

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA**

EVELINE NOGUEIRA LIMA

**ANÁLISE FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DE RESPOSTAS AO
ESTRESSE HÍDRICO EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.)
Walp.]**

**FORTALEZA
2017**

EVELINE NOGUEIRA LIMA

**ANÁLISE FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DE RESPOSTAS AO
ESTRESSE HÍDRICO EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.)
Walp.]**

Tese submetida à coordenação do Curso Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Agronomia/Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará.

Orientadora: Cândida Hermínia Campos de Magalhães
Bertini

Co-orientadora: Rosilene Oliveira Mesquita

**FORTALEZA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L697a Lima, Eveline Nogueira.
ANÁLISE FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DE RESPOSTAS AO ESTRESSE
HIDRICO EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI [Vigna unguiculata (L.) Walp.] / Eveline Nogueira Lima.
– 2017.
120 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Cândida Herminia Campos de Magalhães Bertini.
Coorientação: Profa. Dra. Rosilene Oliveira Mesquita.
1. PEG6000. 2. Screening Box. 3. Mecanismos de tolerância. 4. Espectrometria de massa. 5. Proteína. I.
Título.
-

CDD 630

EVELINE NOGUEIRA LIMA

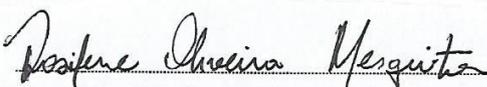
ANÁLISE FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DE RESPOSTAS AO ESTRESSE HÍDRICO EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.].

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Agronomia/Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará. Área de concentração: Melhoramento Vegetal

Aprovada em: 31/03/2017

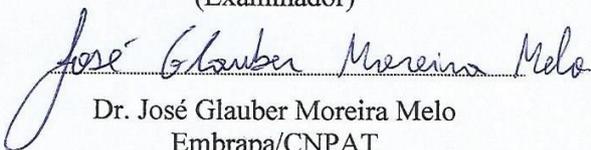
BANCA EXAMINADORA


Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini
Universidade Federal do Ceará
(Orientadora)


Dra. Rosilene Oliveira Mesquita
Universidade Federal do Ceará
(Co-Orientadora)


Dr. Enéas Gomes-Filho
Universidade Federal do Ceará
(Examinador)


Dr. José Hélio Costa
Universidade Federal do Ceará
(Examinador)


Dr. José Glauber Moreira Melo
Embrapa/CNPAT
(Examinador)

Primeiramente, a Deus, pela presença constante em minha vida, por guiar meus passos e fazendo-me instrumento de vossa vontade. Envia-me senhor!!

Aos meus pais Enilson (in memoriam) e Maria das Graças. Aos meus irmãos e sobrinhas, obrigada por encorajar, compreender os momentos difíceis e acreditar na minha vitória.

DEDICO

Ao meu amado esposo José Filho e minha amada filha Larissa Evelyn. Por todo o companheirismo, amor, paciência e dedicação. Dedico com muito amor e carinho a minha família que me faz tão feliz.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por está sempre presente na minha vida e por ter permitido mais essa vitória;

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade da realização do meu curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia.

As minhas orientadoras: Professora Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini pelo incentivo, apoio, paciência e pelos grandes ensinamentos transmitidos. Professora Rosilene Oliveira Mesquita desde o início desse trabalho, proporcionando-me todo o suporte técnico e científico necessários para sua execução. Agradeço igualmente as duas pela compreensão e confiança depositada em mim, que contribuíram para o sucesso do meu doutoramento.

Ao Prof. Enéas Gomes-Filho por ter cedido seu laboratório para realização deste trabalho e por aceitar participar da banca, dado sugestões para melhoria deste trabalho.

A Dra. Ana Cristina Oliveira Monteiro Moreira, pela grande colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Dr. José Glauber Moreira Melo e Dr. José Hélio Costa pelas valiosas sugestões e contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A professora Dra. Marina Lobo por me ajuda na realização das minhas análises podendo finalizar os resultados desta tese.

A Dra. Patrícia do Nascimento Bordallo, por muitas vezes ceder o laboratório e equipamentos do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria tropical, o muito obrigada.

Aos meus pais, Enilson Freitas de Lima e Maria das Graças Nogueira Lima aos quais dedico a conquista desse título, pelo amor incondicional e doação durante todas as fases da minha vida.

Ao meu esposo José Filho e filha Larissa Evelyn, ao qual ofereço essa conquista, por todo o sentimento de amor, fidelidade, respeito e incentivo que foram fundamentais para que juntos conquistássemos todos nossos objetivos profissionais e pessoais. Amo vocês!

Aos meus irmãos Elisângela, Enilton, Marta e Evilane amizade, amor incondicional e dedicação a nossa irmandade, permitindo-me participar diariamente de sua vida.

A todos os meus familiares pela força conjunta na busca pela união e felicidade da nossa grande e linda família.

As minhas sobrinhas, Vitória, Sophia e Ana Clara por trazerem a minha vida: a pureza, a paz e a doçura que necessito.

A todos meus amigos que juntos somam uma grande riqueza adquirida na minha vida. Em especial, as minhas amigas Ingrid, Paula, Maise, Claudiana, Natalia, Juliana, Emília, Edlene e Ancelita.

Os amigos da faculdade Elaine, Conceição, Joilson, Glauber, Francelino, Marcelo, e em especial Lilian e Kátia, Lilian por ter sido fundamental para elaboração do capítulo 2, e Kátia por sempre ajudar nos momentos que eu precisava.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal da Bioquímica, Rafael, Daniel, Lucas, Tiago, e em especial Carlos Eduardo que foi uma pessoa fundamental para a realização do capítulo 3 dessa tese e aos demais por terem paciência comigo, pelos conhecimentos compartilhados, e por toda a colaboração técnica e científica durante a execução deste trabalho e da minha vida acadêmica.

RESUMO

No presente trabalho foi realizado um estudo englobando fisiologia, bioquímica e proteômica no feijão-caupi, uma cultura de grande importância nutricional e econômica, principalmente para a região Nordeste. O objetivo geral do estudo foi de identificar mecanismos envolvidos na tolerância à seca no feijão-caupi utilizando as três abordagens. Para tanto, foram conduzidos três experimentos, dois em casa de vegetação e um em laboratório. No primeiro experimento o objetivo foi identificar genótipos de feijão-caupi tolerantes e suscetíveis ao déficit hídrico a nível de plântulas, utilizando-se de duas metodologias, estresse hídrico simulado com o uso de PEG6000 (Polietilenoglicol) e Screening Box. Os resultados demonstraram que as duas metodologias se mostraram eficientes na seleção de genótipos de feijão-caupi, sendo o genótipo Pingo de Ouro 1,2 tolerante ao déficit hídrico e o genótipo Santo Inácio Vermelho sensível. No segundo experimento o objetivo foi compreender os mecanismos de tolerância por meio da caracterização fisiológica e bioquímica para tolerância à seca em genótipos de feijão-caupi contrastantes para essa característica. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), num arranjo fatorial 4x2. Foram caracterizadas as respostas fisiológicas, como trocas gasosas, florescência da clorofila *a*, pigmentos fotossintéticos, danos de membrana pela peroxidação de lipídeos (MDA) e determinação de solutos orgânicos (Prolina, Carboidratos Solúveis e N-aminoácidos). Alguns mecanismos foram eficientes em evidenciar a tolerância do genótipo Pingo de Ouro 1,2, como a condutância estomática ao vapor d'água (gs), demonstrando eficiência no controle estômático; a razão da taxa de assimilação líquida e condutância estomática ao vapor d'água (A/g_s); a eficiência do uso da água (A/E), provando maior eficiência do uso desta no genótipo tolerante; a eficiência de carboxilação e a clorofila total que tiveram os seus valores recuperados quando o genótipo foi irrigado novamente após os quatro dias de déficit severo, demonstrando que este genótipo pode tolerar por mais tempo o período de seca. No terceiro experimento o objetivo foi identificar as proteínas diferencialmente expressas e as proteínas responsivas aos déficits hídricos nos genótipos contrastantes do experimento 2. As proteínas foram extraídas de folhas de feijão-caupi, dos tratamentos controle (irrigado), déficit moderado (-1,0 MPa) e déficit severo (-1,5 MPa), de cada genótipo tolerante e sensível ao déficit hídrico e foram analisadas pela 2D-SDS PAGE, usando espectrometria de massa na identificação das proteínas. Dentro de todas as comparações foram identificadas 108 proteínas diferencialmente expressas, dessas foram encontradas proteínas envolvidas em várias vias celulares que afetou os dois genótipos. Foram identificadas proteínas tanto no genótipo Pingo de Ouro 1,2 (tolerante) quanto no genótipo Santo Inácio Vermelho (sensível), podendo estas ser utilizadas como marcadores. Das proteínas que foram mais expressas entre os genótipos tem-se a subunidade maior ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, parcial (cloroplasto). Uma diferença encontrada entre os dois genótipos está relacionada a essa proteína. O genótipo sensível teve maior repressão dessa proteína, com isso pode-se sugerir que o genótipo tolerante possua mecanismo mais eficiente de escape à seca que o sensível. Os resultados mostram informações para compreensão das bases moleculares em relação à tolerância e sensibilidade do feijão-caupi sob déficit hídrico.

Palavras-chave: PEG6000, Screening Box, Mecanismos de tolerância, Espectrometria de massa, Proteínas.

ABSTRACT

A physiological, biochemistry and proteomic studies were conducted on cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], aiming to identify mechanisms involved in drought tolerance or susceptibility by using three different approaches. The importance of these studies is based on the fact that cowpea is a nutritional and economically crop cultivated mainly in the water deficient semiarid region of the Northeast of Brazil. Three experiments were conducted, two in a greenhouse and one in the laboratory. The objective of the first trial was to identify genotypes that were tolerant or susceptible to water deficit by using two approaches: (a) water deficit simulated by the use of PEG6000 (Polyethylene glycol) and (b) by Screening Box. The results of these trials revealed that the two methodologies were efficient to allowed the selection of cowpea “Pingo de Ouro 1,2” genotype as being tolerant to water deficit, while the “Santo Inácio Vermelho” genotype was found to be susceptible. The second trail aimed to look for understanding the mechanism underlying plants tolerant to drought by means of physiological and biochemistry characterization of drought tolerance in the contrasting genotypes susceptible. A completely randomized design (CRD) was used in a 4x2 factorial arrangement. The physiological responses, as measured by gas exchange, chlorophyll at the flowering stage, photosynthetic pigments, membrane damage by lipid peroxidation (DPL), and determination of organic solutes (Proline, Soluble Carbohydrates and N-amino acids) were characterized. Some mechanisms were effectives in identifying the “Pingo de Ouro 1,2” genotype tolerance to stomata conductance to water (gs). This observation showed the efficiency in the stomata control, the ratio of liquid assimilation rate and stomata conductance to stream (A/g_s), water use efficiency (A/E), providing greater efficiency of water use in the tolerant genotype. The carboxylation efficiency and the total chlorophyll that had their values recovered when the genotype was irrigated again after the four days of severe water deficit, which indicated that the mentioned genotype can tolerant a longer period of drought. The goals of the third trial were to identify the differentially expressed proteins and proteins responses to the water deficits in the experimental genotypes of the trial number 2. Proteins were extracted from leaves, while the control treatments irrigated show moderate water deficit (-1,0 MPa) and severe deficit (-1,5 MPa) of each tolerant and sensitive water deficit genotype were evaluated by 2D-SDS PAGE, using mass spectrometry for identification of proteins. Within all the comparisons, 108 differentially expressed proteins were identified that were involved in several cellular pathways that affected the two genotypes. Proteins were identified both in the tolerant “Pingo de Ouro 1,2” genotype as well as in the susceptible to water deficit “Santo Inácio Vermelho” genotype. The conclusion is that these genotypes could be used as markers. The proteins that were most expressed among the mentioned genotypes, was the subunit of major partial ribulose-1,5 biphosphate carboxylase/oxigenase, (chloroplast), and a difference was found between these proteins. Considering the described situation, it can be assumed that the tolerance has more efficient mechanisms of dry escape than the sensitive one. The results indicated information for understanding the molecular bases of tolerance and sensible cowpea genotypes under water deficit.

Key words: PEG6000, Screening Box, Mechanisms of tolerance, Mass spectrometry, Proteins.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1. A: Rolos de papel germiteste em Becker contendo as sementes dos genótipos para germinar; B: Saco de polietileno transparente perfurado com plântula de feijão-caupi.....35
- Figura 2. A: Caixa de madeira com bandeja plástica contendo a solução de PEG6000; B: Imagem do experimento mostrando suas repetições em casa de vegetação.....36
- Figura 3. A: Bandejas de plástico contendo substrato e plântulas; B: Orifícios equidistantes feitos em linhas retas.....37
- Figura 4. Comprimento da raiz do genótipo CNCX 251-76E submetido ao tratamento com PEG 6000.....39
- Figura 5. Comprimento das raízes dos genótipos CNCX 251-76E e Pingo de Ouro 1,2, submetidos ao tratamento água, respectivamente.....39
- Figura 6. Na figura demonstra o número de raízes laterais, números de verticilos e massa seca da raiz dos tratamentos com e sem PEG6000.....41
- Figura 7. Curva de murcha ao longo dos dias após a suspensão da irrigação do experimento de Box screening de 15 genótipos para tolerância à seca.....43

CAPÍTULO II

- Figura 1. Potencial Hídrico (MPa) dos genótipos de feijão-caupi, Santo Inácio Vermelho e Pingo de Ouro 1,2.....54
- Figura 2. Trocas Gasosas (taxa de assimilação líquida do CO₂ (A), condutância estomática ao vapor d'água (gs), taxa transpiratória (E) e concentração interna do CO₂ (Ci) dos genótipos de feijão-caupi, Santo Inácio Vermelho e Pingo de Ouro 1,2.....55
- Figura 3. Trocas Gasosas (razão da taxa de assimilação líquida e condutância estomática ao vapor d'água (A/g), eficiência instantânea do uso da água (A/E), razão interna e externa de carbono (razão Ci/Ca), e a eficiência instantânea de carboxilação pela razão (A/Ci.) dos cultivares de feijão-caupi, Santo Inácio Vermelho e Pingo de Ouro 1,2.....57
- Figura 4. Florescência: A) eficiência fotoquímica potencial do PSII (Fv/Fm); B) e a eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema 2 (φ PSII) dos genótipos de feijão-caupi, Santo Inácio Vermelho e Pingo de Ouro 1,2.....59
- Figura 5. Taxa de transporte de elétrons (ETR)60
- Figura 6. Teores de pigmentos em cultivares de feijão-caupi. Clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenóides (D)61

Figura 7: Teores de malondialdeído de feijão-caupi.....	63
Figura 8: Teores de Prolina de feijão-caupi.....	64
Figura 9: Teores de N-aminoácidos e Carboidratos Solúveis feijão-caupi.....	65

CAPÍTULO III

Figura 1. Proteínas de folhas de feijão-caupi com expressão diferencial no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) em relação ao genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) sob condições irrigadas (controle). As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com Coomassie coloidal.....	79
Figura 2. Classificação funcional de proteínas de folhas de feijão-caupi com expressão diferencial no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) em relação ao genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) sob condição irrigada.....	81
Figura 3. Classificação funcional de proteínas de folhas de feijão-caupi com expressão diferencial no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) em relação ao genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) sob condições de déficit moderado (-1,0 MPa)	82
Figura 4. Proteínas de folhas de feijão-caupi com expressão diferencial no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) em relação ao genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) sob condições moderada de déficit hídrico. As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com Coomassie coloidal.....	84
Figura 5. Classificação funcional de proteínas de folhas de feijão-caupi com expressão diferencial no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) em relação ao genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) sob condições de déficit severo (-1,5 MPa)	85
Figura 6. Proteínas de folhas de feijão-caupi com expressão diferencial no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) em relação ao genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) sob condição severa de déficit hídrico. As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com Coomassie coloidal.....	87
Figura 7. Diagrama de Venn de proteínas expressas diferencialmente do genótipo Pingo de Ouro 1,2 sob déficit hídrico em comparação com o controle.....	92
Figura 8. Classificação funcional das proteínas de feijão-caupi com expressão diferencial no cultivar tolerante (Pingo de Ouro 1,2) quando submetido ao deficit moderado (-1,0 MPa)	92
Figura 9. Classificação funcional das proteínas de feijão-caupi com expressão diferencial no cultivar tolerante (Pingo de Ouro 1,2) quando submetido ao déficit severo (-1,5 MPa)	93

Figura 10. Detalhe do spot 99 diferencialmente expresso sob déficit hídrico, os gráficos mostram os valores de % de volume em cada condição. Figura A, controle x Moderado, Figura B, controle x Severo.....	94
Figura 11. Detalhe do spot 115 diferencialmente expresso sob déficit hídrico, os gráficos mostram os valores de % de volume em cada condição. Figura A, controle x Moderado, Figura B, controle x Severo.....	96
Figura 12. Análise de diagramas de Venn de proteínas expressas diferencialmente do genótipo Santo Inácio Vermelho sob déficit hídrico em comparação com o controle.....	99
Figura 13. Classificação funcional das proteínas de feijão-caupi com expressão diferencial no cultivar sensível (Santo Inácio Vermelho) quando submetido ao déficit moderado (-1,0 MPa)	100
Figura 14. Classificação funcional das proteínas de feijão-caupi com expressão diferencial no cultivar tolerante (Santo Inácio Vermelho) quando submetido ao deficit severo (-1,5 MPa)	100
Figura 15. Detalhe dos spots 26, 100 e 115 [Subunidade maior Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, parcial (cloroplasto)], os gráficos mostram os valores da média % do volume + desvio padrão em condição de déficit hídrico moderado. Figura A: spot 26, irrigado x moderado, Figura B: spot 100, irrigado x moderado e Figura C: spot 115, irrigado x moderado.....	102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Descrição dos genótipos avaliados quanto à tolerância ao déficit hídrico.....	35
Tabela 2. Comprimento total (cm) das raízes aos cinco dias após a semeadura e submetidas ao tratamento com água e PEG.....	38
Tabela 3: Taxa de crescimento (cm dia ⁻¹) das plantas aos cinco dias após a semeadura e submetidas ao tratamento com água e PEG6000.....	40
Tabela 4: Plantas Murchas por dia.....	42

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-caupi nos genótipos contrastantes, através de análise por ESI-Q-TOF MS e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$	110
Tabela 2. Nível de expressão relativa das proteínas diferencialmente expressas ($P < 0,05$) baseada na média da % de volume em folhas de plantas contrastantes de feijão-caupi na ausência de déficit hídrico (controle), com sua identificação das proteínas por MS.....	80
Tabela 3. Nível de expressão relativa das proteínas diferencialmente expressas ($P < 0,05$) baseada na média da % de volume em folhas de plantas contrastantes de feijão-caupi sob estresse moderado (-1,0 MPa), com sua identificação das proteínas por MS.....	83
Tabela 4. Nível de expressão relativa das proteínas diferencialmente expressas ($P < 0,05$) baseada na média da % de volume em folhas de plantas contrastantes de feijão-caupi sob estresse severo (-1,5 MPa), com sua identificação das proteínas por MS.....	86
Tabela 5. Nível de expressão relativa das proteínas de folhas baseada na média da % de volume de plantas de feijão-caupi responsivas ao déficit hídrico moderado no genótipo tolerante.....	89
Tabela 6. Nível de expressão relativa das proteínas de folhas baseada na média da % de volume de plantas de feijão-caupi responsivas ao déficit hídrico severo no genótipo tolerante.....	91
Tabela 7. Nível de expressão relativa das proteínas de folhas baseada na média da % de volume de plantas de feijão-caupi responsivas ao déficit hídrico moderado no genótipo sensível.....	97
Tabela 8. Nível de expressão relativa das proteínas de folhas baseada na média da % de volume de plantas de feijão-caupi responsivas ao déficit hídrico severo no genótipo sensível.....	98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivos gerais:.....	18
2.2 Objetivos específicos:.....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Cultura do feijão-caupi.....	19
3.2 Parâmetros fisiológicos e o estresse hídrico.....	20
3.3 Identificação de biomarcadores.....	22
3.4 Tolerância do feijão-caupi ao déficit hídrico.....	24
4 REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 1	31
IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI TOLERANTES E SUSCETÍVEIS AO DÉFICIT HÍDRICO POR MEIO DE DUAS METODOLOGIAS	31
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	44
CAPÍTULO 2	47
CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO- CAUPI CONTRASTANTES PARA TOLERÂNCIA À SECA.....	47
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO.....	66

REFERÊNCIA	66
CAPITULO 3	71
PROTEÔMICA DIFERENCIAL EM FOLHAS DE GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE FEIJÃO-CAUPI SUBMETIDOS A DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS.....	71
INTRODUÇÃO.....	73
MATERIAL E MÉTODOS.....	75
RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS	104
ANEXO	109

1 INTRODUÇÃO

A população do planeta cresce em 83 milhões de pessoas por ano: um pouco mais do que o total dos habitantes da Alemanha. Caso essa tendência se mantenha, em 2050 já haverá nove bilhões de pessoas no mundo, e até o final do século serão mais de 10 bilhões (KINKARTZ, 2011). Além disso, o planeta passa por mudanças, tais como estagnação na produção de muitas espécies cultivadas, aparecimento de novos patógenos e insetos-praga, aumento da demanda por biocombustíveis, e estresse causado pela salinidade, seca e alagamentos que surgem como consequência das mudanças climáticas (MUTEIA, 2014). Tais mudanças requerem respostas imediatas quanto ao desenvolvimento de novos cultivares. Estes cultivares, por sua vez, devem apresentar altas produtividades garantindo a alimentação dessa população crescente e, ao mesmo tempo, serem adaptados às novas condições ambientais (KAVESKI, 2004).

Seca, alta salinidade, bem como baixas ou altas temperaturas se constituem em fatores severamente limitantes da produção vegetal. Quando tais estresses abióticos ocorrem, várias respostas bioquímicas e fisiológicas são induzidas nas plantas, de forma a propiciar a tolerância ou aumentar as chances de sobrevivência às condições adversas (BENKO-ISEPPON et al., 2011).

A seca pode ser considerada um dos mais importantes estresses ambientais que afeta a agricultura e muitos esforços têm sido realizados no sentido de melhorar cultivares quanto à produção sob condições de estresse hídrico. Nesse sentido, por mais de 80 anos alguns trabalhos de melhoramento genético resultaram em aumento da produção em ambientes sob estresse hídrico. O aumento da estabilidade na produção das espécies cultivadas sob diferentes condições de estresse é de importância estratégica para a garantia de alimento no futuro (CATIVELLI et al., 2008).

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é considerado uma cultura essencial em países em desenvolvimento da América Latina, África e Ásia onde é consumido como grãos secos, grãos verdes, vagens ou folhas. Devido ao seu alto teor de proteínas, vitaminas e minerais, o feijão-caupi é importante na alimentação humana e animal (SINGH et al., 1997). No Brasil, o feijão-caupi é cultivado predominantemente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Apesar de adaptadas às condições ambientais de cultivo, apresentam produtividade média de 922 kg ha⁻¹ (CONAB, 2016).

A deficiência hídrica é condição comum no Nordeste do País, sendo um dos fatores que comumente reduz a produtividade do feijão-caupi (MENDES et al., 2007). A região

semiárida do Nordeste brasileiro caracteriza-se por um ecossistema com reconhecidas limitações edafoclimáticas que afetam a produtividade da maioria das espécies cultivadas. A tolerância ao estresse hídrico é uma importante defesa da planta para manter a produção em condições de baixa disponibilidade de água, principalmente em áreas como o semiárido, onde a distribuição das chuvas é bastante irregular e os verões são extensos. Assim, é recomendado usar variedades mais rústicas, tolerantes ao estresse hídrico e com maior habilidade de recuperar-se após períodos de seca (BASTOS et al., 2011).

O feijão-caupi é classificado como moderadamente tolerante, tanto à deficiência hídrica quanto ao excesso de água no solo (BOYER, 1978). O requerimento de água desta cultura é variável com o seu estágio de desenvolvimento (LIMA et al., 2006) e aumenta de um valor mínimo na germinação até um valor máximo na floração e formação de vagens, decrescendo a partir do início da maturação (BASTOS et al., 2008). Dessa forma, a identificação de genótipos que possam se adaptar a essas condições é essencial para uma produção de grãos sustentável.

Nos programas de melhoramento de feijão-caupi, a seleção de genótipos com características de tolerância à seca é de grande importância para garantir o aumento da produção, principalmente nas regiões do semiárido onde, muitas vezes, ocorre má distribuição de chuvas e, nos últimos anos, vem se constatando períodos prolongados de seca. Com isso, o uso da análise fisiológica, bioquímica e molecular, podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de tolerância à seca e na identificação de proteínas marcadoras para uso na seleção de genótipos tolerantes à seca.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

- Identificar mecanismos fisiológicos e bioquímicos de tolerância à seca em feijão-caupi;
- Identificar e caracterizar “proteínas marcadoras” para o melhoramento genético do feijão-caupi na resposta à seca.

2.2 Objetivos específicos:

- Identificar genótipos de feijão-caupi tolerantes e suscetíveis ao déficit hídrico;
- Caracterizar as respostas fisiológicas e bioquímicas de feijão-caupi à seca em genótipos contrastantes quanto à tolerância a este estresse;
- Identificar as principais proteínas para auxiliar programas de melhoramento genético do feijão-caupi na seleção de genótipos tolerantes à seca.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cultura do feijão-caupi

O feijão-de-corda ou feijão-caupi pertence ao gênero *Vigna*, família Fabaceae, sendo composto de mais de 200 espécies. O gênero *Vigna*, contém cerca de 20 espécies típicas das regiões tropicais e as espécies de maior importância econômica e nutricional são *Vigna unguiculata* (L.) Walpers, *V. radiata* (L.) Wilczek e *V. mungo* (L.) Hepper, sendo usadas como fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais indispensável para vários povos (FERY, 2002). Suas sementes apresentam teor de proteínas que varia de 23 a 32% do peso total, sendo estas ricas em lisina e triptofano, apresenta também uma quantidade substancial de minerais e vitaminas (ácido fólico e vitamina B) necessárias na prevenção de doenças fetais durante a gravidez (NIELSON et al., 1993; HALL et al., 2003). O feijão-caupi é também conhecido por apresentar baixo teor de gordura e alto nível de fibras, constituintes que previnem doenças cardíacas pela redução de lipoproteínas de baixa-densidade. Em adição, o consumo de feijão-caupi aumenta a glicose no sangue de forma lenta devido à vagarosa digestibilidade do amido presente nos grãos, o que o torna alimento recomendável para diabéticos (PHILLIPS et al., 2003; SILVA et al., 2010).

Os grãos secos cozidos do feijão-caupi representam sua principal forma de consumo. Entretanto, folhas (em muitas partes do leste da África, continente de onde a planta foi originada), sementes frescas (no sudeste dos Estados Unidos e Senegal) e vagens frescas verdes (em regiões úmidas da Ásia e do Caribe) também são consumidas (EHLERS e HALL, 1997). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial desta espécie de feijão (depois da Nigéria e Níger), com, aproximadamente 33 milhões de consumidores (EMBRAPA, 2010).

Dentre as principais características do feijão-caupi, pode-se citar as seguintes: seu elevado conteúdo proteico, associado à boa capacidade de fixação biológica de nitrogênio, boa tolerância às condições de baixa disponibilidade de água nos solos, altas temperaturas e relativa tolerância à salinidade, condições típicas das regiões semiáridas do Nordeste do Brasil. Apesar de ser considerado tolerante a baixas condições de disponibilidade de água quando comparado a outras culturas, como por exemplo o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), o feijão-caupi é relativamente sensível ao estresse hídrico. Dependendo da duração e da magnitude desse estresse, ele responde regulando os estômatos, reduzindo a área foliar, acelerando ou retardando seu ciclo reprodutivo ou, ainda, desenvolvendo um sistema radicular mais profundo (DAS et al., 2010).

3.2 Parâmetros fisiológicos e o estresse hídrico

As plantas apresentam vários tipos de respostas ao déficit hídrico, as quais contribuem para a manutenção do seu status hídrico e, por extensão, dos processos fisiológicos e bioquímicos essenciais. Estas alterações podem ocorrer tanto em curto prazo, com o aumento na razão sacarose/amido pelo carbono recente fixado, como em longo prazo, pelo pool de solutos orgânicos de baixo peso molecular, também chamado de solutos compatíveis, em um processo conhecido como ajustamento osmótico, em que ambas as alterações fazem parte de uma resposta reguladora da planta para manter a turgescência foliar sob baixa disponibilidade de água (BAJJI et al., 2001). Desse modo, a sobrevivência das plantas sob condições estressantes depende em grande parte da habilidade que as mesmas têm de perceber o estímulo, gerar e transmitir o sinal e iniciar várias alterações fisiológicas e bioquímicas (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997; COSTA et al., 2012).

Segundo Fan et al. (2006), o déficit hídrico em consequência da seca se estabelece quando a absorção de água pelo sistema radicular não consegue atender as exigências da planta. Entre as principais exigências estão a fotossíntese e a transpiração da parte aérea, dois processos essenciais ao crescimento vegetal. Antes que o déficit hídrico se estabeleça, as raízes têm que “sentir” a seca no solo e transmitir essa informação à parte aérea, o que gera uma resposta integrada da planta permitindo sua sobrevivência até a disponibilidade de água aumentada. Esta comunicação é feita por vários meios além da redução no fluxo ascendente de água (COSTA et al., 2012).

A fotossíntese ocupa uma posição fundamental entre as vias biossintéticas das plantas, fornecendo uma ligação entre o metabolismo interno da planta e o ambiente. O processo fotossintético constitui a base da produção de uma cultura, sendo estimada uma participação de 90% na produção de matéria seca do vegetal (JIAO et al., 2003).

Plantas sob déficit hídrico diminuem a condutância estomática que leva a uma diminuição na C_i (concentração interna do CO_2) e na transpiração e em consequência, causa uma diminuição no suprimento de CO_2 para a fotossíntese (OLIVEIRA et al., 2005). A C_i é um, variável que descreve a disponibilidade de dióxido de carbono para o processo fotossintético, sendo que a redução de C_i pode indicar a ocorrência das limitações dos estômatos (CHAVES et al., 2009), de forma que a resistência estomática e do mesófilo reduzem a concentração de CO_2 que pode atingir os cloroplastos. Quando as clorofilas absorvem energia, elas alteram suas configurações passando do estado basal para o estado excitado (nível mais alto de energia). Esse estado excitado é muito instável e de vida muito curta. Dessa maneira,

estes pigmentos, após receberem a energia dos fótons, dissipam esta energia proveniente da luz por diferentes meios (TAIZ e ZEIGER, 2009). O chamado “quenching” fotoquímico (qF) é a dissipação da energia (luminosa) em processos da fotossíntese, usada na formação do poder redutor e ATP, os quais serão utilizados na bioquímica do processo fotossintético. Já o “quenching” não-fotoquímico (qNF) é a dissipação de energia em processos outros que não o fotoquímico, sendo o principal processo envolvendo a proteção contra o fotodano. O qNF mede a dissipação térmica (calor) da energia de excitação em excesso, promovido principalmente pela fluorescência da clorofila *a* no fotossistema II (PSII) e pelo ciclo das xantofilas (carotenoides) (COGDELL, 2006).

Em relação aos parâmetros bioquímicos observa-se o ajustamento osmótico, de forma que a planta se aclimata e/ou se adapta ao déficit hídrico, podendo acumular prolina (ALVARENGA et al., 2011) e outros aminoácidos livres (KUSAKA et al. 2005), poliálcoois (RAMANJULU e BARTELS, 2002) e carboidratos (PEREIRA et al., 2012). Estes compostos compartilham a propriedade de permanecerem estáveis em pH neutro e serem altamente solúveis em água (BALLANTYNE e CHAMBERLIN, 1994).

Os carboidratos, entre estes solutos são elementos-chave, pois podem ser armazenados tanto na forma de polissacarídeos com baixa atividade osmótica como o amido, quanto na forma de açúcares altamente solúveis e higroscópicos como a sacarose e hexoses (WHITTAKER et al., 2007).

Além dos carboidratos, por muito tempo, a capacidade de prolina tem sido correlacionada com a tolerância ao estresse (SOMAL e YAPA, 1998). É comprovado na literatura que a prolina em sua forma livre se acumula, não só em resposta à carência de água, como também pelos efeitos da salinidade e baixas temperaturas. Essa acumulação vem sendo observada em tecidos e órgãos vegetais, especialmente em folhas destacadas (MAIA et al., 2007), folhas maduras (NOGUEIRA et al., 2001), folhas em crescimento (MONTEIRO et al., 2014) e, na seiva do floema (NOGUEIRA et al., 2001). Os níveis de prolina nas plantas antes de sofrerem um estresse são sempre baixos, podendo variar de 1 a 5 mmol. g⁻¹ de M.S. em muitas espécies, como arroz, sorgo, milho, trigo e cevada (HANSON, 1980).

Entretanto os carboidratos e a prolina não são os únicos que refletem danos nas plantas, outro exemplo é quando o estresse por déficit hídrico gera espécies reativas de oxigênio, os quais desencadeiam processos de peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (SMIRNOFF, 1993; SCHWANZ e POLLE, 2001). Esses processos de peroxidação foram estudadas por Carneiro et al. (2011), que verificaram aumento na produção de lipoperóxidos em diversas espécies de gramíneas submetidas ao déficit hídrico.

Desta maneira, a condutância estomática, a taxa fotossintética, a eficiência do fotossistema II, carboidratos, prolina e peroxidação dos lipídeos são alguns dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos que têm apresentado uma grande função na categorização de genótipos tolerantes à seca, além também da capacidade de recuperação destes genótipos após serem submetidos ao déficit hídrico com o restabelecimento do suprimento hídrico (TEZARA et al., 2008).

3.3 Identificação de biomarcadores

Em alguns cenários mais preocupantes a falta de água já é parte da realidade de algumas regiões do planeta, especialmente regiões áridas e semiáridas, sendo que a seca atinge os diversos setores produtivos envolvidos, com ênfase para a agropecuária (BENKO-ISEPPON et al., 2011).

De acordo com Dietrich et al. (2001) ao longo do tempo, as plantas foram submetidas a diferentes tipos de ambientes definidos pelas condições edafoclimáticas, adaptando-se inclusive a ambientes em que a disponibilidade hídrica é limitada, como ocorre em alguns ecossistemas brasileiros, como a caatinga, a restinga, o cerrado e os campos rupestres. Acredita-se que esse processo tenha ocorrido ao longo dos últimos 400 milhões de anos, a partir da pressão seletiva dos ambientes secos e salinos fora dos mares, gerando variações no comportamento entre espécies e culminando com a geração de plantas adaptadas aos ambientes mais áridos.

Plantas adaptadas a ambientes de seca e calor extremos, como no caso destes, apresentam adaptações específicas sem as quais sua ocorrência e sobrevivência seriam ameaçadas. Juntos, os estresses abióticos são responsáveis por desencadear uma série de respostas das plantas, que podem ser percebidas através das modificações morfológicas, fisiológicas, moleculares e metabólicas, a fim de tolerar estes estresses (BENKO-ISEPPON et al., 2011).

A tolerância à seca é definida como a habilidade da planta de sobreviver, crescer e produzir satisfatoriamente com limitado suprimento de água ou sob deficiências periódicas de água (ASHLEY, 1993). Um aspecto crucial nos estudos relacionados à tolerância à seca é a avaliação do nível da tolerância de diferentes genótipos. As respostas das plantas às condições de estresse hídrico variam de acordo com a espécie, cultivar, tempo de exposição e fatores edáficos, entre outros. Não existe uma única variável fisiológica que, por si só, seja indicativa de tolerância à seca. Segundo Nogueira et al. (2001), o ideal é avaliar mais de uma variável,

tais como potencial hídrico, condutância estomática, temperatura e transpiração foliar, considerados importantes para avaliar as respostas das espécies vegetais ao estresse hídrico.

Muitas pesquisas têm se voltado para o esclarecimento dos mecanismos fisiológicos e genéticos relacionados à resistência ou tolerância à seca, com a identificação de genes importantes na determinação destas características. Os estudos de tais genes têm crescido cada vez mais em importância para a biotecnologia, dada à escassez de água que vem se agravando progressivamente em termos globais. As reações moleculares ao estresse hídrico, em plantas, têm sido amplamente analisadas estudando-se diversos genes de resposta à seca, alta salinidade e frio em nível transcricional, havendo algumas revisões sobre estes assuntos (GOLDACK et al., 2011; HUANG et al., 2012) indicando a complexa interação entre estes genes (BENKO-ISEPPON et al., 2011).

Os genes induzidos em condições de estresse têm sua função não somente na produção de importantes proteínas do metabolismo, como também na regulação de genes envolvidos na transdução de sinal (DERGISI, 2005), e que são proteínas que provavelmente funcionam na resposta ao estresse, como aquaporinas, proteínas necessárias para produção de vários osmoprotetores (açúcar, prolina, glicina, betaína, etc.), proteínas que protegem macromoléculas e membranas, proteínas LEA (late-embryogenesis abundant protein), chaperonas, proteínas ligadoras de mRNA, proteases, e enzimas de detoxificação. O segundo grupo contém proteínas envolvidas na regulação da via de transdução de sinal, expressão gênica (ativação e inativação), como as proteínas cinases, fatores transcricionais, fosfolipases C e proteínas de biossíntese de ácido abscísico (ABA) (UMEZAWA, 2004; DERGISI, 2005).

Para um genótipo mais produtivo, a capacidade de expressar um amplo conjunto de proteínas diferencialmente expressas em resposta à disponibilidade de água parece ser uma característica chave na manutenção de crescimento da biomassa durante o período seco. Sua estratégia pode envolver uma diminuição da atividade fotossintética durante a estação seca associada à realocação de recursos por grandes mudanças na expressão de genes associados ao metabolismo primário (VILLAR et al., 2011). Portanto, mapas proteômicos feitos a partir de géis bidimensionais (2-DGE) podem detectar a expressão proteica diferencial ligada a mecanismos de tolerância à seca. E a análise do proteoma diferencial na resposta a seca pode ajudar a elucidar os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos.

Portanto, levando em consideração o exposto acima, o presente estudo visa identificar proteínas em folhas cuja alteração de sua expressão esteja associada à maior tolerância à seca no feijão-caupi. Isto poderá fornecer evidências sobre mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos na resposta ao déficit hídrico, além de caracterizar fisiologicamente os genótipos

contrastantes. Essa caracterização fisiológica é importante para que as descrições de alterações no proteoma em integração às respostas fisiológicas caracterizadas sejam mais esclarecedoras, visando aprofundar o conhecimento na área e inovar na elaboração de uma estratégia de seleção de genótipos de feijão-caupi com características de tolerância à seca.

3.4 Tolerância do feijão-caupi ao déficit hídrico

A deficiência hídrica é uma das maiores causas de redução na produtividade agrícola, porém existe uma grande variabilidade na tolerância à seca entre as espécies (KRAMER e BOYER, 1995). Dentre as leguminosas de grão, o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é produzido em regiões quentes e semiáridas, onde a precipitação é errática e insuficiente (KAY, 1979).

Segundo Taiz e Zeiger (2010), as respostas mais relevantes das plantas ao déficit hídrico são: a redução da área foliar, o fechamento estomático, a antecipação da senescência e abscisão das folhas. Assim, os processos fisiológicos são desencadeados e adaptados, de forma a permitir a manutenção da água no solo, com o objetivo de economizar para períodos futuros, com o intuito de assegurar a sobrevivência e a perpetuação da espécie

Em plantas de feijão o déficit hídrico diminui a condutância estomática e aumenta a resistência difusiva ao vapor de água, mediante fechamento dos estômatos, reduzindo a transpiração e, em consequência, o suprimento de CO₂ para a fotossíntese (OLIVEIRA et al., 2005). Para Larcher (2000), os estômatos atuam como moduladores da perda de água pela transpiração respondendo ao déficit hídrico com a alteração da abertura do poro a uma faixa crítica de valores do potencial hídrico foliar.

Diante da importância do feijão-caupi para o Norte-Nordeste do Brasil, torna-se imprescindível a realização de estudos visando avaliar o desempenho de cultivares desenvolvidas para o cultivo em regime de sequeiro, frente às limitações hídricas impostas que ocorrem em diferentes fases de crescimento. Sousa et al. (2009) verificaram que o efeito do estresse hídrico em feijoeiro causa reduções nos componentes de produção e é mais severo quando ocorre nas fases de floração e frutificação. Guimarães et al. (2006) também constataram que a deficiência hídrica nas plantas é tanto maior quanto menor o suprimento de água pelas raízes.

Apesar dos numerosos trabalhos existentes sobre o déficit hídrico e dos recentes avanços em técnicas de biologia molecular, os mecanismos que conferem a tolerância à seca permanecem ainda pouco esclarecidos. Muitos genes que respondem aos estresses abióticos em nível transcricional têm sido identificados em várias plantas, e muitos deles têm um papel

importante na tolerância a esses estresses (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Estudos funcionais, envolvendo a caracterização molecular do papel fisiológico destes genes em diferentes estágios da resposta ao estresse podem fornecer evidências de forma a identificar os genes envolvidos nesta resposta (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). Uma importante aplicação desses estudos relata a identificação de genes estresse-induzidos que podem revelar funções essenciais ou importantes com efeito na tolerância ou nas reações de defesa contra a perda de água (TALAMÈ et al., 2007).

Uma estratégia de adaptação à seca pode envolver a diminuição da atividade fotossintética durante a estação seca associada à realocação de recursos decorrente de mudanças na expressão de genes associados ao metabolismo primário.

Nos programas de melhoramento do feijão-caupi a seleção de genótipos com características de tolerância à seca é de grande importância para garantir o aumento da produção, principalmente nas regiões do semiárido onde, muitas vezes, ocorre má distribuição de chuvas e, nos últimos anos, vem se constatando períodos prolongados de seca. Com isso, o uso da biologia molecular, em um curto espaço de tempo, pode representar uma alternativa para a obtenção e lançamento de cultivares comerciais com tolerância à seca.

4 REFERÊNCIAS

- ASHLEY, J. **Drought and crop adaptation**. Pages 46–67 in *Dryland farming in Africa*, edited by J.R.J. Rowland. Macmillan Press Ltd, UK. 1993.
- ALVARENGA, I.C.A.; QUEIROZ, G.A.; HONÓRIO, I.C.G.; VALADARES, R.V.; MARTINS, E. R. Prolina livre em alecrim-pimenta sob estresse hídrico antes da colheita. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.13, especial, p.539-541, 2011.
- BAJJI, M.; LUTTS, S.; KINET, J.M. Water deficit effects on solute contribution osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum Desf.*) cultivars performing differently in arid conditions. **Plant Science**, v.160, n.4, p 669- 681, 2001.
- BALLANTYNE, J.S.; CHAMBERLIN, M.E. Regulation of cellular amino acid levels. In: STRANGE, K. (Ed). **Cellular and molecular physiology of cell volume regulation**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 111-122.
- BASTOS, E.A.; FERREIRA, V.M.; SILVA, C.R.; ANDRADE JÚNIOR, A.S. Evapotranspiração e coeficiente de cultivo do feijão-caupi no vale do Gurguéia, PI. **Irriga**, v.13, p.182-190, 2008.

BASTOS, E.A.; NASCIMENTO, S.P.do; SILVA, E.M.da; FREIRE FILHO, F.R.; GOMIDE, R.L. Identification of cowpea genotypes for drought tolerance. **Revista Ciência Agronômica**. v. 42, n. 1, p. 100-107. 2011.

BENKO-ISEPPON, A.M; SOARES-CAVALCANTI, N.M.; BELARMINO, L.C; BEZERRA NETO, J.P.; AMORIM, L.L.B.; FERREIRA NETO, J.R.C.; PANDOLFI, V.; AZEVEDO, H.M.de A.; SILVA, R.L.de O.; Santos, M.G.DOS; ALVES, M.V.da S.; KIDO, E.A. Prospecção de genes de resistência à seca e à salinidade em plantas nativas e cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**. v. 6, p. 1112-1134. 2011

BOYER, J.S. **Water deficits and photosynthesis**. In: Kozlowski, T.T. (ed.) Water deficits and plant growth. New York: Academic Press, v.4, p.154-191, 1978.

CARNEIRO, C.; LIMA, M. M.; DEUNER, S.; DE OLIVEIRA, P. V.; TEIXEIRA, S. B.; SOUSA, C. P.; DE MORAES, D.M. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E VIABILIDADE DE SEMENTES DE GIRASSOL APÓS ESTRESSE HÍDRICO E SALINO. **Revista brasileira de sementes**, v. 33, n.4, 2011.

CATIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F-W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A.M.; FRANCA, E.; MARÈ, C.; TONDELLI, A.; STANCA, A.M. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. **Field Crop Research**. v. 105, p. 1-14. 2008.

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v.103, n.4, p.551-560, 2009.

CHAVES, M.M.; PEREIRA, J.S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M.L.; RICARDO, C.P.P.; OSORIO, M.L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in field? **Photosynthesis and growth**. **Annals of Botany**, v.89, n. 7, p.907-916, 2002.

COGDELL, R.J. The structural basis of non-photochemical quenching is revealed? Trends in Plant Science, v.11, n.2, 2006.

CONAB – **Companhia Brasileira de Abastecimento**. **Conjuntura sobre produção de feijão no Ceará**. Estimativa de safra 2015/2016. Fortaleza, CONAB, 2016. 2p. <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_16_13_38_04_conjuntura_sobre_producao_de_feijao_no_ceara_safra_2011_2012.pdf>, 06 de Março 2017.

COSTA, V.P.da.; HAYASHI, A.H.; CARVALHO, M.A.M.de.; SILVA, E.A.da. Aspectos fisiológicos, anatômicos e ultra estruturais do rizoma de *Costus arabicus* L. (Costaceae) sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**. v.39, n.1, p.125-137, 2012

DERGISI, G.Ü.F.B. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. **Journal of Science**, 18(4): 723-740, 2005.

DIETRICH, P.; SANDERS, D.; HEDRICH, R. The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1959-1967, 2001.

EHLERS, J. D.; HALL, A.E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Field Crops Research**. v. 53, p. 187-204, 1997.

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias**. Disponível em <<http://www.cpatu.embrapa.br/eventos/2010/novembro/tecnologias-para-a-producao-de-feijao-caupi>>. Acesso dia 29 ago. 2013.

FAN, L.; LINKER, R.; GEPSTEIN, S.; TANIMOTO, E.; YAMAMOTO, R.; NEUMANN, P.M. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increase lignin metabolism and progressive stellate accumulation of wall phenolics. **Plant physiology**, v.140, n.2, p.603-612, 2006.

FERY, R.L. New Opportunities in Vigna. **Trends in New Crops and New Users**. J. Janick and A. Whipkey, (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA. 2002.

GOLDACK, D.; KING, I.L.; YANG, O. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 1383-1391, 2011.

GUIMARÃES, C. M.; STONE, L. F.; BRUNINI, O. Adaptação do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) à seca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, p.70-75, 2006.

GWATHMEY, C.O.; HALL, A.E. Adaptation to midseason drought of cowpea genotypes with contrasting senescence traits. **Crop Science**. v. 32, p. 773-778. 1992.

HALL, A.E.; CISSE, N.; THIAW, S.; ELAWAD, H.O.A.; EHLERS, J.D.; ISMAIL, A.; FERY, R.; ROBERTS, P.; KITCH, L.W.; MURDOCK, L.L.; BOUKAR, O.; PHILLIPS, R.D.; MCWATTERS, K.H. Development of cowpea cultivars and germplasm by the Bean/Cowpea CRSP. **Field Crops Research**. v. 82, p. 103–134. 2003.

HANSON, A.D. Interpreting the metabolic responses of plants to water stress. **HortScience**, Alexandria, 5:623-629, 1980.

HUANG, G.-T. MA, S.-L.; BAI, L.-P.; ZHANG, L.; MA, H.; JIA, P.; LIU, J.; ZHONG, M.; GUO, Z.-F. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. **Molecular Biology Reports**, v. 39 p. 969-987, 2012.

- JIAO, D.; JI, B.; LI, X. Characteristics of chlorophyll fluorescence and membrane-lipid peroxidation during senescence of flag leaf in different cultivars of rice. **Photosynthetica**, v. 41, p. 33-41, 2003.
- KAVESKI, M.S. **Avaliação do processo de produção de sementes de Soja visando uma proposta de gestão da qualidade em uma empresa de Mato Grosso do Sul (Dissertação)**, 114p, Universidade Para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal-UNIDERP, Campo Grande- MG, 2004.
- KAY, D. E. **Food legumes**. Londres: Tropical Products Institute, 1979. 435p.
- KINKARTZ, S. **Crescimento populacional e o desafio da alimentação**, 27.10.2011<<http://www.dw.com/pt-br/crescimento-populacional-e-o-desafio-da-alimenta%C3%A7%C3%A3o/a-15486766>> acesso em 08 de fevereiro de 2017.
- KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. Water relations of plants and soils. **Academic Press**, New York: 1995.495p.
- KUSAKA, M.; OHTA, M.; FUJMURA, T. Contribution of inorganic components to osmotic adjustment and leaf folding for drought tolerance in pearl millet. **Physiologia Plantarum**, v.125, n.4, p.474-489, 2005.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: ed. Rima Artes e Textos, 2000. 531p.
- LIMA, J.R.S.; ANTONINO, A.C.D.; SOARES, W.A.; SILVA, I.F. Estimativa da evapotranspiração do feijão-caupi utilizando o modelo de Penman-Monteith. **Irriga**, v.11, p.477-491, 2006.
- MAIA, P.S.P.; OLIVEIRA NETO, C.F.; CASTRO, D.S.; LOBATO, A.K.S.; SANTOS, P. C. M.; COSTA, R.C.L. Conteúdo relativo de água, teor de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de milho submetidas a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5(supl 2), p. 918-920, 2007.
- MENDES, R. M. S.; TÁVORA, F.J.A. F.; PINHO, J.L.N.; PITOMBEIRA, J.B. Relações fonte-dreno em feijão-de-corda submetido à deficiência hídrica. **Ciência Agronômica**, v.38, p. 95-103, 2007.
- MONTEIRO, J. G.; CRUZ, F. J. R.; NARDIN, M. B.; SANTOS, D.M.M.D. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p.18-25, 2014.
- MUTEIA, H. **Ano Internacional de agricultura familiar motivou conversa com Hélder Muteia, responsável pelo escritório da FAO em Portugal**. Ano 2014 <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/faoweb/lisbon/docs/Focus_Social_dezembro_2014.pdf> Acesso: 08 de fevereiro de 2017.

NIELSON, S.S.; BRANDT, W.E., B.B. Genetic variability for nutritional composition and cooking time of improved cowpea lines. **Crop Science**. v. 33, p. 469-472. 1993

NOGUEIRA, R.J.; MANSUR, C.; MORAES, J.A.P.D.; BURITY, H.A.; BEZERRA NETO, E.G.Í.D.I.O. Modifications in vapor diffusion resistance of leaves and water relations in barbados cherry plants under water stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.1, p. 75-87, 2001.

OLIVEIRA, A. D.; FERNANDES, E. J.; RODRIGUES, T. J. D. Condutância estomática como indicador de estresse hídrico em Feijão. **Engenharia Agrícola**, v.25, p.86-95, 2005.

PEREIRA, J. W.; MELO FILHO, P. A.; ALBUQUERQUE, M. B.; NOGUEIRA, R. M.; SANTOS, R.C. Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico moderado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n.4, p.766-773, 2012.

PHILLIPS, R.D.; MCWATTERS, K.H.; CHINANNAN, M.S.; HUNG, Y.; BEUCHAT, L.R.; SEFA- DEDEH, S.; SAKI-DAWSON, E.; NGODDY, P.; NNANYELUGO, D.; ENWERE, J.; KOMEY, N.S.; LIU, K.; MENSA-WILMOT, Y.; NNANNA, I.; OKEKE, C.; PRINYAWIWATKUL, W.; SAALIA, F.K. Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops Research**. v. 82, p. 193–213. 2003.

SCHWANZ, P.; POLLE, A. Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pendunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentrations. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, n.354, p.133-143, 2001.

SILVA, C. D. S., SANTOS, P. A. A., LIRA, J. M. S., SANTANA, M. D., SILVA JUNIOR, C. D. Curso diário das trocas gasosas em plantas de feijão-caupi submetidas a deficiência hídrica. *Revista Caatinga*, v. 23, n. 04, p. 7-13, 2010.

SINGH, B.B.; MOHAN RAJ, D.R.; DASHIELL, K.; JACKAI, L. (1997). **Advances in cowpea research**. IITA-JIRCAS, Ibadan, Nigeria.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.221-227, 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. **Curr Opin Plant Biol**. v.3, p. 217–223, 2000.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. **Plant Physiol**, v.115, n.2, p. 327–334, 1997.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, Cambridge, v.125, p.27-58, 1993.

SOMAL, T. L. C.; YAPA, P. A. J. Accumulation of proline in cowpea under nutrient, drought, and saline stresses. **Journal of Plant nutrition. Philadelphia**, v. 21, n. 11, p. 2465-2473, 1998.

SOUSA, M.A.; LIMA, M.D.B.; SILVA, M.V.V.; ANDRADE, J.W.S. Estresse hídrico e profundidade de incorporação do adubo afetando os componentes de rendimento do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, p.175-182, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. rev. e ampl. Porto Alegre: Artmed, 2010. 819 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia do Estresse**. In: TAIZ, L., ZEIGER, E. (Ed)., Fisiologia Vegetal. Artmed, 2009, p.738-772.

TALAMÈ, V.; OZTURK, N. Z.; BOHNERT, H. J.; TUBEROSA, R. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. **Journal of Experimental Botany**.v.58, p. 229–240, 2007.

TEZARA, W.; DRISCOLL, S.; LAWLOR, D. W. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ assimilation and O₂ reduction in sunflower plants under water deficit. **Photosynthetica**, Praha, v. 46, n. 1, p. 127-134, 2008.

UMEZAWA, T.; YOSHIDA, R.; MARUYAMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of National Academy of Science**, 101:17306–17311, 2004.

VILLAR, E.; KLOPP, C.; NOIROT, C.; NOVAES, E.; KIRST, M.; PLOMION, C.; GION, J-M. RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in eucalyptus. **BMC Genomics**, v.12, p.538-555, 2011.

WHITTAKER, A.; MARTINELLI, T.; FARRANT, J. M.; BOCHICCHIO, A.; VAZZANA, C. Sucrose phosphate synthase activity and the co-ordination of carbon partitioning during resurrection plant *Sporobolus stapfianus* during dehydration. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 58, n. 13, 37775-3787, 2007.

CAPÍTULO 1

IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI TOLERANTES E SUSCETÍVEIS AO DÉFICIT HÍDRICO POR MEIO DE DUAS METODOLOGIAS

RESUMO

Dentre as leguminosas de grão, o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é produzido em regiões quentes e semiáridas, onde a precipitação é errática e insuficiente. Trabalhos sobre os mecanismos que conferem a tolerância à seca permanecem ainda limitados. Portanto, objetivou-se com esse trabalho identificar genótipos de feijão-caupi tolerantes e suscetíveis ao déficit hídrico a nível de plântulas, utilizando-se duas metodologias, estresse hídrico simulado com o uso de PEG6000 (Polietilenoglicol) e *Screening Box*. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Para a metodologia com PEG6000 foram utilizados 15 genótipos e duas testemunhas, com três repetições, totalizando 90 amostras. Foram selecionadas seis plântulas por genótipo, utilizaram-se três caixas contendo apenas água destilada e outras três com nível de potencial osmótico de - 0,2 MPa de PEG6000. A avaliação foi feita até atingir o ponto máximo de crescimento das raízes. Para a metodologia de *Screening Box* foram utilizados 15 genótipos, onde estes foram avaliados quanto à tolerância ao déficit hídrico no estágio de plântula. As duas metodologias mostraram-se eficientes na seleção de genótipos de feijão-caupi, sendo o genótipo Pingo de Ouro 1,2 tolerante ao déficit hídrico, enquanto o genótipo Santo Inácio Vermelho, sensível à seca, em ambas as metodologias.

Palavras-chave: Seca, *Vigna unguiculata*, Plântulas.

CHAPTER 1

COWPEA GENOTYPES TOLERANT AND SUSCEPTIBLE TO WATER DEFICIT BY USING TWO APPROACHES

ABSTRACT

The grain legumes cowpea, [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] is cultivated in hot and semi-arid regions, where the water precipitations are erratic and insufficient. The insights to clarify possible mechanisms that confer drought tolerance remains limited. Therefore, a research with the objective to identify tolerant and susceptible cowpeas genotypes to water deficiency at the seedlings stage of growth, using two methodologies such as (a) water stress with the use of PEG6000 (Polyethylene glycol) and the Screening Box were used in the present research. The experiments were conducted in greenhouse environments using a completely randomized design with three replications. For the PEG6000 approach, 15 genotypes and two controls treatments were used in three replications in a total of 90 samples. Six seedlings were selected per genotype by using three boxes containing only distilled water. In the other treatment, three level of osmotic potential of -0.2 MPa of PEG6000. The evaluations of the trials were done until the Screening Box approach, 15 genotypes were used and were evaluated for tolerance to water deficit at the seedling stage of growth. The two methodologies were positives in help to selections of cowpeas genotypes, “Pingo de Ouro 1.2” was found to be tolerant to water deficit, while the “Santo Inácio Vermelho” genotype was found to be sensible to water deficit.

Key words: Drought, *Vigna unguiculata*, Seedlings.

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é considerado uma cultura essencial em países em desenvolvimento da América Latina, África e Ásia onde é consumido como grãos secos, grãos verdes, vagens ou folhas (SINGH et al., 1997). No Brasil, o feijão-caupi é mais cultivado nas regiões Norte e Nordeste (NASCIMENTO et al., 2011), sendo a região Nordeste aquela que tem uma condição comum de déficit hídrico, um dos fatores que comumente reduz a produtividade do feijão-caupi (MENDES et al., 2007).

O requerimento de água desta cultura é variável com o seu estágio de desenvolvimento (LIMA et al., 2006) e apesar de ser considerado tolerante a baixas condições de disponibilidade de água quando comparado a outras culturas, como por exemplo, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), o feijão-caupi é moderadamente sensível ao estresse hídrico (GWATHMEY e HALL, 1992).

Nos programas de melhoramento de feijão-caupi, a seleção de genótipos com características de tolerância à seca é importante para garantir o aumento da produção, principalmente nas regiões do semiárido onde ocorre má distribuição de chuvas e, nos últimos anos, vem se constatando períodos prolongados de seca. Alguns estudos já estão sendo desenvolvidos e recomendados para se identificar plantas mais adaptadas à baixa disponibilidade de água no solo (DANTAS et al., 2002).

Nesse sentido, um dos materiais utilizados para estudos relacionados ao déficit hídrico, é o polietilenoglicol (PEG6000), que simula os efeitos da restrição hídrica por não penetrar nas células, não ser degradado e não causar toxidez, devido ao seu alto peso molecular (SOUZA e CARDOSO, 2000), atuando como um agente osmótico que simula um determinado potencial osmótico (Ψ_{os}) (BRAGA et al., 1999; SOUZA e CARDOSO, 2000).

Outra metodologia que tem sido utilizada para estimar a tolerância à seca é o descrito por Singh et al. (1999a), esta é denominada de “Screening Box”, trata-se de um método simples de triagem em caixa de madeira, onde podem ser selecionadas plantas tolerantes à seca ou progênes de feijão-caupi na fase de plântulas. A metodologia do “Screening Box” é simples e difere dos outros métodos que são dispendiosos e demorados, além disso, a seleção em condições de campo nem sempre é possível devido à impossibilidade e a intensidade do estresse pela seca (SINGH e MATSUI, 2002).

No melhoramento de plantas uma das primeiras etapas é a identificação de genótipos que apresentem caracteres superiores ou desejáveis ao desenvolvimento de novos cultivares, como por exemplo, genótipos com tolerância à seca. Uma vez identificados, estes são utilizados

como genitores, cujos genes serão inseridos no cultivar a ser desenvolvido. Entretanto, a identificação de grande quantidade de genótipos nesta etapa inviabiliza a avaliação destes em campo, necessitando-se de metodologias que possam facilitar e agilizar a identificação destes genótipos. Esse tipo de estudo foi desenvolvido em Canola (ÁVILA et al., 2004), Algodão (ECHER et al., 2010) e Pinhão Manso (PEREIRA e LOPES, 2011).

Diante do exposto, objetivou-se identificar genótipos de feijão-caupi tolerantes e suscetíveis ao déficit hídrico a nível de plântulas, utilizando-se de duas metodologias, estresse hídrico simulado com o uso de PEG6000 (Polietilenoglicol) e Screening Box descrito por Singh et al. (1999a).

MATERIAL E MÉTODOS

Estresse hídrico simulado com o uso de PEG6000 (Polietilenoglicol)

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal do Ceará. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três repetições. Para este experimento foram utilizados 15 genótipos (Tabela 1), em que 12 sementes de cada genótipo foram esterilizadas com NaOCl a 0,5% por 1 min., lavadas com água destilada e, posteriormente, foram distribuídas sobre duas folhas de papel germiteste umedecidas com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco e formados rolos.

Tabela 1. Descrição dos genótipos avaliados quanto à tolerância ao déficit hídrico.

Nº	GENÓTIPOS	DADOS DE ORIGEM
1	PITIUBA	(BAG UFC/ UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ)
2	PATATIVA	(BAG UFC/ UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ)
3	EPACE 10	(BAG UFC/ EPACE)
4	SEMPRE VERDE	(BAG UFC/ UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ)
5	SETENTÃO	(BAG UFC/ UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ)
6	PINGO DE OURO	(BAG UFC)
7	PINGO DE OURO 1, 2	(BAG/ EMBRAPA MEIO NORTE)
8	BRS PAGEÚ	PRODUTOR PARAMBU-CE
9	SANTO INÁCIO VERMELHO	PRODUTOR PARAMBU-CE
10	CNCX 251-76E	(CNPAF)
11	ROXINHO 1	(BAG/UFC/ ACARAPE - CE)
12	BRS PUNJANTE	(CULTIVAR EMBRAPA MEIO NORTE)
13	BRS PARAGUAÇU	(CULTIVAR EMBRAPA MEIO NORTE)
14	BRS TUMUCUMAQUE	(CULTIVAR EMBRAPA MEIO NORTE)
15	BRS MARATAOÃ	(CULTIVAR EMBRAPA MEIO NORTE)

Os rolos de papel germiteste foram colocados em Becker e transferidos para um germinador com temperatura de 25 °C por 48 h. Em seguida, foram selecionadas seis plântulas por genótipo, com radícula de 1 a 2 mm de comprimento, para ser fixadas em duas folhas de papel germiteste de tamanho A4 e envolvidas por um saco de polietileno transparente perfurado (exsicata) (Figura 1).

Figura 1. A: Rolos de papel germiteste em Becker contendo as sementes dos genótipos para germinar; B: Saco de polietileno transparente perfurado com plântula de feijão-caupi

A



B



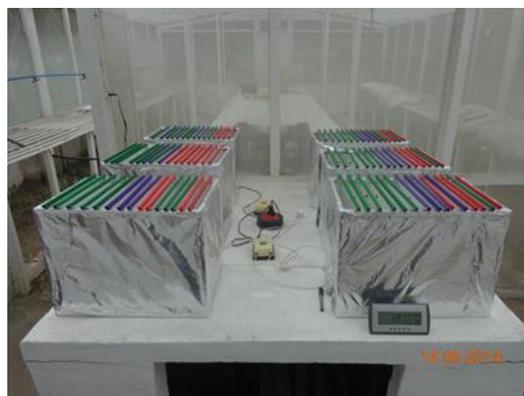
Essas folhas foram colocadas verticalmente em uma caixa de madeira com dimensões 37 x 30 x 50 cm (largura x altura x comprimento) (Figura 2 A), uma caixa contendo água destilada onde foi colocada três repetições de todos os genótipos e outra caixa contendo uma solução com 119,571 g.L⁻¹ de água destilada no nível de potencial osmótico de - 0,2 MPa de PEG6000 com três repetições. A parte superior da exsicata ficou apoiada nas laterais da caixa de madeira e a parte inferior imersa na solução de PEG6000. Esta por capilaridade umedeceu o papel, onde se desenvolveu o sistema radicular (Figura 2 B).

Figura 2. A: Caixa de madeira com bandeja plástica contendo a solução de PEG6000; B: Imagem do experimento mostrando suas repetições em casa de vegetação.

A



B



As caixas foram mantidas em casa de vegetação a uma temperatura de 25 ± 3 °C até o momento das avaliações. A avaliação foi realizada ao longo de cinco dias, sendo mensurados: comprimento total da raiz principal (diariamente e no mesmo horário), número de raízes laterais, número de verticilos e massa seca dos 15 genótipos de feijão-caupi submetidos às duas situações, à solução de PEG6000 e a água. A avaliação foi feita até atingir o ponto máximo de crescimento das raízes. Na análise estatística foi realizado o teste de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Estresse hídrico simulado com o método do *Screening Box*

Para este experimento foram utilizados 15 genótipos de feijão-caupi (Tabela 1), os quais foram avaliados quanto à tolerância ao déficit hídrico. A avaliação foi realizada em casa de vegetação e seguiu a metodologia proposta por Singh et al. (1999a), com algumas modificações.

As variedades de feijão-caupi foram semeadas em bandejas de plástico (53 cm de comprimento, 37 centímetros de largura e 24 cm de profundidade). As bandejas foram preenchidas com uma mistura de 6:3:1 de areia, húmus de minhoca e vermiculita, respectivamente (Figura 3 A). Estas foram preenchidas com uma profundidade de 18 cm, deixando-se cerca de 6 cm de espaço na parte superior para a rega. Orifícios equidistantes foram feitos em linhas retas (Figura 3 B).

Figura 3. A: Bandeja de plástico contendo substrato e plântulas; B: Orifícios equidistantes feitos em linhas retas.

A



B



Antes da semeadura, as sementes foram esterilizadas com 0,5% NaOCl por 1 min., e lavadas com água destilada e, posteriormente, foram distribuídas sobre duas folhas de papel germiteste umedecidas com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Em seguida, estas foram transferidas para um germinador com temperatura de 25 °C até germinar, sendo então transferidas para as bandejas. Cada bandeja continha uma linha de cada um dos 15 genótipos de feijão-caupi com sete plantas (Figura 3 A).

Os tratamentos foram dispostos em cinco repetições ao acaso. As bandejas foram irrigadas até o 9º dia. Após este período, foi cessada totalmente a irrigação de quatro bandejas e uma repetição continuou sendo irrigada. Todos os dias foram avaliados o número de plantas vivas e o número de plantas mortas. A partir do teste de Scott e Knott (1974) e uma curva de murcha permanente, os genótipos foram classificados como tolerante ou sensível à seca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estresse hídrico simulado com o uso de PEG6000 (Polietilenoglicol)

Houve efeito significativo ($P < 0,05$) entre os tratamentos genótipos versus tratamentos para altura final (Tabela 2) e taxa de crescimento (Tabela 3) havendo uma interação significativa.

Tabela 2. Comprimento total (cm) das raízes aos cinco dias após a semeadura e submetidas ao tratamento com água e PEG6000.

Genótipos		PEG		Água*
PITIUBA	$6,36 \pm 1,8$	Bb	$20,5 \pm 3,7$	Aabc
PATATIVA	$5,00 \pm 1,2$	Bb	$20,7 \pm 5,4$	Aabc
EPACE 10	$6,16 \pm 0,5$	Bb	$15,2 \pm 2,4$	Acde
SEMPRE VERDE	$4,83 \pm 0,6$	Bb	$18,6 \pm 7,4$	Aabcd
SETENTÃO	$3,93 \pm 0,5$	Bb	$13,8 \pm 2,5$	Acde
PINGO DE OURO	$4,53 \pm 1,1$	Bb	$8,53 \pm 2,9$	Ae
PINGO DE OURO 1, 2	$6,7 \pm 1,0$	Bb	$25,8 \pm 4,4$	Aab
PAGEÚ	$4,16 \pm 1,8$	Bb	$17,0 \pm 1,9$	Aabcde
SANTO INÁCIO				
VERMELHO	$3,46 \pm 1,7$	Bb	$16,7 \pm 4,5$	Acde
CNCX 251-76E	$22,5 \pm 1,8$	Ba	$26,3 \pm 5,2$	Aa
ROXINHO 1	$3,6 \pm 0,6$	Bb	$17,5 \pm 3,2$	Aabcd
BRS PUNJANTE	$4,13 \pm 0,3$	Bb	$11,1 \pm 6,7$	Ade
PARAGUAÇU	$3,1 \pm 0,2$	Bb	$18,9 \pm 3,4$	Aabcd
BRS MARATAOÃ	$5,46 \pm 0,7$	Bb	$20,0 \pm 1,6$	Aabcd
BRS TUMUCUMAQUE	$2,86 \pm 0,2$	Bb	$13,6 \pm 2,3$	Acde

* Médias com as mesmas letras minúsculas na coluna e mesmas letras maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com mais ou menos o desvio padrão.

O genótipo CNCX 251-76E se destacou quanto ao comprimento final com o tratamento PEG6000 (polietileno glicol) (Figura 4). Price et al. (2002) citam o aumento do comprimento das raízes como resposta ao déficit hídrico. De acordo Taiz e Zeiger (2009), esse mecanismo pode ser considerado uma defesa contra a seca. Assim, o aumento do comprimento

do sistema radicular dos genótipos submetidas ao déficit hídrico simulado indica ser uma alternativa da planta de ir à busca de água que poderia estar em maior profundidade.

Figura 4. Comprimento da raiz do genótipo CNCX 251-76E submetido ao tratamento com PEG 6000



Alguns genótipos como CNCX 251-76E e Pingo de ouro 1,2 também diferiu dos demais quando submetido ao tratamento com água. Para este genótipo não se tem relatos quanto a sua tolerância a seca, já para o genótipo Pingo de Ouro 1,2, Nascimento et al. (2011) verificaram que este genótipo apresentou tolerância ao déficit hídrico (Figura 5).

Figura 5. Comprimento das raízes dos genótipos CNCX 251-76E e Pingo de Ouro 1,2, submetidos ao tratamento água, respectivamente.



A tolerância ao déficit hídrico varia com o genótipo, sendo que algumas plantas desenvolvem mecanismos de adaptação, tornando-se mais eficientes na absorção de água do solo, especialmente através do desenvolvimento de um extenso e profundo sistema radicular e de características da parte aérea, como adequação da área foliar, rápido fechamento dos estômatos e manutenção de uma reduzida temperatura foliar, dentre outros (CHAVES et al., 2004; REIS et al., 2006).

Tabela 3. Taxa de crescimento (cm dia⁻¹) das raízes aos cinco dias após a semeadura e submetidas ao tratamento com água e PEG6000.

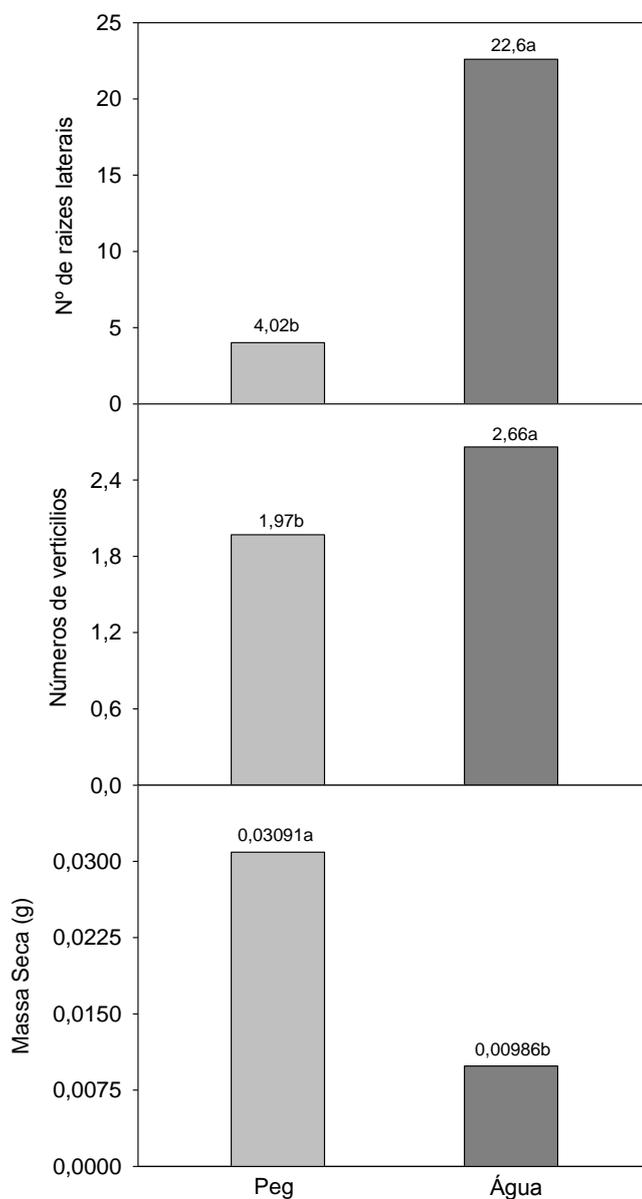
Genótipos	*Água		PEG	
PITIUBA	4,53 ± 0,7	Aab	1,23 ± 0,3	Bb
PATATIVA	4,68 ± 1,0	Aab	0,87 ± 0,3	Bb
EPACE 10	3,80 ± 0,4	Aabc	1,15 ± 0,1	Bb
SEMPRE VERDE	3,95 ± 1,4	Aab	0,87 ± 0,3	Bb
SETENTÃO	3,45 ± 0,5	Abc	0,71 ± 0,1	Bb
PINGO DE OURO	1,80 ± 0,5	Ac	0,86 ± 0,3	Bb
PINGO DE OURO 1, 2	5,59 ± 0,9	Aa	1,13 ± 0,2	Bb
PAGEÚ	3,90 ± 0,4	Aba	0,77 ± 0,3	Bb
SANTO INÁCIO				
VERMELHO	3,76 ± 0,9	Aabc	0,57 ± 0,05	Bb
CNCX 251-76E	5,58 ± 1,0	Aa	4,72 ± 0,4	Ba
ROXINHO 1	3,86 ± 0,6	Aab	0,52 ± 0,1	Bb
BRS PUNJANTE	2,78 ± 1,3	Abc	0,76 ± 0,3	Bb
PARAGUAÇU	4,44 ± 0,7	Aab	0,43 ± 0,05	Bb
BRS MARATAOÃ	4,55 ± 0,4	Aab	0,96 ± 0,14	Bb
BRS TUMUCUMAQUE	3,10 ± 0,5	Abc	0,35 ± 0,05	Bb

*Médias com as mesmas letras minúsculas na coluna e mesmas letras maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com mais ou menos o desvio padrão.

Em relação à taxa de crescimento, os genótipos CNCX 251-76E e Pingo de Ouro 1, 2 se destacaram, enquanto os demais se destacaram no tratamento água. No tratamento PEG6000 o genótipo que diferiu dos demais foi CNCX 251-76E, havendo uma maior taxa de crescimento.

Para número de raízes laterais, números de verticilos e massa seca da raiz (Figura 6), não houve diferença entre genótipos, apenas entre tratamentos com e sem PEG6000.

Figura 6. Na figura demonstra o número de raízes laterais, números de verticilos e massa seca da raiz dos tratamentos com e sem PEG6000.



Comparando os tratamentos, os genótipos submetidos ao tratamento PEG6000 apresentaram menor quantidade de raízes laterais. O mesmo ocorreu para o número de verticilos que foram menores no tratamento PEG6000.

Em relação à massa seca, as maiores médias foram observadas para o tratamento PEG6000. Távora e Melo (1991) descreveram que os principais mecanismos da planta para escapar do déficit hídrico são o aumento e aprofundamento da raiz, podendo ser pelo crescimento (alongamento celular) ou pelo ganho de massa seca (crescimento e aumento de espessura das paredes celulares).

Após as avaliações da raiz, os genótipos CNCX 251-76E e Pingo de Ouro 1,2 destacaram-se como tolerantes, visto que ambos mostraram bom desenvolvimento do sistema

radicular. Os genótipos que foram considerados susceptíveis ao déficit hídrico foram Pingo de Ouro, Santo Inácio Vermelho e BRS Tumucumaque por apresentarem raízes mais superficiais, bem como o menor comprimento e número médio de raízes.

Nascimento et al. (2011) ao estudarem a tolerância ao déficit hídrico em 20 genótipos de feijão-caupi no período reprodutivo, selecionaram entre os genótipos tolerante o Pingo de Ouro 1,2 com características tolerante a seca e os genótipos Pingo de Ouro e Santo Inácio Vermelho como intolerantes ao déficit hídrico moderado.

Estresse hídrico simulado com o método do *Screening Box*

A germinação de sementes e o crescimento inicial das plantas de todos os genótipos foram normais. Cerca de seis dias após o término da irrigação, os efeitos do estresse começaram a aparecer. Alguns genótipos se mostraram suscetíveis, e as diferenças entre eles se tornaram visível e progressivamente mais pronunciada com o avanço dos dias do estresse hídrico. Os efeitos do estresse foram vistos pela primeira vez nas folhas unifoliadas, que se tornaram murchas, seguido pelos trifólios emergentes e, finalmente, a própria ponta de crescimento seca.

Em relação ao teste de média houve diferença estatística entre os genótipos de feijão-caupi, de acordo com as plântulas murchas por dia (Tabela 4).

Tabela 4. Plantas Murchas por dia

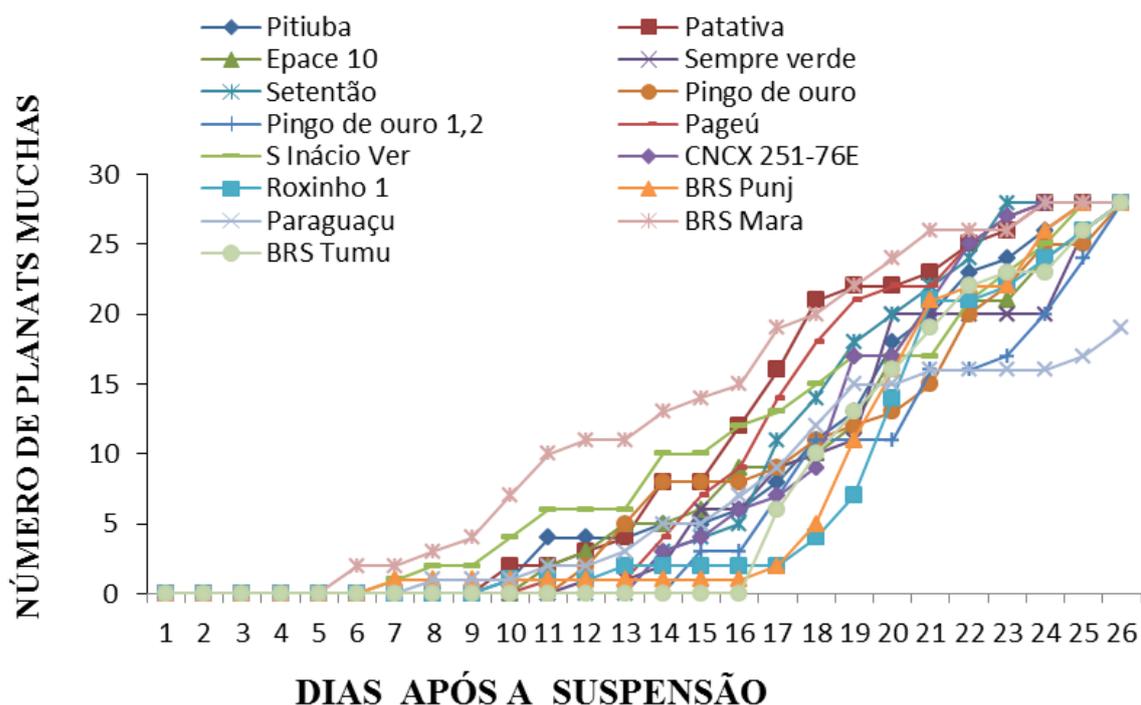
GENÓTIPOS	MÉDIAS
9	0.000000 a
8	0.000000 a
10	0.000000 a
14	0.000000 a
12	0.000000 a
5	0.000000 a
2	0.000000 a
1	0.000000 a
13	0.750000 a
15	1.750000 b
11	1.750000 b
3	1.750000 b
6	3.500000 b
7	3.500000 b
4	3.500000 b

Médias com as mesmas letras minúsculas, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade.

Os genótipos 9, 8, 10, 14, 12, 5, 2, 1 e 13 não diferindo estatisticamente entre si. Nesses genótipos apresentaram maior susceptibilidade ao déficit hídrico. Já os genótipos 15, 11, 3, 6,

7 e 4 foram selecionados como tolerantes, uma vez que mostraram um atraso no processo de murchamento.

A metodologia utilizada possibilitou identificar os genótipos com melhores características de tolerância e suscetibilidade ao déficit hídrico em nível de plântulas. E a partir da curva de murchamento permanente foi possível selecionar os genótipos mais suscetíveis que foram Santo Inácio Vermelho e BRS Tumucumaque. Os dados sobre a porcentagem de murcha em dias diferentes após o término da irrigação indicam estes genótipos como os mais suscetíveis à seca (Figura 7) e, outros dois genótipos, Pingo de Ouro 1,2 e BRS Marataoã como tolerantes à seca. No 14º dia após retenção de água, 32% das plantas de Santo Inácio e 54% das plantas do BRS Tumucumaque tinham murchado, enquanto Pingo de Ouro 1,2 e BRS Marataoã tinham 10% e zero murchamento, respectivamente. Os outros genótipos apresentaram variações de 21 a 43% quanto à porcentagem de murchamento. No 24º dia os genótipos suscetíveis já estavam 100% murchos enquanto os tolerantes ainda tinham plantas vigorosas. Figura 7. Curva de murcha ao longo dos dias após a suspensão da irrigação do experimento de Screening Box de 15 genótipos para tolerância à seca.



Este resultado corrobora com os resultados de Nascimento et al. (2011) e Oliveira et al. (2004) que demonstraram que os genótipos Pingo de Ouro 1,2 e BRS Marataoã apresentam características adequadas a tolerância ao déficit hídrico.

Barros et al. (2013), constataram que o genótipo Pingo de Ouro 1,2 apresentam ampla adaptabilidade e alta estabilidade aos ambientes do Nordeste do Brasil. Assim como a cultivar BRS-Marataoã é moderadamente tolerante ao déficit hídrico (EMBRAPA, 2004). Em relação aos genótipos identificados com maior sensibilidade ao déficit hídrico (Figura 7), na literatura, o genótipo Santo Inácio Vermelho apresenta características de sensibilidade ao déficit hídrico, porém a cultivar BRS Tumucumaque possui características de tolerância (EMBRAPA, 2009), o que não foi verificado neste estudo.

Essa metodologia foi utilizada com sucesso por Singh e Matsui (2002), que validaram esse método para rápida identificação de genótipos promissores para tolerância a seca e confirmaram o mesmo resultado utilizando outras metodologias com plantas em estádios mais avançados de desenvolvimento.

As duas metodologias demonstraram resultados semelhantes já que tanto os genótipos Pingo de Ouro 1,2 e Santo Inácio Vermelho mostraram resultados similares em ambas as metodologias utilizadas, corroborando com os resultados obtidos na literatura. Uma vez que os resultados de estresse simulado com PEG600 e o método do Screening Box são semelhantes, o método do Screening Box é mais prático e a capacidade de possibilitar grande número de plantas/ linhas, faz deste método útil para a identificação de germoplasma de feijão-caupi a esse tipo de estresse. Além disso, o método com PEG6000, mesmo levando menos tempo para o desenvolvimento do experimento é mais trabalhoso, é um método destrutivo das plântulas, diferente do método de caixas que é simples e não destrutivo, as plantas tolerantes à seca podem ser salvas e transplantadas para outros testes como teste de progênies e seleção.

CONCLUSÃO

As duas metodologias mostraram-se eficiente na seleção de genótipos de feijão-caupi. Entre os genótipos estudados o Pingo de Ouro 1,2 mostrou-se o mais tolerante ao déficit hídrico, assim como o Santo Inácio Vermelho foi o mais sensível à seca, em ambas as metodologias.

REFERÊNCIAS

ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; FAGLIARI, J. R.; SANTOS, J. L. influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n. 1, p. 98-106, 2007.

BARROS, M.A.; DE MOURA ROCHA, M.; GOMES, R.L.F.; DAMASCENO, K.J.; DAS NEVES, A.C. Adaptabilidade e estabilidade produtiva de feijão-caupi de porte semiprostrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.48, n.4, p. 403-410, 2013.

BRAGA, L.F.; SOUSA, M. P.; BRAGA, J.F.; SÁ, M. E. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, p. 95–102, 1999.

CHAVES, J.H.; REIS, G.G.; REIS, M.G.F.; NEVES, J.C.L.; PEZZOPANE, J.E.M.; POLLI, H.Q. Seleção precoce de clones de eucalipto para ambientes com disponibilidade diferenciada de água no solo: relações hídricas de plantas em tubetes. **Revista Árvore**, v. 28, p. 333-341, 2004.

DANTAS, J.P.; MARINHO, F.J.L.; FERREIRA, M.M.M. Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande**, v. 6, p. 425-430, 2002.

ECHER, F.R.; CUSTÓDIO, C.C.; HOSSOMI, S.T.; DOMINATO, J.C.; MACHADO NETO, N.B. Estresse hídrico induzido por manitol em cultivares de algodão. **Revista Ciência Agronômica**, p. 638-645, 2010.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- **BRS TUMUCUMAQUE: cultivar de feijão-caupi para o Estado do Amapá**. Macapá, AP: Embrapa Amapá, 2009, Não paginado. 1 folder.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- **BRS-Marataõa: cultivar de feijão-caupi com grão sempre verde**. Teresina: Embrapa Meio Norte, 2004. 8p.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GWATHMEY, C.O.; HALL, A.E. Adaptation to midseason drought of cowpea genotypes with contrasting senescence traits. **Crop Science**. v. 32, p.773-778, 1992.

LIMA, J.R.S.; ANTONINO, A.C.D.; SOARES, W.A.; SILVA, I.F. Estimativa da evapotranspiração do feijão-caupi utilizando o modelo de Penman-Monteith. **Irriga**, v.11, p.477-491, 2006.

LIMA, J.R.S.; ANTONINO, A.C.D.; SOARES, W.A.; SILVA, I.F. Estimativa da evapotranspiração do feijão-caupi utilizando o modelo de Penman-Monteith. **Irriga**, v. 11, p. 477-491, 1992.

MENDES, R. M. S.; TÁVORA, F.J.A.F.; PINHO, J.L.N.; PITOMBEIRA, J.B. Relações fonte-dreno em feijão-de-corda submetido à deficiência hídrica. **Ciência Agronômica**, v. 38, p.95-103, 2007.

NASCIMENTO, S.P D.; BASTOS, E.A.; ARAÚJO, E.C.; FREIRE FILHO, F.R.; SILVA, E.M.D. Tolerance to water deficit of cowpea genotypes. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, p. 853-860, 2011.

- OLIVEIRA, I.J.de.; FONTES, J.R.A.; DAMASCENO, K.J.E.S.; ROCHA, M.M. BRS Marataoã – Cultivar de Feijão-Caupi com Grão Sempre Verde para o Amazonas, 2004. **Comunicado Técnico**.
- PEREIRA, M.D.; LOPES, J.C. Germinação e desenvolvimento de plântulas de pinhão manso sob condições de estresse hídrico simulado, **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1837-1842, 2011.
- PRICE, A.H.; STEELE, K.A.; GORHAM, J.; BRIDGES, J.M.; MOORE, B.J.; EVANS, J.L.; RICHARDSON, P.; JONES, R.G.W. Upland rice grown in soil-filled chambers and exposed to contrasting water-deficit regimes. I. Root distribution, water use and plant water status. **Field Crops Res.**, v. 76, p. 11-24, 2002.
- REIS, G.G.; REIS M.G.F.; FONTAN, I.C.I.; MONTE, M.A.; GOMES, A.M.; OLIVEIRA, C.H.R. Performance of Eucalyptus spp. clones under different levels of soil water availability in the field-root and aboveground growth. **Rev Arvore.** v. 30, p. 921-931, 2006.
- SCOTT, A. J.; e KNOTT M. "A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance." *Biometrics* (1974): 507-512.
- SINGH, B.B.; MATSUI, T. "Cowpea varieties for drought tolerance." **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**, p. 287-300, 2002.
- SINGH B.B; MOHAN RAJ D.R.; DASHIELL K.E, JACKAI, L. **Advances in cowpea research**. IITA-JIRCAS, Ibadan, Nigeria, 1997.
- SINGH. B.B.; MAI-KODOMI, Y.; TERAO T. A simple screening method for drought tolerance in cowpea. **Indian J Gene.** v. 59, p.211–220, 1999a.
- SOUZA, G.M.; CARDOSO, V.J.M. Effects of different environmental stress on seed germination. **Seed Science Technology**, v.28, p. 621–630, 2000.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 819p, 2009.
- TÁVORA, F.J.A.F.; MELO, F.I. Respostas de cultivares de amendoim a ciclos de deficiência hídrica: Crescimento vegetativo, reprodutivo e relações hídricas. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 22, n. 01/02, p. 47-60, 1991.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI CONTRASTANTES PARA TOLERÂNCIA À SECA

RESUMO

Objetivou-se, com esse trabalho, compreender os mecanismos de tolerância por meio da caracterização fisiológica e bioquímica para tolerância à seca em genótipos de feijão-caupi contrastantes para essa característica. O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal Ceará. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), num arranjo fatorial 4x2, sendo o primeiro fator correspondente aos tratamentos e o segundo aos genótipos estudados, com 5 repetições. As plantas quando atingiram o período de pré-floração foram submetidas a quatro níveis de tratamento, os quais corresponderam: controle, condição moderada de déficit hídrico, condição severa de déficit hídrico e condição de reidratação das plantas. Foram caracterizadas as respostas fisiológicas, como trocas gasosas, florescência da clorofila e pigmentos fotossintéticos, determinação da peroxidação de lipídeos (MDA) e solutos orgânicos (Prolina, Carboidratos Solúveis e N-aminoácidos). Alguns mecanismos foram eficientes em evidenciar a tolerância do genótipo Pingo de Ouro 1,2, como a condutância estomática ao vapor d'água (gs), demonstrando eficiência no controle estômático; a razão da taxa de assimilação líquida e condutância estomática ao vapor d'água (A/g_s); a eficiência do uso da água (A/E), provando maior eficiência do uso da água no genótipo tolerante; a eficiência de carboxilação e a clorofila total que tiveram os seus valores recuperados quando o genótipo foi irrigado novamente após os quatro dias de déficit severo, demonstrando que este genótipo pode tolerar por mais tempo o período de seca.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, Déficit hídrico, Adaptabilidade à seca

CHAPTER 2
PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF COWPEA
GENOTYPES CONTRASTING FOR DRY TOLERANCE

ABSTRACT

The objective of this work was to understand the mechanisms involved in drought tolerance through physiological and biochemical characterization in contrasting cowpea genotypes for the mentioned trait. The experiment was carried out in the greenhouse located at the Federal University of Ceara, in Fortaleza, Brazil. The experimental design utilized was a completely randomized design (CRD), in a 4x2 factorial arrangement. The first correlated to the third, and the second one correlate to the studied genotypes, with five replications. The plants were submitted to four treatment levels when they reached the pre-flowering period: (a) control, (b) moderate water deficit, (c) severe water deficit and (d) rehydration conditions of the plants. Physiological responses, such as gas exchange, chlorophyll blooming to photosynthetic pigments, determination of lipid peroxidation (MDA) and organic solutes (Proline, Soluble Carbohydrates and N-amino acids) were characterized. Some mechanisms were efficient in evidencing the tolerance of “Pingo de Ouro 1.2” genotype, such as stomata conductance to water vapor (gs), demonstrating efficiency in the stomata control, the ratio of net assimilation rate and stomata conductance to steam water (A/g_s), water use efficiency (A/E), all providing greater efficiency of water use in the tolerant genotype. The carboxylation efficiency and the total chlorophyll that had their values recovered when the genotype was irrigated again. After four days of severe deficit, it was demonstrated that this genotype can tolerant a longer drought period.

Key-words: *Vigna unguiculata*, Water deficiency, Adaptability to drought

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é cultivado principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (NASCIMENTO et al., 2011). A cultura é de grande importância para a alimentação da população dessas regiões, principalmente as mais carentes, pois seus grãos são muito aceitos, possuem alto valor nutritivo e são relativamente mais acessíveis, constituindo-se um dos principais alimentos da dieta alimentar (SILVA et al., 2010).

Além de ser utilizado na alimentação humana, o feijão-caupi pode ser utilizado na alimentação animal, como forragem, e ainda como adubo verde e cobertura do solo (ANDRADE JÚNIOR et al., 2003). Desta forma, um dos objetivos da pesquisa com essa cultura é buscar variedades com maior produtividade. A utilização de variedades mais produtivas no sistema agrícola familiar é de grande importância econômica para o produtor rural (SANTOS et al., 2009). Entretanto, a região Nordeste tem uma condição comum de déficit hídrico, sendo um dos fatores que comumente reduzem a produtividade do feijão-caupi (MENDES et al., 2007).

A deficiência hídrica é uma situação comum a muitas culturas e constitui-se em um dos fatores que mais afeta a produção agrícola, influenciando praticamente todos os aspectos relacionados ao desenvolvimento vegetal (DAMATTA, 2007). Os danos provocados pelo estresse hídrico variam conforme a duração, intensidade, frequência, época de sua ocorrência e o genótipo. A frequência e a intensidade da deficiência hídrica constituem os fatores mais importantes à limitação da produção agrícola mundial (SANTOS e CARLESSO, 1998).

Apesar do feijão-caupi ser considerado tolerante a baixas condições de disponibilidade de água quando comparado a outras culturas, como por exemplo, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), o feijão-caupi é moderadamente sensível ao estresse hídrico (GWATHMEY e HALL, 1992; BELKO et al., 2012).

Segundo Lima et al. (2006), o requerimento de água desta cultura é variável com o seu estágio de desenvolvimento, aumenta de um valor mínimo na germinação até um valor máximo na floração e formação de vagens, decrescendo a partir do início da maturação.

Diante da importância do feijão-caupi para o Norte-Nordeste do Brasil, torna-se imprescindível a realização de estudos visando avaliar o desempenho de cultivares desenvolvidas para o cultivo em regime de sequeiro, frente às limitações hídricas impostas que ocorrem nas diferentes fases de crescimento da planta. Sousa et al. (2009) verificaram que o efeito do estresse hídrico em feijoeiro causa reduções nos componentes de produção e é mais severo quando ocorre nas fases de floração e frutificação. Já, Guimarães et al. (2006) também

constatarem que a deficiência hídrica nas plantas é tanto maior quanto menor o suprimento de água pelas raízes. No caso do feijão-caupi, alguns estudos sobre déficit hídrico foram realizados, tais como os de Bastos et al., 2012; Nascimento et al., 2004; Santos et al. 2010 e Nascimento et al., 2011. Embora existam trabalhos relacionados com o déficit hídrico em plantas ainda são incompletas as informações sobre os mecanismos que conferem tolerância à seca.

Nos programas de melhoramento de feijão-caupi a seleção de genótipos com características de tolerância à seca é importante para garantir a produção, principalmente nas regiões do semiárido onde, ocorre má distribuição de chuvas e, nos últimos anos, vem se constatando períodos prolongados de seca. Com isso, objetivou-se com o presente trabalho compreender os mecanismos de tolerância por meio da caracterização fisiológica e bioquímica para tolerância à seca em genótipos de feijão-caupi contrastantes.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na horta da Universidade Federal do Ceará, no período de julho a agosto de 2015, com temperatura ambiente de 35 ± 5 °C e umidade relativa de $70 \pm 20\%$. As sementes de feijão-caupi da cultivar Pingo de Ouro 1,2 (genótipo tolerante ao déficit hídrico), cedidas pela Empresa Embrapa Meio-Norte e da variedade Santo Inácio vermelho (genótipo sensível ao déficit hídrico), cedidas pelo Banco de Germoplasma da Universidade Federal do Ceará, foram utilizadas no trabalho. As sementes de cada genótipo foram semeadas três a três em vasos de 11L em substrato contendo areia, húmus de minhoca e vermiculita, na proporção 6:3:1, onde foram irrigadas todos os dias, realizando-se o desbaste aos 10 dias após a semeadura (DAS).

Quando as plantas atingiram o período de pré-floração foram aplicados os tratamentos, os quais corresponderam a (1) Controle – condições de plena irrigação; (2) Condição moderada de déficit hídrico com um potencial hídrico na antemanhã (Ψ_{am}) de $-1,0 \pm 0,1$ MPa; (3) Condição severa de déficit hídrico ($-1,5 \pm 0,1$ MPa) e (4) Condição de reidratação das plantas. No quarto tratamento as plantas ao atingirem o déficit severo foram reidratadas pela retomada da irrigação e avaliadas após quatro dias da reidratação, a fim de avaliar as respostas de recuperação à seca.

A coleta dos dados foi realizada no momento em que as plantas alcançaram o potencial hídrico desejado por meio de medições com uma bomba de pressão tipo Sholander.

As folhas e raízes de feijão-caupi foram coletadas e armazenadas em envelopes de papel aluminizado, congeladas com nitrogênio líquido, e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até posterior uso. As mesmas foram secas em liofilizador e, em seguida, maceradas, até obter um pó fino, o qual foi armazenado.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), num arranjo fatorial 4x2, sendo o primeiro fator correspondente aos tratamentos e o segundo aos genótipos estudados, com 5 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo realizada a comparação entre as médias pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%, com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Para elaboração dos gráficos o programa utilizado foi o SigmaPlot 11.0 (2008).

Caracterização das respostas fisiológicas

Avaliou-se o potencial hídrico foliar (Ψ_w) após 10 dias da imposição do déficit entre 05h30min e 06h30min da manhã em folhas totalmente expandidas do quarto ou quinto trifólio a partir do ápice, por meio de uma bomba de pressão do tipo Scholander (SCHOLANDER et al., 1965).

Trocas gasosas

Para as trocas gasosas foram avaliadas: a taxa de assimilação líquida do CO_2 (A), a condutância estomática ao vapor d'água (g_s), a taxa transpiratória (E), a concentração interna do CO_2 (C_i) e a razão interna e externa de carbono (razão C_i/C_a) e a eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s), obtidas através de um IRGA modelo portátil LI-6400XT, LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA. A eficiência instantânea do uso da água foi calculada pela razão A/E e a eficiência instantânea de carboxilação pela razão A/C_i .

Fluorescência

As variáveis de fluorescência da clorofila a foram obtidas na mesma área da folha em que foram realizadas as medidas das trocas gasosas, usando-se um fluorômetro acoplado ao IRGA. As variáveis de indução da fluorescência obtidas foram: fluorescência inicial (F_0); fluorescência máxima (F_m); fluorescência variável (F_v), determinada pela diferença entre F_0 e F_m . Com os valores de F_v e F_m foi obtido a eficiência fotoquímica potencial do PSII (F_v/F_m) (GENTY et al., 1989). Também foi avaliada a taxa de transporte de elétrons (ETR) e a eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema 2 (ϕ PSII).

Pigmentos Fotossintéticos

Os teores das clorofilas *a* e *b*, das clorofilas totais e dos carotenóides foram determinados através do método descrito por Wellburn (1994). Três discos medindo 1,0 cm de diâmetro foram retirados do primeiro par de folhas completamente expandidas e colocados em tubos de ensaio contendo 2 mL de uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) saturada com CaCO₃, os quais foram previamente revestidos com papel alumínio e permaneceram tampados durante toda a análise. Em seguida, as amostras foram incubadas a 65 °C, em banho-maria, por 30 min. Decorrido esse tempo, e após terem atingido a temperatura ambiente, os discos foliares foram reservados e o extrato de pigmentos foi utilizado para a determinação da absorbância a 665, 649 e 480 nm. Por fim, os discos foliares foram lavados, para a retirada do excesso de solução, e secos a 60 °C, por 48 h, em estufa, para a obtenção de sua massa seca. Os teores de clorofila *a* (C_a), clorofila *b* (C_b), clorofila total (C_t) e carotenoides foram calculados com base nas seguintes equações:

$$C_a = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649});$$

$$C_b = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665});$$

$$C_t = (7,15 \times A_{665}) + (18,71 \times A_{649});$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 \times A_{480} - 1,29 \times C_a - 53,78 \times C_b) / 220,$$

em que *A* representa a absorbância em um respectivo comprimento de onda. O resultado foi expresso em µg mL⁻¹.

Após a leitura nos respectivos comprimentos de onda, os discos foram lavados para retirada do excesso de DMSO e, em seguida, levados a estufa a 65 °C para obtenção do peso seco. O resultado final foi expresso em mg g⁻¹ MS.

Determinação da peroxidação de lipídeos

A determinação da peroxidação dos lipídios foi inferida através da quantificação dos teores de malondialdeído (MDA), produzido pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), como descrito previamente por Heath e Packer (1968). Os teores de MDA foram expressos em ηmol. g⁻¹ MS.

Solutos Orgânicos

Os teores de prolina livre foram determinados de acordo com Bates et al. (1973), em tubos de ensaio contendo 1 mL do extrato convenientemente diluída, foram adicionados 1 mL de ninhidrina ácida e 1 mL de ácido glacial. Os teores de prolina foram estimados tendo como

referência uma curva padrão de prolina e utilizando-se o tolueno como branco. Cada extrato e suas repetições foram dosadas em duplicata sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol. g}^{-1}\text{MS}$.

Os valores para carboidratos solúveis foram obtidos conforme metodologia de Dubois et al. (1956), em alíquotas de 0,5 mL dos extratos convenientemente diluídos, foram adicionados 0,5 mL de feno a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. Após agitação vigorosa, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 15 min para o seu resfriamento. Em seguida, as amostras foram submetidas à leitura por meio de uma curva padrão de glicose D (+) anidra. Cada extrato e suas repetições foram dosadas em duplicata, sendo resultados expressos em $\mu\text{mol. g}^{-1}\text{MS}$.

Os de N-aminossolúveis, foram determinados de acordo com o método de Yemm e Cocking (1955). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL do extrato bruto, devidamente diluído, 0,25 mL de tampão citrato a 0,2 M (pH 5,0), 0,5 mL de cianeto de potássio a 0,2 mM em metilcelosolve a 100% e 0,1 mL de ninhidrina a 5% em metilcelosolve a 100%. Em seguida, os tubos foram fechados, agitados e mantidos em banho-maria a 95 °C, durante 20 min. A reação foi interrompida abruptamente colocando-se os tubos em banho de gelo, e após o resfriamento, foram adicionados 0,65 mL de etanol a 60%. Os teores de N-aminossolúveis foram estimados através de leituras de absorvância em 570 nm, e a curva padrão foi ajustada a partir de soluções com concentrações crescentes de glicina. Os resultados de N-aminossolúveis foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ sendo cada extrato dosado em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

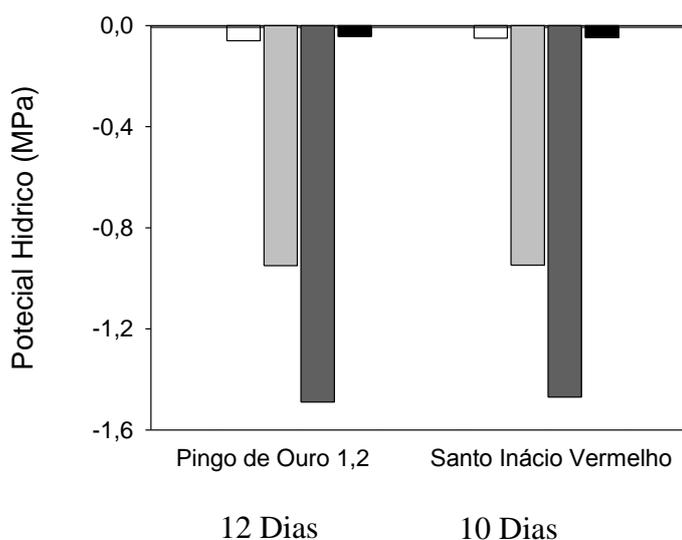
Potencial Hídrico

Nas plantas controle de ambos os genótipos de feijão-caupi (Santo Inácio Vermelho, sensível e Pingo de Ouro 1,2, tolerante), o potencial hídrico da antemanhã (ψ_{am}) foi sempre em torno de -0,04MPa (Figura 1).

As plantas do genótipo Santo Inácio Vermelho alcançaram o ψ_{am} em torno de -1,0 e -1,5 MPa, no décimo dia após a suspensão da irrigação. Por sua vez, as plantas do genótipo Pingo de Ouro 1,2 demandaram um maior tempo para atingir os mesmos níveis de ψ_{am} , cerca de doze dias (Figura 1). Estes resultados mostram que se tem uma melhor economia hídrica no genótipo Pingo de Ouro 1,2. Turner (1997) classifica este cultivar como tolerante à seca, com alto potencial hídrico e acrescenta que a tolerância desta planta ao déficit hídrico parece ser um importante mecanismo de resistência para manter o processo produtivo em condições de baixa disponibilidade de água às plantas.

É importante ressaltar que outro grupo de plantas, dos dois genótipos, ao alcançarem o potencial hídrico severo (-1,5 MPa) foram reirrigados, e quatro dias após a suspensão da irrigação recuperaram totalmente o *status* hídrico inicial, atingindo ψ_{am} de -0,04 MPa no genótipo sensível e de -0,045 MPa no genótipo tolerante.

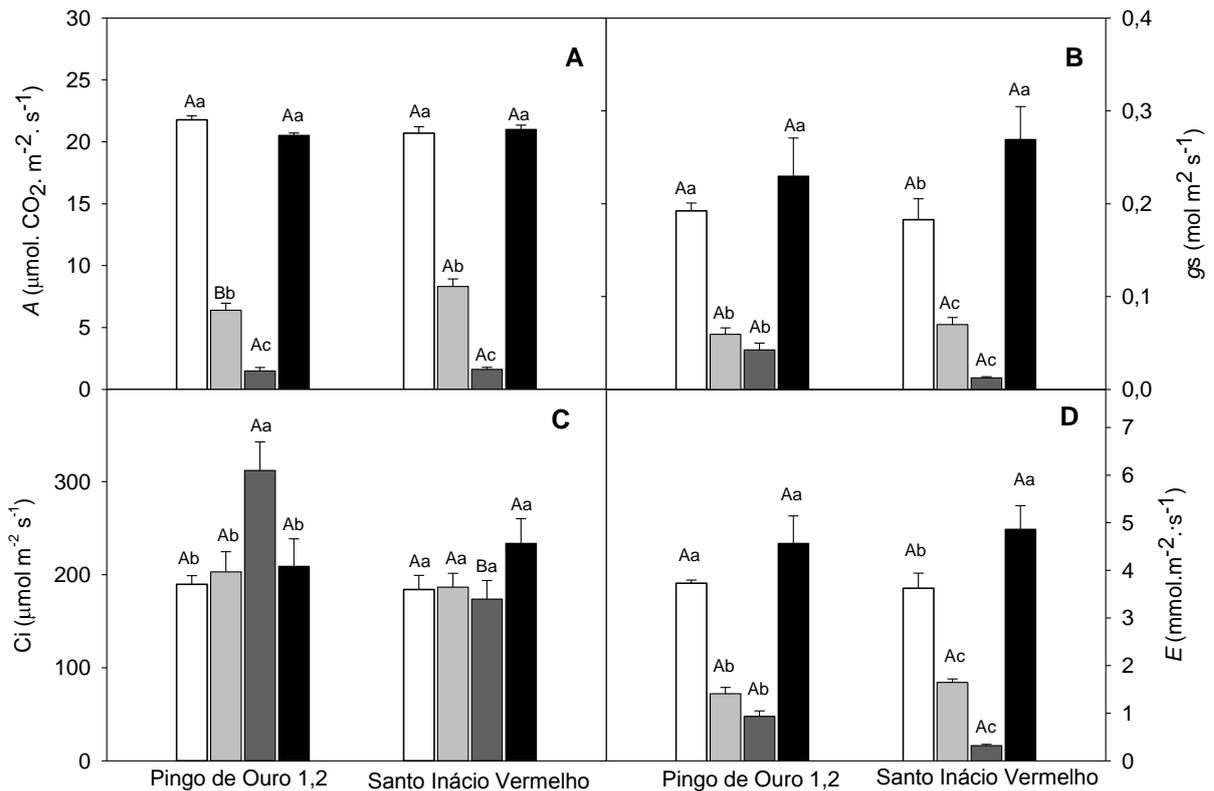
Figura 1. Potencial Hídrico (MPa) dos genótipos de feijão-caupi, Santo Inácio Vermelho e Pingo de Ouro 1,2. (□) Tratamento Irrigado, (▨) Tratamento Moderado, (▩) Tratamento Severo e (■) Tratamento Reirrigado.



Trocas gasosas

Na ausência de estresse, a taxa fotossintética líquida (A) foi igual para ambos os genótipos Pingo de Ouro 1,2 e Santo Inácio Vermelho, sendo esta em torno de $21 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e, sempre menor, em ambos na presença de estresse, diferindo estatisticamente entre os genótipos apenas no déficit moderado (Figura 2 A), fato também verificado por diversos autores em outros genótipos como gergelim e algodão herbáceo (SOUZA et al., 1997, SOUZA et al., 2000 e BELTRÃO et al., 2000). Observando ainda a mesma figura, verifica-se que a retomada da irrigação permitiu uma recuperação total na taxa fotossintética de ambos os genótipos, indicando que os efeitos negativos do déficit severo na fotossíntese foram revertidos (Figura 2 A). A fotossíntese líquida é reduzida com o efeito do estresse hídrico, e a mesma é considerada a principal da natureza e geradora de todas as substâncias orgânicas (Beltrão et al., 2003).

Figura 2. Trocas Gasosas (taxa de assimilação líquida do CO₂ (A), condutância estomática ao vapor d'água (gs), taxa transpiratória (E) e concentração interna do CO₂ (Ci)) dos genótipos de feijão-caupi, Santo Inácio Vermelho e Pingo de Ouro 1,2. (□) Tratamento Irrigado, (▨) Tratamento Moderado, (▩) Tratamento Severo e (■) Tratamento Reirrigado. Cada barra representa a média ± erro padrão (n=5, onde n representa o número de plantas).



Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em genótipos diferentes, e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre médias dentro de um mesmo genótipo (Tukey, $p < 0,05$). Os dados representam a média ± erro padrão (n=5).

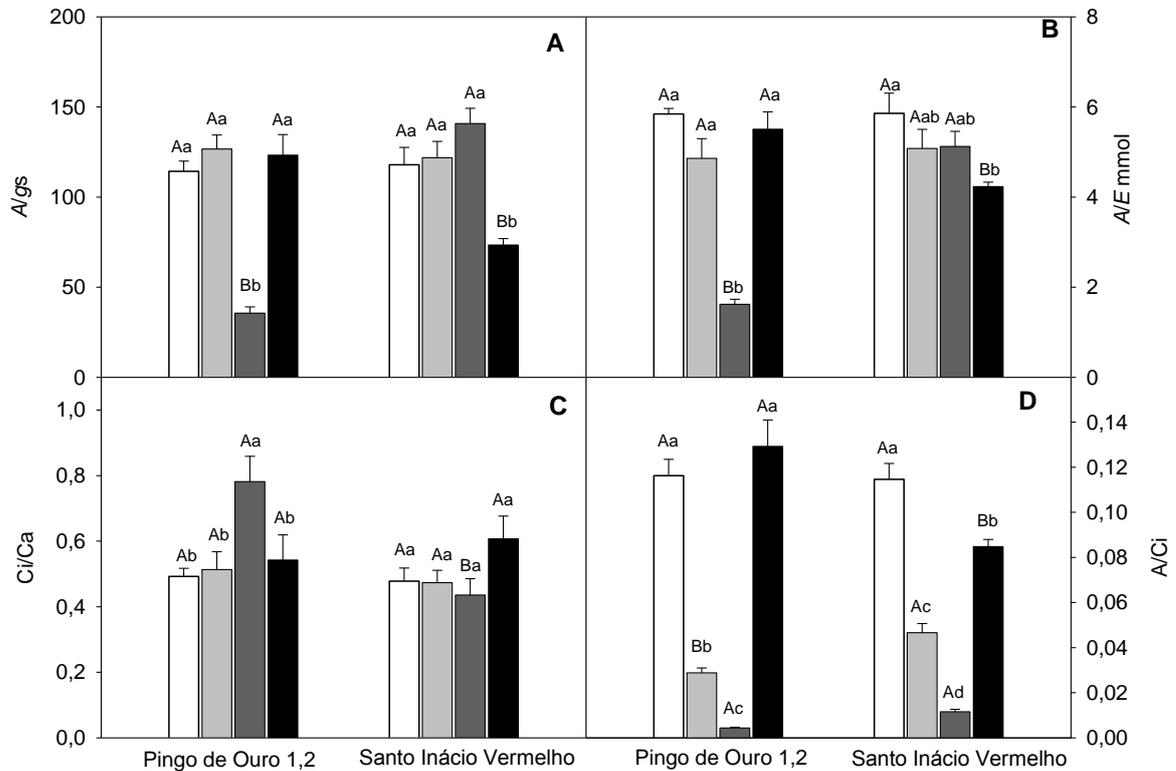
Em relação a condutância estomática ao vapor d'água (gs), não houve diferença estatística entre os genótipos. Já entre genótipos versus tratamento para o genótipo Santo Inácio Vermelho observou-se, uma variação na gs de $0,06 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $0,01 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para os tratamentos sob déficit moderado e déficit severo respectivamente (Figura 2 B), resultados que se assemelham aos de Endres et al. (2010) que verificaram, em feijoeiro comum, uma gs de $0,01 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, chegando quase ao total fechamento dos estômatos, resultado de um estresse hídrico severo. O genótipo Pingo de ouro 1,2 apresentou maior valor de gs em relação ao outro genótipo, sob condições de deficiência hídrica severa demonstrando eficiência no controle

estomático, passível de permitir uma alta atividade fotossintética, o que é desejável para genótipos mais tolerantes à seca (KRAMER e BOYER, 1995). Com relação à concentração interna do CO₂ (*C_i*), ocorreu um aumento na taxa, no genótipo tolerante no tratamento severo e diminuição no sensível no mesmo tratamento (Figura 2 C). Evidencia-se, portanto, uma diferença entre os tratamentos do genótipo tolerante, não ocorrendo diferença no sensível.

Os genótipos reduziram a transpiração (*E*) quando submetidos ao déficit hídrico com maior intensidade na redução no déficit severo do genótipo Santo Inácio vermelho (Figura 2D). Segundo Nascimento et al. (2011) um dos principais mecanismos de adaptação da cultura ao déficit hídrico é evitar a desidratação dos tecidos, embora isto resulte na diminuição de sua capacidade produtiva, sobretudo quando o estresse é prolongado. Para Laffay e Louguet, (1990), o feijão-caupi apresenta, simultaneamente, um rápido fechamento e alta tolerância protoplasmática, estratégias adaptativas que não são opostas, permitindo aos melhoristas vegetais levar em conta essas duas características em estudos de tolerância à seca.

A relação eficiência do uso da água, (*A/E*) [(μmol m⁻² s⁻¹) (mmol H₂O m⁻² s⁻¹)⁻¹] no tratamento severo foi menor no genótipo Pingo de Ouro 1,2 (Figura 3 B), porém as demais foram maiores, esse resultado mostra que este genótipo teve uma maior eficiência do uso da água instantânea (*A/E*).

Figura 3. Trocas Gasosas (razão da taxa de assimilação líquida e condutância estomática ao vapor d'água (A/g_s), eficiência instantânea do uso da água (A/E), razão interna e externa de carbono (razão C_i/C_a), e a eficiência instantânea de carboxilação pela razão (A/C_i) dos genótipos de feijão-caupi, Santo Inácio Vermelho e Pingo de Ouro 1,2. (□) Tratamento Irrigado, (▤) Tratamento Moderado, (▥) Tratamento Severo e (■) Tratamento Reirrigado.



Cada barra representa a média \pm erro padrão ($n=5$, onde n representa o número de plantas). Estatística figura 2.

Na figura 3 A, observamos que houve diferença estatística entre os genótipos nos tratamentos severo que foi maior no genótipo sensível e no tratamento reirrigado que este foi maior no tolerante. No genótipo Pingo de Ouro 1,2 quando comparamos tratamentos versus genótipo houve diferença estatística entre os tratamentos sendo que o tratamento reirrigado obteve recuperação total, já que não diferiu do controle. Para o genótipo Santo Inácio Vermelho também houve diferença estatística entre os tratamentos, porém diferente do genótipo tolerante, o mesmo não conseguiu recupera-se ao ser irrigado novamente.

Para razão interna e externa de carbono (razão C_i/C_a) (Figura 3 C), houve diferença estatística entre os genótipos somente no tratamento sob deficit severo, onde foi maior no genótipo tolerante, já em relação genótipo quando comparados com os tratamentos houve diferença estatística somente no genótipo sensível, onde o deficit severo diferiu-o dos demais.

A eficiência de carboxilação (A/C_i) [$(\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}) (\mu\text{mol mol}^{-1})^{-1}$], houve diferença estatística entre os genótipos nos tratamentos moderado que foi maior no sensível e no reirrigado que foi maior no tolerante. Também foi observado que com a imposição do déficit ocorreu uma redução progressiva nesta relação em ambos os genótipos nos déficits moderado e severo, recuperada somente no genótipo tolerante após reidratação (Figura 3 D). Esse resultado evidencia uma maior eficiência de carboxilação do genótipo tolerante, associada à sua maior capacidade fotossintética (Figura 3 A).

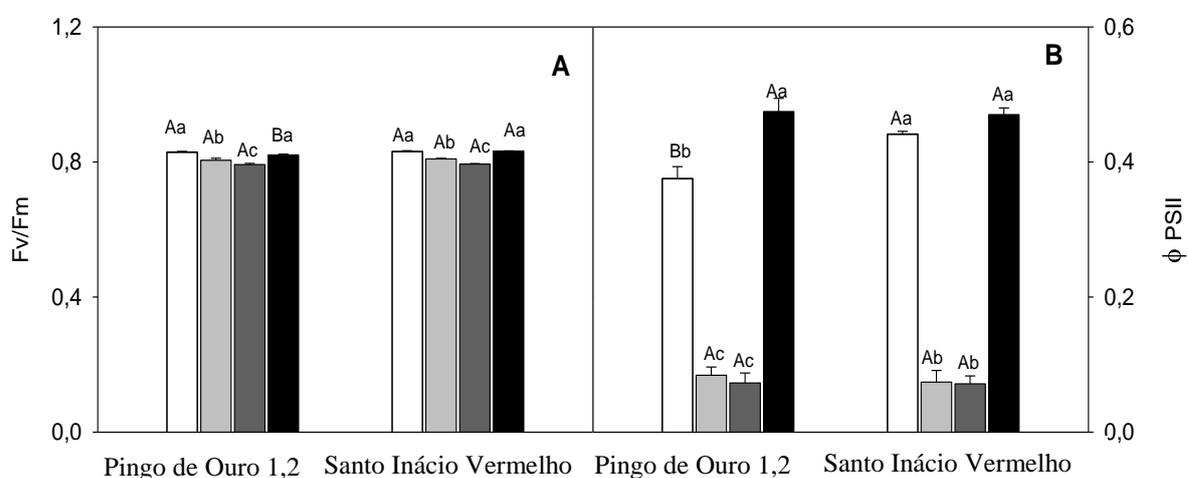
Fluorescência

Com relação à eficiência fotoquímica potencial do PSII, houve diferença significativa na razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima da clorofila (F_v/F_m), somente no tratamento reirrigado entre os genótipos, as demais se mantiveram inalteradas (Figura 4 A). Porém, quando se avaliam os genótipos separadamente, ambos tiveram uma redução em F_v/F_m , indicando um possível dano fotoinibitório. A relação (F_v/F_m) tem sido utilizada para detectar perturbações no sistema fotossintético causada pelo estresse, visto que sua diminuição indica um declínio na eficiência fotoquímica do PSII e um distúrbio ou dano no aparato fotossintético (GLYNN et al., 2003). De acordo com Bolhàr-Nordenkampf et al. (1989), quando uma planta não está submetida ao estresse, a razão F_v/F_m deve ser de 0,75 a 0,85. Os valores referentes à razão F_v/F_m durante os dias sem irrigação, para as cultivares estudadas, foram sempre entre estes valores de referência, ou seja, esse comportamento poderia indicar dano menos severo ao PSII.

A cultivar Pingo de Ouro 1,2 apresentou menor ϕ PSII em relação à variedade Santo Inácio vermelho no tratamento irrigado (Figura 4 B), não diferindo dos demais tratamentos. Ocorreu uma redução no ϕ PSII nos dois genótipos sob estresse hídrico, essa redução está associada à redução em A (Figura 2 A), provavelmente devido à baixa disponibilidade de CO_2 em consequência da diminuição da g_s (Figura 2 B).

Sabe-se que o PSII é responsável pelo fornecimento de energia para a fotossíntese, a avaliação de sua eficiência mediante medidas da emissão de fluorescência pode ser usada como indicador dos danos causados por vários tipos de estresse, gasoso (encharcamento do solo, inundação), déficit hídrico e salino (DURING, 1998).

Figura 4. Florescência: A) eficiência fotoquímica potencial do PSII (Fv/Fm); B) e a eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema 2 (ϕ PSII) dos genótipos de feijão-caupi, Santo Inácio Vermelho e Pingo de Ouro 1,2. (□) Tratamento Irrigado, (▨) Tratamento Moderado, (▩) Tratamento Severo e (■) Tratamento Reirrigado.

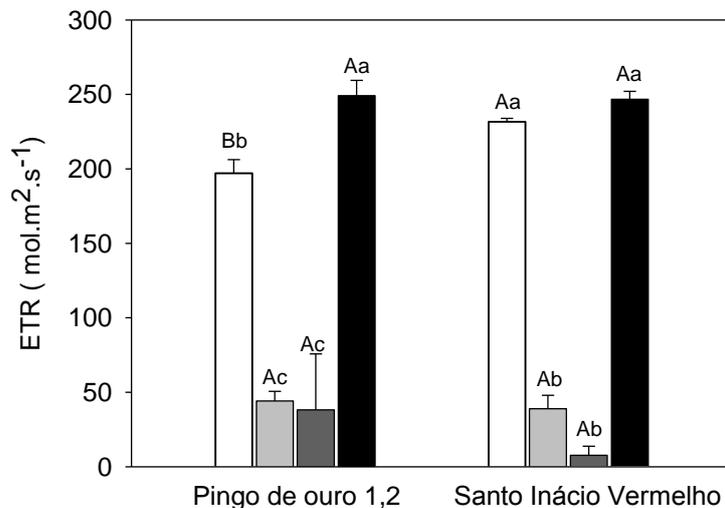


Cada barra representa a média \pm erro padrão (n=5, onde n representa o número de plantas). Estatística figura 2

Na presença de estresse hídrico, a taxa de transporte de elétrons (*ETR*) foi reduzida de forma proporcional com o nível de estresse em ambos os genótipos (Figura 5), sendo que os mesmos não diferiram em quase todos os tratamentos, diferindo apenas no tratamento reirrigado, sendo maior na variedade sensível (Figura 5).

Na ausência de estresse e sob déficit hídrico, houve um paralelismo entre a redução da *ETR* e a *A*, de modo que o genótipo sensível apresentou uma maior taxa de *ETR* no controle e maiores valores de *A* no tratamento moderado (Figura 5, Figura 2 A). Outro fator observado é que em ambos os genótipos houve um aumento no tratamento reirrigado. O *ETR* aumenta conforme a intensidade de luz, até que ocorra a saturação dos carreadores de elétrons. Em alguns casos, a curva de *ETR* pode estar correlacionada à taxa fotossintética bruta (A_G) (MOHAMMED et al., 1995).

Figura 5. Taxa de transporte de elétrons (ETR) (□) Tratamento Irrigado, (▨) Tratamento Moderado, (▩) Tratamento Severo e (■) Tratamento Reirrigado.

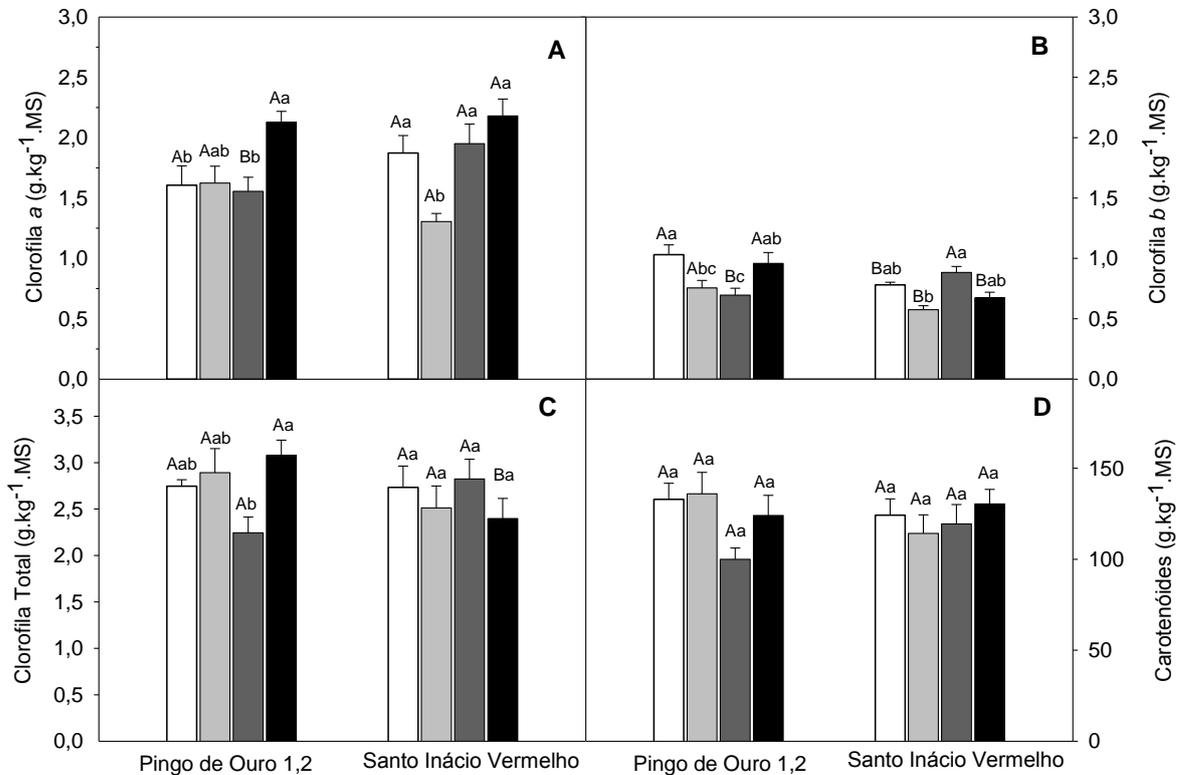


Cada barra representa a média \pm erro padrão (n=5, onde n representa o número de plantas).
Estatística figura 2

Pigmentos fotossintéticos

Com relação aos teores de pigmentos, verificou-se um menor teor de clorofila *a* no cultivar tolerante em relação à variedade sensível, no tratamento sob déficit severo, não diferindo estatisticamente nos demais tratamentos (Figura 6 A). Na variedade sensível observa-se uma redução nos tratamentos moderado e sensível em relação ao tratamento controle, seguido de um aumento no tratamento reirrigado (Figura 6 A). Para o genótipo tolerante os teores de clorofila *a* se mantiveram constantes no controle, moderado e severo, havendo um aumento no reirrigado (Figura 6 A). Com relação à clorofila *b* foi observado diferença significativa entre os genótipos nos tratamentos controle, moderado e reirrigado, sendo que o tolerante apresentou maiores teores. Já sob déficit severo houve uma redução em relação ao genótipo sensível (Figura 6 B). Em relação aos teores de clorofila total, só houve diferença no tratamento reirrigado entre os genótipos (Figura 6 C). No genótipo tolerante ocorreu uma redução seguida de um aumento nos déficit severo e reirrigado, respectivamente. Para o sensível, os teores se mantiveram constantes (Figura 6 C). Já em relação aos teores de carotenóides observa-se que não houve nenhuma diferença entre os genótipos e tratamentos (Figura 6 D).

Figura 6. Teores de pigmentos em cultivares de feijão-caupi. Clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenóides (D). (□) Tratamento Irrigado, (▨) Tratamento Moderado, (▩) Tratamento Severo e (■) Tratamento Reirrigado. Estatística figura 2.



Em tratamentos sob déficit hídrico, os teores de clorofila *a* são reduzidos devido à formação e, conseqüentemente, ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que promovem danos gradativos nas moléculas de clorofila. Já para a clorofila *b*, certamente, está relacionada à degradação dos cloroplastos (CARVALHO et al., 2003). Essa diminuição de clorofilas pode ser uma consequência do rompimento de membranas dos tilacóides, sendo liberado o conteúdo anteriormente presente dentro do cloroplasto, inclusive a clorofila *b*, para o citosol (MARCONDES e GARCIA, 2009).

Os resultados dos teores total de clorofila foram semelhantes ao obtido por Nascimento et al. (2011), quando estudavam o comportamento de genótipos de feijão-caupi sob déficit hídrico. Estes autores constataram que a redução na disponibilidade hídrica do solo fez com que houvesse decréscimo nos teores dos pigmentos clorofilianos nas folhas dos genótipos estudados. Ainda os mesmos autores estudando o cultivar pingo de ouro 1,2 sob déficit hídrico apresentou uma característica marcante, quando as plantas submetidas ao estresse hídrico se comportaram de forma semelhante às sob irrigação plena, o mesmo foi observado neste trabalho. Estatisticamente os valores do tratamento controle e dos tratamentos impostos a déficit

hídrico não diferiram. Essa resposta apresentada pode ser uma característica importante, pois, pode aumentar sua eficiência na absorção de radiação solar, consequentemente maior taxa fotossintética.

Peroxidação de lipídeos (MDA)

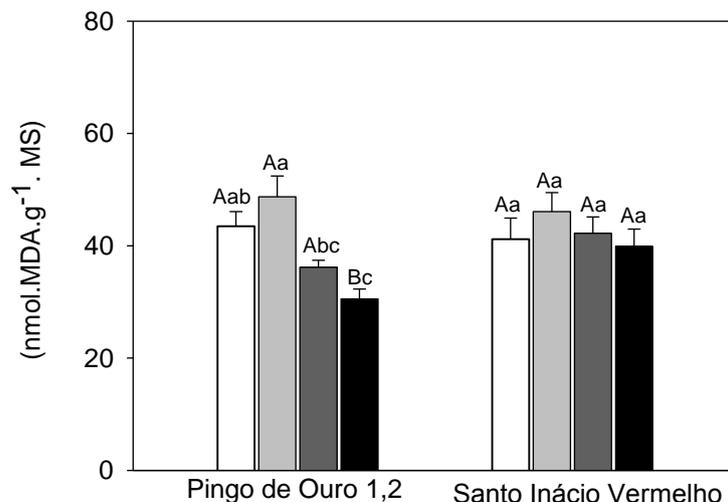
Os danos celulares foram avaliados pela peroxidação de lipídeos através da quantificação dos teores de malondialdeído (MDA) em folhas.

A peroxidação lipídica aumentou no genótipo tolerante sob condição de déficit moderado em comparação com os grupos severo e reirrigado, sendo que o mesmo não diferiu do controle (irrigado) (Figura 7), e o genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) apresentou valores semelhantes ao tolerante (Pingo de ouro 1,2) em quase todos os regimes hídricos (Figura 7). Para o genótipo tolerante houve uma redução no dano oxidativo no tratamento reirrigado, sendo que o seu valor foi ainda inferior ao tratamento controle, indicando que não foi alcançada uma recuperação completa do dano oxidativo após 4 dias de reirrigação (Figura 7). Já na variedade sensível, o dano oxidativo, após a reirrigação, foi semelhante ao tratamento controle.

Danos em membranas a nível foliar podem ser um dos primeiros sinais ao estresse (FAROOQ et al., 2009). Segundo Rosales et al. (2012), genótipos de feijão carioca susceptíveis ao estresse hídrico em condições de restrição hídrica apresentam maiores concentrações de indicadores de estresses oxidativos, como a concentração de malondialdeído (MDA), que está relacionado à degradação da membrana plasmática celular, e aumento de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas. Em contraste, genótipos tolerantes apresentam mecanismos para não alterar a concentração destes compostos durante o estresse hídrico.

Sob estas condições de estresse, as plantas tendem a aumentar a atividade de peroxidases e, às vezes, é a primeira enzima a ter a atividade alterada, independente do substrato utilizado ou do estresse aplicado (SIEGEL, 1993). A variação na atividade de peroxidase pode ser uma adaptação do tecido vegetal a esta condição (GASPAR et al., 1985).

Figura 7. Teores de malondialdeído de feijão-caupi. (□) Tratamento Irrigado, (▨) Tratamento Moderado, (▩) Tratamento Severo e (■) Tratamento Reirrigado. Estatística figura 2.



Solutos orgânicos

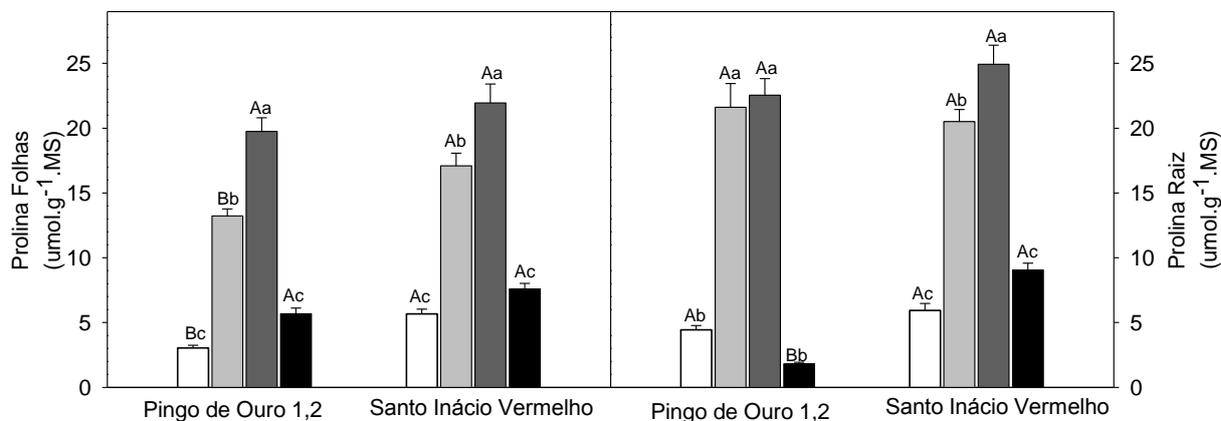
Prolina

O déficit hídrico alterou os teores de prolina de forma diferencial entre os genótipos estudados. Nas folhas, o acúmulo de prolina foi maior no tratamento severo em ambos os genótipos (Figura 8 A). Na variedade sensível os teores de prolina foram maiores nos tratamentos moderado e controle em relação a cultivar tolerante.

Nas raízes, para o cultivar pingo de ouro 1,2, houve um aumento de prolina nos tratamentos moderado e severo, o mesmo ocorreu no Santo Inácio Vermelho (Figura 8 B). O que se observa é que esse acúmulo de prolina ocorre quando as plantas são submetidas ao déficit hídrico. Segundo Costa et al. (2003), o acúmulo de prolina ocorre em várias espécies, geralmente em resposta a estresses prolongados, sendo tal resposta também observada no feijão-caupi.

A síntese de osmólitos, incluindo prolina, é amplamente usada por plantas para estabilizar as membranas e manter a conformação de proteínas sob baixo potencial de água (EFEOĞLU et al., 2008). A síntese e acúmulo de osmólitos variam entre espécies vegetais, assim como em diferentes cultivares da mesma espécie. A prolina é também conhecida por estar envolvida em reduzir danos nos tilacóides das membranas, agindo como um eliminador de radicais livres, como oxigênio singlete (Reddy et al., 2004).

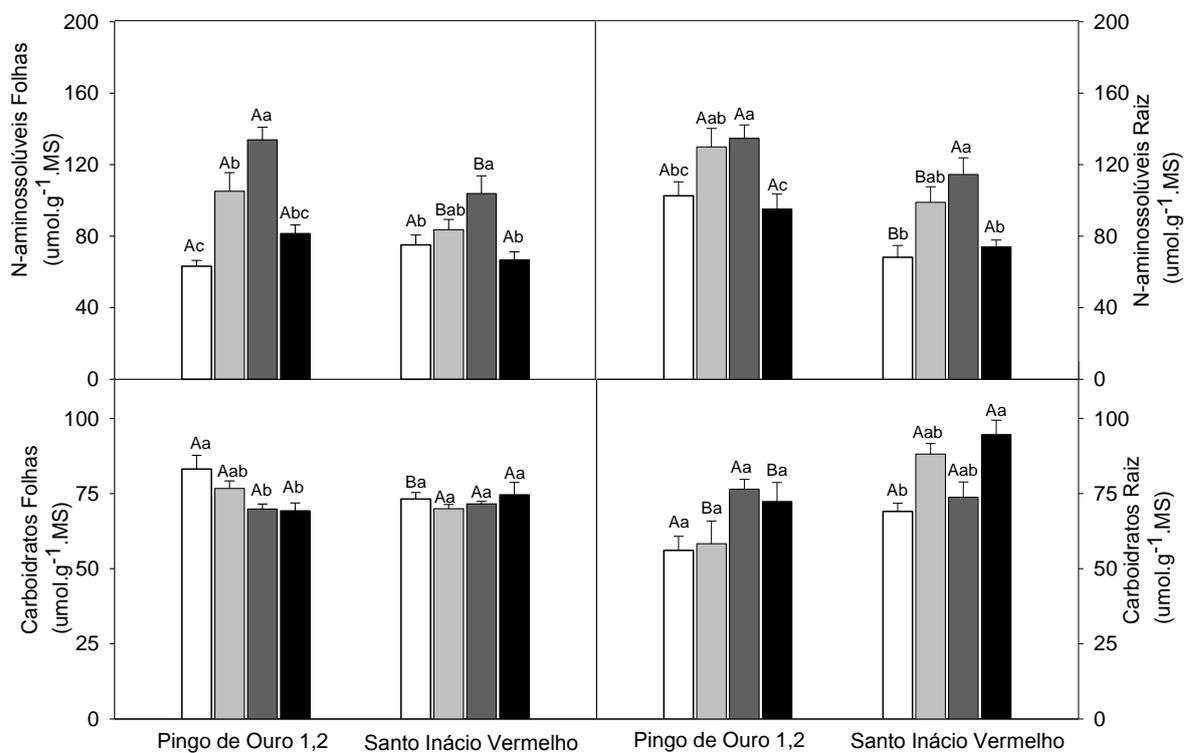
Figura 8. Teores de Prolina de feijão-caupi (□) Tratamento Irrigado, (▨) Tratamento Moderado, (▩) Tratamento Severo e (■) Tratamento Reirrigado. Estatística figura 2.



Carboidratos solúveis e N-aminoácidos

Os teores de N-aminossolúveis nas folhas aumentaram em ambos os genótipos com o déficit hídrico, o acúmulo desses solutos no cultivar Pingo de Ouro 1,2 foi maior do que no Santo Inácio vermelho, com um aumento de 70% no tratamento severo, em relação ao controle (Figura 9 A). Nas raízes, os teores de N-aminossolúveis tiveram um comportamento semelhante ao das folhas, porém, com um aumento de quase 28% no tratamento controle do cultivar tolerante em relação ao controle na variedade Santo Inácio Vermelho (Figura 9 B). Este fato se deve, provavelmente, ao aumento da atividade da enzima protease, que quebra as proteínas de reservas com o aumento do tempo de estresse, aumentando o teor de aminoácidos solúveis totais das mesmas, no intuito de se ajustar osmoticamente ao meio estressante (KERBAUY, 2004).

Figura 9. Teores de N-aminoácidos e Carboidratos Solúveis feijão-caupi. (□) Tratamento Irrigado, (▨) Tratamento Moderado, (▩) Tratamento Severo e (■) Tratamento Reirrigado. Estatística figura 2.



Os níveis de carboidratos solúveis nas folhas do genótipo Pingo de Ouro 1,2 foram diminuídos com a imposição dos déficits moderado e severo, como também no tratamento reirrigado em comparação com o controle. Já o genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho), os teores de carboidratos se mantiveram constantes (Figura 9 C). Nas raízes para o genótipo tolerante observou-se que não foi constatado qualquer significância entre os tratamentos (Figura 9 D), porém houve diferença entre os genótipos em relação ao déficit moderado e reirrigados, onde foi maior no Santo Inácio Vermelho. Nessa variedade houve um aumento de 20% nos teores de carboidratos no tratamento reirrigado em relação ao controle.

O aumento dos teores dos carboidratos pode ser atribuído à indução do ajustamento osmótico causado, provavelmente, pelo declínio na atividade da amilase invertase ácida. Em virtude do efeito da seca, o amido é degradado nos tecidos que o acumulam. A redução nessa quantidade de amido é uma consequência da atividade da amilase, sendo acompanhada por um aumento da quantidade de açúcares solúveis redutores (KELLER et al., 1993). Porque na maioria das plantas, a sacarose é o principal açúcar exportado dos locais de síntese (folhas) para as regiões de consumo como o caule, gemas vegetativas, raízes e órgãos reprodutivos, onde será utilizada para o crescimento e/ou armazenamento. As hexoses liberadas a partir da hidrólise

de sacarose podem ser utilizadas em processos anabólicos ou catabólicos e também fornecendo açúcares redutores para o processo de ajustamento osmótico (CHAVES FILHO e STACCIARINI-SERAPHIN, 2001).

Portanto, mesmo mostrando resultados semelhantes entre os genótipos estudados, alguns mecanismos foram eficientes em evidenciar a tolerância do genótipo Pingo de Ouro 1,2, como a condutância estomática ao vapor d'água (gs), demonstrando eficiência no controle estômático, a razão da taxa de assimilação líquida e condutância estomática ao vapor d'água (A/g_s), a eficiência do uso da água (A/E), provando maior eficiência do uso da água no genótipo tolerante, a eficiência de carboxilação e a clorofila total que tiveram os seus valores recuperados quando o genótipo foi irrigado novamente após os quatro dias de déficit hídrico severo, demonstrando que este genótipo pode tolerar por mais tempo o período de seca.

CONCLUSÃO

Este trabalho indica que alguns mecanismos foram eficientes em evidenciar a tolerância do genótipo Pingo de Ouro 1,2, como a condutância estomática ao vapor d'água (gs), a razão da taxa de assimilação líquida e condutância estomática ao vapor d'água (A/g_s), a eficiência do uso da água (A/E), a eficiência de carboxilação e a clorofila total, demonstrando que este genótipo pode tolerar por mais tempo o período de seca. Portanto estes mecanismos confirmam a tolerância do genótipo Pingo de Ouro 1,2 e a susceptibilidade do genótipo Santo Inácio vermelho.

REFERÊNCIA

- ANDRADE JUNIOR, A.S.; SANTOS, A.A. dos.; SOBRINHO, C.A.; Bastos, E.A.; MELO, F.de.B.; Viana, F.M.P. Cultivo do Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in. RIBEIRO, V. Q. Sistema de produção. **Embrapa Meio-norte Teresina**, v.2, p. 110, 2003.
- BASTOS, E. A., RAMOS, H. M. M., ANDRADE JÚNIOR, A. D., Nascimento, F. D., & Cardoso, M. J. Parâmetros fisiológicos e produtividade de grãos verdes do feijão-caupi sob déficit hídrico. **Water Resources and Irrigation Management**, v.1, n.1, p. 31-37, 2012.
- BELTRÃO, N.D.M.; SOUZA, J. D.; SANTOS, J. D.; JERÔNIMO, J.F.; COSTA, F.X.; LUCENA, A.D.; QUEIROZ, U.D. Fisiologia da mamoneira, cultivar BRS-149 Nordeste na fase inicial de crescimento, submetida a estresse hídrico. **Revista brasileira de oleaginosas e fibrosas**, v. 7, n.1, p. 659-664, 2003.

- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; Teare, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and soil**, v. 39, n. 1, p. 205-207, 1973.
- BELTRÃO, N.E. de M., SOUZA, J.G. de.; SANTOS, J.W. dos. Consequências da anoxia temporária radicular no metabolismo do gergelim. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 4, n. 3, p. 153-161, 2000.
- BELKO, N.; ZAMAN-ALLAH, M.; CISSE, N.; DIOP, N.N.; ZOMBRE, G.; EHLERS, J. D.; VADEZ, V. Lower soil moisture threshold for transpiration decline under water deficit correlates with lower canopy conductance and higher transpiration efficiency in drought-tolerant cowpea. **Functional Plant Biology**, v.39, n. 4, p. 306-322, 2012.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R. **Stressphysiologische Ökosystemforschung Höhenprofil Zillertal: Stress-physiological ecosystem research Altitude Profile Zillertal**. Berger & Fil., 1989.
- CARVALHO, M.A.C. de.; FURLANI JUNIOR, E.; ARF, O.; SÁ, M.E.; PAULINO, H.B.; BUZETTI, S. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio e teores foliares deste nutriente e de clorofila em feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 445-450, 2003.
- CHAVES FILHO, J.T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 199-204, 2001.
- COSTA, P. H.; SILVA, J.V.; BEZERRA, M.A.; ENÉAS-FILHO, J.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos e cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 26, p. 289-297, 2003.
- DAMATTA, F. M. Ecophysiology of tropical tree crops: an introduction. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 239-244, 2007.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n.3, p. 350-356, 1956.
- DURING, H. Photochemical and non-photochemical responses of glasshouse-grown grape to combined light and water stress. **Vitis, Siebeldingen**, v. 37, n.1, p. 1-4, 1998.
- EFEÖĞLU, B.; EKMEKÇI, Y.; ÇIÇEK, N. Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *South African Journal of Botany*, doi. 10.1016/j.sajb.2008.06.005, 2008.
- ENDRES, L.; SOUZA, J.L.; TEODORO, L.; MARROQUIM, P.M.G. SANTOS, C.M.; BRITO, J. E. D. Gas exchange alteration caused by water deficit during the bean reproductive stage. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 11-16, 2010.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S.M.A. **Plant drought stress: effects, mechanisms and management**. In Sustainable agriculture (pp. 153-188). Springer Netherlands, 2009.

GASPAR, T.; PENEL, C.; CASTILLO, F. J.; GREPPIN, H. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia plantarum**, v. 64, n.3, p. 418-423, 1985.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 990, n.1, p. 87-92, 1989.

GLYNN, P.; FRASER, C.; GILLIAN, A. Foliar salt tolerance of Acer genotypes using chlorophyll fluorescence. **Journal of Arboriculture**, v. 29, p. 61-65, 2003.

GUIMARÃES, C.M.; STONE, L.F.; BRUNINI, O. Adaptação do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) à seca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, p. 70-75, 2006.

GWATHMEY, C.O.; HALL, A.E. Adaptation to midseason drought of cowpea genotypes with contrasting senescence traits. **Crop Science**, v. 32, p. 773-778, 1992.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, 125(1), 189-198, 1968.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. Water relations of plants and soils. **Academic Press** York: 495p, 1995.

KELLER, H.; WAHLI, W. Peroxide proliferator-activated receptors. **Trends Endocrinol. Metab.** v. 4, p. 291-296, 1993.

KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LAFFAY, D.; LOUGUET, P. Stomatal responses and drought resistance. Bulletin de la Societ Botanique de France: **Actaualites Botaniques**, v. 137, p. 47-60, 1990.

LIMA, J.R.S. ANTONINO, A.C.D.; SOARES, W.A, SILVA, I.F. Estimativa da evapotranspiração do feijão-caupi utilizando o modelo de Penman-Monteith, v. 11, p. 477-491, 2006.

MARCONDES, J.; GARCIA, A.B. Aspectos citomorfológicos do estresse salino em plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n.02, p. 187-194, 2009.

MENDES, R.M.S.; TÁVORA, F.J.A.F.; PITOMBEIRA, J.B.; NOGUEIRA, R.J.M.C. Relações fonte-dreno em feijão-de-corda submetido à deficiência hídrica. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 38, n.1, p. 95-103, 2007.

MOHAMMED, G.H.; BINDER, W.D.; GILLIES, S.L. Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v.10, n. 1-4, p. 383-410, 1995.

NASCIMENTO, S.P.; BASTOS, E.A.; ARAÚJO, E.C.E.; FREIRE FILHO, F.R.; SILVA, E.M. Tolerance to water deficit of cowpea genotypes. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.15, n. 8, p. 853-860, 2011. DOI: 10.1590/S1415-43662011000800013.

NASCIMENTO, J. T., PEDROSA, M. B., TAVARES SOBRINHO, J. Efeito da variação de níveis de água disponível no solo sobre o crescimento e produção de feijão caupi, vagens e grãos verdes. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.2, p. 174-177, 2004.

REDDY, J.N. **Mechanics of laminated composite plates and shells: theory and analysis**. CRC press, 2004.

ROSALES, M.A.; OCAMPO, E.; RODRIGUEZ-VALENTIN, R.; OLVERA-CARRILLO, Y.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; COVARRUBIAS, A.A. Physiological Analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. **Plant physiology and biochemistry**, v.56, p. 24-34, 2012.

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

SANTOS, J.F.; GRANGEIRO, I.T.; BRITO, C.H.de. SANTOS, M.C.C.A. Produção e componentes produtivos de variedades de feijão-caupi na microrregião cariri paraibano. **Revista Engenharia Ambiental**, v. 6, n.1, p. 214-222, 2009.

SANTOS, R.F.; CARLESSO, R. Deficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.2, n.3, p. 287-294, 1998.

SIGMAPLOT. 2008. For windows, version 11.0. Systat Software, 2008.

SILVA, C.D.S.; SANTOS, P.A.A.; LIRA, J.M.S.; SANTANA, M.D.; SILVA JUNIOR, C.D. Curso diário das trocas gasosas em plantas de feijão-caupi submetidas à deficiência hídrica. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 04, p. 7-13, 2010.

SOUZA, J.G.de; BELTRÃO, N.E. de M.; SANTOS, J.W. dos. Influência da saturação hídrica do solo na fisiologia do algodão em casa de-vegetação. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v.1, n.1, p.63-71, 1997.

SOUZA, J.G.de.; BELTRÃO, N.E.de.M.; SANTOS, J.W. Fisiologia e produtividade do gergelim em solo com deficiência hídrica. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 4, n.3, p.163-168, 2000.

SIEGEL, D.P. Energetics of intermediates in membrane fusion: comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms. **Biophysical Journal**, v.65, n.5, p. 2124, 1993.

- SOUSA, M.A.; LIMA, M.D.B.; SILVA, M.V.V.; ANDRADE, J.W.S. Estresse hídrico e profundidade de incorporação do adubo afetando os componentes de rendimento do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.39, p. 175-182, 2009.
- SCHOLANDER, P.F., HAMMEL, H.T., HEMMINGSEN, E.A., & BRADSTREET, E.D. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v. 148, p.339-346, 1965.
- WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of plant physiology**, v.144, n.3, p. 307-313, 1994.
- YEMM, E.W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, n.948, p.209-214, 1955.
- TURNER, N. C. Further progress in crop water relations. **Advances in Agronomy**. v. 58, n. 1, p. 293-325, 1997.

CAPITULO 3

PROTEÔMICA DIFERENCIAL EM FOLHAS DE GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE FEIJÃO-CAUPI SUBMETIDOS A DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS

RESUMO

O feijão-caupi é classificado como moderadamente tolerante, tanto à deficiência hídrica quanto ao excesso de água no solo. Nos programas de melhoramento de feijão-caupi a seleção de genótipos com características de tolerância à seca é de grande importância para garantir produção, principalmente nas regiões do semiárido. O uso da biologia molecular pode auxiliar na obtenção e lançamento de cultivares comerciais com tolerância à seca. Diante do exposto, objetivou-se identificar as proteínas diferencialmente expressas e as proteínas responsivas aos déficits hídricos nos genótipos contrastantes do experimento 2. As proteínas foram extraídas de folhas de feijão-caupi, dos tratamentos controle (irrigado), déficit moderado (-1,0 MPa) e déficit severo (-1,5 MPa), de cada genótipo tolerante e sensível ao déficit hídrico e foram analisadas pela 2D-SDS PAGE, usando espectrometria de massa na identificação das proteínas. Dentro de todas as comparações foram identificadas 108 proteínas diferencialmente expressas, dessas foram encontradas proteínas envolvidas em várias vias celulares que afetou os dois genótipos. Foram identificadas proteínas tanto no genótipo Pingo de Ouro 1,2 (tolerante) quanto no genótipo Santo Inácio Vermelho, podendo ser utilizadas como marcadores. Das proteínas que foram mais expressas entre os genótipos tem-se a subunidade maior ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, parcial (cloroplasto). Uma diferença encontrada entre os dois genótipos está relacionada a essa proteína. O genótipo sensível teve maior repressão dessa proteína, com isso pode-se sugerir que o tolerante possua mecanismo mais eficiente de escape à seca que o sensível.

Palavras-chave: Espectrometria de massa, Proteínas, Fotossíntese.

CHAPTER 3

DIFFERENTIAL PROTEIN IN LEAVES OF CONTRASTING GENOTYPES OF COWPEA SUBMITTED DIFFERENT WATER SYSTEMS

ABSTRACT

Cowpea, [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] is an annual herbaceous legume from the genus *Vigna* classified as moderately tolerant, both to water deficient and to excess water in the soil. In the breeding programs of cowpea, the selection of genotype with drought tolerance characteristic is of great importance for assure production, especially in the semi-arid regions of the northeast part of Brazil. The use of molecular biology can help to obtain and release commercial drought tolerant cultivars. In view of the above, the objective of this research was to identify the differentially expressed proteins and the proteins responsible for the water deficits in the contrasting genotypes of the experiment 2. Proteins were extracted from leaves of cowpea plants control treatments (irrigated), with moderate deficit (-1.0 MPa) and with severe deficit (-1.5 MPa) of each genotype tolerant and sensitive to water deficit and then they were analyzed by 2D-SDS PAGE, using mass spectrometry to identify the proteins. Considering all comparisons made among the 108 differentially expressed proteins there were identified proteins involved in several cell pathways were found that affected the two genotypes. Proteins were identified both in the “Pingo de Ouro 1.2” genotype (tolerant) and in the “Santo Inácio Vermelho” both of which can be used as markers. Of the proteins that were most expressed among the genotypes there was the subunit of larger ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, partial (chloroplast). The differences found between the two genotypes are related to this protein, in the sensible genotype that had greater that the tolerant genotype has a more efficient escape mechanism than the sensible one.

Key words: Mass spectrometry, Proteins, Photosynthesis.

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi ou feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é considerado uma leguminosa de ciclo anual, porte herbáceo, sendo cultivada em toda a região Nordeste do Brasil (MELO et al., 1999). A colheita pode ser realizada quando os grãos estão secos ou ainda verdes, mas isso depende do tipo de mercado consumidor a quem se pretende comercializar o produto (BLANCO et al., 2011).

Essa cultura apresenta ciclo precoce, quando comparada a outras culturas anuais, pouco exigente em água e se adapta às mais diversas condições de solo. O cultivo do feijão-caupi possui papel de destaque na agricultura familiar, principalmente nos aspectos econômico, social e nutricional (FREIRE FILHO, 2005; TEÓFILO et al., 2008). É caracterizado por ser uma leguminosa de alto conteúdo proteico, nas quais suas sementes são fontes de aminoácidos, tiamina e niacina, além de fibras dietéticas, sendo por isso uma boa opção para a melhoria da qualidade de vida, especialmente da população carente no meio rural e urbano (FONSECA et al., 2010).

As respostas das plantas às condições de estresse hídrico variam de acordo com a espécie, cultivar, tempo de exposição e fatores edáficos, entre outros (NOGUEIRA et al., 2001). O feijão-caupi é classificado como moderadamente tolerante, tanto à deficiência hídrica quanto ao excesso de água no solo (BOYER, 1978). O requerimento de água desta cultura é variável com o seu estágio de desenvolvimento (LIMA et al., 2006) e aumenta de um valor mínimo na germinação até um valor máximo na floração e formação de vagens, decrescendo a partir do início da maturação (BASTOS et al., 2008).

Segundo Fontana et al. (1992), déficit hídrico é um dos fatores que afetam a produção agrícola com maior frequência e intensidade, influenciando praticamente todos os aspectos relacionados ao desenvolvimento vegetal, diminuindo a taxa de fotossíntese pela redução da área foliar e afetando vários outros processos fisiológicos, além de alterar o ambiente físico das culturas. Dessa forma, a identificação de genótipos que possam se adaptar a essas condições é essencial para uma produção de grãos sustentável.

Nos programas de melhoramento de feijão-caupi a seleção de genótipos com características de tolerância à seca é de grande importância para garantir a produção, principalmente nas regiões do semiárido onde, muitas vezes, ocorre má distribuição de chuvas e, nos últimos anos, vem se constatando períodos prolongados de seca. Com isso, o uso da biologia molecular, em um curto espaço de tempo, pode auxiliar na identificação e seleção de

genótipos tolerantes à seca e, conseqüentemente, na obtenção de cultivares comerciais com essa característica.

Entre as técnicas da biologia molecular destaca-se a proteômica que é uma poderosa ferramenta no melhoramento genético, pois, diferentemente do que ocorre quando são utilizados marcadores fenotípicos ou baseados em DNA, a proteômica fornece informação em nível molecular da variabilidade genética que é efetivamente expressa do genoma (PENNINGTON e DUNN, 2001).

Dentre as diversas aplicações já realizadas na investigação de proteomas de resposta a estresses vegetais (expressão diferencial) nos últimos 15 anos (JORRIN- NOVO et al., 2009), destacam-se as análises em plantas submetidas a estresse abiótico por seca (RABELLO et al., 2008), salinidade (CHENG et al., 2009, ABREU et al., 2014), baixa temperatura (LEE et al., 2008), alta temperatura (XU e HUANG, 2010), ozônio (CHO et al., 2008), luz visível (KIM et al., 2005) e estresse oxidativo (WAN et al., 2008). Todos estes estudos constituem conteúdos específicos da proteômica em plantas e têm permitido identificar as proteínas em vegetais que desempenham funções importantes diretamente contra estresses abióticos, na regulação gênica dependente de estresses ou como enzima chave na biossíntese de moléculas anti-estresses como osmoprotetores e as fitoquelatinas (QUESHI et al., 2007).

Vários artigos vêm sendo publicados sobre proteômica do estresse hídrico em diferentes espécies vegetais: feijão comum (ZADRAŽNIK et al., 2013); trigo (PENG et al., 2009); arroz (KE et al., 2009); e milho (ALVAREZ et al., 2008). Estes estudos são importantes visto que possibilitam uma melhor compreensão do complexo mecanismo de resposta ao estresse hídrico. Além disso, os peptídeos e genes identificados poderão ser úteis para o desenvolvimento de novas variedades menos susceptíveis a seca. Portanto, diante do exposto, objetivou-se identificar as proteínas diferencialmente expressas e as proteínas responsivas aos déficits hídricos nos genótipos contrastantes do experimento 2.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e imposição do déficit

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no período de julho a agosto de 2015, com temperatura ambiente de 35 ± 5 °C e umidade relativa de $70 \pm 20\%$.

As sementes de feijão-caupi da cultivar Pingo de Ouro 1,2 (genótipo tolerante ao déficit hídrico), cedidas pela Empresa Embrapa Meio-Norte e da variedade Santo Inácio vermelho (genótipo sensível ao déficit hídrico), cedidas pelo Banco de Germoplasma da Universidade Federal do Ceará, foram utilizadas no trabalho. As sementes de cada genótipo foram semeadas três a três em vasos de 11L em substrato contendo areia: húmus de minhoca: vermiculita, na proporção 6:3:1, onde foram irrigadas todos os dias, realizando-se o desbaste aos 10 dias após a semeadura (DAS). Quando as plantas atingiram o período de pré-floração foram iniciados os tratamentos.

As plantas, ao atingirem o estágio de desenvolvimento V4, foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) ou submetidas a déficit hídrico, imposto pela suspensão da irrigação, até propiciar um potencial hídrico na antemanhã (Ψ_{am}) de $-1,0 \pm 0,1$ MPa e $-1,5 \pm 0,1$ MPa, valores que caracterizam uma condição de estresse moderado e severo para plantas de feijão-caupi, respectivamente.

Análises do proteoma

A análise proteômica diferencial entre os genótipos de feijão-caupi foi realizada em folhas das plantas nos regimes hídricos: irrigado, déficit moderado (-1,0 MPa) e déficit severo (-1,5 MPa).

Extração de proteínas

Para a extração, foram utilizadas cerca de cinco repetições de cada genótipo resultando em 20 tubos, os quais foram utilizados para a extração de proteínas totais. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e a extração foi feita baseada no método de extração descrito por Mesquita et al. (2013).

O *pellet* final foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e deixado secar a temperatura ambiente. As proteínas foram solubilizadas em tampão de solubilização contendo ureia 7 M, tiourea 2 M e CHAPS 2% e depois sonicadas em banho de gelo numa potência de

10%, em sonificador marca *UltraSonic Elma* (Modelo Elmasonic). As proteínas extraídas foram armazenadas em *freezer* -20 °C.

Quantificação das proteínas e eletroforese unidimensional

A concentração proteica foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando-se a albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão. Os resultados da quantificação proteica foram avaliados, tanto por meio da dosagem das proteínas, como em eletroforese SDS-PAGE unidimensional.

Para a preparação do gel unidimensional, visando verificar a integridade e a distribuição das bandas das proteínas, utilizou-se um volume total de 30 µL, em que quantidades iguais de extrato de proteína (10 µg) foram adicionadas ao tampão de amostra contendo SDS que consiste em 0,187 M Tris- HCl pH 6,8, glicerol 30%, 6% (m/v) de SDS e 0,007% de azul de bromofenol. As amostras foram desnaturadas durante 5 min a 90 °C e carregadas para um gel de empilhamento pré-fundido de Tris-HCl 4% de 1,0 milímetro com 20 poços. A corrida foi realizada em 100 V e 40 mA e, em seguida, aumentou-se para 200 V e 80 mA para o gel de separação de Tris-HCl 10%. As bandas de proteínas foram visualizadas por coloração Coomassie Blue (NEUHOFF et al., 1988).

Eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e revelação dos *spots*

A eletroforese bidimensional consiste inicialmente na separação das proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) por meio de focalização isoelétrica. Para isso foram utilizadas fitas de gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida (IPG) de 13 cm, com pH 4-7 (GE Healthcare). As amostras proteicas foram solubilizadas em solução de rehidratação [uréia 7M, tiouréia 2M, DTT 65 mM, CHAPS 2% (m/v), tampão IPG 2% (v/v) e azul de bromofenol 0,02%] durante 16 h em cubas de reidratação (Reswelling Tray II, Pharmacia Biotech). Em seguida, as fitas reidratadas foram submetidas à separação isoelétrica utilizando a seguinte programação: 200 V (Stp) por 60 min; 500 V (Stp) por 500 Vxh; 1000 V (Grd) por 800 Vxh; 8000 V (Stp) por 11300 Vxh; 8000 V (Grd) por 6500 Vxh; 6300 V (Stp) por 3:00 h no aparelho IPGphor modelo Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare).

Após a focalização isoelétrica nas fitas, foram realizadas duas etapas de equilíbrio com a finalidade de reduzir e alquilar as proteínas, sob agitação lenta por 20 min em solução de equilíbrio [Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, glicerol 87% (v/v), ureia 6 M, SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol] mais 1% (m/v) de DTT e depois mais 20 min com a solução de equilíbrio mais 2,5 % (m/v) de iodoacetamida, sob agitação lenta.

A segunda dimensão (SDS-PAGE) foi realizada em gel vertical homogêneo (14 x 14 cm), na unidade de eletroforese vertical SE 600 Ruby (GE-Healthcare), por meio da fixação das fitas focalizadas sobre o gel de poliacrilamida de 12,5%, utilizando solução de agarose 0,5% (m/v) e azul de bromofenol a 0,002% (m/v). A separação das proteínas, de acordo com suas massas moleculares, foi realizada a 5 °C, por uma fonte EPS 3501 XL. A corrida foi composta de duas etapas: 20 mA/gel durante 30 min e 40 mA/gel até que o indicador (azul de bromofenol) saísse do gel o que ocorreu aproximadamente 4 h após o início. Juntamente com a amostra, foi aplicada uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas (MW Marker Kit Range: 14.000-70.000, Sigma-Aldrich, USA). Depois de fixadas no gel com uma solução de ácido acético a 10% (v/v) e etanol a 40% (v/v), as proteínas separadas foram coradas com solução de Coomassie Blue G-250 coloidal a 0,1% (v/v) (Neuhoff et al. 1988). Os géis foram escaneados utilizando-se o programa LabScan v. 5.0 (GE-Healthcare) no ImageScanner (Amersham Biosciences) e as imagens obtidas analisadas no programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE-Healthcare). Através deste programa foram estimados os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada “spot”.

A comparação foi feita entre géis de plantas sob diferentes regimes hídricos de genótipos contrastantes para seca e também foi feita comparação entre plantas irrigadas e sob déficit hídrico nos genótipos tolerante e sensível, considerando três repetições biológicas para cada tratamento. Foram considerados diferencialmente expressos, *spots* que apresentaram uma variação de sobreposição de medidas acima de 1,5 e ANOVA ($p < 0,05$).

Depois da detecção dos *spots*, os géis foram combinados uns com os outros e se fundiram em um gel máster que contém os *spots* encontrados em todos os géis analisados. A comparação do gel máster com os outros géis dos tratamentos permitiu a visualização de *spots* diferencialmente expressos.

Processamento dos *spots*, espectrometria de massas e identificação de proteínas

Os *spots* foram retirados manualmente a partir dos géis corados com CBG coloidal, sendo então descorados e digeridos com tripsina (Promega, Madison, WI, USA), conforme descrito por Shevchenko et al. (2006). Após as amostras serem tratadas, estas foram transferidas para microtubos limpos, secas em uma centrífuga a vácuo (SpeedVac SVC 100H, Svant, USA) e, então armazenadas em freezer -80 °C para posterior análise por espectrometria de massa.

Os peptídeos da digestão triptica foram analisados por espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray, acoplada a cromatografia líquida (Nano-high-performance, UPCL), o qual por sua vez estava acoplado a um espectrômetro de massas híbrido

de alta resolução (Q-TOF), com dois analisadores de massa, um quadruplo (Q) e um analisador por tempo de voo (TOF-Time-of-flight) (Waters Cop., Milford, MA, USA). Os espectros de massas resultantes (.raw) foram coletados e processados utilizando o programa ProteinLynx Global Server 2 (Walters Co.), sendo posteriormente convertidos para arquivos de micromassa (.pkl). Esses arquivos foram carregados no programa Mascot v.2.2 (Matrix Science) para a confirmação da identidade das proteínas em pesquisa de sequências contra o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Os parâmetros utilizados para a busca das proteínas foram: peptídeos com até dois sítios de clivagem perdidos; erro de +1,2 Da para identificação de peptídeos; como modificações variáveis escolheu-se carbamidometilação dos resíduos de cisteína e oxidação dos resíduos de metionina. Para as proteínas identificadas, utilizou-se o programa Uniprot (www.uniprot.org/) para caracterizar as vias metabólicas e funções biológicas que as proteínas estão envolvidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

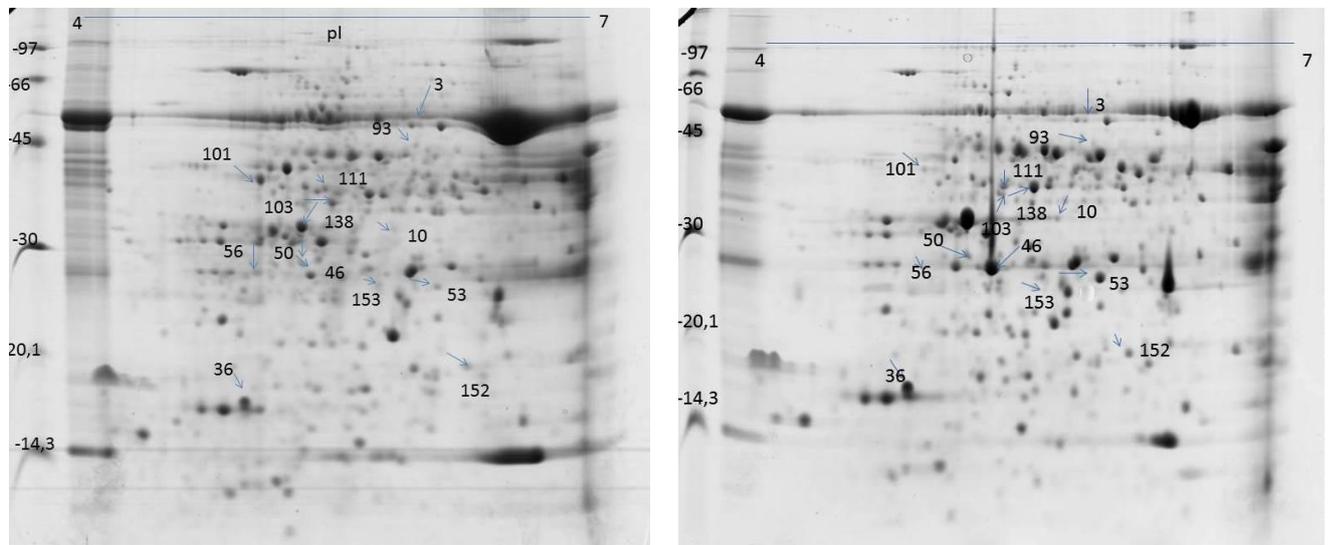
Pela análise das imagens dos géis bidimensionais de folhas de feijão-caupi foi detectado um total de 120 *spots* diferencialmente expressos comparando-se os genótipos tolerante (Pingo de Ouro 1,2) e sensível (Santo Inácio Vermelho) nos diferentes regimes hídricos (irrigado, déficit moderado e déficit severo). Destes, 108 foram identificados por MS/MS. A identificação das proteínas foi realizada pelo auxílio do algoritmo do programa Mascot.

Proteínas diferencialmente expressas na condição irrigada nos genótipos contrastantes

As proteínas identificadas foram organizadas na Tabela 1 (**ANEXO**), conforme a análise da similaridade com outras sequências de proteínas já depositadas no NCBI (banco de dados para pesquisa em bioinformática). Na tabela constam: número do spot, número de acesso no banco de dados, identidade das proteínas, organismo de referência, os valores de ponto isoelétrico e massa molecular (experimentais e teóricos), score, cobertura da sequência e processo biológico.

Na figura 1 estão representados os *spots* que apresentaram abundância diferencial em folhas de feijão-caupi nos genótipo tolerante e genótipo sensível sob condição controle e que foram retirados para análise por MS e detecção por MS/MS.

Figura 1. Proteínas de folhas de feijão-caupi com expressão diferencial no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) em relação ao genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) sob condições irrigadas (controle). As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com Coomassie coloidal. A expressão diferencial foi analisada no software ImageMaster 2D Platinum



Pingo de Ouro 1,2

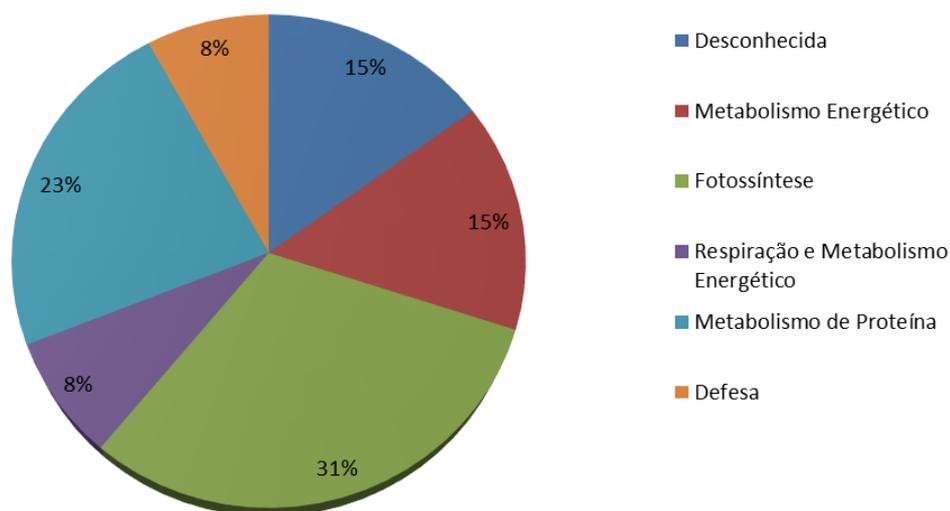
Santo Inácio Vermelho

Comparando-se as folhas do genótipo tolerante Pingo de Ouro 1,2 com o genótipo Santo Inácio Vermelho, na ausência de estresse, observou-se um total de 14 *spots* diferencialmente expressos, com um aumento na abundância relativa em 6 *spots* e redução em 8 *spots*. Os 14 *spots* que foram identificados no tratamento irrigado corresponderam a 13 proteínas diferentes (Tabela 2), pois foram encontradas duas possíveis isoformas ou modificações de uma mesma proteína, representada por mais de um *spot* em um mesmo gel. As proteínas que aumentaram sua expressão no genótipo tolerante estão envolvidas em diferentes processos importantes como metabolismo energético (*spot* 3 e 101), metabolismo de proteínas (*spot* 53), fotossíntese (*spots* 56 e 153) e desconhecida (*spot* 36). Já os *spots* que apresentaram redução na abundância relativa no genótipo tolerante em comparação com o sensível, estão envolvidos no metabolismo de proteína (*spots* 10 e 50), defesa (*spot* 93), fotossíntese (*spots* 138 e 152), respiração e metabolismo energético (*spot* 111) e desconhecida (*spot* 46) (Figura 2).

Tabela 2. Nível de expressão relativa das proteínas diferencialmente expressas ($P < 0,05$) baseada na média da % de volume em folhas de plantas contrastantes de feijão-caupi na ausência de déficit hídrico (controle), com sua identificação das proteínas por MS.

Spot ID	Proteína	Média da % de volume \pm DP		Nível de expressão
		Pingo de Ouro 1,2	Santo Inácio Vermelho	
3	Proteína LR48_Vigan03g317700	0,225 \pm 0,04	0,097 \pm 0,097	+2,31
10	PREDICTO: isoforma do tipo alantoinase X1	0,026 \pm 0,001	0,062 \pm 0,062	-6,91
36	Proteína hipotética GPECTOR_71g584	0,567 \pm 0,161	1,948 \pm 1,948	+3,43
46	Proteína 3 desconhecida, parcial	0,037 \pm 0,001	0,116 \pm 0,116	-9,28
50	Proteína LR48_Vigan01g229200	0,330 \pm 0,048	0,158 \pm 0,158	-2,08
53	Proteína PHAVU_009G224900g	0,097 \pm 0,005	0,368 \pm 0,368	+3,77
56	RecName: Full = Clorofila a-b proteína 3, cloroplástica; AltName: Full = LHCI tipo I CAB-3; Curto = LHCP; Sinalizadores: Precursor	0,196 \pm 0,029	0,080 \pm 0,080	+2,43
93	Proteína CPRD8	2,354 \pm 0,147	3,992 \pm 3,992	-4,34
101	Proteína PHAVU_001G240200g	0,128 \pm 0,057	0,320 \pm 0,320	-2,50
111	Subunidade beta do componente piruvato desidrogenase E1	0,306 \pm 0,306	1,332 \pm 0,539	-6,51
138	PREVISÍVEL: proteína potenciadora de oxigênio 1, cloroplástica	0,069 \pm 0,030	0,072 \pm 0,069	-3,77
152	Putativo rubisco activase, parcial	0,037 \pm 0,001	0,116 \pm 0,116	-9,28
153	Proteína 5 contendo domínios PsbP, cloroplástica, parcial	0,091 \pm 0,03	0,261 \pm 0,261	-1,58

Figura 2. Classificação funcional de proteínas de folhas de feijão-caupi com expressão diferencial no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) em relação ao genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) sob condição irrigada. Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas UniProt (Universal Protein Resource).



Um dos principais grupos de proteínas que difere entre os genótipos está relacionado à fotossíntese. Os *spots* 56 (proteína de ligação à clorofila a-b) e 153 (proteína 5 contendo domínios PsbP, cloroplástica, parcial) aumentaram suas expressões em relação ao tolerante quando comparado com o genótipo sensível, porém os *spots* 138 (potenciador de oxigênio 1, cloroplástico) e 152 (rubisco ativase putativa, parcial) ocorreram uma diminuição na sua expressão quando compararam-se genótipos tolerante e sensível. No capítulo anterior foi observado que a fotossíntese, na ausência de estresse, não apresenta respostas diferenciadas entre os genótipos estudados.

A subunidade beta do componente piruvato desidrogenase E1 (*spot* 111), foi uma das proteínas que diminuiu em sua abundância no genótipo tolerante em relação ao sensível. Essa enzima atua na respiração e metabolismo energético. O seu complexo catalisa a conversão global do piruvato em acetil-CoA e CO₂ (PATEL e ROCHE, 1990; MOONEY et al., 2002). A proteína LR48_Vigan03g317700 (*spot* 3), é uma proteína relacionada com atividades catalíticas, ligação de fosfato piridoxal e processos biossintético. Já a proteína PHAVU_001G240200g (*spot* 101), é relacionada com síntese de carboidratos. Estas proteínas são importantes para o processo de respiração, segundo Wang et al. (2014) a respiração é um importante processo metabólico no qual os compostos orgânicos reduzidos produzidos na

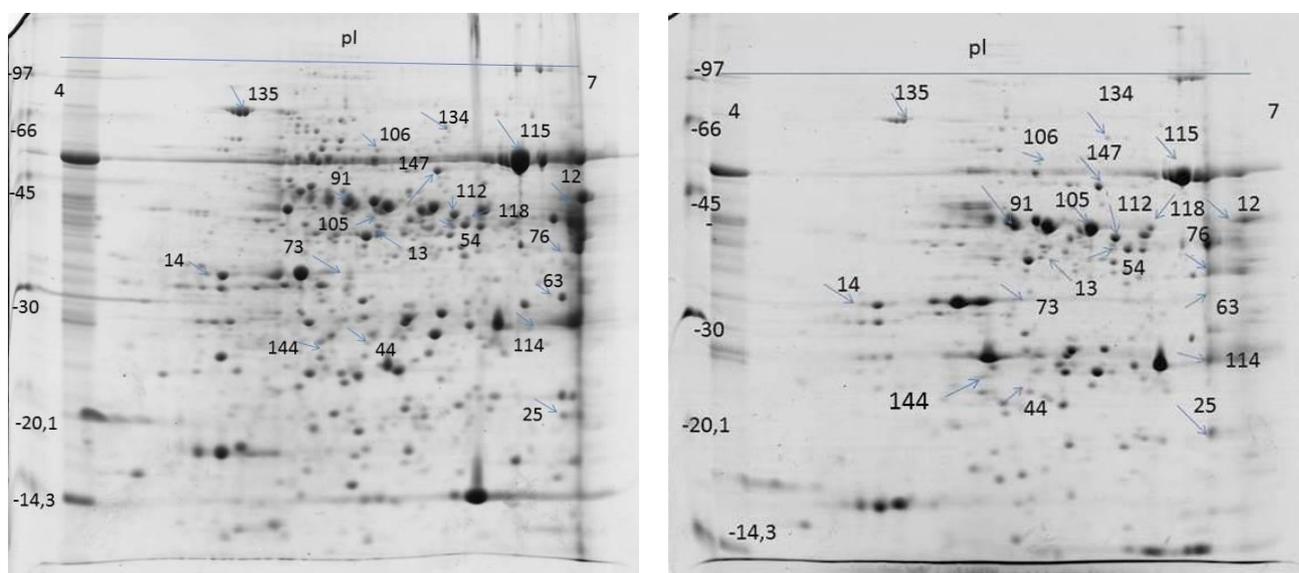
fotossíntese são oxidados, de forma que parte da energia liberada é utilizada pela célula, de acordo com a demanda da planta.

Dentre as proteínas relacionadas ao metabolismo de proteínas foram encontradas, proteínas relacionadas a síntese de purinas (spot 10) e enovelamento de proteínas (spot 53). Segundo Kosová et al. (2013), as mudanças na expressão gênica e adaptações a tolerância, estão diretamente envolvidas com uma grande mudança no metabolismo de proteínas, seja de síntese ou de degradação, tendo em vista que elas têm papel crucial na tolerância ao estresse.

Proteínas diferencialmente expressas na presença de déficit moderado nos genótipos contrastantes

Na figura 3 estão representados os *spots* que apresentaram abundância diferencial em folhas do tratamento de déficit moderado (-1,0 MPa) e que foram retirados para análise por MS e detecção por MS/MS.

Figura 3. Proteínas de folhas de feijão-caupi com expressão diferencial no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) em relação ao genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) sob condições moderada de déficit hídrico. As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com Coomassie coloidal. A expressão diferencial foi analisada no software ImageMaster 2D Platinum.



Pingo de Ouro 1,2

Santo Inácio Vermelho

Na condição de déficit moderado foram encontradas 20 proteínas diferencialmente expressas, sendo 18 identificadas (Tabela 1, **ANEXO**).

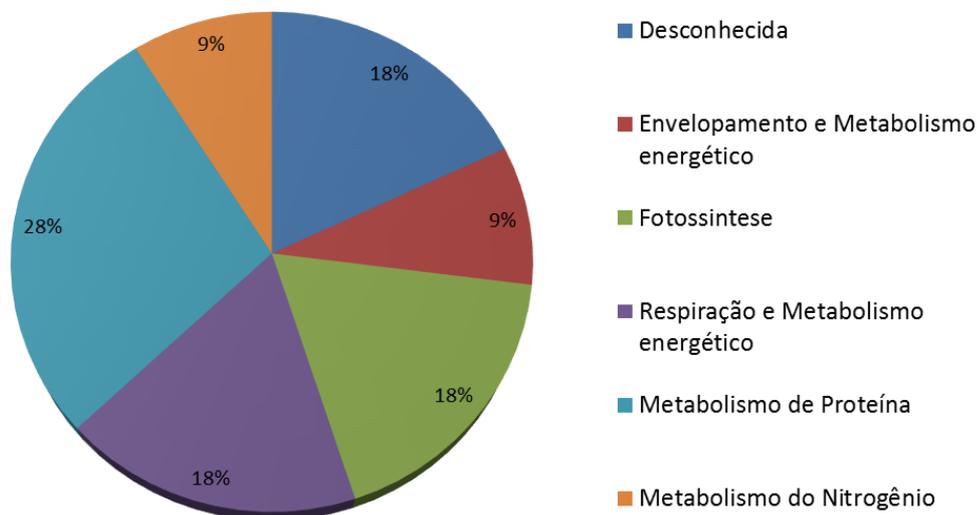
Dos 18 *spots* diferencialmente expressos identificados ocorreu aumento da abundância em 11 proteínas (Tabela 3) em relação ao genótipo sensível, estando elas envolvidas nos

processos envolvendo metabolismo do nitrogênio (*spot* 13), metabolismo de proteína (*spots* 76, 144 e 147), fotossíntese (*spots* 91 e 112), respiração e metabolismo energético (*spot* 115 e 118), envelopamento e metabolismo energético (*spot* 135) e desconhecida (*spots* 25 e 134) (Figura 4).

Tabela 3. Nível de expressão relativa das proteínas diferencialmente expressas ($P < 0,05$) baseada na média da % de volume em folhas de plantas contrastantes de feijão-caupi sob estresse moderado (-1,0 MPa), com sua identificação das proteínas por MS.

Spot ID	Proteína	Média da % de volume \pm DP			Nível de expressão
		Pingo de Ouro 1,2	Santo Inácio Vermelho		
13	Rubisco ativase putativo, parcial	0,081 \pm 0,011	0,235 \pm 0,083	-2,87	
25	Proteína SOVF_145230	0,169 \pm 0,005	0,533 \pm 0,132	-4,70	
76	PREDICTO: cinnamoyl-CoA redutase 1-like [Vigna angularis]	0,101 \pm 0,013	1,240 \pm 0,462	-18,3	
91	PREVISTO: ribulose bisfosfato carboxilase / oxigenase ativase, tipo cloroplástico	0,571 \pm 0,202	2,475 \pm 0,510	-4,33	
112	PREDICTO: PROTEÍNA DE BAIXA QUALIDADE: frutose-bisfosfato aldolase, Isoenzima 1 citoplasmática	0,387 \pm 0,071	0,657 \pm 0,041	-1,69	
115	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande, parcial (cloroplasto)	0,284 \pm 0,085	0,364 \pm 0,314	-2,68	
118	Proteína hipotética VIGAN_05238000	0,049 \pm 0,007	0,282 \pm 0,082	-8,61	
134	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	0,019 \pm 0,001	0,048 \pm 0,015	-7,54	
135	Chaperone DnaK	0,174 \pm 0,178	0,375 \pm 0,070	+2,98	
144	Hipotética proteína SOVF_007620, parcial	0,134 \pm 0,166	0,233 \pm 0,087	-9,14	
147	Proteína hipotética VIGAN_10094100	0,290 \pm 0,023	0,571 \pm 0,093	-1,96	

Figura 4. Classificação funcional de proteínas de folhas de feijão-caupi com expressão diferencial no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) em relação ao genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) sob condições de déficit moderado (-1,0 MPa). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas UniProt (Universal Protein Resource).



O *spot* 13 tem função em processo metabólico de compostos nitrogenados, em déficit hídrico este metabolismo é afetado, alguns metabólitos nitrogenados, como o aminoácido prolina, tendem a acumular nos tecidos vegetais sob estresse hídrico (FERREIRA et al., 2002). No capítulo anterior, houve um aumento de prolina nos dois genótipos, sendo mais pronunciado no genótipo sensível, fato também observado que esta proteína teve aumento neste mesmo genótipo. Como a assimilação do nitrogênio é reduzida sob déficit hídrico, pode-se supor que tais compostos se originam da rotatividade de proteínas, assim as enzimas envolvidas na incorporação de amônia a compostos orgânicos, podem agir como precursores para diferentes metabólitos podendo ter importante papel na sobrevivência de plantas durante estresse (FERREIRA et al., 2002).

Foram identificadas também, proteínas envolvidas com a fixação de CO₂, a etapa final da fotossíntese, conhecida como ciclo de Calvin-Benson, na qual ocorre a produção de glicose e outros esqueletos de carbono. A proteína encontrada foi à subunidade maior da Rubisco (*spot* 115) que catalisa a primeira e principal reação do ciclo de Calvin, onde fixa CO₂ à molécula de ribulose-1,5-bifosfato, produzindo compostos orgânicos. Outra proteína encontrada foi à frutose-1,6-bifosfatase, que catalisa a conversão de frutose-1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato, essas duas enzimas são importantes para produção dos produtos fotossintéticos, como açúcar e amido, que aumentam a tolerância a estresse e auxiliam na produção de reserva energética para a planta (WANG et al., 2013). Paiva (2015), estudando feijão-caupi submetido ao estresse

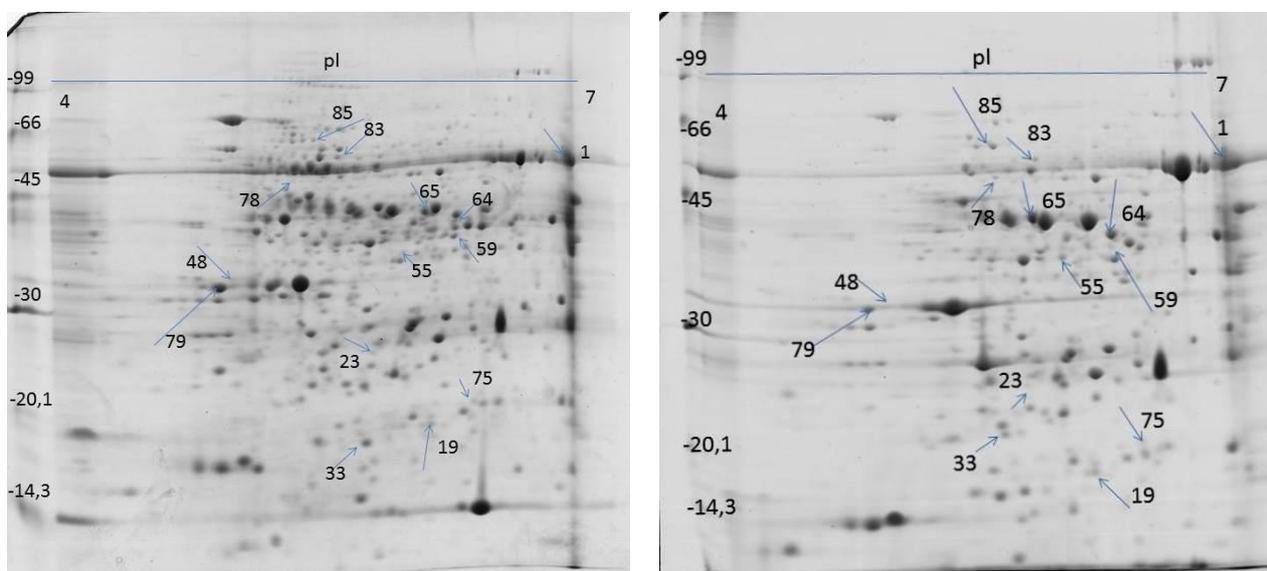
salino encontrou estas duas proteínas que tiveram seus valores aumentados. Neste estudo, ocorreu um aumento desta proteína no genótipo tolerante quando comparado com o sensível. No capítulo anterior, foi verificado uma mudança no teor de fotossíntese líquida quando estes genótipos foram submetidos ao déficit hídrico, observou-se também que houve diferença estatística entre os genótipos em condições de estresse moderado.

As proteínas identificadas foram organizadas na Tabela 1 (**ANEXO**), conforme a análise da similaridade com outras sequências de proteínas já depositadas no NCBI (banco de dados para pesquisa em bioinformática).

Proteínas diferencialmente expressas sob déficit severo nos genótipos contrastantes

Na figura 5 estão representados os spots que apresentaram abundância diferencial em folhas do tratamento de déficit severo (-1,5 MPa) e que foram retirados para análise por MS e detecção por MS/MS.

Figura 5. Proteínas de folhas de feijão-caupi com expressão diferencial no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) em relação ao genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) sob condição severa de déficit hídrico. As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com Coomassie coloidal. A expressão diferencial foi analisada no software ImageMaster 2D Platinum



Pingo de Ouro 1,2

Santo Inácio Vermelho

Quando analisadas as proteínas diferencialmente expressas nos genótipos contrastantes na presença de déficit severo, 14 *spots* (Tabela 4) diferenciais foram encontrados, onde todas estas proteínas foram identificadas e corresponderam a diferentes proteínas (Tabela 1, **ANEXO**).

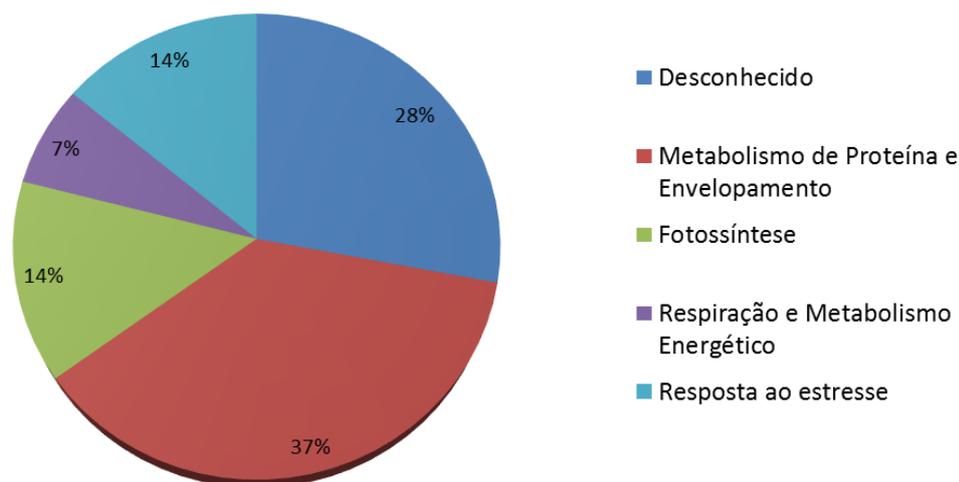
Tabela 4. Nível de expressão relativa das proteínas diferencialmente expressas ($P < 0,05$) baseada na média da % de volume em folhas de plantas contrastantes de feijão-caupi sob estresse severo (-1,5 MPa), com sua identificação das proteínas por MS.

Spot ID	Proteína	Média da % de volume \pm DP		Nível de expressão
		Pingo de Ouro 1,2	Santo Inácio Vermelho	
1	Serina hidroximetiltransferase, mitocondrial	1,033 \pm 0,725	3,348 \pm 0,919	-3,52
19	PREVISTO: fator de iniciação da tradução eucariótica 5A-2	0,093 \pm 0,001	0,165 \pm 0,034	- 5,30
23	Hipotética proteína PHAVU_009G224900g	0,058 \pm 0,010	0,195 \pm 0,021	-5,42
33	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	0,038 \pm 0,014	0,132 \pm 0,026	-5,42
48	Hipotética proteína LR48_Vigan09g195100	0,090 \pm 0,064	0,215 \pm 0,053	-3,53
55	PREVISTO: cisteína sintase, cloroplástica / cromoplasma	0,044 \pm 0,019	0,164 \pm 0,013	-5,74
59	PREVISTO: frutose-bisfosfato aldolase, isoenzima citoplasmática 1	0,272 \pm 0,112	0,092 \pm 0,022	3,32
64	PREVISTO: PROTEÍNA DE BAIXA QUALIDADE: frutose-bisfosfato aldolase, isoenzima 1 citoplasmática	0,147 \pm 0,027	0,914 \pm 0,245	-5,48
65	Isoenzima foliar de glutamina sintetase, cloroplástica	0,496 \pm 0,023	0,896 \pm 0,095	-1,80
75	Proteína contendo domínio HSP20	0,076 \pm 0,001	0,174 \pm 0,001	-5,51
78	Hipotética proteína TSUD_75090	0,039 \pm 0,007	0,225 \pm 0,092	-9,09
79	Hipotética proteína LR48_Vigan09g195100	1,005 \pm 0,251	0,421 \pm 0,014	+2,38
83	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande, parcial (cloroplasto)	0,075 \pm 0,002	0,421 \pm 0,177	-7,38
85	PREVISTO: chaperonina CPN60-2, mitocondrial	0,031 \pm 0,001	0,214 \pm 0,049	-19,3

As 14 proteínas identificadas tiveram suas expressões modificadas, sendo estas envolvidas na resposta ao estresse (*spots* 1 e 75), no metabolismo de proteína e envelopamento

(*spots* 19, 23, 55, 65 e 85), na fotossíntese (*spots* 59 e 64), na respiração e metabolismo energético (*spot* 83) e quatro com função desconhecida (*spots* 33, 48, 78 e 79) (Figura 6).

Figura 6. Classificação funcional de proteínas de folhas de feijão-caupi com expressão diferencial no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) em relação ao genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho) sob condições de déficit severo (-1,5 MPa). Classificação baseada no catalogo de informações de proteínas UniProt (Universal Protein Resource).



As proteínas envolvidas na síntese de proteínas foram glutamina sintetase (*spot* 65), cisteína sintase (*spot* 55), PHAVU_009G224900g (*spot* 23) e chaperonina CPN60-2, mitocondrial (*spot* 85). Estas aumentaram em abundância sob a seca no genótipo sensível. A glutamina sintetase é essencial para a biossíntese de glutamina e a cisteína sintase é a enzima chave na síntese de cisteína, que é necessária para a biossíntese de glutathione, importante para o metabolismo antioxidativo em plantas sob estresse hídrico (SOFO et al. 2010). Essas proteínas juntamente com as proteínas ribossômicas, sob restrição hídrica, contribuem para a síntese de proteínas de defesa do estresse e outras como uma estratégia das células em lidar com o estresse (ZADRAŽNIK et al., 2013). Também foram encontradas proteínas envolvidas no redobramento de proteínas com a chaperonina CPN60-2, mitocondrial. Em geral essa chaperonina desempenha um papel crucial no estresse através do estabelecimento de conformações normais da função de proteínas (WANG et al., 2004).

Outra proteína envolvida no enovelamento de proteínas é PHAVU_009G224900g, que teve maior abundância no genótipo Santo Inácio Vermelho, quando comparado com o Pingo de Ouro 1,2. Comportamento semelhante foi observado por Zadražnik et al. (2013), quando proteínas relacionadas no redobramento de proteínas foram mais abundantes no cultivar sensível quando comparadas com o tolerante em condições de seca em feijão comum. Sharma

et al. (2003), sugerem que este efeito pode ser devido à presença de diferentes vias regulatórias nas plantas.

Outra proteína encontrada relacionada ao metabolismo de proteína foi fator de iniciação da tradução eucariótica 5A-2 (*spot 19*), esta proteína está envolvida em processos de senescência e tolerância a seca (FENG et al., 2007), a mesma foi mais pronunciada no genótipo sensível quando comparado com o tolerante.

O *spot 1* foi identificado como serina hidroximetiltransferase, mitocondrial, esta enzima pode participar da síntese de serina ou da degradação da glicina-betaína. Essa enzima teve aumento na sua abundância no genótipo sensível, esse aumento pode ser um ajustamento osmótico em resposta ao estresse (MESQUITA, 2013).

As proteínas em resposta a fotossíntese foram frutose-bisfosfato aldolase, isoenzima citoplasmática 1 (*spot 59*) e frutose-bisfosfato aldolase, semelhante a isoenzima citoplasmática 1 (*spot 64*), sendo que o *spot 59* teve sua abundância aumentada no genótipo tolerante e o *spot 64* aumentou no genótipo sensível. Estes resultados sugerem que o *spot 59* desempenhou papel essencial na manutenção da fotossíntese enquanto *spot 64* foi inibido no genótipo tolerante.

A subunidade maior da enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, também conhecida como Rubisco, foi identificada no *spot 83*. Esta enzima capta o dióxido de carbono procedente do ar e um açúcar existente na célula chamado RuDP (ribulose 1,5-difosfato ou RuBP - ribulose bis-fosfato). A reação entre estes dois reagentes dá origem a duas moléculas do açúcar PGA (fosfoglicerato). A Rubisco é assim responsável pelo importante primeiro passo do ciclo de Calvin e em concreto pela fixação do dióxido de carbono na sua forma orgânica. No trabalho desenvolvido por Abreu et al. (2014), esta proteína, correspondente ao *spot 83* no presente trabalho, foi aumentada 2,9 vezes no genótipo sensível. Esses autores estudaram feijão-caupi sobre estresse salino e identificaram essa mesma enzima na qual também teve maior abundância no genótipo sensível. De modo semelhante, Ali e Komatsu (2006) também encontraram reduções na expressão da Rubisco em arroz (*Oryza sativa* L.).

As proteínas identificadas foram organizadas na Tabela 1 (ANEXO), conforme a análise da similaridade com outras sequências de proteínas já depositadas no NCBI (banco de dados para pesquisa em bioinformática).

Os resultados do proteoma diferencial de folhas de feijão-caupi dos genótipos contrastantes revelam uma modulação na expressão de proteínas, em que as proteínas que mais aumentaram suas expressões no genótipo tolerante foram aquelas envolvidas diretamente no metabolismo de proteínas, seguido de proteínas responsáveis pela fotossíntese, tanto na condição de controle como sob déficit hídrico. De acordo com Mesquita (2013), essas

diferenças são importantes mecanismos de tolerância e identificação de potenciais moléculas candidatas à manipulação para uso em genética com vistas à seleção de genótipos tolerantes à seca.

Proteoma diferencial de proteínas responsivas ao déficit hídrico no genótipo tolerante (Pingo de Ouro 1,2) e genótipo sensível (Santo Inácio Vermelho)

As proteínas responsivas ao déficit hídrico mostraram diferenças na sua abundância relativa. A porcentagem de volume (% Volume) dos *spots* foi comparada com as imagens dos géis nas plantas submetidas ao déficit hídrico em relação ao controle (irrigado). Essas proteínas diferencialmente expressas são ditas responsivas ao déficit hídrico, devido apresentarem aumento ou diminuição na expressão em termos de abundância relativa (MESQUITA, 2013). Muitas dessas proteínas podem revelar funções consistentes com a resposta ao estresse (SALVATO e CARVALHO, 2010).

Folhas do genótipo Pingo de Ouro 1,2 submetido ao déficit hídrico moderado (-1,0 MPa) apresentaram 22 proteínas com abundância diferencial (Tabela 5) em relação ao controle. Dessas, 11 foram reduzidas e 11 foram aumentadas em resposta ao déficit hídrico moderado (Tabela 1, ANEXO).

Tabela 5. Nível de expressão relativa das proteínas de folhas baseada na média da % de volume de plantas de feijão-caupi responsivas ao déficit hídrico moderado no genótipo tolerante.

Spot ID	Proteína	Média da % de volume ± DP		Nível de expressão
		Irrigado	Moderado	
3	Hipotética proteína LR48_Vigan03g317700	0,2303 ± 0,0442	0,0960 ± 0,0317	+2,39
11	Sistema de clivagem de glicina Proteína H, mitocondrial	0,4421 ± 0,1232	1,1195 ± 0,2203	-2,53
20	Ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase / oxigenase, subunidade parcial	5,9781 ± 1,1705	2,6925 ± 0,7485	+2,22
33	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	0,1163 ± 0,0119	0,2872 ± 0,0823	-2,46
34	Inibidor da ribonuclease E RraA / Dimetilmenaquinona metiltransferase isoforma 1	0,0544 ± 0,0139	0,0227 ± 0,0010	+7,17
56	RecName: Full = Clorofila a-b proteína 3, cloroplástica; AltName: Full = LHCI tipo I CAB-3; Curto = LHCP; Sinalizadores: Precursor	0,2013 ± 0,0325	0,1032 ± 0,0300	+2,92

58	BnaA04g12000D		0,3395 ± 0,0541	0,1733 ± 0,0218	+1,95
63	Desconhecida		0,2659 ± 0,1439	0,0502 ± 0,0126	+5,28
70	Hipotética	proteína			
	GLYMA_18G244900		0,0763 ± 0,0344	0,2406 ± 0,0969	-4,72
77	Hipotética	proteína			
	AXX17_AT4G25850		0,3261 ± 0,1113	0,1113 ± 0,0337	+2,97
79	Hipotética	proteína			
	LR48_Vigan09g195100		0,2299 ± 0,0176	0,4418 ± 0,0800	-2,88
81	PREVISTO: haloacid dehalogenase-like hidrolase domain-containing protein At3g48420		0,1327 ± 0,0169	0,3178 ± 0,0600	-2,39
99	Malato desidrogenase		0,0812 ± 0,0333	0,1480 ± 0,0053	-2,88
105	PREVISTO: ribulose bisfosfato carboxilase / oxigenase activase, cloroplástica		0,154 ± 0,0020	0,801 ± 0,03000	+7,46
107	Proteína hipotética VIGAN_05238000		0,0823 ± 0,0424	0,4059 ± 0,0330	-6,88
110	Desconhecido		0,1653 ± 0,0430	0,0567 ± 0,0010	+8,74
115	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande, parcial (cloroplasto)		11,268 ± 2,2674	2,8579 ± 0,7930	+3,94
117	Hipotética proteína TSUD_247570		0,0484 ± 0,0170	0,6182 ± 0,3420	-12,7
121	Cadeia B, estrutura cristalina do cloroplasto F1-Atpase de espinafre		0,1523 ± 0,0582	0,1435 ± 0,0790	+3,35
125	Hipotética proteína TSUD_346040		0,1094 ± 0,0429	0,2087 ± 0,0175	-2,86
130	Hipotética	proteína			
	LR48_Vigan05g022600		0,0501 ± 0,0095	0,1194 ± 0,0071	-3,38
131	PREDICTO: ácido 2-metileno-furan-3-ona redutase		0,0777 ± 0,0212	0,2788 ± 0,0441	-5,12

Quando o genótipo tolerante foi submetido ao déficit hídrico severo (-1,5 MPa) apresentaram 16 proteínas com abundância diferencial (Tabela 6) em relação ao controle.

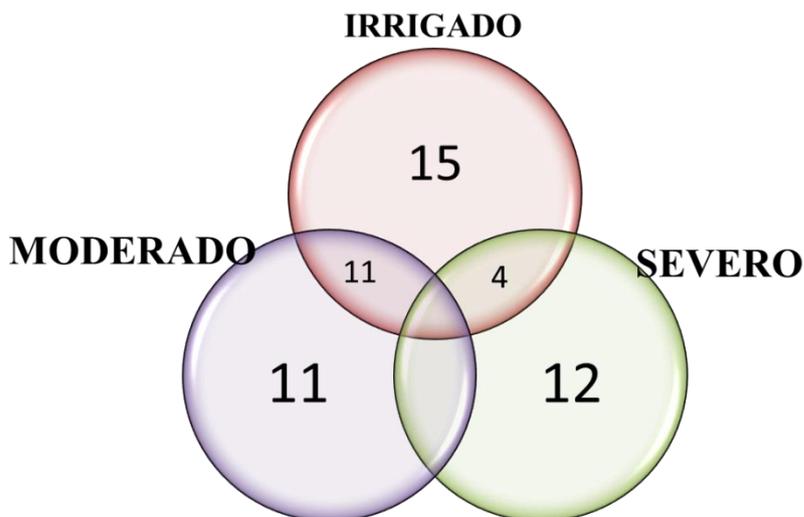
Tabela 6. Nível de expressão relativa das proteínas de folhas baseada na média da % de volume de plantas de feijão-caupi responsivas ao déficit hídrico severo no genótipo tolerante.

Spot ID	Proteína	Média da % de volume ± DP		Nível de expressão
		Irrigado	Severo	
6	PREVISTO: subunidade de proteassoma alfa tipo-6	0,0721 ± 0,0188	0,28266 ± 0,0799	-3,91

	Ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase /			
20	oxigenase, subunidade parcial	5,9330 ± 1,1249	2,22008 ± 0,9567	+2,67
37	Produto proteico não identificado	0,1273 ± 0,0189	0,3379 ± 0,0506	-2,65
41	Proteína hipotética KK1_007370	0,2291 ± 0,0713	0,0338 ± 0,0078	+10,1
	Hipotética proteína			
50	LR48_Vigan01g229200	0,0858 ± 0,0019	0,2284 ± 0,0706	-3,99
	RecName: Full = proteína 3			
54	desconhecida, parcial	0,0990 ± 0,0701	0,2894 ± 0,0216	-4,38
	Hipotética proteína			
79	LR48_Vigan09g195100	0,2284 ± 0,0210	1,0419 ± 0,2664	-6,84
	Glutamine synthetase leaf isozyme,			
84	chloroplastic	0,4373 ± 0,0741	0,9833 ± 0,1592	-2,24
	Proteína hipotética			
86	PRUPE_ppa005137mg	0,5095 ± 0,0876	1,3100 ± 0,2014	-2,57
	Subunidade beta de ATP sintase CF1			
94	(cloroplasto)	0,6185 ± 0,1632	0,1436 ± 0,0385	+4,30
	Hipotética proteína			
98	PHAVU_011G082600g	0,0167 ± 0,0064	0,4010 ± 0,1075	-33,8
99	Malato desidrogenase	0,0804 ± 0,0318	0,1822 ± 0,0035	-4,03
	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase /			
	oxigenase subunidade grande, parcial			
115	(cloroplasto)	13,034 ± 2,1078	4,3343 ± 0,2982	+3,00
	PREVISÍVEL: proteína potenciadora			
138	de oxigênio 1, cloroplástica	0,7882 ± 0,2348	2,603 ± 0,6737	-3,00
	PREVISTO: isoforma X2 de proteína			
	36 contendo o domínio CCCH do dedo			
139	de zinco	0,1375 ± 0,0418	0,3545 ± 0,1180	+2,57
	Hipotética proteína			
141	PHAVU_001G181000g	0,8042 ± 0,1266	1,3151 ± 0,0449	-1,63

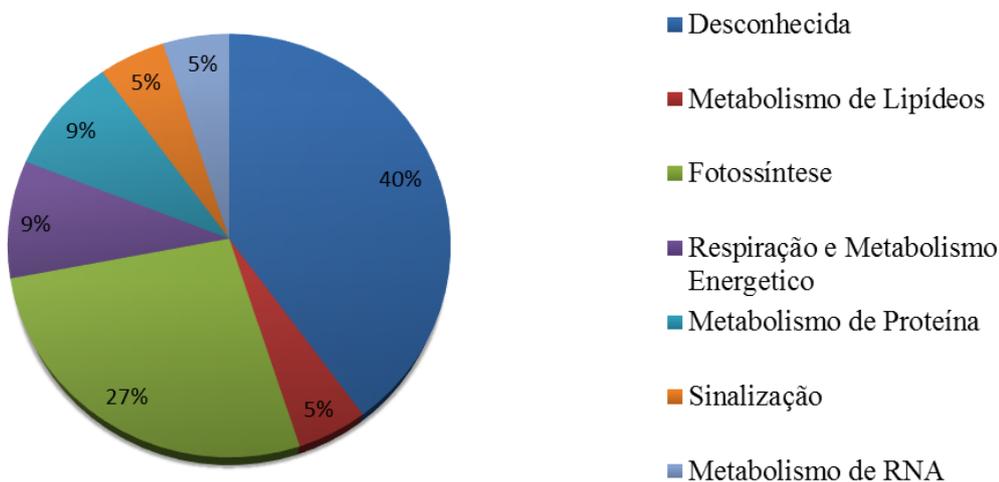
Desse total, 4 tiveram sua expressão reduzida e 12 aumentada com a imposição do déficit severo (Tabela 1, ANEXO). Na figura 7, observa-se o diagrama de venn o qual demonstra a quantidade de proteínas responsivas que foram observadas no genótipo tolerante sob déficit hídrico quando comparado com o controle.

Figura 7. Diagrama de Venn de proteínas expressas diferencialmente do genótipo Pingo de Ouro 1,2 sob déficit hídrico em comparação com o controle.



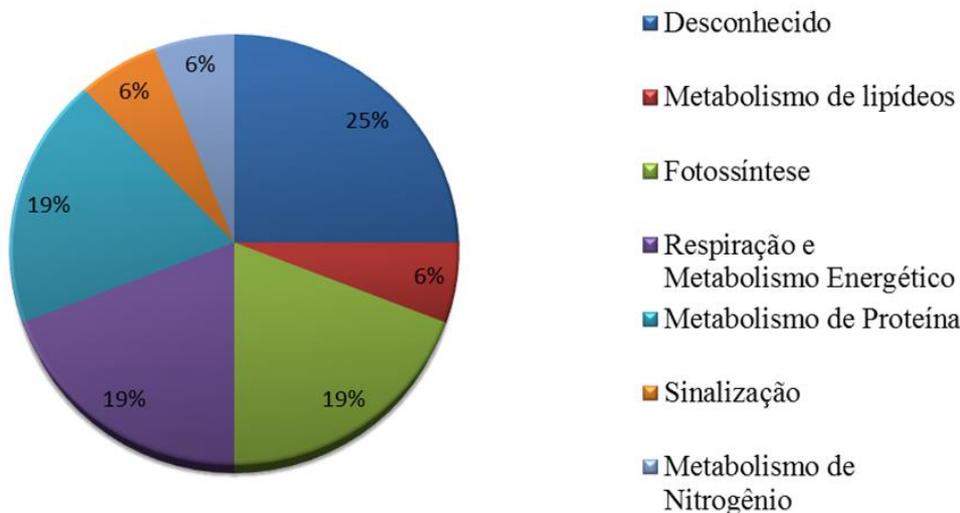
Observa-se, pela distribuição funcional, que as proteínas responsivas ao déficit moderado foram encontradas em diferentes grupos, fotossíntese, metabolismo de proteína, metabolismo de RNA, respiração e metabolismo energético, metabolismo de carboidratos, sinalização e desconhecida (Figura 8). Observou-se predominância em relação à fotossíntese, com 27% das proteínas expressa.

Figura 8. Classificação funcional das proteínas de feijão-caupi com expressão diferencial no cultivar tolerante (Pingo de Ouro 1,2) quando submetido ao deficit moderado (- 1,0 MPa).



Para o déficit severo foram encontradas proteínas com funções de metabolismo de proteína, fotossíntese, metabolismo de nitrogênio, respiração e metabolismo energético, metabolismo de carbono, sinalização e desconhecido (Figura 9).

Figura 9. Classificação funcional das proteínas de feijão-caupi com expressão diferencial no cultivar tolerante (Pingo de Ouro 1,2) quando submetido ao déficit severo (- 1,5 MPa).



Enquanto que no estresse moderado houve expressão diferencial mais acentuada de proteínas no processo de fotossíntese, no estresse severo houve uma equivalência da expressão diferencial entre metabolismo de proteína, fotossíntese e respiração e metabolismo energético.

Os *spots* 20, 56, 70, 105, 107 e 131 são proteínas responsáveis pelo processo fotossintético, sendo que 70, 107 e 131, tiveram seus valores de expressões aumentados no déficit hídrico moderado. A proteína GLYMA_18G244900 (*spot* 70), VIGAN_05238000 (*spot* 107), PREVISTO: ácido 2-metileno-furan-3-ona redutase (*spot* 131), ambas participam do processo de fotorrespiração, que é o fenômeno de absorção de O₂ e evolução de CO₂ dependente da luz durante a fotossíntese em plantas verdes. Essas proteínas aumentaram a sua abundância, evidenciando um aumento na fotorrespiração, que reduz a fotossíntese. No capítulo anterior foi apresentado a ocorrência de queda na fotossíntese quando comparado com o tratamento moderado e controle. Com o aumento da taxa de fotorrespiração, a atividade de processos anaeróbicos no metabolismo ocasiona o excesso de íons, também contribuem na produção de EROs. Essas espécies reativas de oxigênio induzidas pelo estresse podem agir como moléculas sinalizadoras e desencadear a expressão de genes envolvidos em mecanismos de defesa ou danificar o mecanismo celular, provocando diversos efeitos negativos na planta (DU et al., 2010).

Inibidor da ribonuclease E RraA / Dimetilmenaquinona metiltransferase isoforma 1 (*spot* 34) e LR48_Vigan05g022600 (*spot* 130), são proteínas responsáveis pelo metabolismo de RNA e sinalização respectivamente. Neste estudo poucas proteínas com essa função foram encontradas. De acordo com Paiva (2015), isso é justificado pela sua própria função, onde

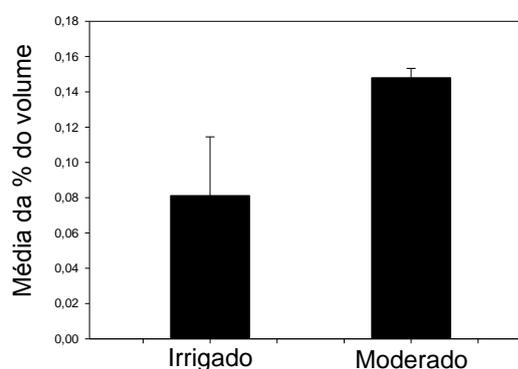
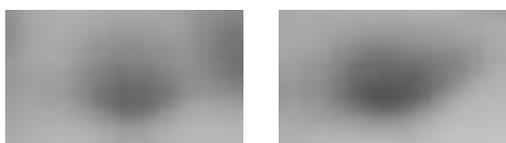
pequenas mudanças em suas expressões ou abundância já são capazes de alterar vários outros processos e geralmente são encontradas com pouca abundância.

O *spot 99* (Malato desidrogenase) mostrou alteração tanto no déficit hídrico moderado como no déficit hídrico severo, onde aumentou sua expressão 2,88 e 4,03 vezes respectivamente, ou seja, quanto mais esse genótipo exposto ao estresse mais essa proteína se expressa. (Figura 10).

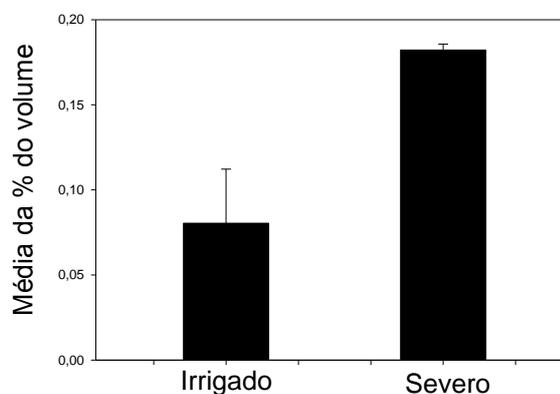
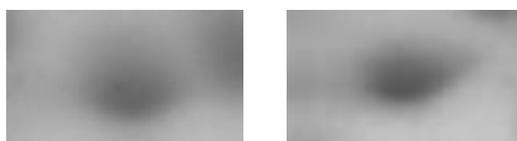
Figura 10. Detalhe do *spot 99* diferencialmente expresso sob déficit hídrico, os gráficos mostram os valores da média % do volume \pm desvio padrão em cada condição de déficit hídrico.

Figura A: irrigado x moderado e Figura B: irrigado x severo.

A



B



Para o tratamento severo quando comparado com o controle destacam-se proteínas relacionadas com metabolismo de proteína, subunidade de proteassoma alfa tipo 6 (*spot 6*), LR48_Vigan01g229200 (*spot 50*) e PHAVU_011G082600g (*spot 98*). O *spot 6* tem função relacionada com a proteólise, *spot 50* relacionado com síntese de ácidos nucleicos e *spot 98* com enrolamento de proteínas. Estes processos tiveram suas expressões aumentadas.

Apesar do crescimento da planta ser controlado por uma variedade de processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, a fotossíntese é o mecanismo chave, que fornece parte da energia e moléculas orgânicas para o crescimento e desenvolvimento da planta (NOURI et al., 2015). Para o processo de fotossíntese destaca-se os *spots* 20, 86 e 138. A subunidade menor Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase, parcial (*spot* 20), este mesmo *spot* foi expresso no déficit hídrico moderado, sendo que em ambos sua expressão foi diminuída. Razavizadeh et al. (2009), verificaram um aumento na expressão dessa enzima em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), quando submetidas a estresse salino. Abreu (2014), diz que a Rubisco é uma enzima que está sujeita tanto ao aumento como a diminuição da expressão em condições de estresse.

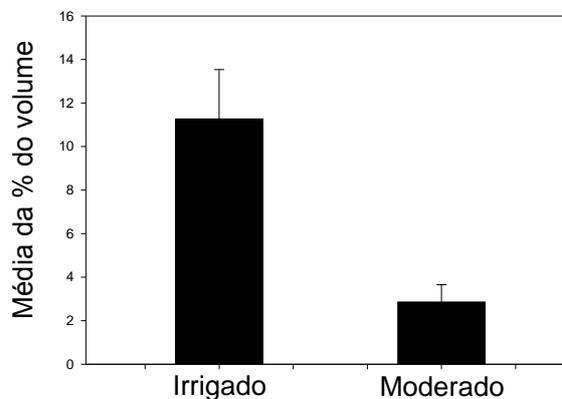
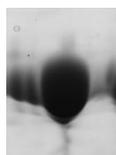
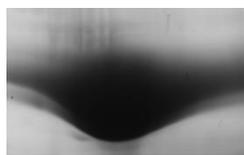
Na respiração e metabolismo energético o *spot* 94 (ATP síntase CF1 subunidade beta cloroplasto), diminui sua expressão quando submetido ao déficit hídrico severo. Essa proteína também foi identificada por Paiva (2015) em feijão-caupi quando submetido ao estresse biótico e abiótico, e a mesma teve sua expressão reduzida quando comparada com o controle, supondo que essa proteína sofre alterações quando submetida a algum tipo de estresse.

A subunidade maior Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase, parcial (cloroplasto) (*spot* 115), foi reduzida tanto no estresse moderado quanto no severo quando comparados com o controle. Também conhecida como a rubisco, essa enzima atua na fixação do carbono no ciclo de Calvin-Benson. O nível de expressão dessa proteína nas folhas do genótipo tolerante sob déficit hídrico moderado e severo foi de 3,94 e 3,00, respectivamente, quando comparado com o controle (Figura 11). À medida que se aumenta o nível de severidade do déficit hídrico, a expressão desta proteína diminui. No capítulo anterior, verificou-se uma redução na fotossíntese, comparando os tratamentos, controle, moderado e severo, com isso pode-se demonstrar o papel importante desta proteína na resposta da planta ao estresse.

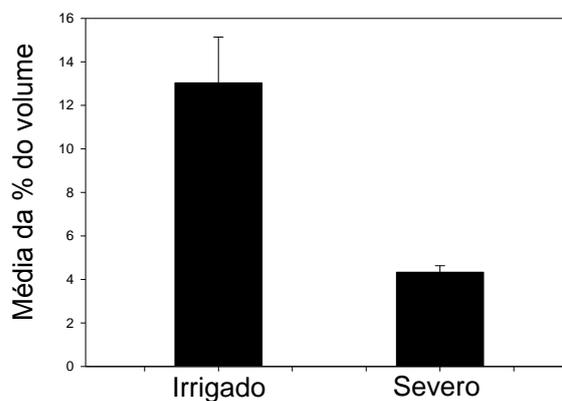
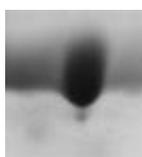
Figura 11. Detalhe do *spot* 115 diferencialmente expresso sob déficit hídrico, os gráficos mostram os valores da média % do volume \pm desvio padrão em cada condição de déficit hídrico.

Figura A: irrigado x moderado e Figura B: irrigado x severo.

A



B



Para o genótipo sensível quando submetido ao déficit hídrico moderado (-1,0 MPa), obteve-se o maior número de proteína responsivas 31 (Tabela 1, **ANEXO**), apresentando 21 proteínas diferentes (Tabela 7), pois foram encontradas 10 possíveis isoformas ou modificações de uma mesma proteína, representada por mais de um *spot* em um mesmo gel.

Tabela 7. Nível de expressão relativa das proteínas de folhas baseada na média da % de volume de plantas de feijão-caupi responsivas ao déficit hídrico moderado no genótipo sensível.

Spot ID	Proteína	Média da % de volume \pm DP		Nível de expressão
		Irrigado	Moderado	
5	Hipotética proteína GLYMA_17G228800	0,1399 \pm 0,0265	0,0361 \pm 0,0094	3,87
9	Proteína 2, intensificadora da oxigenação	0,7228 \pm 0,3051	0,1788 \pm 0,0878	4,04
14	Hipotética proteína LR48_Vigan09g195100	0,0733 \pm 0,0167	0,1862 \pm 0,0358	-2,54
15	Proteína de choque térmico de classe II de 17,9 kDa	0,0490 \pm 0,001	0,2583 \pm 0,0951	-7,49
18	PREVISTO: peroxiredoxina-2E, cloroplástica	0,7140 \pm 0,0682	3,0002 \pm 1,4584	-4,20
27	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	0,0716 \pm 0,0097	0,1773 \pm 0,0284	-2,48
40	Desconhecido	0,1032 \pm 0,0124	0,3451 \pm 0,1318	-3,34
41	Proteína hipotética KK1_007370	0,0483 \pm 0,0059	0,1702 \pm 0,0274	-5,50
42	Mog1 / PsbP, sanduíche alfa / beta / alfa	0,0182 \pm 0,0002	0,1031 \pm 0,0113	-14,91
74	Proteína hipotética KK1_025388	0,0196 \pm 0,0019	0,0492 \pm 0,0100	-2,51
87	PREVISTO: ribulose bisfosfato carboxilase / oxigenase activase, cloroplástica	0,7340 \pm 0,4736	2,3114 \pm 0,2856	-3,15
93	Proteína CPRD8	0,0429 \pm 0,0067	0,0846 \pm 0,0069	-2,04
109	PREVISTO: dissulfureto de proteína- isomerase-like	0,0052 \pm 0,0005	0,1011 \pm 0,0397	-28,9
115	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande, parcial (cloroplasto)	8,8011 \pm 2,1900	1,7708 \pm 2,1898	+4,97
116	Chaperone DnaK	0,1781 \pm 0,0332	0,3740 \pm 0,0709	-2,05
142	ATP sintase epsilon subunidade, parcial (cloroplasto)	0,0599 \pm 0,0075	0,1542 \pm 0,0602	-2,65
143	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	0,0435 \pm 0,0020	0,2984 \pm 0,0637	-6,85
144	Hipotética proteína SOVF_007620, parcial	0,0882 \pm 0,0062	0,2392 \pm 0,0864	-2,71
146	Rubisco ativase putativo, parcial	0,0527 \pm 0,0105	0,1217 \pm 0,0195	-2,31
147	Proteína hipotética VIGAN_10094100	0,2838 \pm 0,0396	0,5863 \pm 0,0865	-2,07

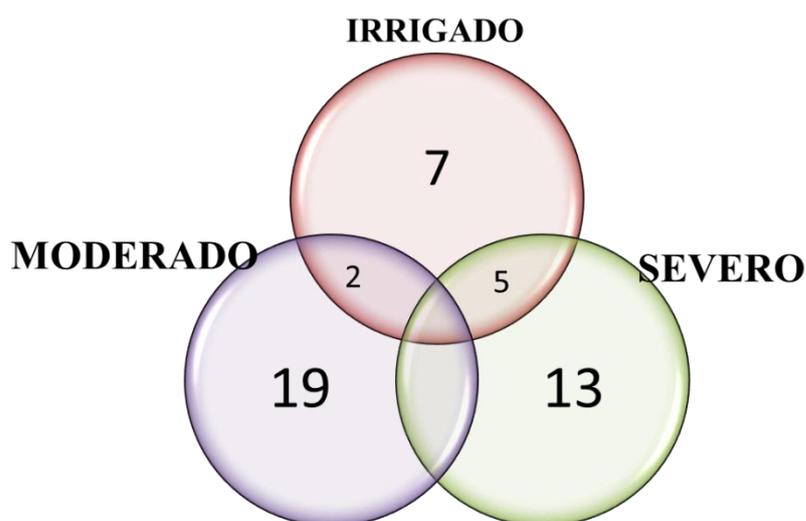
Desse total, duas tiveram sua expressão reduzida e 19 aumentadas (Figura 12). Para déficit severo (-1,5 MPa) foram encontradas 19 proteínas (Tabela 8), na qual 18 foram classificadas como proteínas diferenciais. Dessas 18, 5 foram reduzidas e 13 aumentadas (Figura 12).

Tabela 8. Nível de expressão relativa das proteínas de folhas baseada na média da % de volume de plantas de feijão-caupi responsivas ao déficit hídrico severo no genótipo sensível.

Spot ID	Proteína	Média da % de volume ± DP		Nível de expressão
		Irrigado	Severo	
1	Serina hidroximetiltransferase, mitocondrial	1,075 ± 1,075	3,672 ± 1,070	-4,70
4	Cinamoil-CoA redutase 1-like	4,124 ± 4,124	1,788 ± 0,395	+2,31
17	G-tipo lectina S-receptor-tipo serina / treonina-proteína quinase			
	LECRK2	0,096 ± 0,096	0,550 ± 0,126	-5,70
20	Ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase / oxigenase, subunidade parcial	1,623 ± 1,623	0,132 ± 0,026	+12,33
28	PREVISTO: hidroxiacilglutamina hidrolase citoplasmática	0,025 ± 0,025	0,083 ± 0,030	-1,21
29	Desconhecido	0,099 ± 0,099	0,286 ± 0,106	-2,90
34	Inibidor da ribonuclease E RraA / Dimetilmenaquinona metiltransferase isoforma 1	0,377 ± 0,377	0,996 ± 0,062	-2,64
46	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	1,108 ± 1,108	2,695 ± 0,380	-2,17
51	Hipotética proteína PHAVU_002G024000g	0,573 ± 0,573	1,553 ± 0,505	-2,71
60	Produto proteico não identificado	0,143 ± 0,143	0,087 ± 0,050	+4,90
68	Desconhecido	0,718 ± 0,718	2,103 ± 0,225	-2,93
82	PREVISTO: ribulose-fosfato 3-epimerase, cloroplástico	0,010 ± 0,010	0,080 ± 0,043	-26,0
88	PREVISTO: ribulose bisfosfato carboxilase / oxigenase activase, cloroplástica	0,036 ± 0,036	0,307 ± 0,139	-12,8
106	Proteína hipotética LR48_Vigan02g169000	0,029 ± 0,029	0,375 ± 0,150	-13,1

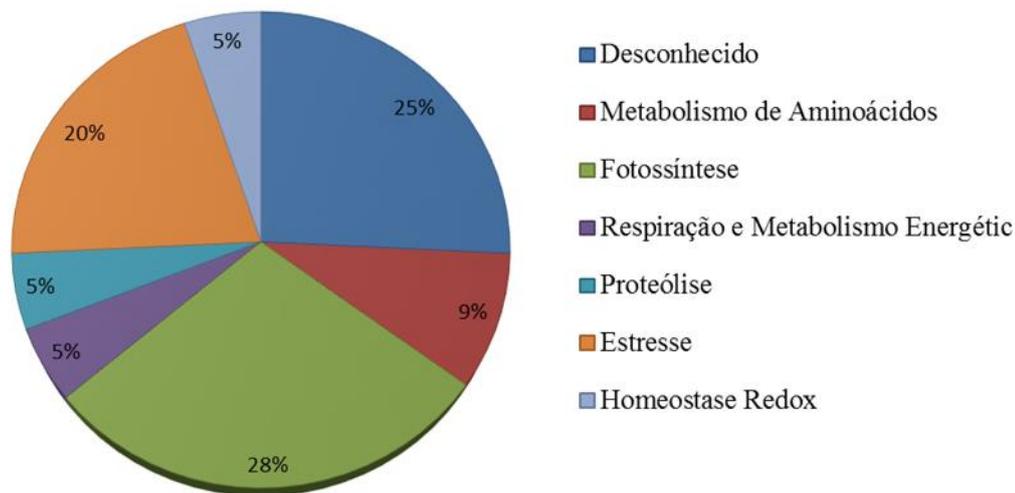
111	Subunidade beta do componente piruvato desidrogenase E1	0,311 ± 0,311	0,162 ± 0,027	+1,92
144	Hipotética proteína SOVF_007620, parcial	0,086 ± 0,086	0,181 ± 0,047	-2,10
149	Rubisco ativase putativo, parcial	0,280 ± 0,280	0,115 ± 0,008	+3,66
151	Hipotética proteína TSUD_191560	0,042 ± 0,042	0,093 ± 0,019	-2,20

Figura 12. Análise de diagramas de Venn de proteínas expressas diferencialmente do genótipo Santo Inácio Vermelho sob déficit hídrico em comparação com o controle.



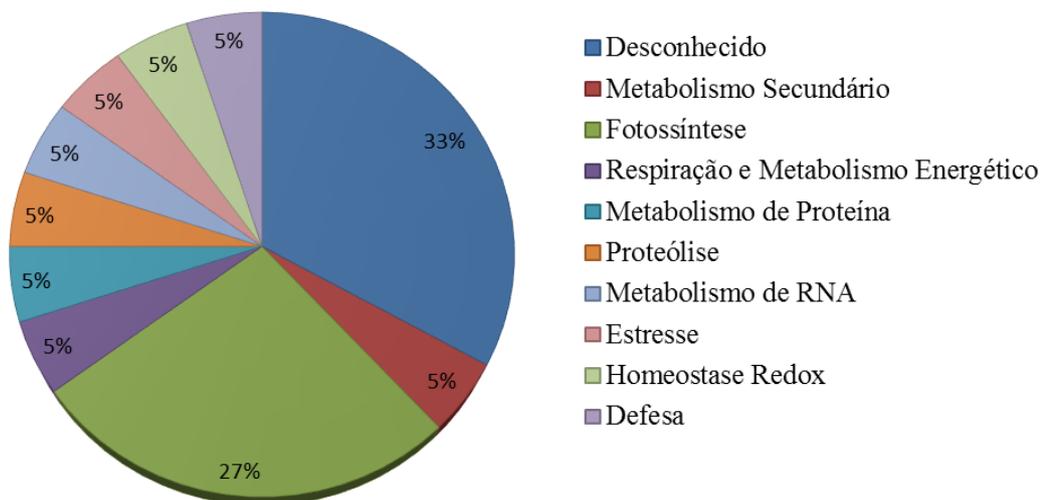
O genótipo Santo Inácio Vermelho quando submetido ao déficit hídrico moderado apresentou proteínas responsivas com diferentes grupos de função, fotossíntese, estresse, metabolismo de aminoácidos, homeostase redox, respiração e metabolismo energético, proteólise e função desconhecida (Figura 13).

Figura 13. Classificação funcional das proteínas de feijão-caupi com expressão diferencial no cultivar sensível (Santo Inácio Vermelho) quando submetido ao déficit moderado (- 1,0 MPa).



Para o déficit severo foram encontradas proteínas com funções de metabolismo de proteína, fotossíntese, metabolismo de RNA, respiração e metabolismo energético, metabolismo secundário, defesa, proteólise e desconhecido (Figura 14).

Figura 14. Classificação funcional das proteínas de feijão-caupi com expressão diferencial no cultivar tolerante (Santo Inácio Vermelho) quando submetido ao déficit severo (- 1,5 MPa).



As proteínas responsivas que mais se destacaram no estresse moderado foram as responsáveis pelo processo de fotossíntese sendo um total de 6, proteína 2 intensificadora da oxigenação, (*spot* 9), Mog1 / PsbP, sanduíche alfa / beta / alfa (*spot* 42), KK1_025388 (*spot* 74), Ribulose bisfosfato carboxilase / oxigenase ativase, Cloroplástico (*spot* 87) e rubisco ativase putative, partial (*spot* 146), apenas o *spot* 9 (Proteína 2 intensificadora da oxigenação), teve seu valor reduzido. Essa proteína tem função no processo de fotossíntese. Paiva (2015), também encontrou essa proteína em feijão-caupi submetido a dois tipos de estresse, na qual a

mesma teve sua expressão reduzida, quando comparada com o controle, fato semelhante ao encontrado neste trabalho.

A rubisco ativase putative, parcial (*spot* 146), também encontrada por Paiva (2015), agiu de modo diferente do *spot* 9, tendo o seu valor aumentado. Essa proteína tem o papel de remover a pentose fosfato da Rubisco, permitindo sua carbamilação e promove sua ativação, além disso, também tem papel de chaperona quando a célula está sob estresse (FATEHI et al., 2012). Tal fato pode estar relacionado com uma recuperação da planta e a tentativa de reativação da Rubisco para fixar o CO₂ remanescente (RINALDUCCI et al., 2011).

As proteínas identificadas com resposta ao estresse foram, Proteína de choque térmico de classe II de 17,9 kDa (*spot* 15), Proteína CPRD8 (*spot* 93), PREVISTO: dissulfureto de proteína-isomerase-like (*spot* 109) e Chaperone DnaK (*spot* 116), na qual estão relacionadas com resposta ao calor, atividade oxiredutase e estresse, resposta ao estresse do retículo endoplasmático e dobramento de proteínas.

As chaperonas moleculares são uma família diversificada de proteínas que funcionam para proteger proteínas no meio intracelular da agregação irreversível durante a síntese e em tempos de estresse celular. A chaperona DnaK (*spot* 116) é uma enzima que acopla ciclos de ligação a ATP, hidrólise e libertação de ADP por um domínio de hidrólise de ATP N-terminal para ciclos de sequestro e libertação de proteínas desdobradas por um domínio de ligação de substrato C-terminal. DnaK é em si um ATPase fraco. A hidrólise de ATP pelo DnaK é estimulada pela interação com outro co-chaperone, DnaJ. Deste modo, as co-chaperonas DnaJ e GrpE são capazes de regular rigorosamente o estado ligado a ligação a nucleotídeo e ligado a substrato de DnaK de modo que são necessários para as funções normais de manutenção e funções relacionadas com o estresse (GEORGOPOULOS e WELCH 1993).

A subunidade maior Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, parcial (cloroplasto), foi uma proteína que apareceu três vezes no mesmo gel, sendo identificado nos *spots* 26, 100 e 115, fato interessante que os *spots* 26 e 100 tiveram suas expressões aumentadas e o *spot* 115 reduzido (Figura 15). Essa enzima catalisa a primeira e principal reação do ciclo de Calvin-Benson, onde fixa CO₂ à molécula ribulose-1,5-bisfosfato, produzindo compostos orgânicos. Essa enzima é importante para produção dos fotossintéticos, como açúcares e amido, que aumentam a tolerância à estresse e auxiliam na produção de reserva energética para a planta (WANG et al., 2013). A presença da mesma proteína em diferentes *spots* indica maiores taxas de degradação proteica, como sugerido por Hajheidari et al. (2005).

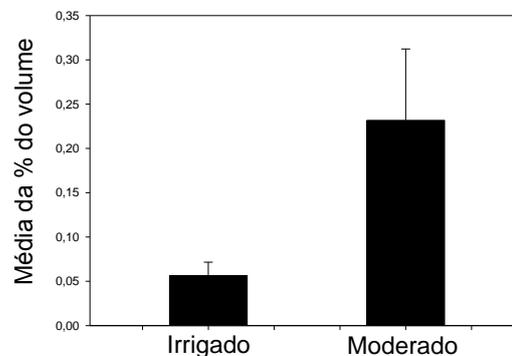
Figura 15. Detalhe dos *spots* 26, 100 e 115 [Subunidade maior Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, parcial (cloroplasto)], os gráficos mostram os valores da média % do volume \pm desvio padrão em condição de déficit hídrico moderado. Figura A: *spot* 26, irrigado x moderado, Figura B: *spot* 100, irrigado x moderado e Figura C: *spot* 115, irrigado x moderado.

A

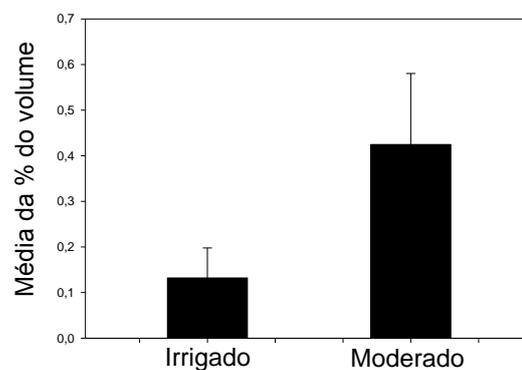
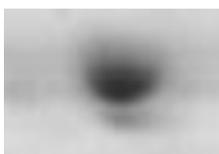
CONTROLE



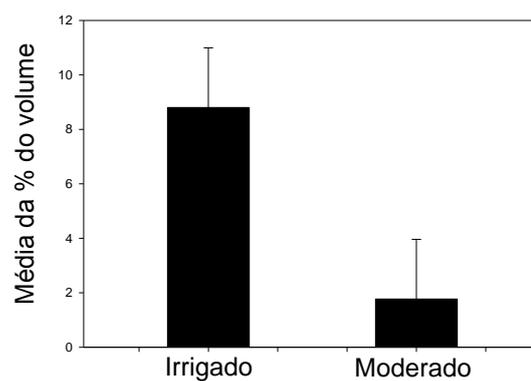
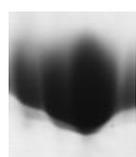
MODERADO



B



C



Para o déficit hídrico severo, novamente foi destacado proteínas relacionadas com a fotossíntese onde foram identificadas, subunidade menor Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase, parcial (*spot* 20), PHAVU_002G024000g (*spot* 51), ribulose-fosfato 3-epimerase, cloroplástico (*spot* 82), ribulose bisfosfato carboxilase / oxigenase ativase, cloroplástico (*spot* 88) e rubisco ativase putative, parcial (*spot* 149). Os *spots* 20 e 149 foram reduzidos e os *spots*

82 e 88 foram aumentados, ambos têm função com a ativação da Rubisco importante processo para a fotossíntese. Com maior exposição à seca, pode-se ocorrer à redução da abundância de Rubisco, sugerindo que a eficiência da fixação de CO₂ diminui sob estresse hídrico (ZADRAŽNIK et al., 2013).

A enzima Serina hidroximetiltransferase, mitocondrial (*spot 1*), pode participar da síntese de serina ou da degradação da glicina-betaina. No estresse severo observa-se um aumento de serina, fato esse que está relacionado ao ajustamento osmótico em resposta ao estresse. Para o metabolismo secundário foi identificada a proteína Cinamoil-CoA redutase 1-like (*spot 4*), onde tem função relacionada com processo de biossíntese de esteroides.

As plantas também respondem às condições de estresse ligadas a respiração e metabolismo energético. Como esperado, ambos são afetados pela seca, piruvato desidrogenase E1 subunidade componente beta (*spot 111*), teve sua expressão aumentada, isso poderia estar relacionado à necessidade de células para obter energia extra para lidar com o estresse e reparar danificações. Paiva (2015), também observou esta proteína aumentada quando submetida ao estresse.

CONCLUSÃO

A partir da análise do proteoma diferencial de folhas de feijão-caupi responsivas ao déficit hídrico e proteínas diferenciais nos genótipos sob déficits foi possível obter uma visão da resposta ao déficit hídrico na folha, por meio da identificação proteínas/enzimas de diferentes rotas metabólicas envolvidas no processo de tolerância a seca em feijão-caupi. As proteínas que mais aumentaram suas expressões no genótipo tolerante foram aquelas envolvidas diretamente no metabolismo de proteínas, seguido de proteínas responsáveis pela fotossíntese, tanto na condição de controle como sob déficit hídrico.

Com estes resultados sugere que um dos fatores para a tolerância diferencial dos genótipos podem estar relacionados, pelo menos em parte, com os passos inicial da fotossíntese. Isso é evidenciado pelos aumentos na Rubisco no genótipo tolerante. A proteína que mais expressou entre os genótipos foi a subunidade maior ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, parcial (cloroplasto), uma diferença encontrada entre os dois genótipos está relacionada a essa proteína, o genótipo sensível teve maior repressão dessa proteína, com isso pode-se sugerir que o tolerante possua mecanismo mais eficiente de escape à seca que o sensível.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. E. B., DOS SANTOS ARAÚJO, G., DE OLIVEIRA MONTEIRO-MOREIRA, A. C., COSTA, J. H., DE BRITO LEITE, H., MORENO, F. B. M. B., ... & GOMES-FILHO, E. Proteomic analysis of salt stress and recovery in leaves of *Vigna unguiculata* cultivars differing in salt tolerance. **Plant cell reports**, v. 33, n. 8, p. 1289-1306, 2014.
- ALI, G. M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. **Journal of proteome research**, v.5, n.2, p. 396-403, 2006.
- ALVAREZ, S.; MARSH, E.L.; Schroeder, S.G.; Schachtman, D.P. Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. **Plant Cell Environ**, v. 3, p. 325-340, 2008.
- BASTOS, E. A.; FERREIRA, V. M.; SILVA, C. R.; Andrade Júnior, A. S. Evapotranspiração e coeficiente de cultivo do feijão-caupi no vale do Gurguéia, **PI Irriga**, v.13, p. 182-190, 2008.
- BLANCO, F.F., et al. Milho verde e feijão-caupi cultivados em consórcio sob diferentes lâminas de irrigação e doses de fósforo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 46, n. 5, p. 524-530, 2011.
- BOYER, J. S. WATER deficits and photosynthesis. In: Kozlowski, T.T. (ed.) Water deficits and plant growth. New York: **Academic Press**, v.4, p.154-191, 1978.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v. 7, n.72, p. 248-254, 1976.
- CHENG, Y.; QI, Y.; ZHU, Q.; CHEN, X.; WANG, N.; ZHAO, X.; CHEN, H.; CUI, X. XU, L.; ZHANG, W. New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. **Proteomics**, v.9, n.11, p.3100-3114, 2009.
- CHO, K.; SHIBATO, J.; AGRAWAL, G. K.; JUNG, Y. H.; KUBO, A.; JWA, N. S.; TAMOGAMI, S.; KOUJI. S.; KIKUCHI. S.; HIGASHI. T.; KIMURA. S.; SAJJ, H.; TANAKA, Y.; WAHASHI, Y.M.; KIMURA, S. Integrated transcriptomics, proteomics, and metabolomics analyses to survey ozone responses in the leaves of rice seedling. **Journal of proteome research**, v.7, n.7, 2980-2998, 2008.
- DA CRUZ, F. S. M. C.; GALLO, de C.II. "Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal." **Ciência Rural** v.40, n.3, p.727-734, 2010.

DU, C. X., FAN, H. F., GUO, S. R., TEZUKA, T., & LI, J. Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress. **Phytochemistry**, v.71, n.13, p.1450-1459, 2010.

FATEHI, F., HOSSEINZADEH, A., ALIZADEH, H., BRIMAVANDI, T., & STRUIK, P. C. The proteome response of salt-resistant and salt-sensitive barley genotypes to long-term salinity stress. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 5, p. 6387-6397, 2012.

FENG, H.; CHEN, Q.; FENG, J.; ZHANG, J.; YANG, X.; ZUO, J. Functional characterization of the Arabidopsis eukaryotic translation initiation factor 5A-2 that plays a crucial role in plant growth and development by regulating cell division, cell growth, and cell death. **Plant physiology**, v. 144, n. 3, p. 1531-1545, 2007.

FERREIRA, V.M.; MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; OLIVEIRA, L.E.M.D.; PURCINO, A. Á. C. Nitrogen metabolism associated to water deficit and its recovery in maize genotypes. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.13-17, 2002.

FONSECA, M. R. et al. Teor e acúmulo de nutrientes por plantas de feijão caupi em função do fósforo e da saturação por bases. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 53, n. 2, p. 195-205, 2010.

FONTANA, D.C.; BERLATO, M.A.; BERGAMASCHI, H. Alterações micrometeorológicas na cultura da soja submetida a diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.5, p.661-669, 1992.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, A.A. **Melhoramento Genético**. In: Freire Filho, F. R.; Lima, J. A. A.; Ribeiro, V. Q. (Ed.). Feijão caupi: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.

GEORGOPOULOS, C.; WELCH, W.J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. **Annual review of cell biology**, v.9, n.1, p.601-634, 1993.

HAJHEIDARI, M.; ABDOLLAHIAN-NOGHABI, M.; ASKARI, H.; HEIDARI, M.; SADEGHIAN, S.Y.; OBER, E. S.; HOSSEINI SALEKDEH, G. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. **Proteomics**, v.5, n.4, p. 950-960, 2005.

JORRIN-NOVO, J.V.; MALDONADO, A.M.; ECHEVARRIA-ZOMEÑO, S., VALLEDOR, L.; CASTILLEJO, M.A.; CURTO, M.; VALERO, J.; SGHAER, B.; DONOSO, G.; Redondo I (2009) Plant Proteomics update: Second-generation proteomic techniques, na appropriate experimental design, and data Analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteoma coverage and expand biological Knowledge. **J Proteomics**. v.72, p. 285-314, 2009.

LEE, C.P.; EUBEL, H.; O'TOOLE, N.; MILLAR, A.H. Heterogeneity of the mitochondrial proteome for photosynthetic and non-photosynthetic Arabidopsis metabolism. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.7, n.7, p.1297-1316, 2008.

LIMA, J. R. S.; ANTONINO, A. C. D.; SOARES, W. A.; SILVA, I. F. **Estmativa da evapotranspiração do feijão-caupi utilizando o modelo de Penman-Monteith**, v.11, p.477-491, 2006.

KE, Y.; HAN, G.; HE, H.; LI, D. Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. **Biochem Biophys Res Commun** v.379, p. 133-138, 2009.

KIM, D. W.; RAKWAL, R.; AGRAWAL, G. K.; JUNG, Y.H.; SHIBATO, J.; JWA, N. S., ... & USUI, K. A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. **Electrophoresis**, v.26, n.23, p.4521-4539, 2005.

KOSOVÁ, K.; PRÁŠIL, I. T.; VÍTÁMVÁS, P. Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 4, p. 6757-6789, 2013.

MELO, A.R.B.; BARBOSA, Z.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. **Acumulação de solutos e ajustamento osmótico em plantas de caupi [Vigna unguiculata (Walp) L.] submetidas à salinidade**. In: VII congresso brasileiro de fisiologia vegetal, BRASÍLIA, 1999.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; MORAES, J.A.P.V.; BURITY, H.A.; BEZERRA NETO, E. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.75-87, 2001.

MESQUITA, R.O. **Determinantes fisiológicos e moleculares da resposta diferencial à seca em soja**. (Tese). Universidade Federal de Viçosa, VIÇOSA, MINAS GERAIS. 2013, 143p.

MOONEY, B.P., MIERNYK, J.A., AND RANDALL, D.D. The complex fate of alpha-ketoacids. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**. v. 53, p. 357–375, 2002.

NEUHOFF, V., STAMM, R., & EIBL, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. **Electrophoresis**, v.6, n.9, p.427-448, 1988.

PAIVA, A.L.S. **Resposta bioquímica a do feijão-de-corda [Vigna unguiculata L. (WALP)] ao estresse salino e infecção pelo vírus do mosaico severo do caupi (CPMV) revelada pela proteômica quantitativa livre de marcação**. (dissertação). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce. 2015. 200 p.

NOURI, M. Z., MOUMENI, A., & KOMATSU, S. Abiotic stresses: insight into gene regulation and protein expression in photosynthetic pathways of plants. **International journal of molecular sciences**, v.16, n.9, p.20392-20416, 2015.

PATEL, M.S.; ROCHE, T.E. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. **FASEB J**, v. 4, p. 3224–3233, 1990.

PENG, Z., WANG, M., LI, F., LV, H., LI, C.;XIA, G. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.8, n.12, p.2676-2686, 2009.

PENNINGTON, S.R.; DUNN. M.J. Proteomics: from protein sequence to function. **New York: Springer-Verlag e BIOS scientific Plubishers**, v. 1, 2001.

QUESHI, M.I.; QADIR, S, ZOLLA, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathway in plants, **J Plant Physiol**, v.164, p. 1239-1260, 2007

RABELLO, A.R.; GUIMAÃES, C.M.; RANGER, P.H, DA SILV, F.R.; SEIXAS, D.; DE SOUZA, E.; BRASILEIRO, A.C.; SPEHAR, C.R.; FERREIRA, M.E.; METHTA, A. Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryza sativa* L.). **BMC Genomics** v.9, p. 485, 2008.

RAZAVIZADEH, R.; EHSANPOUR, A.A.; AHSAN, N.; KOMATSU, S. Proteome analysis of tobacco leaves under salt stress. **Peptides** v.30, p.1651–1659, 2009.

RINALDUCCI, S., EGIDI, M. G., KARIMZADEH, G., JAZII, F. R., ZOLLA, L. Proteomic analysis of a spring wheat cultivar in response to prolonged cold stress. **Electrophoresis**, v.32, n.14, p.1807-1818, 2011.

SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. C. G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 727-734, 2010.

SHARMA S, SHARMA SS, RAI VK. Modulation by phenolic compounds of ABA-induced inhibition of mustard (*Brassica juncea* L. cv. RLM 198) seed germination. **Indian J Experimental Biology**, v.4, p. 352 - 356, 2003.

SHEVCHENKO A, TOMAS H, HAVLIS J, OLSEN JV, MANN M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature** v.1, p. 2856 - 2860, 2006.

SOFO, A.; CICCIO, N.; PARAGGIO, M.; SCOPA, A. Regulation of the Ascorbate–Glutathione Cycle in Plants Under Drought Stress. **Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants** 137-189, 2010

TEÓFILO, E. M.; DUTRA, A. S.; PITIMBEIRA, J. B.; CUNHA DIAS, F. T.; BARBOSA, F. DE S. Potencial fisiológico de sementes de feijão caupi produzidas em

duas regiões do Estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 03, p. 443-448, 2008.

WAN, X. Y., & LIU, J. Y. Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.7, n.8, p.1469-1488, 2008.

WANG W, VINOCUR B, SHOSEYOV O, ALTMAN A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends Plant Sci** v.9, p.244-52, 2004.

WANG, X.; CHANG, L.; WANG, B.; WANG, D.; LI, P.; WANG, L., ... & GUO, A. Comparative proteomics of *Thellungiella halophila* leaves from plants subjected to salinity reveals the importance of chloroplastic starch and soluble sugars in halophyte salt tolerance. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.12, n.8, p.2174-2195, 2013.

WANG, X., VIGNJEVIC, M., JIANG, D., JACOBSEN, S., & WOLLENWEBER, B. Improved tolerance to drought stress after anthesis due to priming before anthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) var. Vinjett. **Journal of experimental botany**, v.362, 2014.

XU, C.; HUNG, B. Differential proteomic response to heat stress in thermal *Agrostis scabra* and heat-sensitive *Agrostis stolonifera*. **Physiol Plant** (in press), 2010.

ZADRAŽNIK, T., HOLLUNG, K., EGGE-JACOBSEN, W., MEGLIČ, V., & ŠUŠTAR-VOZLIČ, J. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of proteomics**, v.78, p.254-272, 2013.

.

ANEXO

Tabela 1 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-caupi nos genótipos contrastantes, através de análise por ESI-Q-TOF MS e buscas no NCBI. O nível ncia considerado nas identificações foi $p < 0,05$.

N° do spot	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Score ^c	Cobertura da sequência (%)	Processo biológico
				Experimental	Teórico			
1	gi 734319689 KHN03621.1	Serina hidroximetiltransferase, mitocondrial.	Glycine soja	6,65/46	8.60/57,45	339	12	Estresse
3	gi 920696570 KOM39795.1	Proteína hipotética LR48_Vigan03g317700	Vigna angularis	5,83/46	5.29/41,15	65	2	Metabolismo Energético
4	gi 1044577539 XP_017425528.1	Cinocheil-CoA redutase 1-like	Vigna angularis	6,62/26	7/36,08	461	30	Metabolismo Secundário
5	gi 947056007 KRH05460.1	Proteína hipotética GLYMA_17G228800	Glycine max	6,36/82	7.05/114,52	135	2	Metabolismo de aminoácidos
6	gi 950946060 XP_014494399.1	PEVISTO: subunidade de proteassoma alfa tipo-6	Vigna radiata var. radiata	5,80/27	5.58/27,53	218	15	Metabolismo de proteína
9	gi 950991454 XP_014504521.1	A proteína potenciadora de evolução de oxigênio 2, cloroplasto	Vigna radiata var. radiata	5,74/20	8.81/28,46	435	31	Fotossíntese
10	gi 951044472 XP_014518642.1	PREVISTO: isoforma de tipo alantoinase X1	Vigna radiata var. radiata	5,69/31	5.09/56,85	65	2	Metabolismo de Proteína
11	gi 1035945099 OAY69884.1	Sistema de clivagem de glicina Proteína H, mitocondrial	Ananas comosus	4,84/16	5,44/17,45	73	9	Metabolismo de Proteína
12	gi 149941202 CAO02533.1	rubisco ativase Putative, parcial	Vigna unguiculata	6,76/42	8.31/28,12	252	17	Fotossíntese
13	gi 902184685 KNA10343.1	Proteína hipotética SOVF_145230	Spinacia oleracea	5,76/37	8.44/40,26	158	6	Metabolismo do Nitrogênio
14	gi 920712043 KOM53292.1	Proteína hipotética LR48_Vigan09g195100	Vigna angularis	4,82/31	5.28/36,10	206	10	Função desconhecida
15	gi 734335969 KHN08087.1	Proteína de choque térmico de classe II de 17,9 kDa	Glycine soja	5,82/14	6.62/17,96	81	10	Estresse
16	gi 558695536 AHA84121.1	Peroxiredoxin-2E	Phaseolus vulgaris	4,72/15	7.67/23,07	159	16	Homeostase redox

Continuação. Tabela 1 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-caupi nos genótipos contrastantes, através de análise por ESI-Q-TOF MS e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$

N° do spot	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa)b		Scorec	Cobertura da sequência (%)	Processo biológico
				Experimental	Teórico			
17	gi 460366084 XP_004228923.1	G-tipo lectina S-receptor-tipo serina / treonina-proteína quinase LECRK2	Solanum lycopersicum	5,47/16	6.18/94,551	65	1	Defesa
18	gi 950949607 XP_014495197.1	PREVISTO: peroxiredoxina-2E, cloroplástica	Vigna radiata var. radiata	4,95/15	8.38/23,08	166	15	Homeostase redox
19	gi 449441864 XP_004138702.1	PREVISTO: factor de iniciação da tradução eucariótica 5A-2	Cucumis sativus	6,09/19	5.32/17,61	122	13	Metabolismo de Proteína e envelopamento
23	gi 593330407 XP_007138630.1	Proteína hipotética PHAVU_009G224900g	Phaseolus vulgaris	5,77/25	8.86/26,30	168	9	Metabolismo de Proteína e envelopamento
25	gi 965665675 BAT81163.1	Proteína hipotética VIGAN_03082800	Vigna angularis var. angularis	6,77/19	8.74/27,99	169	11	Proteína não caracterizada
26	gi 353444485 AER00006.1	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande, parcial (cloroplasto)	Habenaria roxburghii	5,46/21	5,78/22,99	86	6	Respiração e Metabolismo energético
27	gi 172046675 P85487.1	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	Pinus halepensis	5,17/21	4,21/11,58	58	100	Função desconhecida
28	gi 950986436 XP_014503567.1	PREVISTO: hidroxiacilglutamina hidrolase citoplasmática	Vigna radiata var. radiata	4,39/30	5.76/28,95	100	5	Metabolismo de proteína
29	gi 388515001 AFK45562.1	Desconhecido	Lotus japonicus	5,43/23	5,75/21,52	64	5	Proteína não caracterizada
33	gi 172046675 P85487.1	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	Pinus halepensis	5,32/17	4,21/11,58	58	100	Função desconhecida
34	gi 508714523 EOY06420.1	Inibidor da ribonuclease E RraA / Dimetilmenaquinona metiltransferase isoforma 1	Theobroma cacao	5,94/27	9,38/32,70	66	3	Metabolismo de RNA

Continuação. Tabela 1 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-caupi nos genótipos contrastantes, através de análise por ESI-Q-TOF MS e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$.

N° do spot	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Score ^c	Cobertura da sequência (%)	Processo biológico
				Experimental	Teórico			
36	gi 1004136181 KXZ44223.1	Proteína hipotética GPECTOR_71g584	Gonium pectorale	4,93/16	8,63/21,05	66	5	Função desconhecida
37	gi 661893989 CDP02430.1	Produto de proteína sem nome	Coffea canephora	5,58/20	6,51/35,31	64	5	Função desconhecida
39	gi 950991454 XP_014504521.1	PREVISTO: protein 2 potenciador de oxigênio, Tipo cloroplástico	Vigna radiata var. radiata	6,27/23	8,81/28,47	201	16	Fotossíntese
40	gi 388515001 AFK45562.1	Desconhecido	Lotus japonicus	5,43/24	5,74/21,52	69	5	Função desconhecida
41	gi 1012363500 KYP74683.1	Proteína hipotética KK1_007370	Cajanus cajan	5,78/23	8,89/28,54	71	3	Função desconhecida
42	gi 976915702 KVI01566.1	Mog1 / PsbP, sanduíche alfa / beta / alfa	Cynara cardunculus var. scolymus	4,72/25	5,97/28,45	227	16	Fotossíntese
44	gi 388504372 AFK40252.1	Desconhecido	Lotus japonicus	5,69/24	9,14/26,64	155	9	Função desconhecida
46	gi 172046675 P85487.1	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	Pinus halepensis	5,40/25	4,21/11,58	63	100	Função desconhecida
48	gi 920712043 KOM53292.1	Proteína hipotética LR48_Vigan09g195100	Vigna angularis	5,01/33	5,28/36,10	123	7	Função desconhecida
50	gi 920688753 KOM32736.1	Proteína hipotética LR48_Vigan01g229200	Vigna angularis	5,25/27	4,95/31,61	127	9	Metabolismo de proteína
51	gi 593787652 XP_007156865.1	Proteína hipotética PHAVU_002G024000g	Phaseolus vulgaris	6,39/30	6,08/35,20	445	27	Fotossíntese
53	gi 593330407 XP_007138630.1	Proteína hipotética PHAVU_009G224900g	Phaseolus vulgaris	5,96/25	8,86/23,1	153	9	Metabolismo de Proteínas
54	gi 172046675 P85487.1	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	Pinus halepensis	4,45/27	4,21/11,58	58	100	Função desconhecida

Continuação. Tabela 1 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-caupi nos genótipos contrastantes, através de análise por ESI-Q-TOF MS e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$.

N° do spot	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Score ^c	Cobertura da sequência (%)	Processo biológico
				Experimental	Teórico			
55	gi 1044541266 XP_017406459.1	PREVISTO: cisteína sintase, cloroplástica / cromoplasia	Vigna angularis	5,96/25	6.86/41,11	835	53	Metabolismo de Proteína e envelopamento
56	gi 115800 P09756.1	RecName: Full = Clorofila a-b proteína 3, cloroplástica; AltName: Full = LHCII tipo I CAB-3; Curto = LHCP; Sinalizadores: Precursor BnaA04g12000D	Glycine max	4,98/27	5,46/27,90	76	4	Fotossíntese
58	gi 674917301 CDY15911.1		Brassica napus	5,59/26	6,90/33,45	73	4	Respiração e Metabolismo Energético
59	gi 950994906 XP_014505248.1	PREVISTO: fructose-bisfosfato aldolase, isoenzima citoplasmática 1	Vigna radiata var. radiata	6,22/38	6.07/38,57	409	13	Fotossíntese
60	gi 661894930 CDP01929.1	Produto de proteína sem nome	Coffea canephora	5,88/37	8.76/35,26	171	8	Função desconhecida
63	gi 388491410 AFK33771.1	Desconhecido	Lotus japonicus	6,69/28	6,63/27,02	154	11	Função desconhecida
64	gi 1012199871 XP_015972885.1	PREVISTO: PROTEÍNA DE BAIXA QUALIDADE: fructose-bisfosfato aldolase, isoenzima 1 citoplasmática	Arachis duranensis	6,23/39	5.67/34,73	813	27	Fotossíntese
65	gi 955071241 NP_001304236.1	Isoenzima foliar de glutamina sintetase, cloroplástica	Vigna radiata	5,18/42	6.77/47,51	296	12	Metabolismo de Proteína e envelopamento
68	gi 217073226 ACJ84972.1	Desconhecido	Medicago truncatula	5,87/33	7.60/29,11	129	13	Função desconhecida
70	gi 947051433 KRH00962.1	Proteína hipotética GLYMA_18G244900	Glycine max	5,02/30	5.75/30,777	207	17	Fotossíntese

Continuação. Tabela 1 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-caupi nos genótipos contrastantes, através de análise por ESI-Q-TOF MS e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$.

N° do spot	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Scorec	Cobertura da sequência (%)	Processo Biológico
				Experimental	Teórico			
73	gi 113208365 BAF03553.1	Cisteína proteinase CP2	Phaseolus vulgaris	5,59/32	6,16/40,42	79	5	Função desconhecida
74	gi 1012341444 KYP52647.1	Proteína hipotética KK1_025388	Cajanus cajan	5,87/36	7,09/38,36	174	6	Fotossíntese
75	gi 1130844837 GAV74505.1	Proteína contendo domínio HSP20	Cephalotus follicularis	6,85/53	5,41/27,02	144	11	Resposta ao Estresse
76	gi 1044577539 XP_017425528.1	PREVISTO: cinnamoyl-CoA redutase 1-like	Vigna angularis	6,7/35	7/36,08	196	10	Metabolismo de Proteína
77	gi 1032285790 OAP00118.1	Proteína hipotética AXX17_AT4G25850	Arabidopsis thaliana	4,97/31	6,03/33,81	60	4	Função desconhecida
78	gi 1045407955 GAU11758.1	hypothetical protein TSUD_75090	Trifolium subterraneum	5,48/47	5,99/55,13	148	4	Função desconhecida
79	gi 920712043 KOM53292.1	Hypothetical protein LR48_Vigan09g195100	Vigna angularis	4,86/31	5,28/36,10	265	14	Função desconhecida
81	gi 950964179 XP_014498496.1	PREDICTO: haloacid dehalogenase-like hidrolase domain-containing protein At3g48420	Vigna radiata var. radiata	5,12/31	6,33/35,91	313	14	Função desconhecida
82	gi 1098782533 XP_018850886.1	PREVISTO: ribulose-fosfato 3-epimerase, cloroplástico	Juglans regia		8,97/30,32	85	5	Fotossíntese
83	gi 1770222 CAB00006.1	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande, parcial (cloroplasto)	Dovyalis rhamnoides	5,70/54	6,18/52,18	69	2	Respiração e Metabolismo energético
84	gi 955071241 NP_001304236.1	A isozima foliar de glutamina sintetase	Vigna radiata	5,40/41	6,77/47,52	211	12	Metabolismo de Nitrogênio
85	gi 734312817 KHN00995.1	PREVISTO: chaperonina CPN60-2, mitocondrial	Glycine soja	5,56/59	5,75/61/93	284	8	Estresse

Continuação. Tabela 1 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-caupi nos genótipos contrastantes, através de análise por ESI-Q-TOF MS e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$.

N° do spot	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Score ^c	Cobertura da sequência (%)	Processo biológico
				Experimental	Teórico			
86	gi 595823828 XP_007205135.1	Proteína hipotética PRUPE_ppa005137mg	Prunus persica	5,51/41	6,10/52,22	419	15	Fotossíntese
87	gi 1044564536 XP_017418548.1	PREVISTO: ribulose bisfosfato carboxilase / oxigenase activase, cloroplástica	Vigna angularis		7,57/48,51	751	30	Fotossíntese
88	gi 1044564536 XP_017418548.1	PREVISÃO: bisfosfato de ribulose carboxilase / oxigenase ativase, cloroplástica	Vigna angularis		7,57/48,51	932	30	Fotossíntese
91	gi 1044587493 XP_017430917.1	PREVISTO: ribulose bisfosfato carboxilase / oxigenase ativase, tipo cloroplástico	Vigna angularis	5,54/40	5,57/52,42	322	9	Fotossíntese
92	gi 11989977 CAC19521.1	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande, parcial (cloroplasto)	Arcytophyllum aristatum		6,13/52,34	218	7	Fotossíntese
93	gi 1854443 BAA12160.1	Proteína CPRD8	Vigna unguiculata		5,49/42,33	63	4	Estresse
94	gi 393396089 YP_006460328.1	Subunidade beta de ATP sintase CF1 (cloroplasto)	Vigna unguiculata	5,19/47	5,20/53,80	592	23	Fotossíntese
98	gi 593191312 XP_007132293.1	Proteína hipotética PHAVU_011G082600g	Phaseolus vulgaris	4,90/56	5,12/61,60	846	21	Metabolismo de proteína
99	gi 3273828 AAC24855.1	Malato-desidrogenase reforçada com nódulos	Glycine max	5,33/36	6,91/43,86	353	16	Metabolismo de carboidratos
100	gi 1770222 CAB00006.1	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande, parcial (cloroplasto)	Dovyalis rhamnoides	5,7/46	6,18/52,18	142	5	Respiração e Metabolismo Energético
101	gi 593800950 XP_007163512.1	Proteína hipotética PHAVU_001G240200g	Phaseolus vulgaris	5,38/36	5,94/41,97	276	11	Metabolismo Energético

Continuação. Tabela 1 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-caupi nos genótipos contrastantes, através de análise por ESI-Q-TOF MS e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$.

N° do spot	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Score ^c	Cobertura da sequência (%)	Processo biológico
				Experimental	Teórico			
105	gi 1044564536 XP_017418548.1	PREVISTO: ribulose bisfosfato carboxilase / oxigenase activase, cloroplástica	Vigna angularis	6,63/39	7.57/48,51	854	29	Fotossíntese
106	gi 920692315 KOM35540.1	Proteína hipotética LR48_Vigan02g169000	Vigna angularis	4,57/39	5.52/53,40	328	10	Função desconhecida
107	gi 965601597 BAT88775.1	Proteína hipotética VIGAN_05238000	Vigna angularis var. angularis	6,18/38	5,89/42,80	99	2	Fotossíntese
109	gi 950979939 XP_014501963.1	PREVISTO: dissulfureto de proteína-isomerase-like	Vigna radiata var. radiata	5,33/76	5.35/61,79	64	2	Estresse
110	gi 255646270 ACU23619.1	Desconhecido	Glycine max	5,24/39	5,89/45,76	130	5	Função desconhecida
111	gi 195621752 ACG32706.1	Subunidade beta do componente piruvato desidrogenase E1	Zea mays	6,83/35	5,46/40,15	73	2	Respiração e Metabolismo energético
112	gi 1012199871 XP_015972885.1	PREDICTO: PROTEÍNA DE BAIXA QUALIDADE: frutose-bisfosfato aldolase, isoenzima 1 citoplasmática	Arachis duranensis	6,15/40	5,67/34,73	683	27	Fotossíntese
113	gi 172046675 P85487.1	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	Pinus halepensis	5,78/40	4,21/11,58	58	100	Função desconhecida
114	gi 661878473 CDP17775.1	Produto de proteína sem nome	Coffea canephora	6,65/26	5,65/24,26	242	17	Função desconhecida
115	gi 353444485 AER00006.1	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande, parcial (cloroplasto)	Withania somnifera	6,48/47	6,30/51,10	737	28	Respiração e Metabolismo energético

Continuação. Tabela 1 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-caupi nos genótipos contrastantes, através de análise por ESI-Q-TOF MS e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$.

N° do spot	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Score ^c	Cobertura da sequência (%)	Processo biológico
				Experimental	Teórico			
116	gi 976917633 KVI03056.1	Chaperone DnaK	Cynara cardunculus var. scolymus	4,9/63	5,36/78,43	369	10	Estresse
117	gi 1045364182 GAU47135.1	Proteína hipotética TSUD_247570	Trifolium subterraneum	5,27/43	5,53/44,40	561	28	Função desconhecida
118	gi 965601597 BAT88775.1	Proteína hipotética VIGAN_05238000	Vigna angularis var. angularis	6,29/43	5,89/42,8	155	6	Respiração e Metabolismo energético
121	gi 15988217 1FX0_B	Cadeia B, estrutura cristalina do cloroplasto F1-Atpase de espinafre	Spinacia oleracea	5,69/48	5,46/53,9	93	2	Função desconhecida
122	gi 1770222 CAB00006.1	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande, parcial (cloroplasto)	Dovyalis rhamnoides	5,93/47	6,18/52,18	72	2	Respiração e Metabolismo energético
125	gi 1045408543 GAU11612.1	Proteína hipotética TSUD_346040	Trifolium subterraneum	4,82/26	5,28/30,05	80	5	Função desconhecida
130	gi 1044576486 XP_017424963.1	Proteína hipotética LR48_Vigan05g022600	Vigna angularis	5,54/34	5,63/92,23	128	4	Sinalização
131	gi 1044559695 XP_017416029.1	PREDICTO: ácido 2-metileno-furan-3-ona redutase	Vigna angularis	6,06/33	5,94/34,16	338	13	Fotossíntese
134	gi 172046675 P85487.1	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	Pinus halepensis	6,11/61	4,21/11,58	66	100	Função desconhecida
135	gi 976917633 KVI03056.1	Chaperone DnaK	Cynara cardunculus var. scolymus	5,05/69	5,36/76,43	587	15	Envelopamento e Metabolismo Energético

Continuação. Tabela 1 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-caupi nos genótipos contrastantes, através de análise por ESI-Q-TOF MS e buscas no NCBI. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$.

N° do spot	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa) ^b		Score ^c	Cobertura da sequência (%)	Processo biológico
				Experimental	Teórico			
138	gi 951055290 XP_014521436.1	PREVISÍVEL: proteína potenciadora de oxigênio 1, cloroplástica	Vigna radiata var. radiata	5,25/31	5,87/35,06	585	30	Fotossíntese
139	gi 1072951011 XP_018486209.1	PREDICTO: isoforma X2 de proteína 36 contendo o domínio CCCH do dedo de zinco	Raphanus sativus	5,46/35	9,58/18,18	63	14	Sinalização
140	gi 172046675 P85487.1	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	Pinus halepensis	6,12/60	4,21/11,58	65	100	Função desconhecida
141	gi 593799508 XP_007162792.1	Hipotética proteína PHAVU_001G181000g	Phaseolus vulgaris	5,88/24	7,59/33,27	366	26	Respiração e Metabolismo energético
142	gi 22797153 CAD23995.1	ATP sintase epsilon subunidade, parcial (cloroplasto)	Pentaphragma ellipticum	5,70/16	5,41/14,55	131	19	Fotossíntese
143	gi 172046675 P85487.1	RecName: Full = proteína 3 desconhecida, parcial	Pinus halepensis	5,63/23	4,21/11,58	65	100	Função desconhecida
144	gi 902238787 KNA25317.1	Hipotética proteína SOVF_007620, parcial	Spinacia oleracea	5,37/23	5,46/29,74	215	11	Metabolismo de Proteína
146	gi 149941202 CAO02533.1	Rubisco ativase putativo, partial	Vigna unguiculata	6,20/32	8,31/28,12	74	5	Fotossíntese
147	gi 965613862 BAT99494.1	Proteína hipotética VIGAN_10094100	Vigna angularis var. angularis	5,99/44	5,67/53,83	420	16	Metabolismo de Proteína
148	gi 920712672 KOM53921.1	Proteína hipotética LR48_Vigan09g258000	Vigna angularis	5,59/79	5,45/73,72	133	3	Função desconhecida
149	gi 149941202 CAO02533.1	Rubisco ativase Putativo, parcial		5,89/38	8,31/28,12	486	38	Fotossíntese
151	gi 661896938 CDP00127.1	Hipotética proteína TSUD_191560	Trifolium subterraneum	5,32/42	6,08/35,14	99	5	Função desconhecida
152	gi 149941202 CAO02533.1	Rubisco ativase Putativo, parcial	Vigna unguiculata	6,12/19	8,31/28,12	74	5	Fotossíntese

153	gi 1098892032 JAU04506.1	Proteína 5 contendo domínios PsbP, cloroplástica, parcial	Noccaea caerulescens	5,67/29	9,04/34,99	76	3	Fotossíntese
-----	--------------------------	--	-------------------------	---------	------------	----	---	--------------
