz / parte aérea viva (R/PAv), no final do período experimental (09/04/03).

Causas de variação	G L	QM BT	P>F	QM R/PAv	P>F
Água	1	5641,16	< 0,0001	0,45	0,055
Genótipo	2	41,28	0,449	0,17	0,237
AxG	2	20,82	0,662	0,07	0,529
Erro	18	49,29		0,11	
CV		21,10		29,10	

Apêndice 13. Análise da variância para peso seco de estolões (E), raízes (R) e folhas mortas (FM) por vaso, no segundo período de crescimento, 24/01/03 a 09/04/03.

Causas de variação	G L	QM E	P>F	QM R	P>F	QM FM	P>F
Água	1	144,65	< 0,0001	998,54	< 0,0001	39,77	0,009
Genótipo	2	1,003	0,398	20,06	0,472	1,66	0,699
AxG	2	0,480	0,35	1,70	0,936	10,03	0,140
Erro	18	1,033		25,60		4,56	
CV		18,42		34,65		45,18	

Apêndice 14. Análise da variância para peso seco de inflorescências (I), no segundo período de crescimento, 24/01/03 a 09/04/03.

Causas de variação	GL	QM I	P>F
Água	1	2,15	0,001
Genótipo	2	0,31	0,1385
AxG	2	0,36	0,1040
Erro	18	0,14	
CV		120,11	

Apêndice 15. Análise da variância para peso seco de folhas vivas (FV), relação peso de folhas / peso de estolões (F/E), no segundo período de crescimento, 24/01/03 a 09/04/03.

Causas de variação	G L	QM FV	P>F	QM F/E	P>F
Água	1	562,02	< 0,0001	1,99	< 0,0001
Genótipo	2	4,20	0,305	0,38	0,018
AxG	2	0,44	0,876	0,01	0,86
Erro	18	3,31		0,08	
CV		22,40		20,10	

Apêndice 16. Análise da variância para peso seco de folhas em expansão (FE), no segundo período de crescimento, 24/01/03 a 09/04/03.

Causas de variação	GL	QM FE	P>F
Água	1	9,40	< 0,0001
Genótipo	2	0,21	0,1804
AxG	2	0,52	0,0220
Erro	18	0,11	
CV		29,87	

Apêndice 17. Análise da variância para tamanho de folíolo (TF), área foliar por vaso (AF), no final do período experimental (09/04/03)

Causas de variação	G L	QM TF	P>F	QM AF	P>F
Água	1	3,98	< 0,0001	0,129	< 0,0001
Genótipo	2	0,02	0,765	0,003	0,058
AxG	2	0,05	0,554	0,009	0,323
Erro	18	0,08		0,0008	
CV		12,52		23,53	

Apêndice 18. Análise da variância para peso específico de lâminas (PE) e número de folhas verdes (NºFV), no final do período experimental (09/04/03)

Causas de variação	G L	QM PE	P>F	G L	QM NºFV	P>F
Água	1	0,996	0,002	1	1385944,8	< 0,0001
Genótipo	2	0,208	0,100	2	37820,7	0,027
AxG	2	0,263	0,06	2	7079,7	0,449
Erro	18	0,08		17	8435,2	
CV		9,09			19,5	

Apêndice 19. Análise da variância para os resultados de fotossíntese líquida (FL), transpiração (T) e condutância estomática (g) por unidade de área de folha. Medição realizada no final do período experimental (09/04/03).

Causas de variação	G L	QM FL	P>F	QM T	P>F	QM g	P>F
Água	1	110,86	0,0006	12,13	0,063	0,345	0,003
Genótipo	2	22,90	0,033	2,70	0,415	0,01	0,641
AxG	2	22,13	0,035	2,74	0,410	0,029	0,320
Erro	11	4,82		2,83		0,023	
CV		12,61		30,96		33,35	

Apêndice 20. Análise da variância para os resultados de fotossíntese líquida (FLv) e transpiração (Tv) por vaso. Medição realizada no final do período experimental (09/04/03).

Causas de variação	G L	QM FLv	P>F	QM Tv	P>F
Água	1	3,523	< 0,0001	5,812	< 0,0001
Genótipo	2	0,278	< 0,0001	0,459	0,012
AxG	2	0,172	0,0002	0,259	0,055
Erro	11	0,009		0,068	
CV		16,10		34,55	

Apêndice 21. Análise da variância para os resultados de eficiência de uso da água por unidade de área de foliar (EUAF) e por vaso (EUAV). Medição realizada no final do período experimental (09/04/03).

Causas de variação	G L	QM EUAf	P>F	QM EUAV	P>F
Água	1	0,0002	0,88	0,0013	0,88
Genótipo	2	0,0008	0,91	0,005	0,91
AxG	2	0,0003	0,96	0,002	0,96
Erro	11	0,009		0,055	
CV		28,26		28,26	