



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

**LETÍCIA KENIA BESSA DE OLIVEIRA**

**TOLERÂNCIA DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI AO DÉFICIT HÍDRICO NA  
FASE GERMINATIVA: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E  
CITOQUÍMICAS**

**FORTALEZA**

**2020**

LETÍCIA KENIA BESSA DE OLIVEIRA

TOLERÂNCIA DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI AO DÉFICIT HÍDRICO NA FASE  
GERMINATIVA: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E CITOQUÍMICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Fitotecnia - Ecofisiologia e produção de culturas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Bosco de Oliveira

FORTALEZA

2020

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)

---

- O48t Oliveira, Letícia Kenia Bessa de.  
Tolerância de cultivares de feijão-caupi ao déficit hídrico na fase germinativa : alterações fisiológicas, bioquímicas e citoquímicas / Letícia Kenia Bessa de Oliveira. – 2020.  
101 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Bosco de Oliveira.
1. Estresse abiótico. 2. Fisiologia e anatomia de sementes. 3. Mobilização de reservas. 4. *Vigna unguiculata* L. Walp. I. Título.

CDD 630

---

LETÍCIA KENIA BESSA DE OLIVEIRA

TOLERÂNCIA DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI AO DÉFICIT HÍDRICO NA FASE  
GERMINATIVA: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E CITOQUÍMICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Fitotecnia - Ecofisiologia e produção de culturas.

Aprovada em: 28/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Alexandre Bosco de Oliveira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Izabel Gallão  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aiala Vieira Amorim  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

**A Deus.**

Aos meus pais, **Osana Bessa e Ernandes Oliveira**, à minha irmã, **Brena Shellem**, e ao meu companheiro **Bruno Alves**.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, pela saúde, pela persistência e por sempre estar ao meu lado nos momentos de angústia e também nos momentos de conquistas. Agradeço a Ele por estar me permitido concluir mais um ciclo de minha vida acadêmica com garra, dedicação, comprometimento e perseverança.

Aos meus pais, Ernandes Oliveira e Osana Bessa, por todos os ensinamentos, por minha educação, por toda força repassada, por todo o apoio e pelo esforço que sempre fizeram para me ajudar, de modo a reduzir meu cansaço diário. À minha irmã, Brena Shellem, pela grande amizade, companheirismo, força e pelos conselhos que fizeram de mim uma pessoa melhor e mais confiante. Ao meu companheiro, Bruno Alves, por ter me incentivado desde o início e por toda paciência, apoio e compreensão nos dias de altos níveis de estresse. À toda minha família e amigos pela torcida e pelo apoio nesses anos de caminhada.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo o apoio e disponibilização do espaço para realização da pesquisa. Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, representado por seus professores, pelo empenho em minha formação acadêmica e profissional. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão e financiamento da bolsa de pesquisa do mestrado.

Agradeço às professoras participantes da banca examinadora, Maria Izabel Gallão e Aiala Vieira Amorim, pela disponibilidade de tempo para a realização das devidas correções, colaborações e por terem dividido comigo este momento tão importante e esperado. De forma mais enfática, agradeço à professora Izabel, por toda dedicação e ajuda nas atividades desenvolvidas no Laboratório de Biologia Celular Vegetal; ao professor Sebastião pela disponibilidade e auxílio nos experimentos desenvolvidos no Laboratório de Análise de Sementes; ao professor Enéas Gomes Filho, por toda ajuda nas análises bioquímicas dos meus experimentos; à professora Aiala Vieira Amorim, por toda a amizade, fidelidade, pelas palavras de força e fé, e por todos os ensinamentos e colaborações para com o meu trabalho.

Agradeço imensamente e de forma muito carinhosa ao meu orientador Alexandre Bosco de Oliveira, pela excelente receptividade, respeito, paciência e consideração para comigo, por todos os ensinamentos e oportunidades de crescimento profissional e por toda a confiança em mim depositada.

Ao meu amigo Rafael Santiago, pela amizade sincera, por me aconselhar nos momentos de tristeza e desânimo, por me dar forças para seguir em frente. Agradeço à Lílian, minha companheira de trabalho e de laboratório, por toda a paciência e dedicação em me ensinar e ajudar nas análises, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis. Agradeço também à Liliane, Charles, Johny, Linco e a todos os demais colegas do curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, que participaram da minha formação acadêmica, seja como colegas de disciplinas ou auxílio em alguma atividade experimental.

Agradeço ainda a colaboração dos bolsistas de iniciação científica Rennan e Edilaine e a todos os demais colegas pertencentes aos laboratórios de Análise de Sementes, Biologia Celular Vegetal e Fisiologia Vegetal, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização dessa etapa tão importante em minha vida.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. (José de Alencar).

## RESUMO

Diante do grave problema da seca na região Nordeste do Brasil, os estudos sobre fisiologia, citoquímica e bioquímica em diferentes cultivares surgem como uma abordagem promissora que pode fornecer informações relevantes para a identificação dos processos responsáveis pela tolerância de cultivares ao estresse hídrico. Nesse sentido, objetivou-se com a presente pesquisa obter informações básicas que auxiliem na compreensão dos mecanismos fisiológicos, citoquímicos e bioquímicos responsáveis pelo atraso e/ou inibição da germinação e da mobilização de reservas em sementes de feijão-caupi sob condições de déficit hídrico. O experimento foi conduzido em laboratórios da Universidade Federal do Ceará, situada em Fortaleza, Ceará, e foi dividido em cinco seções. Na primeira delas, foram avaliados os efeitos do déficit hídrico (0, -0,1, -0,2, -0,4MPa) na germinação e no vigor de sementes de 14 cultivares de feijão-caupi e, a partir disso, foram selecionadas duas cultivares com tolerância diferencial ao déficit hídrico e a concentração osmótica que mais afetou as variáveis analisadas. Na segunda seção, caracterizou-se a curva de embebição das duas cultivares selecionadas tanto em água destilada (0MPa) quanto em solução de PEG 6000 na concentração selecionada (-0,2MPa) e, a partir dos resultados, determinou-se os tempos de embebição em que as demais análises foram realizadas (0, 12, 24, 48 e 72 horas). Na terceira seção, foram realizadas análises citoquímicas nos cotilédones e nos eixos embrionários de acordo com os tempos de embebição. Na quarta seção, a fim de avaliar a mobilização de reservas e o sistema antioxidativo de defesa das células cotiledonares e dos eixos embrionários das sementes, utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições, no esquema de parcelas subdivididas, em que as parcelas foram definidas pelas 2 cultivares, as subparcelas pelos 2 níveis de potencial osmótico (0 e -0,2MPa) e a subsubparcelas pelos 5 tempos de embebição. As cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú foram classificadas, respectivamente, como sensível e tolerante ao déficit hídrico, tendo ambas seguido um padrão trifásico de embebição tanto no tratamento controle quanto na solução com -0,2MPa, havendo nesta última, retardo no processo de absorção de água. A análise citoquímica dos embriões de ambas as cultivares revelou células com formatos irregulares, paredes celulares delgadas e presença de núcleos, detectando também a presença de amido nos cotilédones e de corpos proteicos tanto nos cotilédones quanto nos eixos embrionários. O déficit hídrico promoveu retardo na mobilização de carboidratos solúveis e proteínas dos cotilédones para o embrião, proporcionou maior acúmulo de N-aminossolúveis e de prolina, tanto nos cotilédones quanto nos eixos embrionários, e provocou aumentos consideráveis na atividade das enzimas antioxidantes nos cotilédones, principalmente da

peroxidase do ascorbato (APX). A cultivar BRS-Pajeú apresentou maiores teores de solutos compatíveis nos eixos embrionários, bem como a que exibiu maiores atividades da catalase e da APX. Com base nestes resultados, pode-se sugerir que as sementes de feijão-caupi da cultivar BRS-Pajeú têm um nível de tolerância ao déficit hídrico superior às demais cultivares avaliadas, apresentando uma maior probabilidade de resistir a um ambiente com baixa disponibilidade hídrica.

**Palavras-Chave:** Estresse abiótico. Fisiologia e anatomia de sementes. Mobilização de reservas. *Vigna unguiculata* L. Walp.

## ABSTRACT

Northeast of Brazil is a semiarid region where there is a serious problem of drought. Thus, studies on physiology, cytochemistry and biochemistry of different cultivars may be a promising approach to identify the processes responsible for water stress tolerance. This research aimed to enlighten the physiological, cytochemical and biochemical mechanisms responsible for the delay or inhibition of germination and reserves mobilization in cowpea seeds under water deficit conditions. In the first section of this research, we evaluated the effects of water deficit (0, -0.1, -0.2, -0.4 MPa) on the germination and vigor of seeds of 14 cowpea cultivars. Furthermore, we selected two cultivars with differential tolerance to water deficit and the osmotic concentration that most affected the analyzed variables. In the second section, the imbibition curve of the two selected cultivars was characterized both with distilled water (0 MPa) and with PEG 6000 solution at the selected concentration (-0.2MPa). From the results we determined the time of imbibition in which the following experiments should be evaluated (0, 12, 24, 48 and 72 hours). In the third section, cytochemical analyzes were performed on cotyledons and embryonic axes according to the imbibition times. In the fourth section, we assessed the mobilization of reserves and the antioxidative defense system of cotyledon cells and embryonic axis of cowpea seeds. To achieve this, we set up a completely randomized experimental design with four replications, in the scheme of subdivided plots, in which the plots were defined by the 2 cultivars, the subplots by the 2 levels of osmotic potential (0 and -0.2MPa) and the sub-subplots by the 5 soak times. The cultivars BRS-Milênio and BRS-Pajeú were classified, respectively, as sensitive and tolerant to water deficit, both having followed a three-phase pattern of imbibition in the control treatment and in the solution with -0.2MPa, with the latter having a delay in the process water absorption. The cytochemical analysis of the embryos of both cultivars revealed cells with irregular shapes, thin cell walls and the presence of nuclei, also detecting the presence of starch in the cotyledons and protein bodies both in the cotyledons and in the embryonic axes. The water deficit delayed the mobilization of soluble carbohydrates and proteins from cotyledons to the embryo, provided a greater accumulation of N-aminosoluble and proline, both in cotyledons and embryonic axes, and caused considerable increases in the activity of antioxidant enzymes in cotyledons, mainly of ascorbate peroxidase (APX). The cultivar BRS-Pajeú showed higher levels of compatible solutes in the embryonic axes, as well as the one that showed greater activities of catalase and APX. Based on these results, it can be suggested that the cowpea seeds of the BRS-Pajeú cultivar have a higher water

deficit tolerance level than the other cultivars, presenting a greater probability of resisting an environment with low water availability.

**Keywords:** Abiotic stress. Physiology and anatomy seeds. Reserve mobilization. *Vigna unguiculata* L. Walp.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Curva de embebição de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) BRS-Milênio e BRS-Pajeú em água destilada (A) e em solução de PEG 6000 no nível de -0,2MPa (B). Fortaleza – CE, 2019..... 50
- Figura 2 – Seções transversais de cotilédones e de eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio (A - F) e BRS-Pajeú (G - L) coradas com AT 0,025% pH 4,0. Sementes quiescentes (A, D, G, J) e com 72 horas da embebição em condição controle (B, E, H, K) e de estresse hídrico (C, F, I, L). Parede celular..... 54
- Figura 3 – Seções transversais de cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio (A, B, C) e BRS-Pajeú (D, E, F) coradas com Xylidine Ponceau (XP) 0,1% pH 2,5. Sementes quiescentes (A, D) e com 72 horas da embebição em condição controle (B, E) e de estresse hídrico (C, F). Corpos proteicos..... 56
- Figura 4 – Seções transversais de eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio (A - F) e BRS-Pajeú (G - L) coradas com Xylidine Ponceau (XP) 0,1% pH 2,5. Sementes quiescentes (A, D; G, J), com 24 horas da embebição em condição controle (B; H) e de estresse hídrico (E; K), com 72 horas da embebição em condição controle (C; I) e de estresse hídrico (F; L). Corpos proteicos..... 58
- Figura 5 – Seções transversais de cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio (A, B, C) e BRS-Pajeú (D, E, F) coradas com Periodic Acid-Schiff (PAS). Sementes quiescentes (A, D) e com 72 horas da embebição em condição controle (B, E) e de estresse hídrico (C, F). Grânulos de amido..... 60
- Figura 6 – Seções transversais de eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio (A, B, C) e BRS-Pajeú (D, E, F) coradas com Periodic Acid-Schiff (PAS). Sementes quiescentes (A, D) e com 72 horas da embebição em condição controle (B, E) e de estresse hídrico (C, F). Grânulos de amido..... 61
- Figura 7 – Seções transversais de cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio (A, B, C) e BRS-Pajeú (D, E, F) submetidas à

	microscopia sob luz polarizada. Sementes quiescentes (A, D) e com 72 horas da embebição em condição controle (B, E) e de estresse hídrico (C, F).....	62
Figura 8 –	Teores de carboidratos solúveis nos cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.....	65
Figura 9 –	Teores de carboidratos solúveis nos eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.....	67
Figura 10 –	Teores de proteínas solúveis nos cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.....	69
Figura 11 –	Teores de proteínas solúveis nos eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.....	71
Figura 12 –	Teores de N-aminossolúveis nos cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em condição controle (0MPa) e em solução de PEG 6000 (-0,2MPa). Fortaleza – CE, 2019.....	72
Figura 13 –	Teores de N-aminossolúveis nos eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE:	

	BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.....	73
Figura 14 –	Teores de prolina nos cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.....	75
Figura 15 –	Teores de prolina nos eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.....	77
Figura 16 –	Atividade da catalase (CAT) nos cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019....	80
Figura 17 –	Atividade da catalase (CAT) nos eixos embrionários de sementes de feijão-caupi comparando entre si as duas cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú (A) e os dois potenciais osmóticos (B) em função dos tempos de embebição. Fortaleza – CE, 2019.....	82
Figura 18 –	Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) nos cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.....	84
Figura 19 –	Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) nos eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação de cultivares quanto à tolerância ao déficit hídrico, baseando-se na redução das variáveis de germinação e vigor avaliadas.....	50
Tabela 2 –	Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de emergência (IVG) e tempo médio de germinação (TMG) de quatorze cultivares de feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L.) submetidas a quatro níveis de potencial osmótico simulados através de PEG 6000. Fortaleza – Ceará, 2019.....	40
Tabela 3 –	Médias das variáveis porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de emergência (IVG) e tempo médio de germinação (TMG) de quatorze cultivares de feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L.) submetidas a quatro níveis de potencial osmótico simulados através de PEG 6000. Fortaleza – Ceará, 2019.....	41
Tabela 4 –	Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de quatorze cultivares de feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L.) submetidas a quatro níveis de potencial osmótico simulados através de PEG 6000. Fortaleza – Ceará, 2019.....	44
Tabela 5 –	Médias das variáveis comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de quatorze cultivares de feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L.) submetidas a quatro níveis de potencial osmótico simulados através de PEG 6000. Fortaleza – Ceará, 2019.....	45
Tabela 6 –	Redução, em percentual, das variáveis germinação (%G), índice de velocidade de emergência (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de quatorze cultivares de feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L.) submetidas ao nível de -0,2MPa de PEG 6000 e sua classificação quanto à tolerância ao déficit hídrico. Fortaleza – Ceará, 2019.....	49
Tabela 7 –	Resumo da análise de variância para os teores de carboidratos solúveis em cotilédones (CS <sub>C</sub> ) e eixos embrionários (CS <sub>EE</sub> ), proteínas solúveis em	

cotilédones (PS<sub>C</sub>) e eixos embrionários (PS<sub>EE</sub>), N-aminossolúveis em cotilédones (N-AMINO<sub>C</sub>) e eixos embrionários (N-AMINO<sub>EE</sub>) e prolina livre em cotilédones (PL<sub>C</sub>) e eixos embrionários (PL<sub>EE</sub>) de sementes de feijão-caupi (cvs. Milênio e Pajeú) submetidas a condições controle e de estresse hídrico. Fortaleza – Ceará, 2019..... 64

Tabela 8 – Resumo da análise de variância para a atividade da catalase em cotilédones (CAT<sub>C</sub>) e eixos embrionários (CAT<sub>EE</sub>) e da peroxidase do ascorbato em cotilédones (APX<sub>C</sub>) e eixos embrionários (APX<sub>EE</sub>) de sementes de feijão-caupi (cvs. Milênio e Pajeú) submetidas a condições controle e de estresse hídrico. Fortaleza – Ceará, 2019..... 79

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Características gerais da germinação de sementes.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.1</b>	<i>O padrão trifásico germinativo.....</i>	<i>21</i>
<b>4.2</b>	<b>Germinação e desenvolvimento de plântulas sob estresse hídrico.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.1</b>	<i>Estresse oxidativo consequente do déficit hídrico.....</i>	<i>23</i>
<b>4.2.2</b>	<i>Sistema antioxidativo de defesa.....</i>	<i>24</i>
<b>4.2.3</b>	<i>Ajustamento osmótico decorrente do déficit hídrico.....</i>	<i>25</i>
<b>4.2.4</b>	<i>Mobilização de reservas durante a germinação e o desenvolvimento de plântulas.....</i>	<i>26</i>
<b>4.3</b>	<b>Feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.).....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.1</b>	<i>Aspectos gerais do feijão-caupi.....</i>	<i>77</i>
<b>4.3.2</b>	<i>Estresse hídrico e o feijão-caupi.....</i>	<i>28</i>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Experimento 1: Seleção de cultivares de feijão-caupi e definição da concentração de PEG 6000.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1.1</b>	<i>Local do experimento e material vegetal utilizado.....</i>	<i>30</i>
<b>5.1.2</b>	<i>Delineamento experimental e tratamentos.....</i>	<i>31</i>
<b>5.1.3</b>	<i>Teste de germinação.....</i>	<i>31</i>
<b>5.1.4</b>	<i>Testes de vigor.....</i>	<i>32</i>
<b>5.1.5</b>	<i>Tolerância ao déficit hídrico.....</i>	<i>32</i>
<b>5.1.6</b>	<i>Análise estatística.....</i>	<i>33</i>
<b>5.2</b>	<b>Experimento 2: Padrão trifásico de embebição de sementes de feijão-caupi em condições ideais de germinação e sob déficit hídrico.....</b>	<b>33</b>
<b>5.3</b>	<b>Experimento 3: Estudos citoquímicos em sementes de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico durante a germinação.....</b>	<b>34</b>
<b>5.3.1</b>	<i>Análises citoquímicas.....</i>	<i>34</i>

5.4	<b>Experimento 4: Avaliação da mobilização de reservas e dos mecanismos antioxidantes em sementes de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico durante a germinação.....</b>	36
5.4.1	<i>Carboidratos solúveis.....</i>	36
5.4.2	<i>Proteínas solúveis.....</i>	37
5.4.3	<i>N-aminossolúveis.....</i>	37
5.4.4	<i>Prolina livre.....</i>	38
5.4.5	<i>Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) .....</i>	38
5.4.6	<i>Atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX, EC 1.11.11.1) .....</i>	38
5.4.7	<i>Delineamento experimental e análise estatística.....</i>	39
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	40
6.1	<b>Experimento 1: Seleção de cultivares de feijão-caupi e definição da concentração de PEG 6000.....</b>	40
6.1.1	<i>Teste de germinação.....</i>	40
6.1.2	<i>Testes de vigor.....</i>	43
6.2	<b>Experimento 2: Padrão trifásico de embebição de sementes de feijão-caupi em condições ideais de germinação e sob déficit hídrico.....</b>	50
6.3	<b>Experimento 3: Estudos citoquímicos em sementes de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico durante a germinação.....</b>	53
6.4	<b>Experimento 4: Avaliação da mobilização de reservas e dos mecanismos antioxidantes em sementes de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico durante a germinação.....</b>	63
6.4.1	<i>Carboidratos solúveis.....</i>	65
6.4.2	<i>Proteínas solúveis.....</i>	69
6.4.3	<i>N-aminossolúveis.....</i>	72
6.4.4	<i>Prolina livre.....</i>	75
6.4.5	<i>Sistema antioxidativo de defesa.....</i>	78
6.4.5.1	<i>Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) .....</i>	79
6.4.5.2	<i>Atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX, EC 1.11.11.1) .....</i>	83
7	<b>CONCLUSÕES.....</b>	89
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	90

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), também conhecido como feijão-de-corda, feijão-macassar e feijão-fradinho (grãos brancos), é uma das leguminosas mais cultivadas e consumidas no mundo, sendo uma das principais fontes de proteína vegetal para as populações, especialmente para àquelas com menor poder aquisitivo (SILVA et al., 2010; VIJAYKUMAR et al., 2010). No Brasil, sobretudo, é cultivado no Norte e no Nordeste, apresentando funções socioeconômicas importantes para a agricultura familiar dessas regiões (VALE et al., 2017), tendo em vista que se configura como fonte de emprego e renda para inúmeras famílias (SILVA; NEVES, 2011).

Embora o feijão-caupi seja bem adaptado a diversas condições edafoclimáticas e seja considerado tolerante a situações de baixa disponibilidade de água no solo, alguns estudos vêm demonstrando que o déficit hídrico é um dos estresses abióticos que mais afeta essa cultura, podendo ocasionar, dentre outras coisas, alterações nos processos de germinação de sementes e de desenvolvimento inicial, que são as fases consideradas mais vulneráveis à escassez de água (NASCIMENTO et al., 2011; FREITAS et al., 2017). Nesse sentido, as respostas das plantas de feijão-caupi a esse tipo de estresse podem variar na dependência do grau do estresse aplicado (tempo de exposição, intensidade e frequência), da cultivar submetida ao estresse bem como de seus estádios de desenvolvimento (MUNNS et al., 2002; COELHO et al., 2013).

O déficit hídrico influencia praticamente todos os aspectos relacionados ao desenvolvimento vegetal, o que acaba culminando na redução da produtividade das culturas (DAMATTA, 2007; NASCIMENTO et al., 2011). Esse tipo de estresse tende a comprometer o estabelecimento inicial do estande de plântulas, pois a limitação de água acaba reduzindo a velocidade da germinação, podendo até mesmo impedi-la (MOŽDŽENÍ et al., 2015). Isso ocorre porque a água é o fator iniciante da germinação e está envolvida direta e indiretamente em todas as demais etapas do metabolismo germinativo (OLIVEIRA; GOMES FILHO, 2010).

Segundo Marcos Filho (2015), a água é fundamental para o metabolismo celular durante a germinação pelo menos por três motivos: para a atividade enzimática, para a solubilização e transporte de reservas e como reagente em si, principalmente na digestão hidrolítica das substâncias de reservas armazenadas nas sementes. Dessa forma, a escassez de água logo após a sementeira pode comprometer todo o processo germinativo.

Fatores como a composição química e as características anatômicas das células dos tecidos da semente também podem ser determinantes no processo de germinação, uma vez que podem influenciar tanto em sua capacidade de absorção de água como também na perda de

água da semente para ambientes mais secos, contribuindo ou não para a tolerância ao déficit hídrico (CASTILLO; GUENNI, 2001; MA et al., 2004; MARCOS FILHO, 2015).

Condições de escassez hídrica podem provocar vários danos às estruturas vegetais, pois pode favorecer, por exemplo, o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) no interior das células. Estas, uma vez formadas, podem reagir com compostos orgânicos causando uma série de danos às células, como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e conseqüentemente alterações no perfil proteico (YAMAUCHI et al., 2008; GILL; TUTEJA, 2010; MONTEIRO et al., 2011; GOMES; GARCIA, 2013). Entretanto, as plantas tolerantes à seca podem apresentar mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos, que podem neutralizar os efeitos negativos do excesso das EROs, aumentando a capacidade das células em reter a água sem afetar o metabolismo normal da planta (REDDY et al., 2015).

Estudos detalhados com foco nas características celulares de sementes de feijão-caupi, assim como o estudo da mobilização de reservas, produção de EROs e mecanismos antioxidantes durante sua germinação sob estresse hídrico, são escassos. Ademais, o progresso nesta área tem sido lento e um dos motivos é justamente a falta de conhecimentos sobre os mecanismos anatômicos, fisiológicos e bioquímicos associados com a tolerância ao estresse hídrico, em especial na fase de germinação de sementes e desenvolvimento inicial das plântulas, que são estádios sensíveis para grande parte das culturas de importância econômica, como no caso do feijão-caupi.

Nesse sentido, a caracterização das células dos tecidos das sementes, juntamente com a identificação e o entendimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem durante a germinação são de fundamental importância para compreender como se dá a tolerância ao déficit hídrico nessa espécie. Tais estudos podem ser cruciais para uma futura indicação de plantio de cultivares adequadas para o semiárido nordestino em diferentes condições edafoclimáticas.

## **2 HIPÓTESE**

As cultivares de feijão-caupi apresentam diferentes alterações fisiológicas, bioquímicas e citoquímicas durante a germinação de sementes como consequência dos diferentes níveis de tolerância ao déficit hídrico de cada material genético.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Identificar as alterações fisiológicas, bioquímicas e citoquímicas em cultivares de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico durante a fase germinativa.

### **3.2 Específicos**

- Determinar o nível de tolerância de diferentes cultivares de feijão-caupi ao estresse hídrico durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas, e selecionar o nível de potencial osmótico mais prejudicial para a cultura nesses estádios;
- Caracterizar o padrão trifásico de embebição da semente em condições ideais de germinação e sob condições de déficit hídrico;
- Identificar alterações bioquímicas e citoquímicas nas células das sementes (cotilédones e eixos embrionários) de feijão-caupi decorrentes da exposição ao estresse hídrico;
- Investigar a mobilização de reservas e os mecanismos de defesa antioxidativa em sementes de feijão-caupi (cotilédones e eixos embrionários) germinando em condições ideais e sob condições de déficit hídrico;

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Características gerais da germinação de sementes

De acordo com Jann e Amen (1980), a germinação é, morfológicamente, a transformação do embrião em plântula, enquanto que, sob o ponto de vista fisiológico, a germinação consiste na retomada do metabolismo e do crescimento que estavam reduzidos ou suspensos após a maturidade, e o reinício da transcrição do genoma. Já bioquimicamente, a germinação refere-se à diferenciação sequencial dos caminhos oxidativos e de síntese e à retomada de uma sequência de processos bioquímicos característicos do crescimento vegetativo e do desenvolvimento.

No processo de germinação, a água apresenta várias funções importantes. Segundo Marcos Filho (2015), ela é imprescindível para o reinício de atividades metabólicas da semente, contribuindo para amolecer o tegumento, intensificar a velocidade respiratória, favorecer as trocas gasosas, induzir a síntese e a atividade de enzimas e hormônios e contribuir significativamente para a regularidade da digestão, translocação e assimilação das reservas e crescimento subsequente. A entrada de água provoca o aumento do volume do embrião e dos tecidos de reserva, resultando na ruptura do tegumento e facilitando a protrusão da raiz primária.

A deficiência hídrica geralmente é considerada o fator limitante da germinação de sementes não-dormentes, afetando a percentagem, a velocidade e a uniformidade de germinação (MARCOS FILHO, 2015). Desse modo, a escassez de água logo após a semeadura pode comprometer todo o processo de germinação.

#### 4.1.1 O padrão trifásico germinativo

O processo de germinação apresenta três fases (BEWLEY; BLACK, 1994). A primeira fase, também denominada embebição, ocorre rápida entrada de água na semente, em função da grande diferença de potencial entre as sementes e o substrato, sendo um evento meramente físico. Dessa forma, a semente muda de um estado praticamente anidro para outro completamente hidratado (MARCOS FILHO, 2015). Nessa fase, a reidratação dos tecidos da semente promove o reparo de estruturas que podem ter sido danificadas durante a fase final de maturação e/ou sua secagem, como por exemplo, membranas e ácidos nucleicos (NONOGAKI et al., 2010).

Ainda na fase I ocorre o rápido aumento na captação de oxigênio, gerando espécies

reativas de oxigênio (EROs), que podem causar dano estrutural e funcional às células (TOMMASI et al., 2001; PRODANOVIĆ et al., 2007). Porém, as espécies reativas de oxigênio em concentrações adequadas, também funcionam como sinalizadoras para a germinação. Em sementes de soja, por exemplo, as EROs produzidas no eixo embrionário logo após a embebição, foram as responsáveis pela indução e produção de etileno, promovendo o alongamento das células da radícula (ISHIBASHI et al. 2013).

A fase II da germinação é caracterizada pela estabilização na absorção de água, tendendo para o equilíbrio entre os potenciais, e redução drástica na intensidade de respiração. Nessa fase ocorrem processos bioquímicos preparatórios à emergência da raiz primária, como reorganização celular, síntese de novas proteínas, mobilização de reservas e desintoxicação das espécies reativas de oxigênio que foram produzidas em excesso na fase I (BEWLEY et al., 2013; WANG et al., 2015).

Já na fase III, ocorre uma redução no potencial hídrico das sementes, resultando em rápida absorção de água do meio, mobilização das principais substâncias de reserva (amido, proteínas e lipídios), tornando visível a retomada do crescimento do embrião, identificado pela protrusão radicular. Segundo Teulat-Merah et al. (2011) essa fase para sementes de feijão ocorre a partir de 30h após a absorção de água.

#### **4.2 Germinação e desenvolvimento de plântulas sob estresse hídrico**

São muitos os fatores que afetam a germinação, o desenvolvimento e a sobrevivência das plântulas, dentre eles, encontram-se: a quantidade e a qualidade das reservas energéticas; a morfologia funcional dos cotilédones; as interações com outras espécies; e, por fim, os fatores abióticos (excesso ou déficit hídrico, salinidade, etc.) (MELO et al., 2004).

No caso do déficit hídrico, a inibição ou o atraso da germinação ocorre por causa da restrição à absorção de água, o que acaba retardando a embebição das sementes e consequentemente a protrusão da radícula (MARCOS FILHO, 2015). Os efeitos negativos do estresse hídrico sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas já foram descritos em diversas espécies como a soja (SOARES et al., 2015), o girassol (ARAÚJO, 2013), o milho-pipoca (VAZ-DE-MELO et al., 2012) e o feijão (CUSTÓDIO et al., 2009; COELHO et al., 2010).

Portanto, considerando que as fases de germinação e desenvolvimento inicial da plântula são etapas fundamentais na produção vegetal, o estudo dessas etapas em sementes e

plântulas sob condições de déficit hídrico poderão contribuir para reduzir os efeitos deletérios desse estresse abiótico sobre o estabelecimento do estande de plantas, permitindo a obtenção de maiores produtividades nessas condições de cultivo.

#### ***4.2.1 Estresse oxidativo consequente do déficit hídrico***

Condições de estresses abióticos, como o déficit hídrico, podem aumentar a concentração das espécies reativas de oxigênio (EROs) no interior das células das plantas (GILL; TUTEJA, 2010; OLIVEIRA et al., 2012; GOMES; GARCIA, 2013). As espécies reativas de oxigênio referem-se ao átomo ou molécula que possui um ou mais elétrons não pareados na sua órbita externa (radical livre), o que lhe confere alta reatividade (MITTLER, 2002; CHOUDHURY et al., 2017). Como a maioria das moléculas permanece com os elétrons pareados em meio biológico e não se encontram na forma de radicais, utiliza-se o termo “espécies reativas do oxigênio” (MØLLER et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que uma das consequências do déficit hídrico é o desequilíbrio do estado redox intracelular, ocorrendo a produção excessiva de EROs, tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os radicais livres superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ). Em condições de estresse, essas moléculas reagem com os ácidos graxos insaturados das membranas celulares, promovendo a peroxidação lipídica (MONTEIRO et al., 2011). A peroxidação lipídica por sua vez, diminui a fluidez das membranas interferindo nas funções das proteínas levando à sua oxidação, alterando assim o perfil proteico (YAMAUCHI et al., 2008; YE et al., 2011).

As espécies reativas de oxigênio têm um duplo papel na fisiologia de sementes. Em concentrações adequadas, essas substâncias irão funcionar como sinalizadores para a germinação, mas sua ausência ou seus níveis elevados podem comprometer a germinação, afetando a mobilização de reservas e o percentual de germinação (VERMA et al., 2015).

Alta concentração de espécies reativas de oxigênio e baixa concentração de antioxidantes e/ou baixa atividade do sistema enzimático antioxidante podem favorecer a peroxidação lipídica e consequentemente alterações celulares e no perfil proteico durante a germinação de genótipos sensíveis a estresses abióticos (MITTLER, 2002; CHOUDHURY et al., 2017). Segundo Wang et al. (2015), na germinação, a desintoxicação das EROs ocorre durante a fase II.

#### **4.2.2 Sistema antioxidativo de defesa**

As plantas possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que protegem ou minimizam os efeitos deletérios causados pelo aumento na concentração de EROs. Em resposta ao estresse oxidativo secundário, as plantas podem: sintetizar antioxidantes não enzimáticos, tais como o ascorbato hidrossolúvel (vitamina C), tripeptídeo glutationa reduzida,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e carotenoides; e/ou expressar genes que codificam para enzimas eliminadoras das EROs, como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a peroxidase do ascorbato (APX) e a peroxidase do guaiacol (GPX) (MITTLER, 2002; CHOUDHURY et al., 2017; TAIZ et al., 2017).

A SOD é a primeira enzima envolvida no sistema de defesa das plantas quando a célula detecta um sinal de estresse, sendo ela responsável por desmutar o radical  $O_2^{\bullet}$  e formar  $H_2O_2$  (APEL; HIRT, 2004). Quando o nível de  $H_2O_2$  aumenta, começa a ação de enzimas secundárias de neutralização, tais como, CAT e as peroxidases, APX e GPX, que são responsáveis pela conversão do  $H_2O_2$  em  $H_2O + O_2$  e de em  $H_2O$ , respectivamente (APEL; HIRT, 2004; PEREIRA et al., 2012).

O sistema antioxidativo não enzimático é constituído por antioxidantes biológicos, ou seja, compostos orgânicos pequenos ou peptídeos pequenos que podem aceitar elétrons de EROs, como o superóxido ou o peróxido de hidrogênio, e neutralizá-los. No entanto, algumas EROs não conseguem reagir de forma espontânea com antioxidantes celulares, são instáveis e apresentam decaimento antes de causar dano celular. Deste modo, para inativá-las, as células precisam sintetizar ou ativar enzimas antioxidativas, as quais são responsáveis por aumentar drasticamente a eficiência do processo de detoxificação (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2013; TAIZ et al., 2017).

Vários estudos indicam que a redução nos danos oxidativos e o aumento da tolerância ao estresse hídrico estão correlacionados à existência de sistemas antioxidantes (constitutivos e induzidos) mais eficientes (OLIVEIRA et al., 2012). Dessa forma, a eficiência dos mecanismos antioxidantes de defesa (enzimas e compostos orgânicos antioxidantes) tem sido considerada uma característica importante na seleção de genótipos mais tolerantes à seca. Estas observações demonstram a importância de se estabelecer o papel do sistema antioxidativo de defesa (enzimático e não enzimático) em plantas contra o estresse oxidativo induzido pela deficiência hídrica.

### ***4.2.3 Ajustamento osmótico decorrente do déficit hídrico***

O ajuste osmótico é uma das principais respostas das plantas ao estresse hídrico e está correlacionado ao grau de tolerância. Esse mecanismo configura-se como sendo a capacidade das células vegetais de biossintetizar e acumular solutos e usá-los para baixar o potencial hídrico durante períodos de estresse osmótico. Esses solutos são denominados solutos compatíveis ou osmólitos compatíveis e podem ser acumulados tanto no vacúolo quanto no citosol das células sem ocasionar efeitos prejudiciais ao metabolismo (CARLIN; SANTOS, 2009; TAIZ et al., 2017).

Os solutos compatíveis possuem função osmoprotetora e são utilizados com o objetivo de manter o equilíbrio hídrico nas células e preservar a integridade de proteínas, enzimas e membranas para a continuidade das atividades vitais (MARIJUAN; BOSH, 2013). Os osmólitos compatíveis mais comuns incluem aminoácidos como a prolina, açúcares-alcoóis como o sorbitol, carboidratos e compostos quaternários de amônio como a glicina betaína (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2013; TAIZ et al., 2017).

Considerado osmólito-chave para o ajuste osmótico de plantas em condições de estresse hídrico (TROVATO et al., 2008; ASHRAF et al., 2011), a prolina atua, principalmente, aumentando a estabilidade das células em reter água sem afetar o metabolismo normal das plantas, podendo agir também como estabilizador proteico e inibidor da peroxidação lipídica, protegendo as membranas contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (GILL; TUTEJA, 2010).

A prolina se acumula em uma variedade de espécies de plantas em resposta a estresses ambientais, tais como a seca. Esse acúmulo está correlacionado à tolerância ao estresse, sendo a concentração desse aminoácido geralmente encontrada em níveis mais elevados em plantas tolerantes do que em plantas sensíveis (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008). Acúmulos de prolina foram encontrados em plântulas de feijão guandu (MONTEIRO et al., 2014), alecrim-pimenta (ALVARENGA et al., 2011) e milho (MAIA et al., 2007) submetidas a déficit hídrico.

Diante de tais informações, é de extrema importância investigar essa característica de ajustamento osmótico usando prolina e carboidratos em plântulas de feijão-caupi para seleção de cultivares mais tolerantes à seca.

#### ***4.2.4 Mobilização de reservas durante a germinação e o desenvolvimento de plântulas***

A germinação e o estabelecimento da plântula consistem nas etapas de maior vulnerabilidade para as culturas em condições de campo (ARAÚJO, 2013). Nessas fases, as reservas nutritivas armazenadas durante a maturação da semente possuem papel essencial, pois serão utilizadas no decorrer do processo germinativo e, posteriormente, serão metabolizadas para o crescimento e desenvolvimento das plântulas. Todo esse processo ocorre através de um sistema sincronizado que envolve uma comunicação entre tecidos de reserva e embrião (LIRA, 2016).

Em sementes, os principais grupos de reservas nutritivas são os carboidratos, as proteínas e os lipídios. Tais reservas são utilizadas pelo embrião como fonte de energia para a manutenção dos processos metabólicos e também como substrato para compor estruturas de células e tecidos que constituirão as plântulas (BEWLEY et al., 2013). No entanto, a proporção dessa composição é determinada por fatores genéticos e pelas condições ambientais, podendo variar de acordo com a espécie, a cultivar, o habitat, etc. (BUCKERIDGE et al., 2004).

Segundo Buckeridge et al. (2000), carboidratos e lipídios atuam como fonte de energia e de carbono, e, por isso, são essenciais para a germinação, o crescimento e o desenvolvimento das plântulas. Os principais carboidratos encontrados em sementes são a sacarose, os oligossacarídeos da série rafínosica, o amido e os polissacarídeos de reserva de parede celular (BUCKERIDGE et al., 2004; CORTE et al., 2006). Todavia, o amido é o polissacarídeo de reserva mais encontrado em sementes, sendo a principal molécula armazenadora de carbono em algumas leguminosas (BLACK et al., 2006).

Já as proteínas, um dos compostos mais importantes do protoplasma das células, funcionam como fontes de enxofre e nitrogênio, os quais são fundamentais para a síntese de novas proteínas, ácidos nucleicos e compostos secundários necessários ao desenvolvimento das plântulas (BUCKERIDGE et al., 2000; LIRA, 2016). No que se refere às proteínas de reserva, quatro grandes grupos são encontrados em sementes: as albuminas, as globulinas, as prolaminas e as glutelinas; no entanto, as duas primeiras são mais comuns e abundantes em dicotiledôneas (BUCKERIDGE et al., 2004; ARAÚJO, 2013).

Pesquisas recentes têm utilizado técnicas de microscopia óptica e eletrônica para caracterizar a mobilização dos principais compostos de reserva encontrados nas sementes (REALE et al., 2012). Embora muitos trabalhos demonstrem os efeitos deletérios do déficit hídrico sobre a germinação e o estabelecimento de plântulas (CUSTÓDIO et al., 2009; COELHO et al., 2010), poucos investigam e caracterizam as alterações no padrão de

mobilização de reservas em feijão-caupi sob condições de déficit hídrico (ARAÚJO, 2013). Tendo em vista que os fatores ambientais e a utilização das reservas nutritivas são preponderantes para o desenvolvimento das plântulas, torna-se imprescindível investigar como o déficit hídrico afeta a mobilização das reservas nas sementes a fim de melhorar o estabelecimento do estande de plantas no campo.

### **4.3 Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.)**

#### ***4.3.1 Aspectos gerais do feijão-caupi***

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma planta herbácea, anual, dicotiledônea, pertencente à família Fabaceae. Conhecida como feijão-macassar ou feijão-de-corda, é uma fonte de renda alternativa, sendo considerada alimento básico da população da região Nordeste onde é considerada uma das principais fontes de proteína vegetal, especialmente para as populações da zona rural (BERTINI; TEÓFILO; DIAS, 2009; CALVET et al., 2013).

De acordo com Freire Filho (1988), a cultura apresenta origem africana, tendo sido introduzida no Brasil na segunda metade do século XVI pelos colonizadores portugueses no estado da Bahia. Vale ressaltar, ainda, que é considerada uma das mais importantes culturas leguminosas cultivadas em trópicos semiáridos; Ásia; sudeste da Europa; e América Central e do Sul, especificamente por sua capacidade produtiva em áreas onde outras culturas não se desenvolvem bem devido às altas temperaturas e chuvas irregulares (AKIBODE; MAREDIA, 2011; FREITAS et al., 2017).

Dentre os fatores climáticos que mais afetam o desenvolvimento e a produtividade do feijão-caupi destacam-se: a precipitação, a temperatura e a radiação solar. A quantidade de água requerida pela cultura varia de acordo com a fase fenológica. O consumo de água aumenta de um valor mínimo na germinação até um valor máximo na floração e na formação de vagens, decrescendo a partir do início da maturação (BASTOS et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2011), podendo variar de 300 a 450 mm/ciclo, bem distribuídos nos diferentes estádios de desenvolvimento, e esse consumo também é dependente da cultivar, do solo e das condições climáticas locais (NASCIMENTO, 2009). A baixa produtividade dessa leguminosa é resultante de um conjunto de vários fatores, no entanto, um dos mais expressivos e limitantes é a ocorrência de deficiência hídrica (MENDES et al., 2007).

A temperatura mais adequada para o desenvolvimento do feijão-caupi encontra-se

na faixa de 20°C a 30°C. Elevadas temperaturas durante a fase de florescimento podem ser prejudiciais à cultura, além de diminuir a nodulação nas raízes. Por outro lado, temperaturas abaixo de 20°C podem causar a paralisação do desenvolvimento das plantas (SANTOS et al., 2011). Por se tratar de uma planta C3, satura-se fotossinteticamente a intensidades de luz relativamente baixas, em torno de 10.000 e 40.000 lux (CARDOSO, 2000).

No que diz respeito à composição nutricional, dentre as leguminosas, caracteriza-se por apresentar uma excelente fonte de proteínas (23% a 25% em média) além de todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62% em média), vitaminas e minerais, além de grande quantidade de fibras dietéticas e baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2% em média) (ROCHA; SILVA; MENEZES JUNIOR, 2017).

No que tange os aspectos produtivos, na safra de 2017/2018, estimou-se, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2019), uma produção total de 789,8 mil toneladas do grão em uma área de 1.516.000 hectares. Destaca-se entre todas as regiões do Brasil, a região Nordeste, considerada a maior produtora com produção total estimada em 465,9 mil toneladas de feijão-caupi.

Dentre os estados nordestinos, constata-se ainda que o Ceará é o estado com maior produção da referida cultura, tendo obtido no citado ano agrícola, uma produção estimada em 115,7 mil toneladas em uma área de aproximadamente 400,2 mil hectares (CONAB, 2019). Confirma-se deste modo, a importância socioeconômica do feijão-caupi para o Nordeste brasileiro e em especial para o estado do Ceará, sendo necessário, por sua vez, maior incentivo à busca por tecnologias que aumentem sua produção.

#### ***4.3.2 Estresse hídrico e o feijão-caupi***

Dentre os estresses abióticos aos quais as plantas podem ser submetidas, o estresse hídrico é um dos mais relevantes no que se refere à perda de produtividade potencial das culturas. Esse tipo de estresse pode ser ocasionado tanto pelo excesso quanto pela falta de água no solo. No caso da escassez, o estresse hídrico é normalmente referido como déficit hídrico, ocorrendo por excessiva perda de água por transpiração ou por inadequada absorção de água ou, ainda, pela combinação de ambas (LOPES; LIMA, 2015). No Brasil, principalmente no Norte e no Nordeste, a situação mais comum é a de limitação hídrica, a qual pode causar efeitos drásticos no crescimento e no desenvolvimento das plantas, modificando sua anatomia, morfologia, bioquímica e fisiologia (TAIZ et al., 2017).

Assim como as demais culturas, o feijão-caupi tem seu desempenho bastante afetado pela baixa disponibilidade de água no solo, o que acaba ocasionando alterações no metabolismo, no transporte e na translocação de solutos pela planta, redução da turgescência celular e da abertura estomática, inibição da fotossíntese e consequente redução da produtividade (MARIANO et al., 2009; SILVA et al., 2010; TAIZ et al., 2017). Tais efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento de plântulas de feijão-caupi foram constatados recentemente por vários autores (NASCIMENTO et al., 2011; SILVA et al., 2013; SOUZA et al., 2015), assim como também foram verificadas as respostas fisiológicas desta cultura a situações de deficiência hídrica (SILVA et al., 2010; FERNANDES et al., 2015).

Na maioria dos casos, as respostas dos vegetais ao déficit hídrico incluem também alterações bioquímicas em nível celular. Como exemplo, pode-se citar a ativação de um sistema antioxidativo de defesa enzimático ou não-enzimático, cujo intuito é eliminar o excesso de espécies reativas de oxigênio; e o ajustamento osmótico, o qual tem por objetivo o acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos para manter um gradiente de potencial hídrico que permita a absorção de água pela célula (TAIZ et al., 2017). Contudo, as respostas das plantas podem diferir entre espécies, cultivares, tecidos analisados, duração e intensidade do estresse (CAMPOS et al., 2004).

O efeito do déficit também foi avaliado durante a fase germinativa do feijão-caupi. Ferreira et al. (2017) verificaram que a germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de feijão-caupi, cultivar BRS-Tumucumaque, foram afetados negativamente pelo estresse hídrico induzido por PEG-6000 (-0,2 MPa) e manitol (-0,8 MPa), com efeito mais pronunciado quando induzido por PEG-6000. De forma análoga, Silva et al. (2013) constataram atraso na germinação e menores valores de primeira contagem e índice de velocidade de emergência quando utilizaram as menores lâminas de irrigação (2 mm e 4 mm).

Diante do exposto, é de extrema importância a compreensão dos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e anatômicos envolvidos na tolerância ao estresse hídrico durante a germinação de sementes. Tais estudos podem ser cruciais para a indicação de plantio de cultivares adequadas para o semiárido nordestino em diferentes condições edafoclimáticas.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos seguintes laboratórios: Laboratório de Análises de Sementes (Departamento de Fitotecnia), Laboratório de Fisiologia Vegetal (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular), Laboratório de Biologia Celular Vegetal (Departamento de Biologia) e Central Analítica da Universidade Federal do Ceará.

Para este estudo foram utilizadas sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) das seguintes cultivares: BRS-Pujante, BRS-Guariba, BRS-Potengi, BR 17-Gurgueia, BRS-Tumucumaque, BRS-Pajeú, BRS-Rouxinol, BRS-Novaera, BRS-Xiquexique, BRS-Milênio, BRS-Acauã, Patativa, BR 3-Tracuateua e BRS-Aracê. Todas as sementes foram cedidas pelo Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de feijão-caupi da UFC.

### 5.1 EXPERIMENTO 1: Seleção de cultivares de feijão-caupi e definição da concentração de PEG 6000

Neste experimento, foram utilizadas as 14 cultivares cedidas pelo BAG, dentre as quais foram selecionadas duas cultivares com tolerância diferencial ao déficit hídrico (uma tolerante e uma sensível), por meio de testes de germinação e vigor sob condições de déficit hídrico. Para observar o quanto essas cultivares eram capazes de suportar esse estresse, as mesmas foram submetidas ao processo germinativo em que a água do substrato foi substituída por diferentes concentrações de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). Esse agente osmótico foi escolhido porque, além de simular condições de déficit hídrico, apresenta-se quimicamente inerte, atóxico para as sementes e não penetra no tegumento devido ao tamanho de suas moléculas (VILLELA et al., 1991).

#### 5.1.1 Local do experimento e material vegetal utilizado

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza-CE. Foram utilizadas sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Pujante, BRS-Guariba, BRS-Potengi, BR 17-Gurgueia, BRS-Tumucumaque, BRS-Pajeú, BRS-Rouxinol, BRS-Novaera, BRS-Xiquexique, BRS-Milênio, BRS-Acauã, Patativa, BR 3-Tracuateua e BRS-Aracê.

### ***5.1.2 Delineamento experimental e tratamentos***

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 14 x 4, sendo quatorze cultivares (BRS-Pujante, BRS-Guariba, BRS-Potengi, BR 17-Gurgueia, BRS-Tumucumaque, BRS-Pajeú, BRS-Rouxinol, BRS-Novaera, BRS-Xiquexique, BRS-Milênio, BRS-Acauã, Patativa, BR 3-Tracuateua e BRS-Aracê) e quatro níveis de potenciais osmóticos (0, -0,1, -0,2 e -0,4MPa), com quatro repetições, totalizando 56 tratamentos.

### ***5.1.3 Teste de germinação***

Inicialmente, foram selecionadas sementes uniformes e com tegumento intacto de cada uma das cultivares. Em seguida, as sementes foram desinfestadas em solução com hipoclorito de sódio a 1%, durante 1 minuto sob agitação constante, sendo logo em seguida lavadas com água corrente e depois com água destilada. Posteriormente, as sementes foram dispostas uniformemente entre três folhas de papel substrato mata borrão umedecidas com água destilada ou solução de PEG 6000 na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco (BRASIL, 2009), obedecendo os diferentes potenciais osmóticos estabelecidos anteriormente (0, -0,1, -0,2 e -0,4MPa).

Para cada tratamento, foram utilizadas 200 sementes divididas em quatro repetições de 50 sementes, sendo cada grupo distribuído entre três folhas de papel substrato mata borrão (Germitest®), usando duas folhas como base e uma para cobrir. Em seguida, as três folhas foram enroladas e os rolos provenientes foram colocados dentro de potes de polietileno cobertos com plástico transparente, sendo estes, mantidos em câmara de germinação do tipo BOD à uma temperatura constante de 25°C (BRASIL, 2009) e sob fotoperíodo de 12h de claro/12 h de escuro.

A contagem de sementes germinadas foi realizada diariamente durante nove dias considerando-se como critério de germinação a emissão da radícula com no mínimo 2,0 mm (ROSA et al., 2005). As variáveis germinativas avaliadas foram: porcentagem final de germinação (LABOURIAU, 1983), índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962), e tempo médio de germinação (LABOURIAU, 1983). Esses testes visam apontar se existem diferenças no desempenho germinativo das sementes das cultivares em função do estresse hídrico aplicado.

#### 5.1.4 Testes de vigor

Para avaliação do vigor foi conduzido um experimento nas mesmas condições e tratamentos mencionados no item 5.2.3, no entanto, as quatro repetições de cada tratamento apresentavam vinte sementes cada, conforme metodologia proposta por Nakagawa (1999). As avaliações foram realizadas aos nove dias após a semeadura, medindo-se os comprimentos de parte aérea (CPA) e raiz (CR) das plântulas normais de cada repetição, com auxílio de uma régua graduada em centímetros.

Posteriormente, as plântulas de cada repetição tiveram parte aérea e raiz seccionadas, acondicionadas, separadamente, em sacos de papel devidamente identificados e levadas à estufa com circulação de ar forçada a 65°C por 48 horas. Após este período, cada repetição teve sua massa pesada em balança de precisão 0,001g e assim foram obtidos os dados de massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) (NAKAGAWA, 1999). Os resultados médios serão expressos em gramas por plântula. Vale ressaltar que estes testes visam verificar se existem diferenças no desempenho inicial de plântulas em função do estresse hídrico aplicado.

#### 5.1.5 Tolerância ao déficit hídrico

A partir dos resultados dos testes de germinação e vigor, foram selecionadas uma cultivar tolerante e uma sensível ao déficit hídrico, bem como o nível de potencial osmótico que mais afetou essas cultivares. A concentração de PEG 6000 selecionada foi aquela que mais afetou significativamente a germinação e o vigor das sementes.

Para a escolha das cultivares sensível e tolerante ao déficit hídrico foram quantificadas as reduções nas variáveis porcentagem de germinação (% G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimentos de parte aérea (CPA) e raiz (CR), massas secas da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) das plântulas submetidas ao nível de potencial osmótico selecionado comparando-as com o tratamento controle (-0MPa), conforme a Equação (1), adaptada de Fageria (1985).

$$R (\%) = \frac{[(VRTC - VRTH)]}{VRTC} \times 100 \quad (1)$$

Em que: R (%) = Percentual de Redução; VRTC = Valor da redução no tratamento controle (0MPa); VRTH = Valor da redução no tratamento sob déficit hídrico.

Os resultados foram interpretados com o auxílio da Tabela 1, que dispõe da classificação de cultivares quanto à tolerância ao déficit hídrico, baseando-se na redução das variáveis de germinação e vigor avaliadas.

Tabela 1 – Classificação de cultivares quanto à tolerância ao déficit hídrico, baseando-se na redução das variáveis de germinação e vigor avaliadas.

Redução (%)	Classificação
0 - 20	Tolerante (T)
21 - 40	Moderadamente Tolerante (MT)
41 - 60	Moderadamente Sensível (MS)
> 60	Sensível (S)

Fonte: Adaptado de Fageria (1985).

### 5.1.6 Análise estatística

Os dados qualitativos das variáveis analisadas foram submetidos à análise de variância e posteriormente, quando significativos a 1 e 5% pelo teste F, foram submetidos ao teste de médias de Scott-Knott com  $P < 0,05$ . Para as análises estatísticas e confecção dos gráficos utilizou-se os programas computacionais “SISVAR 5.0” (FERREIRA, 2014) e “SigmaPlot 11.0” (Copyright © 2014 Systat Software Inc.), respectivamente.

## 5.2 EXPERIMENTO 2: Padrão trifásico de embebição de sementes de feijão-caupi em condições ideais de germinação e sob déficit hídrico

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza-CE. A curva para a avaliação do padrão trifásico de germinação das cultivares foi estabelecida com umedecimento das sementes em água e polietilenoglicol 6000. Através dessa curva foi possível definir em quais momentos da germinação seriam realizadas as análises citoquímicas e bioquímicas.

Para este experimento foram utilizadas 100 sementes de cada uma das cultivares selecionadas. As repetições de 25 sementes foram distribuídas entre três folhas de papel substrato mata borrão (Germitest®) umedecidas com água destilada ou com solução de PEG 6000 na concentração definida no Experimento 1, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, usando duas folhas como base e uma para cobrir. Em seguida, as três folhas foram enroladas e os rolos provenientes do mesmo tratamento foram colocados dentro de potes de

polietileno cobertos com plástico transparente, sendo estes, mantidos em câmara de germinação do tipo BOD à uma temperatura constante de 25°C (BRASIL, 2009) e sob fotoperíodo de 12 h.

O nível de absorção foi medido em intervalos de 2 horas durante as primeiras 26 horas e, após esse tempo, foi determinado em intervalos de 4, 6, 8 e 12 horas. De acordo com método descrito por Baskin e Baskin (2001), ao final de cada período, as sementes foram retiradas dos rolos, enxugadas com papel toalha e pesadas, obtendo-se o peso úmido. Após a obtenção do peso úmido, as sementes foram colocadas novamente nos tratamentos e retornadas a BOD. O teor de água absorvida em cada tempo foi calculado pela Equação (2).

$$\% \text{ de água absorvida} = \frac{P_f - P_i}{P_i} \times 100 \quad (2)$$

Em que:  $P_i$  = peso inicial das sementes;  $P_f$  = peso final das sementes em cada tempo.

A pesagem cessou quando as sementes de cada tratamento apresentaram germinação em 50% + 1. Quanto aos resultados, foram expressos na forma de percentagem e apresentados em gráficos confeccionados através do programa computacional “SigmaPlot 11.0” (Copyright © 2014 Systat Software Inc.).

### **5.3 EXPERIMENTO 3: Estudos citoquímicos em sementes de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico durante a germinação**

As sementes das duas cultivares selecionadas no Experimento 1 (uma tolerante e outra sensível ao déficit hídrico) foram colocadas para germinar sob condições ideais e sob estresse (concentração escolhida no Experimento 1) e, em cada tempo estabelecido pelas curvas de embebição, foram coletados cotilédones e embriões de cada uma das cultivares avaliadas para que se pudesse analisar as características citoquímicas de cada uma dessas estruturas. A separação de cotilédones e embriões foi realizada por meio de cortes transversais feitos nas sementes e, após essa separação, cada uma das estruturas foi dividida em partes menores e armazenadas em tubos de eppendorf devidamente identificados.

#### **5.3.1 Análises citoquímicas**

Para a realização das análises citoquímicas, as quais foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular Vegetal da UFC, as secções dos cotilédones e dos embriões

foram fixadas por 24 horas em solução contendo a mistura de paraformaldeído a 4% (p/v) e glutaraldeído a 1% (v/v) preparada em tampão fosfato de sódio a 0,2 M, pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965). Após a finalização do tempo de fixação, o material foi exposto a três lavagens de 10 min cada, com tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 e, logo em seguida, a três rápidas lavagens em água destilada. Após esse procedimento, foi realizada a desidratação do material em bateria crescente de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%, uma hora em cada álcool), sendo o material, posteriormente, exposto a pré-infiltração em resina-álcool etílico na proporção 1:1 (v/v) por 24 h. Ao final da pré-infiltração, o material foi destinado à etapa de infiltração e inclusão em solução pura de Histoiresina (Histoiresin Leica) por no mínimo dois dias.

Posteriormente, as estruturas incluídas foram coladas ou fixadas em blocos de madeira com auxílio de resina acrílica autopolimerizante. Após a secagem da resina acrílica, os blocos foram destinados ao micrótomo semiautomático (SLEE) para realização de cortes com 5 µm de espessura. As secções, obtidas através do corte, foram montadas em lâminas e estas, por sua vez, foram submetidas aos seguintes corantes citoquímicos: Azul de Toluidina (AT) a 0,025%, pH 4,0, que detecta radicais aniônicos totais (VIDAL, 1977); Xylidine Ponceau (XP) a 0,1%, pH 2,5, para detectar radicais catiônicos totais, o que revela o conteúdo proteico do citoplasma das células (VIDAL, 1970); e a reação do Periodic Acid-Schiff (PAS), para detecção de polissacarídeos neutros (MAIA, 1979). A birrefringência dos grânulos de amido foi avaliada através de microscopia de luz polarizada com objetivas de 10, 20 e 40x, equipada com câmera digital.

Após a coloração dos cortes, as lâminas foram montadas utilizando verniz geral Acrilex® para preencher os espaços entre a lâmina e a lamínula, finalizando a fixação dos cortes. Esse tipo de verniz apresenta baixo índice de refração, permitindo a visualização clara da morfologia dos tecidos e seus detalhes (PAIVA, 2006). Após a montagem das lâminas, estas foram encaminhadas para observação em microscópio óptico Olympus modelo BX41. As imagens foram obtidas através de câmera de captura acoplada ao microscópio com o programa de captura de imagem Olympus cellSens Entry 1.18.

#### **5.4 EXPERIMENTO 4: Avaliação da mobilização de reservas e dos mecanismos antioxidantes em sementes de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico durante a germinação**

As sementes das duas cultivares selecionadas no Experimento 1 (uma tolerante e outra sensível ao déficit hídrico) foram colocadas para germinar sob condições ideais e sob estresse (concentração escolhida no Experimento 1) e, em cada tempo estabelecido pelas curvas de embebição, foram coletados cotilédones e embriões de cada uma das cultivares avaliadas para que se pudesse analisar a mobilização de reservas e o perfil proteico das sementes em condições ideais ou sob déficit hídrico.

A separação de cotilédones e embriões foi realizada por meio de cortes transversais feitos nas sementes e, após a separação, cada uma das estruturas foi dividida em partes menores e armazenadas em folhas de papel alumínio devidamente identificadas. As amostras foram congeladas a -20 °C e posteriormente liofilizadas. Depois, com auxílio de nitrogênio líquido, as amostras liofilizadas foram maceradas até formar um pó fino e este foi armazenado em tubos de eppendorf devidamente identificados para posterior utilização nos Experimentos 3 e 4.

##### **5.4.1 Carboidratos solúveis**

Os extratos brutos foram preparados de acordo com o método de Rinner et al. (2012), utilizando 50 mg de pó fino proveniente dos cotilédones ou dos embriões para 5 mL de água deionizada. Em tubos de ensaio foram adicionados, separadamente, os pós liofilizados de cotilédones e de embriões à água deionizada. As amostras foram, então, mantidas em banho-maria a 85°C por 60 minutos, com agitações a cada 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4.000 x g, a 25°C por 20 minutos, sendo o sobrenadante (extrato) coletado, filtrado e armazenado em frascos de vidro a -25°C para uso posterior.

A determinação dos carboidratos solúveis foi realizada conforme metodologia de Dubois et al. (1956), com algumas modificações. Em uma alíquota de 0,2 mL do extrato, devidamente diluído, foram adicionados 0,2 mL de fenol a 5% e 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 10 minutos para o seu resfriamento. Em seguida, as amostras foram submetidas à quantificação dos carboidratos solúveis por meio de leituras de absorvância em 490 nm. A curva padrão de carboidratos solúveis foi obtida utilizando-se soluções com concentrações crescentes de D(+) glicose anidra. Os resultados de carboidratos solúveis foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ , sendo cada extrato

dosado em duplicata.

#### **5.4.2 Proteínas solúveis**

A obtenção dos extratos foi feita a partir da homogeneização de 0,1 g do pó liofilizado dos cotilédones e dos embriões em 5,0 mL de fosfato de potássio 100 mM com EDTA (sal dissódico dihidratado) 0,1 mM (pH 7,0), durante 4 min. O homogeneizado foi filtrado em tecido de nylon de malha fina, agitado e posteriormente centrifugado a 12.000 x g durante 15 min. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4°C e o sobrenadante foi armazenado a -25°C até o momento das análises.

A determinação das proteínas solúveis totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando-se o reagente do Coomassie. Este reagente foi preparado dissolvendo-se 100 mg de “Coomassie Brilliant Blue G-250” (Sigma Chemical Company) em 50 mL de etanol a 95%, acrescido de 100 mL de ácido fosfórico a 85%. O volume final da solução foi completado para 1 L com água deionizada e filtrado duas vezes. A uma alíquota de 0,1 mL do extrato devidamente diluído, foi adicionado 1 mL do reagente de Bradford. A mistura foi deixada em repouso por 15 min para então ser submetida à leitura de absorbância a 595 nm. Como padrão, foi utilizada a albumina de soro bovina. O conteúdo de proteína solúvel foi expresso em mg g<sup>-1</sup> MS, sendo cada extrato dosado em duplicata.

#### **5.4.3 N-aminossolúveis**

Para a determinação de N-aminossolúveis, os extratos utilizados foram os mesmos descritos para carboidratos (ver item 5.3.1). Os teores de N-aminossolúveis, dos quais grande parte consiste em aminoácidos livres, foram determinados de acordo com o método de Yemm e Cocking (1955). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL do extrato bruto, devidamente diluído, 0,25 mL de tampão citrato a 0,2 M (pH 5,0), 0,5 mL de cianeto de potássio a 0,2 mM em metilcelosolve a 100% e 0,1 mL de ninhidrina a 5% em metilcelosolve a 100%. Em seguida, os tubos foram fechados, agitados e mantidos em banho-maria a 95 °C, durante 20 min. A reação foi interrompida abruptamente colocando-se os tubos em banho de gelo e, após o resfriamento, foram adicionados 0,65 mL de etanol a 60%. Os teores de N-aminossolúveis foram estimados através de leituras de absorbância em 570 nm, e a curva padrão foi ajustada a partir de soluções com concentrações crescentes de glicina. Os resultados de N-aminossolúveis foram expressos

em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS, sendo cada extrato dosado em duplicata.

#### **5.4.4 Prolina livre**

Para a determinação de prolina, os extratos utilizados foram os mesmos descritos para carboidratos (ver item 5.3.1). O teor de prolina livre nas amostras foi determinado segundo metodologia proposta por Bates et al. (1973). Para as análises foram feitas 3 repetições com 0,25 g de embriões e de cotilédones das sementes em cada tempo da curva de embebição. As amostras foram extraídas em ácido sulfossalicílico (3% m/v). O extrato foi centrifugado (3600 rpm 15 minutos) recuperando-se o sobrenadante (2 ml) ao qual foram adicionados 2 mL de ninhidrina ácida e 2 mL de ácido acético glacial. O meio de reação foi incubado em banho-maria (100°C/1h), sendo a reação paralisada por imersão em banho de gelo. Após este procedimento, foram acrescentados 4 mL de tolueno, seguido de agitação vigorosa (20 segundos) e recuperação do sobrenadante aspirado da fase aquosa para leitura em espectrofotometro. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS.

#### **5.4.5 Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)**

Para todas as análises enzimáticas, os extratos utilizados foram os mesmos descritos para proteínas (ver item 5.5.3). A Catalase teve sua atividade medida de acordo com o método de Havir e McHale (1987). O ensaio constiu em adicionar 150  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático diluído a um meio de reação contendo 1290  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio a 100 mM (pH 7,0), contendo EDTA a 0,1 mM e 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,5 M. A atividade foi determinada monitorando-se a degradação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm (pico de absorção do  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante o período de 2 minutos e dosagem contínua em intervalos de 1 segundo em temperatura ambiente. A diferença em absorbância ( $\Delta A_{240}$ ) foi dividida pelo coeficiente molar de extinção ( $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e a atividade enzimática expressa em  $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$ .

#### **5.4.6 Atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX, EC 1.11.11.1)**

Foi determinada de acordo com Nakano e Asada (1981). Para um volume final de 1,5 mL, foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, devidamente diluído, a uma mistura de reação constituída de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 30 mM e 50  $\mu\text{L}$  de ascorbato a 15 mM, em 1100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio a 50 mM (pH 6,0), EDTA a 0,05 mM. A oxidação do ascorbato

foi monitorada pela leitura em absorvância de 290 nm, no momento da adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 2 minutos após. A diferença na absorvância ( $\Delta A_{290}$ ) foi dividida pelo coeficiente de extinção molar do ascorbato ( $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e a atividade enzimática foi expressa como  $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$ , levando em consideração que 2 mols do ascorbato é necessário para a redução de 1 mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MCKERSIE; LESHEM, 1994).

#### ***5.4.7 Delineamento experimental e análise estatística***

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, no esquema de parcelas subdivididas, com quatro repetições. As parcelas foram definidas pelas duas cultivares escolhidas no Experimento 1 (BRS-Milênio e BRS-Pajeú), as subparcelas formadas pelas duas concentrações osmóticas definidas no Experimento 1 e as subsubparcelas pelos cinco tempos que foram definidos através da curva de embebição.

Os dados qualitativos das variáveis analisadas foram submetidos à análise de variância e posteriormente, quando significativos a 1 e 5% pelo teste F, foram submetidos ao teste de médias de Scott-Knott com  $P < 0,05$ . Para os dados de natureza quantitativa, quando também significativos pelo teste F, foi realizada uma análise de regressão. As equações que melhor se ajustam aos dados foram selecionadas com base no maior coeficiente de determinação, ou seja, maior R<sup>2</sup>. Para as análises estatísticas e confecção dos gráficos foram utilizados os programas computacionais “SISVAR 5.0” (FERREIRA, 2014) e “SigmaPlot 11.0” (Copyright © 2014 Systat Software Inc.), respectivamente.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 EXPERIMENTO 1: Seleção de cultivares de feijão-caupi e definição da concentração de PEG 6000

#### 6.1.1 Teste de germinação

De acordo com a análise de variância apresentada na Tabela 2, pode-se observar que todas as variáveis sofreram influências significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, tanto para os fatores isolados (Cultivares e Potenciais osmóticos) quanto para a interação entre eles.

Tabela 2 – Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação (% G), índice de velocidade de emergência (IVG) e tempo médio de germinação (TMG) de quatorze cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) submetidas a quatro níveis de potencial osmótico simulados através de PEG 6000. Fortaleza – Ceará, 2019.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio		
		% G	IVG	TMG
Cultivares (C)	13	765,65**	14,91**	2,94**
Potenciais osmóticos (PO)	3	44682,15**	876,23**	76,18**
Int. C x PO	39	325,52**	1,68**	1,78**
Resíduo	168	33,63	0,38	0,15
Total	223	-	-	-
Média Geral	-	77,80	7,18	3,49
CV %	-	7,45	8,60	10,94

GL = Grau de liberdade; CV = Coeficiente de variação; \*\* Significativo pelo teste F a 0,01; \* Significativo pelo teste F a 0,05; ns = não significativo. Fonte: A autora.

Na Tabela 3, observa-se o efeito da interação das cultivares com os níveis de potencial osmótico nas variáveis porcentagem de germinação (% G), índice de velocidade de emergência (IVG) e tempo médio de germinação (TMG). Os resultados apontaram que a % G foi afetada severamente quando as sementes foram submetidas ao maior nível de estresse (-0,4MPa), com exceção da cultivar BRS-Milênio que, no nível de -0,2MPa, já havia apresentado redução significativa de 41,67% quando comparada à condição controle de 0MPa. Por outro lado, mesmo sob estresse, as cultivares BRS-Guariba e BRS-Pajeú mantiveram seu potencial germinativo até o nível de -0,2MPa e foram as que apresentaram melhor média de germinação no nível de -0,4MPa, com reduções de 37,00% e 36,08%, respectivamente.

Tabela 3 – Médias das variáveis porcentagem de germinação (% G), índice de velocidade de emergência (IVG) e tempo médio de germinação (TMG) de quatorze cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) submetidas a quatro níveis de potencial osmótico simulados através de PEG 6000. Fortaleza – Ceará, 2019.

Cultivares	Germinação (%)				IVG				TMG			
	Níveis (MPa)				Níveis (MPa)				Níveis (MPa)			
	0	-0,1	-0,2	-0,4	0	-0,1	-0,2	-0,4	0	-0,1	-0,2	-0,4
BRS-Pujante	94 Aa	90 Ab	94 Aa	25 Bc	11,08 Ab	6,90 Bd	6,40 Bb	1,24 Cc	2,17 Ca	3,43 Bc	3,80 Ba	8,80 Aa
BRS-Guariba	100 Aa	98 Aa	93 Aa	63 Ba	12,33 Aa	10,82 Ba	7,79 Ca	4,09 Da	2,04 Ca	2,38 Cc	3,15 Bb	4,92 Ac
BRS-Potengi	98 Aa	96 Aa	90 Aa	48 Bb	11,96 Aa	11,15Aa	7,89 Ba	3,12 Ca	2,07 Ca	2,27 Cc	3,03 Bb	4,01 Ad
BR 17-Gurguéia	96 Aa	92 Aa	90 Aa	45 Bb	11,83 Aa	9,32 Bb	7,31 Ca	2,29 Db	2,04 Ca	2,66 Bc	3,18 Bb	5,77 Ab
BRS-Tumucumaque	98 Aa	89 Bb	87 Ba	17 Cd	12,04 Aa	8,14 Bc	6,24 Cb	1,08 Dc	2,08 Ca	2,88 Bc	3,64 Aa	4,10 Ad
BRS-Pajeú	97 Aa	96 Aa	94 Aa	62 Ba	11,75 Aa	9,52 Bb	7,81 Ca	3,35 Da	2,09 Ca	2,74 Bc	3,16 Bb	4,95 Ac
BRS-Rouxinol	96 Aa	97 Aa	88 Ba	45 Cb	11,67 Aa	10,22 Ba	7,70 Ca	2,68 Db	2,08 Ca	2,56 Bc	3,01 Bb	4,81 Ac
BRS-Novaera	98 Aa	97 Aa	85 Ba	47 Cb	12,21 Aa	8,44 Bc	7,03 Ca	2,46 Db	2,01 Ca	3,08 Bc	3,21 Bb	4,59 Ac
BRS-Xiquexique	97 Aa	92 Aa	93 Aa	48 Bb	11,52 Aa	8,40 Bc	6,90 Ca	2,76 Db	2,16 Ba	4,36 Aa	3,90 Aa	4,47 Ad
BRS-Milênio	96 Aa	83 Bc	56 Cc	25 Dc	11,52 Aa	6,97 Bd	4,08 Cd	1,37 Dc	2,14 Ca	3,54 Bb	3,63 Ba	4,71 Ac
BRS-Acauã	94 Aa	96 Aa	89 Aa	13 Bd	10,06 Ab	8,19 Bc	5,85 Cb	0,88 Dc	2,49 Ca	4,20 Ba	4,03 Ba	4,69 Ac
Patativa	96 Aa	98 Aa	90 Aa	23 Bc	11,48 Aa	7,88 Bc	6,34 Cb	1,42 Dc	2,16 Ca	3,79 Bb	4,08 Ba	4,84 Ac
BR 3-Tracuateua	98 Aa	93 Aa	78 Bb	12 Cd	10,75 Ab	6,59 Bd	4,87 Cc	0,81 Dc	2,41 Ca	3,85 Bb	4,16 Ba	4,69 Ac
BRS-Aracê	96 Aa	81 Bc	74 Bb	29 Cc	11,40 Aa	6,97 Bd	5,38 Cc	2,06 Db	2,18 Ba	3,91 Ab	3,90 Aa	4,41 Ad

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott  $P < 0,05$ . Fonte: A autora.

Esses resultados evidenciam que a germinação das sementes é afetada sob o potencial mais elevado de estresse hídrico (-0,4MPa). Essa redução na porcentagem de germinação das sementes sob baixos potenciais hídricos se deve à redução na disponibilidade de água necessária para a ativação e manutenção do metabolismo das sementes e isso acaba ocasionando retardo ou até mesmo impedimentos à germinação (BEWLEY et al., 2013; PELEGRINI et al., 2013).

Assim como no presente experimento, o potencial osmótico de -0,4 MPa promoveu decréscimos significativos na porcentagem de germinação das sementes de *Apuleia leiocarpa* (SPADETO et al., 2012). Ferreira et al. (2017), trabalhando com simulação de estresse hídrico em genótipos de feijão-caupi, também constataram que houve redução na porcentagem de germinação de sementes com a redução do potencial osmótico. Essa mesma resposta foi encontrada em sementes de soja submetidas a condições de déficit hídrico (SOARES et al., 2015).

Quanto ao IVG (Tabela 3), observa-se que houveram decréscimos nas médias de todas as cultivares à medida em que se reduziu o potencial osmótico. Ao comparar os níveis de estresse dentro de cada cultivar, pode-se observar que o mais prejudicial foi o de -0,4MPa, o qual reduziu drasticamente os valores de IVG. No entanto, em todas as cultivares observa-se que a partir do nível de -0,1MPa já houveram reduções significativas nessa variável, com exceção da cultivar BRS- Potengi. De modo geral, quando se compara a média das cultivares dentro de cada potencial osmótico, obtêm-se que, para todos os níveis de estresse, os melhores índices foram apresentados pelas cultivares BRS-Guariba e BRS-Rouxinol e, em contraste, os piores foram obtidos na cultivar BRS-Milênio.

Esses decréscimos no IVG, mediante ao aumento da expressividade do estresse, são bastante relatados na literatura (OLIVEIRA; GOMES FILHO, 2009; AGOSTINI et al., 2013). Quando o potencial osmótico da solução é inferior ao das células do embrião, ocorre a redução tanto da velocidade como também da porcentagem de germinação (MARCOS FILHO, 2015), sendo que para cada espécie existe um valor de potencial hídrico no substrato, abaixo do qual a germinação não ocorre (LOPES; MACEDO, 2008). A diminuição na absorção da água necessária para a ativação do metabolismo da semente acaba dificultando a digestão das reservas e a translocação dos produtos metabolizados, culminando em uma germinação mais lenta (TAIZ et al., 2017).

Quanto ao TMG (Tabela 3), observa-se que os valores aumentaram à medida em que se reduziu o potencial osmótico, ou seja, à medida em que se aumentou o nível de déficit

hídrico a semente precisou de mais tempo para germinar. Ao comparar os níveis de estresse dentro de cada cultivar, observa-se que o mais prejudicial foi o de  $-0,4\text{MPa}$ , que culminou no aumento exacerbado dos valores de TMG. No entanto, em todas as cultivares observa-se que a partir do nível de  $-0,1\text{MPa}$  já houveram aumentos significativos nessa variável, com exceção das cultivares BRS-Guariba e BRS- Potengi. Quando se compara a média das cultivares dentro de cada potencial osmótico, obtêm-se que, de forma geral, os menores tempos médios de germinação foram apresentados pelas cultivares BRS-Guariba, BRS-Potengi, BRS-Pajeú, BRS-Rouxinol e BRS-Novaera e, em contraste, os maiores foram obtidos nas cultivares BRS-Xiquexique, BRS-Acauã e BRS-Pujante (Tabela 3).

Ao avaliarem o tempo médio de germinação em sementes de *Poinciana pyramidalis* e *Anadenanthera colubrina* sob estresse hídrico induzido por polietilenoglicol, Santos et al. (2016) constataram que nos níveis de potenciais osmóticos mais negativos foram necessários um maior número de dias para que as sementes germinassem, dados que corroboram com os resultados obtidos na presente pesquisa. Diante disso, pode-se sugerir que à medida que o potencial osmótico aumenta, a semente necessita de mais tempo para germinar (PELEGRINI et al., 2013).

O TMG é uma variável importante para que seja detectada a rapidez das sementes em germinar e, conseqüentemente, se estabelecer em um determinado local (BORGHETTI; FERREIRA, 2004). Quando expostas a condições desfavoráveis de disponibilidade hídrica, o tempo para que a germinação das sementes ocorra tende a se elevar até que se possa desenvolver mecanismos de tolerância a essa situação, ou, caso isso não aconteça, o processo germinativo pode, até mesmo, ser totalmente inibido (BARROSO et al., 2010).

Sabe-se que deficiência hídrica promove alterações no comportamento vegetal e seus efeitos podem variar na dependência do genótipo, da duração, da severidade e do estágio de desenvolvimento da planta (PELEGRINI et al., 2013). Nesse sentido, o modo como essas cultivares respondem a esse estresse é que vai determinar sua tolerância e o seu nível de qualidade fisiológica.

### **6.1.2 Testes de vigor**

Na análise de variância apresentada na Tabela 4, verificou-se que, tanto para os fatores isolados (Cultivares e Potenciais osmóticos) quanto para a interação entre os fatores, todas as variáveis sofreram influências significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 4 – Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de quatorze cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) submetidas a quatro níveis de potencial osmótico simulados através de PEG 6000. Fortaleza – Ceará, 2019.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio			
		CPA	CR	MSPA	MSR
Cultivares (C)	13	3,2629**	36,0352**	0,0515**	0,3741**
Potenciais osmóticos (PO)	3	2108,9770**	2861,5140**	5,8773**	0,0091**
Int. C x PO	39	2,5868**	15,6208**	0,0243**	0,0022**
Resíduo	168	0,2696	1,1178	0,0011	0,0002
Total	223	-	-	-	-
Média Geral	-	4,76	9,64	0,31	0,12
CV %	-	10,90	10,97	10,81	11,76

GL = Grau de liberdade; CV = Coeficiente de variação; \*\* Significativo pelo teste F a 0,01; \* Significativo pelo teste F a 0,05; ns = não significativo. Fonte: A autora.

Na Tabela 5, observa-se o efeito da interação das cultivares com os níveis de potencial osmótico nas variáveis comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR).

Tabela 5 – Médias das variáveis comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de quatorze cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) submetidas a quatro níveis de potencial osmótico simulados através de PEG 6000. Fortaleza – Ceará, 2019.

Cultivares	CPA(cm)				CR(cm)				MSPA(g)				MSR(g)			
	Níveis (MPa)				Níveis (MPa)				Níveis (MPa)				Níveis (MPa)			
	0	-0,1	-0,2	-0,4	0	-0,1	-0,2	-0,4	0	-0,1	-0,2	-0,4	0	-0,1	-0,2	-0,4
BRS-Pujante	15,1Ab	2,7 Bb	1,8Ca	0Da	16,1Ac	14,8Aa	11,2Bc	0Ca	1,0Ab	0,27Bb	0,18Cb	0Da	0,23Ab	0,19Bb	0,13Cb	0Da
BRS-Guariba	13,4Ac	3,8Ba	2,2Ca	0Da	17,4Ab	10,8Bc	8,7Cd	0Da	0,85Ad	0,25Bb	0,16Cb	0Da	0,16Ac	0,15Ac	0,08Bd	0Ca
BRS-Potengi	14,0Ac	4,0Ba	2,1Ca	0Da	19,0Aa	10,3Bc	11,1Bc	0Ca	0,89Ac	0,31Bb	0,18Cb	0Da	0,19Ac	0,16Bc	0,12Cc	0Da
BR 17- Gurguéia	12,5Ad	3,9Ba	1,8Ca	0Da	16,2Ac	14,6Ba	12,6Cc	0Da	0,65Af	0,28Bb	0,20Cb	0Da	0,15Ac	0,16Ac	0,10Bc	0Ca
BRS- Tumucumaque	13,8Ac	2,8Bb	1,8Ca	0Da	16,5Ac	10,6Bc	9,7Bd	0Ca	0,71Ae	0,22Bc	0,15Cb	0Da	0,16Ac	0,12Bd	0,08Cd	0Da
BRS-Pajeú	15,2Ab	3,3Ba	2,3Ca	0Da	19,6Aa	12,8Cb	16,4Ba	0Da	0,66Af	0,27Bb	0,18Cb	0Da	0,15Ac	0,16Ac	0,15Aa	0Ba
BRS-Rouxinol	14,0Aa	3,8Ba	2,2Ca	0Da	17,6Ab	12,8Bb	11,8 Bc	0Ca	0,65Af	0,32Bb	0,18Cb	0Da	0,16Ac	0,15Ac	0,10Bc	0Ca
BRS-Novaera	11,5Ad	2,4Bb	2,0Ba	0Ca	18,6Aa	15,0Ba	11,3Cc	0Da	0,92Ac	0,32Bb	0,19Cb	0Da	0,26Aa	0,24Ba	0,18Ca	0Da
BRS- Xiquexique	14,3Ac	3,6Ba	2,4Ca	0Da	17,1Ab	9,0Cd	14,8Bb	0Da	0,70Ae	0,29Bb	0,20Cb	0Da	0,17Ac	0,14Bc	0,13Bb	0Ca
BRS-Milênio	16,3Aa	2,6 Bb	1,5Ca	0Da	17,6Ab	7,4Be	5,6Ce	0Da	0,80Ad	0,29Bb	0,17Cb	0Da	0,23Ab	0,14Bc	0,12Cc	0Da
BRS-Acauã	14,1Ac	4,4Ba	2,1Ca	0Da	17,8Ab	6,4Bf	6,7Be	0Ca	0,62Af	0,29Bb	0,16Cb	0Da	0,18Ac	0,12Bd	0,08Cd	0Da
Patativa	15,0Ab	3,8Ba	2,0Ca	0Da	17,2Ab	8,1Ce	11,7Bc	0Da	0,63Af	0,29Bb	0,17Cb	0Da	0,20Ac	0,15Bc	0,13Cb	0Da
BR 3- Tracuateua	11,6Ae	3,1Bb	1,8Ca	0Da	16,5Ac	9,6Cd	12,2Bc	0Da	1,10Aa	0,44Ba	0,26Ca	0Da	0,27Aa	0,18Bb	0,14Cb	0Da
BRS-Aracê	11,4Ae	2,5Bb	1,9Ba	0Ca	14,7Ac	5,1Cf	6,9Be	0Da	0,50Ag	0,19Bc	0,14Cb	0Da	0,12Ad	0,10Bd	0,10Bc	0Ca

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott  $P < 0,05$ . Fonte: A autora.

Os resultados apontaram que, independentemente das cultivares estudadas, todas as variáveis avaliadas foram afetadas severamente quando as sementes foram submetidas ao maior nível de estresse (-0,4MPa), onde não se puderam desenvolver plântulas ao ponto de serem contabilizadas as variáveis CPA, CR, MSPA e MSR (Tabela 5). Segundo Machado Neto et al. (2004), quando as sementes são submetidas à deficiência hídrica por soluções osmóticas, o vigor é mais afetado do que a germinação.

De acordo com os resultados obtidos para CPA, observou-se que à medida em que se reduziu o potencial osmótico houveram decréscimos significativos nessa variável para todas as cultivares, com exceção da BRS-Novaera e da BRS-Aracê, que permaneceram iguais estatisticamente quando submetidas aos níveis de -0,1MPa e -0,2MPa. Quando se compara a média das cultivares dentro de cada potencial osmótico, obtêm-se que, no nível de -0,1MPa, os melhores desempenhos foram apresentados pelas cultivares BRS-Guariba, BRS-Potengi, BR 17-Gurgueia, BRS-Pajeú, BRS-Rouxinol, BRS-Xiquexique, BRS-Acauã e Patativa e, em contraste, os piores foram obtidos nas demais cultivares. Já no que se refere ao nível de -0,2MPa, o que se observa é que não houve diferença significativa entre as médias das cultivares (Tabela 5).

Essas reduções nos valores de CPA das plântulas podem ser explicadas pela diminuição no metabolismo das sementes, uma vez que há menor disponibilidade de água para digestão das reservas e translocação dos produtos metabolizados (BEWLEY; BLACK, 1994; TAIZ et al., 2017). Resultados semelhantes foram obtidos por Carneiro et al. (2011), que trabalhando com a viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico, constataram redução linear no crescimento das plântulas à medida que aumentaram as concentrações de PEG 6000, apresentando os menores valores no potencial osmótico de -0,8 MPa. Em *Triticum aestivum* L, também foi constatada redução expressiva para todos os genótipos avaliados com o aumento dos níveis de déficit hídrico (GIROTTO et al., 2012).

Quanto à variável CR (Tabela 5), observou-se que algumas cultivares apresentaram decréscimos significativos nessa variável à medida em que se reduziu o potencial osmótico, no entanto, nas cultivares BRS-Potengi, BRS-Pajeú, BRS-Xiquexique, BRS-Acauã, Patativa, BRS-Tracuateua e BRS-Aracê, houve um aumento no comprimento da raiz em plântulas oriundas de sementes submetidas ao nível de -0,2MPa em relação àquelas submetidas ao nível de -0,1MPa. Quando se compara a média das cultivares dentro de cada potencial osmótico, obtêm-se que, no nível de -0,1MPa, os maiores CR foram apresentados pelas cultivares BRS-Pujante, BR 17-Gurgueia e BRS-Novaera, em contraste, os menores comprimentos foram

obtidos nas cultivares BRS-Aracê e BRS-Acauã. Já no que se refere ao nível de  $-0,2\text{MPa}$ , a maior média de CR foi obtida na cultivar BRS-Pajeú, enquanto que as cultivares BRS-Milênio, BRS-Acauã e BRS-Aracê apresentaram as menores médias (Tabela 5).

Mesmo sob déficit hídrico algumas cultivares apresentaram aumentos na variável CR. Pode-se sugerir, diante disso, que a maior parte das reservas metabolizadas foram destinadas ao desenvolvimento radicular e não da parte aérea, tendo isso refletido na variável CR. Segundo Scalón et al. (2011), a condição de déficit hídrico sugere uma priorização do crescimento radicular, característica importante no escape a esse tipo de estresse, onde poderá favorecer a absorção de água justamente por aumentar a superfície de contato com o substrato. Essa continuidade no crescimento da raiz depende da manutenção de uma pressão de turgor mínima nas células, que seja suficiente para permitir o alongamento e o crescimento celular, como também da ação de hormônios como o ácido abscísico, por exemplo, uma vez que este está envolvido com sinais de estímulo ao crescimento da raiz principal e formação de raízes laterais (TAIZ et al., 2017).

Resultados contrastantes foram obtidos por Garcia et al. (2012) trabalhando com diferentes genótipos de *Phaseolus vulgaris* L., onde constataram que o maior crescimento radicular ocorreu no tratamento controle com  $0\text{MPa}$ , ou seja, a redução no potencial hídrico afetou negativamente o desenvolvimento da radícula, causando uma diminuição em seu crescimento. Na presente pesquisa, foi possível observar que, no nível  $-0,2\text{MPa}$ , a BRS-Pajeú apresentou crescimento radicular superior ao do nível  $-0,1\text{MPa}$ , demonstrando que esta cultivar pode ser mais tolerante à falta de água que as demais cultivares testadas. A tolerância ao déficit hídrico varia com o genótipo, sendo que algumas plantas desenvolvem mecanismos de adaptação, tornando-se mais eficientes na absorção de água do solo, especialmente através do desenvolvimento de um extenso e profundo sistema radicular (TAIZ et al., 2017).

No que tange à variável MSPA (Tabela 5), pode-se observar que à medida em que se reduziu o potencial osmótico houveram decréscimos significativos nessa variável para todas as cultivares estudadas. Quando se compara a média das cultivares dentro de cada potencial osmótico, obtêm-se que, no nível de  $-0,1\text{MPa}$ , o melhor resultado foi apresentado pela cultivar BR 3-Tracuateua, em contraste, as menores massas foram obtidas nas cultivares BRS-Tumucumaque e BRS-Aracê. Já no que se refere ao nível de  $-0,2\text{MPa}$ , a maior média de MSPA foi obtida na cultivar BR 3-Tracuateua, enquanto que as demais cultivares apresentaram médias inferiores estatisticamente.

Já para a variável MSR (Tabela 5), observou-se que à medida em que se reduziu o

potencial osmótico houveram decréscimos significativos nessa variável para todas as cultivares, com exceção da BRS-Pajeú, da BRS-Xiquexique e da BRS-Aracê, que permaneceram iguais estatisticamente quando submetidas aos níveis de  $-0,1\text{MPa}$  e  $-0,2\text{MPa}$ . Quando se compara a média das cultivares dentro de cada potencial osmótico, obtêm-se que, no nível de  $-0,1\text{MPa}$ , o melhor desempenho de MSR foi apresentado pela cultivar BRS-Novaera e, em contraste, os piores foram obtidos nas cultivares BRS-Tumucumaque, BRS-Acauã e BRS-Aracê. Já no que se refere ao nível de  $-0,2\text{MPa}$ , a maior média de MSR foi obtida na cultivar BRS-Novaera, enquanto que as cultivares BRS-Guariba, BRS-Tumucumaque e BRS-Acauã apresentaram as menores médias (Tabela 5).

No presente trabalho o déficit hídrico também afetou a produção de massa seca da parte aérea e da raiz. Esses dados estão de acordo com os obtidos por Custódio et al. (2009) e Coelho et al. (2010), onde observaram que plântulas de *Phaseolus vulgaris* L. tiveram redução na massa seca da parte aérea e da raiz nos potenciais mais negativos. Essa redução da massa seca de plântulas em função da restrição hídrica pode ser consequência de uma menor velocidade dos processos fisiológicos e bioquímicos ou da dificuldade de hidrólise e mobilização das reservas da semente (BEWLEY; BLACK, 1994; BEWLEY et al., 2013).

Levando em consideração os resultados obtidos, selecionou-se o nível de  $-0,2\text{MPa}$  de PEG 6000 para ser utilizado nos experimentos posteriores, uma vez que foi o nível a partir do qual tanto as variáveis germinativas quanto as de vigor apresentaram respostas expressivas e contrastantes. O nível de maior estresse ( $-0,4\text{MPa}$ ) não foi utilizado porque o percentual de germinação foi muito baixo e, além disso, as variáveis de vigor foram drasticamente afetadas. Diante da escolha do potencial osmótico, iniciou-se a determinação das cultivares com tolerância diferencial conforme os resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Redução, em percentual, das variáveis germinação (% G), índice de velocidade de emergência (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de quatorze cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) submetidas ao nível de -0,2MPa de PEG 6000 e sua classificação quanto à tolerância ao déficit hídrico. Fortaleza – Ceará, 2019.

Cultivares	Redução (%)						Médias (%)
	Potencial Osmótico (-0,2 MPa)						
	% G	IVG	CPA	CR	MSPA	MSR	
BRS-Pujante	0	42	88	31	82	40	47 MS
BRS-Guariba	7	37	83	50	81	46	51 MS
BRS-Potengi	8	34	85	42	80	39	48 MS
BRS-Gurguéia	6	38	85	22	70	33	42 MS
BRS-Tumucumaque	11	48	87	41	79	49	53 MS
BRS-Pajeú	3	34	84	16	72	0	35 MT
BRS-Rouxinol	8	34	84	33	73	36	45 MS
BRS-Novaera	13	42	83	39	80	30	48 MS
BRS-Xiquexique	4	40	83	14	71	21	39 MT
BRS-Milênio	42	65	91	68	78	49	66 S
BRS-Acauã	5	42	85	62	74	53	54 MS
BRS-Patativa	6	45	87	32	72	32	46 MS
Tracuateua	20	55	85	26	75	49	52 MS
BRS-Aracê	23	53	83	53	73	18	51 MS

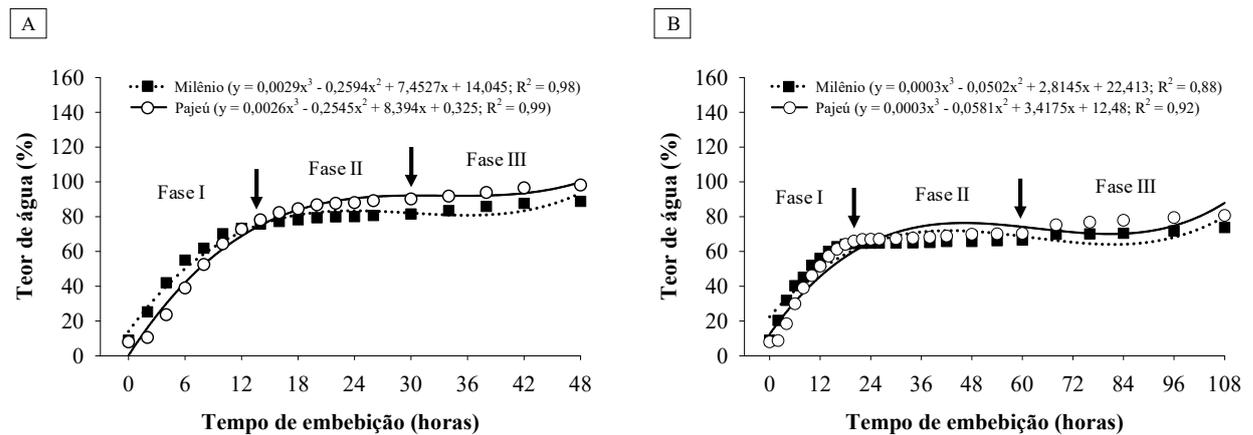
MS: Moderadamente Sensível; MT: Moderadamente Tolerante; S: Sensível. Fonte: A autora.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, pode-se observar que a cultivar que menos sofreu reduções nas variáveis de germinação e vigor foi a BRS-Pajeú, apresentando média de redução de 35% e sendo classificada como moderadamente tolerante ao déficit hídrico (-0,2MPa). Em contraste, observa-se que a cultivar que obteve a maior média de redução foi a BRS-Milênio com 66%, sendo classificada, desta forma, como cultivar sensível ao nível de -0,2MPa. Mediante a quantificação das reduções nas variáveis analisadas, as cultivares selecionadas para os experimentos posteriores foi a BRS-Pajeú e a BRS-Milênio. Vale ressaltar que essa classificação foi realizada conforme descrito na Tabela 1 do tópico Material e Métodos.

## 6.2 EXPERIMENTO 2: Padrão trifásico de embebição de sementes de feijão-caupi em condições ideais de germinação e sob déficit hídrico

Nas curvas de embebição observa-se o teor de água em função do tempo em horas, onde é possível verificar a evolução do processo germinativo das cultivares, BRS-Milênio e BRS-Pajeú, por meio da curva de absorção de água pelas sementes ao longo de 48 horas para o tratamento controle (água destilada) e 108 horas para a condição de déficit hídrico (solução de PEG 6000 ao nível de -0,2 MPa). Os resultados se ajustaram à equação cúbica, sendo que o teor de umidade inicial utilizado para BRS-Milênio foi de 9% e para BRS-Pajeú foi de 8%, referentes aos seus respectivos lotes (Figura 1A e 1B).

Figura 1 – Curva de embebição de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) BRS-Milênio e BRS-Pajeú em água destilada (A) e em solução de PEG 6000 no nível de -0,2MPa (B). Fortaleza – CE, 2019.



Fonte: A autora.

Analisando-se a Figura 1A e 1B pode-se constatar que a absorção de água pelas sementes de ambas as cultivares, tanto no tratamento controle quanto na solução de PEG 6000, seguiu um padrão trifásico (BEWLEY; BLACK, 1994), sendo possível identificar a transição entre as fases I, II e III da embebição. Observa-se que tanto a velocidade de embebição quanto o teor de água das sementes de ambas as cultivares apresentaram-se menores quando estas foram submetidas à concentração osmótica de -0,2MPa, o que contribuiu para o maior atraso no processo de absorção e germinação.

Segundo Marcos Filho (2015), o sentido do fluxo de movimentação da água é regido pela diferença de potencial hídrico entre a semente e o meio em que ele se encontra.

Quanto maior esse gradiente, maior e mais rápido será o processo de absorção. Deste modo, o atraso na germinação das sementes submetidas ao PEG se dá pelo fato de que no meio, há menos energia livre da água do que no tratamento com água destilada (0MPa), ou seja, a diferença de potencial é maior entre as sementes que estão no tratamento controle, por isso há uma maior absorção de água (TAIZ et al., 2017).

Quando se compara as duas cultivares, é possível perceber que a BRS-Milênio apresenta uma absorção de água mais intensa durante a fase I da embebição em ambas as condições (controle e déficit hídrico), chegando à estabilidade de absorção de água (fase II da embebição) mais rapidamente. No entanto, a partir de 14 horas (controle) e de 20 horas (estresse) do início do experimento, a cultivar BRS- Pajeú aumenta seu potencial de absorção e passa a apresentar maior teor de água, destacando-se em relação a cultivar BRS-Milênio.

No que se refere à BRS-Milênio no tratamento em água destilada, ao final das 14 horas iniciais referentes a fase I da embebição, as sementes apresentaram média de, aproximadamente, 76% de umidade quando comparada ao seu peso inicial. Já no tratamento em solução de PEG 6000, ao final das 20 horas iniciais de estresse, as sementes apresentaram média de, aproximadamente, 65% de umidade. No que tange à fase I da embebição para a BRS-Pajeú, constatou-se que, no tratamento controle, ao final das 14 horas iniciais as sementes apresentaram média de, aproximadamente, 78% de umidade; já no tratamento em solução de PEG 6000, ao final das 20 horas iniciais, as sementes apresentaram média de, aproximadamente, 66% de umidade.

De acordo com Marcos Filho (2015), o aumento expressivo na absorção de água durante fase I deve-se ao fato de as sementes antes da embebição estarem com potencial hídrico muito negativo e, devido à diferença de potencial existente entre a semente e o meio, quando em contato com a água resulta em rápida absorção. Esse gradiente de umidade entre a semente e o meio é reduzido à medida em que se aumenta a absorção de água, por isso observa-se que a inclinação da curva diminui com o ganho de água. Vale ressaltar que, com o aumento da absorção de água, ocorre a ativação de enzimas e, por conseguinte, aumento da taxa respiratória e síntese de RNA-m.

Constatou-se também uma fase de absorção lenta (fase II), na qual houve pouca variação no gradiente de umidade e perdurou para as duas cultivares até cerca de 30 horas (controle) e 60 horas (estresse) após o início do experimento. No que se refere a BRS-Milênio no tratamento em água destilada, ao final das 30 horas, as sementes apresentaram média de, aproximadamente, 82% de umidade quando comparada ao seu peso inicial. Já no tratamento

em solução de PEG 6000, ao final das 60 horas iniciais de estresse, as sementes apresentaram média de, aproximadamente, 67% de umidade. No que tange à BRS-Pajeú, constatou-se que, no tratamento controle, ao final das 30 horas iniciais as sementes apresentaram média de, aproximadamente, 90% de umidade; já no tratamento em solução de PEG 6000, ao final das 60 horas iniciais, as sementes apresentaram média de, aproximadamente, 70% de umidade.

Na fase II, denominada de estacionária ou de repouso fisiológico, ocorrem processos bioquímicos preparatórios à emergência da raiz primária, como reorganização celular, síntese de novas proteínas e enzimas, mobilização de reservas e desintoxicação das espécies reativas de oxigênio (BEWLEY et al., 2013). Estes dados corroboram com os encontrados por Oliveira e Bosco (2013), que trabalhando com sementes de *Copernicia hospita* Martius também encontraram essa fase II bem caracterizada e estacionária.

Na fase III as sementes das duas cultivares voltam a absorver água rapidamente. Isso acontece após 30 horas (controle) e 60 horas (estresse) do início do experimento, sendo caracterizado pelo surgimento da radícula. Nessa fase ocorre a mobilização das principais substâncias de reserva (amido, proteínas e lipídios), tornando visível a retomada do crescimento do embrião, identificado pela protrusão radicular (GUIMARÃES et al., 2008; OLIVEIRA; BOSCO, 2013; MARCOS FILHO, 2015).

Sementes da cultivar BRS-Milênio embebidas em água destilada apresentaram média de 89% de umidade no último ponto coletado da curva de embebição. Já no tratamento em solução de PEG 6000, as sementes apresentaram média de, aproximadamente, 74% de umidade. No que concerne à BRS-Pajeú, constatou-se que, no tratamento controle, as sementes apresentaram média de, aproximadamente, 98% de umidade; já no tratamento em solução de PEG 6000, as sementes apresentaram média de, aproximadamente, 81% de umidade.

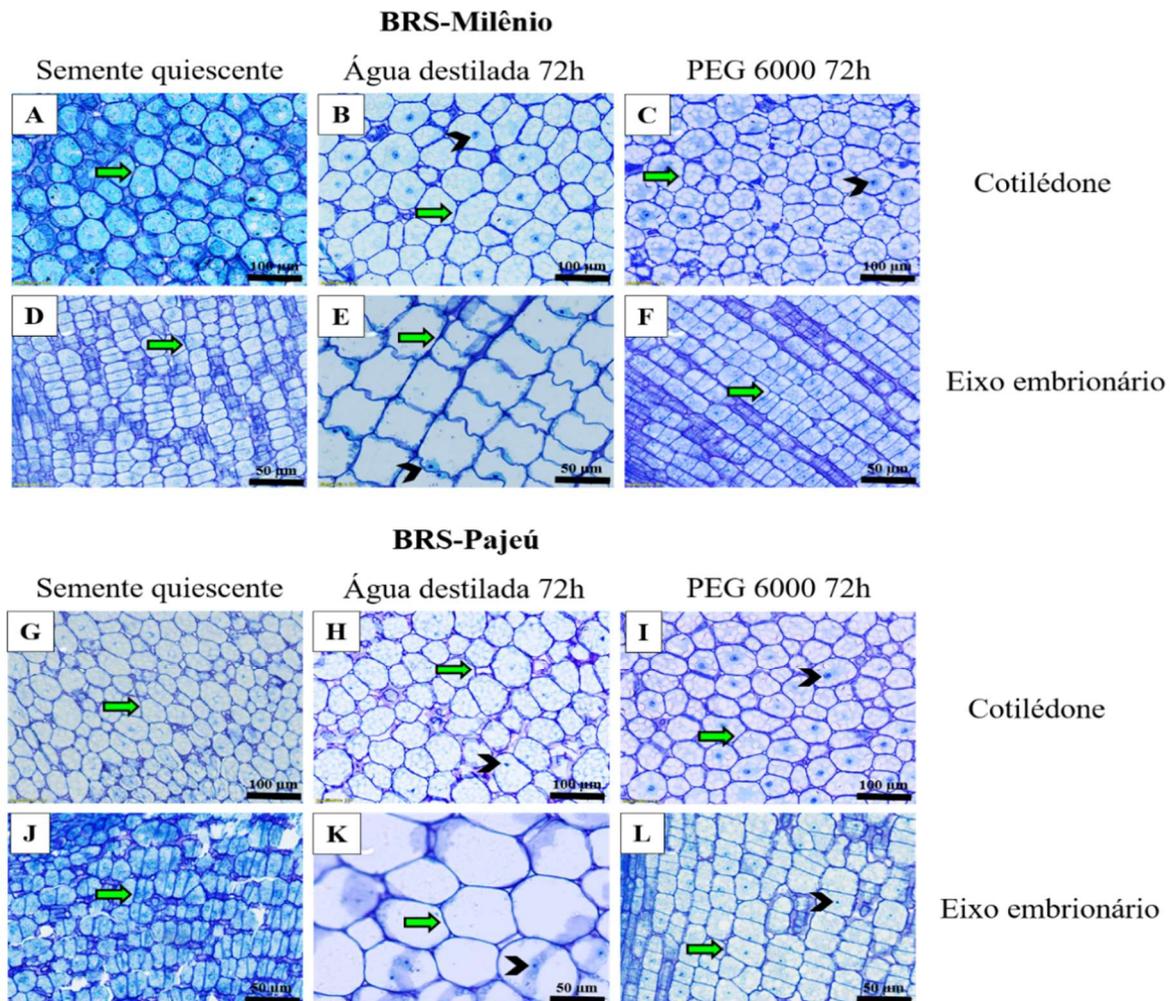
Diante dos resultados obtidos pelas curvas de embebição foram selecionados cinco tempos para a realização dos Experimentos 3 e 4 referentes às análises bioquímicas e citoquímicas: 0 (controle), 12, 24, 48 e 72 horas; os quais correspondem aos eventos/momentos mais relevantes que compreendem as três fases da germinação para as duas cultivares tanto em condições ideais quanto em condições de déficit hídrico.

### **6.3 EXPERIMENTO 3: Estudos citoquímicos em sementes de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico durante a germinação**

Através das análises citoquímicas foi possível detectar os principais constituintes e observar a morfologia das células cotiledonares e do eixo embrionário de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú. A seguir, estão descritos os resultados mais expressivos, em que se compara as diferenças nos tempos de embebição mais contrastantes.

Por meio da coloração dos cortes transversais com Azul de Toluidina (AT), verificou-se que as células cotiledonares e do eixo embrionário apresentavam padrões semelhantes de coloração em ambas as cultivares e em todos os tempos analisados (Figura 2). Essa reação de coloração com o AT ocorre porque o corante, que é de natureza catiônica, se liga a componentes de caráter aniônico (ácido) das estruturas, como por exemplo, a pectina da parede celular (TABOGA; VILAMAIOR, 2019).

Figura 2 – Seções transversais de cotilédones e de eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio (A - F) e BRS-Pajeú (G - L) coradas com Azul de Toluidina (AT) 0,025% pH 4,0. Sementes quiescentes (A, D, G, J) e com 72 horas da embebição em condição controle (B, E, H, K) e de estresse hídrico (C, F, I, L). Parede celular ( → ). Núcleo ( > ).



Fonte: A autora.

Em ambas as cultivares, a coloração com AT revelou paredes celulares delgadas que, visivelmente, não foram alteradas em função do déficit hídrico e do tempo de avaliação. De modo geral, as células apresentaram formatos irregulares, variando do elíptico (alongado) ao arredondado, com presença de núcleos, o que indica que algumas células apresentavam atividade celular intensa (Figura 2). De igual modo, em trabalho realizado por Oliveira et al. (2011) e Gallão et al. (2006), a coloração com AT também revelou paredes celulares finas em células cotiledonares de *Sorghum bicolor* L. Moench e *Moringa oleifera* Lam., respectivamente.

No que se refere à cultivar BRS-Milênio, pode-se observar que tanto as células cotiledonares quanto as do eixo embrionário do tratamento de 72 horas em água destilada (Figura 2B e 2E, respectivamente) apresentaram tamanhos superiores às do tratamento com PEG 6000 em 72 horas de embebição (Figura 2C e 2F, respectivamente), o que também pôde ser observado para a BRS-Pajeú. Essa diferenciação no tamanho é evidenciada pelo fato de a absorção de água pelas sementes ser mais lenta e dificultada no tratamento com PEG 6000 e isso ocorre em razão da menor diferença de potencial hídrico entre o embrião e o meio circundante.

De acordo com Läuchli e Grattan (2007), o efeito osmótico resultante do déficit hídrico promove modificações nas relações hídricas das células. Em situações de baixa disponibilidade de água, a embebição é comprometida pela redução dos potenciais hídricos e o crescimento da plântula pode ser afetado pela diminuição da expansão e do alongamento celular e do atraso na mobilização de reservas (MOTERLE et al., 2008; DANTAS et al., 2011).

É importante ressaltar que as células do eixo embrionário da BRS-Pajeú encontraram-se bem mais expandidas do que as da BRS-Milênio no tratamento de 72 h com água destilada e que, no tratamento com PEG 6000 ao nível de  $-0,2\text{MPa}$ , as células do embrião (eixo embrionário + cotilédones) da cultivar BRS-Pajeú se apresentaram ligeiramente mais expandidas que as da BRS-Milênio. Essas respostas podem ser explicadas através da curva de embebição apresentada no Experimento 2, na qual mostra que a cultivar BRS-Pajeú, após 14 horas de embebição em água destilada e 20 horas em solução de PEG 6000, passou a apresentar teores mais elevados de água nos tecidos embrionários, o que acabou contribuindo para o processo de expansão celular.

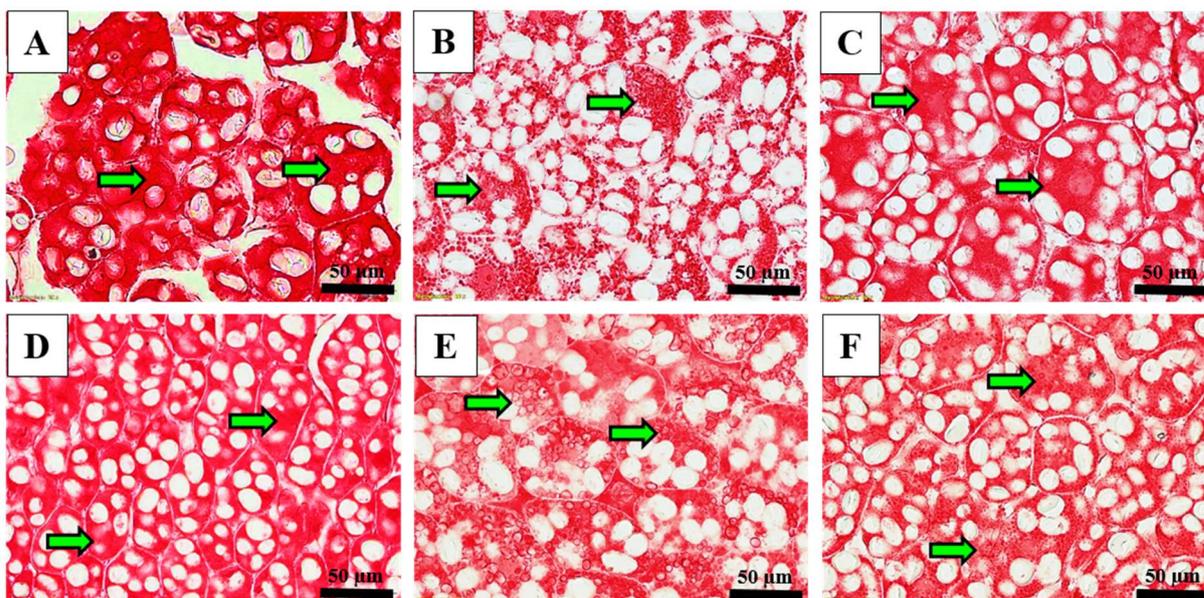
De acordo com Bewley e Black (1994), de maneira geral, a extensão celular predomina na germinação das sementes da maioria das espécies, não havendo correlação e nem necessidade de divisão celular. O crescimento das células está subordinado ao limite de resistência da parede celular e, uma vez vencida, ocorrerá a expansão e a possibilidade de deposição de novos polissacarídeos na parede (BRETT; WALDRON, 1996).

No que tange às proteínas, estas foram detectadas através da coloração com Xylidine Ponceau (XP), em uma reação mediada por ligações eletrostáticas entre o corante com carga negativa (aniônico) e os grupos com cargas positivas (catiônico), como por exemplo, os grupos amino protonados das proteínas (TABOGA; VILAMAIOR, 2019). De modo geral, observa-se que tanto as células dos cotilédones quanto as dos eixos embrionários das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú apresentaram coloração vermelha intensa sugerindo grande

quantidade de corpos proteicos no citoplasma, os quais foram sendo exauridos conforme o desenvolvimento do eixo embrionário e o estresse aplicado (Figuras 3 e 4).

Esses corpos proteicos, assim chamados por vários autores (BUCKERIDGE et al., 2004; GALLÃO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2011), são estruturas vacuolares que acumulam proteína de reserva, mas que também podem acumular, em menores proporções, outras substâncias (VIDAL; PIMENTEL, 1985; BUCKERIDGE et al., 2004). A presença dessas estruturas globulares coradas por XP, também foi observada no citoplasma das células dos cotilédones de *Sorghum bicolor* L. Moench (OLIVEIRA et al., 2011) e *Prosopis juliflora* (GALLÃO et al., 2007).

Figura 3 – Seções transversais de cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio (A, B, C) e BRS-Pajeú (D, E, F) coradas com Xylidine Ponceau (XP) 0,1% pH 2,5. Sementes quiescentes (A, D) e com 72 horas da embebição em condição controle (B, E) e de estresse hídrico (C, F). Corpos proteicos (➡).



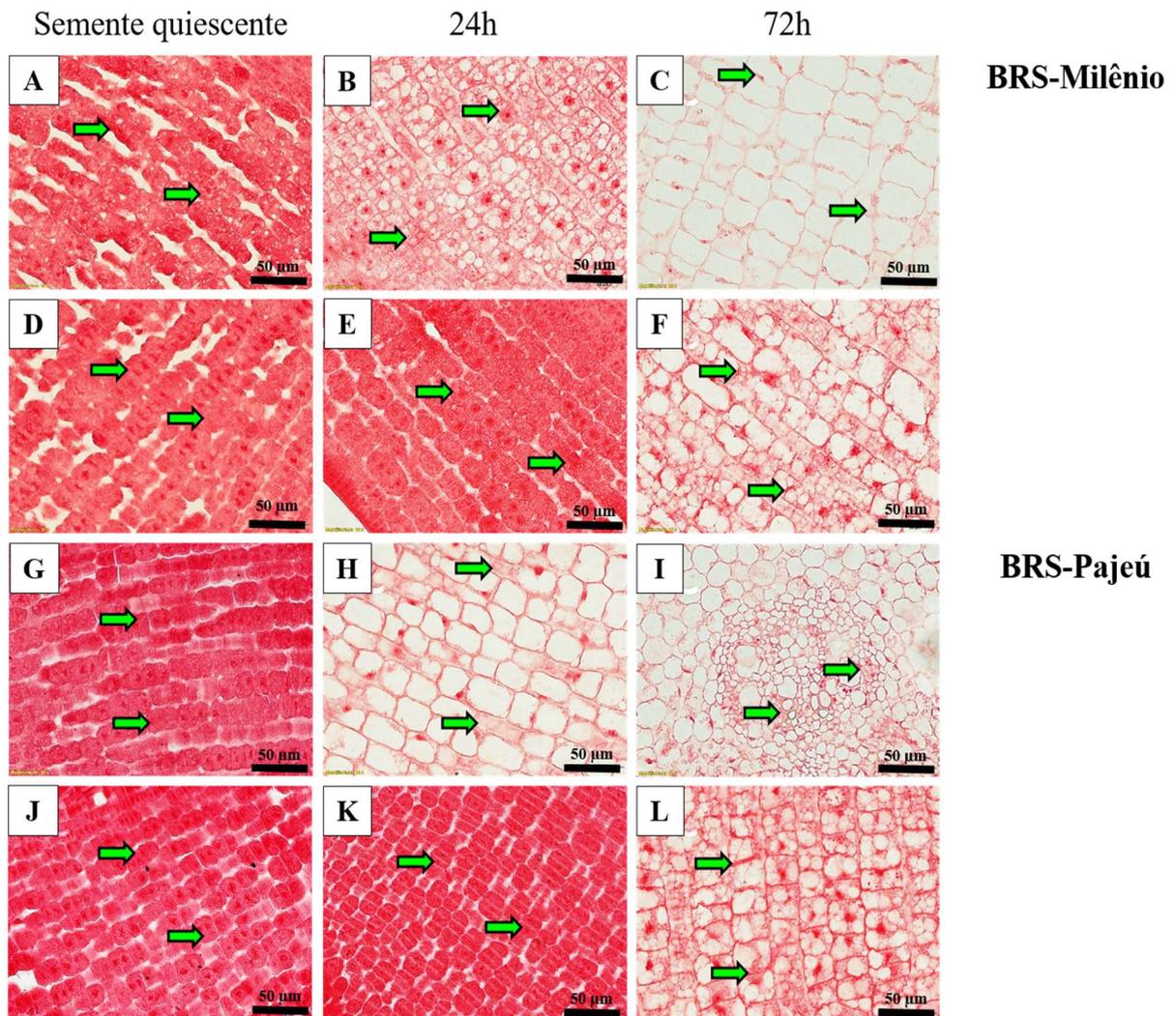
Fonte: A autora.

Nas células cotiledonares das sementes quiescentes de ambas as cultivares, os corpos proteicos se apresentaram distribuídos uniformemente e em grande quantidade pelo citoplasma, sendo intensamente corados pelo XP. Com o aumento das horas de embebição e já destacando o tempo de 72 horas, é possível perceber a redução da intensidade da cor vermelha nas células dos cotilédones submetidos ao tratamento com água destilada (0 MPa), o que sugere redução no conteúdo proteico. Ao compará-lo com o tratamento com PEG 6000 (-0,2MPa), nota-se um atraso na mobilização dessa reserva. Tal resposta é comum para as duas cultivares

estudadas (Figura 3).

Assim como nos cotilédones, as células dos eixos embrionários das sementes quiescentes também apresentaram grande quantidade de corpos proteicos distribuídos por todo o citoplasma, tanto na BRS-Milênio quanto na BRS-Pajeú (Figura 4). No entanto, nota-se que no tempo de 24 horas em água destilada (0MPa), há uma redução bastante considerável na coloração pelo XP, principalmente nas células da cultivar BRS-Pajeú (Figura 4H). Já no tratamento sob déficit hídrico (-0,2MPa), praticamente não se vê diferença entre o tempo 0 (sementes quiescentes) e o tempo de 24 horas de embebição para ambas as cultivares (Figura 4E e 4K).

Figura 4 – Seções transversais de eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio (A - F) e BRS-Pajeú (G - L) coradas com Xylidine Ponceau (XP) 0,1% pH 2,5. Sementes quiescentes (A, D; G, J), com 24 horas da embebição em condição controle (B; H) e de estresse hídrico (E; K), com 72 horas da embebição em condição controle (C; I) e de estresse hídrico (F; L). Corpos proteicos ( → ).



Fonte: A autora.

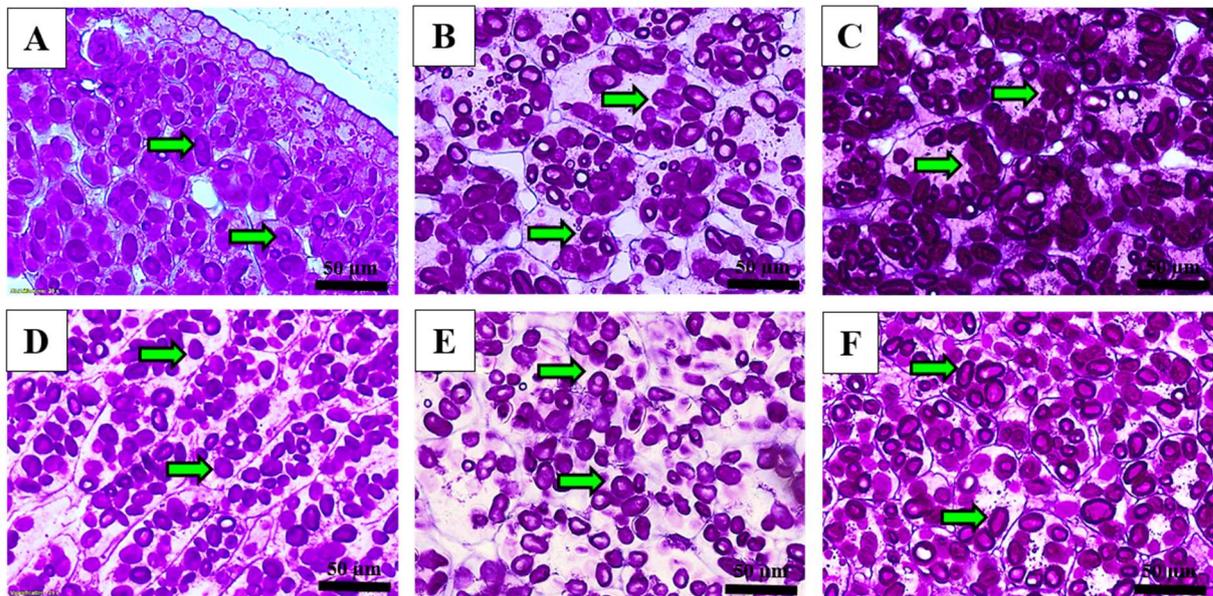
Essa diferenciação na mobilização de reservas do eixo embrionário no tempo de 24 horas de embebição, pode estar associada à fase da germinação em que as sementes se encontram. Esse período de 24 horas corresponde à fase II da germinação, em que ocorre o aumento na degradação e no transporte das substâncias de reserva para a retomada do crescimento do embrião (MARCOS FILHO, 2015; GUOLLO et al., 2016). No caso do tratamento com estresse, ocorre um retardo nessa mobilização, tendo em vista que essa etapa ainda está em suas horas iniciais, devido ao atraso na embebição.

No que concerne ao tempo de 72 horas, no tratamento com água destilada, percebe-se que houve acentuada redução na coloração dos corpos proteicos, sendo observado que, em algumas células, praticamente não havia a presença dessas estruturas (Figura 4C e 4I). Essa resposta é observada nas duas cultivares. Já no que diz respeito ao tempo de 72 horas no tratamento sob déficit hídrico (-0,2MPa), nota-se a presença dos corpos proteicos ainda aglutinados em algumas partes das células, caracterizando retardo na mobilização de proteínas devido a esse estresse (Figura 4F e 4L).

Essa rápida mobilização de proteínas nos eixos embrionários pode ser decorrente dos processos de desenvolvimento e crescimento que estão mais avançados nas sementes que estão germinando em água destilada (0MPa). À medida em que ocorre o crescimento do embrião se transformando em plântula, as proteínas no eixo vão sendo esgotadas e a fonte de aminoácidos para a síntese proteica será exclusivamente oriunda dos que estão armazenados nos cotilédones e que serão exportados após a degradação das proteínas (BEWLEY et al., 2013). De modo geral, o que se observa é que a cultivar BRS-Pajeú é mais eficiente no processo de mobilização de proteínas sob condições ideais de umidade do substrato, porém aparenta não se diferenciar da BRS-Milênio quanto às condições de déficit hídrico.

Por meio da reação do Periodic Acid-Schiff (PAS) nos cortes transversais, foi possível perceber a presença de polissacarídeos neutros na parede celular, devido ao fato de ser constituída por pectina, celulose e hemicelulose (açúcares neutros), e de outros carboidratos (como por exemplo, o amido) no citoplasma das células cotiledonares e do eixo embrionário (Figuras 5 e 6). Essa reação de coloração com o PAS ocorre a partir da oxidação das ligações C-C da sequência 1-2 glicol pelo ácido periódico. Essa oxidação resulta na formação de grupos aldeídos na estrutura dos carboidratos que, ao se ligarem ao reativo de Schiff, produzem uma substância com coloração púrpura (TABOGA; VILAMAIOR, 2019). Devido a tais características, a reação do PAS é muito utilizada na detecção de glicoproteínas e amido.

Figura 5 – Seções transversais de cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio (A, B, C) e BRS-Pajeú (D, E, F) coradas com Periodic Acid-Schiff (PAS). Sementes quiescentes (A, D) e com 72 horas da embebição em condição controle (B, E) e de estresse hídrico (C, F). Grânulos de amido (→).



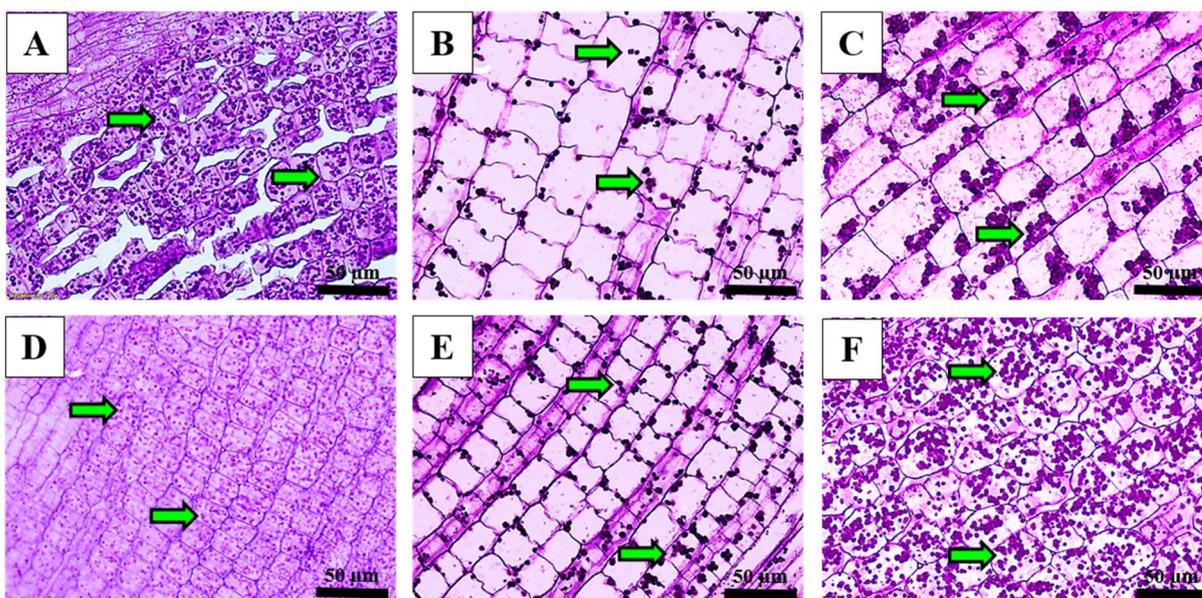
Fonte: A autora.

Em ambas as cultivares, a coloração com PAS revelou a presença de grânulos de amido distribuídos por todo o citoplasma das células cotiledonares, os quais, posteriormente, foram confirmados pela utilização de microscopia com luz polarizada (Figura 7). Com o aumento das horas de embebição e já destacando o tempo de 72 horas, é possível perceber a redução da coloração do PAS no citoplasma das células dos cotilédones submetidos ao tratamento com água destilada (0 MPa), o que sugere decréscimo do conteúdo de amido (Figura 5B e 5E). Ao compará-lo com o tratamento com PEG 6000 (-0,2MPa), nota-se um atraso na mobilização dessa reserva (Figura 5C e 5F). Essas respostas são comuns para ambas cultivares estudadas.

No que se refere às células dos eixos embrionários das sementes quiescentes, estas também apresentaram carboidratos nas formas de grânulos em seus citoplasmas, porém, aparentemente, em quantidades e tamanhos bastante inferiores aos dos cotilédones, tanto na BRS-Milênio quanto na BRS-Pajeú (Figura 6). Nota-se que no tempo de 72 horas em água destilada (0MPa), há uma redução bastante acentuada no conteúdo dessas estruturas, sendo observado que, em algumas células, praticamente não havia a sua presença. Essa resposta é observada nas duas cultivares (Figura 6B e 6E). Já no que diz respeito ao tempo de 72 horas no tratamento sob déficit hídrico (-0,2MPa), nota-se que a mobilização desses carboidratos nas

células do eixo embrionário da cultivar BRS-Pajeú foi inferior e mais retardada do que a BRS-Milênio (Figura 6C e 6F).

Figura 6 – Seções transversais de eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio (A, B, C) e BRS-Pajeú (D, E, F) coradas com Periodic Acid-Schiff (PAS). Sementes quiescentes (A, D) e com 72 horas da embebição em condição controle (B, E) e de estresse hídrico (C, F). Grânulos de amido (→).



Fonte: A autora.

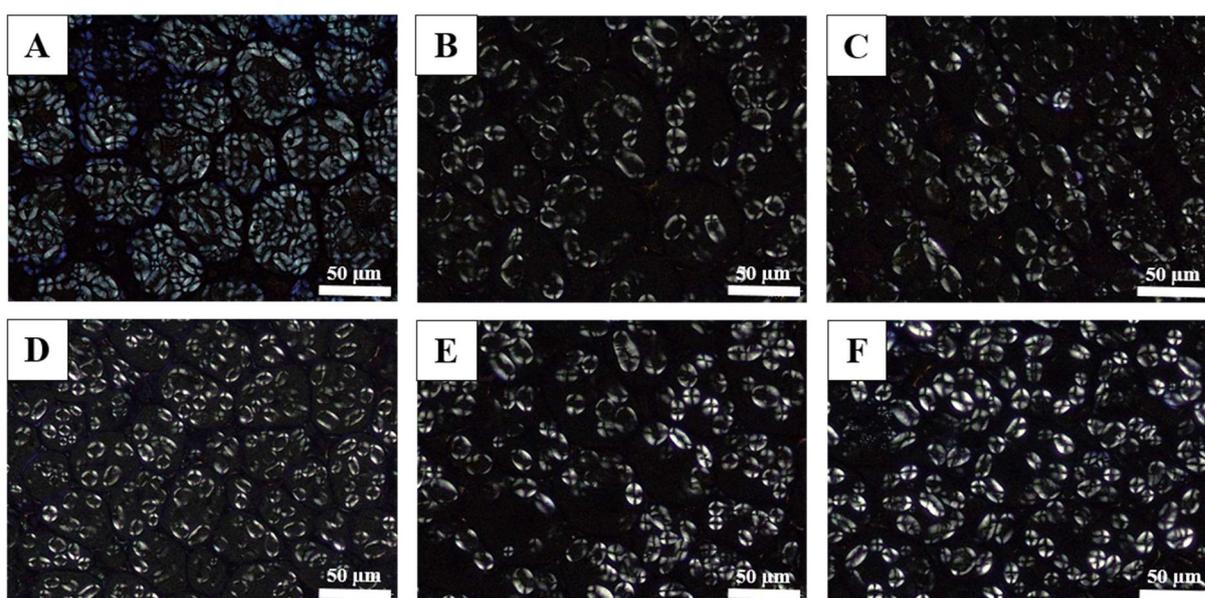
Resultados semelhantes foram encontrados por Magalhães et al. (2010) que, trabalhando com sementes de *Apuleia leiocarpa* durante a embebição, constataram que os teores de amido no eixo embrionário e cotilédones também decresceram, no entanto, essa redução aconteceu até 48 horas e, a partir daí, permaneceram estáveis em ambos os compartimentos.

O amido fornece glicose para ser utilizada tanto no processo de respiração, para gerar energia, quanto para compor estruturas físicas durante o crescimento do embrião na fase de germinação (MAGALHÃES et al., 2010). Essa utilização é variável e, dependendo da espécie, pode ocorrer tanto durante a germinação quanto no estágio de plântula (PONTES et al., 2002). Aparentemente, embora seja perceptível a mobilização de amido pelas células dos cotilédones, nota-se que o eixo embrionário utilizou mais rapidamente suas reservas durante a fase de germinação. Possivelmente, a reserva cotiledonar será intensamente exaurida quando o embrião se tornar de fato uma plântula.

A microscopia de polarização confirmou que o material corado com o PAS nos

cotilédones era, de fato, grânulos de amido. A Figura 7 mostra a birrefringência desses grânulos presentes no citoplasma das células cotiledonares de ambas as cultivares, onde percebe-se que há uma quantidade maior dessas estruturas nas sementes quiescentes, tendo em vista que a mobilização vai sendo realizada ao longo do tempo de embebição.

Figura 7 – Seções transversais de cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio (A, B, C) e BRS-Pajeú (D, E, F) submetidas à microscopia sob luz polarizada. Sementes quiescentes (A, D) e com 72 horas da embebição em condição controle (B, E) e de estresse hídrico (C, F).



Fonte: A autora.

Os grânulos de amido são compostos de regiões amorfas e cristalinas, cujas cadeias são mantidas unidas por pontes de hidrogênio (EVERT, 2013). Quando observados em microscópio sob luz polarizada, apresentam birrefringência, o que indica certo grau de organização molecular. A parte linear da molécula de amilopectina forma estruturas helicoidais duplas que dão origem às regiões cristalinas dos grânulos (SOUZA; ANDRADE, 2000). A refração por essas regiões do amido é que resulta em um modelo típico chamado de Cruz de Malta que é visualizado no microscópio óptico (MUCCILLO, 2009).

Já nas células do eixo embrionário, a utilização da luz polarizada não permitiu confirmar a existência de amido. A visualização pontual dos grânulos pode ter sido prejudicada tanto pelo conteúdo proteico presente no eixo embrionário, que pode ter se sobreposto aos grânulos, como também pelo tamanho reduzido dos amiloplastos. Resultados semelhantes foram constatados por ABUD et al. (2010), que trabalhando com *Carthamus tinctorius* não

puderam observar a presença de amido no citoplasma das células dos tecidos de reservas, devido à presença de glóbulos de proteínas que impediram o acesso das substâncias que identificam o amido.

#### **6.4 EXPERIMENTO 4: Avaliação da mobilização de reservas e dos mecanismos antioxidantes em sementes de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico durante a germinação**

Na análise de variância apresentada na Tabela 7, pode-se observar que, para o fator isolado Cultivares (C), apenas as variáveis carboidratos solúveis nos cotilédones (CSc), carboidratos solúveis nos eixos embrionários (CS<sub>EE</sub>) e N-aminossolúveis nos cotilédones (N-AMINO<sub>C</sub>) não sofreram influência significativa, enquanto que para os demais fatores isolados (potenciais osmóticos e tempos de embebição) todas as variáveis foram influenciadas significativamente, exceto o N-AMINO<sub>C</sub> para o fator tempos de embebição (TE). Para a interação dupla Cultivares x Potenciais osmóticos (C x PO), foi verificado que apenas as variáveis CSc, PS<sub>C</sub> e N-AMINO<sub>EE</sub> não sofreram influência dos fatores testados. Em relação às interações duplas C x TE e PO x TE, todas as variáveis foram influenciadas significativamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, com exceção do N-AMINO<sub>C</sub> para a interação C x TE e do N-AMINO<sub>EE</sub> na interação PO x TE. Em relação à interação tripla entre os fatores, constatou-se que apenas a variável N-AMINO<sub>C</sub> não foi influenciada significativamente.

Tabela 7 – Resumo da análise de variância para os teores de carboidratos solúveis em cotilédones (CS<sub>C</sub>) e eixos embrionários (CS<sub>EE</sub>), proteínas solúveis em cotilédones (PS<sub>C</sub>) e eixos embrionários (PS<sub>EE</sub>), N-aminossolúveis em cotilédones (N-AMINO<sub>C</sub>) e eixos embrionários (N-AMINO<sub>EE</sub>) e prolina livre em cotilédones (PL<sub>C</sub>) e eixos embrionários (PL<sub>EE</sub>) de sementes de feijão-caupi (cvs. Milênio e Pajeú) submetidas a condições controle e de estresse hídrico. Fortaleza – Ceará, 2019.

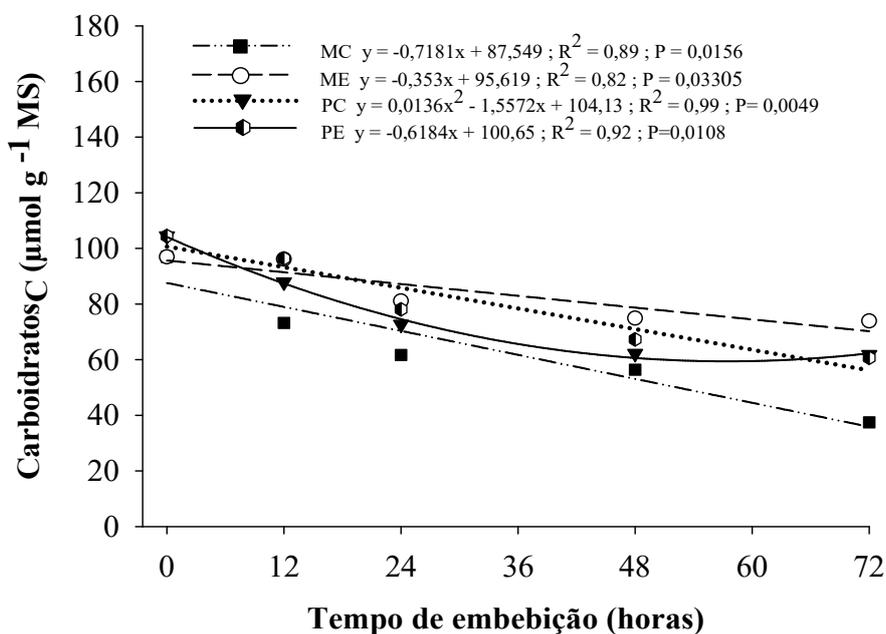
FV	GL	Quadrado Médio							
		CS <sub>C</sub>	CS <sub>EE</sub>	PS <sub>C</sub>	PS <sub>EE</sub>	N-AMINO <sub>C</sub>	N-AMINO <sub>EE</sub>	PL <sub>C</sub>	PL <sub>EE</sub>
Cultivares (C)	1	298,83 ns	289,79 ns	299,82**	8149,01**	1138,59 ns	3897,82*	23,40**	38,74**
Resíduo (C)	6	109,80	84,16	7,25	96,71	321,92	321,80	0,58	0,80
Potenciais Osmóticos (PO)	1	8449,92**	3079,66**	988,24**	3045,61**	3018,65**	2545,14*	78,60**	50,75**
Int. C x PO	1	4,64 ns	994,70**	14,29 ns	1940,10**	368,38*	197,39 ns	13,67**	2,89**
Resíduo (PO)	6	18,55	54,33	5,21	27,52	59,92	327,98	0,59	0,16
Tempos de Embebição (TE)	4	17645,93**	4105,88**	700,37**	569,73**	275,17 ns	11695,26**	46,50**	19,89**
Int. C x TE	4	613,07**	424,96**	132,44**	1249,01**	140,37 ns	1285,67**	3,22**	1,65**
Int. PO x TE	4	3349,26**	459,92**	600,23**	1036,10**	491,31**	361,11 ns	12,59**	7,73**
Int. C x PO x TE	4	2033,67**	334,49**	42,24**	653,94**	89,90 ns	1096,38*	2,46**	4,19**
Resíduo (TE)	48	92,4	74,34	4,87	25,10	124,10	296,21	0,30	0,40
Total	79	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	83,21	76,78	27,81	44,50	112,05	146,14	3,71	4,46
CV % (C)	-	12,59	11,95	9,68	22,10	16,01	12,28	20,61	19,97
CV % (PO)	-	5,18	9,60	8,21	11,79	6,91	12,39	20,66	8,87
CV % (TE)	-	11,55	11,23	7,94	11,46	9,98	11,78	14,76	14,11

FV = Fontes de Variação; GL = Grau de liberdade; CV = Coeficiente de variação; \*\* Significativo pelo teste F a 0,01; \* Significativo pelo teste F a 0,05; ns = não significativo. Fonte: A autora.

### 6.4.1 Carboidratos solúveis

Para os teores de carboidratos solúveis determinados nos cotilédones das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú (Figura 8), foram ajustadas três equações lineares decrescentes e uma equação polinomial do 2º grau, em que, de modo geral, verificou-se que as duas cultivares submetidas à solução de PEG 6000 (-0,2MPa) apresentaram maior retardo na mobilização dessa reserva quando comparadas com seus controles (água destilada 0MPa). Ao comparar as duas cultivares sob estresse, observa-se que, no último tempo analisado (72 horas), a BRS-Pajeú apresentou teor de carboidratos solúveis 17,94% inferior ao da BRS-Milênio, constando-se maior mobilização.

Figura 8 – Teores de carboidratos solúveis nos cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.



Fonte: A autora.

No tratamento com água destilada, a cultivar BRS-Milênio apresentou uma tendência linear decrescente com taxa de mobilização de  $0,72 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$  para cada aumento no tempo de embebição. Já sob déficit hídrico, essa taxa foi inferior, sendo de, aproximadamente,  $0,35 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ , ou seja, sob essa condição estressante, a cultivar

apresentou menor hidrólise de carboidratos (Figura 8).

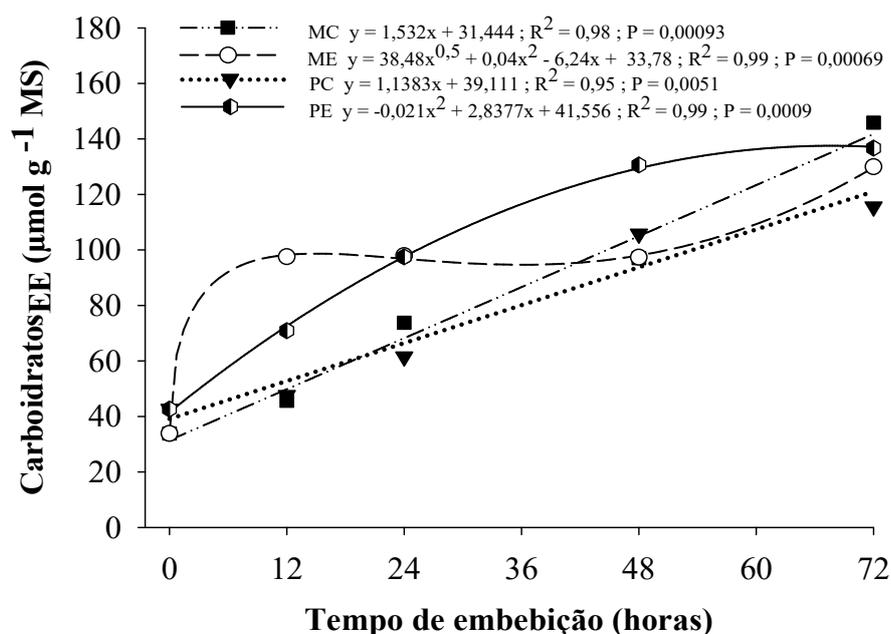
No que se refere à cultivar BRS-Pajeú, pode-se perceber que quando as sementes estavam sob o tratamento de 0MPa (água destilada), seus cotilédones apresentaram redução nos teores de carboidratos solúveis até determinado momento e depois apresentaram um leve aumento (não significativo) no tempo de 72h de embebição. O menor teor de carboidratos nos cotilédones foi de  $57,25 \mu\text{mol g}^{-1}$  MS, quando as sementes atingiram o tempo de 60 horas de embebição (período após emissão da radícula). Quando comparado com o ponto referente ao tempo 0 (sementes quiescentes), pode-se verificar uma redução de 45,19% no conteúdo de carboidratos solúveis (Figura 8).

Já para os cotilédones da cultivar BRS-Pajeú que estavam submetidos à concentração de -0,2MPa, a taxa de mobilização foi de  $0,62 \mu\text{mol g}^{-1}$  MS para cada aumento no tempo de embebição, apresentando uma tendência linear decrescente. Com esses dados verifica-se que mesmo sob condição estressante, a cultivar BRS-Pajeú permaneceu com alta taxa de mobilização de carboidratos quando comparada com a cultivar BRS-Milênio nessa mesma condição (Figura 8).

Resultados semelhantes foram encontrados por Magalhães et al. (2010), em que trabalhando com sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake, constataram a crescente mobilização de carboidratos dos cotilédones para o eixo embrionário durante o período de embebição. Já Pontes et al. (2002), trabalhando com *Apuleia leiocarpa*, observaram que os teores médios de carboidratos solúveis dos cotilédones não diferiram significativamente durante o período de embebição, mesmo tendo havido uma tendência de mobilização dessa reserva durante todos os períodos.

Em relação aos teores de carboidratos solúveis determinados nos eixos embrionários de ambas cultivares (Figura 9), foram ajustadas duas equações lineares crescentes e uma equação polinomial do 2º grau. Os dados da cultivar BRS-Milênio sob condição de déficit hídrico não se ajustaram a nenhuma dessas equações anteriormente mencionadas. De modo geral, observa-se que, diferentemente dos cotilédones, à medida que se aumentou as horas de embebição, houve uma tendência de aumento no conteúdo de carboidratos solúveis dos eixos embrionários das cultivares (Figura 9).

Figura 9 – Teores de carboidratos solúveis nos eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.



Fonte: A autora.

No tratamento com água destilada (Figura 9), a cultivar BRS-Milênio apresentou uma tendência linear crescente com acréscimo de  $1,532 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$  para cada aumento no tempo de embebição. Já sob déficit hídrico, houve aumento de 65,29% no conteúdo de carboidratos no tempo de 12 horas em relação ao tempo 0, permanecendo praticamente constante até o tempo de 48 horas, quando voltou novamente a aumentar os seus níveis apresentando, no tempo de 72 horas de embebição, um aumento de 73,95% em relação aos teores obtidos no tempo 0 (sementes quiescentes) e 10,93% inferior ao tratamento dessa mesma cultivar no tempo 72 horas em água destilada (0MPa).

No que concerne à cultivar BRS-Pajeú, pode-se perceber que quando as sementes estavam sob o tratamento de 0MPa (água destilada), seus eixos embrionários apresentaram aumentos lineares nos teores de carboidratos solúveis, cerca de  $1,138 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$  para cada aumento no tempo de embebição. Já no tratamento com -0,2MPa (solução de PEG 6000), o conteúdo de carboidratos dos eixos embrionários dessa mesma cultivar apresentou comportamento quadrático, obtendo ponto máximo de  $137,42 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$  no tempo de,

aproximadamente, 68 horas de embebição. Ao comparar com o ponto referente ao tempo 0 (sementes quiescentes), pode-se verificar um aumento de 68,96% no conteúdo de carboidratos solúveis (Figura 9).

De forma geral, o que se observa é que a quantidade de açúcares foi reduzida nos cotilédones o que pode evidenciar a sua mobilização para o eixo embrionário, onde os teores de carboidratos foram aumentados, havendo maior acúmulo ao longo do período de embebição. Os tratamentos que mais acumularam essa reserva nos eixos embrionários foram os submetidos à solução de PEG 6000, a qual simula déficit hídrico. Esse fato sugere que os carboidratos foram armazenados nas células como uma forma de evitar a perda de água e de assegurar fontes de carbono para a plântula, tendo em vista que são utilizados tanto na formação de componentes estruturais durante o crescimento, quanto como substrato para a respiração gerando energia (MARCOS FILHO, 2015).

Para manter a turgescência celular em condições de baixo potencial hídrico, um dos mecanismos fisiológicos mais eficazes é o ajustamento osmótico (PEREIRA et al., 2012). Esse mecanismo consiste no acúmulo de solutos compatíveis (carboidratos, aminoácidos, entre outros) no vacúolo ou no citosol, os quais contribuem para a manutenção do equilíbrio hídrico e para a preservação da integridade de proteínas e membranas celulares (ASHRAF et al., 2011; TAIZ et al., 2017). Esse acúmulo não é danoso ao metabolismo celular e, por aumentar a pressão osmótica no interior das células, mantêm a absorção de água e a pressão de turgor, o que é essencial para a continuidade dos processos fisiológicos (MARIJUAN; BOSCH, 2013; TAIZ et al., 2017).

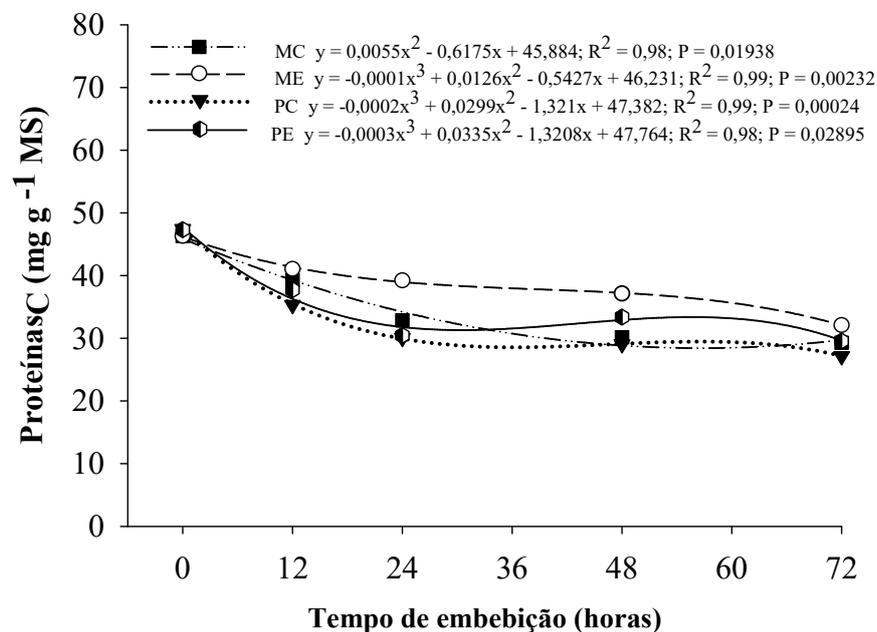
Pereira et al. (2012), trabalhando com genótipos de *Arachis hypogaea* L. submetidos a déficit hídrico moderado, verificaram que as concentrações de carboidratos diferiram entre as condições hídricas dos tratamentos, havendo ganho em três dos cinco genótipos avaliados. Na análise de amido, os autores também constataram que todos os genótipos apresentaram expressiva redução quando as plantas estavam em condição de estresse hídrico.

No presente trabalho, não foi realizada a quantificação dos teores de amido, no entanto, pela análise citoquímica fica evidente a redução na intensidade da reação do PAS ao longo do tempo de embebição nos tratamentos com déficit hídrico (Figuras 5 e 6). Segundo Kramer e Boyer (1995), várias espécies quando são submetidas à seca apresentam redução na concentração de amido para formar açúcares solúveis, ou seja, a diminuição na concentração de amido é acompanhada pelo aumento da concentração de carboidratos solúveis.

### 6.4.2 Proteínas solúveis

Para os teores de proteínas solúveis determinados nos cotilédones das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú (Figura 10), foram ajustadas três equações polinomiais do 3º grau e uma do 2º grau, em que, de modo geral, verificou-se que as duas cultivares submetidas à solução de PEG 6000 (-0,2MPa) apresentaram maior retardo na mobilização dessa reserva quando comparadas com seus controles (água destilada 0MPa). Ao comparar as duas cultivares sob estresse, observa-se que, em todos os tempos de embebição analisados (exceto o tempo 0), a BRS-Milênio apresentou teores de proteínas superiores aos da BRS-Pajeú em 8,13%, 22,35%, 10,13%, 7,92%, nos tempos 12, 24, 48 e 72, respectivamente, constatando-se assim, menor mobilização (Figura 10).

Figura 10 – Teores de proteínas solúveis nos cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.



Fonte: A autora.

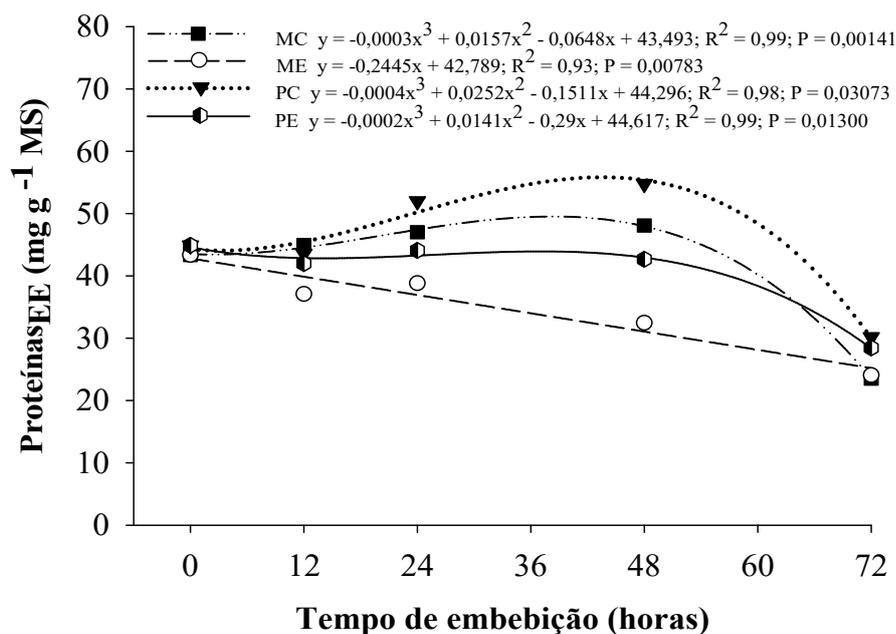
De modo geral, observa-se que nos tempos de 12 e 24 horas houve um maior declínio no conteúdo de proteínas dos cotilédones. Esses tempos compreendem ao período que antecede a fase II da germinação e a fase II propriamente dita, respectivamente, ou seja, compreendem aos períodos da germinação em que ocorrem tanto a síntese de novas proteínas

como também a sua digestão em partículas menores, como os aminoácidos (MARCOS FILHO, 2015). Neste caso, em específico, houve uma intensa mobilização dessa reserva, seguida de teores praticamente estacionários até o tempo de 48 horas, os quais foram sucedidos por uma redução no tempo de 72 horas. Esses decréscimos no conteúdo proteico também podem ser sustentados pela redução da intensidade da reação com XP apresentada no Experimento 3.

É importante destacar que essa mobilização acontece porque as reservas armazenadas nos cotilédones não podem ser transportadas de uma célula para outra, nem utilizadas para formação de estruturas como as paredes celulares e nem serem transferidas até os pontos de crescimento do embrião, antes de serem simplificadas, ou seja, transformadas em substâncias solúveis e difusíveis. No caso das proteínas, elas são convertidas em aminoácidos através da ação de enzimas chamadas proteases e peptidases (BEWLEY et al., 2013; MARCO FILHO, 2015).

Em relação aos teores de proteínas solúveis determinados nos eixos embrionários das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú (Figura 11), foram ajustadas uma equação linear decrescente e três equações polinomiais do 3º grau. De modo geral, observa-se que as sementes de ambas as cultivares submetidas à solução de PEG 6000 (-0,2MPa) apresentaram menores teores de proteínas solúveis quando comparadas com seus controles (água destilada 0MPa). Ao comparar as duas cultivares sob estresse, observa-se que, em todos os tempos de embebição analisados, a BRS-Pajeú apresentou teores de proteínas superiores aos da BRS-Milênio em 11,64%, 11,94%, 23,92%, 15,36%, nos tempos 12, 24, 48 e 72, respectivamente (Figura 11).

Figura 11 – Teores de proteínas solúveis nos eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.



Fonte: A autora.

Ao comparar a Figura 11 com a Figura 13, constata-se que, para a BRS-Milênio, os teores de proteínas solúveis e N-aminoácidos apresentam resultados inversamente proporcionais em resposta à deficiência hídrica, o que demonstra que esse estresse afetou negativamente a síntese de proteínas dessa cultivar. Já no que tange à BRS-Pajeú, percebe-se que ela tenta manter constante e com poucas reduções o seu conteúdo de proteínas, indicando que pode haver existência de síntese proteica, mesmo que em menores proporções.

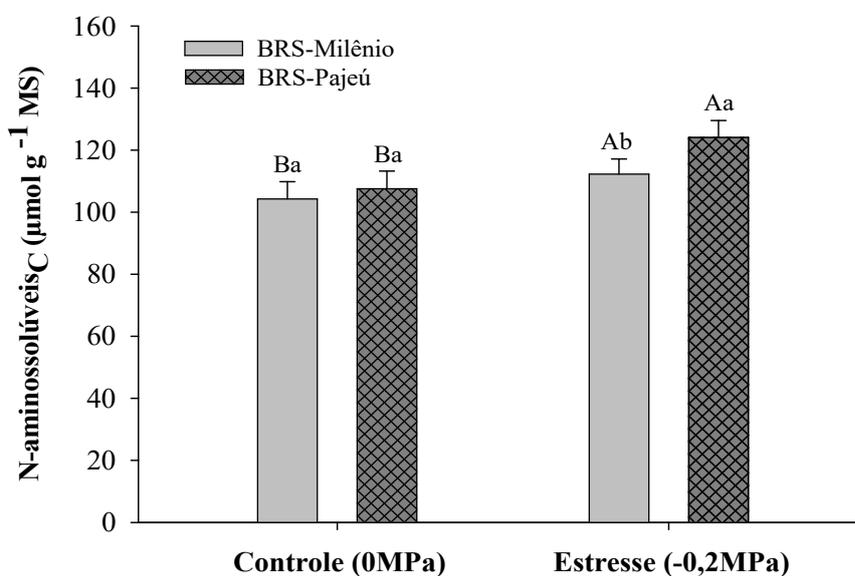
Após 48 horas de embebição, ocorre decréscimo nos teores de proteínas em todos os tratamentos. Esses períodos compreendem aos momentos finais da fase II da germinação (para as sementes submetidas a -0,2MPa) e a fase III (para as sementes submetidas a 0MPa), ou seja, compreendem ao período da germinação em que as proteínas estão sendo utilizadas na formação de tecidos vivos ou nas reações da cadeia respiratória (MARCOS FILHO, 2015). É importante ressaltar que, nos tempos iniciais da embebição em água destilada (0MPa), o aumento no teor de proteínas dos eixos de ambas as cultivares indica síntese proteica, provavelmente para posterior formação das estruturas da plântula.

Resultados semelhantes foram encontrados por Santos et al. (2019), que verificaram aumento do teor de proteínas após 24 h de embebição em sementes de *Pterogyne nitens*. Bewley et al. 2013, explicam que a síntese de novas proteínas durante o processo de germinação depende do fornecimento de aminoácidos apropriados derivados da decomposição de proteínas previamente formadas durante o desenvolvimento e armazenamento.

#### 6.4.3 N-aminossolúveis

Para os teores de N-aminossolúveis nos cotilédones (Figura 12), observou-se que ambas as cultivares de feijão-caupi apresentaram maior acúmulo significativo quando foram submetidas ao tratamento de -0,2MPa (déficit hídrico), e que neste a cultivar BRS-Pajeú apresentou teor significativamente superior ao da BRS-Milênio, cerca de 9,54%. Ao compará-lo com os níveis apresentados no tratamento controle (0MPa), nota-se um acréscimo de 13,37% no conteúdo de N-aminossolúveis.

Figura 12 – Teores de N-aminossolúveis nos cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em condição controle (0MPa) e em solução de PEG 6000 (-0,2MPa). Fortaleza – CE, 2019.

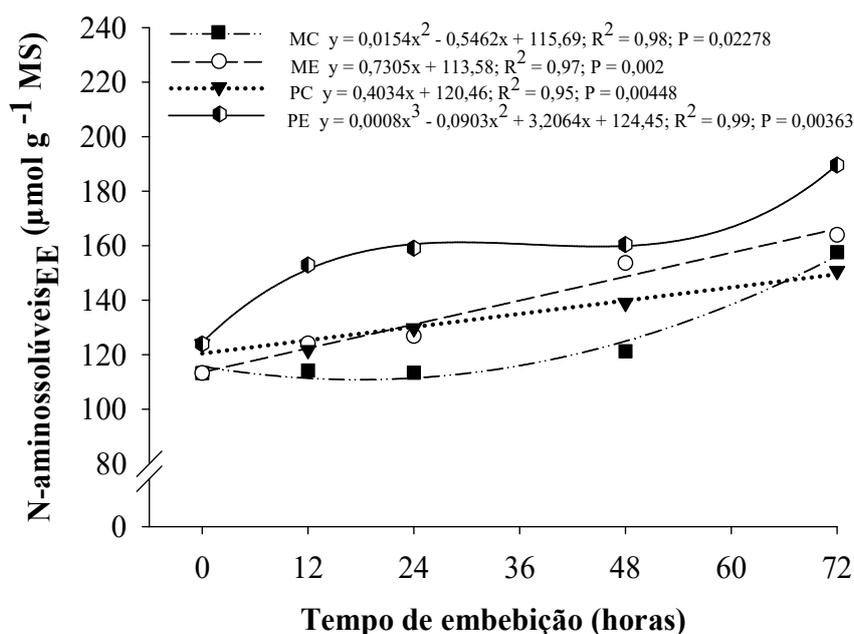


Médias seguidas pela mesma letra minúscula (cultivares) e maiúscula (estresse) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott  $P < 0,05$ . Fonte: A autora.

Em relação aos teores de N-aminossolúveis determinados nos eixos embrionários de ambas as cultivares (Figura 13), foram ajustadas duas equações lineares crescentes e duas

equações polinomiais (uma do 2º e outra do 3º grau). De modo geral, observa-se que à medida que se aumentou as horas de embebição, houve uma tendência de aumento no conteúdo de N-aminossolúveis dos eixos embrionários das cultivares, tanto em situação controle como em situação de déficit hídrico. Ao comparar as duas cultivares sob estresse, observa-se que, em todos os tempos de embebição analisados, a BRS-Pajeú apresentou teores de N-aminossolúveis superiores aos da BRS-Milênio em 18,83%, 20,27%, 4,21%, 13,51%, nos tempos 12, 24, 48 e 72, respectivamente (Figura 13).

Figura 13 – Teores de N-aminossolúveis nos eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.



Fonte: A autora.

No tratamento com água destilada, os eixos embrionários da cultivar BRS-Milênio apresentaram uma redução nos teores de N-aminossolúveis nas primeiras 24 horas de embebição e, em seguida, exibiu aumento até o tempo de 72 horas, onde atingiu ponto de máximo acúmulo dessa reserva (157,61 µmol g<sup>-1</sup> MS). Ao comparar com o tempo 0 (sementes quiescentes), pode-se verificar um aumento de 28,13% no conteúdo de N-aminossolúveis (Figura 13). Já sob déficit hídrico, houve aumentos lineares nos teores de N-aminossolúveis, cerca de 0,73 µmol g<sup>-1</sup> MS para cada aumento no tempo de embebição. Vale ressaltar que em

todos os tempos avaliados, exceto o tempo 0, os teores de N-aminossolúveis dos eixos embrionários sob déficit hídrico apresentaram-se superiores aos do tratamento com água destilada.

No que tange à cultivar BRS-Pajeú (Figura 13), pode-se perceber que quando as sementes estavam sob o tratamento de 0MPa (água destilada), seus eixos embrionários apresentaram aumentos lineares nos teores de N-aminossolúveis, cerca de  $0,40 \mu\text{mol g}^{-1}$  MS para cada aumento no tempo de embebição. Já no tratamento com  $-0,2\text{MPa}$  (solução de PEG 6000), o conteúdo de carboidratos dos eixos embrionários dessa mesma cultivar apresentou-se superior aos demais tratamentos nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas, e, neste último, alcançou ponto máximo de  $189,58 \mu\text{mol g}^{-1}$  MS, cerca de 34,62% superior aos teores obtidos no tempo 0 (sementes quiescentes).

Essa elevação dos teores de N-aminossolúveis nos embriões (cotilédones e eixos embrionários) sob concentração osmótica de  $-0,2\text{MPa}$  pode ser decorrente da restrição na síntese proteica, ocasionada devido à situação de estresse hídrico que afeta todo o seu processo bioquímico, e da atividade de enzimas proteolíticas. Essas enzimas são responsáveis por quebrar as ligações peptídicas entre os aminoácidos que constituem as proteínas e isso pode resultar na elevação e no acúmulo de aminoácidos solúveis, os quais podem ser utilizados pelas células com o intuito de se ajustarem osmoticamente ao meio estressante em que estão inseridas (LECHINOSKI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2013).

Além disso, o acúmulo desse soluto pode também auxiliar na estabilização de proteínas e membranas, bem como servir como reserva de carbono e nitrogênio em condições adversas (OLIVEIRA et al., 2010). Muitos estudos têm evidenciado o acúmulo de aminoácidos como osmoprotetor em plantas expostas a vários estresses abióticos, as protegendo contra espécies reativas de oxigênio geradas pelo estresse oxidativo secundário (ZHU, 2003). No entanto, poucos são os trabalhos que investigam esse acúmulo nas fases iniciais da germinação (PRAXEDES et al., 2009; LUGAN et al., 2010; CALVET et al., 2012). Diante dessas características, o acúmulo de N-aminossolúveis pode ser considerado como um sinal de tolerância ao déficit hídrico (SZEGLETES et al., 2000).

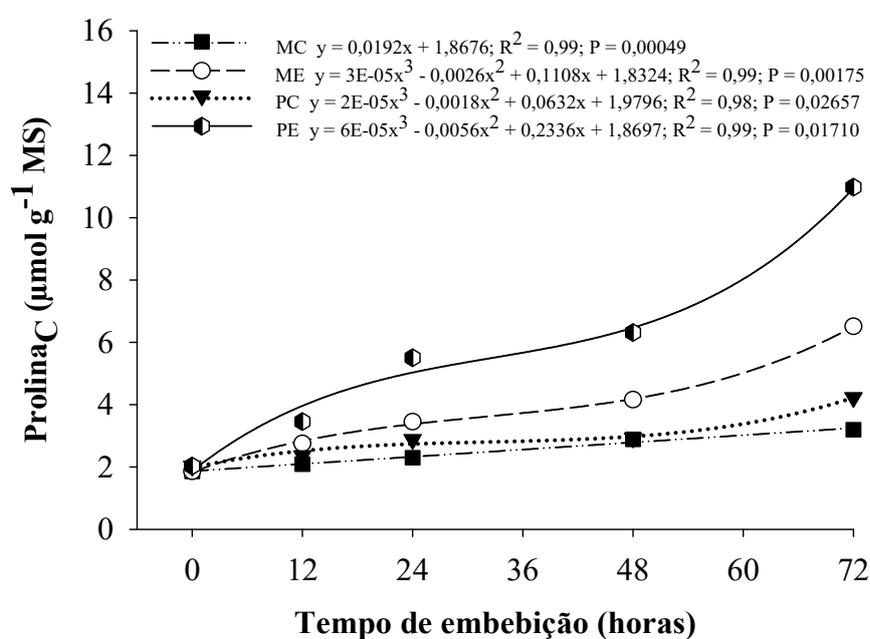
Acredita-se, desta forma, que esse maior acúmulo de aminoácidos no embrião após a emissão da radícula (30 horas de embebição em PEG 6000) seja uma alternativa encontrada para absorver maior quantidade de água do substrato e garantir a sobrevivência do eixo embrionário e, posteriormente, da plântula com as reservas armazenadas. Ou seja, enquanto as sementes sob déficit hídrico investem sua energia em processos metabólicos para a garantia de

sua sobrevivência, as que estavam em água destilada (0MPa) utilizam suas reservas para o pleno desenvolvimento e crescimento do embrião.

#### 6.4.4 Prolina livre

Para os teores de prolina determinados nos cotilédones das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú (Figura 14), foram ajustadas três equações polinomiais do 3º grau e uma equação linear crescente. De modo geral, comparando com seus controles (água destilada 0MPa), verificou-se que os cotilédones das duas cultivares que estavam submetidos à solução de PEG 6000 (-0,2MPa) apresentaram maior acúmulo desse aminoácido em todos os tempos de embebição. Ao comparar os cotilédones das duas cultivares sob estresse, observa-se que, os da BRS-Pajeú apresentaram-se superiores aos da BRS-Milênio em 20,35%, 37,27%, 34,11% e 40,66% nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas de embebição, respectivamente (Figura 14).

Figura 14 – Teores de prolina nos cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.



Fonte: A autora.

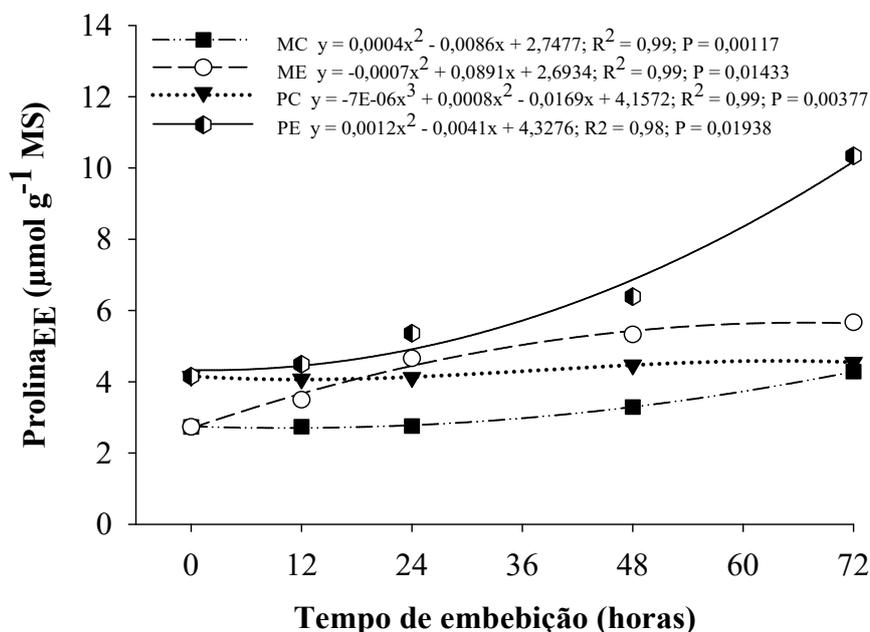
No tratamento com água destilada, a cultivar BRS-Milênio apresentou uma tendência linear com incrementos de 0,0192 µmol g⁻¹ MS para cada aumento no tempo de

embebição. No tratamento sob déficit hídrico, pôde-se verificar que até o tempo 48 horas os incrementos nos teores de prolina não foram significativos, no entanto, no tempo de 72 horas, quando comparado com o ponto referente ao tempo 0 (sementes quiescentes), houve um aumento de 71,47%. Ao comparar os teores nas duas condições, percebe-se que, quando submetidos ao déficit hídrico (-0,2MPa), os cotilédones apresentaram maior acúmulo de prolina nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas, sendo superiores à condição controle (0MPa) em 23,98%, 33,41%, 30,55% e 50,94%, respectivamente (Figura 14).

No que se refere à cultivar BRS-Pajeú, pode-se perceber que quando as sementes estavam sob o tratamento de 0MPa (água destilada), seus cotilédones apresentaram um incremento de 52,05% no tempo de 72 horas de embebição, quando comparado com o ponto referente ao tempo 0 (sementes quiescentes). Já para os cotilédones que estavam submetidos à concentração de -0,2MPa, esse incremento no tempo de 72 horas em relação ao tempo 0 (sementes quiescentes) é ainda maior, ficando em torno de 81,52%. Ao comparar os teores de prolina nas duas condições, percebe-se que, quando submetidos ao déficit hídrico (-0,2MPa), os cotilédones apresentaram maior acúmulo em todos os tempos de embebição, sendo superiores à condição controle (0MPa) em 31,66%, 47,65%, 53,55% e 61,47%, respectivamente (Figura 14).

Em relação aos teores de prolina determinados nos eixos embrionários de ambas cultivares (Figura 15), foram ajustadas quatro equações polinomiais (três do 2º e uma do 3º grau). De modo geral, observa-se que à medida que se aumentou as horas de embebição, houve uma tendência de aumento no conteúdo de prolina dos eixos embrionários das cultivares, tanto em situação controle como em situação de déficit hídrico. Ao comparar as duas cultivares sob estresse, observa-se que, em todos os tempos de embebição analisados, a BRS-Pajeú apresentou teores de prolina superiores aos da BRS-Milênio em 22,24%, 13,12%, 16,64% e 45,20%, nos tempos 12, 24, 48 e 72, respectivamente (Figura 15).

Figura 15 – Teores de prolina nos eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.



Fonte: A autora.

No tratamento com água destilada, o conteúdo de prolina da cultivar BRS-Milênio apresentou comportamento quadrático, obtendo ponto mínimo de  $2,70 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$  no tempo de, aproximadamente, 11 horas de embebição. Ao comparar com o ponto referente ao tempo 72 horas (maior acúmulo), pode-se verificar um aumento de 36,97% no conteúdo de prolina. No tratamento sob déficit hídrico, o conteúdo de prolina também apresentou comportamento quadrático, obtendo ponto de máximo acúmulo ( $5,53 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ ) no tempo de, aproximadamente, 64 horas de embebição. Ao comparar os teores de prolina nas duas condições, percebe-se que, quando submetidos ao déficit hídrico (-0,2MPa), os eixos embrionários apresentaram maior acúmulo nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas, sendo superiores à condição controle (0MPa) em 21,50%, 40,78%, 38,19% e 24,35%, respectivamente (Figura 15).

No que se refere à cultivar BRS-Pajeú, pode-se perceber que quando as sementes estavam sob o tratamento de 0MPa (água destilada), o teor de prolina de seus eixos embrionários permaneceram praticamente constantes até o tempo de 72 de embebição, onde alcançou incremento máximo de 8,67%, quando comparado com o ponto referente ao tempo 0

(sementes quiescentes). Já para os cotilédones que estavam submetidos à concentração de -0,2MPa, esse incremento no tempo de 72 horas em relação ao tempo 0 (sementes quiescentes) é bem maior, ficando em torno de 59,84%. Ao comparar os teores de prolina nas duas condições, percebe-se que, quando submetidos ao déficit hídrico (-0,2MPa), os cotilédones apresentaram maior acúmulo em todos os tempos de embebição, sendo superiores à condição controle (0MPa) em 9,21%, 23,17%, 30,00% e 56,03%, respectivamente (Figura 15).

Essa elevação dos teores de prolina nos embriões (cotilédones e eixos embrionários) em razão da redução da disponibilidade hídrica, pode estar relacionada ao ajustamento osmótico, resposta de tolerância à seca que proporciona a manutenção do conteúdo de água das células com o intuito de manter a turgescência e os processos relacionados, tais como crescimento e alongamento celular (MOTA et al., 2016). Segundo Filippou et al. (2014), o acúmulo desse soluto ocorre pela síntese “de novo” ou pela inibição do processo de oxidação da prolina.

Monteiro et al. (2014), trabalhando com plântulas de *Cajanus cajan* submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena, constataram que o aumento da deficiência hídrica resultou em incrementos lineares de 8,04 e 7,99  $\mu\text{mol g}^{-1}$  nos teores de prolina na parte aérea e nas raízes, respectivamente. A constatação de que teores aumentados de prolina atenuam os efeitos do estresse hídrico já são bastantes estudados (CVIKROVÁ et al., 2013), no entanto pouco se sabe sobre esse acúmulo nas estruturas das sementes durante o processo de germinação.

Devido à sua sensibilidade de resposta a condições de estresse, alguns autores consideram a prolina como o principal soluto compatível em plantas sob restrição hídrica (JOHARI-PIREIVATLOU et al., 2010; ASHRAF et al., 2011). Contudo, a função da prolina em resposta ao déficit hídrico ainda é questionada e não se sabe se esse acúmulo sempre ocorre (TROVATO et al., 2008; SZÁBADOS ET al., 2011).

#### **6.4.5 Sistema antioxidativo de defesa**

De acordo com a análise de variância apresentada na Tabela 8, pode-se observar que para os fatores isolados Cultivares (C), Potenciais osmóticos (PO) e Tempos de embebição (TE), todas as variáveis foram influenciadas significativamente pelos tratamentos testados, exceto a atividade da catalase nos eixos embrionários ( $CAT_{EE}$ ) para o fator Cultivares. Em relação às interações duplas (C x PO, C x TE e PO x TE), constatou-se que apenas as variáveis  $CAT_C$  (atividade da catalase nos cotilédones) e  $CAT_{EE}$  não sofreram influência na interação C

x PO. Para a interação tripla foi verificado que apenas a variável  $CAT_{EE}$  não foi influenciada pelos tratamentos testados enquanto que as demais sofreram influência ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 8 – Resumo da análise de variância para a atividade da catalase em cotilédones ( $CAT_C$ ) e eixos embrionários ( $CAT_{EE}$ ) e da peroxidase do ascorbato em cotilédones ( $APX_C$ ) e eixos embrionários ( $APX_{EE}$ ) de sementes de feijão-caupi (cvs. Milênio e Pajeú) submetidas a condições controle e de estresse hídrico. Fortaleza – Ceará, 2019.

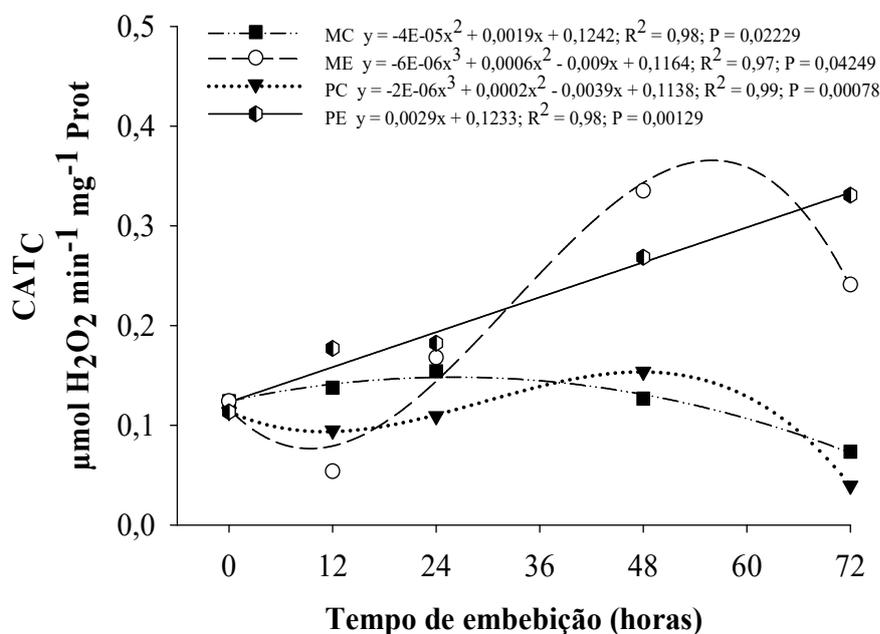
Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio			
		$CAT_C$	$CAT_{EE}$	$APX_C$	$APX_{EE}$
Cultivares (C)	1	0,01953**	0,00002 ns	0,133660**	0,03004*
Resíduo (C)	6	0,00074	0,0002	0,002031	0,00394
Potenciais osmóticos (Po)	1	0,04908**	0,01099**	0,147710**	0,18965**
Int. C x Po	1	0,00175 ns	0,00065 ns	0,035482**	0,03136*
Resíduo (Po)	6	0,00072	0,00021	0,001463	0,00521
Tempos de embebição (TE)	4	0,04643**	0,18996**	0,187526**	0,27017**
Int. C x TE	4	0,00712**	0,00639**	0,031911**	0,02854**
Int. Po x TE	4	0,09663**	0,00469**	0,189991**	0,03756**
Int. C x Po x TE	4	0,03000**	0,00043 ns	0,072312**	0,01458**
Resíduo (TE)	48	0,00118	0,00031	0,002211	0,00384
Total	79	-	-	-	-
Média Geral	-	0,167	0,107	0,27	0,30
CV % (C)	-	16,30	13,33	17,02	20,77
CV % (Po)	-	16,11	13,67	14,44	23,89
CV % (T)	-	20,64	16,46	17,75	20,50

GL = Grau de liberdade; CV = Coeficiente de variação; \*\* Significativo pelo teste F a 0,01; \* Significativo pelo teste F a 0,05; ns = não significativo. Fonte: A autora.

#### 6.4.5.1 Atividade da Catalase ( $CAT$ , EC 1.11.1.6)

Para a atividade da catalase ( $CAT$ ) determinada nos cotilédones das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú (Figura 16), foram ajustadas três equações polinomiais (uma do 2º e duas do 3º grau) e uma equação linear crescente. De modo geral, quando comparados com seus controles (água destilada 0MPa), verificou-se que os cotilédones das duas cultivares submetidas à solução de PEG 6000 (-0,2MPa) apresentaram maior atividade significativa dessa enzima a partir do tempo de 24 horas (Figura 16).

Figura 16 – Atividade da catalase (CAT) nos cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.



Fonte: A autora.

No tratamento com água destilada, a atividade enzimática dos cotilédones da cultivar BRS-Milênio seguiu um comportamento quadrático, apresentando um leve aumento até o tempo de 24 horas (ponto máximo  $0,1919 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$ ) e, em seguida, uma redução até o tempo de 72 horas de embebição, onde atingiu seu ponto de menor atividade ( $0,074 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$ ). Já sob déficit hídrico, percebe-se que houve uma redução dessa atividade no tempo de 12 horas, seguido de um aumento de 64,98% até 48 horas, o qual foi sucedido por um decréscimo de 28,06% no tempo de 72 horas de embebição. Ao compará-los nas duas condições, percebe-se que, quando submetidos ao déficit hídrico (-0,2MPa), os cotilédones apresentaram maior atividade da catalase, sendo superiores à condição controle (0MPa) em 8,15%, 62,15% e 69,48% nos tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 16).

No que se refere aos cotilédones da cultivar BRS-Pajeú, pode-se perceber que quando as sementes estavam sob o tratamento de 0MPa (água destilada), seus cotilédones apresentaram uma redução na atividade da catalase no tempo de 12 horas, seguido de um aumento de 38,27% até 48 horas, o qual foi sucedido por um decréscimo de 74,27% no tempo de 72 horas de embebição. Já no tratamento com -0,2MPa (solução de PEG 6000), a atividade

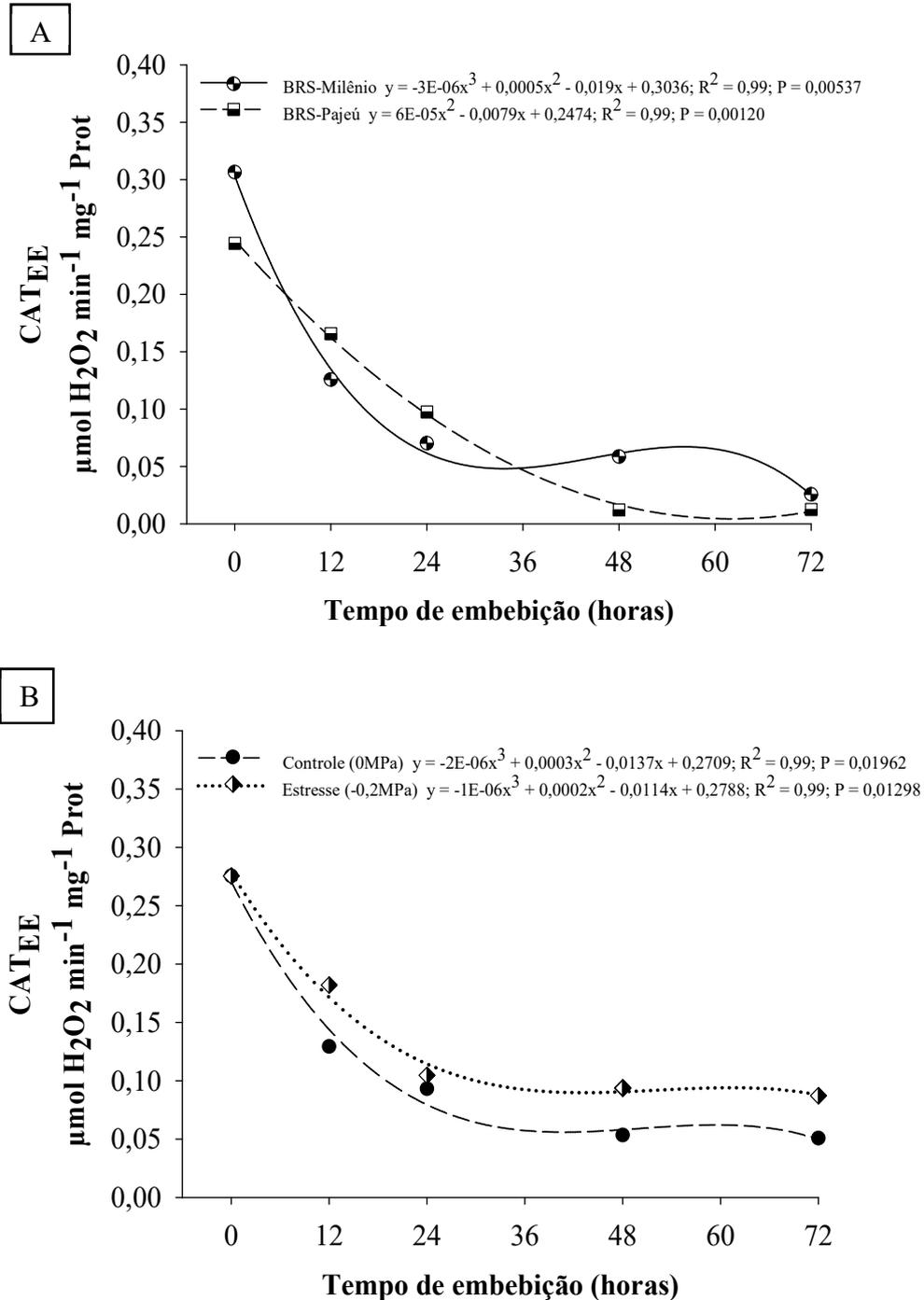
dessa enzima nos cotilédones apresentou comportamento linear com acréscimos de 0,0029  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$  para cada aumento no tempo de embebição. Ao compará-los nas duas condições, percebe-se que, quando submetidos ao déficit hídrico (-0,2MPa), os cotilédones apresentaram maior atividade da catalase, sendo superiores à condição controle (0MPa) em 46,36%, 40,04%, 42,68% e 88,03% nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 16).

Ao comparar os cotilédones das duas cultivares sob estresse (Figura 16), observa-se que, os da BRS-Milênio apresentaram maior atividade da catalase apenas no tempo de 48 horas de embebição, ficando 19,92% acima da atividade desempenhada nos cotilédones da BRS-Pajeú. Em contrapartida, a atividade da catalase nos cotilédones da BRS-Pajeú mostrou-se superior aos da BRS-Milênio em 69,57%, 7,84% e 27,06% nos tempos 12, 24 e 72 horas, respectivamente, apresentando uma maior eficiência na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Essa alta atividade da catalase é comum em plantas que estão submetidas a condições estressantes, sejam elas hídricas, salinas, térmicas e etc., uma vez que se caracteriza como meio alternativo para a conversão de EROs, como o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , em água e oxigênio molecular, evitando assim, danos às estruturas celulares que estão sob restrição hídrica (REDDY et al., 2004; DUBEY, 2011). Acredita-se que essa elevação na atividade da catalase em função do tempo de embebição esteja relacionada com o aumento na produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  decorrentes da intensificação do processo de respiração das células, o qual naturalmente já é aumentado devido ao fato da semente estar próximo de emitir sua radícula, correspondendo à fase III da germinação onde há o crescimento visível do eixo embrionário.

Em relação à atividade da catalase (CAT) determinada nos eixos embrionários das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú, pode-se observar que ela foi influenciada pela interação entre os seguintes fatores: cultivares x tempos de embebição (Figura 17A) e potenciais osmóticos x tempos de embebição (Figura 17B). Para o efeito conjunto das cultivares e dos tempos de embebição, foram ajustadas duas equações polinomiais (uma do 2º e outra do 3º grau), onde demonstraram que houve uma tendência de redução na atividade dessa enzima à medida em que se aumentou as horas de embebição. Percebe-se que a atividade da CAT nos eixos embrionários da cultivar BRS-Milênio no tempo 0 (sementes quiescentes) iniciam mais altos, ficando inferiores aos da BRS-Pajeú em 24,19% e 27,97%, nos tempos de 12 e 24 horas, e voltando a serem superiores em 79,35% e 51,36% nos tempos de 48 e 72 horas de embebição (Figura 17A).

Figura 17 – Atividade da catalase (CAT) nos eixos embrionários de sementes de feijão-caupi comparando entre si as duas cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú (A) e os dois potenciais osmóticos (B) em função dos tempos de embebição. Fortaleza – CE, 2019.



Fonte: A autora.

Na Figura 17B, observa-se o efeito conjunto dos potenciais osmóticos e dos tempos de embebição na atividade da catalase nos eixos embrionários. Os dados se ajustaram a duas

equações polinomiais do 3º grau e também demonstraram que houve uma tendência de redução na atividade dessa enzima à medida em que se aumentou as horas de embebição. Percebe-se que, mesmo tendo reduzido ao longo dos tempos de embebição, no tratamento a -0,2MPa (déficit hídrico), a atividade da CAT nos eixos embrionários foi mais alta, sendo superior ao tratamento de 0MPa (água destilada) em 28,90%, 10,98%, 42,96% e 41,63% nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas de embebição, respectivamente.

De acordo com esses resultados, pode-se sugerir que, possivelmente, os eixos embrionários de ambas as cultivares sofreram estresse oxidativo, uma vez que a atividade da enzima antioxidante catalase no tratamento sob déficit hídrico foi significativamente superior ao do tratamento com água destilada a 0MPa. A redução na atividade da catalase ao longo dos tempos avaliados pode indicar que, nos eixos embrionários sob condições de estresse, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pode estar sendo mais consumido em processos oxidativos com substratos orgânicos, como lipídeos e proteínas, do que sendo eliminado do metabolismo pela ação da enzima (BARBOSA et al., 2014). Diante dessa suposição, a proteína contida no citoplasma das células sob estresse pode não estar sendo utilizada de forma efetiva para atender às necessidades do eixo embrionário, mas sim sendo degradadas e oxidadas pela ação de EROs, assim como pode estar havendo peroxidação dos lipídios de membrana.

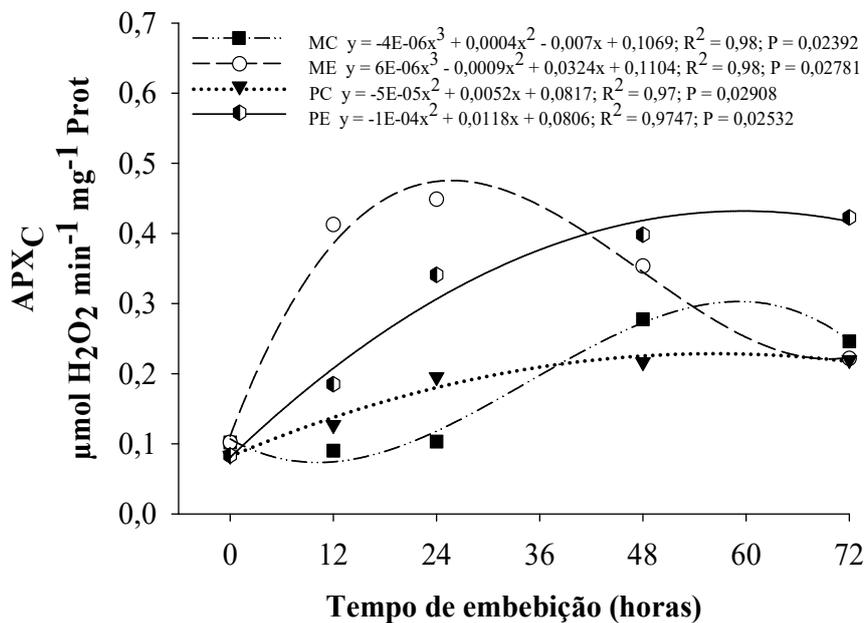
Carneiro et al. (2011), trabalhando com vários níveis de estresse hídrico em sementes de girassol, observaram que não houve diferença significativa na atividade antioxidante da CAT nos níveis -0,2 e -0,4MPa, no entanto, no nível de -0,8MPa houve uma queda na atividade dessa enzima, o que sugere que tenha ocasionado um excessivo estresse hídrico nas plântulas. A atividade da CAT é efetiva, principalmente, em concentrações relativamente altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por isso são consideradas indispensáveis para a desintoxicação de EROs, especialmente em condições de estresse severo (DUBEY, 2011; SHARMA et al., 2012).

#### *6.4.5.2 Atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX, EC 1.11.11.1)*

Para a atividade da peroxidase do ascorbato (APX) determinada nos cotilédones das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú (Figura 18), foram ajustadas quatro equações polinomiais (duas do 2º e duas do 3º grau). De modo geral, quando comparados com seus controles (água destilada 0MPa), verificou-se que os cotilédones da cultivar BRS-Milênio submetidos à solução de PEG 6000 (-0,2MPa) apresentaram maior atividade significativa dessa enzima no tempo 12, 24 e 48 horas, no entanto, no tempo de 72 horas essa atividade foi inferior. Já no que concerne aos cotilédones da cultivar BRS-Pajeú submetidos à solução de PEG 6000 (-0,2MPa), estes

apresentaram atividades superiores aos seus controles em todos os tempos de embebição avaliados (Figura 18).

Figura 18 – Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) nos cotilédones de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.



Fonte: A autora.

No que tange ao tratamento com água destilada, a atividade enzimática dos cotilédones da cultivar BRS-Milênio apresentou uma leve redução no tempo de 12 horas e, em seguida, aumentou cerca de 63,29% até o tempo de 48 horas, reduzindo novamente 11,31% no tempo de 72 horas de embebição. Já sob déficit hídrico, percebe-se que houve aumento de 77,29% nessa atividade ao final do tempo de 24 horas, que foi sucedido por um decréscimo de 21,24% e 50,59% nos tempos de 48 e 72 horas de embebição. Ao compará-los nas duas condições, percebe-se que, quando submetidos ao déficit hídrico (-0,2MPa), os cotilédones apresentaram maior atividade da APX nos tempos de 12, 24 e 48 horas, sendo superiores à condição controle (0MPa) em 78,13%, 77,00% e 21,45%, respectivamente (Figura 18).

No que se refere aos cotilédones da cultivar BRS-Pajeú, pode-se perceber que quando as sementes estavam sob o tratamento de 0MPa (água destilada), a atividade enzimática da APX apresentou um comportamento quadrático, alcançando ponto máximo de 0,2169 μmol

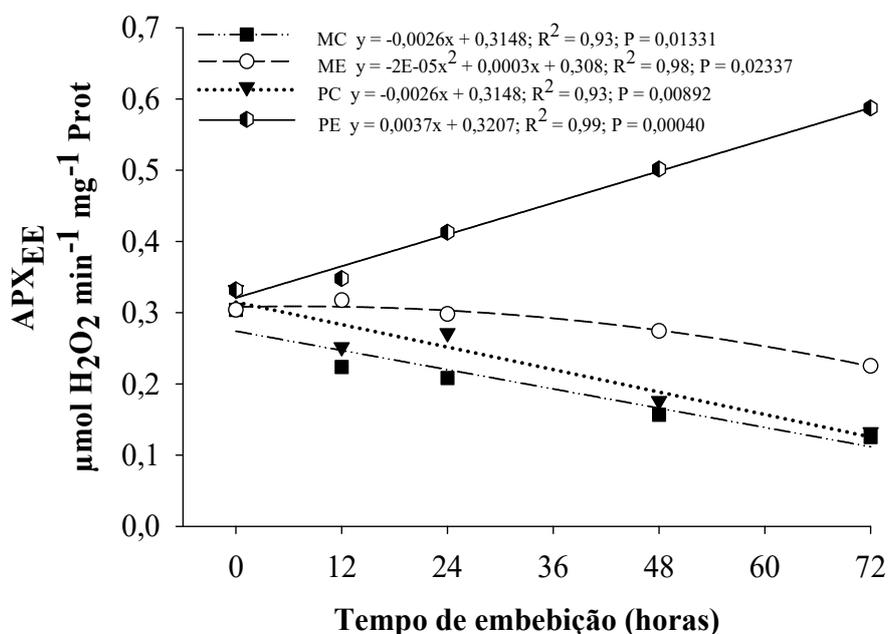
$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$  no tempo de 52 horas de embebição. Ao comparar com o ponto referente ao tempo 0 (sementes quiescentes), pode-se verificar um aumento de 61,64% na atividade dessa enzima. No tratamento com -0,2MPa (solução de PEG 6000), a atividade da APX nos cotilédones também apresentou comportamento quadrático, obtendo ponto máximo de 0,4287  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$  no tempo de 59 horas de embebição. Ao comparar com o ponto referente ao tempo 0 (sementes quiescentes), pode-se verificar um aumento de 80,59% na atividade dessa enzima. Ao compará-los nas duas condições, percebe-se que, quando submetidos ao déficit hídrico (-0,2MPa), os cotilédones apresentaram maior atividade da APX, sendo superiores à condição controle (0MPa) em 31,31%, 43,00%, 45,59% e 48,03% nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 18).

Ao comparar os cotilédones das duas cultivares sob estresse (Figura 18), observa-se que, os da BRS-Milênio apresentaram maior atividade da APX nos tempos de 12 e 24 horas de embebição, ficando 55,18% e 24,02%, respectivamente, acima da atividade desempenhada nos cotilédones da BRS-Pajeú, mostrando, dessa forma, que nesses tempos avaliados, houve maior eficiência na desintoxicação de EROs. Em contrapartida, nos tempos 48 e 72 horas, a atividade da APX nos cotilédones da BRS-Milênio mostrou-se inferior aos da BRS-Pajeú em 11,23% e 47,56%, respectivamente, apresentando menor eficiência na desintoxicação e possível acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 18).

Com o aumento das taxas respiratórias que ocorre pouco antes e/ou após a emergência da radícula, a formação de EROs é intensificada e sua eliminação deve ocorrer de forma constante para evitar o estresse oxidativo (DEUNER et al., 2011). Ao observar a Figura 18, pode-se constatar que, para as cultivares no tratamento com água destilada (0MPa), após 30 horas de embebição (período de início da fase III da germinação) há o aumento na atividade da enzima APX, a qual pode ser ocasionada pelo aumento do metabolismo e da intensidade respiratória das células.

Para a atividade da APX determinada nos eixos embrionários das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú (Figura 19), foram ajustadas três equações lineares e uma equação polinomial do 2º grau. De modo geral, quando comparados com seus controles (água destilada 0MPa), verificou-se que, em todos os tempos de embebição, os eixos embrionários das duas cultivares submetidas à solução de PEG 6000 (-0,2MPa) apresentaram-se com maior atividade enzimática (Figura 19).

Figura 19 – Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) nos eixos embrionários de sementes de feijão-caupi das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú em função dos tempos de embebição. MC: BRS-Milênio em água destilada; ME: BRS-Milênio em solução com -0,2MPa (PEG 6000); PC: BRS-Pajeú em água destilada; PE: BRS-Pajeú em solução com -0,2MPa (PEG 6000). Fortaleza – CE, 2019.



Fonte: A autora.

No que concerne ao tratamento com água destilada, a atividade enzimática dos eixos embrionários da cultivar BRS-Milênio apresentou um comportamento linear decrescente, com decréscimos de  $0,0026 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$  para cada aumento no tempo de embebição. Ao comparar o último tempo avaliado (72 horas) com o ponto referente ao tempo 0 (sementes quiescentes), pode-se verificar uma redução de 58,74% na atividade dessa enzima. Já sob déficit hídrico, a atividade da APX apresentou um comportamento quadrático, alcançando ponto máximo de  $0,3091 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$  no tempo de, aproximadamente 8 horas de embebição, tendo em seguida uma redução de 27,14% até o tempo de 72 horas de embebição. Ao compará-las nas duas condições, percebe-se que, quando submetidos ao déficit hídrico (-0,2MPa), os eixos embrionários apresentaram maior atividade da APX sendo superiores à condição controle (0MPa) em 29,49%, 30,11%, 42,85% e 44,32% nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 19).

No que se refere aos eixos embrionários da cultivar BRS-Pajeú, pode-se perceber que quando as sementes estavam sob o tratamento de 0MPa (água destilada), a atividade enzimática da APX linear decrescente, com decréscimos de  $0,0026 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$

para cada aumento no tempo de embebição. Ao comparar o último tempo avaliado (72 horas) com o ponto referente ao tempo 0 (sementes quiescentes), pode-se verificar uma redução de 60,15% na atividade dessa enzima. No tratamento com -0,2MPa (solução de PEG 6000), a atividade da APX nos eixos embrionários apresentou comportamento linear crescente, com acréscimos de  $0,0037 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$  para cada aumento no tempo de embebição. Ao comparar com o ponto referente ao tempo 0 (sementes quiescentes), pode-se verificar um aumento de 45,52% na atividade dessa enzima. Ao compará-los nas duas condições, percebe-se que, quando submetidos ao déficit hídrico (-0,2MPa), os eixos embrionários apresentaram maior atividade da APX, sendo superiores à condição controle (0MPa) em 27,62%, 34,27%, 64,89% e 77,48% nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 19).

Ao comparar os eixos embrionários das duas cultivares sob estresse (Figura 19), observa-se que, os da BRS-Pajeú apresentaram maior atividade da APX, sendo superiores à BRS-Milênio em 8,77%, 27,78%, 45,33% e 61,66% nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas de embebição, respectivamente, mostrando, dessa forma, que houve maior eficiência na desintoxicação de EROs.

A produção de EROs em plantas em condições normais de crescimento é relativamente baixa. Todavia, em resposta a vários estresses ambientais, a produção dessas EROs é drasticamente aumentada, gerando inúmeras perturbações ao ambiente intracelular (SHARMA et al., 2019), tais como desnaturação de proteínas, peroxidação de lipídios e degradação de nucleotídeos, o que resulta inicialmente em dano celular e, posteriormente, morte das células (JAKOVLJEVIĆ et al., 2017).

Vários trabalhos mostram o aumento na atividade de muitas enzimas do sistema antioxidativo de defesa para combater o estresse oxidativo induzido de forma secundária por estresses ambientais, como a seca (SAYFZADEH; RASHIDI, 2011; DEUNER et al., 2011; CARNEIRO et al., 2011). A manutenção de uma alta capacidade antioxidante para eliminar as EROs tem sido muito associada ao aumento da tolerância das plantas a esses estresses (ZAEFYZADEH et al., 2009; CHEN et al., 2010). Santos et al. (2010), investigando a tolerância em genótipos feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) submetidos a estresse hídrico, revelaram a presença de maior capacidade antioxidante em genótipos tolerantes.

A CAT e a APX são as duas enzimas mais importantes quando se trata da desintoxicação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (BHATT; TRIPATHI, 2011). A remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela CAT ocorre sem a necessidade de um agente redutor e acaba fornecendo às plantas uma forma energeticamente mais eficiente para eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , convertendo-o em água e oxigênio molecular. No

entanto, no caso da APX, para que haja a remoção de  $H_2O_2$  é necessária a presença de uma pequena molécula redutora (ácido ascórbico) para agir como um co-fator de regeneração. Essa conversão de  $H_2O_2$  pela APX não leva à evolução de  $O_2$ , uma vez que a água é o produto da reação (MHAMDI et al., 2012; BARBOSA et al., 2015; MITTLER, 2017).

A APX está amplamente distribuída nas células vegetais (citosol, mitocôndrias, peroxissomos, cloroplastos, parede celular) e suas isoformas têm uma afinidade muito maior pelo  $H_2O_2$  do que as da CAT, o que a torna mais eficiente na eliminação de  $H_2O_2$  em condições estressantes (WANG et al., 1999; BARBOSA et al., 2015). Alguns autores relatam a atividade aprimorada da APX em resposta a estresses abióticos, como seca, salinidade, radiação, dentre outros (SHARMA; DUBEY, 2005; HAN et al. 2009; TANOU et al. 2009).

Nesse experimento observa-se que a atividade da CAT (Figuras 16 e 17A e B), de modo geral, foi inferior à da APX (Figuras 18 e 19), o que pode ser justificado pela sua menor afinidade pelo  $H_2O_2$ . Levando isso em consideração, pode-se sugerir que a enzima APX foi mais eficaz na remoção das EROs, tendo a cultivar BRS-Pajeú se destacado com um melhor sistema antioxidativo de defesa. Logo, esse aumento na atividade das enzimas de defesa da BRS-Pajeú implica em maior tolerância dessa cultivar ao déficit hídrico, confirmando assim, os resultados anteriormente obtidos no experimento de germinação e vigor e de mobilização de reservas.

## 7 CONCLUSÕES

1. Dentre as cultivares estudadas, a BRS-Milênio e BRS Pajeú foram as que se apresentaram mais contrastantes, podendo ser consideradas a partir do nível  $-0,2\text{MPa}$  como sensível e tolerante ao déficit hídrico, respectivamente;

2. A absorção de água pelas sementes das cultivares BRS-Milênio e BRS-Pajeú, tanto no tratamento controle quanto na solução de PEG 6000, segue um padrão trifásico e apresenta retardo nessa absorção quando submetidas ao déficit hídrico no nível  $-0,2\text{MPa}$ ;

3. A análise citoquímica das estruturas embrionárias de ambas as cultivares revela células com formatos irregulares, paredes celulares delgadas e presença de núcleos, havendo também presença de amido nos cotilédones e de corpos proteicos tanto nos cotilédones quanto nos eixos embrionários;

4. O déficit hídrico retarda a mobilização de carboidratos solúveis e de proteínas dos cotilédones para o embrião, proporciona maior acúmulo de solutos orgânicos tanto nos cotilédones quanto nos eixos embrionários e provoca aumentos consideráveis na atividade das enzimas antioxidantes nos cotilédones, principalmente da APX;

5. Em situação de déficit hídrico, a cultivar BRS-Pajeú apresenta maiores teores de solutos compatíveis nos eixos embrionários, bem como exibe maiores atividades da CAT e da APX. Deste modo, pode-se sugerir que as sementes de feijão-caupi da cultivar BRS-Pajeú têm um nível de tolerância ao déficit hídrico superior às demais cultivares avaliadas, apresentando uma maior probabilidade de resistir a um ambiente com baixa disponibilidade hídrica.

## REFERÊNCIAS

- ABUD, H. F.; GONÇALVES, N. R.; REIS, R. G. E.; GALLÃO, M. I.; INNECCO, R. Morfologia de sementes e plântulas de cártamos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 259-265, 2010.
- AGOSTINI, E. A. T.; MACHADO-NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Induction of water deficit tolerance by cold shock and salicylic acid during germination in the common bean. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 2, p. 209-219, 2013.
- AKIBODE, S.; MAREDIA, M. **Global and regional trends in production, trade and consumption of food legume crops**. Michigan, p. 1-83, 2011.
- ALVARENGA, I. C. A.; QUEIROZ, G. A.; HONÓRIO, I. C. G.; VALADARES, R. V.; MARTINS, E. R. Prolina livre em alecrim-pimenta sob estresse hídrico antes da colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. esp, p. 539-541, 2011.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARAÚJO, J. L. O. **Mobilização de reservas durante o crescimento pós-germinativo em girassol sob estresse salino e osmótico aplicados de forma isolada e combinada**. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2013.
- 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.
- 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. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BARROSO, C. M.; FRANKE, L. B.; BARROS, I. B. I. Substrato e luz na germinação das sementes de rainha-do-abismo. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 236-240, n. 2, 2010.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. New York: Academic Press, 2001.
- BASTOS, E. A.; FERREIRA, V. M.; SILVA, C. R.; ANDRADE JÚNIOR, A. S. Evapotranspiração e coeficiente de cultivo do feijão-caupi no vale do Gurguéia, PI. **Irriga**, v. 13, n. 2, p. 182-190, 2008.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 1, p. 205-207, 1973.
- BERTINI, C. H. C. M.; TEÓFILO, E. M.; DIAS, F. T. C. Genetic divergence among cowpea UFC germplasm bank accessions. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 1, p. 99-105, 2009.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New

York: Plenum Press, 1994.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3. ed. New York: Springer, 2013.

BHATT, I.; TRIPATHI, B. N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 850-859, 2011.

BLACK, M.; BEWLEY, J.D.; HALMER, P. **The encyclopedia of seeds: science, technology and uses**. Wallingford: CAB International, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária/Mapa/ACS, 2009.

BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Chapman & Hall, 1996. 255 p.

BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINE, M. A. S. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 163-188.

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, Edição Especial, p. 137-162, 2000.

CALVET, A. S. F.; LIMA, R. E. M.; PINTO, C. de M.; FARIAS, F. C.; BEZERRA, M. A.; PRISCO, J. T. Solutos orgânicos e inorgânicos em diferentes fenofases de feijão de corda cultivado sob estresse salino. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, suplemento, p.761-769, 2012.

CALVET, A. S. F.; PINTO, C. M.; MAIA-JOCA, R. P. M.; BEZERRA, A. crescimento e acumulação de solutos em feijão-de-corda irrigado com águas de salinidade crescente em diferentes fases de desenvolvimento. **Irriga**, v. 18, n. 1, p. 148-159, 2013.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CARDOSO, M. J. (Org.). **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**. Embrapa/Meio-Norte. Teresina, PI. 2000. 264 p. (Circular técnica, 28).

CARLIN, S. D.; SANTOS, D. M. M. Indicadores fisiológicos da interação entre déficit hídrico e acidez do solo em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 9, p. 1106-1113, 2010.

- CARNEIRO, M. M. L. C.; DEUNER, S.; OLIVEIRA, P. V.; TEIXEIRA, S. B.; SOUSA, C. P.; BACARIN, M. A.; MORAES, D. M. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 752-761, 2011.
- CASTILLO, R.; GUENNI, O. Latencia em semillas de *Stylosanthes hamata* (Leguminosae) y su relación com la morfología de la cubierta seminal. **Revista de Biología Tropical**, v. 49, n. 1, p. 287-299, 2001.
- CHEN, Q.; ZHANG, M.; SHEN, S. Effect of salt on malondialdehyde and antioxidant enzymes in seedling roots of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). **Acta physiologiae plantarum**, v. 33, n. 2, p. 273-278, 2011.
- CHOUDHURY, F. K.; RIVERO, R. M.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856-867, 2017.
- COELHO, D. L. M.; AGOSTINI, E. A. T.; GUABERTO, L. M.; MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Estresse hídrico com diferentes osmóticos em sementes de feijão e expressão diferencial de proteínas durante a germinação. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 491-499, 2010.
- COELHO, J. B. M.; BARROS, M. F. C.; BEZERRA NETO, E.; CORREA, M. M. Comportamento hídrico e crescimento do feijão vigna cultivado em solos salinizados. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 4, p. 379-385, 2013.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos**. 2019. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 22 de maio de 2019.
- CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A.; LEITE, I. T. A.; VENTRELLA, M. C.; MATHIAS, A. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). **Revista Árvore**, v. 30, n. 6, p. 941-949, 2006.
- CUSTÓDIO, C. C.; SALOMÃO, G. R.; MACHADO NETO, N. B. Estresse hídrico na germinação e vigor de sementes de feijão submetidas a diferentes soluções osmóticas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 4, p. 617-623, 2009.
- CVIKROVÁ, M.; GEMPERLOVÁ, L.; MARTINCOVÁ, O.; VANKOVÁ, R. Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in prolineoverproducing tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 7-15, 2013.
- DAMATTA, F. M. Ecophysiology of tropical tree crops: an introduction. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 239-244, 2007.
- DANTAS, C. V. S.; SILVA, I. B.; PEREIRA, G. M.; MAIA, J. M.; LIMA, J. P. M. S.; MACEDO, C. E. C. Influência da sanidade e déficit hídrico na germinação de sementes de *Carthamus tinctorius* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 3, 2011.

- DEUNER, C.; MAIA, M. S.; DEUNER, S.; ALMEIDA, A. S.; MENEGHELLO, G. E. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 711-720, 2011.
- DUBEY, R. S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S. D. (Ed.). **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.178-203.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- EVERT, R. F. **Anatomia das plantas de Esau: meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento**. 1 ed. São Paulo: Blucher, 2013. 728 p.
- FAGERIA, N. K. Salt tolerance of rice cultivars. **Plant and Soil**, v. 88, p. 237-243, 1985.
- FERNANDES, F. B. P.; LACERDA, C. F.; ANDRADE, E. M.; NEVES, A. L. R.; SOUSA, C. H. C. Efeito de manejos do solo no déficit hídrico, trocas gasosas e rendimento do feijão-de-corda no semiárido. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 3, p. 506-515, 2015.
- FERREIRA, A. C. T.; FELITO, R. A.; ROCHA, A. M.; CARVALHO, M. A. C.; YAMASHITA, O. M. Estresse hídrico e salino na germinação de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* cv. Brs tumucumaque). **Revista Caatinga**, v. 30, n. 4, p. 1009-1016, 2017.
- FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.
- FILIPPOU, P.; ANTONIOU, C.; FOTOPOULOS, V. The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 56, p. 172-183, 2013.
- FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília, DF: IITA EMBRAPA, 1988. p. 26-46.
- FREITAS, R. M. O.; DOMBROSKI, J. L. D.; FREITAS, F. C. L.; Nogueira, N. W.; PINTO, J. R. S. Physiological responses of cowpea under water stress and rewatering in no-tillage and conventional tillage systems. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 3, p. 559-567, 2017.
- GALLÃO, M. I.; DAMASCENO, L. F.; BRITO, E. S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 1, p. 106-109, 2006.
- GALLÃO, M. I.; VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; SOUZA, A. S. N.; BRITO, E. S. Reserve mobilisation in mesquite (*Prosopis juliflora*) seed (Leguminosae). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 2012-2018, 2007.

- GARCIA, S. H.; ROZZETTO, D. S.; COIMBRA, J. L. M.; GUIDOLIN, A. F. Simulação de estresse hídrico em feijão pela diminuição do potencial osmótico. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 11, n. 1, p. 35-41, 2012.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- GIROTTO, L.; ALVES, J. D.; DEUNER, S.; ALBUQUERQUE, A. C. S.; TOMAZONI, A. P. Tolerância à seca de genótipos de trigo utilizando agentes indutores de estresse no processo de seleção. **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 192-199, 2012.
- GOMES, M. P.; GARCIA, Q. S. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia**, v. 68, n. 3, p. 351-357, 2013.
- GUIMARÃES, M. A.; DIAS, D. C. F. S.; LOUREIRO, M. E. Hidratação de sementes. **Revista Trópica**, v. 2, n. 1, p. 31-39, 2008.
- GUOLLO, K.; MENEGATTI, R. D.; DEBASTIANI, A. B.; POSSETI, J. C.; NAVROSKI, M. C. Biometria de frutos e sementes e determinação da curva de embebição em sementes de *Mimosa scabrella* Benth. **Revista Cultivando O Saber**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2016.
- HAN, C.; LIU, Q.; YANG, Y. Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 58, n. 2, p. 153-162, 2009.
- HAVIR, E.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalases in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- ISHIBASHI, Y.; KODA Y.; ZHENG, S. H.; YUASA T.; IWAYA-INOUE M. Regulation of soybean seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species. **Annals of Botany**, v. 111, n. 1, p. 1-8, 2013.
- JAKOVLJEVIĆ, D. Z.; TOPUZOVIĆ, M. D.; STANKOVIĆ, M. S.; BOJOVIĆ, B. M. Changes in antioxidant enzyme activity in response to salinity-induced oxidative stress during early growth of sweet basil. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 240-246, 2017.
- JANN, R. C.; AMEN, R. D. What is germination? In: KHAN, A. A. (ed.). **The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination**. New York, Elsevier/North Holland Inc. 2 ed., p.7-28, 1980.
- JOHARI-PIREIVATLOU, M.; QASIMOV, N. MARALIAN, H. Effect of soil water stress on yield and proline content of four wheat lines. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 36-40, 2010.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 137-138, 1965.
- KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. Academic Press, 1995.
- LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA, 1983.

- LÄUCHLI, A.; GRATAN, S. R. Plant growth and development under salinity stress. In: JENKS, M. A.; HASEGAWA, P. M.; JAIN, S. M. (Eds.). **Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 1-32.
- LECHINOSKI, A.; FREITAS, J. M. N.; CASTRO, D. S.; LOBATO, A. K. L.; OLIVEIRA NETO, C. F.; CUNHA, R. L. M.; COSTA, R. C. L. Influência do estresse hídrico nos teores de proteínas e aminoácidos solúveis totais em folhas de Teca (*Tectona grandis* L. f). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 927-929, 2007.
- LIRA, E. H. A. **Mobilização de reservas durante o estabelecimento de plântulas de pinhão manso submetidas ao estresse salino**. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.
- LOPES, J. C.; MACEDO, C. M. P. Germinação de sementes de sob influência do teor de substrato e estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 79-85, 2008.
- LOPES, N. F.; LIMA, M. G. S. **Fisiologia da produção**. Viçosa: Editora UFV, 2015.
- LUGAN, R.; NIOGRET, M. F.; LEPOR, L.; GUEGAN J. P, LARHER, F. R.; SAVOURE, A.; KOPKA, J.; BOUCHEREAU, A. Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. **The Plant Journal**, v. 64, n. 2, p. 215-229, 2010.
- MØLLER I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.
- MA, F.; CHOLEWA, E.; MOHAMED, T.; PETERSON, C. A.; JZEN, M. G. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. **Annals of Botany**, v. 94, n. 2, p. 213-228, 2004.
- MACHADO NETO, N. B.; SATURNINO, S. M.; BOMFIM, D. C.; CUSTÓDIO, C. C. Water stress induced by mannitol and sodium chloride in soybean cultivars. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 4, p. 521-529, 2004.
- MAGALHÃES, S. R.; BORGES, E. E. L.; BERGER, A. P. A. Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) SF Blake durante a germinação. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 4, p. 589-595, 2010.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MAIA, P. S. P.; OLIVEIRA NETO, C. F.; CASTRO, D. S.; FREITAS, J. M. N.; LOBATO, A. K. S.; COSTA, R. C. L. Conteúdo relativo de água, teor de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de milho submetidas ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl 2, p. 918-920, 2007.
- MAIA, V. **Técnica histológica**. São Paulo: Atheneu, 1979.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 659p.

MARIANO, K. R.; BARRETO, L. S.; SILVA, A. H.; NEIVA, G. K.; AMORIM, S. M. Fotossíntese e tolerância protoplasmática foliar em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetida ao déficit hídrico. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 72-77, 2009.

MARIJUAN, M. P.; BOSCH, S. M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 12, p. 660-666, 2013.

MCKERSIE, B. D.; LESHEM, Y. Y. **Stress and Stress Coping in Cultivated Plants**. Londres: Kluwer Academic Publishes, 1994.

MELO, F. P. L.; AGUIAR NETO, A. V.; SIMABUKURO, E. A.; TABARELLI, M. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 237-250.

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

MHAMDI, A.; NOCTOR, G.; BAKER, A. Plant catalases: peroxisomal redox guardians. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 181- 194, 2012.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; GRATAO, P. L.; CARVALHO, G.; TEZOTTO, T.; MEDICI, L. O.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Biochemical responses of ethylene-insensitive Neve ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 2, p. 306-320, 2011.

MONTEIRO, J. G.; CRUZ, F. J. R.; NARDIN, M. B.; SANTOS, D. M. M. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 18-25, 2014.

MOTA, C. S.; OLIVA CANO, M. A. Respostas fisiológicas de plantas jovens de macaúba a condições de seca cíclica. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 87, p. 225-234, 2016.

MOTERLE, L. M.; SCAPIM, C. A.; BRACCINI, A. L.; RODOVALHO, M. A.; BARRETO, R. R. Influência do estresse hídrico sobre o desempenho fisiológico de sementes de híbridos simples de milho-pipoca. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1810-1817, 2008.

MOŽDŽEŇ, K.; BOJARSKI, B.; RUT, G.; MIGDAŁEK, G.; REPKA, P.; RZEPKA, A. Effect of drought stress induced by mannitol on physiological parameters of maize (*Zea mays*) seedlings and plants. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 4, n. especial, p.86-91, 2015.

- MUCCILLO, R. C. S. T. **Caracterização e avaliação de amido nativo e modificado de pinhão mediante provas funcionais e térmicas**. 2009. 155 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 239-250, 2002.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 20-31.
- NAKANO, Y.; ASADA, K., Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, **Plant & Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- NASCIMENTO, S. P. **Efeito do déficit hídrico em feijão-caupi para identificação de genótipos com tolerância à seca**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 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 e Ambiental**, v. 15, n. 8, p. 853-861, 2011.
- NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination and still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574-581, 2010.
- OLIVEIRA, A. B.; ALENCAR, N. L. M.; GALLÃO, M. I.; GOMES FILHO, E. Avaliação citoquímica durante a germinação de sementes de sorgo envelhecidas artificialmente e osmocondicionadas, sob salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 223-231, 2011.
- OLIVEIRA, A. B.; BOSCO, M. R. O. Biometria, determinação da curva de absorção de água em sementes e emergência inicial de plântulas de *Copernicia hospita* Martius. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 1, 2013.
- OLIVEIRA, A. B.; GOMES FILHO, E.; ENÉAS FILHO, J. O problema da salinidade na agricultura e as adaptações das plantas ao estresse salino. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1-16, 2010.
- OLIVEIRA, A. B.; GOMES FILHO, E. Efeito do condicionamento osmótico na germinação e vigor de sementes de sorgo com diferentes qualidades fisiológicas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 25-34, 2010.
- OLIVEIRA, A. B.; GOMES FILHO, E.; ENÉAS-FILHO, J.; PRISCO, J. T.; ALENCAR, N. L. M. Seed priming effects on growth, lipid peroxidation and activity of ROS scavenging enzymes in NaCl-stressed sorghum seedlings from aged seeds. **Journal of Plant Interactions (Print)**, v. 7, n. 2, p. 151-159, 2012.
- OLIVEIRA, L. M.; SILVA, J. N.; COELHO, C. C. R.; NEVES, M. G.; SILVA, R. T. L.; OLIVEIRA NETO, C. F. Pigmentos fotossintetizantes, aminoácidos e proteínas em plantas

juvens de graviola submetida ao déficit hídrico. **Revista Agroecossistemas**, v. 5, n. 1, 39-44, 2013.

PAIVA, J. G. A.; FANK-DE-CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M. P.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 257-264, 2006.

PELEGRINI, L. L.; BORCIONI, E.; NOGUEIRA, A. C.; KOEHLER, H. S.; QUOIRIN, M. G. G. Efeito do estresse hídrico simulado com NaCl, manitol e PEG (6000) na germinação de sementes de *Erythrina falcata* Benth. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 2, p. 511-519, 2013.

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**, v. 43, n. 4, p. 766-773, 2012.

PONTES, C. A.; BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; SOARES, C. P. B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) JF Macbr. (garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, v. 26, n. 5, p. 593-601, 2002.

PRAXEDES, S. C.; FERREIRA, T. M.; GOMES FILHO, E. Acúmulo de prolina e aminoácidos em cultivares de feijão caupi com tolerância diferencial à salinidade. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 3, p. 211-214, 2009.

PRODANOVIĆ, O.; PRODANOVIĆ, R.; BOGDANOVIĆ, J.; MITROVIĆ, A.; MILOSAVIĆ, N.; RADOTIĆ, K. Antioxidative enzymes during germination of two lines of serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně]. **Archives of Biological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 209-216, 2007.

REALE, L.; RICCI, A.; FERRANTI, F.; TORRICELLI, R.; VENANZONI, R.; FALCINELLI, M. Cytohistological analysis and mobilization of reserves in *Jatropha curcas* L. seed. **Crop Science**, v. 52, n. 2, p. 830-835, 2012.

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, n. 11, p. 1189-1202, 2004.

REDDY, P. S.; JOGESWAR, G.; RASINENI, G. K.; MAHESWARI, M.; REDDY, A. R.; VARSHNEY, R. K.; KISHOR, P. B. K. Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 94, p. 104-113, 2015.

RINNER, K. T.; SAURER, M.; STREIT, K.; SIEGWOLF, R. T. W. Evaluation of a liquid chromatography method for compound-specific  $\delta^{13}C$  analysis of plant carbohydrates in alkaline media. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, n. 18, p. 2173-2185, 2012.

ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; MENEZES JUNIOR, J. A. N. **Sistemas de Produção: cultivo de feijão-caupi**. 2. Ed. Embrapa, 93 p., 2017.

ROSA, L. S.; FELIPPI, M.; NOGUEIRA, A. C.; GROSSI, F. Avaliação da germinação sob

diferentes potenciais osmóticos e caracterização morfológica da semente e plântula de *Ateleia glazioviana* Baill (timbó). **Cerne**, v. 11, n. 3, p. 306-314, 2005.

SANTOS, C. A.; SILVA, N. V.; WALTER, L. S.; SILVA, E. C. A.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Germinação de duas espécies da caatinga sob déficit hídrico e salinidade. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 87, p. 219-224, 2016.

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

SANTOS, E. R.; BORGES, P. R. S.; SIEBENEICHLER, S. C.; CERQUEIRA, A. P.; PEREIRA, P. R. Crescimento e teores de pigmentos foliares me feijão-caupi cultivado sob dois ambientes de luminosidade. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 4, p. 14-19, 2011.

SANTOS, M. M.; DORIGUETTO, I. R.; BORGES, E. E. L.; ATAÍDE, G. M. Germinação e alteração de reservas em sementes de amendoim-bravo (*Pterogyne nitens*) sob estresse térmico. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 17, n. 1., p. 32-37, 2019.

SAYFZADEH, S.; RASHIDI, M. Response of antioxidant enzymes activities of sugar beet to drought stress. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 6, n. 4, p. 27-33, 2011.

SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; EUZÉBIO, V. L. D. M.; KODAMA, F. M.; KISSMANN, C. Estresse hídrico no metabolismo e crescimento inicial de mudas de mutambo (*Guazuma ulmifolia* Lam.). **Ciência Florestal**, v. 21, n. 4, p. 655-662, 2011.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 46, n. 3, p. 209-221, 2005.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S. Oxidative stress and antioxidative defense system in plants growing under abiotic stresses. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of Plant and Crop Stress**. 4 ed. Boca Raton: CRC press, 2019. p. 93-136.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p.1-26, 2012.

SILVA, C. D. S.; SANTOS, P. A. A.; LIRA, J. M. S.; SANTANA, M. C.; SILVA JÚNIOR, C. D. Curso diário das trocas gasosas em plantas de feijão-caupi submetidas à deficiência hídrica. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 4, p. 7-13, 2010.

SILVA, J. A. L.; NEVES, J. A. Componentes de produção e suas correlações em genótipos de feijão-caupi em cultivo de sequeiro e irrigado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 702-713, 2011.

SILVA, W. C.; PEREIRA, J. S.; TELES, V. O.; CAMARA, F. Efeito da disponibilidade de água na germinação e no desenvolvimento inicial de plântulas de feijão-caupi. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 2984-2993, 2013.

SOARES, M. M.; SANTOS JUNIOR, H. C.; SIMÕES, M. G.; PAZZIN, D.; SILVA, L. J.

Estresse hídrico e salino em sementes de soja classificadas em diferentes tamanhos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 4, p. 370-378, 2015.

SOUSA, C.; PEDROSA, E. M.; ROLIM, M. M.; OLIVEIRA FILHO, R. A.; SOUZA, M. A.; PEREIRA FILHO, J. V. Crescimento e respostas enzimáticas do feijoeiro caupi sob estresse hídrico e nematoide de galhas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 113-118, 2015.

SOUZA, R. C. R.; ANDRADE, C. T. Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho. **Polímeros**, v. 10, n. 1, p. 24-30, 2000.

SPADETO, C.; LOPES, J. C.; MENGARDA, L. H. G.; MATHEUS, M. T.; BERNARDES, P. M. Estresse salino e hídrico na germinação de sementes de garapa (*Apuleia leiocarpa* (VOGEL.) JF Macbr.). **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 539-551, 2012.

SZÁBADOS, L.; KOVACS, H.; ZILBERSTEIN, A.; BOUCHEREAU, A. Plants in extreme environments: importance of protective compounds in stress tolerance. TURKAN, I (Ed.). **Plant responses to drought and salinity stress: developments in a postgenomic Era**. London: Elsevier, 2011. p. 105-150. (Advances in Botanical Research, 57).

SZEGLETES, Z. S.; ERDEI, L.; TARI, I.; CSEUZ, L. Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. **Cereal Research Communications**, v. 28, n. 4, p. 403-410, 2000.

TABOGA, S. R.; VILAMAIOR, P. S. L. Métodos de estudos das células. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. (ed.). **A célula**. Barueri: Manole, 4 ed., 2019. p. 57-98.

TAIZ, L.; ZEIGER, E; MOLLER, I. M; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TANOU, G.; MOLASSIOTIS, A.; DIAMANTIDIS, G. Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 2-3, p. 270-281, 2009.

TEULAT-MERAH, B.; MORERE-LE PAVEN, M. C.; RICOULT, C.; AUBRY, C.; PELTIER, D. cDNA-AFLP profiling in the embryo axes during common bean germination. **Biologia Plantarum**, v. 55, n. 3, p. 437-447, 2011.

TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; PINTO, M. C.; GARA, L. A. Comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. **Journal Experimental Botany**, v. 52, n. 361, p. 1647-1654, 2001.

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

VALE, J. C.; BERTINI, C.; BORÉM, A. **Feijão-Caupi do Plantio à Colheita**. 1 ed. Viçosa: Editora UFV, 2017.

VAZ-DE-MELO, A.; SANTOS, L. D. T.; FINOTO, E. L.; DIAS, D. C. F. S.; ALVARENGA, E. M. Germinação e vigor de sementes de milho-pipoca submetidas ao estresse térmico e

hídrico. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 5, p. 687-695, 2012.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino acids**, v. 35, n. 4, p. 753-759, 2008.

VIDAL, B. C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cellular and Molecular Biology**, v. 22, n. 1, p. 45-64, 1977.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R. **Analytical Histochemistry**, v. 15, n. 4, p. 289-296, 1970.

VIDAL, B. C.; PIMENTEL, E. R. Caracterização bioquímica, topoquímica e estrutural dos corpos protéicos do feijão macuco ou jacatupé (*Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 8, p. 223-229, 1985.

VIJAYKUMAR, A.; SAINI, A.; JAWALI, N. Phylogenetic analysis of subgenus vigna species using nuclear ribosomal RNA ITS: evidence of hybridization among *Vigna unguiculata* subspecies. **Journal of Heredity**, v. 101, n. 2, p. 177-188, 2010.

VILLELA, F. A.; FILHO, L. D.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 11-12, p. 1957-1968, 1991.

WANG, J.; ZHANG, H.; ALLEN, R. D. Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. **Plant and Cell Physiology**, v. 40, n. 7, p. 725-732, 1999.

WANG, W. L.; LIU, S. J.; SONG, S. Q.; MOLLER, I. M. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 1-15, 2015.

YAMAUCHI, Y.; FURUTERA, A.; SEKI, K.; TOYODA, Y.; TANAKA, K.; SUGIMOTO, Y. Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 8-9, p. 786-793, 2008.

YE, N.; ZHU, G.; LIU, Y.; ZHANG, A.; LI, Y.; LIU, R.; SHI, L.; JIA, L.; ZHANG, J. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. **Journal Experimental Botany**, v. 63, n. 5, p. 1809-1822, 2011.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

ZAEFYZADEH, M.; QULIYEV, R. A.; BABAYEVA, S. M.; ABBASOV, M. A. The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces. **Turkish Journal of biology**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2009.

ZHU, J. K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 5, p. 441-445, 2003.