



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**  
**CURSO DE AGRONOMIA**

**BRUNO DO NASCIMENTO SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE VARIEDADES LOCAIS DE  
FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) QUANTO A TOLERÂNCIA AO DÉFICT  
HÍDRICO**

**FORTALEZA**

**2017**

BRUNO DO NASCIMENTO SILVA

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE VARIEDADES LOCAIS DE  
FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) QUANTO A TOLERÂNCIA AO DÉFICT  
HÍDRICO

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências da disciplina Atividade Supervisionada para obtenção do título de Engenheiro-agrônomo.

Orientadora pedagógica: Prof. Dra. 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)

---

- D66c do Nascimento Silva, Bruno.  
CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE VARIEDADES LOCAIS DE FEIJÃO-CAUPI  
(*Vigna unguiculata* (L.) Walp)) QUANTO A TOLERÂNCIA AO DÉFICT HÍDRICO / Bruno do  
Nascimento Silva. – 2017.  
56 f.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências  
Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Rosilene Oliveira Mesquita.
1. *Vigna unguiculata*. 2. Seca. 3. Tolerância. I. Título.

CDD 630

---

BRUNO DO NASCIMENTO SILVA

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE VARIEDADES LOCAIS DE  
FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) QUANTO A TOLERÂNCIA AO DÉFICIT  
HÍDRICO

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia  
do Centro de Ciências Agrárias da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Engenheiro agrônomo.

Aprovada em 29/11/2017

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. D. Sc. Rosilene Oliveira Mesquita (Orientadora pedagógico).  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

M.Sc. Stelamaris de Oliveira Paula (Coorientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. D.Sc Cândia Hermínia Campos de Magalhães  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. D.Sc. Marcelo de Almeida Guimarães  
Universidade Federal do Ceará(UFC)

A minha família, Monalisa, Fernanda, Aline,  
Antônio Paulo, Laura e Fernando.

DEDICO À VOCÊS

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por toda a benção a mim concedida, a toda saúde, amparo e ensinamentos.

Agradeço a minha mãe Monalisa do Nascimento, madrinha Fernanda Laura do Nascimento e pai Antônio Paulo Silva por todo apoio e incentivo. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço a meu anjo da guarda que um dia esteve ao meu lado como avó Maria Laura da Cunha do Nascimento por todas as alegrias e proteção a mim concedida. Ao meu também anjo da guarda que um dia esteve nesse plano, meu avô Fernando Severiano do Nascimento.

Ao PET-agronomia pelo apoio nessa caminhada.

Ao MEC/SESU pela concessão da bolsa que possibilitou desenvolver a pesquisa.

Ao LABFIVE e seus integrantes por toda ajuda e pela concessão do espaço para que esse trabalho pudesse ser executado.

Aos companheiros de trabalho Joniele, Lais, e Stelamaris pela ajuda na implantação, e análises.

A professora Rosilene Oliveira Mesquita pela orientação e por me mostrar novos caminhos a serem percorridos na agronomia.

A minha amada esposa Aline dos Santos Paixão que sempre esteve ao lado nos momentos mais difíceis e felizes da minha vida. Pelo seu apoio e companheirismo durante esses anos. Seu alicerce possibilitou que hoje esse trabalho pudesse ser concluído.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente, o meu muito obrigado

## RESUMO

O feijão-caupi é uma leguminosa de importância nacional tendo grande notoriedade nas regiões Nordeste e Norte servindo como base na alimentação por ser rica em proteínas, vitaminas e minerais; e geração de renda dos pequenos agricultores. O déficit hídrico, principalmente nas fases críticas da cultura, é um dos fatores que mais compromete a alta produtividade, sendo na região Nordeste um dos problemas mais sérios por conta da curta quadra chuvosa. Plantas submetidas ao estresse hídrico apresentam uma série de alterações a nível morfológico, fisiológico e bioquímico. Nesse âmbito, a caracterização de variedades que possuam mecanismos para mitigar os efeitos deletérios do estresse hídrico é importante para os programas de melhoramento dessa cultura. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar os parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das variedades locais de feijão-caupi quando submetidas a diferentes níveis de restrição hídrica. O experimento foi realizado em casa de vegetação, em um delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 3 x 3, em que o primeiro fator foi definido como os três genótipos (duas variedades locais (Sempre-verde e Cabeça-de-gato) e um padrão tolerante (Pingo de ouro 1,2)). Já o segundo fator foi definido como sendo os níveis de fornecimento de água (controle, estresse moderado e estresse severo). As plantas foram conduzidas em vasos até o estágio V4 (pré-floração) onde foram avaliados os seguintes parâmetros: parâmetros biométricos (Altura de planta, número de folhas, área foliar e massa seca), o  $\psi_w$  na antemanhã, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, conteúdo de pigmentos (clorofilas e carotenóides), peroxidação lipídica, mensuração dos solutos orgânicos (prolina, carboidratos totais, carboidratos redutores, carboidratos não-redutores), teor de amido e atividade das enzimas catalase, peroxidase do ascorbato, peroxidase do guaiacol e desmutase do superóxido. O genótipo Pingo de ouro 1,2 se mostrou tolerante ao déficit hídrico, apresentando melhor economia hídrica quando submetidos ao estresse severo, maior taxa de fotossíntese líquida independente da restrição hídrica, além de altos índices da eficiência do uso da água e alto conteúdo de prolina. A variedade Sempre-verde apresentou alguns mecanismos de tolerância semelhantes ao observado no genótipo tolerante, apresentando menores taxa de inibição da fotossíntese que o cabeça-de-gato. Não foram observadas alterações nos pigmentos quando submetidos aos diferentes níveis de estresse, porém houve alterações na ETR. Em relação aos solutos osmorreguladores o genótipo tolerante apresentou os maiores teores de carboidratos não redutores e maiores teores de prolina, seguidos do Sempre-verde. A genótipo Pingo de ouro 1,2 confirmou seu padrão de tolerância quando comparado aos genótipos testados, sendo o Cabeça-de-gato o que apresentou alguns parâmetros superiores ao Sempre-verde.

**Palavras chaves:** *Vigna unguiculata*, seca, tolerância

## ABSTRACT

Cowpea is a legume of national importance and has great notoriety in the Northeast and North regions serving as a food base because it is rich in proteins, vitamins and minerals; and income generation of small farmers. The water deficit, especially in the critical phases of the crop, is one of the factors that most compromises the high productivity, being in the Northeast one of the most serious problems due to the short rainy season. Plants subjected to drought present a series of changes at the morphological, physiological and biochemical levels. In this context, the characterization of varieties that have mechanisms to mitigate the deleterious effects of drought is important for breeding programs of this crop. Therefore, the present study aimed to evaluate the morphological, physiological and biochemical parameters of the local varieties of cowpea when submitted to different levels of water restriction. The experiment was carried out in a greenhouse in a completely randomized design in the 3 x 3 factorial scheme, in which the first factor was defined as the three genotypes (two local varieties (Sempre-verde and Cabeça-de-gato) and one standard (control, moderate stress and severe stress), and the plants were conducted in pots up to the V4 stage (pre-flowering (plant height, leaf number, leaf area and dry mass),  $\psi_w$  in the morning, gas exchange, chlorophyll a fluorescence, pigment content (chlorophylls and carotenoids), lipid peroxidation, measurement of organic solutes (proline, total carbohydrate, reducing carbohydrate, non-reducing carbohydrate), starch content and activity of catalase enzymes, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase and desmutase of superoxide. Pingo-de-ouro-1,2 genotype showed tolerance to drought, with better water economy when subjected to severe stress, largest independent net photosynthesis rate of fluid restriction, and high levels of efficiency of use water content and high proline content. The Sempre-verde variety presented some tolerance mechanisms similar to those observed in the tolerant genotype, presenting a lower rate of inhibition of photosynthesis than the Cabeça-de-gato. No changes were observed in the pigments when submitted to different levels of stress, but there were changes in the ETR. In relation to the osmoregulatory solutes, the tolerant genotype presented higher levels of non-reducing carbohydrates and higher levels of proline, followed by Sempre-verde. The genotype Pingo de ouro 1,2 confirmed its tolerance pattern when compared to the tested genotypes, with Cabeça-de-gato presenting some parameters superior to Sempre-verde.

**Key words:** *Vigna unguiculata*, drought, tolerance

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Influência do déficit hídrico no potencial hídrico foliar dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.....	28
Gráfico 2: Influência do déficit na altura das plantas (A), número de folhas (B), área foliar (C) e massa seca foliar (C) dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.....	29
Gráfico 3: Influência do déficit hídrico no acúmulo de clorofila e carotenoides nos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.....	31
Gráfico 4: Influência do déficit hídrico no teor de fotossíntese (A), condutância estomática (B), transpiração (C), razão Ci/Ca (D) dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.....	32
Gráfico 5: Influência do déficit hídrico na eficiência do uso da água (EUA), eficiência do uso da água intrínseca (EUA <sub>int</sub> ) e eficiência de carboxilação (EiC) dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.....	34
Gráfico 6: Influência do déficit hídrico sobre rendimento quântico potencial do PSII (Fv/Fm), rendimento quântico efetivo (Phi PSII), Taxa de transporte de elétrons (ETR), dissipação não fotoquímica no escuro (NPQ), dissipação fotoquímica (qP) e dissipação não fotoquímica no claro (qN) dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.....	36
Gráfico 7: Influência do déficit hídrico sobre o teor de peroxidação lipídica (TBARS) e danos de membranas dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.....	38
Gráfico 8: Atividades antioxidativas das enzimas peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (G-POD), catalase (CAT) superóxido dismutase (SOD) dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.....	39
Gráfico 9: Influência do déficit hídrico na acumulação de prolina nas folhas dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.....	41

Gráfico 10: Influência do déficit hídrico nos teores de carboidratos totais, redutores, não redutores e amido dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.....42

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
<b>2.1 O Feujão-Caupi.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Relações hídricas .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Estresse Hídrico Na Fisiologia De Plantas.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 Mecanismos Enzimáticos De Proteção .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5 Prolina.....</b>	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Objetivos Específicos.....</b>	<b>21</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	
<b>4.1 Localização Do Experimento.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Condução Do Experimento E Tratamentos.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3 Delineamento Experimental E Análise Estatística.....</b>	<b>22</b>
<b>4.4 Instalação E Condução.....</b>	<b>23</b>
<b>4.5 Avaliações</b>	
<b>4.5.1 Avaliações Biométricas.....</b>	<b>23</b>
<b>4.5.2. Potencial Hídrico Foliar.....</b>	<b>23</b>
<b>4.5.3 Trocas Gasosas.....</b>	<b>23</b>
<b>4.5.4 Fluorescência Da Clorofila A.....</b>	<b>23</b>
<b>4.5.5 Peroxidação lipídica.....</b>	<b>24</b>
<b>4.5.6 Extravasamento de eletrólitos.....</b>	<b>24</b>

4.5.7. Enzimas Antioxidantes.....	24
4.5.7.1 Peroxidase Do Ascorbato.....	25
4.5.7.2 Peroxidase Do Guaiacol .....	25
4.5.7.3 Catalase .....	25
4.5.7.4 Dismutase Do Superóxido.....	26
4.5.7.5 Proteínas Solúveis.....	26
4.5.6 Prolina Livre.....	26
4.5.7 Solutos Orgânicos.....	27
4.5.7.1 Carboidratos Solúveis Totais.....	27
4.5.7.2 Carboidratos Redutores.....	27
4.5.7.3 Determinação De Amido.....	27
4.6 ANALISE ESTATÍSTICA.....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
5. 1 Potencial Hídrico Foliar.....	28
5.2 Caracterização Biométrica.....	28
5.3 Teores De Clorofila.....	31
5.4. Trocas Gasosas E Fluorescência Da Clorofila <i>a</i> .....	33
5.4 Mecanismos Enzimáticos e Não Enzimáticos	
5.4.1 Danos De Membrana e Peroxidação Lipídica.....	39
5.4.2 Enzimas.....	40
5.5 Teores De Solutos Orgânicos	
5.5.1 Prolina Livre.....	42
5.5.2 Carboidratos Solúveis.....	43
6 CONCLUSÃO.....	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47



## 1.INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), sendo conhecido por diversos nomes a depender da região (feijão de corda, feijão macassar, feijão de praia, entre outros), é uma leguminosa de crescimento determinado ou indeterminado e porte variando do ereto ao prostrado (PADULOSI, 1993). Seu provável centro de origem é no continente Africano, mas se adapta muito bem em regiões com características semelhantes a seu local de origem (BRITO; MURAOKA; SILVA, 2009). No Brasil, o feijão-caupi foi introduzido pelos portugueses no século XVI inicialmente no estado da Bahia, onde foi disseminado por todo o país (FREIRE FILHO, 1988).

O feijão-caupi é uma cultura que apresenta rusticidade (AGEITEC, 2013) e sua baixa exigência tanto em nutrição como em água torna possível ser cultivada em diferentes regiões (FREIRE FILHO, 2011). O seu grão desempenha importante função na dieta alimentar, sendo uma importante fonte de proteínas e carboidratos além de fornecer alto teor de fibras alimentares, vitaminas e minerais (EMBRAPA MEIO NORTE, 2003).

Dentre os fatores que afetam a produtividade das culturas, pode-se citar o estresse hídrico, sendo comum na região do Nordeste brasileiro, onde as precipitações são concentradas na quadra chuvosa, além de uma alta taxa evaporativa. Dessa forma, o rendimento da cultura é comprometido, impedindo-o, assim, de alcançar grandes produtividades quando submetidas ao cultivo de sequeiro (GOMES *et al.*, 2000). Dentro do ciclo fenológico as fases de maior limitação hídrica são, florescimento e enchimento de grãos (Bezerra *et al.*, 2003), causando assim limitações nos componentes produtivos (SOUSA *et al.*, 2009). A necessidade hídrica do feijão-caupi varia entre 300 a 450 mm/ciclo em que se inicia a partir de um valor mínimo com a germinação até um valor máximo no período de floração e enchimento dos grãos. Após esse período a maturação dos grãos é marcada por uma queda na necessidade hídrica (NÓBREGA *et al.*, 2001).

Plantas quando submetidas ao estresse hídrico apresentam uma série de mudanças como um menor acúmulo de biomassa, uma menor expansão foliar e conseqüentemente uma menor área fotossintetizante, acarretando em uma menor produtividade (FARIAS *et al.*, 2011). Segundo Chaves *et al.* (2002) plantas quando submetidas a restrição hídrica apresentam

mecanismos para mitigar os efeitos negativos que podem ser de três tipos: evitação, retardo ou tolerância. No geral, as plantas quando submetidas a estresse hídrico sofrem mudanças nos mais diversos níveis, como menor área foliar total (FARIAS *et al.*, 2011), menor influxo de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese (CRUZ *et al.* 2009), além de um aumento de ácido abscísico, abscisão foliar, mudança no potencial osmótico celular (TAIZ; ZEIGER, 2013) e estímulo do crescimento radicular para explorar uma maior área (KERBAUY, 2004) são algumas das mudanças observadas.

Plantas quando submetidas ao estresse hídrico apresentam mecanismos osmóticos relacionados diretamente com o grau de tolerância (CARLIN; SANTOS 2009). Dentre esses mecanismos a prolina possui função osmoprotetora, mantendo o balanço hídrico, integridade das proteínas, enzimas e membranas e eliminando radicais livres (LEITE; VIRGENS FILHO; RODRIGUES, 2010).

Existe no meio científico uma carência em estudos sobre o potencial das variedades locais de feijão-caupi para tolerância a seca, sendo que essas variedades locais possivelmente apresentam características relacionadas a tolerância devido as mesmas serem preferidas pelos pequenos agricultores que cultivam em regime de sequeiro.

A ampla variedade de genótipos locais cultivados pelos pequenos agricultores do estado do Ceará e a necessidade se conhecer o potencial desses genótipos na doação de genes de tolerância a seca nos programas de melhoramento motivou o presente estudo. Dessa forma, o objetivo do estudo foi conhecer os mecanismos de tolerância de variedades locais de feijão-caupi quando submetidos ao déficit hídrico, além de caracterizar essas variedades locais que possuam genes potenciais aos programas de melhoramento.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Feijão-caupi

O feijão-caupi é também conhecido como feijão de corda ou feijão macassar no Nordeste; feijão de praia, feijão-da-colônia e feijão-de-estrada, na região Norte e feijão-miúdo, na região Sul (FREIRE FILHO; 2011). Faz parte do gênero *Vigna* composto por 85 espécies, sendo a espécie cultivada do feijão-caupi classificada como *Vigna unguiculata* L. Walp. O porte da planta pode variar desde o ereto ao prostrado, podendo crescer de forma determinada ou indeterminada (PADULOSI, 1993). Essa leguminosa tem ampla distribuição no mundo e devido sua provável origem ser na África, se adapta muito bem a regiões com as características edafoclimáticas que se assemelham ao local de origem (BRITO *et al.*, 2009).

O Brasil, através dos programas de melhoramento, desenvolveu e continua desenvolvendo diversas variedades do feijão-caupi, adaptadas as mais diferentes condições edafoclimáticas e resistentes as principais pragas e doenças. A busca é predominantemente para incorporação de genes que elevem os aspectos produtivos, tolerância a seca, melhoraria na arquitetura com preferência ao porte semi-ramador e resistência ao ataque de pragas (FREIRE FILHO, 1988). Para a caracterização da variabilidade genética por meio de caracteres, deve-se conhecer a fenologia da planta (CAMPOS *et al.*, 2000). Acredita-se que a introdução da planta ocorreu na América Latina pelos espanhóis e portugueses no século XVI de início nas colônias espanholas e posteriormente foi trazido no Brasil primeiramente no estado da Bahia. (FREIRE FILHO, 2011)

O feijão-caupi é uma espécie que apresenta rusticidade, sendo muito cultivada na região Norte e Nordeste e em condições favoráveis alcança rendimentos satisfatórios (AGEITEC, 2013). Além de baixa exigência nutricional e hídrica, a sua alta variabilidade genética torna a planta altamente adaptada a diferentes regiões (FREIRE FILHO, 2011).

Estatísticas oficiais sobre a produção de feijão-caupi são dificultadas devido ao fato de que não se separam os gêneros *Phaseolus* e *Vigna* nos dados produtivos, porém a Embrapa Arroz e Feijão estimou que em 2014, sua produção em 482.665 toneladas, colhidas em 1.202.491 hectares. É importante ressaltar a inexistência de campos de produção de feijão-caupi nos estados do Acre, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Tocantins, ou seja, o fato de não haver produção nesses locais reduz os dados de produtividade do país (EMBRAPA, 2014). A cultura é importante como componente da dieta alimentar e na geração de emprego e renda das regiões produtoras (RIBEIRO, 2002). Seu consumo per capita é de 16 kg ano<sup>-1</sup>, sendo o grão uma importante fonte de proteínas (23 a 25% em média), carboidratos, alto teor de fibras alimentares, vitaminas e minerais, além de possuir baixa quantidade de lipídios (2%) (EMBRAPA MEIO NORTE, 2003). Em sistemas agroflorestais é muito usado na fixação biológica de nitrogênio, controle de erosão, controle de plantas daninhas, além de estimular a reprodução de inimigos naturais e fungos micorrizos (AZEVEDO *et al.*, 1997).

Embora o feijão-caupi possua alta adaptabilidade as condições da região Nordeste, os seus índices produtivos ainda são baixos (FREIRE FILHO *et al.*, 2011), tendo alcançado a produtividade de 322 kg.ha<sup>-1</sup> na safra 2015/2016 (Conab, 2016). O baixo rendimento é consequência, em parte, do uso de solos com baixa fertilidade e da irregularidade das precipitações (NASCIMENTO *et al.*, 2011), sendo, entre esses, a seca o fator mais limitante para o alcance de altos rendimentos da cultura (MUCHERO *et al.*, 2009).

## **2.2 Relações hídricas**

Segundo Castro (2009), apesar da grande quantidade de água presente na terra 97,5% compõe os oceanos e 2,5% é doce sendo, mas apenas 0,5% está disponível, sendo o resto componentes das geleiras. Os setores consumidores de água podem ser divididos em três, sendo o agrícola o maior consumidor, seguido do industrial e por último as atividades urbano-domésticas.

Á água é essencial para a integridade e funcionalidade das células vegetais, sendo componente interno de 80-95% da massa verde de células vivas, porém varia de 95% para hortaliças a 5% para sementes (MARENCO; LOPES, 2009). Além disso, participa do processo de transpiração, mantendo assim a homeostase térmica, sendo importante no metabolismo e crescimento (MARTINS, 2008) e na translocação de solutos via xilema ou floema

(RODRÍGUEZ-PÉREZ, 2006). A perda de água pela corrente transpiratória é essencial para a entrada de CO<sub>2</sub> pelo estômato, sendo mediada pelo estômato (KERBAUY, 2004).

Portanto para que a planta mantenha seu funcionamento normal é necessário que haja uma manutenção do status hídrico (LAMBERS, 2008). Esse status da água no sistema solo-planta-atmosfera é descrito pelo potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) e consiste quatro componentes: potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) é determinado pela concentração soluto osmoticamente ativo; o potencial matricial ( $\Psi_m$ ) registra a capacidade de adsorção das matrizes celulares; potencial de pressão registrada ( $\Psi_p$ ) as pressões tanto positiva quanto negativa que atuam sobre um sistema e o potencial gravitacional ( $\Psi_g$ ) é uma consequência de diferenças de altura com o nível de referência (RODRÍGUEZ-PÉREZ, 2006).

### **2.3. Estresse hídrico no feijão-caupi**

Segundo Larcher (2000), estresse é definido como um desvio significativo na condição ótima da planta. Esse estresse gera respostas em todos os níveis funcionais e podem ser reversíveis a princípios, mas podem se tornar permanente. Já Taiz e Zeiger (2017), definem estresse como um fator externo de origem biótica ou abiótica que gera influência negativa a planta. Dessa forma, déficit hídrico pode ser definido como todo o conteúdo de água que está abaixo do maior valor de hidratação (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Estresses abióticos podem funcionar tanto como mecanismos destrutivos como construtivos, pois agem exercendo uma pressão de seleção, tornando-se a força para incrementar tolerância e evolução adaptativa nas plantas (PIMENTEL, 2004).

A região Nordeste é caracterizada pela escassez hídrica, condição essa que afeta o negativamente o feijão-caupi. (MENDES *et al.*, 2007), causando uma redução em seu rendimento e produtividade (MUCHERO *et al.*, 2009). Pelo fato do cultivo de feijão-caupi ser 60% em regime de sequeiro, o déficit hídrico se torna um dos fatores de maior limitação para a cultura (GOMES, 2000). As três fases que mais limitam a produtividade do feijão quando submetido ao baixo suprimento hídrico são o florescimento e o enchimento de grãos (BEZERRA *et al.*, 2003), em que o foram encontrados pelo autor reduções de 30,9% na produção de grãos das plantas submetidas ao estresse hídrico. Os mecanismos que as plantas possuem para lidar com o déficit hídrico envolvem estratégias para evitar, retardar ou tolerar o estresse, que vai depender de cada

genótipo (CHAVES *et al.*, 2002), dessa forma, se faz necessário a identificação e o desenvolvimento de variedades adaptadas e produtivas para essas regiões (BELKO *et al.*, 2013).

A demanda hídrica varia de acordo com o estágio que a planta se encontra, variando desde pequenas quantidades na germinação até altas demandas no período de floração e formação das vagens com decréscimo no período de maturação dos grãos. Para um bom desenvolvimento a cultura necessita de uma precipitação variando de 300 a 450 mm, sendo distribuídos ao longo do ciclo fenológico da planta, dependendo do genótipo e das condições edafoclimáticas (NÓBREGA *et al.*, 2001).

O déficit hídrico no feijão-caupi desencadeia mudanças na relação entre a célula e a água e nos processos morfofisiológicos (CORDEIRO *et al.*, 2009) podendo reduzir o seu ciclo de vida. Na fase inicial o processo germinativo é afetado, comprometendo o estabelecimento da cultura no campo (CARDOSO *et al.* 2000). Já as fases de maior demanda hídrica se concentram entre a floração e o enchimento dos grãos. Segundo Farias *et al.* (2011) plantas que sofrem esse tipo de estresse tem menor acúmulo de biomassa, comprometendo a expansão das folhas, bem como seu número e conseqüentemente afetando a área foliar total, além das taxas de crescimento ser reduzida.

Plantas quando exposta ao baixo suprimento de água tem menor expansão celular e conseqüentemente menor expansão foliar. Essa condição reduz a área de transpiração da planta, conservando o fornecimento de água nos tecidos por mais tempo, sendo essa a primeira resposta de defesa das plantas (ANJUM *et al.*, 2011).

O estresse hídrico desencadeia mudança na fisiologia das plantas, como um menor suprimento de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese, resultado da menor taxa transpiratória que é resultante do maior fechamento estomático (ASHRAF e HARRIS, 2013). Segundo Araujo e Demenicis (2009) a extensão da desidratação, o estágio em que a planta se encontra e a irradiância são os três fatores importante a serem levados em conta na resposta da fotossíntese ao déficit hídrico. Além da fotossíntese a produção de ácido abscísico, a abscisão foliar, o ajuste osmótico e o volume celular também são observados em plantas estressadas (MORAIS *et al.*, 2003).

As raízes podem afetar as respostas a nível de estômatos ao déficit hídrico (Davies *et al.* 2002), pois atuam como sensores de déficit hídrico que é detectado pelas células-guardas dos

estômatos antes mesmo de qualquer déficit ser observados nas folhas, por meio de sinais enviados a parte aérea (MATTOS *et al.* 2005).

O ácido abscísico é sintetizado continuamente e tende a se acumular nos cloroplastos. Com a desidratação desse tecido ocorre uma variação no pH com a redistribuição desse hormônio para o apoplasto mesofílico (TAIZ; ZEIGER, 2017). Essa redistribuição até as células-guardas é influenciada pela corrente transpiratória (ARAÚJO; DEMENICIS 2009). Dessa forma, em razão ao estresse hídrico o fechamento dos estômatos funciona como um mecanismo de proteção a desidratação, o que leva a um menor suprimento de CO<sub>2</sub> intercelular reduzindo a fotossíntese (DAMATTA *et al.* 2003). Além dos efeitos nos estômatos o ABA estimula o crescimento das raízes, permitindo que possa haver a exploração de um maior volume de solo, aumentando a área de influência radicular para maior absorção de água, e a inibição do crescimento da parte aérea, com menor alongamento do caule (KERBAUY, 2004).

Plantas submetidas a seca, apresentam menor absorção de nitrogênio, componente essencial das clorofilas (Carvalho *et al.*, 2003). Esse pigmento está ligado a capacidade de transformar a radiação solar em energia química, por meio do processo de fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2004). Além disso, a seca pode afetar direta ou indiretamente o fotossistema II, dessa forma a capacidade de tolerar estresse hídrico está ligado a uma maior eficiência no sistema fotoprotetor do fotossistema II (SILVA *et al.*, 2006). O rendimento quântico desse fotossistema pode ser afetado por esse tipo de estresse. A fluorescência da clorofila *a* pode revelar o nível energético de excitação dos pigmentos que controlam a fotossíntese, desse modo, a habilidade em manter elevada a razão F<sub>v</sub> /F<sub>m</sub> sob estresse hídrico pode significar eficiência no uso da radiação pela etapa fotoquímica e, conseqüentemente, a assimilação de carbono (TESTER; BACIC, 2005).

#### **2.4 Mecanismos enzimáticos de proteção**

A deficiência hídrica ou outros estressores, como altas temperaturas, altas irradiâncias entres outros, provocam uma redução na atividade fotossintética, levando ao menor uso da radiação, ocasionando assim, um acúmulo de NADPH (poder redutor) e uma redução no *pool* do aceptor final da cadeia transportadora de elétrons (CTE) (NADP<sup>+</sup>). O excesso de NADPH pode reduzir consideravelmente o poder redutor na CTE, podendo haver escape de

elétrons que reagindo com o oxigênio molecular ( $O_2$ ) formam as espécies reativas de oxigênios (ERO's). (RESENDE, 2003).

As ERO's são formadas normalmente nas vias metabólicas dos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas, em particular na fotossíntese e na respiração, porém em quantidades muito baixas (APEL; HIRT, 2004), sendo produzidas a partir da redução parcial do oxigênio molecular através de metabolitos aeróbicos. Como subprodutos temos são formados oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) o radical superóxido ( $O_2 \bullet^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou o radical hidroxila ( $OH\bullet$ ) (RESENDE *et al.*, 2009).

Quando submetidas a estresses, as vias metabólicas são alteradas, o que leva a um aumento na produção de ERO's, acarretando o chamado estresse oxidativo (GILL; TUTEJA, 2010). Nessa perspectiva, as ERO's desempenham uma dupla função e dependem da quantidade na célula. Quando mantidos em baixas concentrações, é provável que funcione como sinalizadores bioquímicos do estresse, levando assim a respostas defensivas e a aclimação das plantas como os causados pelo estresse hídrico (BARBOSA *et al.*, 2014).

Quando em concentrações excessivas, os níveis tóxicos das ERO's tornam-se prejudiciais, uma vez que as plantas não são capazes de metabolizar altos níveis, causando assim a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, inibição enzimáticas e danos ao DNA e RNA (GILL; TUTEJA, 2010).

Como forma de reduzir os danos oxidativos, as plantas possuem um sistema de defesa antioxidativo que envolve compostos de baixa massa como o ácido ascórbico e a glutamina reduzida, ou lipofílicas como o  $\alpha$ -tocoferol e os carotenóides, além de enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), glutathione peroxidase (GPX), peroxidase não específicas (POX), redutase da glutathione (GR), monodesidroascorbato redutase (MDHA) e desidroascorbato redutase (BARBOSA *et al.*, 2014). Dada a sensibilidade dessas enzimas, esse aparato funciona como sinalizadores do estresse oxidativos ou indicativos que a planta está em altos níveis de estresse além de controlar as ERO's evitando os danos oxidativos (SHARMA *et al.*, 2012).

## 2.5. Prolina

A limitação hídrica impede a célula de desempenhar suas funções normalmente, desencadeando respostas fisiológicas e moleculares, como o acúmulo de solutos orgânicos (BUCHAMAN *et al.*, 2015 ). Essa estratégia vegetal é uma proteção osmorreguladora que visa manter potencial hídrico celular reduzido através de solutos orgânicos e/ou osmoprotetores (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Compostos osmoprotetores desempenham primariamente o papel de reduzir a perda de água, mantendo a célula turgida e possibilitando a contínua absorção de água na célula, pelo diferencial de potencial (RAHMAN., 2012). Dessa forma, um dos parâmetros para se avaliar a tolerância ao déficit hídrico é através ajustamento do osmótico (RHEIN *et al.*, 2011).

A prolina é um aminoácido conhecido em plantas submetidas a deficiência hídrica (MOLINARI, 2006). Esse soluto é largamente estudado por conta da sua suscetibilidade a resposta de plantas em déficit hídrico (ASHRAF *et al.*, 2011), bem como o armazenamento de aminas e o restabelecimento de crescimento da planta ao termino do estresse (HOAI *et al.*, 2003). Em condições normais, totaliza menos de 5% dos aminoácidos totais livres, porém quando submetidas a estresses as plantas podem acumular concentrações de até 80% (GUBIS *et al.*, 2007)

A capacidade que alguns genótipos têm de acumular prolina para se ajustar osmoticamente as condições de seca, evidencia uma resposta tanto bioquímica quanto fisiológica para que as plantas possam aumentar sua tolerância as condições de estresse por curto período de tempo (KUMAR; KARAJOL; NAIK 2001).

Outros compostos osmoprotetores também são relatados como estratégias da planta para mitigar os efeitos da seca. Os carboidratos desempenham um importante papel, pois podem ser armazenados na forma de amido, onde possuem baixa atividade osmótica ou podem ser quebrados em açúcares simples que possuem alta solubilidade e higroscopicidade (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

### **3. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar e avaliar os parâmetros de crescimento, fisiologia, e bioquímica em variedades locais de feijão-caupi submetidos a diferentes níveis de restrição hídrica para tolerância a seca.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o crescimento vegetativo de variedades locais de feijão-caupi submetidos diferentes condições de estresse hídrico;
- Avaliar as trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e o potencial hídrico em variedades locais de feijão-caupi sob estresse hídrico;
- Compreender os mecanismos de aclimação do feijão-caupi quando submetido a estresse hídrico;
- Determinar a expressão de enzimas antioxidantes (APX, G-POD, CAT, SOD) em variedades locais de feijão-caupi quando submetidos a diferentes níveis de estresse hídricos;
- Identificar genótipos de feijão-caupi que seja mais tolerante a condição de déficit hídrico, para servir como base para o melhoramento genético;

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Localização do experimento**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências na Universidade Federal do Ceará (UFC), no período de junho a agosto de 2016, com altitude de 47m, latitude Sul 3° 44' 35'' e longitude Oeste 38° 34' 33''. No interior da casa de vegetação foi registrado ao longo do experimento, temperatura média de 32°C.

### **4.2. Condução do experimento e tratamentos**

Foram utilizadas as variedades locais coletadas no estado do Ceará: Cabeça-de-gato (CCE120), Sempre-verde (CCE 108) e o genótipo padrão para tolerância a seca Pingo de ouro 1,2. Os níveis dos tratamentos de estresses hídrico foram T1- ausência de estresse hídrico; T2- estresse hídrico moderado (5 dias de estresse, tendo uma irrigação ao terceiro dia) e T3- estresse severo (5 dias consecutivos de estresse hídrico).

### **4.3. Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, num arranjo fatorial 3x3, (3 genótipos x 3 níveis de estresse) com 5 repetições para cada tratamento. A unidade experimental foi composta por 2 plantas por vaso.

### **4.4 Instalação e condução**

As sementes foram germinadas em papel de filtro tipo “*germitest*” saturados com água destilada e mantidas em câmara controlada por 72h (Temperatura a 25°C e fotoperíodo de

12h). Após esse período as plantas foram transplantadas para vasos com capacidade para 3 litros preenchidos com substratos composto por areia, húmus e vermiculita (6:3:1) previamente saturados com água destilada. As plantas foram irrigadas diariamente com 100 mL de água destilada e fertirrigação complementar com Solução de Hoagland até o 32º dia, quando atingiram o estágio de desenvolvimento V4 (Terceira folha trifoliada totalmente expandida), em seguida os vasos foram plenamente saturados até atingirem a capacidade de campo e, após a saturação foram submetidos aos três níveis de estresse hídrico até o final do experimento. Os tratamentos com déficit hídrico foram impostos pela suspensão da irrigação até atingirem o nível de déficit desejado.

#### **4.5 Avaliações**

As avaliações foram feitas ao 37º dia após o transplante, sendo avaliados os seguintes parâmetros:

##### **4.5.1 Avaliações Biométricas**

No 37º dia após a semeadura as plantas foram coletadas e foram medidos a altura das plantas, número de folhas e a área foliar. A área foliar foi medida com o auxílio um medidor de área (LI-3100, Li-COR, Inc., Lincoln, NE, USA). As folhas coletadas foram pesadas e posteriormente secas em estufa a 60°C por 72h para a obtenção da massa seca das folhas.

##### **4.5.2. Potencial Hídrico foliar**

O potencial hídrico foliar foi determinado na antemanhã, antes e após a imposição do déficit hídrico, em folhas completamente desenvolvidas com auxílio de uma bomba de pressão tipo Scholander.

##### **4.5.3. Trocas gasosas**

As medidas de trocas gasosas foram realizadas entre o terceiro e quarto trifólio completamente expandido. As variáveis, taxa de assimilação fotossintética líquida por unidade de área ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), taxa de transpiração ( $E$ ), razão entre concentração interna e externa de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ), eficiência do uso da água (EUA;  $(A/E)$ ) e eficiência instantânea de carboxilação ( $E_iC$ ;  $(A/C_i)$ ) foram determinadas por analisador de gás por infravermelho (IRGA; modelo portátil LI-6400XT, LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, Nebraska, USA). As medições

foram realizadas entre 08:00 e 12:00 a.m., utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ( $1200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentra\u00e7\u00e3o constante de  $\text{CO}_2$  (400ppm), temperatura e umidade ambiente.

#### **4.5.4. Fluoresc\u00eancia da clorofila *a***

As vari\u00e1veis de fluoresc\u00eancia da clorofila *a* foram obtidas na mesma \u00e1rea da folha em que foram realizadas as medidas das trocas gasosas, com aux\u00edlio do IRGA. As folhas foram adaptadas ao escuro por um per\u00edodo de 30 minutos para que os centros de rea\u00e7\u00e3o ficassem completamente abertos (todos os aceptores prim\u00e1rios oxidados) com perda de calor m\u00ednima. Em seguida a leitura de fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel (*F<sub>v</sub>*) e m\u00e1xima (*F<sub>m</sub>*) foram determinadas e utilizadas para o c\u00e1lculo da efici\u00eancia fotoqu\u00edmica potencial do PSII, expressa pela rela\u00e7\u00e3o *F<sub>v</sub>*/*F<sub>m</sub>*. Foram determinadas tamb\u00e9m o rendimento qu\u00e2ntico efetivo do FSII ( $\Phi\text{FSII}$ ), taxa aparente de transporte de el\u00e9trons (ETR) e o coeficiente de extin\u00e7\u00e3o n\u00e3o-fotoqu\u00edmico (NPQ).

#### **4.5.5. Peroxida\u00e7\u00e3o lip\u00eddica**

A peroxida\u00e7\u00e3o lip\u00eddica foi determinada segundo a metodologia descrita por (HEATH; PACKER, 1968) em que os tecidos foliares frescos foram macerados em solu\u00e7\u00e3o de \u00e1cido tricloroac\u00e9tico (TCA) a 5%. Logo ap\u00f3s o homogenenato foi centrifugado a  $12.000 \times g$ , por 20 min, a 4 \u00b0C. O sobrenadante foi coletado, colocado em tubos de ensaio com solu\u00e7\u00e3o TCA (0,5%)-TBA (20%) e levado ao banho-maria por 20 minutos \u00e0 95\u00b0C. Decorrido esse tempo a rea\u00e7\u00e3o foi paralisada e os tubos foram centrifugados a  $3000 \times g$  durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e lido nos comprimentos de onda 532nm (espec\u00edfica) e 600nm (n\u00e3o-espec\u00edfica). O conte\u00fado de melondialde\u00eddo foi expresso utilizando coeficiente de extin\u00e7\u00e3o molar do MDA ( $\epsilon = 155. \text{mM}^{-1} . \text{cm}^{-1}$ ), sendo seus valores expressos em  $\text{MDA} . \text{g}^{-1}$  de mat\u00e9ria fresca.

#### **4.5.6 Extravasamento de eletr\u00f3litos.**

A metodologia para extravasamento de eletr\u00f3litos seguiu a metodologia descrita por Singh et al. (2007), em que foram retirados discos foliares e imersos em \u00e1gua deionizada em que foram determinados a condutividade el\u00e9trica inicial atrav\u00e9s de um condut\u00edmetro (Micronal, modelo AJX-515. Em seguida os discos foram aquecidos a 95\u00b0 C por 30 minutos para obten\u00e7\u00e3o das medidas da condutividade el\u00e9trica final (CE2). O VE ser\u00e1 estimado atrav\u00e9s da equa\u00e7\u00e3o:  $\text{VE} = (\text{CE1}/\text{CE2}) \times 100$ .

#### **4.5.5. Enzimas antioxidantes**

Foram retirados o folíolo central da terceira folha das plantas para a quantificação da atividade enzimática das enzimas APX, G-POD, Catalase e SOD.

Os extratos foram feitos usando 1 g de material fresco, macerado em 4mL do tampão fosfato de potássio (concentração final 50 mM e pH final 7), filtrados e malha de náilon e centrifugados a 12.000 x g a 6°C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em tubos *ependoff* no freezer a -25° C até as análises.

##### **4.5.5.1 Peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)**

A atividade da APX seguiu a metodologia descrita por Nakano e Asada (1981), onde foi acompanhado a redução na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio a APX, através do ácido ascórbico fornecido. 1100µL de tampão fosfato de potássio nos tubos de ensaio e, em seguida, transferi-los para banho-maria a 30°C. Em seguida foram adicionados 300 µL do extrato diluídos, 50 µL de ácido ascórbico (0,015M). A reação foi iniciada com a adição do peróxido de hidrogênio (0,03M), sendo acompanhada durante 1 minutos com leituras a cada 15 segundos, à absorvância de 290nm. Para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar do ascorbato ( $\epsilon = 2,8.\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), sendo a atividade expressa em mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> de matéria fresca.

##### **4.5.5.2 Peroxidase do guaiacol (G-POD, EC 1.11.1.7)**

A atividade da G-POD foi determinada seguindo a metodologia descrita por Kar e Mirsha (1976) em que foi monitorado a formação do tetraguaiacol. O meio reacional foi composto adicionando aos tubos de ensaio 950 µL de tampão de extração submetidos a 30°C em banho-maria. Em seguida foram adicionados 500 µL do guaiacol (0,02M), 500 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,06M) e 50 µL do extrato. A reação foi iniciada com a adição do extrato, sendo acompanhada durante 1 minuto com leituras a cada 15 segundos, à absorvância de 470 nm. Os cálculos foram obtidos usando o o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ( $\epsilon = 26,6.\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), sendo a atividade da enzima expressa em mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> de matéria fresca.

##### **4.5.5.3 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)**

A atividade da CAT foi determinada seguindo a metodologia descrita por Haver e McHale (1987) em que foi monitorado a redução na absorvância pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O meio

reacional foi composto adicionando-se aos tubos de ensaio 1290  $\mu\text{L}$  do tampão de extração em banho-maria a 30°C. Em seguida foi adicionado 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,05M) e 150  $\mu\text{L}$  do extrato diluído. A reação foi iniciada após a adição do extrato, sendo monitorado por 1 minutos com leituras a cada 15 segundos, à absorvância de 240 nm. Os cálculos foram obtidos usando o coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon = 36.\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), sendo a atividade da enzima expressa em  $\text{mmol de H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$  de matéria fresca.

#### **4.5.5.4 Dismutase Do Superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)**

A atividade da SOD foi determinada seguindo a metodologia descrita por Beauchamp e Fridovich (1971) que foi monitorado a fotorredução do azul p-nitrotetrazólio (NBT) com a formação da formazana. A unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT. O meio reacional foi composto adicionando aos *ependorffs* 1000  $\mu\text{L}$  do tampão de extração, metionina 13 mM, 50  $\mu\text{L}$  do extrato diluído, 150  $\mu\text{L}$  de NBT (750  $\mu\text{M}$ ) e de riboflavina (10  $\mu\text{M}$ ). Os *ependorffs* foram submetidos a luz artificial proveniente de uma lâmpada fluorescente com 20W em uma câmara de reação revestida de papel laminado. Tempo de reação foi de 15 minutos, com posterior leitura à absorvância de 560 nm. Os cálculos foram e a atividade da enzima expressa em  $\text{mmol de H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$  de matéria fresca.

#### **4.5.5.5 Proteínas solúveis**

As proteínas solúveis, usadas na quantificação da atividade específica da enzima, foram quantificadas seguindo o método descrito por Bradford (1976), em que foi utilizado o reagente *Coomassie Blue*. Os extratos enzimáticos foram os mesmos utilizados no item 4.5.2. O meio reacional consistiu da adição de 1mL desse reagente que foi composto a partir do azul de Coomassie brilhante G-250 a 0,01%, etanol à 4,75% e ácido fosfórico à 8,5% e 100  $\mu\text{L}$  do extrato. A mistura foi deixada reagindo por 15 minutos e lida à absorvância de 595 nm.

#### **4.5.6 Prolina livre**

Os extratos foram preparados utilizando 20 mg de folhas liofilizadas adicionados 2,0 mL de água deionizada em tubos de *ependorff* com agitação a cada 10 mim. Decorrido 1 hora os extratos foram centrifugados a 3.000 x g por 15 min e o sobrenadante foi coletado.

A determinação de prolina livre seguiu a metodologia descrita por Bates (1973) em que foram utilizados 0,5mL de extratos adicionados 1,0 mL da mistura ninhidrina ácida: ácido acético glacial na proporção de 1:1. A mistura foi colocada em banho-maria por 1h e decorrido o tempo a reação foi interrompida. Foram adicionados 1,0 mL de tolueno, formando um sistema bifásico e a mistura menos densa foi coletada e lida em espectrofotômetro a 520 nm. A concentração de prolina livre foi expressa em  $\mu\text{mol}$  prolina  $\text{g}^{-1}$  de matéria seca.

#### **4.5.7 Solutos orgânicos**

Os extratos foram preparados adicionando 30 mg do pó liofilizado em 5 mL de etanol a 80%. O homogenato foi mantido a 75° C em banho maria por 1 hora e, posteriormente centrifugado a 3.000 x g por 110 minutos a 4° C. coletou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento mais duas vezes com o tempo de extração de 30 mim. Ao final os volumes foram aferidos para 25 mL com etanol 80%.

##### **4.5.7.1 Carboidratos solúveis totais**

A quantificação seguiu a metodologia descrita por Dubois (1956), em que foram adicionados aos tubos de ensaio 200  $\mu\text{l}$  dos extratos, 200  $\mu\text{l}$  de fenol a 5% e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram agitados e decorridos 10 minutos foram feitas as leituras em espectrofotômetro a 490 nm tendo como padrão a D (+) glucose anidra. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de carboidrato  $\text{g}^{-1}$  matéria seca.

##### **4.5.7.2 Carboidratos redutores.**

Foram adicionados aos tubos de ensaio 500  $\mu\text{L}$  dos extratos e 500  $\mu\text{L}$  do reativo de Nelson AB. A solução foi aquecida em banho maria a 100 °C por 15 minutos. Transcorrido esse tempo foi acrescido 500 $\mu\text{L}$  da solução arsenitomolibídica e agitado por 5 minutos. Ao final foram adicionados 3,5 mL de água deionizada e mais uma vez agitados. As leituras foram feitas em espectrômetro a 540 nm tendo como padrão a D (+) glucose anidra e os valores foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de carboidrato  $\text{g}^{-1}$  matéria seca.

##### **4.5.7.3 Determinação de amido**

A extração do amido foi feita com o precipitado remanescente do extrato etanólico usado na quantificação dos carboidratos solúveis em que foram adicionados 4 mL de ácido

perclórico 30%, mantendo o homogenato sob agitação por 20 min com movimentos orbitais a 45 rpm. Decorrido o tempo, foram adicionados 3,33 mL de água deionizada e os tubos foram centrifugados 3.000 x g por 10 min a 4° C com posterior coleta do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes e ao final as amostras foram aferidas em 50 mL e armazenadas a -25 °C.

A determinação de amido seguiu a metodologia descrita Hodge e Hofreiter (1962), em que foram adicionados 0,5 mL do extrato, convenientemente diluído, e 2,5 mL de antrona 0,14% nos tubos de ensaio. Os tubos foram agitados e levados a banho maria a 95 °C por 10 min. Decorrido esse tempo a reação foi interrompida e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro 620 nm de absorbância. A concentração de amido foi expressa em  $\mu\text{mol de glicose.g}^{-1}$  de matéria seca.

#### **4.6. Análise estatística**

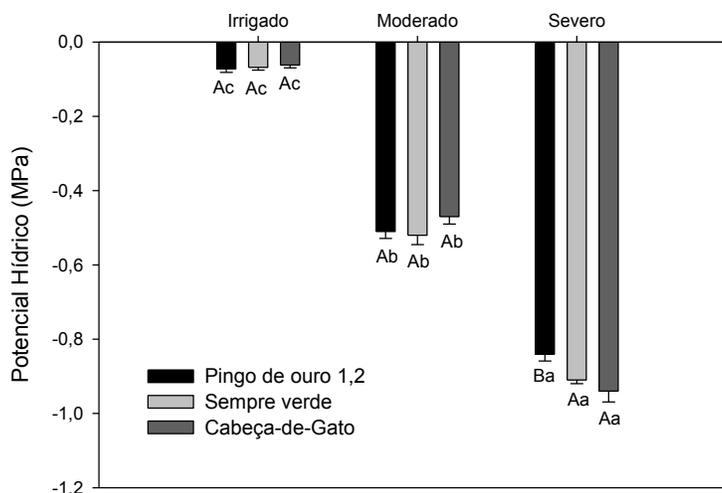
Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, e quando significativo a  $P \leq 0,05$  as médias dos parâmetros biométricos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott. Já para os demais parâmetros foi utilizado o teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Sisvar.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5. 1. Potencial Hídrico foliar**

Plantas submetidas ao tratamento controle apresentaram o potencial hídrico da antemanhã em valores altos (menos negativos), não ocorrendo diferença entre os genótipos (Gráfico 1). Após a imposição da irrigação, foi possível observar uma redução progressiva do potencial hídrico nas plantas submetidas ao déficit hídrico, sendo essa diminuição mais pronunciada nas variedades locais testadas no déficit severo. Estes resultados são consistentes com uma melhor economia hídrica no genótipo tolerante que apresentou potencial hídrico menos negativo aos demais genótipos nos dois déficits avaliados.

**Gráfico 1: Influência do déficit hídrico no potencial hídrico foliar dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.** O primeiro grupo corresponde ao tratamento controle, o segundo grupo ao tratamento moderado e o terceiro grupo ao tratamento severo. As barras indicam o erro padrão. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente entre genótipos dentro do mesmo tratamento, e letras minúsculas distintas diferem dentro do mesmo genótipo em diferentes tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ).



## 5.2 Caracterização Biométrica

Na condição controle não houve diferença significativa na altura das plantas entre os genótipos (Gráfico 2A). Com a progressão do estresse hídrico houve uma inibição do crescimento da parte aérea no genótipo Cabeça-de-Gato, tendo o genótipo Pingo de ouro 1,2 e a variedade local Sempre-Verde as maiores alturas nos tratamentos com estresse, com maior destaque para o déficit severo (Gráfico 2A).

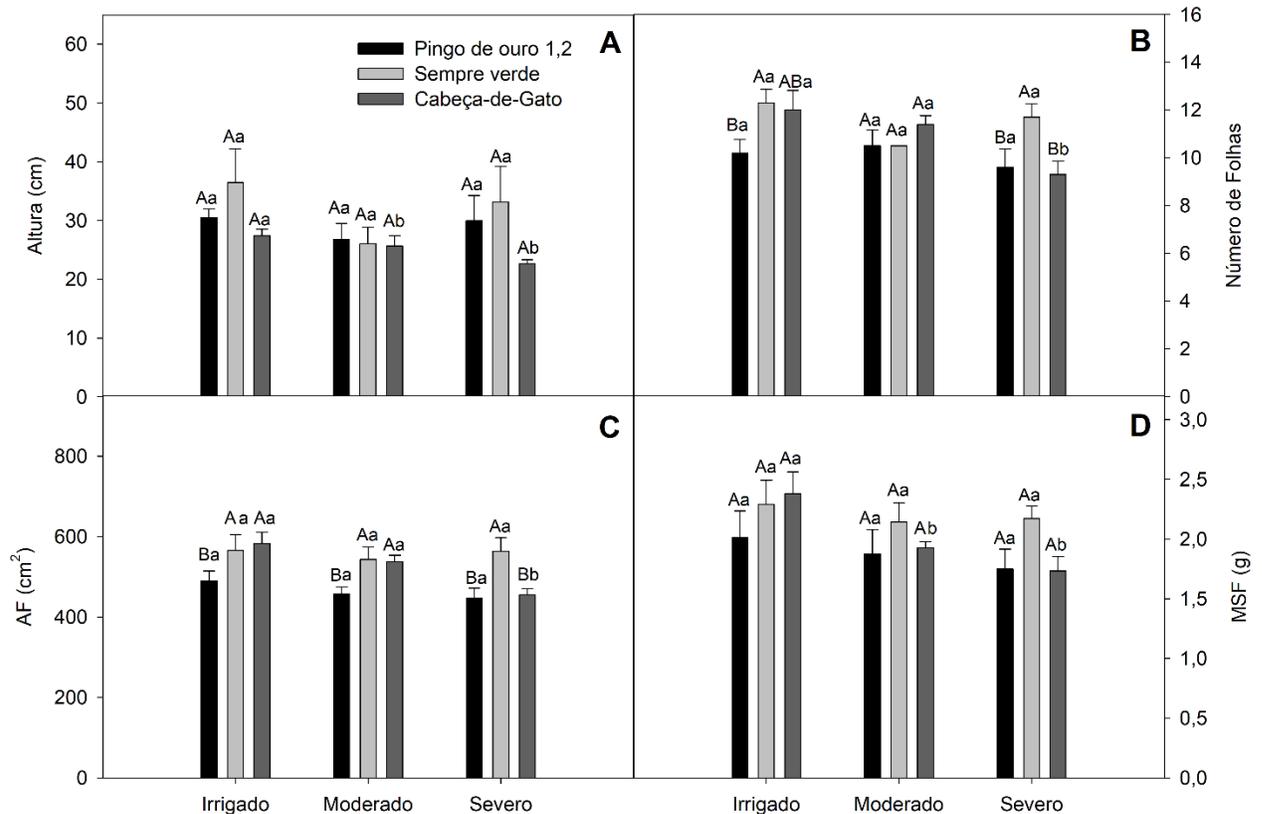
O número de folhas diferiu nos tratamentos controle e severo com o genótipo Pingo-de-Ouro apresentando os menores valores, com maior evidencia no déficit severo (Gráfico 2B). Analisando os três genótipos, apenas o genótipo Cabeça-de-Gato sofreu uma inibição do número

de folhas com a progressão do déficit, podendo ser um mecanismo de economia hídrica a inibição do lançamento de novas folhas (Gráfico 2B).

Em relação a área foliar total (AF), de um modo geral, as variedades locais apresentaram maiores AF em relação ao genótipo tolerante em todos os tratamentos, especialmente na condição irrigada e sob déficit severo, sendo observado diferença estatística entre os genótipos no déficit moderado (Gráfico 2C). A imposição do déficit hídrico culminou na inibição significativa da expansão foliar apenas na variedade local Cabeça-de-Gato (Gráfico 2C).

A matéria seca das folhas não diferiu entre os genótipos nos três tratamentos (Gráfico 2D). A imposição do déficit hídrico culminou na redução significativa da matéria seca apenas na variedade local Cabeça-de-gato (Gráfico 2D).

**Gráfico 2: Influência do déficit na altura das plantas (A), número de folhas (B), área foliar (C) e massa seca foliar (C) dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.** O primeiro grupo de barras corresponde ao tratamento controle, o segundo grupo ao tratamento moderado e o terceiro grupo ao tratamento severo. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente entre genótipos dentro do mesmo tratamento, e letras minúsculas distintas diferem dentro do mesmo genótipo em diferentes tratamentos (Scott-Knott,  $p < 0,05$ ).



O fechamento dos estômatos causa a redução da condutância estomática (Gráfico 4B) e juntamente com a inibição da expansão da área foliar, estão entre as primeiras respostas à seca (NASCIMENTO *et al.*, 2011). Bastos *et al.* (2011), verificou uma redução de até 20% na área foliar em genótipos de feijão-caupi quando submetidos ao estresse hídrico. De acordo com Taiz; Zeiger (2004) a redução na área foliar é um dos mecanismos de defesa contra a transpiração, conservando assim o suprimento de água no solo. Dutra *et al.* (2012) verificaram que há uma relação positiva entre a área foliar e a massa seca quando plantas são submetidas a diferentes lâminas de irrigação. Dessa forma, de acordo com Bastos (2012) um menor potencial hídrico no solo, reduz o teor de água nos tecidos vegetais, reduzindo a área foliar e o teor de clorofila total (Gráfico 3C), acarretando em uma menor produtividade.

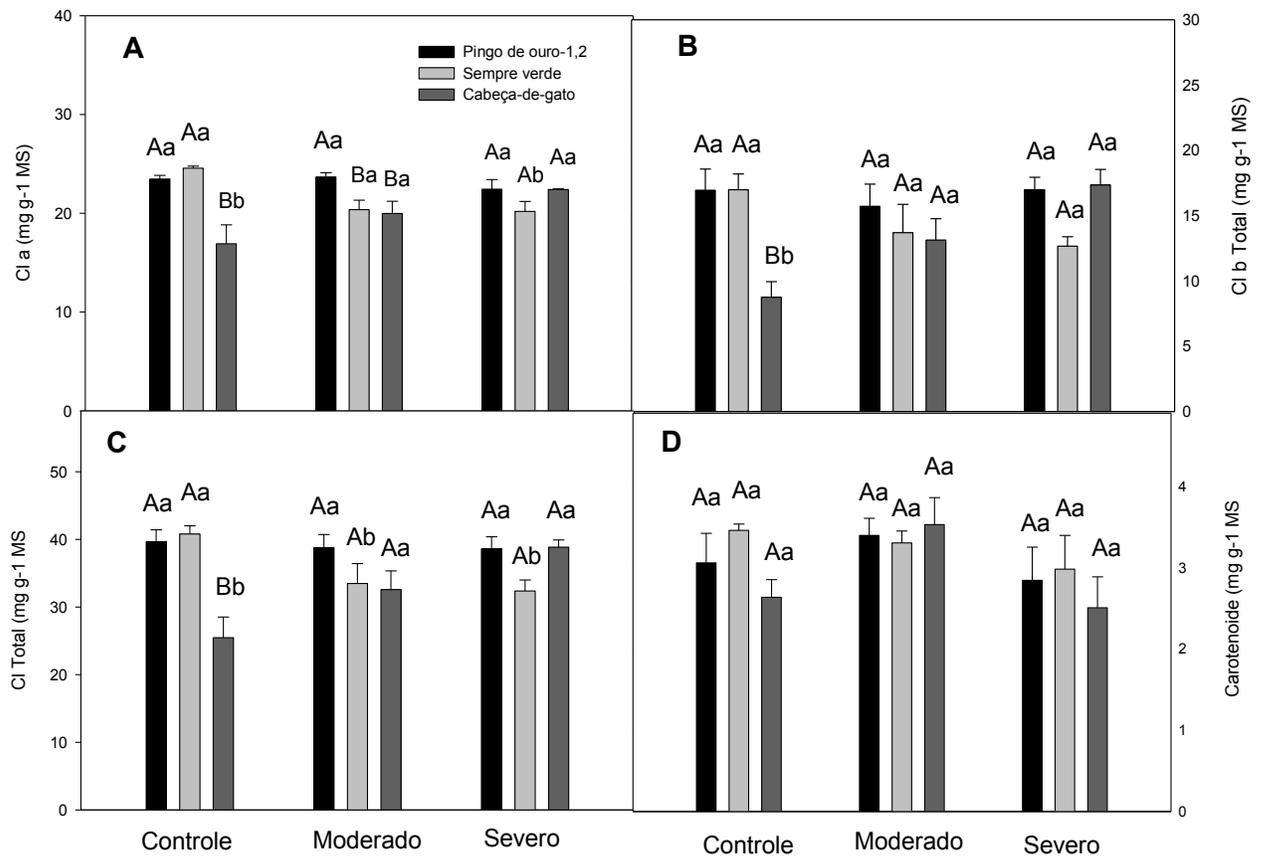
Portanto, percebe-se que no Cabeça-de-Gato os maiores teores de clorofila (Gráfico 3) estão relacionados com a redução da área foliar, concentrando esses pigmentos em uma menor massa seca, podendo assim contrabalancear os efeitos da seca para maximizar o potencial produtivo. Já no Sempre-verde, foi observado um comportamento contrário, com um aumento da

área foliar que não acompanhou a síntese de clorofila, afetando assim os parâmetros da ETR (Gráfico 6C) e consequentemente a produção de assimilados.

### **5.3 Teores de clorofila**

Com relação aos pigmentos fotossintéticos, os genótipos Pingo de ouro 1,2 e Sempre-verde tiveram as maiores médias quando mantidos sobre irrigação constante, porém com a imposição do déficit severo houve redução nos teores de clorofila *a*, afetando também a ETR (Gráfico 3A e 6C). Os teores de clorofila *b* aumentaram quando imposto o déficit severo para o genótipo Cabeça-de-gato, porém houve redução no Pingo de ouro 1,2 (Gráfico 3B). Já em relação aos carotenoides não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos mesmo com a imposição do déficit (Gráfico 3D) o que pode ser relacionado com o NPQ se manter estável nos genótipos mesmo com a imposição do déficit.

**Gráfico 3: Influência do déficit hídrico no acúmulo de clorofila e carotenoides nos genótipos Pingo de ouro 1,2; Sempre-verde e Cabeça-de-gato.** Detalhes estatísticos como descrito no Gráfico 1



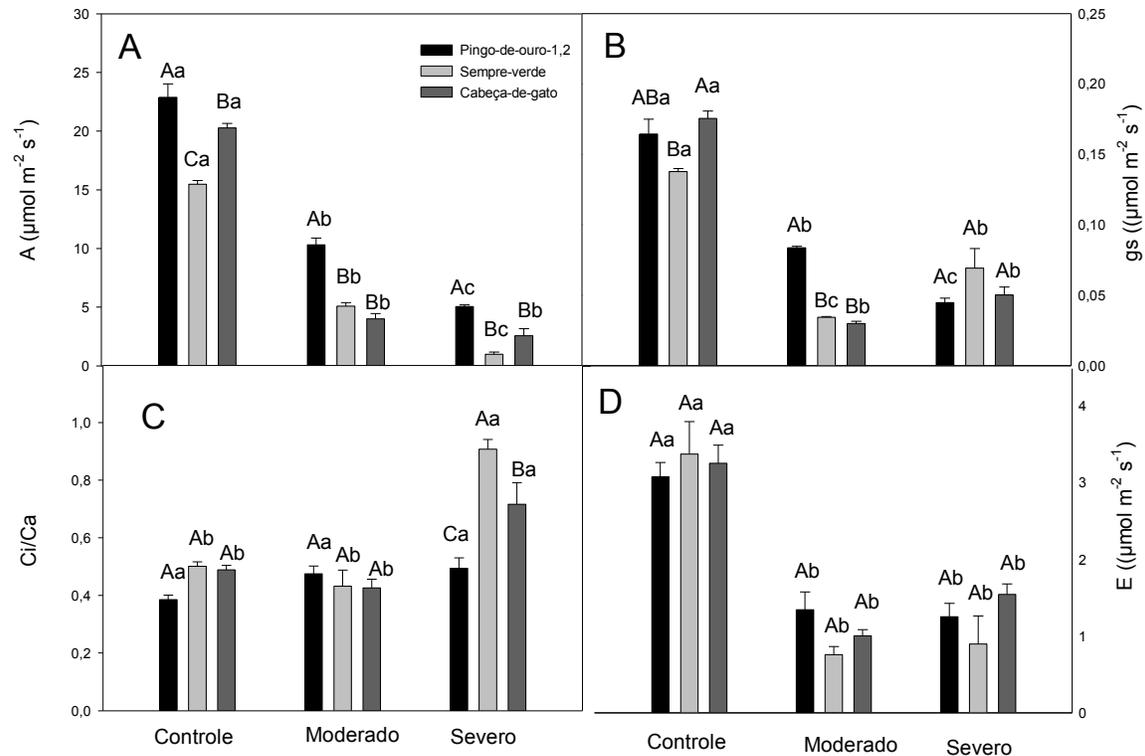
As membranas do tilacóide contêm duas formas diferentes de clorofilas, as clorofilas *a* e *b*. A clorofila *a* é encontrada em todos os centros de reação e antenas, onde também é encontrada a clorofila *b* (BUCHANAN, 2015), sendo ambas, relacionadas com o processo fotossintético das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013). A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a fase fotoquímica da fotossíntese, já a *b* funciona mais como um pigmento acessório, auxiliando na absorção de luz e na transferência de energia para os centros de reação (STREIT *et al.*, 2005). Segundo Silva *et al.* (2014), o déficit hídrico afeta os teores de clorofila reduzindo a fotossíntese, dessa forma, pode inferir que o declínio na fotossíntese do Sempre-verde (Gráfico 4A) também pode ser consequência do declínio da clorofila *a*. Já no Cabeça-de-gato o declínio da fotossíntese por ter sido consequência de outros eventos, como alterações na atividade da RUBISCO, uma vez que as clorofilas *a* e *b* aumentaram com a evolução do estresse. Já os carotenoides são importantes moléculas de função antioxidante, e juntamente com as enzimas

(Gráfico 8) atuam na proteção contra o oxigênio singlete produzido nas membranas do tilacóides que atuam no PSII (BARBOSA *et al.*, 2014). Esse pigmento, através do ciclo das xantofilas, atua na dissipação do excesso de energia, principalmente na forma de calor, ocorrendo, como também em menor escala, em dissipação química (EDGE *et al.*, 1997). Dessa forma, observa-se que a não alteração nos valores de NPQ (Gráfico 6D) é reflexo de os teores de carotenoides não terem variado, possivelmente pela intensidade luminosa não foi suficiente.

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

Na ausência de estresse a fotossíntese (*A*) foi maior no genótipo Pingo de ouro 1,2 (padrão tolerante), seguido do Sempre-verde e por último Cabeça-de-gato, porém com a imposição do déficit houve inibição significativa da fotossíntese em todos os genótipos, sendo o genótipo tolerante o que obteve maior média na condição severa do estresse (Gráfico 4A). A redução deve-se, primeiramente, a redução na condutância estomática (*g<sub>s</sub>*) nos três genótipos (Gráfico 4B) quando submetidos ao estresse moderado, levando assim, a uma menor entrada de CO<sub>2</sub> pelo fechamento estomático afim de reduzir a perda de água pela transpiração (Gráfico 4D). Quando observado a relação *C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>* (Gráfico 4C), pode-se notar que com exceção do Pingo-de-ouro, o estresse severo acarretou um aumento na relação *C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>* do Cabeça-de-gato e do Sempre-verde, o que sugere que as plantas estão sofrendo inibição bioquímica da fotossíntese. A taxa transpiratória (*E*) foi reduzida em todos os genótipos no estresse moderado e se mantiveram constantes no severo.

**Gráfico 4: Influência do déficit hídrico no teor de fotossíntese (A), condutância estomática (B), transpiração (C), razão *C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>* (D) dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.** Detalhes estatísticos como descrito no Gráfico 1

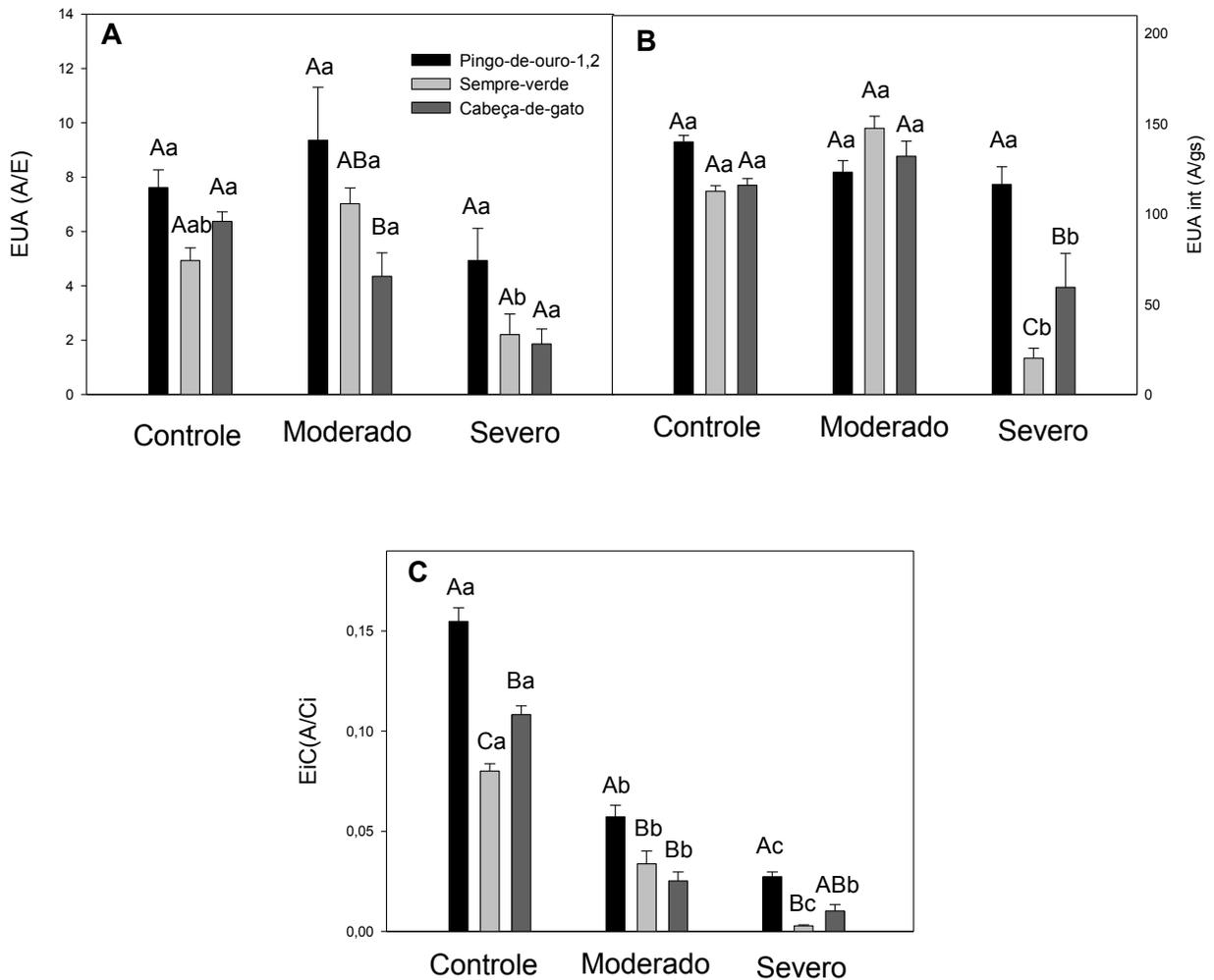


Plantas quando submetidas a restrição hídrica podem apresentar, como mecanismos de proteção, o fechamento estomático afim de evitar a perda de água pela transpiração, como consequência, há um menor influxo de  $\text{CO}_2$  para os sítios de carboxilação, havendo assim uma queda na atividade fotossintética (Bosco *et al.*, 2009), caracterizando assim uma limitação difusiva. Segundo estudos realizados por Lima *et al.* (2010), a condutância estomática é um bom indicativo de estresse hídrico em feijão, apresentando estreita relação com o fluxo de  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CO}_2$ . Plantas que possuem a capacidade de perceber os estímulos ambientais e rapidamente reduzir a perda de água por meio dos estômatos e mantendo assim, pelo menos temporariamente, taxas fotossintéticas razoáveis, apresentam bom comportamento fisiológico em situações de deficiência hídrica (NASCIMENTO *et al.*, 2011). A queda na condutância estomática pode ser atribuída a uma redução no  $\Psi_w$  foliar (COSTA; MARENCO, 2007). Além disso, a transpiração é um mecanismo da planta para reduzir a temperatura. De acordo com Taiz e Zeiger (2013), plantas C3 como o feijão são mais sensíveis as variações de temperatura que as C4. Segundo Bastos *et al.*

(2014), a redução na condutância reduz a transpiração o que afeta a redução da temperatura prejudicando assim a produção de assimilados. Já quando as plantas foram submetidas aos estresses severos, pode-se observar que os mecanismos difusivos não mais limitam a taxa de fotossíntese, havendo agora limitações bioquímicas, como pode ser observado nos genótipos Cabeça-de-gato e Sempre-verde (Gráfico 4C). Segundo DaMatta *et al* (2002), a intensificação do estresse pode levar a inibição não-estomática da fotossíntese, que é consequência do comprometimento da regeneração da Rubisco (Ribulose 1,5-bifosfato caboxilase-oxigenase) além de uma menor atividade de carboxilação dessa enzima, ou seja, ocorre um aumento da taxa fotorrespiratória, reduzindo assim a fotossíntese líquida. Segundo Araújo *et al.* (2009), a fotorrespiração é um mecanismo eficaz na dissipação do excesso de energia proveniente na forma de ATP e NADPH. Pode-se concluir que o genótipo tolerante sofreu inibição da fotossíntese por meios difusivos e as variedades locais testadas foram além dessa inibição, passando assim por uma inibição bioquímica quando submetidos ao estresse severo. Esse fato pode ser sustentado quando comparamos o NPQ (Gráfico 6 D) em que não se observa aumento na dissipação não fotoquímica.

As consequências da restrição hídrica nas trocas gasosas podem ser expressas pela eficiência do uso da água (EUA) (Gráfico 5A). Pode-se observar que o Pingo de ouro 1,2 e o Cabeça-de-gato não diferiram com a evolução do estresse. Já o Sempre-verde reduziu esse parâmetro no estresse severo. Quando avaliado a eficiência do uso da água intrínseca (EUA<sub>int</sub>) (Gráfico 5B) observa-se que o Pingo de ouro 1,2 manteve a relação constante independentemente do nível de estresse, mostrando assim que a taxa de fotossíntese acompanhou a redução na condutância estomática. Já nas variedades locais testadas houve decréscimo acentuado nesse parâmetro, mostrando que a inibição da fotossíntese não é consequência de processos difusivos, mas sim de processos bioquímicos como mostrado no Gráfico 4C, em que a eficiência instantânea de carboxilação (EiC) foi reduzida nos genótipos testados, ou seja, existe uma alta concentração de CO<sub>2</sub> dentro da folha, mas a fotossíntese está sendo limitada pela etapa bioquímica.

**Gráfico 5: Influência do déficit hídrico na eficiência do uso da água (EUA), eficiência do uso da água intrínseca (EUA<sub>int</sub>) e eficiência de carboxilação (EiC) dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.** Detalhes estatísticos como descrito no Gráfico 1

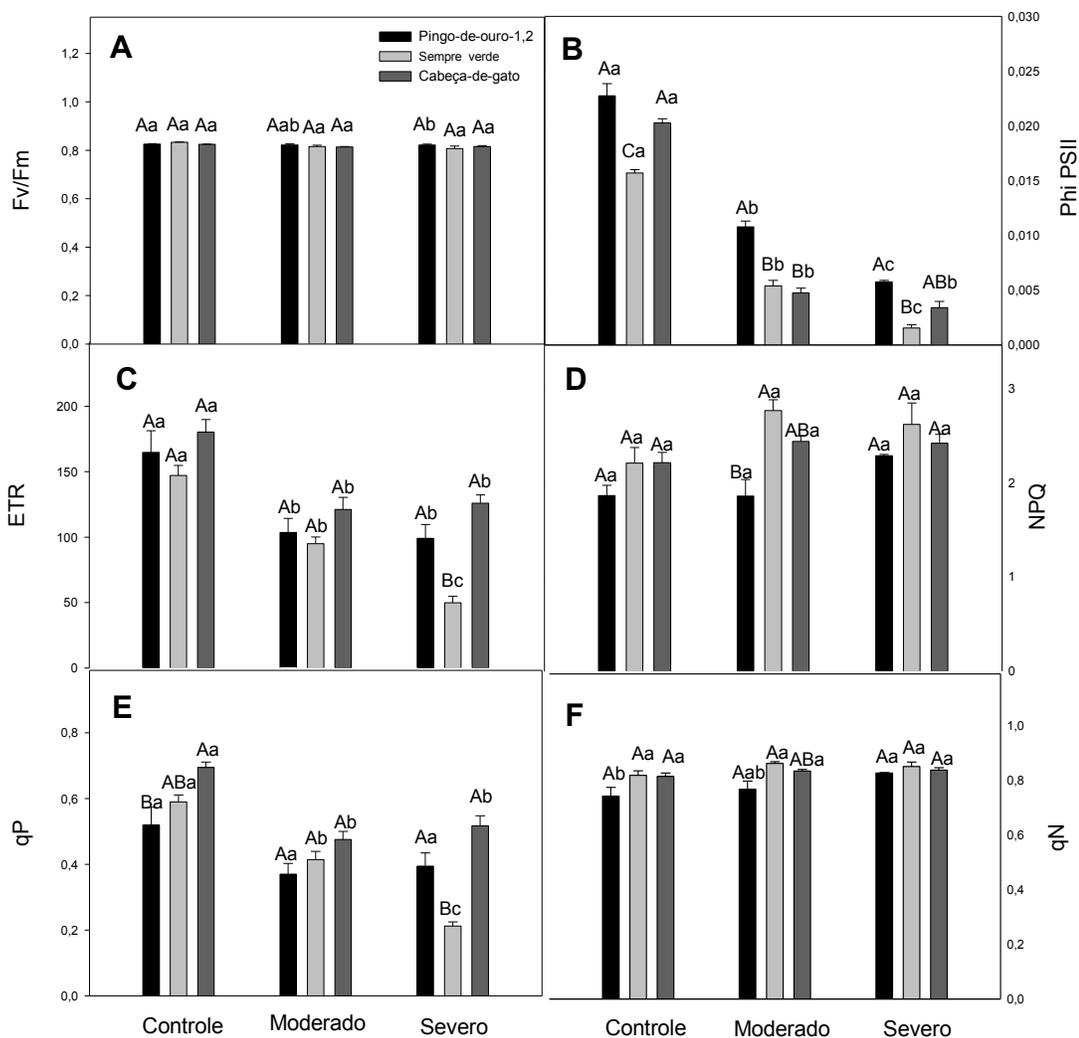


Aumento nos valores do EUA ( $A/E$ ) pode ser explicado como uma estratégia de mitigar os efeitos deletérios da seca. Segundo Jaimez *et al.* (2005), existe uma estreita relação entre a fotossíntese e a transpiração, ou seja, a quantidade de carbono fixado pela quantidade de água transpirada. Dessa forma, plantas em que são observados maiores valores desse parâmetro mostram maior eficiência na fixação de carbono por uma menor perda de água. Quando observado a eficiência intrínseca do uso da água ( $EUA_{int}$ ;  $A/g_s$ ) pode-se concluir que a variedade local Sempre-verde apresenta os menores valores no estresse severo, apresentando, assim, características de inibição bioquímica, o que pode ser comprovado quando observado a eficiência instantânea de carboxilação ( $EiC$ ;  $A/C_i$ ).

Portanto, pode-se observar que as plantas quando submetidas a estresse moderado apresentaram inibição difusiva. Dessa forma, com uma menor disponibilidade de água, menos ATP e NADPH são formados na etapa fotoquímica (SILVA *et al*, 2015). Já com a evolução do estresse a inibição passou a ser bioquímica, pois não mais os fatores de limitação estomática estavam governando a redução na fotossíntese.

Não foram observadas diferenças no rendimento quântico potencial do PSII ( $F_v/F_m$ ) nas plantas com a evolução dos tratamentos, porém pode-se observar uma tendência a uma redução dos valores do Pingo de ouro 1,2 quando submetido ao tratamento severo. Os valores da taxa de transporte de elétrons (ETR) (Gráfico 6C) e rendimento quântico efetivo do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) (Gráfico 6B) decresceram com a evolução do estresse, sendo o Sempre-verde o mais afetado quando submetido ao estresse severo, mostrando, assim, uma correlação com a fotossíntese (Gráfico 4A). Não foram observadas diferenças na dissipação não fotoquímica (NPQ) (Gráfico 6D) com a evolução do estresse, porém observou-se uma tendência ao aumento dessas médias, mostrando assim indícios de estresse. A dissipação fotoquímica (qP) (Gráfico 6E) se manteve constante somente no genótipo Pingo-de-ouro-1,2. Já a dissipação não fotoquímica (qN) (Gráfico 6F) não foi alterada com o déficit hídrico.

**Gráfico 6: Influência do déficit hídrico sobre rendimento quântico potencial do PSII ( $F_v/F_m$ ), rendimento quântico efetivo ( $\Phi_{PSII}$ ), Taxa de transporte de elétrons (ETR), dissipação não fotoquímica no escuro (NPQ), dissipação fotoquímica (qP) e dissipação não fotoquímica no claro (qN) dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato. Detalhes estatísticos como descrito no Gráfico 1**



Segundo Tezara *et al.* (2005), normalmente não são observadas diferenças entre a razão Fv/Fm em experimentos em casa de vegetação, sendo o seu declínio um indicativo de dano fotonibitório no PSII. A ETR é uma função do Phi PSII e do fluxo de fótons fotossintetizantes, o que explica a redução desse parâmetro nos genótipos quando suspensa a irrigação, sendo o Sempre-verde o genótipo que sofreu maiores reduções. Além disso, pode-se observar que a fotoinibição, consequência do estresse hídrico, atuou como mecanismo fotoprotetor, pois, pelo menos em parte, não foi observado alterações na peroxidação lipídica (Gráfico 7A). Esse argumento é sustentado quando se observa que o NPQ e o qN não diferiu significativamente, mostrando assim, que não houve mudança na dissipação não fotoquímica (Gráfico 6D e F).

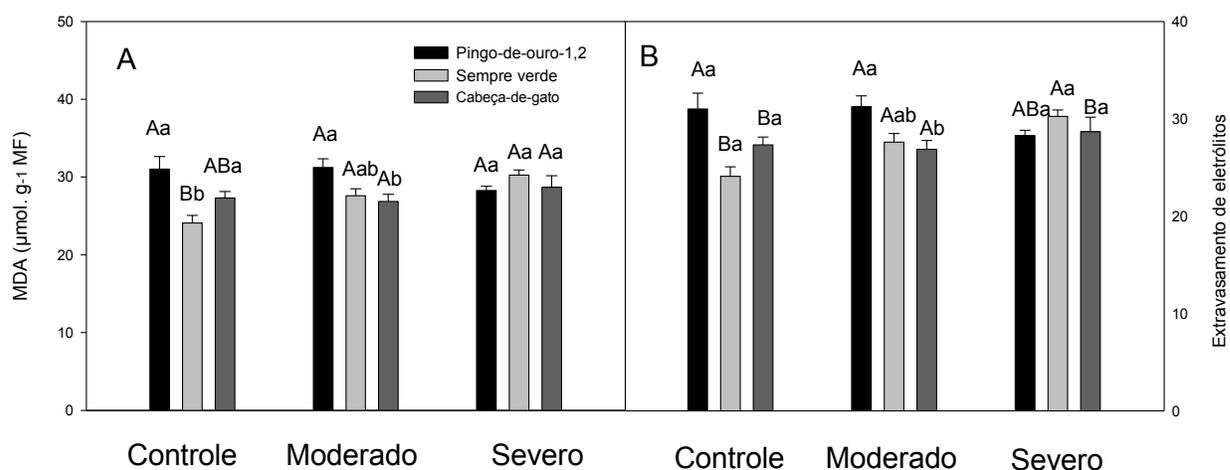
O valor de qP indica a proporção dos centros de reação do PSII que estão abertos para converter a energia luminosa em processos da fotossíntese (NADPH e ATP). Já o qN representa as formas de dissipação da energia, principalmente forma de calor (ZANANDREA, 2006). Segundo Silva *et al.* (2006) a queda no qP, indica que a plastoquinona Q<sub>A</sub> (primeiro acceptor de elétrons do PSII) se encontrava reduzida, dessa forma, apresentando uma menor capacidade de reduzir o NADP<sup>+</sup>, o que reflete o declínio na fotossíntese (Gráfico 4A).

## 5.4. Mecanismos enzimáticos e não enzimáticos

### 5.4.1. Danos de membrana e peroxidação lipídica

Os danos causados pela restrição hídrica na membrana celular, estão representados pelo aumento nos níveis de malonaldeído (MDA) (Gráfico 7A). Os resultados mostram que houve uma tendência ao aumento de MDA no estresse moderado para o genótipo tolerante, mas em condições severas os valores não diferiram significativamente. Comportamento semelhante foi observado para o extravasamento de eletrólitos (Gráfico 7B).

Gráfico 7: **Influência do déficit hídrico sobre o teor de peroxidação lipídica (TBARS) e danos de membranas dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.** Detalhes estatísticos como descrito no Gráfico 1



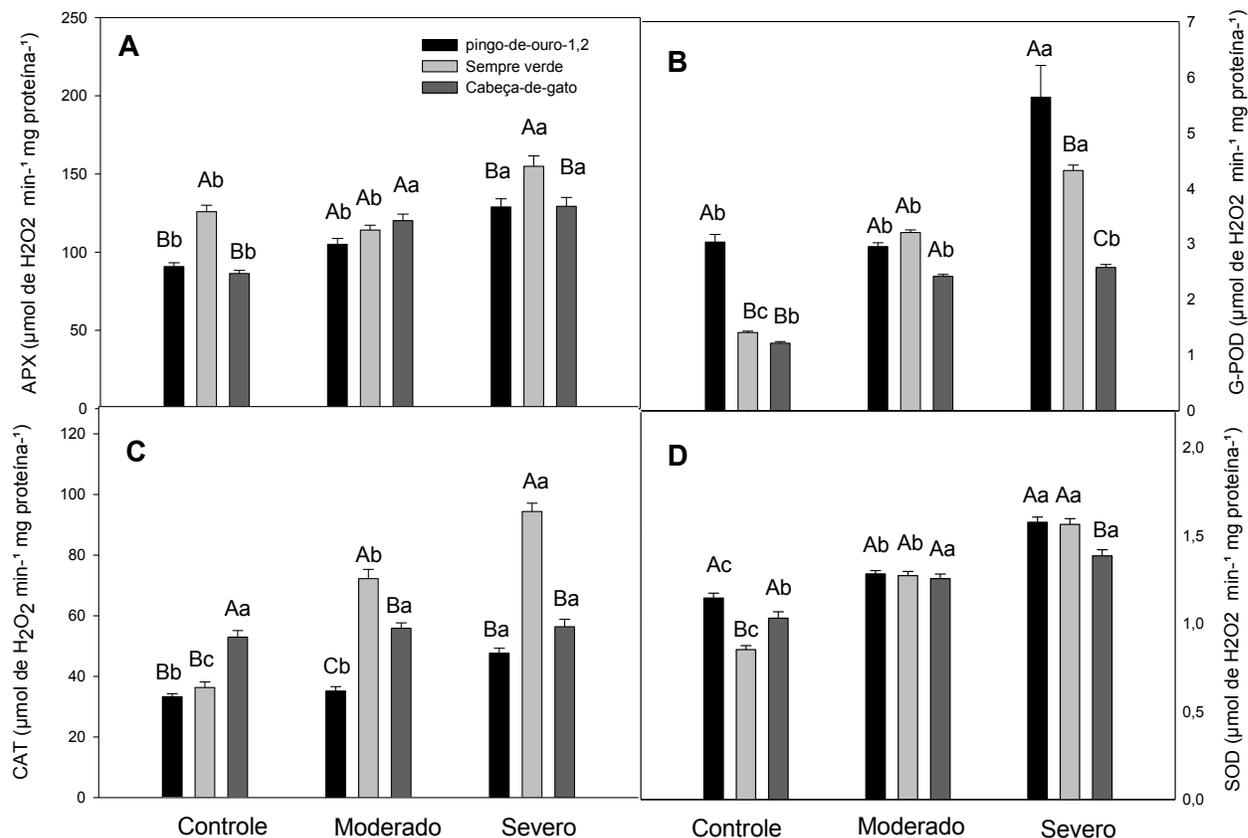
Em condições de estresse, a cadeia transportadora de elétrons é desestabilizada, levando a produção das ERO's a níveis significativamente altos, ocorrendo assim a peroxidação

lipídica e conseqüentemente danos as membranas (CHANG *et al.* 2016). Como conseqüência desses radicais livres, a manutenção da integridade da membrana é comprometida ocorrendo assim o extravasamento de eletrólitos. (FIOREZE *et al.* 2013). Dessa forma, se observa uma tendência do genótipo Sempre-verde ao incremento significativo de danos de membrana, possivelmente verificado se o estresse fosse mais prolongado. Já o Cabeça-de-gato mostrou comportamento semelhante ao padrão tolerante.

#### **5.4.2. Enzimas**

Constatou-se um aumento na atividade da APX (Gráfico 8A) em plantas quando submetidas ao estresse severo, sendo o Sempre-verde o genótipo que apresentou maior atividade dessa enzima. Já a atividade da G-POD (Gráfico 8 B) foi maior no Pingo de ouro 1,2 no estresse severo. A atividade da CAT (Gráfico 8 C) foi significativamente superior no Sempre-verde a partir do estresse moderado. Já a atividade da SOD (Gráfico 8 D) foi superior no Pingo de ouro 1,2e no Sempre-verde. Portanto, pode-se observar que os genótipos Pingo de ouro 1,2 e Sempre-verde possuem mecanismos enzimáticos de defesa mais sensíveis as variações de conteúdo de água no solo que o Cabeça-de-gato.

**Gráfico 8: Atividades antioxidativas das enzimas peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (G-POD), catalase (CAT) superóxido desmutase (SOD) dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato. Detalhes estatísticos como descrito no Gráfico 1**



Segundo Barbosa *et al.* (2014), a fotorrespira\u00e7\u00e3o \u00e9 a principal fonte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas c\u00e9lulas que realizam fotoss\u00edntese. Isso explica, em parte, o aumento na atividade enzim\u00e1tica dos gen\u00f3tipos, uma vez que esses mecanismos atuam como linha de defesa que neutralizam o efeito t\u00f3xico das ERO's.

A SOD participa como primeira linha de defesa nas plantas submetidas a algum tipo de estresse (APEL *et al.*, 2004). Essa enzima \u00e9 respons\u00e1vel pela forma\u00e7\u00e3o das esp\u00e9cies reativas de oxig\u00eanio, servindo assim de gatilho para a atua\u00e7\u00e3o das outras enzimas (CAT, G-POD, APX), uma vez que atua aumentando os n\u00edveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (PEREIRA *et al.*, 2012). A APX e a CAT s\u00e3o as duas principais enzimas envolvidas na remo\u00e7\u00e3o da ERO's (Sharma *et al.*, 2012) sendo essa \u00faltima enzima respons\u00e1vel por atuar em altas concentra\u00e7\u00f5es de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como em estresse h\u00eddrico severo (DUBEY, 2011).

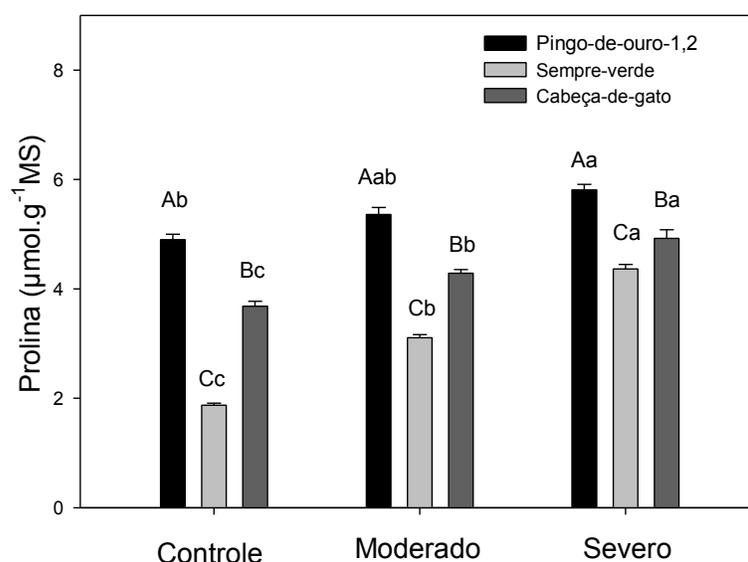
Dessa forma, pode-se observar que além dos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, os genótipos também evitam produção de ERO's reduzindo a taxa de elétrons na cadeia transportadora.

## 5.5. Teores de solutos orgânicos

### 5.5.1. Prolina livre

Os teores de prolina livre foram alterados significativamente com a imposição da restrição hídrica, havendo diferenças entre os genótipos estudados. Os maiores teores foram observados no genótipo Pingo de ouro 1,2, que se manteve superior aos demais e constante mesmo com a evolução do estresse. Os genótipos Cabeça-de-gato e Sempre-verde apresentaram incremento significativo com a evolução do estresse, porém não superando o genótipo tolerante (Gráfico 9).

**Gráfico 9: Influência do déficit hídrico na acumulação de prolina nas folhas dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato.** Detalhes estatísticos como descrito no Gráfico 5.



A prolina tem sido relacionada como um aminoácido padrão de tolerância em espécies submetidas ao estresse hídrico ou salino, sendo maior em plantas tolerantes do que em

plantas sensíveis (ASHRAF *et al.*, 2007), como pode ser visualizado no presente estudo. Dessa forma, o genótipo tolerante se confirmou como superior nesse parâmetro quando comparado ao Cabeça-de-gato e ao Sempre-verde, visto que esse soluto funciona como osmorregulador. Estudos realizados por Costa (2003) também mostraram uma relação positiva entre o acúmulo de prolina e a tolerância ao déficit hídrico quando se trabalhou com o genótipo Pingo de ouro 1,2. Castro *et al.* (2007) e Lazcano-Ferrat; Lovat (1999) também observaram correlação positiva desse soluto em plantas de *Tectona grandis* L.f e *Phaseolus vulgaris* respectivamente.

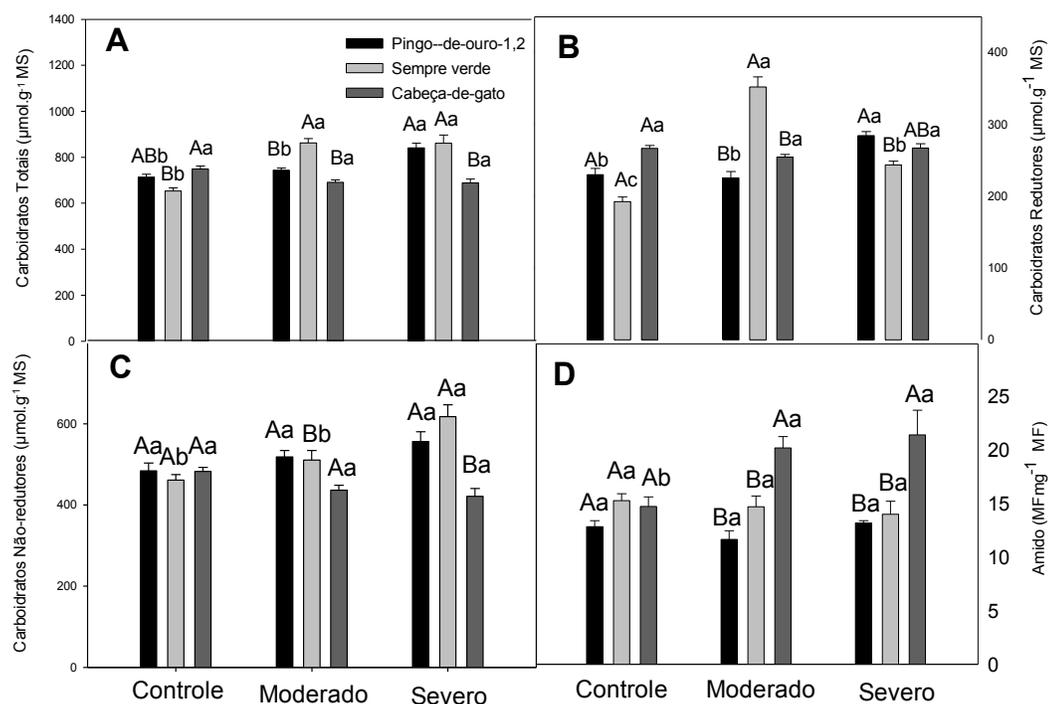
A síntese e acúmulo de prolina e outros osmorreguladores são amplamente usados em plantas para manter a estabilidade das membranas e a manutenção e conformação de proteínas sob baixa disponibilidade hídrica (EFEOĞLU *et al.*, 2008), variando entre espécies vegetais, genótipos e também em diferentes níveis de estresse, sendo reconhecida também como responsável por proteger as membranas do tilacoides contra o oxigênio singlete, além de estar envolvida na morfogênese vegetal (REDDY *et al.*, 2004). Esse soluto funciona como estoque de aminas para o reestabelecimento do crescimento da cultura após o estresse (HOAI, 2003). Essa proteção contra o oxigênio singlete se dá pelo fato desse aminoácido atuar na redução no NADPH para geração a partir do glutamato (FERREIRA *et al.* 2002). Dessa forma, a prolina também atua na dissipação de energia gerada pela fotorrespiração como foi observado quando comparamos a fotossíntese (Gráfico 4A) com o incremento de prolina, em que as variedades locais apresentarão alta taxa respiratória.

### **5.5.2. Carboidratos solúveis**

O estresse hídrico alterou o teor de carboidratos totais nos diferentes genótipos. Pode-se observar que os carboidratos totais (Gráfico 10A) no genótipo tolerante e Sempre-verde aumentaram seus teores com a evolução do estresse, sendo o Pingo de ouro 1,2 sensível ao parâmetro somente quando submetido ao estresse severo. Já o Cabeça-de-gato manteve seus teores inalterados com a evolução do déficit. Um comportamento parecido pode ser observado nos carboidratos redutores (Gráfico 10B), porém houve um alto incremento do Sempre-verde para o estresse moderado e posteriormente um decréscimo quando submetido ao estresse severo. Os teores de carboidratos não redutores (Gráfico 10C) foram superiores no Pingo de ouro 1,2, mantendo-se inalterado independente do estresse. Já o Sempre-verde reduziu o seu teor

significativamente a partir do estresse severo. O teor de amido (Gráfico 10D) aumentou no Cabeça-de-gato com a imposição do estresse, enquanto nos demais se manteve constante.

**Gráfico 10: Influência do déficit hídrico nos teores de carboidratos totais, redutores, não redutores e amido dos genótipos Pingo de ouro 1,2, Sempre-verde e Cabeça-de-gato. Detalhes estatísticos como descrito no Gráfico 1.**



A deficiência hídrica pode causar alterações no conteúdo de carboidratos foliares (CHAVES FILHO, 2001). O aumento na taxa respiratória de manutenção e a redução na assimilação de CO<sub>2</sub>, consequências da seca, levam a aumentos nos conteúdos de aminoácidos e açúcares solúveis (KRAMER; BOYER, 1995). Segundo DaMatta *et al.* (1997 *apud* Melo, 2008) um leve estresse hídrico causa diminuições na concentração de amido e um acúmulo de açúcares solúveis, porém esse fato não foi observado possivelmente pelo conteúdo de prolina (Gráfico 9) ter aumentado em detrimento dos carboidratos, dessa forma a planta continuou a produzir açúcares para suprir as demandas.

Sob estresse hídrico severo, há relatos da diminuição do conteúdo sacarose pela inibição da síntese como pelo aumento da sua degradação (PRAXEDES *et al.*, 2006), não sendo observado no presente estudo.

Segundo Albuquerque *et al.* (2013), a partição das trioses-fosfatos aumentando os teores de amido pode significar uma estratégia de sobrevivência, uma vez que garante o suprimento energético para a respiração, como observado no Cabeça-de-gato.

A falta de água afetar a fotossíntese (YORDANOV *et al.*, 2000). Segundo Zlater e Yordanov (2004) o estresse hídrico prejudica a atividade da frutose-1,6-bifosfato e da sedoheptulo-1,7-bifosfato, prejudicando a liberação de Pi nos cloroplastos e conseqüentemente gerando menor ATP (KUWAMAHARA; SOUSA 2009). A função da frutose-1,6-bifosfato é atuar como transportador de Pi entre o cloroplasto e o citoplasma (TAIZ; ZAIGER 2009). Dessa forma, o estresse hídrico prejudica a síntese de sacarose, como foi observado no Cabe-de-gato. Segundo Sousa (2005) a redução demanda de sacarose pode resultar no aumento da síntese de amido ou de uma redução na assimilação de CO<sub>2</sub>, podendo estar relacionada à baixa concentração de Pi no citoplasma, o que explica o aumento no teor de amido e redução nos teores de carboidratos totais no Cabeça-de-gato com a evolução do estresse. Esse fato também pode está ligado a menor fotossíntese observada, pois Magalhães filho *et al.* (2007), relatam uma relação entre esses dois parâmetros.

O déficit hídrico desencadeia uma série de alterações tanto a nível celular quando a nível morfológico, sendo essas alterações ligadas por uma série de sinalizadores. Além disso, as plantas apresentam uma série de linhas de defesa para mitigar os efeitos deletérios da seca que vão desde o fechamento estomático até a paralização do crescimento.

## **6. CONCLUSÃO**

O genótipo Pingo de ouro 1,2 confirmou seu padrão de tolerância, pois quando submetido ao déficit hídrico apresentou a maior taxa fotossintética e melhor economia hídrica. Além disso seus mecanismos aclimatativos impediram esse genótipo de sofrer inibição bioquímica, o que confirma uma vantagem em relação as variedades locais.

Entre as variedades locais, o genótipo Cabeça-de-gato se destacou quando comparado ao Sempre-verde, apresentando maior economia hídrica, além de um eficiente aparato bioquímico de defesa contra o estresse hídrico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJUM, S.A. et al. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 9, p. 2026-2032, 2011

ALBUQUERQUE, M. P. F.; MORAES, F.K.C.; SANTOS, R. I. N.; CASTRO, G.L.S.; RAMOS, E.M.L.S.; PINHEIRO, H.A. Ecofisiologia de plantas jovens de mogno-africano submetidas a déficit hídrico e reidratação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 48(1), 9-16. 2013

APEL, K; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annu. Rev. Plant Biol. Palo Alto**, v.55, p. 373-399, 2004.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.

ASHRAF, M.; AKRAM, N.A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M.R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, v. 111, p. 249-296, 2011.

ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C., Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163-190, 2013.

ARAÚJO, S.A.C; DEMINICIS, B.D. Fotoinibição da Fotossíntese. **Revista brasileira de Biociência**, Porto Alegre, v. 7, n. 4, p. 463-472, out./dez. 2009

AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F; BATISTA, F. A. S. Recomendações Técnicas para o cultivo da mamona (*Ricinus communis* L.) no Brasil. Campina Grande: **Embrapa-CNPA**, 1997. 52 p.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciências Agrárias**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014

BARRETO, D. P. D.; SANTOS, A. A. dos; QUINDERÉ, M.A.W.; VIDAL, J. C.; ARAÚJO, J. P. P.; WALT, E.E.; RIOS, G.P.; NEVES, B.P. EPACE-10: nova genótipo de caupi para o Ceará. Fortaleza: EPACE, 1988. Folder.

BASTOS, E.A.; RAMOS, H.M.M.; ANDRADE JUNIOR, A.S.; NASCIMENTO, F.N.; 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.

BATISTA, L. A.; Guimarães, R. J.; Pereira, F. J.; Carvalho, G. R.; Castro, M. C. Anatomia foliar e potencial hídrico na tolerância de genótipos de café ao estresse hídrico. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 3, p. 475-481, Sept. 2010

BEZERRA, F. M. L.; ARARIPE, M. A. E.; TEÓFILO, E. M.; CORDEIRO, L. G.; SANTOS, J. J. A. Feijão-caupi e déficit hídrico em suas fases fenológicas. **Ciência Agronômica**, v.34, p.5-10, 2003.

BOSCO, M. R. O.; OLIVEIRA, A. B.; HERNANDEZ, F. F. F.; LACERDA, C. F. Efeito do NaCl sobre o crescimento, fotossíntese e relações hídricas de plantas de berinjela. **Revista Ceres**, v.56, p.296-302. 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 3a Impressão**. 2015. American Society of Plant Physiologists, Rockville

BRITO, M. M.P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. da. Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com o uso de N. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 3, n. 4, p. 895-905, 2009.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P.; LIMA, D.U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.137-162, 2000.

CAMPOS, F.L.; FREIRE FILHO, F.R.; LOPES, A.C. de A.; RIBEIRO, V.Q.; SILVA, R.Q.B. da; ROCHA, M. de M. Ciclo fenológico em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.): uma proposta de escala de desenvolvimento. **Revista Científica Rural**, v. 5, n. 2, p. 110-116, 2000.

CARLIN, S.D.; SANTOS, D.M.M.; Indicadores fisiológicos da interação entre deficit hídrico e acidez do solo em cana-de-açúcar. *Pesquisa agropecuária brasileira*. 2009, vol.44, n.9, pp.1106-111

CASTRO, D. S.; SANTOS, A, O. SANTOS, LOBATO, A. K. S.; GOUVEA, D. S.; NETO, C. F.O; CUNHA, R. L. M.; COSTA, R. C. L. Concentrações de Prolina e Carboidratos Solúveis Totais em Folhas de Teca (*Tectona grandis*) submetida ao Estresse Hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl. 2, p. 921-923, jul. 2007.

CASTRO, D. **Tratamento jurídico internacional da água e o desenvolvimento sustentável**. 2008. Dissertação (mestrado em direito econômico). Faculdade de Direito Unesp. São Paulo

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.

CARVALHO M.H.C. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v.3, 156-165, 2008.

CHANG Z, LIU Y, DONG H, TENG K, HAN L, ZHANG, X. Effects of cytokinin and nitrogen on drought tolerance of creeping bentgrass. **Plos One** 3-19, 2016

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 the field? **Photosynthesis and growth**. Ann Bot (Lond) 89: 907–916, 2002.

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**. 2001, vol.24, n.2, pp.199-204.

COSTA, G. F.; MARENCO, R.A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). **Acta amazônica**. 2007, vol.37.

CRUZ, M.C.M.; SIQUEIRA, D.L; SALOMÃO, L.C.C.; CECON, P.R. Fluorescência da clorofila a em folhas de tangerineira 'Ponkan' e limeira ácida 'Tahiti' submetidas ao estresse hídrico. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(3), 896-901, 2009

CORDEIRO, Y. E. M.; PINHEIRO, H. A.; Filho, B. G. S.; CORREA, S. S.; SILVA, J. R. R. E.; FILHO, M. B. D. Physiological and morphological responses of young mahogany (*Swietenia macrophylla* King) plants to drought. *Forest ecology and management*, v. 258, p. 1449-1455, 2009.

DaMATTA, F. M.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S. Photosynthetic performance of two coffee species under drought. *Photosynthetica*, Prague, v. 34, p. 2, p. 257-264, 1997

DAMATTA, F.M., LOOS, R.A, SILVA, E.A., LOUREIRO, M.E. Limitations to photosynthesis in *Coffea Canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology*, 159: 975-981, 2002.

DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; PINHEIRO, H. A.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Science, Clare*, v. 164, n. 1, p. 111-117, Jan. 2003

DEVES, O. D. Utilização da Água: Um Estudo do Potencial de Captação de Água das Chuvas e a Importância das Políticas Públicas e da Educação Ambiental, Brasília – DF ,IV **Encontro Nacional da Anppas**, junho. 2008. p.2

DUTRA, C.C.; PRADO, E.A.F.; PAIM, L.R.; SCALON, S.P.Q. Desenvolvimento de plantas de girassol sob diferentes condições de fornecimento de água. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, suplemento 1, p. 2657-2668, 2012

EDGE, R.; MACGARVEY, D.J.; TRUSCOTT, T.G. The Carotenoids as antioxidant- a review *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* V. 41, 189-200, 1997

EFEOĞLU, B.; EKMEKÇI, Y.; ÇIÇEK, N. **Physiological responses of three maize genotypes to drought stress and recovery.** *South African Journal of Botany*,.06.005., 2008.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2014): área, produção e rendimento. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, 2015

EMBRAPA MEIO NORTE. A cultura do feijão caupi no Brasil: Informações elaboradas pela Embrapa Meio-Norte a pedido da Divisão de Análise de Risco de Pragas - DARP/CGPP/DSV, sobre a cultura do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no Brasil para subsidiar a elaboração de Análise de Risco de Pragas - ARP pelos países importadores de feijão-caupi do Brasil.. Terezina, Pi, 2016

EMBRAPA MEIO-NORTE. **Cultivo de feijão caupi. Jul/2003.** Disponível em: <<http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa/graos/FeijaoCaupi/referencias.htm>>. Acesso em: 8 mar. 2017.

FARIAS, V.D.S; LIMA, M.J.A; NUNES, H.G.C.C.; SOUSA, D.P.; SOUZA, P.JO.P; water demand, crop coefficient and uncoupling factor of cowpea in the eastern amazon. **Revista Caatinga**, 30(1), 190-200, 2017

FERREIRA, V.M.; MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.F.O.M.; OLIVEIRA, L.E.M.; PURCINO, A.A.C.; METABOLISMO DO NITROGÊNIO ASSOCIADO À DEFICIÊNCIA HÍDRICA E SUA RECUPERAÇÃO EM GENÓTIPOS DE MILHO. **Ciência Rural**, 32(1), 13-17. 2002

FIGUEIREDO, S.L., RODRIGUES, J.D., CARNEIRO, J.P.C., SILVA, A.A., LIMA, M.B. Fisiologia e produção da soja tratada com cinetina e cálcio sob déficit hídrico e sombreamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 48:1432-1439, 2013

FREIRE FILHO, F. R. **Origem, evolução e domesticação do caupi.** In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. (eds) O caupi no Brasil. Brasília: IITA/Embrapa, 1988. cap. 1, p. 27-46

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, C.A.F. **Melhoramento genético de Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)** na Região do Nordeste, 1999.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q. Comparação entre três métodos de melhoramento em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 9., 1993, Teresina. **Anais...** Teresina: SBG, 1993. p.133.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; ROCHA, M. de M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M.S.R.; RODRIGUES, E.V. **Feijão-caupi do Brasil**: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina-PI: Embrapa Meio-Norte, p. 84, 2011.

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

GOMES, A.A.; ARAÚJO, A.P.; ROSSIELLO, R.O.P; PIMENTEL, C. Acumulação de biomassa, características fisiológicas e rendimento de grãos em cultivares de feijoeiro irrigado e sob sequeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35(10), 1927-1937, 2000

GUBIS, J.; VANKOVÁ, R.; CERVENÁ, V.; DRAGUNOVÁ, M.; HUDCOVICOVÁ, M.; LICHTNEROVIA, H.; DOKUPIL, T.; JUREKOVÁ, Z. Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought. **South Africa Journal of Botany**, v. 73, n. 4, p. 505-511, 2007.

HOAI, N.T.T.; SHIM, I.S.; KOBAYASHI, K.; KENJI, U. Accumulation of some nitrogen compounds in response to salt stress and their relationships with salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 41, n. 2, p. 159-164, 2003.

JADOSKI, S. O.; KLAR, A. E.; SALVADOR, E. D. Relações hídricas e fisiológicas em plantas de pimentão ao longo de um dia. **Ambiência**, Guarapuava, v. 1, n. 1, p. 11-19, 2005

JAIMEZ, R. E.; F.Rada; C.García-Núñez; A.Azócar Seasonal variations in leaf gas exchange of plantain cv. 'Hartón' (*Musa AAB*) under different soil water conditions in a humid tropical region. **Scientia Horticulturae, Amsterdam**, v. 104, n. 1, p. 79-89, 2005.

LAMBERS, H. et al. **Plant physiological ecology**. 2.ed. New York: Springer, 2008. 610p.

LAZCANO-FERRAT, I.; LOVATT, C. J. Relationship between relative water content, nitrogen pools, and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray during water deficit. **Crop Science**, v.39, p.467-475, 1999.

LEITE, M.L.; VIRGENS FILHO, J. R; RODRIGUES, J.D. Variação de prolina em folhas de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) submetido a diferentes déficits hídricos. **Revista Biotemas**, v.12, n.1 p.21-33. 2000.

LIMA, M. J.A.; FARIAS, V. D.S.; COSTA, D. L.P.; SAMPAIO, LEILA, S.S.; SOUZA, P. J.P.O. . Efeito combinado das variáveis meteorológicas sobre a condutância estomática do feijão-caupi. *Horticultura Brasileira*, 34(4), 547-553, 2016

RAHMAN, I. M. M, **Water Stress**, Rijeka: INTECH, p. 1-14, 2012.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012

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

KUMAR, R. R.; KARAJOL, K.; NAIK, G. R. Effect of Polyethylene Glycol Induced Water Stress on Physiological and Biochemical Responses in Pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 148- 152, 2011

KUWAHARA, F.A.; SOUZA, G.G;. Fósforo como possível mitigador dos efeitos da deficiência hídrica sobre o crescimento e as trocas gasosas de *Brachiaria brizantha* cv. MG-5 Vitória. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 31(2), 261-267, 2009

MAGALHÃES FILHO, J.R.; AMARAL, L.R.; MACHADO, D.F.S.P; MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira ‘Valência’ sobre dois tipos de porta-enxertos. *Bragantia*, 67(1), 75-82 (2008).

MARENCO, Ricardo A.; LOPES, Nei F. **Fisiologia vegetal**: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral . 3. ed. atual. e ampl. Viçosa, MG: UFV, 2009. 486 p

MARTINS, F. D.; STRECK, N. A., SILVA, J. C. ; MORAIS, W.W., SUSIN, F.; NAVROSKI, M.C.; VIVIAN, M.A.; Deficiência hídrica no solo e seu efeito sobre transpiração, crescimento e desenvolvimento de mudas de duas espécies de eucalipto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32(3), 1297-1306. 2008

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

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.345, p.659-668, 2000.

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

MOLINARI, H. B. C. **Expressão estresse-induzida do gene p5cs em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico**. Curitiba, 2006. 98p. Tese (Doutor em Ciências – Área de Concentração em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Paraná

MORAIS, R. R.; Gonçalves, J.F.C; Santos Júnior, U.M; Dünisch, O.; Santos, A.L.W Chloroplastid pigment contents and chlorophyll *a* fluorescence in amazonian tropical three species. R. **Árvore**, v. 31, n. 5, p. 959-966, 2007

MUCHERO, W.; EHLERS, J.D.; CLOSE, T.J.; ROBERTS, P.A. Mapping QTL for drought stress induced premature senescence and maturity in cowpea. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 5, p. 849–863, 2009.

NASCIMENTO, S.P.; BASTOS, E. A.; ARAÚJO, E.C.E.; FREIRE FILHO, F.R.; SILVA, E.M. Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi. *Revista brasileira de engenharia agrícola ambiental*, **Revista brasileira de engenharia agrícola ambiental** v. 15, n. 8, p. 8, 2011.

NEVES JÚNIOR, E. S.; XAVIER, F. L. **Avaliação do desenvolvimento do feijão (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cultivado em três texturas de solo na região de Imperatriz no estado Maranhão**. Imperatriz, 2010. 61p. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas, Área de concentração: Ciências Ambientais) Universidade de Ensino Superior do sul do Maranhão

NÓBREGA, J. Q.; RAO, T. V. R.; BELTRÃO, N. E. M.; FIDELIS FILHO, J. Análise de crescimento do feijoeiro submetido a quatro níveis de umidade do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 437-443, 2001.

OLIVEIRA, Alexandra D. de; FERNANDES, Edemo J.; RODRIGUES, Teresinha de J. D.. Condutância estomática como indicador de estresse hídrico em feijão. **Engenharia agrícola**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 86-95, Apr. 2005

PADULOSI, S. **Genetic diversity, taxonomy, and ecogeographic survey of the wild relatives of cowpea (*Vigna unguiculata*)**. PhD Thesis, University of Louvain-La Neuve, Belgium, 1993.

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

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropédica, RJ: Edur. 2004. 191 p.

RAXEDES, S.C.; DAMATTA, F.M.; LOUREIRO, M.E.; FERRÃO, M.A.G.; CORDEIRO, A.T. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves. **Environmental and Experimental Botany**, v.56, p.263-273, 2006

REDDY, A. R. ; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, 2004

RESENDE, M.L. V.; Salgado, S. M. L.; Chaves, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, 28(2), 123-130, 2003

RHEIN, A. F. L.; SANTOS, D. M. M.; CARLIN, S. D. Atividade da enzima redutase do nitrato e teores de prolina livre em raízes de cana-de-açúcar sob os estresses hídrico e ácido no solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1345-1360, 2011.

RIBEIRO VQ. **Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 108p. (Embrapa Meio-Norte. Sistemas de Produção: 2) 2002

RODRIGUEZ-PEREZ, L. Implicações fisiológicas da osmorregulação em plantas. **Agrônômia colombiana.**, Bogotá, v. 24, n. 1, p. 28-37, 2006.

SHARMA, P. ; Jha, A.B.; Dubey R.S.; Pessarakli, M.. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stress ful Conditions. **Journal of Botany**, New York, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SILVA, M.A. ; SANTOS, C.M. ; VITORINO, H.S ; RHEIN, A.F.L. Pigmentos fotossintéticos e índice SPAD como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Bioscience. J.**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 173-181, Jan./Feb. 2014

SILVA, M.M.P.; VASQUEZ, H.M.; BRESSAN-SMITH R.; SILVA, J.F.C.; D'AVILA ERBESDOBLER, L.; ANDRADE JUNIOR, P.S.C.. Eficiência fotoquímica de gramíneas forrageiras tropicais submetidas à deficiência hídrica. **Revista brasileira de zootecnia.** , 2006, vol.35, n.1, pp.67-74.

SILVA, FLAVIANA G. DA, DUTRA, WELLISON F., DUTRA, ALEXSON F., OLIVEIRA, IZAAC M. DE, FILGUEIRAS, LUANNA M. B., & MELO, ALBERTO S. DE. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em plantas de berinjela sob lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 19(10), 2015 p 946-952

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. V.; ARORA, K. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, v.53, p. 65-73, 2007.

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.

SOUZA A.; MORAES, M.G.; RIBEIRO R.C.L.F; Gramíneas do cerrado: carboidratos não-estruturais e aspectos ecofisiológicos. **Acta Botânica Brasileira** 19( 1 ): 81-90, 2005

STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

TESTER, M.; BACIC, A. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. **Plant Physiology**, v.137, p.791- 793, 2005.

TEZARA, W., MARÍN, O., RENGIFO, E., MARTÍNEZ, D., HERRERA, A., 2005. Photosynthesis and photoinhibition in two xerophytic shrubs during drought. **Photosynthetica**, 43, p. 37-45.

TROVATO, M.; MATTIOLI, R.; COSTANTINO, P. Multiples roles of proline in plant stress tolerance and development. **Rendiconti Lincei**, v. 19, n. 4, p. 325-346, 2008

VALENZUELA, H.; SMITH, J. **Cowpea**. Sustainable Agriculture Green Manure Crops. 2002.

YORDANOV I, VELIKOVA V, TSONEV T. Plant response to drought, acclimation, and stress tolerance. **Photosynthetica** 38:171-186, 2000

ZANANDREA, I; NASSI F.L; TURCHETTO1, A.C; BRAG, E.J.B.; PETERS, J.A.; BACARIN, M.A. effect of salinity under fluorescence parameters in *Phaseolus vulgaris*. **Revista Brasileira Agrociência, Pelotas**, v. 12, n. 2, p. 157-161, abr-jun, 2006

ZLATEV, S. Z.; YORDANOV, I. Effects of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants, **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, V.30, 2004