



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

JOHNY DE SOUZA SILVA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA TOLERÂNCIA INDUZIDA POR
BIOESTIMULANTE EM VARIEDADES DE FEIJÃO-CAUPI SOB DÉFICIT
HÍDRICO

FORTALEZA

2023

JOHNY DE SOUZA SILVA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA TOLERÂNCIA INDUZIDA POR
BIOESTIMULANTE EM VARIEDADES DE FEIJÃO-CAUPI SOB DÉFICIT HÍDRICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de doutor em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Fisiologia e Biotecnologia Vegetal

Orientadora: Prof.^a Dra. Rosilene Oliveira Mesquita

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

- S58a Silva, Johny de Souza.
Aspectos fisiológicos e bioquímicos da tolerância induzida por bioestimulante em variedades de Feijão-caupi sob déficit hídrico / Johny de Souza Silva. – 2023.
77 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Rosilene Oliveira Mesquita.
1. Metabolismo primário. 2. Sustentabilidade. 3. Tolerância à seca. 4. *Vigna unguiculata* [L.] Walp.

CDD 630

JOHNY DE SOUZA SILVA

Aspectos fisiológicos e bioquímicos da tolerância induzida por bioestimulante em variedades de feijão-caupi sob déficit hídrico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de doutor em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Fisiologia e Biotecnologia Vegetal

Aprovado em 10/10/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Rosilene Oliveira Mesquita (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. ° Dr. Marlos Alves Bezerra
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

Dr. Flavio Barcellos Cardoso
Pesquisador do Grupo Multitécnica

Prof.º Dr. Juan Carlos Alvarez-Pizarro
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Dra. Stelamaris de Oliveira Paula Marinho
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

A Deus, pela vida.

À minha amada esposa, Larissa Alves.

Aos meus pais, José Carlos e Cicera Maria, e
minha irmã, Debora Evelim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, cuja orientação e graça estiveram presentes em todas as etapas desta jornada. Sua sabedoria e força me sustentaram quando enfrentei desafios e incertezas.

A minha esposa, Larissa Alves, por tudo. Seu apoio, paciência e amor foram fundamentais para que eu pudesse me concentrar e concluir este trabalho.

Aos meus pais, José Carlos e Cícera Maria. Sem o amor, apoio e incentivo que vocês sempre me deram ao longo da minha jornada acadêmica, esta tese não teria sido possível. Desde os primeiros passos da minha educação até este momento importante na minha vida, vocês foram uma fonte constante de inspiração.

A minha irmã, Debora Evelim. Seu apoio foi fundamental para o sucesso desta jornada.

Aos meus inúmeros tios e primos que ajudaram na minha criação e que formaram a pessoa que sou hoje.

Gostaria de estender meus agradecimentos à minha nova família, Nilsa Lopes, Lucieuda Lopes, Enilvan Ferreira, Daniel Lopes, Ana Clara, Maria Lopes, Roseno Lopes, Francisco e Eunice, cuja generosidade, apoio e encorajamento ao longo deste período foram verdadeiramente significativos para mim

À minha grande orientadora, professora e amiga Rosilene Oliveira Mesquita. Sua dedicação incansável e paixão pelo ensino e pesquisa foram contagiantes e me fizeram querer ser melhor a cada dia. Obrigado, por ser não apenas uma orientadora excepcional, mas também alguém que tornou esses seis anos de pós-graduação mais leves.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa, em especial Rafael Santiago, Leticia Bessa e Bruna Silva, pelo companheirismo, apoio, momentos de descontrações, pela ajuda com o trabalho pesado na montagem e desenvolvimento da pesquisa, vocês foram indispensáveis para a concretização deste trabalho, e principalmente pela amizade.

Gostaria também de agradecer a todos os meus amigos de pós-graduação, cujo apoio e companheirismo fizeram da pós-graduação uma experiência enriquecedora e memorável. Cada um de vocês desempenhou um papel significativo em minha vida durante este período, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional. Em especial, gostaria de agradecer a alguns amigos: Toshik Iarley, Fernanda Carla, Ingrid Pinheiro, Arnaldo Sales, Ana Beatriz, Bruno Alves, Lucas Lobo, Linco Thomaz, Wendson Moraes (*in*

memoriam), Caris Viana, Flenna Amorim, Suane Brasil, Carlos Yago, Andreza de Melo e Jesimiel Viana. A amizade e apoio de vocês foram inestimáveis.

Gostaria de agradecer a Dona Elisa, Vitor Hugo, Seu Vieira Costa, Tomil Ricardo, Ana Kelly, Felipe Souza e Seu Sérgio do restaurante universitário, pelos inúmeros momentos compartilhados, e por suas contribuições que muitas vezes passam despercebidas, porém, seu papel é essencial. Vocês proporcionaram um ambiente de apoio e facilitaram meu mestrado e doutorado.

Aos integrantes da banca avaliadora, Dr. Flávio Barcellos, Dr. Juan Carlos, Dr. Marlos Bezerra e Dra. Stelamaris de Oliveira. Obrigado pelo apoio e instrução dada não apenas no momento de avaliação, mas no decorrer desse estudo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia da UFC pelos ensinamentos transmitidos, em especial, aos professores Wagner Melo e Marcos Esmeraldo.

Aos laboratórios: LABFIVE e laboratório de toxinas vegetais e seus integrantes por toda ajuda e pela concessão do espaço para que esse trabalho pudesse ser executado. Em especial, gostaria de expressar minha sincera gratidão aos meus amigos Daniela Freitas e Sávio Justino pela contribuição fundamental nas análises bioquímicas deste projeto

Meus mais sinceros agradecimentos ao dedicado pessoal do PET (Programa de Educação Tutorial) por seu apoio na montagem do experimento.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia (PPGAF) pela oportunidade concedida para realização do Curso de Mestrado e Doutorado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro por meio da concessão de diversas bolsas de estudos.

A todos da Diretoria, Coordenação, Secretaria, Serviços Gerais, enfim a todos que fazem a UFC ser esse mundo de conhecimento e diversidade.

Muito obrigado!

RESUMO

As mudanças climáticas representam um desafio crucial no século XXI, afetando a agricultura, em particular o feijão-caupi. O aumento da temperatura, padrões de chuva imprevisíveis e eventos climáticos extremos ameaçam a segurança alimentar. Os bioestimulantes, como extratos de algas marinhas e ácidos fúlvicos, surgem como alternativas promissoras para mitigar a escassez de água nas plantas, estimulando diversos processos nas plantas, como o crescimento radicular, ativação de defesas antioxidantes e osmorregulação. Além disso, em conjunto com a análise metabolômica é possível fornecer uma visão detalhada dessas respostas. Logo, devido a relevância da cultura para as regiões de clima árido e semiárido, como o Nordeste Brasileiro, torna-se essencial entender suas respostas à seca, bem como a influência potencial do uso de bioestimulantes como estratégia de manejo visando mitigar os efeitos negativos na produtividade. Deste modo, o objetivo do trabalho foi relacionar efeito da aplicação de bioestimulante nas alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas com a modulação de metabólitos primários em duas variedades de feijão-caupi cultivadas sob déficit hídrico. Para isso, foram conduzidos dois experimentos. O primeiro consistiu em um experimento em arranjo fatorial 2x2 (duas condições hídricas: com e sem déficit hídrico x manejo da aplicação do bioestimulante: com e sem bioestimulante) com medidas repetidas ao longo do tempo, seguido de reidratação após 9 dias de seca progressiva. O segundo consistiu de um delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x2x2, sendo 3 condições hídricas do solo: controle irrigado, déficit moderado e déficit severo; 2 genótipos: Pingo de Ouro 1,2 – PO e Sempre-verde – SV; e 2 manejos do bioestimulante; com bioestimulante – CB e sem bioestimulante – SB. Foram avaliados: o comprimento da planta; a massa seca; as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a*; conteúdo de malondialdeído (MDA) e prolina, extravasamento de eletrólito; teor relativo de água (TRA); atividade de enzimas antioxidantes; variáveis produtivas; e por fim, o perfil metabólico das folhas. Para os dois experimentos o déficit hídrico afetou significativamente as diversas características das plantas de feijão-caupi. No entanto, o bioestimulante teve influência positiva na eficiência fotossintética das plantas submetidas ao déficit hídrico moderado, aliviando os danos de membrana, à taxa de transporte de elétrons e eficiência instantânea de carboxilação. Além disso, houve associação positiva da aplicação do bioestimulante e o sistema de defesa enzimático. O perfil metabólico das folhas dos genótipos avaliados mostrou tolerância diferencial ao déficit hídrico, com maiores alterações sendo observados para o genótipo Sempre-verde. É importante destacar que a reidratação das

plantas, simulando uma situação de veranico, promoveu boas respostas, sendo impulsionada principalmente nas plantas tratadas com o bioestimulante. Esse fato demonstra a capacidade das plantas que receberam bioestimulante em se reestabelecer após seca, sendo um importante ponto para ser abordado em programas de melhoramento. Portanto, conclui-se que o uso do bioestimulante a base de *Ascophyllum nodosum* e ácidos fúlvicos (FH Attivus®) mostra-se uma estratégia promissora para auxiliar na aclimação do feijão-caupi sob condições desfavoráveis de escassez hídrica.

Palavras-chave: metabolismo primário; sustentabilidade; tolerância à seca; *Vigna unguiculata* [L.] Walp.

ABSTRACT

Climate change has emerged as a critical challenge in the 21st century, significantly impacting agriculture, particularly cowpea cultivation. Rising temperatures, unpredictable rainfall patterns, and extreme weather events threaten food security. Biostimulants, such as seaweed extracts and fulvic acids, have become promising alternatives for alleviating water scarcity in plants by stimulating various processes, including root growth, antioxidant defense activation, and osmoregulation. Furthermore, metabolomic analysis provides a detailed insight into these responses. Given the significance of cowpea in arid and semi-arid regions, such as the Brazilian Northeast, it becomes essential to comprehend cowpea's responses to drought and the potential influence of biostimulant use as a management strategy to mitigate adverse effects on productivity. Consequently, this study aimed to investigate the effect of biostimulant application on morphological, physiological, and biochemical changes, as well as the modulation of primary metabolites in two cowpea varieties grown under water deficit conditions. Two experiments were conducted. The first experiment involved a 2x2 factorial arrangement (two water conditions: with and without water deficit x biostimulant application management: with and without biostimulant) with repeated measurements over time, followed by rehydration after nine days of progressive drought. The second experiment adopted a completely randomized design in a 3x2x2 factorial arrangement, considering three soil water conditions: irrigated control, moderate drought, and severe drought; two genotypes: Pingo de Ouro 1.2 – PO and Sempre-verde – SV; and two biostimulant treatments: with biostimulant – CB and without biostimulant – SB. Various parameters were assessed, including plant length, dry mass, gas exchange, chlorophyll a fluorescence, malondialdehyde (MDA) and proline content, electrolyte leakage, relative water content (RWC), antioxidant enzyme activity, productivity variables, and, finally, leaf metabolic profiling. In both experiments, water deficit significantly affected several cowpea plant characteristics. However, the biostimulant had a positive impact on photosynthetic efficiency in plants subjected to moderate water deficit, mitigating membrane damage, electron transport rate, and instantaneous carboxylation efficiency. Additionally, a positive association was observed between biostimulant application and the enzymatic defense system. The leaf metabolic profile of the evaluated genotypes exhibited differential tolerance to water deficit, with greater alterations observed in the Sempre-verde genotype. It is worth noting that rehydration of plants, simulating a dry spell situation, prompted positive responses, particularly in plants treated with the biostimulant. This demonstrates the ability of biostimulant-treated plants to recover after drought, an

important aspect to consider in breeding programs. In conclusion, the use of biostimulant based on *Ascophyllum nodosum* and fulvic acids (FH Attivus®) appears to be a promising strategy to assist cowpea in adapting to unfavorable conditions of water scarcity.

Keywords: primary metabolism; sustainability; drought tolerance; *Vigna unguiculata* (L). Walp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dados da localização experimental e dados meteorológicos durante o experimento	23
Figura 2 – Detalhamento das condições de cultivo e tratamentos aplicados.....	25
Figura 3 – Efeitos do estresse hídrico progressivo (9 dias após o estresse – 9 DAE) e reidratação (4 dias de reidratação - 4DRH) no comprimento da parte aérea.	27
Figura 4 – Efeitos do estresse hídrico progressivo (9 dias após o estresse – 9 DAE) e reidratação (4 dias de reidratação - 4 DRH) e manejo da aplicação do bioestimulante no diâmetro do caule.....	28
Figura 5 – Efeitos do estresse hídrico progressivo e reidratação nas variáveis fotossíntese líquida e condutância estomática em plantas de feijão-caupi.....	30
Figura 6 – Efeitos do estresse hídrico progressivo e reidratação nas variáveis transpiração e eficiência instantânea de carboxilação em plantas de feijão-caupi.....	31
Figura 7 – Efeitos do estresse hídrico progressivo e reidratação nas variáveis razão C_i/C_a e temperatura da folha em plantas de feijão-caupi.....	32
Figura 8 – Efeitos do estresse hídrico progressivo e reidratação nas variáveis rendimento quântico potencial e efetivo do fotossistema II em plantas de feijão-caupi.....	32
Figura 9 - Efeitos do estresse hídrico progressivo e reidratação nas variáveis <i>quenching</i> fotoquímico (qP) e coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) em plantas de feijão-caupi.....	33
Figura 10 – Efeitos do estresse hídrico progressivo e reidratação na variável taxa de transporte de elétrons (ETR) em plantas de feijão-caupi.....	34
Figura 11 – Efeitos do estresse hídrico progressivo e manejo da aplicação do bioestimulante no diâmetro do caule.....	35

Figura 12 – Detalhamento das condições de cultivo e tratamentos aplicados para o experimento II.....	48
Figura 13 – Biplot mostrando a relação entre variáveis, genótipos de feijão-caupi e condições hídricas do solo para os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2).....	54
Figura 14 – Heatmap mostrando a relação entre as variáveis estudadas e a interação com os tratamentos	57
Figura 15 – Mínimos quadrados parciais - análise discriminante (PLS-DA) de perfis metabólicos em folhas de feijão-caupi dos genótipos Sempre Verde (SV) e Pingo de Ouro, sob ausência de estresse hídrico (C), estresse hídrico moderado (EM) e estresse hídrico severo (ES). Acompanhados da aplicação (CB), ou não (SB), do bioestimulante. Gráficos de pontuação SV(a) e PO (b), e testes de validação cruzada e permutação PLS-DA para SV (c) e para PO (d).....	58
Figura 16 – VIP score de metabólitos dos genótipos SV (a) e PO (b) de maior peso (VIP>1,2) na explicação da variação observada no componente 1 pela análise de PLS- DA.....	59
Figura 17 – VIP score de metabólitos dos genótipos SV (a) e PO (b) de maior peso (VIP>1,2) na explicação da variação observada no componente 2 pela análise de PLS- DA.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Características físicas e químicas da mistura (solo + areia lavada).....	23
Tabela 2	– Composição do Bioestimulante FH Attivus®	24
Tabela 3	– Número de folhas ao final do déficit hídrico severo e reidratação.....	29
Tabela 4	– Coeficientes peso (autovetores), autovalores e variância explicada por cada componente principal (CP1 e CP2), a partir das variáveis estudadas.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A</i>	Taxa de assimilação do CO ₂ / Taxa Fotossintética
AF	Área foliar
ALT	Altura de planta
APX	Ascorbato peroxidase
C	Controle
CAT	Catalase
CB	Com bioestimulante
<i>Chl a</i>	Clorofila <i>a</i>
<i>Chl b</i>	Clorofila <i>b</i>
<i>Chl T</i>	Clorofila <i>total</i>
Ci/Ca	Razão entre CO ₂ interno/CO ₂ atmosférico
CMR	Comprimento radicular
<i>Crt</i>	Carotenoides
DC	Diâmetro do caule
DH	Déficit hídrico
<i>E</i>	Transpiração
EiC	Eficiência instantânea de carboxilação
EM	Estresse moderado
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ES	Estresse severo
ETR	Taxa de transporte de elétrons
EUA	Eficiência no uso da água
Fv/Fm	Rendimento quântico potencial do fotossistema II
<i>gs</i>	Condutância estomática
MDA	Malonaldeído
MSC	Massa seca do caule

MSF	Massa seca das folhas
MSR	Massa seca das raízes
MST	Massa seca total
NF	Número de folhas
NQP	Quenching não fotoquímico
PO	Pingo de ouro
PSII	Fotossistema II
SB	Sem bioestimulante
SOD	Superóxido dismutase
SV	Sempre-Verde
TRA	Teor Relativo de água
VE	Vazamento de eletrólitos
ψ_{wf}	Potencial Hídrico foliar
Φ PSII	Eficiência fotoquímica efetiva do PS II

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2	CAPÍTULO 1 - MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS À REIDRATAÇÃO INDUZIDAS PELA APLICAÇÃO DE BIOESTIMULANTE EM VARIEDADES TRADICIONAIS DE FEIJÃO-CAUPI.....	21
2.1	Introdução.....	21
2.2	Material e métodos.....	23
2.2.1	<i>Localização do experimento, material vegetal e condições experimentais.....</i>	23
2.2.2	<i>Tratamentos, delineamento experimental e análise estatística.....</i>	24
2.2.3	<i>Variáveis biométricas.....</i>	26
2.2.4	<i>Caracterização das trocas gasosas</i>	26
2.2.5	<i>Produção de vagens</i>	27
2.3	Resultados.....	27
2.3.1	<i>Efeito do estresse hídrico progressivo no crescimento.....</i>	27
2.3.2	<i>Efeito do estresse hídrico e reidratação nas trocas gasosas.....</i>	29
2.3.3	<i>Efeito da aplicação de bioestimulante em plantas sob estresse hídrico e reidratação nos parâmetros de fluorescência da clorofila a.....</i>	32
2.3.4	<i>Efeito do estresse hídrico sobre caracteres produtivos.....</i>	35
2.4	Discussão	36
2.4.1	<i>O uso de bioestimulante alivia os efeitos do estresse hídrico severo e melhora as respostas morfológicas após a reidratação.....</i>	36
2.4.2	<i>O uso de bioestimulante alivia os efeitos do estresse hídrico severo e proporciona rápida recuperação das trocas gasosas após a reidratação.....</i>	38
2.4.3	<i>O uso de bioestimulante protege o fotossistema II de plantas sob déficit hídrico e proporciona rápida recuperação após a reidratação.....</i>	40
2.4.4	<i>O uso de bioestimulante promove ganhos produtivos em plantas de feijão-caupi sob condição de veranico.....</i>	41
2.5	Conclusão	43

3	CAPÍTULO 2 – BIOESTIMULANTE À BASE DE <i>Ascophyllum nodosum</i> E ÁCIDOS FÚLVICOS MITIGAM OS DANOS CAUSADOS PELO DÉFICIT HÍDRICO EM FEIJÃO-CAUPI.....	44
3.1	Introdução.....	44
3.2	Material e métodos.....	46
3.2.1	<i>Localização do experimento, material vegetal e condições experimentais.....</i>	46
3.2.2	<i>Tratamentos e delineamento</i>	48
3.2.3	<i>Coleta das plantas e medidas biométricas.....</i>	48
3.2.4	<i>Caracterização fisiológica.....</i>	49
3.2.4.1	<i>Estado hídrico da planta e teor relativo de água (TRA)</i>	49
3.2.4.2	<i>Caracterização de alterações nos parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a e índice SPAD.....</i>	49
3.2.5	<i>Caracterização bioquímica.....</i>	50
3.2.5.1	<i>Carboidratos solúveis e prolina.....</i>	50
3.2.5.2	<i>Atividade de enzimas antioxidantes.....</i>	50
3.2.5.3	<i>Integridade das membranas.....</i>	51
3.2.5.4	<i>Perfil metabólico.....</i>	51
3.3	Análise estatística.....	52
3.4	Resultados.....	53
3.4.1	<i>Status hídrico, fisiológicos, bioquímicos e biométricos.....</i>	53
3.5	Discussão.....	61
3.6	Conclusão	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A - VALORES NÃO NORMALIZADOS DE INTENSIDADE RELATIVA DE METABÓLITOS EM FOLHAS DO GENÓTIPO PINGO DE OURO (PO).....	75
	APÊNDICE B - VALORES NÃO NORMALIZADOS DE INTENSIDADE RELATIVA DE METABÓLITOS EM FOLHAS DO GENÓTIPO SEMPRE-VERDE (SV).....	78

1 INTRODUÇÃO GERAL

As alterações climáticas surgem como um dos desafios preeminentes do século XXI, causando efeitos substanciais em vários setores, principalmente na agricultura. O aumento das temperaturas médias globais, os padrões de precipitação imprevisíveis e o aumento da frequência de fenômenos meteorológicos extremos colocaram pressões significativas sobre a segurança alimentar. Neste contexto, as culturas agrícolas, incluindo o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.), enfrentam a ameaça crescente do déficit hídrico, que resulta em reduções drásticas na produção e na qualidade das culturas.

À seca é um dos maiores desafios enfrentados pelas plantas em regiões áridas e semiáridas do mundo. A escassez de água pode afetar negativamente a fisiologia, morfologia e bioquímica das plantas, prejudicando assim o seu crescimento e desenvolvimento (LIU *et al.*, 2019). À seca afeta as plantas a nível fisiológico através de reduções da taxa fotossintéticas e da transpiração, e inibe o crescimento e desenvolvimento das folhas e raízes. Além disso, desencadeia processos de estresse oxidativo nas plantas, resultando em danos às suas estruturas celulares (BASHIR *et al.*, 2021; SELEIMAN *et al.*, 2021).

Diante desse cenário desafiador, os bioestimulantes, como os extratos de algas marinhas, têm surgido como uma promissora ferramenta para mitigar o déficit hídrico em plantas (DEOLU-AJAYI *et al.*, 2022). Esses bioestimulantes têm a capacidade de estimular o crescimento radicular, melhorar a absorção de nutrientes e água pelas plantas e ativar mecanismos de defesa antioxidante, tornando as plantas mais resilientes ao déficit hídrico (JACOMASSI *et al.*, 2022). Diante dessa complexidade, a metabolômica, surge como uma abordagem poderosa, uma vez que oferece uma visão aprofundada das respostas das plantas à aplicação de bioestimulantes, identificando mudanças nos perfis metabólicos e quantificando metabólitos específicos, como açúcares, aminoácidos e lipídios, que desempenham um papel crucial na resposta ao estresse (WANG *et al.*, 2019; LLANES *et al.*, 2018; TOUNTA *et al.*, 2021).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) é uma cultura muito importante para as regiões de clima árido e semiárido, como o Nordeste Brasileiro, tornando-se então essencial entender suas respostas ao estresse hídrico e o papel dos bioestimulantes como estratégia de manejo, que visa mitigar os efeitos negativos na produtividade. Portanto, o desenvolvimento de cultivares de feijão-caupi que sejam tolerantes ao déficit hídrico é uma estratégia promissora para aumentar a segurança alimentar nas áreas menos tecnificadas e

com pouca gestão de recursos hídrico (SILVA et al., 2019; SILVA, et al., 2021; SINGH e RAJA REDDY, 2011). Muitos estudos focam na seleção de genótipos baseado no rendimento de grãos produzidos em sequeiro, no entanto, uma abordagem fisiológica bioquímica, podem contribuir para aprofundar a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca (ANDROCIOLI *et al.*, 2020).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo consistiu em investigar, através das análises univariada e multivariada, os impactos da aplicação de bioestimulantes no desempenho de plantas de feijão-caupi submetidas a condições de déficit hídrico severo e reidratação. Para isso, neste estudo, adotamos diversas abordagens, como o estudo da metabolômica e as respostas fisiológicas e produtivas. Além disso, avaliamos como a aplicação de bioestimulantes pode modular essas respostas, identificando possíveis metabólitos envolvidos na atenuação dos efeitos do estresse hídrico.

2 CAPÍTULO 1 – MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS À REIDRATAÇÃO INDUZIDAS PELA APLICAÇÃO DE BIOESTIMULANTE EM FEIJÃO-CAUPI

(Artigo a ser submetido)

2.1 Introdução

As mudanças climáticas globais têm induzido restrições ambientais ao crescimento, desenvolvimento e produção das culturas. O estresse hídrico é um dos principais fatores que afetam a produtividade agrícola no Brasil e no mundo. A irregularidade na distribuição das chuvas e o manejo inadequado da irrigação podem causar déficit hídrico nas plantas, reduzindo o seu crescimento, desenvolvimento e rendimento. Há previsão que esse problema se torne ainda mais severo e frequente em todo o mundo, principalmente nas regiões áridas e semiáridas, afetando a segurança alimentar mundial (MUNJONJI *et al.*, 2018). Em adição, estima-se que para atender à crescente demanda por alimentos até 2050, sejam necessários ganhos de produção em torno de 50% do que encontramos na atualidade (HUNTER *et al.*, 2017).

O déficit hídrico é uma condição que ocorre quando a demanda de água pelas plantas excede o suprimento de água pelo solo e/ou pela precipitação (LAITURI, 2014). Essa situação pode afetar o crescimento, desenvolvimento e rendimento das plantas que são limitados pelos prejuízos causados a fotossíntese, transpiração e absorção de nutrientes (ETESAMI; JEONG; GLICK, 2023). O déficit hídrico também pode aumentar a suscetibilidade das plantas a pragas e doenças, bem como reduzir a qualidade da cultura e o valor de mercado (HUNTER *et al.*, 2017). Portanto, melhorar a eficiência do uso da água pelas plantas e otimizar o manejo de água na agricultura são essenciais para garantir a segurança alimentar e a sustentabilidade ambiental.

A aplicação de bioestimulante como atenuador de estresse pode se tornar importante no cenário das mudanças climáticas. O seu uso na agricultura tem crescido nos últimos anos, uma vez que esses produtos podem auxiliar os agricultores a obterem lavouras mais produtivas e sustentáveis (MA; FREITAS; DIAS, 2022). Os bioestimulantes são produtos à base de substâncias naturais que, quando aplicados às plantas, têm como objetivo estimular o seu crescimento e desenvolvimento, além de melhorar a sua resistência a diversos tipos de estresses bióticos e abióticos (DU JARDIN, 2015). Além disso, podem melhorar a

absorção de nutrientes e estimular o crescimento radicular, o que aumenta a capacidade das plantas de explorarem o solo em busca desses recursos (SILVA *et al.*, 2023).

Atualmente existem diversas formulações de bioestimulantes (MALIK *et al.*, 2021). Eles podem ser compostos por ácidos húmicos e/ou ácidos fúlvicos, algas marinhas, aminoácidos e micro e macronutrientes (DU JARDIN, 2015). Por exemplo, os bioestimulantes a base de extratos de algas marinhas (como, *Ascophyllum nodosum*) e ácidos fúlvicos, atuam aprimorando a capacidade de absorção de água e nutrientes, promovendo aumentos nas atividades metabólicas (ROSA *et al.*, 2021; SHUKLA *et al.*, 2019). Após a absorção pela planta, diversos processos metabólicos e fisiológicos são estimulados. Esse conjunto de processos induzem mudanças nas vias de sinalização mediadas por fitohormônios, envolvidas no crescimento e desenvolvimento dos vegetais (NIU *et al.*, 2022). Essas reações estão relacionadas ao fato dos extratos de algas marinhas e ácidos fúlvicos serem ricos em uma variedade de aminoácidos, proteínas, betaínas, vitaminas e precursores de hormônios vegetais, e outras substâncias que podem ser benéficas em plantas sob estresse (ROSA, *et al.*, 2021; GOÑI; QUILLE; O'CONNELL, 2018).

O feijão-caupi é uma das leguminosas mais importantes do Brasil devido a sua elevada aptidão para o cultivo em áreas semiáridas ou com baixa disponibilidade de água. Isto devido à existência nesta espécie de mecanismos fisiológicos e morfológicos que reduzem a perda de água e mantêm a atividade fotossintética sob escassez hídrica (SILVA *et al.*, 2021). Dentre esses mecanismos, destacam-se o fechamento estomático, a redução da área foliar, o aumento do sistema radicular e a síntese de compostos osmoprotetores (MUNJONJI AYISI, *et al.*, 2018; NINOUS TSIALTAS, *et al.*, 2013). O melhoramento genético do feijão-caupi tem proporcionado avanços na cultura visando melhorar a produtividade, a qualidade dos grãos e a resistência a pragas e doenças. Portanto, devido a relevância desta espécie no cenário nacional e mundial, diferentes abordagens para reduzir os impactos da seca na produção e qualidade dos grãos tem sido proposta, incluindo a aplicação de bioestimulantes como indutores de tolerância. No entanto, são necessários estudos que demonstrem os mecanismos de respostas de plantas de feijão-caupi submetidos a déficit hídrico e aplicação de bioestimulante a base de extratos de algas e ácidos fúlvicos

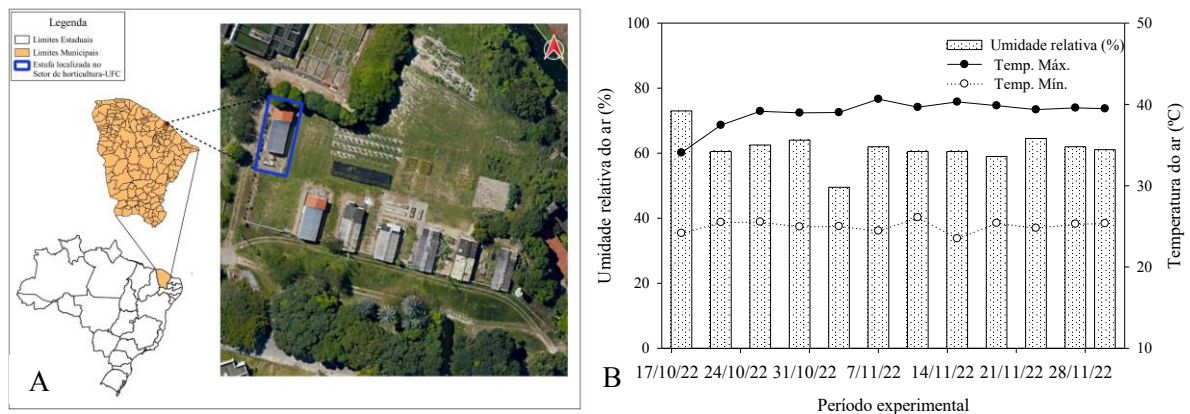
Diante desse cenário, o objetivo desse trabalho é determinar a eficiência do bioestimulante a base de extrato de algas marinhas (*Ascophyllum nodosum*) e ácidos fúlvicos em aliviar os efeitos negativos do déficit hídrico severo sobre as respostas morfológicas, aspectos produtivos e as trocas gasosas de plantas de feijão caupi, além de avaliar a capacidade de resposta das plantas a reidratação.

2.2 Material e métodos

2.2.1. Localização do experimento, material vegetal e condições experimentais

O experimento foi conduzido em casa de vegetação (Figura 1A) pertencente ao Departamento de Fitotecnia, localizada no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE, situada na zona litorânea com latitude de 3°44'25" S, longitude de 38° 34'34" W e altitude de 14 m do nível do mar. A região é classificada como tropical semiúmido (tipo As segundo a classificação climática de Köppen-Geiger). As temperaturas máximas e mínimas e umidade relativa do ar coletadas durante o período experimental com auxílio de um datalogger e estão representadas na Figura 1B.

Figura 1: Localização do experimento e dados de umidade relativa e temperatura do ar.



Fonte: Mapa elaborado por Antônio Erivando Bezerra (1A). Figura elaborada pelo autor (1B).

Um dos genótipos de feijão-caupi empregado neste estudo já foi caracterizado e reconhecido por sua tolerância à seca, denominado Pingo de Ouro 1,2 (PO) (RIVAS *et al.*, 2016). Cinco sementes foram semeadas em colunas de PVC (com 0,15 m de diâmetro e 0,5 m de altura), preenchidas com solo de textura média e areia, e devidamente adubadas de acordo com as necessidades nutricionais da espécie, conforme indicado pela análise química do solo (Tabela 1). O processo de desbaste foi realizado sete dias após a semeadura (DAS), mantendo apenas uma planta por coluna.

Tabela 1 – Características físicas e químicas da mistura (solo + areia lavada).

pH	ds	CE	MO	Ca	Mg	Na	K	H+Al	S	T	V	P	Cu	Fe	Mn	Zn
H ₂ O	g cm ³	dS m ⁻¹	g kg ⁻¹cmol _c kg ⁻¹						%mg kg ⁻¹					
7,0	1,46	0,26	5,65	2,70	1,20	0,18	0,20	0,66	4,3	4,9	87	57	0,61	57,10	33,15	1,76

Fonte: Laboratório de solos/água SRH- Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos – FUNCEME.

A determinação da Capacidade de Campo (CC) seguiu a metodologia estabelecida por Souza et al. (2000), que envolveu a diferença entre o peso do solo úmido após saturação e drenagem completa e o peso do solo seco ao ar. A manutenção diária da CC foi rigorosamente mantida em uma parcela amostral, com a perda diária de água devido à evapotranspiração sendo reposta até o momento em que o déficit hídrico fosse imposto nos tratamentos sob estresse. O peso do solo foi monitorado utilizando uma balança com capacidade para 20 kg, enquanto a técnica de gravimetria foi empregada para acompanhar as mudanças nas colunas para indicar a reposição hídrica.

O bioestimulante utilizado neste estudo foi o FH Attivus®, um produto comercializado pela empresa de Fertilizantes Heringer. Esse bioestimulante é composto por extrato de algas marinhas (*Ascophyllum nodosum*) e ácidos fúlvicos, além de conter pequenas quantidades de macro e micronutrientes (Tabela 2). O produto apresentado na forma de pó foi dissolvido em água, de acordo com a recomendação do fabricante, antes de ser aplicado via pulverização foliar nos tratamentos que receberam o bioestimulante. O grupo controle, que não recebeu bioestimulante, recebeu aplicação de água. A dose aplicada seguiu as recomendações do fabricante para a cultura da soja/feijão, totalizando 250 g/ha (Heringer Fertilizers).

Tabela 2 – Composição do Bioestimulante FH Attivus®

Nutrientes (%)										Compostos naturais (%)	
N	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn		<i>Ascophyllum nodosum</i>	Ácidos fúlvicos
2	1	3,6	0,1	0,04	0,05	0,1	0,1	0,2		64	6,5

Fonte: Fertilizantes Heringer

A aplicação do bioestimulante foi realizado três dias antes da imposição do déficit hídrico em toda área foliar do feijão-caupi com o auxílio de um pulverizador manual de compressão com capacidade para 1,5 L. O Déficit hídrico foi imposto na fase vegetativa correspondente a pré-floração e maior demanda hídrica.

Para os dados fisiológicos foi realizada uma ANOVA seguindo o modelo de análise de medidas repetidas ao longo do tempo (ANOVA-RM). Foi realizado inicialmente a verificação dos pressupostos estatísticos, incluindo a normalidade dos dados (Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias e quando necessário realizou-se a transformação dos dados. A aplicação de testes de pós-hoc, como o teste de Tukey, foi realizada quando a ANOVA-RM revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), permitindo uma análise mais detalhada das diferenças entre grupos específicos. Esse tipo de abordagem proporcionou uma compreensão aprofundada das tendências e das influências dos fatores em nossa pesquisa, garantindo uma interpretação sólida e confiável dos resultados.

2.2.4. Variáveis biométricas

Para as variáveis de crescimento foram avaliados: altura da parte aérea (ALT) com auxílio de uma trena graduada, número de folhas (NF) por meio da contagem de folhas completamente expandidas, diâmetro do caule (DC) com auxílio de um paquímetro digital. As avaliações foram realizadas ao final do máximo estresse hídrico (9 dias de suspensão da irrigação) e ao final do período de reidratação (4 dias após a retomada da irrigação).

2.2.5. Caracterização dos mecanismos fotossintéticos

A análise das variáveis relacionadas as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foi realizada nos dias amostrais das 08:00 às 11:00 h no terceiro trifoliolo completamente expandido utilizando um analisador de gases por infravermelho (IRGA, Li-Cor - Li6400 XT) com concentração de CO₂ na câmara a 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e 1500 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Foram mensurados a taxa fotossintética líquida (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), razão C_i/C_a ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) e transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). A partir da razão A/C_i , foi calculada eficiência instantânea de carboxilação (E_iC).

As medidas de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas utilizando o fluorômetro acoplado ao IRGA (6400-40, LI-COR, USA) na mesma folha em que foram avaliadas as trocas gasosas. Inicialmente as folhas das plantas avaliadas foram aclimatadas ao escuro por um período de 30 minutos, para obtenção dos parâmetros de fluorescência mínima (F_o) e, após um pulso de luz saturante, foi obtido a fluorescência máxima (F_m). Em seguida foi calculada a eficiência fotoquímica potencial do fotossistema II (PSII), expressa pela relação F_v/F_m . Com os parâmetros de fluorescência coletados no claro (no mesmo momento da

determinação das trocas gasosas) foram determinados o rendimento quântico efetivo do FSII (Φ PSII), taxa de transporte de elétrons (ETR), o *quenching* fotoquímico (qP), o *quenching* não-fotoquímico (qN) e o coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ).

2.2.6. Produção de vagens

Após a reidratação, todas as plantas foram mantidas em 80% CC até o final do ciclo. Portanto, a caracterização da produtividade, foi avaliada ao final do experimento (55 DAS) em plantas controles e reidratadas: comprimento da vagem (CVA), número de vagens por planta (NVP), número de sementes por vagens (NSV) e peso de 10 sementes (P_{10S}).

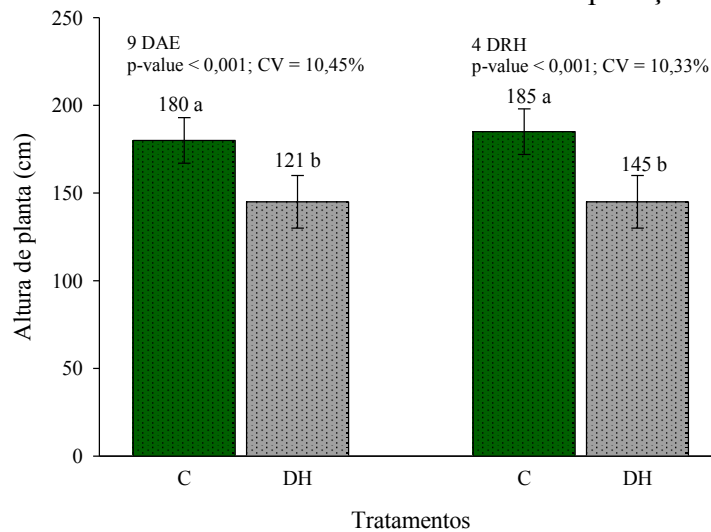
2.3. Resultados

2.3.1. Efeito do estresse hídrico progressivo no crescimento

Na análise estatística de todas as variáveis foi verificado se os erros atendem às pressuposições de normalidade e homogeneidade das variâncias. Quando necessário, foi realizado a transformação de dados.

A ANOVA realizada aos 9 DAE (dias após a imposição do estresse hídrico) para a variável altura de planta revelou efeito estatisticamente significativo ($p < 0,001$) para o fator condição hídrica do solo, indicando que esse fator exerceu influência substancial sobre essa variável resposta. A média do tratamento controle foi de 180 cm, enquanto a média do tratamento sob déficit hídrico foi de 121 cm, o que implica em uma diferença relativa de 33,00% entre os tratamentos (Figura 3).

Figura 3 – Efeitos do estresse hídrico progressivo (9 dias após o estresse – 9 DAE) e reidratação (4 dias de reidratação - 4 DRH) no comprimento da parte aérea de plantas de feijão-caupi crescidas sob déficit hídrico severo e submetidas a aplicação de bioestimulante.

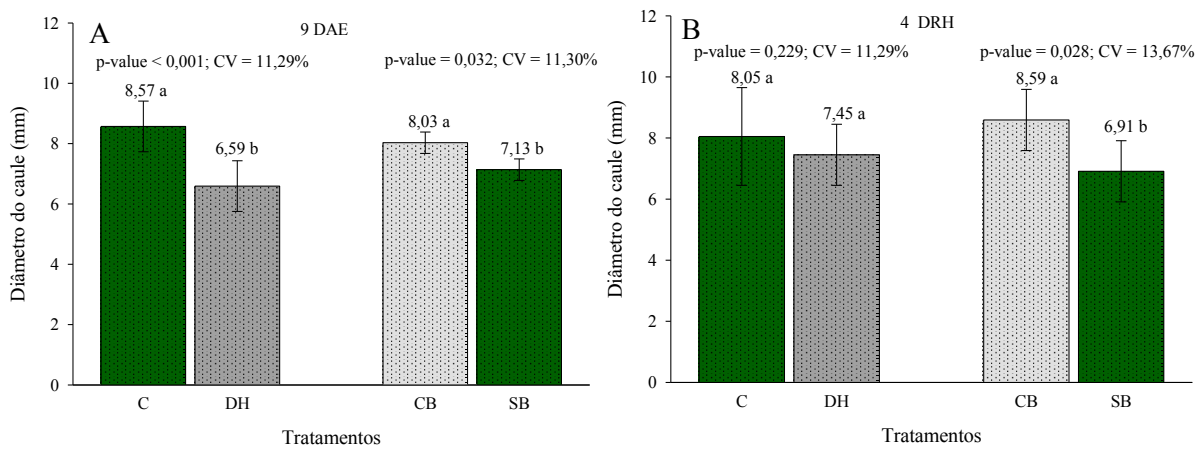


Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Tukey ($p < 0,05$). C- Controle e DH- Déficit hídrico. Valores são médias (\pm DP) para cinco repetições.

A análise das plantas que foram reidratadas por quatro dias (4DRH; Figura 3B), mostrou efeitos significativo apenas para o fator condição hídrica do solo ($p < 0,001$). A diferença relativa entre as médias foi de 21,00% (Figura 3). Esses resultados ressaltam que a deficiência hídrica influenciou significativamente na variável altura de planta e que após a reidratação os efeitos foram levemente reduzidos.

No que se refere ao diâmetro do caule avaliado após nove dias de estresse progressivo, a análise de variância (ANOVA) destacou como significativo a influência dos fatores condição hídrica do solo ($p < 0,001$) e manejo do bioestimulante ($p = 0,032$) para essa variável. Observou-se que a condição hídrica do solo (CH) exerceu um efeito altamente significativo, com uma média de 8,6 mm para o grupo controle e 6,6 mm para o grupo sob estresse (Figura 4A), ou seja, uma diferença relativa de 23,25% entre as médias. No que diz respeito ao manejo do bioestimulante, a ANOVA também revelou um efeito significativo, com médias de 8,03 mm para o grupo com bioestimulante (CB) e 7,31 mm para o grupo sem bioestimulante (SB), resultando em um incremento de 11,25% aos 9 DAE.

Figura 4. Efeitos do estresse hídrico progressivo (9 dias após o estresse – 9 DAE, A) e reidratação (4 dias de reidratação - 4 DRH, B) e manejo da aplicação do bioestimulante no diâmetro do caule.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo Tukey ($p < 0,05$). Valores são médias (\pm DP) para cinco repetições.

A análise realizada ao final do período de reidratação demonstrou efeito significativo apenas para o fator manejo do bioestimulante ($p=0,028$) (Figura 4B). As plantas que receberam o bioestimulante tiveram médias de DC de 8,59 mm, enquanto os tratamentos que não receberam tiveram média de 6,91 mm. A comparação relativa demonstrou um incremento de 20,00%, indicando efeito positivo do produto aplicado.

A ANOVA realizada para a variável número de folhas revelou efeito significativo ($p < 0,001$) da interação entre a condição hídrica do solo e o manejo do bioestimulante para os dois momentos avaliados. A interação aos 9DAE revelou que a aplicação do produto em situação de déficit hídrico promoveu um incremento significativo de 26,70%, e em termos absolutos resultou em um ganho em média de 2 folhas. Por outro lado, após a retomada da irrigação, observamos um incremento de 30,00%, e um ganho médio de 4 folhas, quando as plantas receberam bioestimulante.

Tabela 3. Número de folhas ao final do déficit hídrico severo e após quatro dias de reidratação.

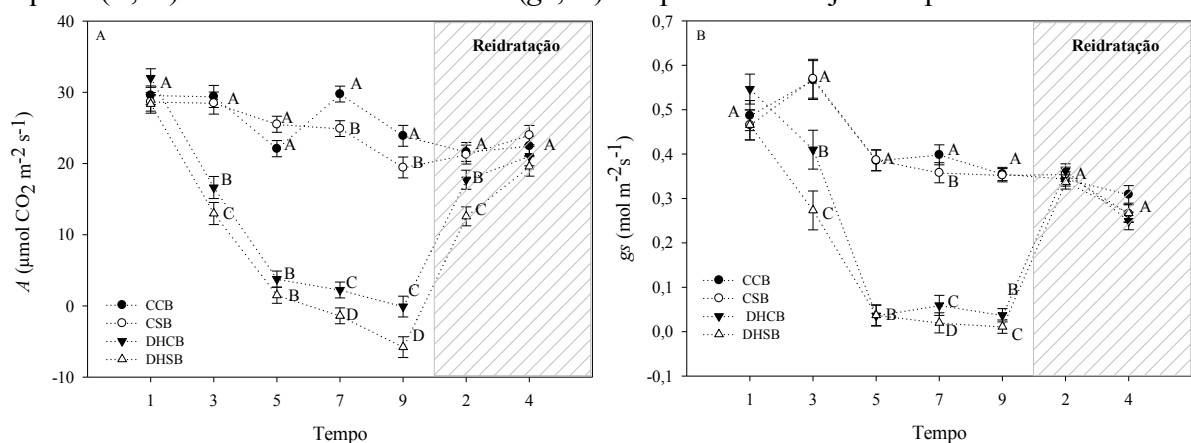
9 DAE	CB	SB	4 DRH	CB	SB
Controle	12,2 \pm 1,48 aA	12,4 \pm 0,70 aA	Controle	17,0 \pm 1,00 aA	16,4 \pm 1,94 aA
DH	9,0 \pm 0,70 bA	6,6 \pm 1,42 bB	DH	13,0 \pm 1,22 bA	9,0 \pm 1,22 bB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha não diferem pelo Tukey ($p < 0,05$). CB e SB representam a aplicação ou não de bioestimulante e DH indica o tratamento com Déficit Hídrico.

2.3.2. Efeito do estresse hídrico e reidratação nas trocas gasosas

A fotossíntese líquida (A) apresentou queda sob condição de seca progressiva (Figura 5A). Percebe-se que aos três dias já se observa efeito significativo do estresse e da aplicação do bioestimulante. É possível destacar que a aplicação do bioestimulante resultou em uma redução da taxa fotossintética sob condições de déficit hídrico nesta data. Com o maior tempo de exposição ao déficit hídrico, notou-se também efeito significativo da interação entre os fatores ao sétimo e nono dia de avaliação. Nessas ocasiões, os tratamentos T3 e T4 apresentaram, respectivamente, médias de $2,24 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $-1,39 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, para o sétimo dia; e $-0,09 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $-5,79 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, para o nono dia. Durante esse período as testemunhas, T1 e T2, apresentaram diferenças também ao sétimo e nono dia de avaliação, com médias superiores para os tratamentos que receberam aplicação do bioestimulante (T1), com diferenças relativas entre esses tratamentos de 16,27 e 18,60% aos 7 e 9 DAE, respectivamente. Após a retomada da irrigação foi observada uma recuperação da fotossíntese ao segundo dia, porém, apesar da recuperação, as plantas que estavam sob estresse ainda tiveram médias inferiores aos controles (Figura 5A). No entanto, é importante destacar que as plantas com bioestimulante (T3) foram superiores as não tratadas (T4), com médias de $17,71 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $12,57 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, ou seja, um ganho de quase 30%. Ao final da reidratação observou-se resposta positiva, uma vez que não tivemos diferenças significativas entre os tratamentos.

Figura 5. Efeitos do estresse hídrico progressivo e reidratação nas variáveis fotossíntese líquida (A , A) e condutância estomática (g_s , B) em plantas de feijão-caupi.

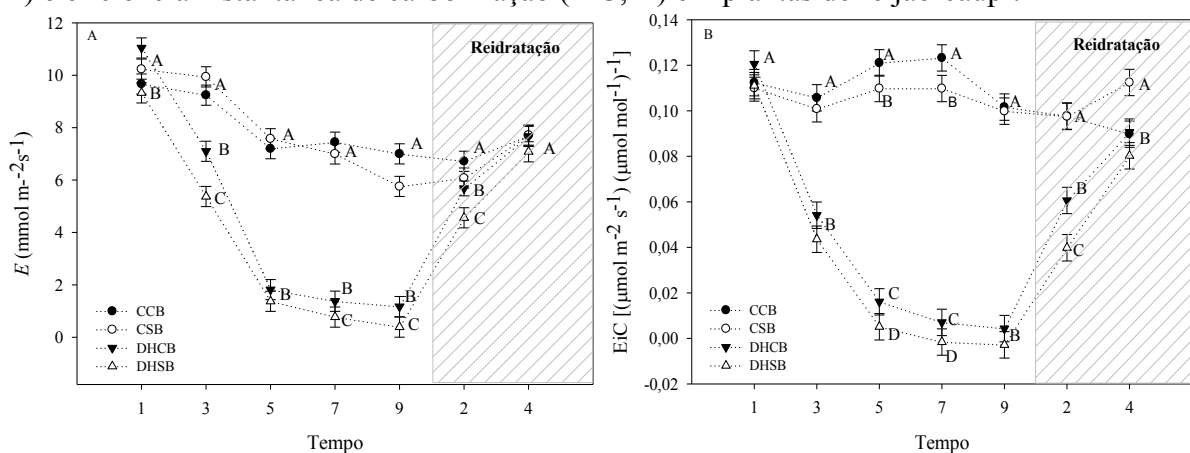


De 1 - 9 dias representa o déficit hídrico progressivo e 2 - 4 representam a fase de reidratação. T1: CCB, T2: CSB; T3: DHCB; T4 DHSB. As plantas controles são representadas por círculos, e as plantas sob déficit hídrico por triângulos. Marcações pretas significa aplicação do bioestimulante e marcações brancas remetem a ausência de bioestimulante. Valores são médias (\pm EP) para quatro plantas.

As respostas de condutância estomáticas (g_s) foram semelhantes às de A (Figura 5B). Os efeitos foram observados com três dias de suspensão da irrigação. Nesse período, é possível notar um efeito imediato no tratamento T4, com diferença de 34,00% em relação ao tratamento T3. A intensificação do estresse resultou em valores próximos a zero. Na situação de máximo estresse, a média das plantas do tratamento T3 ($0,036 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) foi estatisticamente superior à média do tratamento T4 ($0,011 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Após a retomada da irrigação, os valores dos tratamentos foram equiparados ao segundo dia, diferentemente do que se observou em relação a taxa fotossintética.

A ANOVA realizada para a taxa de transpiração (E) relevou um efeito significativo da interação ao longo do tempo ($p < 0,05$) (Figura 6A). Os tratamentos T1 e T2 não diferiram entre si ao longo do período experimental, demonstrando que não houve influência da aplicação do produto em plantas sem restrição hídrica para essa variável. No entanto, no terceiro dia, o efeito do déficit de água foi evidente, principalmente no tratamento T4, que apresentou a menor média ($5,37 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), sendo 24,36% inferior ao tratamento T3. A intensificação do estresse exerceu forte influência nesta variável, porém, com sete e nove dia de avaliação notamos que o tratamento T3 ($1,37$ e $1,17 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) foi levemente superior ao tratamento T4 ($0,77$ e $0,38 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). A retomada da irrigação estabilizou o processo de transpiração, com resposta mais pronunciada observada no tratamento T3 ($5,68 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), que foi estatisticamente superior ao tratamento T4 ($4,55 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ao segundo dia de reidratação, assim como observado para g_s .

Figura 6. Efeitos do estresse hídrico progressivo e reidratação nas variáveis transpiração (E , A) e eficiência instantânea de carboxilação (E_iC , B) em plantas de feijão-caupi.



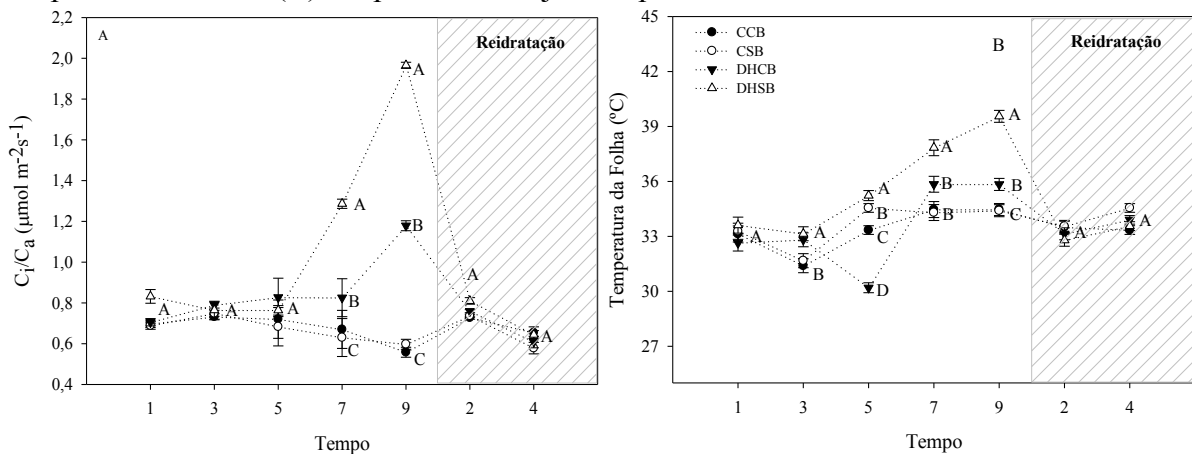
De 1 - 9 dias representa o déficit hídrico progressivo e 2 - 4 representam a fase de reidratação. T1: CCB, T2: CSB; T3: DHCB; T4 DHSB. As plantas controles são representadas por círculos, e as plantas sob déficit hídrico

por triângulos. Marcações pretas significa aplicação do bioestimulante e marcações brancas remetem a ausência de bioestimulante. Valores são médias (\pm EP) para quatro plantas.

Para a eficiência instantânea de carboxilação (EiC), foram observadas respostas semelhantes à variável transpiração (Figura 6B). Uma redução é notável nos tratamentos T3 e T4, com diferenças entre eles sendo observadas nos dias cinco e sete de avaliação. Enquanto isso os tratamentos T1 e T2 demonstraram respostas distintas nos tempos cinco e sete, com destaque para o tratamento T1, que apresentou melhor EiC. É possível estimar um ganho médio de 16,7% na eficiência instantânea de carboxilação com a aplicação do bioestimulante. No entanto, com a presença do déficit hídrico os ganhos observados são de mais de 50% se aplicado o bioestimulante. Após a reidratação a EiC teve resposta positiva, com ganhos significativos, que podem ser observados já na primeira avaliação.

Para a razão C_i/C_a (Figura 7A), inicialmente foi observado que os tratamentos não diferiram entre si até o quinto dia de estresse. Porém, o incremento da seca provocou efeitos significativos, em que as médias do T4 foram superiores as demais, seguidas do tratamento T3, que também foi superior aos tratamentos T1 e T2. Após o segundo dia da retomada da irrigação, foi observada uma recuperação da relação C_i/C_a ao nível dos tratamentos controles.

Figura 7. Efeitos do déficit hídrico progressivo e reidratação nas variáveis razão C_i/C_a (A) e temperatura da folha (B) em plantas de feijão-caupi.



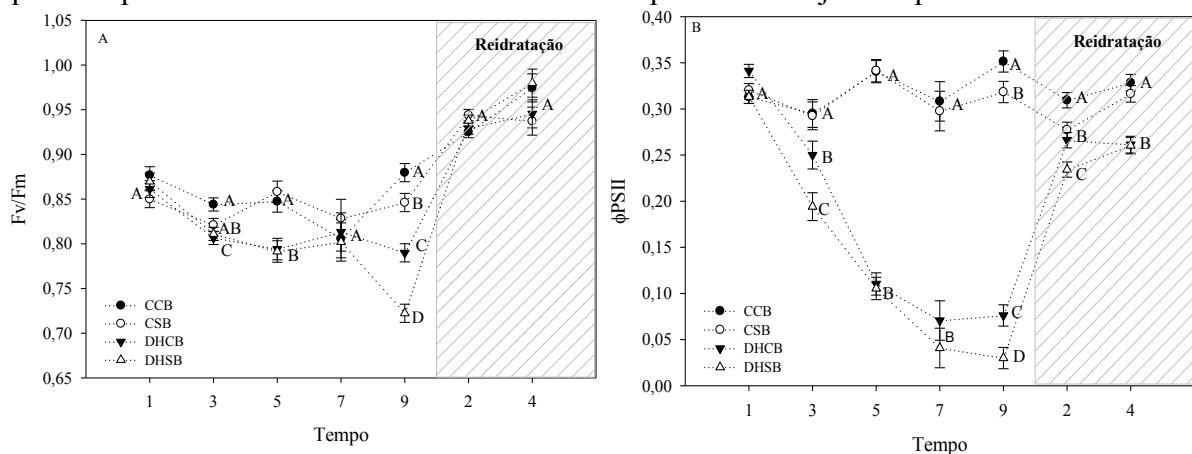
De 1 - 9 dias representa o déficit hídrico progressivo e 2 - 4 representam a fase de reidratação. T1: CCB, T2: CSB; T3: DHCB; T4 DHSB. As plantas controles são representadas por círculos, e as plantas sob déficit hídrico por triângulos. Marcações pretas significa aplicação do bioestimulante e marcações brancas remetem a ausência de bioestimulante. Valores são médias (\pm EP) para quatro plantas.

Para a variável temperatura da folha, foram observadas oscilações ao longo do período de avaliação em todos os tratamentos. No entanto, é importante ressaltar que durante o período de estresse as maiores médias foram observadas no tratamento T4, com temperatura máxima em torno de 39 °C no nono dia de déficit hídrico.

2.3.3. Efeito da aplicação de bioestimulante nos parâmetros de fluorescência da clorofila a de plantas sob déficit hídrico e reidratação

A eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m) foi variável entre os tratamentos (Figura 8A). O tratamento T4 foi mais afetado, principalmente com nove dias de seca, com média de 0,72. O tratamento T3, com média 0,79, foi fortemente influenciado, porém, é válido destacar que mesmo assim esse tratamento foi superior ao T4, neste tempo. O rendimento quântico efetivo (ϕ PSII) foi influenciado negativamente pelo estresse (Figura 8B). A presença do bioestimulante atenuou os efeitos negativos da falta de água quando comparado com o tratamento sem bioestimulante. Após a reidratação as plantas conseguiram se reestabelecer, no entanto, ainda assim, ao final do período de avaliações as médias dos tratamentos T3 e T4 foram inferiores aos dos tratamentos T1 e T2.

Figura 8. Efeitos do estresse hídrico progressivo e reidratação nas variáveis rendimento quântico potencial e efetivo do fotossistema II em plantas de feijão-caupi.

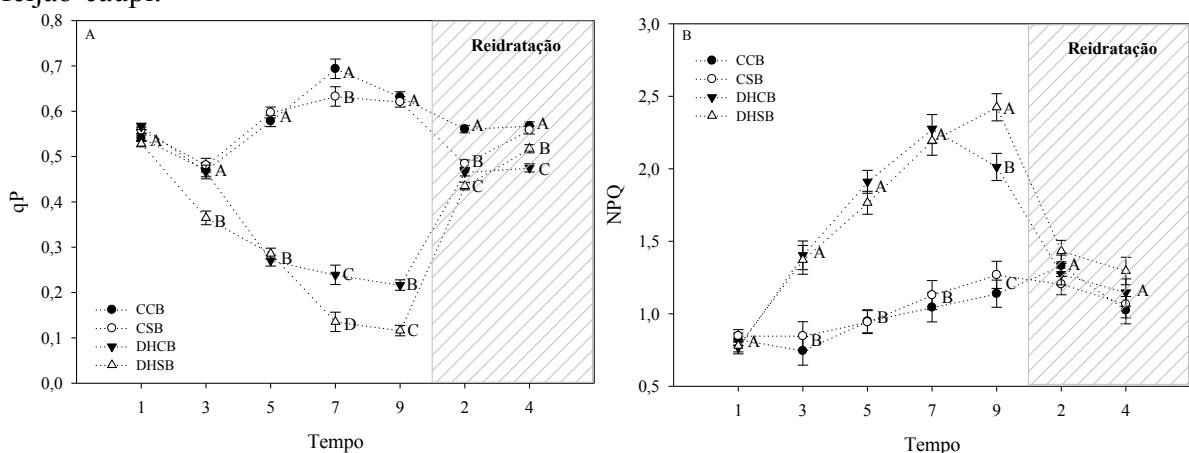


De 1 - 9 dias representa o déficit hídrico progressivo e 2 - 4 representam a fase de reidratação. T1: CCB, T2: CSB; T3: DHCB; T4 DHSB. As plantas controles são representadas por círculos, e as plantas sob déficit hídrico por triângulos. Marcações pretas significa aplicação do bioestimulante e marcações brancas remetem a ausência de bioestimulante. Valores são médias (\pm EP) para quatro plantas.

As figuras 9A e 9B mostram o efeito da aplicação do bioestimulante em plantas de feijão-caupi sob déficit hídrico progressivo sobre as variáveis *quenching* fotoquímico (qP)

e coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ). Para o qP foi observado uma redução nos tratamentos T3 e T4 destacando-se o T3 que foi superior nos tempos de avaliações 3, 7 e 9 em relação às plantas sem aplicação do bioestimulante (T4), com diferenças de 22,0%, 43,0% e 47,0%, respectivamente. A reidratação proporcionou recuperação da qP das plantas sujeitas previamente ao estresse hídrico, no entanto, os valores foram inferiores aos dos tratamentos controles ao final de 4 dias.

Figura 9. Efeitos do déficit hídrico progressivo e reidratação nas variáveis *quenching* fotoquímico (qP, A) e coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ, B) em plantas de feijão-caupi.



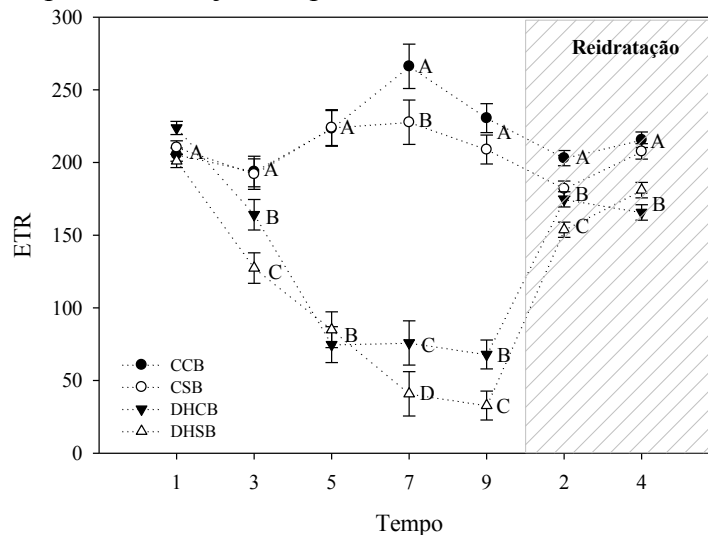
De 1 - 9 dias representa o déficit hídrico progressivo e 2 - 4 representam a fase de reidratação. T1: CCB, T2: CSB; T3: DHCB; T4: DHSB. As plantas controles são representadas por círculos, e as plantas sob déficit hídrico por triângulos. Marcações pretas significa aplicação do bioestimulante e marcações brancas remetem a ausência de bioestimulante. Valores são médias (\pm EP) para quatro plantas.

Para o NPQ, o comportamento foi semelhante entre os tratamentos T1 e T2, assim como T3 e T4 (Figura 9B). No entanto, as plantas estressadas e não tratadas com o bioestimulante (T4) apresentaram maiores médias ao nono dia de aplicação (9DAE). Após a reidratação todos os tratamentos tiveram médias estatisticamente iguais.

A taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 10) apresentou uma tendência semelhante à observada na fotossíntese líquida (A) sob condições de seca progressiva. Após três dias de exposição à seca ficou evidente um efeito significativo sobre a ETR, porém, a aplicação do bioestimulante aliviou os efeitos do estresse. À medida que o déficit hídrico se intensificou, observou-se também efeito significativo da interação entre os fatores, no sétimo e nono dia de avaliação. Nessas ocasiões, as médias de ETR para os tratamentos T3 e T4, respectivamente, foram de 75 e 67 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no sétimo dia e 40 e 32 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no nono dia, com diferenças estatísticas sendo observadas. Após a retomada da irrigação, observou-se

resposta das plantas já no segundo dia. No entanto, mesmo com essa recuperação, os tratamentos T3 e T4 apresentaram médias inferiores aos demais.

Figura 10. Efeitos do déficit hídrico progressivo e reidratação na variável taxa de transporte de elétrons (ETR) em plantas de feijão-caupi.



De 1 - 9 dias representa o déficit hídrico progressivo e 2 - 4 representam a fase de reidratação. T1: CCB, T2: CSB; T3: DHCB; T4 DHSB. Valores são médias (\pm EP) para quatro plantas. As plantas controles são representadas por círculos, e as plantas sob déficit hídrico por triângulos. Marcações pretas significa aplicação do bioestimulante e marcações brancas remetem a ausência de bioestimulante. Valores são médias (\pm EP) para quatro plantas.

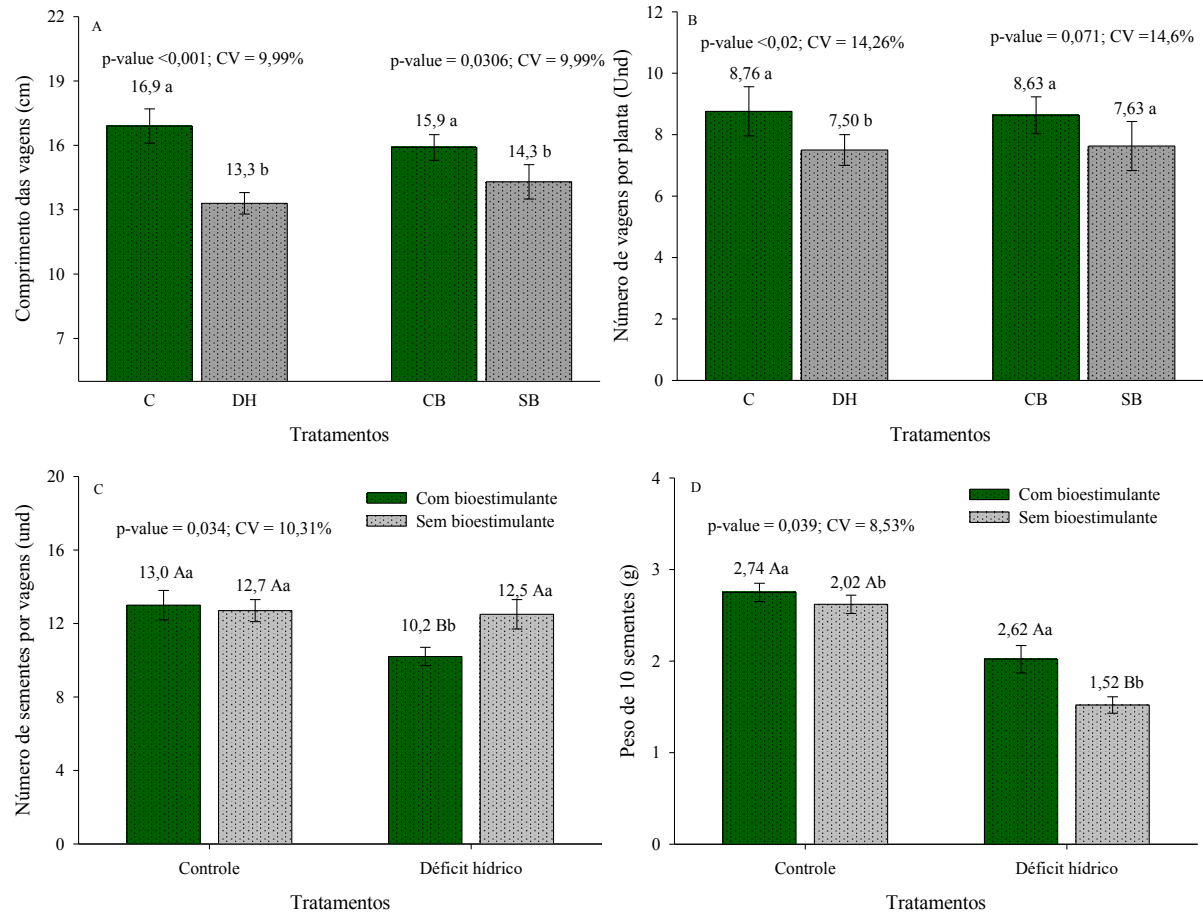
2.3.4. Efeito do déficit hídrico sobre caracteres produtivos em diferentes genótipos de feijão-caupi.

Todos os componentes de rendimento mostraram-se influenciados pelos fatores avaliados. Para o comprimento das vagens (CVA) e número de vagens por planta (NVP), a ANOVA revelou efeito significativo apenas para os fatores isolados, enquanto que para as variáveis número de sementes por vagens (NSV) e peso de 10 sementes (P10s), a ANOVA foi significativa para a interação entre os fatores.

Para o comprimento das vagens (Figura 11A), observou-se que para o efeito isolado condição hídrica, as plantas controles (16,9 cm) tiveram médias superiores às plantas sob restrição hídrica (13,3 cm). Já para o fator manejo do bioestimulante, a aplicação do produto proporcionou um incremento de 10,0% no CVA. Para o NVP, o efeito significativo foi apenas para o fator condição hídrica (Figura 11B). Nesse caso, as plantas irrigadas tiveram uma superioridade de 14,38% em relação as plantas sob estresse. O efeito do manejo do

bioestimulante não foi significativo, mas em termos absolutos, foi observado média superior nas plantas que receberam bioestimulante.

Figura 11. Efeitos do déficit hídrico progressivo e manejo da aplicação do bioestimulante nos caracteres produtivos comprimento das vagens (A), número de vagens por planta (B), número de sementes por vagens (C) e peso de 10 sementes (D).



Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo Tukey ($p < 0,05$) para os fatores simples. Para interação (Figuras C e D), médias seguidas de mesma minúscula (condição hídrica) e maiúscula (Manejo do bioestimulante), não diferem pelo teste de Tukey. Valores são médias (\pm DP) para cinco repetições.

Para o número de sementes por vagens, foi observado efeito significativo da interação entre os fatores (Figura 11C). A partir do gráfico podemos inferir, sob déficit hídrico, as plantas tratadas com o bioestimulante (T3) apresentaram médias inferiores às não tratadas com o bioestimulante (T4). Os tratamentos T1 e T2, não foram diferentes entre si. Logo, o bioestimulante não foi suficiente para proporcionar incremento no número de sementes por vagens. No entanto, avaliando o peso de 10 sementes, observa-se uma resposta positiva da aplicação do bioestimulante (Figura 11D). Comparando os tratamentos T3 e T4, percebe-se que as sementes tratadas tiveram uma maior massa, logo a presença do bioestimulante proporcionou um incremento em massa de 42,0% em condições de déficit

hídrico. Além disso, não houve diferença significativa entre os tratamentos T1 e T3, ou seja, entre condição irrigada e seca.

2.4. Discussão

2.4.1. O uso de bioestimulante alivia os efeitos do déficit hídrico severo e melhora as respostas morfológicas após a reidratação

O déficit hídrico progressivo e a retomada da irrigação, simulando uma situação de veranico proporcionaram diferentes respostas em plantas de feijão-caupi. As respostas ocorreram a níveis fisiológicos e morfológicos, e se deu principalmente em plantas que receberam a aplicação exógena de bioestimulante a base de extratos de algas marinhas e ácidos fúlvicos.

A restrição hídrica e a reidratação, tiveram impactos significativos nas variáveis altura da planta, diâmetro do caule e número de folhas. Estudos têm mostrado que a restrição hídrica afeta negativamente o crescimento das plantas, resultando em uma redução nas variáveis morfológicas das plantas (MA; FREITAS; DIAS, 2022). Isso está relacionado com o papel essencial da água na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (ETESAMI; JEONG; GLICK, 2023). Nossos resultados estão em concordância com os obtidos em um estudo anterior realizado por Silva et al. (2021) com feijão-caupi sob condição de seca e reidratação, em que a falta de água reduziu significativamente a altura média das plantas. Isso ocorre devido à diminuição da taxa fotossintética, também observada no presente estudo (Figura 5A), e da disponibilidade de água para o transporte de nutrientes nas plantas. A altura de planta não sofreu influência significativa da aplicação do bioestimulante, o que sugere que os compostos presentes no produto podem estar atuando em outras linhas de defesa. Além disso, plantas com maior comprimento da parte aérea podem demandar mais água.

Para o diâmetro do caule, a falta de água também pode levar a uma redução no seu crescimento. Estudos têm mostrado que a restrição hídrica afeta a divisão celular e o alongamento das células do caule, resultando em um diâmetro menor (SONG *et al.*, 2023). Já em estudo realizado por Meng et al. (2017), os autores relataram que a falta de água reduziu o diâmetro médio do caule em plantas de tomate. Logo, a aplicação de bioestimulantes pode ajudar a mitigar os efeitos deletérios da seca nos parâmetros de crescimento. Estudos têm demonstrado que os bioestimulantes podem melhorar o desenvolvimento radicular das

plantas, aumentando assim a absorção de água e nutrientes do solo, favorecendo o DC (BAYAT et al., 2021; ROSA et al., 2021). Esses achados estão de acordo com os resultados aqui encontrados, onde em média a aplicação do bioestimulante proporcionou incrementos de 15% no DC (Figura 4).

Quanto ao número de folhas, a falta de água também pode inibir sua produção e desenvolvimento. Alguns estudos mostraram que a restrição hídrica afeta negativamente a taxa de fotossíntese e o desenvolvimento das folhas, resultando em uma menor produção de folhas. Por exemplo, um estudo conduzido por Cowie et al. (2020), o déficit hídrico progressivo reduziu o número médio de folhas em até 50%. A aplicação de bioestimulante pode auxiliar na mitigação dos efeitos do déficit hídrico, através de mecanismos como melhora na eficiência fotossintética das plantas, aumentando assim a produção de folhas. Por exemplo, Oancea et al. (2013) testaram o efeito de bioestimulantes em tomateiro com e sem déficit hídrico, nesse caso, o bioestimulante aumentou o número de folhas e em relação ao controle.

Estudo envolvendo novas técnicas de mitigação do estresse evidenciam que a falta de água afeta negativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas a aplicação de bioestimulantes pode ser uma estratégia promissora para minimizar esses efeitos negativos. Esses resultados revelaram que a aplicação do bioestimulante proporcionou um DC mais robusto, o que pode ter favorecido um maior NF, logo torna-se uma alternativa sustentável para ganhos biométricos.

2.4.2. O uso de bioestimulante alivia os efeitos do estresse hídrico severo e proporciona rápida recuperação das trocas gasosas após a reidratação

Quando as plantas são submetidas a condições de escassez hídrica, ocorrem uma série de alterações fisiológicas e bioquímicas. A redução na disponibilidade de água leva à diminuição da taxa de fotossíntese, resultando em menor produção de carboidratos e biomassa. Essa resposta ocorrer mediante o fechamento dos estômatos das folhas como um mecanismo de defesa, reduzindo a transpiração e, conseqüentemente, a absorção de CO₂ (ANDROCIOLI et al., 2020). Esses efeitos provocados pela seca afetam diretamente a produtividade agrícola, com expectativa de menor crescimento vegetativo e menor produção de grãos ou frutos.

No presente trabalho observou-se o efeito positivo da aplicação do bioestimulante nas trocas gasosas das plantas de feijão submetidas ao déficit hídrico, estando em

concordância com outros estudos relacionados (SHUKLA et al., 2019; SILVA et al., 2023). Além disso, os bioestimulantes ativam a expressão de várias proteínas cruciais para a manutenção da fotossíntese, isso abrange desde a regulação da condutância estomática até a modulação de genes (*MYB60*, *NCED3*, *RK2*), e aquaporinas (PIP1;2), fornecendo proteção contra a desidratação em plantas como *Arabidopsis* (MA; FREITAS; DIAS, 2022; SANTANIELLO et al., 2017). Essas alterações induzidas por esses bioestimulantes permitem que as plantas preservem o estado da água e evitem a desidratação, aumentem a fotossíntese e a eficiência do uso da água (Figura 5) (DEL BUONO, 2021). Portanto, o fato desses compostos atuarem como sinalizadores moleculares e proteção aos pigmentos fotossintético, conferem as plantas mecanismos de tolerância à seca e potencializa os efeitos positivos da reidratação. Conforme observado, a percepção do retorno da irrigação proporcionou rápidas respostas do tratamento T3 (*A*, *gs*, *E* e *EiC*), o que significa que o sistema fotossintético não foi totalmente comprometido pelo estresse.

As respostas de *E* e *A* estão diretamente relacionadas ao fechamento estomático induzido pela imposição do estresse hídrico. O fechamento dos estômatos é um processo complexo que envolve uma série de mecanismos regulatórios. Durante o déficit hídrico, os níveis de água nas células-guarda diminuem, levando ao murchamento celular (BAWA et al., 2023). Esse processo resulta no fechamento dos estômatos, reduzindo assim a perda de água por transpiração. No contexto da regulação estomática, os bioestimulantes podem atuar de diferentes maneiras para mitigar os efeitos do déficit hídrico, por exemplo, como mensageiros químicos que induzem a síntese de ácido abscísico (ABA) para regular processos metabólicos, incluindo fotossíntese e respiração (DEL BUONO, 2021; GHARAGOZLOO et al., 2019).

A eficiência instantânea de carboxilação (*EiC*) e a razão *Ci/Ca* foram influenciadas pelos efeitos avaliados. A *EiC* é uma medida da eficiência com que uma planta pode fixar o dióxido de carbono (CO_2) durante a fotossíntese. Ela é calculada através da razão entre a taxa fotossintética e carbono interno, e é uma medida importante da eficiência de assimilação de CO_2 pelas plantas. A redução observada sugere restrições bioquímicas no ciclo de Calvin, possivelmente devido à baixa disponibilidade de substrato para ativação e regeneração da enzima Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) (HORIKE et al., 2023). Este resultado é um indicativo de que fatores não estomáticos atuam sobre a atividade fotossintética do feijão-caupi, como a baixa atividade da enzima RuBisCO, provavelmente devido à baixa disponibilidade de substrato (ATP e NADPH) para ativação e regeneração da enzima (DIAS, A. S. et al., 2018; FLEXAS et al., 2016).

Já a razão C_i/C_a representa a concentração de CO_2 no espaço intercelular das folhas (C_i) dividida pela concentração de CO_2 no ar ambiente (C_a), sendo afetada diretamente pelo acúmulo ou consumo de CO_2 interno. Aqui, foi observado que o tratamento T4 teve um aumento nessa variável (Figura 6B), indicando haver limitações para a utilização do CO_2 , nesse caso, um efeito bioquímico por estar sendo o principal limitante, uma vez que há a presença de CO_2 no interior do sítio de carboxilação (TATAGIBA *et al.*, 2014). Já as plantas tratadas com o produto demonstraram um aumento nessa variável, porém, bem inferior ao tratamento sem bioestimulante, indicando efeito positivo da aplicação foliar. É importante destacar que a retomada desses parâmetros após a reidratação realça a capacidade das plantas tratadas com bioestimulante em se reestabelecer após seca, sendo um importante ponto para ser abordado em programas de melhoramento (TALBI *et al.*, 2020).

2.4.3. O uso de bioestimulante protege o fotossistema II de plantas sob déficit hídrico severo

O déficit hídrico afeta o PSII do aparato fotossintético das plantas, portanto, considera-se fundamental o estudo das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, principalmente por ser considerado um método não destrutivo e rápido para avaliar a influência do estresse na fotossíntese de plantas (LIU *et al.*, 2019).

Foram observadas variações significativas entre os tratamentos para todas as variáveis. Para a eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m), o tratamento T4 foi o mais afetado, com uma média de 0,72, especialmente após nove dias de seca. Por outro lado, o tratamento T3, com uma média de 0,79, foi menos impactado em relação ao T4, destacando a influência positiva da aplicação do bioestimulante. A razão F_v/F_m indica a dissipação fotoquímica de energia e expressa a eficiência de captura desta energia de excitação pelos centros de reação abertos do PSII, com valores ótimos acima na faixa de 0,8 (DIAS, M. C. *et al.*, 2018). Logo, este resultado sugere que o bioestimulante pode proteger o fotossistema II dos efeitos negativos do estresse hídrico, o que justifica a rápida recuperação das trocas gasosas no tratamento T3, após reidratação.

O Φ_{FSII} , qP e ETR decresceram com a intensificação do déficit hídrico. O Φ_{FSII} foi negativamente afetada pela seca, porém, é crucial observar que a presença do bioestimulante atenuou esses efeitos negativos da seca, no 9º dia de estresse, como também aumentou o rendimento quântico efetivo nas plantas irrigadas (Figura 8B). Em condições estressantes essa variável é constantemente regulada negativamente pela diminuição da capacidade de assimilação de CO_2 o que ocorre em função do excesso de energia (LIU *et al.*,

2019). Já o qP foi influenciado positivamente pelo bioestimulante, sendo observado um impacto significativo no tratamento T3, que mostrou uma melhora notável em comparação ao T4, especialmente nos dias 3, 5 e 7 de avaliação. Quanto ao coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ), ambos os tratamentos, com ou sem bioestimulante, apresentaram comportamento semelhante durante o estresse hídrico. O qP indica o quanto de energia captada que está sendo consumida na fotossíntese, e sua redução indica que menos energia está sendo destinada e utilizada na fotossíntese, o que contribuiu para a queda observada nos valores de A , principalmente no tratamento T3 (HAZRATI *et al.*, 2016). Logo os dados de qP sugerem não haver danos permanentes ao PSII, porém, as plantas tratadas com bioestimulantes sofreram menos. O NPQ refere-se à dissipação de energia na forma de calor, com isso, o excesso de energia absorvida pelo aparato fotossintético pode ser dissipado, indicando um mecanismo fotoprotetor das plantas (HAZRATI *et al.*, 2016).

A ETR apresentou uma tendência semelhante à fotossíntese líquida (A) sob condições de seca progressiva. Observamos um efeito significativo do estresse hídrico após três dias, mas a aplicação do bioestimulante aliviou esses efeitos. Conforme o déficit hídrico aumentou, a interação entre os fatores se tornou significativa no sétimo e nono dia de avaliação, com as médias de ETR para os tratamentos com e sem bioestimulante sendo distintas. Durante a etapa de fixação de CO_2 a energia é um substrato essencial, logo danos a cadeia transportadora de elétrons irão causar prejuízos na produção de energia na forma de ATP e poder redutor (NADPH) (ARALDI *et al.*, 2011). Esse achado pode justificar os efeitos mais tardio da seca nas plantas tratadas com bioestimulante sob a fotossíntese e condutância estomática. Além disso um sistema menos danificado pode se restaurar mais rapidamente, conforme observado nessas variáveis.

Observou-se na Figura 7B, que para a variável temperatura da folha houve um efeito significativo da interação entre os fatores avaliados. O estresse hídrico pode resultar em um aumento na temperatura foliar devido a vários fatores, como fechamento estomático, que limita a transpiração, levando ao acúmulo de calor nas folhas (MA; FREITAS; DIAS, 2022). Esse aumento de temperatura foliar teve efeito negativo na atividade do PSII, conforme observado em nosso estudo, principalmente no tratamento T3, o mesmo que apresentou os menores valores de g_s . O PSII é altamente sensível a variações de temperatura, e o aumento excessivo pode danificar os componentes do PSII, incluindo as proteínas do complexo de reação e os pigmentos fotossintéticos (HAZRATI *et al.*, 2016).

Esses resultados indicam que a aplicação do bioestimulante teve um impacto positivo em aliviar os efeitos do déficit hídrico nas plantas de feijão-caupi, proporcionando

uma melhor eficiência fotossintética, a taxa de transporte de elétrons e o *quenching* fotoquímico em comparação com as plantas não tratadas. No entanto, mesmo com a reidratação, os tratamentos T3 e T4 ainda não alcançaram as mesmas médias que os tratamentos de controle. Isso sugere a importância de estudos adicionais para compreender totalmente os mecanismos subjacentes e otimizar o uso de bioestimulantes em condições de estresse hídrico. Essas descobertas têm implicações importantes para a agricultura, especialmente em regiões suscetíveis à escassez de água.

2.4.. O uso de bioestimulante auxilia no incremento do peso de 10 sementes e NSV em plantas de feijão-caupi sob condição de veranico

O déficit hídrico afetou negativamente os componentes produtivos. Para o CVA (Figura 11A), as médias obtidas foram inferiores nas plantas submetidas à restrição hídrica em comparação com as plantas controle, conforme era esperado. No entanto, a aplicação do bioestimulante proporcionou incremento de 10,0% no comprimento das vagens. Isso pode estar relacionado com o papel dos bioestimulantes em facilitar a absorção e a mobilização de nutrientes do solo, tornando-os mais facilmente disponíveis para as plantas (BERTOLIN *et al.*, 2010), fornecendo os nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento das vagens. Outros trabalhos destacam a importância da aplicação de bioestimulantes a base de algas marinhas como ferramenta ecologicamente correta e sustentável para aumentar a produtividade e a qualidade de vagens e sementes de feijão sob condições normais de irrigação e/ou estresse hídrico (PETROPOULOS *et al.*, 2020).

Para o NVP (Figura 11B), o efeito significativo foi observado apenas para o fator de condição hídrica, em que plantas irrigadas apresentaram uma superioridade de 14,38% no número de vagens em relação às plantas sob déficit hídrico. Embora o manejo do bioestimulante não tenha tido um efeito significativo, é importante observar que, em termos absolutos, as plantas que receberam o bioestimulante tiveram uma média superior. Neste caso, é importante ressaltar que um investimento em qualidade de grãos pode ter ocorrido em detrimento de um maior número de vagens, como observado em nossos resultados. Os Extratos de algas, ácidos fúlvicos e aminoácidos são conhecidos por conter compostos bioativos que podem estimular o crescimento e o desenvolvimento das plantas (BAYAT *et al.*, 2021). Isso pode resultar em uma maior formação de estruturas reprodutivas, como vagens, no entanto, mais estudos que envolva números de aplicações em fases diferentes são necessários para incrementar os ganhos nesta variável.

Para o NSV (Figura 11C) as plantas tratadas com o bioestimulante (T3) apresentaram médias inferiores em comparação com as não tratadas (T4), sugerindo que o bioestimulante não foi suficiente para aumentar o número de sementes por vagem. Esses resultados estão alinhados com estudos anteriores que relataram variações no número de sementes por vagem em feijão comum em resposta ao estresse hídrico e à aplicação de bioestimulantes (PETROPOULOS *et al.*, 2020). No entanto, para o P10s (Figura 11D) a aplicação do bioestimulante teve um impacto positivo. Comparando os tratamentos T3 e T4, observa-se que as sementes tratadas tiveram uma maior massa, com um aumento de 42,0%. Além disso, não houve diferença significativa entre os tratamentos T1 e T3, ou seja, entre condições irrigadas e secas. Essa aparente contradição nos resultados pode ser atribuída a múltiplos mecanismos de ação dos bioestimulantes, que influenciam de maneira complexa o desenvolvimento das sementes. Além disso, as substâncias presentes no bioestimulantes, como *Ascophyllum nodosum* (L.), ácidos fulvicos e aminoácidos, estimulam processos naturais para aumentar/beneficiar a absorção de nutrientes e a eficiência nutricional, o que pode refletir em uma maior qualidade de grãos produzidos (KOLEŠKA *et al.*, 2017). É importante destacar que o número de sementes por vagem reflete a taxa de formação de sementes, enquanto o peso dos grãos está relacionado à qualidade e ao tamanho das sementes individuais.

Em resumo, os resultados do estudo indicam que a aplicação de bioestimulantes pode melhorar significativamente o rendimento das plantas de feijão-caupi sob estresse hídrico, principalmente no ganho em peso por sementes. No entanto, os efeitos variam dependendo das variáveis de rendimento consideradas. Os achados deste estudo são consistentes com pesquisas anteriores (KOLEŠKA *et al.*, 2017; PETROPOULOS *et al.*, 2020), que demonstraram a capacidade dos bioestimulantes de otimizar o desenvolvimento das plantas e a qualidade das sementes em condições desafiadoras. No cenário do aumento populacional e necessidade de se aumentar a produtividade, essas descobertas têm implicações importantes, destacando o potencial dos bioestimulantes em auxiliar no incremento da produção de feijão-caupi, mesmo em regiões propensas à escassez de água, e fazer parte de uma agricultura sustentável.

2.5. Conclusão

O bioestimulante utilizado no estudo demonstrou ser eficiente em aliviar os efeitos danosos do déficit hídrico. Ele aprimorou a taxa de transporte de elétrons, eficiência

do fotossistema II (PSII) e a eficiência instantânea de carboxilação, fortalecendo o aparato fotossintético e protegendo-o contra os efeitos adversos do déficit hídrico, notadamente observados após 5 e 7 dias de estresse. Além disso, a aplicação do bioestimulante resultou em um aumento significativo no comprimento das vagens e na qualidade dos grãos de feijão-caupi, sinalizando seu potencial para ampliar a produção agrícola

3 CAPÍTULO 2 - BIOESTIMULANTE À BASE DE *ASCOPHYLLUM NODOSUM* E ÁCIDOS FÚLVICOS MITIGA OS DANOS CAUSADOS PELO DÉFICIT HÍDRICO EM FEIJÃO-CAUPI

(Artigo a ser submetido)

3.1 Introdução

A escassez hídrica decorrente das mudanças climáticas é um desafio que além de diminuir a disponibilidade de água para o consumo humano, também causa impactos negativos na fisiologia das plantas, sendo o principal limitante da produtividade agrícola (KHODADADI; FOTOKIAN; KAREEM, 2021). As perspectivas para o futuro são preocupantes, pois as projeções apontam para a intensificação das mudanças climáticas, aumentando a frequência e a gravidade de eventos climáticos extremos. Diante dessa situação, é essencial buscar estratégias eficazes para mitigar os impactos negativos da seca na produção agrícola e garantir a segurança alimentar.

No Brasil, o déficit hídrico é uma importante restrição ambiental que afeta o crescimento e o desenvolvimento das plantas, levando à redução do rendimento e da qualidade das culturas. Foi estimado que o aquecimento global é responsável pela perda de produtividade das lavouras de até 50% (MA; FREITAS; DIAS, 2022). Esse cenário se torna ainda mais preocupante em regiões como o Semiárido brasileiro, que já enfrenta desafios relacionados à escassez hídrica, altas temperaturas e à vulnerabilidade socioeconômica, resultando em danos sérios à agricultura, ao meio ambiente e à qualidade de vida da população (SANTOS; DE OLIVEIRA; FILHO, 2022; RATTIS et al., 2021).

Esses desafios têm impactos direto nas plantas. Por exemplo, as trocas gasosas sofrem forte influência sob condições de estresse. Logo, a funcionalidade da maquinaria fotossintética fica comprometida, principalmente pela restrição da abertura estomática, regulada pela escassa disponibilidade de água no solo (SILVA *et al.*, 2021). Essa resposta aclimatativas, visa reduzir a perda de água pelos estômatos, limita a fixação de dióxido de carbono (CO₂) e, conseqüentemente, a produção fotossintética, resultando na inibição do crescimento e desenvolvimento das plantas (LUO *et al.*, 2016).

Além dos efeitos na fotossíntese, o déficit hídrico tem impactos na expansão celular, no metabolismo de carboidratos e na síntese de compostos osmorreguladores (ZHANG; YANG; DU, 2022). Outro fator importante, é o desbalanço do metabolismo celular devido o estresse oxidativo, que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies

reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade das células de neutralizá-las por meio dos sistemas antioxidantes (VISHNUPRADEEP *et al.*, 2022).

As EROs são moléculas altamente reativas contendo oxigênio, como o radical livre superóxido ($\cdot\text{O}^{2-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$). No entanto, o sistema de defesa antioxidante das plantas pode desempenhar um papel fundamental na neutralização das EROs (LIMA *et al.*, 2018). Esse sistema inclui enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), bem como moléculas antioxidantes não enzimáticas, como glutathiona e carotenoides (MANSOOR *et al.*, 2022), que atuam em conjunto para converter as EROs em moléculas inofensivas, como água e oxigênio (YANG *et al.*, 2022).

Quando as plantas estão expostas ao déficit hídrico, ocorrem diversas modulações nas vias metabólicas e na atividade celular. A metabolômica, entra então como uma ferramenta analítica poderosa, com papel fundamental na compreensão abrangente das respostas das plantas (WANG *et al.*, 2019). Portanto, através da abordagem metabolômica, é possível explorar alterações nos perfis metabólicos, identificando compostos-chave que podem ser induzidos pela aplicação de bioestimulantes em resposta à seca (LLANES *et al.*, 2018). Outro fator importante se refere a quantificação e análise comparativa de metabólitos específicos, como açúcares, aminoácidos, lipídios e outros intermediários metabólicos, que não seriam detectáveis apenas pela observação isolada de alterações fisiológicas ou bioquímicas (TOUNTA *et al.*, 2021). Essa técnica pode então auxiliar no entendimento das respostas das plantas à aplicação de bioinsumos, como por exemplo os bioestimulantes, podendo fornecer informações sobre como eles afetam a composição metabólica das plantas, influenciando potencialmente as principais vias metabólicas relacionadas com a resposta ao estresse hídrico (NEPHALI *et al.*, 2020).

Os bioestimulantes à base de algas marinhas e ácidos fúlvicos, têm se destacado como uma possível solução para atenuar o estresse causado pela seca nas plantas. Os bioestimulantes podem ativar os mecanismos de defesa das plantas e aumentar a tolerância delas ao estresse abiótico (DEOLU-AJAYI *et al.*, 2022). Além disso, podem melhorar a absorção de nutrientes e água pelas plantas, aumentando assim a sua resistência aos efeitos da seca (JACOMASSI *et al.*, 2022). Portanto, podem modular as respostas fisiológicas, bioquímicas e metabólicas das plantas, tornando-as mais resilientes às condições ambientais adversas, pois ao estimular o crescimento das raízes, a absorção de nutrientes e a atividade enzimática, eles desempenham um papel crucial na atenuação dos efeitos nocivos do estresse hídrico nas plantas.

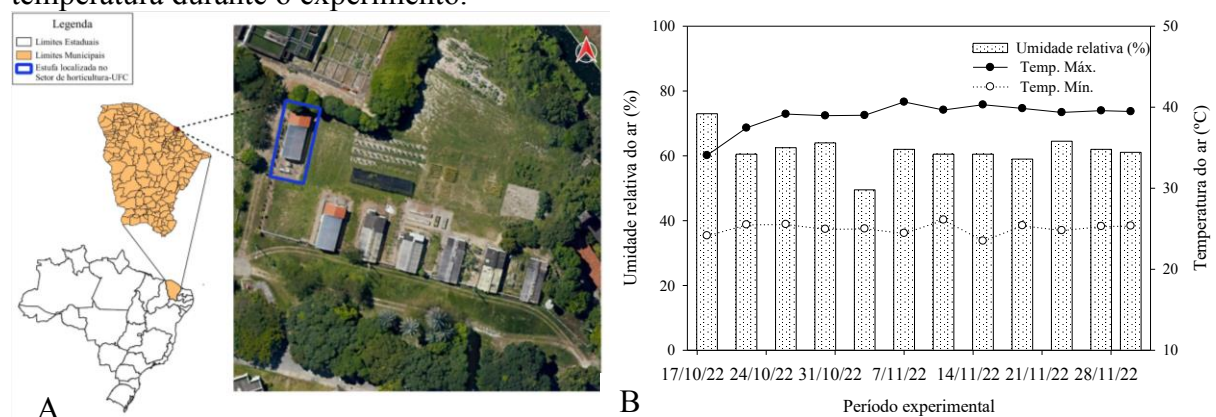
O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) é uma cultura de grande importância para as regiões de clima árido e semiárido, como o Nordeste Brasileiro, tornando-se então essencial entender suas respostas ao déficit hídrico e a influência potencial do uso de bioestimulantes para melhor convivência com a seca e segurança alimentar nessas regiões. Neste estudo, adotou-se uma abordagem fisiológica e metabólica, através da análise metabolômica, para investigar as alterações causadas nas plantas submetidas a diferentes condições hídricas. Além disso, será investigado como a aplicação de bioestimulantes pode modular essas respostas, identificando possíveis metabólitos-chave envolvidos na atenuação do estresse hídrico. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar os impactos da aplicação de bioestimulantes no aprimoramento da resposta metabólica e fisiológica de plantas de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Localização do experimento, material vegetal e condições experimentais

O experimento foi conduzido em casa de vegetação (Figura 1A) do Departamento de Fitotecnia, Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Brasil (3° 44' 25" S e 38° 34' 34" W, com altitude de 14 m). A região é classificada como tropical semiúmido (tipo As segundo a classificação climática de Köppen-Geiger). A temperatura média e umidade média estão representadas na Figura 1B.

Figura 1 – Localização do experimento e dados meteorológicos de umidade relativa e temperatura durante o experimento.



Fonte: Mapa elaborado por Antônio Erivando Bezerra (1A). Figura laborada pelo autor (1B).

Dois genótipos de feijão-caupi, uma variedade crioula, Sempre Verde (SV) e um genótipo padrão para tolerância à seca (Pingo de ouro 1,2; PO) (RIVAS et al., 2016) foram

utilizados. Cinco sementes foram semeadas em vasos plásticos com capacidade para 13 kg preenchidos com solo coletado da Fazenda Experimental Vale do Curu, pertencente à UFC, localizada no município de Pentecostes-CE mais areia lavada e adubado de acordo com a recomendação nutricional da espécie, baseado na análise química do solo (Tabela 1). O desbaste foi realizado sete dias após a semeadura (DAS), permanecendo uma planta por vaso.

Tabela 1 – Características físicas e químicas da mistura (solo + areia lavada).

pH	ds	CE	MO	Ca	Mg	Na	K	H+Al	S	T	V	P	Cu	Fe	Mn	Zn
H ₂ O	g cm ³	dS m ⁻¹	g kg ⁻¹cmol _c kg ⁻¹						%mg kg ⁻¹					
7,0	1,46	0,26	5,65	2,70	1,20	0,18	0,20	0,66	4,3	4,9	87	57	0,61	57,10	33,15	1,76

Fonte: Laboratório de solos/água SRH- Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos – FUNCEME

A capacidade de campo (CC) foi determinada conforme descrito por Souza et al. (2000) considerando a diferença entre o peso do solo úmido após a saturação e a drenagem livre, e o peso do solo seco ao ar. Foi realizada manutenção diária da CC em todos os vasos e a perda diária de água por evapotranspiração foi repostada até que o início da imposição do déficit hídrico. Uma balança com capacidade para 20 kg foi usada para medir o peso do solo e o monitoramento da umidade foi feito por gravimetria.

O bioestimulante aplicado foi o FH Attivus®, comercializado pela empresa Fertilizantes Heringer, sendo esse composto por *Ascophyllum nodosum* e ácidos fúlvicos e também por macro e micronutrientes (Tabela 2). O produto, formulação em pó, foi dissolvido em água e aplicado nos tratamentos que receberam bioestimulante, enquanto que para o grupo de plantas controles foi aplicado apenas água destilada. A dose aplicada foi de 0,250 kg ha⁻¹, seguindo a recomendação do fabricante para a cultura da soja/feijão.

Tabela 2 – Características químicas do bioestimulante FH Attivus®.

N	Mg	S	B	Nutrientes (%)					Compostos naturais (%)	
				Cu	Fe	Mn	Mo	Zn	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Ácidos fúlvicos
2	1	3,6	0,1	0,04	0,05	0,1	0,1	0,2	64	6,5

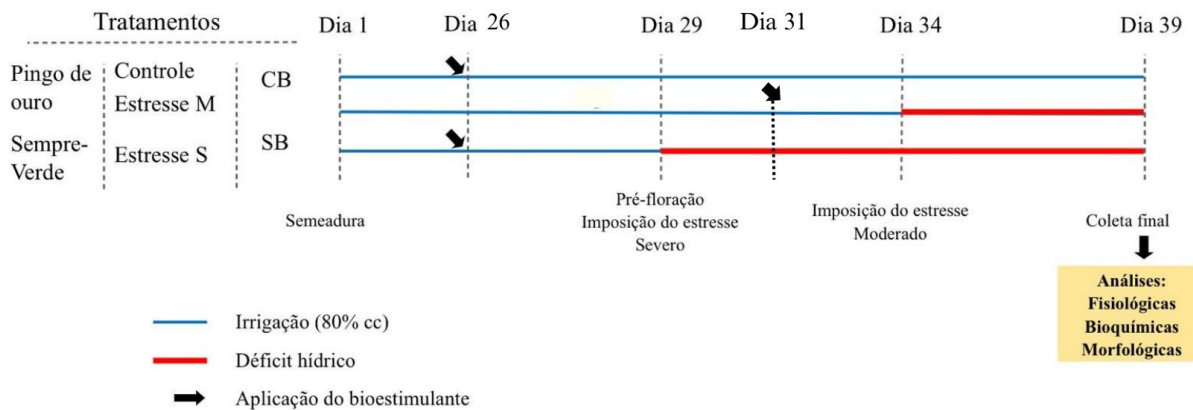
Fonte: Fertilizantes Heringer

A aplicação do bioestimulante foi realizado três dias antes da imposição do déficit hídrico, de modo que toda a área foliar do feijão-caupi fosse coberta com o produto. Para isso, utilizou-se um pulverizador manual de compressão com capacidade para 1,5 L.

3.2.2. Tratamentos e Delineamento experimental

Os tratamentos com déficit hídrico foram impostos aos 29 dias após a semeadura (DAS), período de pre-floração e fase de maior demanda hídrica, sendo essa imposição realizada através da suspensão da irrigação. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x2x2 (3 condições hídricas do solo, 2 genótipos (Pingo de Ouro – PO e Sempre-verde – SV) e 2 manejos do bioestimulante (com bioestimulante – CB e sem bioestimulante – SB) com cinco repetições para cada tratamento, totalizando 60 unidades experimentais (figura 12).

Figura 12 – Detalhamento das condições de cultivo e tratamentos aplicados no experimento II.



Onde: CB – Com bioestimulante, SB – Sem bioestimulante, Estresse Moderado e Estresse Severo.

O fator irrigação foi composto de: controle irrigado (mantidos a 80% da CC durante todo o ciclo), déficit moderado (até alcançar Ψ_w de -0,8 MPa, aproximadamente 5 dias de déficit) e déficit severo (até alcançar Ψ_w de -1,5 MPa, aproximadamente 10 dias de déficit). Os valores de potenciais hídricos foram determinados em estudos anteriores (SILVA et. al., 2021).

3.2.4. Coleta das plantas e medidas biométricas

A coleta e as avaliações destrutivas foram realizadas aos 39 DAS. A altura da parte aérea (ALT), número de folhas (NF) e diâmetro do caule (DC) foram avaliados manualmente, e com o auxílio de um integrador de área (LI-3100, Li-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) foi mensurada a área foliar total (AF). Foram avaliados ainda o comprimento das raízes

(CR) e volume radicular (VR). A massa seca total (MST), massa seca das folhas (MSF), caule (MSC) e raiz (MSR), foram obtidos após secagem do material vegetal em estufa de circulação forçada a 65 °C, até atingir peso constante, e pesagem em balança de precisão.

As duas folhas mais jovens completamente expandidas, a partir do ápice foram coletados aos 39 DAS de cada repetição, congelados imediatamente em N₂ líquido e armazenados em ultrafreezer a -80 ° C para posterior utilização nas análises enzimáticas, solutos orgânicos, perfil metabólico e demais análises bioquímicas.

3.2.5. Caracterização fisiológica

3.2.5.1. Status hídrico da planta e teor relativo de água (TRA)

O potencial hídrico (Ψ_w) da folha foi medido no pré-amanhecer (05:00 h às 06:00 h), momento em que a planta se encontra em equilíbrio com o solo, usando uma bomba de pressão do tipo Scholander (SCHOLANDER et al., 1964). Em folha distinta foi avaliado o teor relativo de água (TRA) foi determinado como descrito por Alti (1960) utilizando discos foliares. Das primeiras folhas completamente expandidas, foram retirados 10 discos de 1,0 cm de diâmetro. Após pesagem e obtenção da massa fresca (MF), os discos foliares foram imersos em água destilada por 3 h até atingirem a massa túrgida (MT). Em seguida, os discos foram colocados em estufa a 60 ° C durante 72 h, para obtenção da massa seca (MS). O TRA foi calculado pela equação: $TRA (\%) = [(MF-MS)/(MT-MS)] \times 100$.

3.2.5.2. Caracterização de alterações nas trocas gasosas, fluorescência da clorofila a e índice SPAD

A análise de fotossíntese líquida foi realizada, sob condições normais e sob condições de estresse hídrico, das 08:00 às 11:00 no terceiro trifólio completamente expandido, utilizando um analisador de gás no infravermelho (IRGA, Li-Cor - Li6400 XT) com concentração de CO₂ na câmara a 400 $\mu\text{mol}^{-1} \text{ mol}$ e 1500 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A taxa fotossintética líquida (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração interna de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) e transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram determinadas.

A fluorescência da clorofila *a* foi realizada utilizando o fluorômetro acoplado ao IRGA (6400-40, LI-COR, USA) na mesma folha em que foram avaliadas as trocas gasosas.

As plantas foram aclimatadas ao escuro por 30 minutos, obtendo as variáveis de fluorescência mínima (F_0) e, após um pulso de luz saturante, foi obtida a fluorescência máxima (F_m). Em seguida, foi calculada a eficiência fotoquímica potencial do PSII, expressa pela relação F_v/F_m . Com os parâmetros de fluorescência coletados no claro (no mesmo momento da determinação das trocas gasosas) foram determinados o rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{FSII}), taxa de transporte de elétrons (ETR), quenching fotoquímico (qP), quenching não-fotoquímico (qN) e o coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ). Além disso, avaliou-se o índice de clorofila com um leitor de índice SPAD (Soil Plant Analysis Development).

3.2.6. Caracterização bioquímica

3.2.6.1. Carboidratos solúveis e prolina

Os extratos para determinação dos carboidratos solúveis foram preparados a partir de 30 mg de folhas liofilizadas que foram adicionadas a 5 mL de etanol (80%) e colocados em banho-maria a 75 ° C por 1 hora e, em seguida, centrifugados a 3000 x g, a 4 ° C, sendo o sobrenadante coletado. O processo de extração foi repetido mais duas vezes. Foram quantificados os teores do carboidratos totais, de acordo com os métodos propostos por Dubois et al. (1956).

O teor de prolina livre seguiu a metodologia de Bates; Waldren e Teare, (1973). A fase cromófora foi lida a 520 nm usando tolueno como padrão de referência. A concentração de prolina foi calculada usando uma curva de calibração padrão e os resultados foram expressos em mmol g MS^{-1} .

3.2.6.2. Atividade de enzimas antioxidantes

Os extratos enzimáticos foram preparados a partir de 1 g de folha fresca, macerado em 4 mL do tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7. A partir desse extrato foram mensuradas as atividades enzimáticas da peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e dismutase do superóxido (SOD), de acordo com os métodos de Nakano; Asada, (1981), Kar; Mishra, (1976), e Havir; Mchale, (1987), respectivamente. Os teores de proteína solúveis foram quantificados no mesmo extrato enzimático, a partir do reagente *Coomassie Brilliant Blue*, pelo método proposto por Bradford (1976), sendo as atividades enzimáticas APX e

CAT expressas em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de proteína, enquanto a SOD foi expressa em UA mg^{-1} proteína.

3.2.6.3. Integridade das membranas

O nível de dano provocado pelo déficit hídrico sobre as membranas em folhas foi determinado através do extravasamento de eletrólitos, de acordo com metodologia descrita por Singh et al. (2007), onde foram retirados discos foliares (cerca de 100 mg) e colocados em tubos de ensaio contendo 10 mL de água deionizada e mantidos em repouso em temperatura ambiente por 2 horas. Decorrido esse tempo, foi determinada a condutividade elétrica inicial (CE1), através de um condutivímetro de bancada. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram aquecidos a 95 °C, por 30 minutos em banho maria, para obtenção das medidas da condutividade elétrica final (CE2). O vazamento de eletrólitos (VE) foi estimado através da equação:

$$VE(\%) = \frac{CE1}{CE2} \times 100$$

Já a quantificação dos teores de malondialdeído (MDA), seguiu a metodologia desenvolvida por Buege e Aust, (1978), onde foram feitas leituras de absorbância nos comprimentos de onda de 532 nm (específica) e 600 nm (não-específica). O conteúdo de malondialdeído foi estimado pela subtração das leituras específicas de não-específicas utilizando o coeficiente de extinção molar do MDA ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo os resultados expressos em mmol g^{-1} MF.

3.2.6.4 Perfil metabólico

A extração e derivatização dos metabólitos foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Lisec et al. (2006) para separação e detecção por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry* - GCMS). Os extratos foram preparados a partir de amostras da terceira folha completamente expandida, que foram maceradas em almofariz (previamente congelado em N₂ líquido).

Os extratos foram preparados a partir de 50 mg de amostras pulverizadas, acrescentando 700 μl de metanol P.A. e adição de 20 μl de ribitol a 0,2 mg mL^{-1} como

padrão interno, com posterior incubação por 15 min, a 70 ° C. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 10 min, e o sobrenadante foi transferido individualmente para microtubos, contendo clorofórmio/água ultrapura (1:2 v/v). Após esse processo, foi realizada outra centrifugação a $3000 \times g$ por 10 min, momento em que uma alíquota (150 μ L) da fase superior (polar) foi coletada e seca em um concentrador de vácuo overnight por um período de 12 horas.

Para a derivatização, foi adicionado cloridrato de metoxiamina (20 mg mL⁻¹) dissolvido em piridina, com incubação por 2 h, a 37 ° C. Em seguida, foram adicionados 35 μ L de MSTFA [N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide] e posterior incubação a 37 °C, por 30 min, em termomix. As amostras derivatizadas foram injetadas (1 μ L) no CGMS, no modo split (ratio 1:5). A separação e identificação dos metabólitos foram realizadas de acordo com Roessner et al. (2001).

A faixa de varredura utilizada foi a razão massa-carga de 40-700 (m/z), iniciada após o tempo de corte do solvente de 4 min. Tanto o cromatograma quanto a análise espectral de massa foram analisados utilizando o software Xcalibur® 2.1. A identificação dos compostos foi baseada em seus tempos de retenção, com base na injeção prévia de padrões de metabólitos, e no espectro de massas e fragmentação, tendo como referência a biblioteca NIST, bem como o banco de dados de metaboloma de Golm. O valor relativo de cada metabólito foi determinado pelo padrão interno (ribitol, Sigma-Aldrich), e depois dividido pela massa fresca utilizada.

A análise do perfil metabólico foi realizada no software MetaboAnalyst 5.0 ([//www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca)). Para a análise estatística os dados foram normalizados por transformação de log e escalonamento automático de modo que se ajuste a uma melhor distribuição estatística normal. A Análise de Componentes (PCA) foi realizada para mostrar as diferenças entre tratamentos para cada tecido vegetal, avaliados separadamente. Para avaliar o efeito do tratamento referente ao controle do perfil metabólico, uma Análise Discriminante (PLS-DA) e a importância das variáveis em projeções (VIP score) foram realizadas para folhas e raízes separadamente para cada genótipo, obtendo os principais metabólitos discriminantes. Os mapas de calor hierárquicos foram construídos pela distância euclidiana com base em uma análise de variância unidirecional (ANOVA).

3.3 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do método estatístico multivariado Análise de Componentes Principais (PCA) e análise de agrupamento, com auxílio do software estatístico RStudio (RStudio Team, 2020). A PCA proporciona um melhor entendimento dos processos, especialmente aqueles relacionados à fisiologia das plantas e suas interações. Utilizou-se o pacote "MultivariateAnalysis" para a PCA. A análise de agrupamento foi realizada utilizando a função "Dendrograma" do pacote "MultivariateAnalysis" (R CORE TEAM, 2021). Para facilitar a visualização da importância dos tratamentos sobre as variáveis, um mapa de calor (*Heatmap*) foi construído utilizando a função "heatmap" no software RStudio.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Status hídrico e aspectos fisiológicos, bioquímicos e biométricos

Para as variáveis fisiológicas, bioquímicas e morfológicas, verificou-se que o espaço multidimensional das 27 variáveis originais foram reduzidas a duas dimensões representadas pelos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) com autovalores maiores que $\lambda > 1,0$, conforme Kaiser (1960) (Tabela 4). Com base nesses resultados, os respectivos autovalores e percentuais de variação explicados para cada componente podem ser observados na Tabela 4. Juntos, esses componentes explicaram 77,11% da variação total. O PC 1 explicou 60,86% da variância total, formada pela maioria das variáveis analisadas, enquanto o PC 2 representou 16,25% da variância restante, composta apenas pelas variáveis razão C_i/C_a , EUA, teor de Prolina, atividade enzimática da APX e CAT.

Tabela 4 – Coeficientes peso (autovetores), autovalores e variância explicada por cada componente principal (CP1 e CP2), a partir das variáveis estudadas.

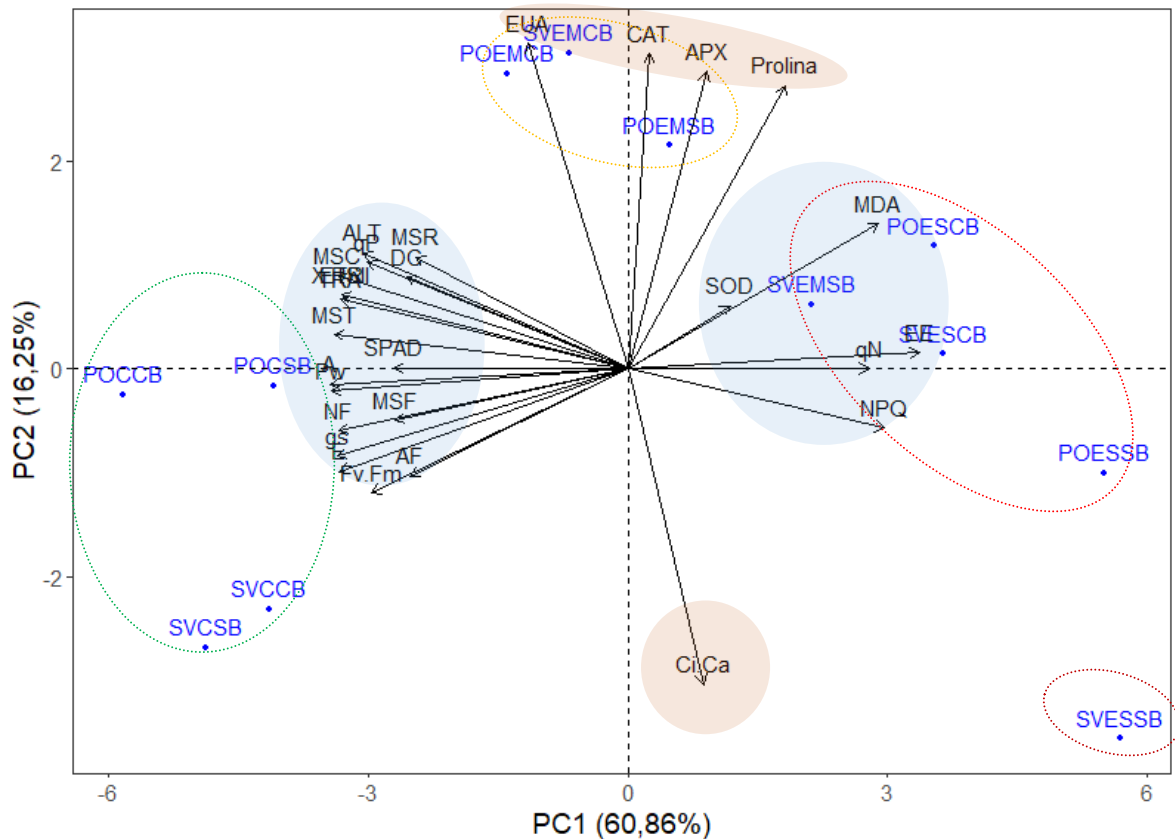
Variáveis	CP1	CP2
Fotossintética líquida (<i>A</i>)	-0,986	-0,008
Condutância estomática (<i>gs</i>)	-0,968	0,181
Transpiração (<i>E</i>)	-0,966	0,221
Eficiência do Uso da Água (EUA)	-0,270	-0,897
Razão C_i/C_a	0,162	0,889
Índice SPAD	-0,949	0,011
F_v/F_m	-0,831	0,303
Φ PSII	-0,936	-0,246
qP	-0,835	0,303
qN	0,815	0,021
NPQ	0,856	0,217
ETR	-0,936	-0,246
Prolina	0,548	-0,750
MDA	0,767	-0,330
Teor Relativo de Água (TRA)	-0,918	-0,256
Potencial Hídrico (Ψ_w)	-0,962	-0,069
Extravasamento de eletrólitos (EE)	0,909	0,071
APX	0,329	-0,780
CAT	0,085	-0,822
SOD	0,425	-0,166
Número de Folhas (NF)	-0,933	0,167
Altura da Planta (ALT)	-0,857	-0,312
Diâmetro do Caule (DC)	-0,717	0,246
Área Foliar (AF)	-0,705	0,289
Massa seca das Folhas (MSF)	-0,753	0,138
Massa seca das Raízes (MSR)	-0,684	-0,301
Massa seca do Caule (MSC)	-0,941	-0,251
Massa seca Total (MST)	-0,950	-0,093
Autovalores	17,04	4,54
Variância explicada (%)	60,86	16,24
Variância explicada acumulada (%)	60,85	77,11

Fonte: elaborado pelo autor.

As projeções bidimensionais dos efeitos do tratamento e das variáveis no primeiro e segundo componente principal (PC1 e PC2) são mostradas na Figura 13. No primeiro componente principal (PC1), foi identificado um processo caracterizado pelo efeito da interação tripla, uma vez que os coeficientes de correlação entre fotossíntese (*A*), condutância estomática (*gs*), transpiração (*E*), índice de clorofila (SPAD), eficiência fotoquímica potencial do PSII (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do PSII (Φ PSII), taxa de transporte de elétrons (ETR), *quenching* fotoquímico (qP), *quenching* não-fotoquímico (qN) e o coeficiente de

extinção não-fotoquímico (NPQ), teores de malondialdeído (MDA), teor relativo de água (TRA), potencial hídrico das folhas (Ψ_w), extravasamento de eletrólitos (EE), número de folhas (NF), altura de plantas (ALT), diâmetro do caule (DC), área foliar (AF), massa seca das folhas (MSF), massa seca (MSC) e massa seca total (MST) foram superiores a 0,70.

Figura 13. Biplot mostrando a relação entre variáveis, genótipos de feijão-caupi e condições hídricas do solo para os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2).



Efeitos do déficit hídrico nas trocas gasosas, morfologia e bioquímica de dois genótipos de feijão-caupi: Pingo-de-Ouro 1,2 e Sempre Verde. Onde: PO e SV referem-se aos genótipos Pingo-de-Ouro e Sempre-verde, C, EM e ES, aos tratamentos controle, estresse moderado e estresse severo, e CB e SB, a aplicação ou não de bioestimulante. Onde temos, Fotossintética líquida (A), Condutância estomática (gs), Transpiração (E), Eficiência do Uso da Água (EUA), Razão Ci/Ca, Índice SPAD, eficiência fotoquímica potencial (Fv/Fm), rendimento quântico efetivo do FSII (Φ PSII), taxa de transporte de elétrons (ETR), quenching fotoquímico (qP), quenching não-fotoquímico (qN) e o coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ), Prolina, MDA, Teor Relativo de Água (TRA), Potencial Hídrico (Ψ_w), Extravasamento de eletrólitos (EE), APX, CAT, SOD, Número de Folhas (NF), Altura da Planta (ALT), Diâmetro do Caule (DC), Área Foliar (AF), Massa seca das Folhas (MSF), Massa seca das Raízes (MSR), Massa seca do Caule (MSC) e Massa seca Total (MST).

O PC1 mostrou 4 grupos bem definidos, onde os tratamentos controles (80% CC) com aplicação ou não do bioestimulante, se caracterizaram por apresentar maiores valores

para as variáveis fisiológicas e biométricas: A , gs , E , SPAD, F_v/F_m , $\Phi PSII$, qP , qN , NPQ, ETR, NF, DC, ALT, AF, MSF, MSC e MSR, enquanto que os tratamentos com estresse severo com e sem aplicação de bioestimulantes para os dois genótipos apresentaram as menores médias. O tratamento SVESSB foi o mais afetado negativamente, indicando maior sensibilidade ao estresse, especialmente quando a variedade SV não recebeu o bioestimulante. Já os tratamentos SVEMCB, POEMSB e POEMCB apresentaram valores intermediários para A , gs , E , SPAD, F_v/F_m , $\Phi PSII$, qP , qN , NPQ, ETR, NF, DC, ALT, AF, MSF, MSC e MSR.

A comparação relativa dos resultados obtidos nas plantas do tratamento POEMCB com POEMSB mostrou incrementos de 34,06% (A), 49,77% (gs), 18,82% (E), 3,88% (F_v/F_m), 3,16% (TRA), 16,6% (NF), 2,78% (DC), 12,29% (ALT), 25,75% (MSF), 15,60% (MSC), 25,70% (MSR), 6,79% (AF), resultantes da aplicação do bioestimulante. Além disso, reduções de 3,14% (MDA), 25,25% (EE) e 20% (Ψ_w) foram observadas. Já comparando os tratamentos SVEMCB com o respectivo tratamento sem bioestimulante, SVEMSB, observamos o efeito positivo da aplicação do produto, com incrementos de 36,41% (A), 19,52% (gs), 15,79% (E), 3,14% (TRA), 15,38% (NF), 21,30% (DC), 15,27% (ALT), 19,76% (MSF), 8,41% (MSC), 33,79% (MSR) e 19,47% (AF) enquanto isso, reduções de 20% (MDA), 13,48% (EE), 10% (Ψ_w) foram observadas.

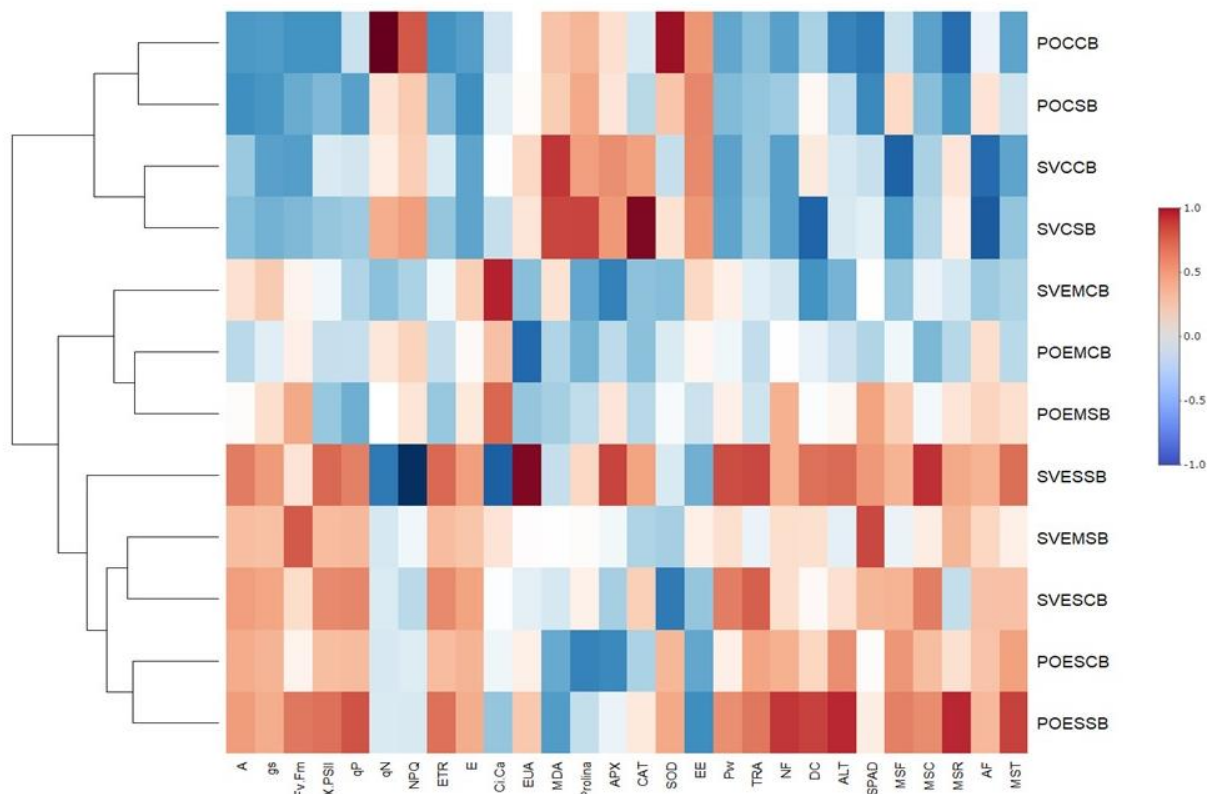
Ainda no componente principal 1, os menores valores de A ($0,69 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), gs ($0,01 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), E ($0,55 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), F_v/F_m (0,816), ETR (53,67), TRA (27,63%), Ψ_w (-1,50 MPa), AF ($1054,75 \text{ cm}^2$) e MST (20,10 g) foram encontrados no tratamento SVESSB, ou seja, em plantas com déficit hídrico severo e ausência de bioestimulante, evidenciando assim os efeitos deletérios causados pela seca em plantas de feijão-caupi.

Para o componente principal 2 (PC2), observa-se que as variáveis com maiores valores de correlação (Tabela 4), estão envolvidas com a defesa antioxidante enzimática (APX e CAT), osmoregulação (prolina), eficiência do uso da água (EUA) e razão C_i/C_a . Para essas variáveis se destacaram os seguintes tratamentos: POEMCB, POEMSB e SVEMCB, assim como havia acontecido para o PC1. Já o tratamento SVESSB, novamente apresentou as menores médias em relação aos demais tratamentos, onde a EUA apresentou média de $1,24 \text{ mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$, e a razão C_i/C_a de 0,74. Para a atividade enzimática CAT e APX, as médias foram de $9,58 \text{ mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de proteína e $68,10 \text{ mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de proteína, respectivamente. Para a prolina, o tratamento SVESSB apresentou médias inferiores aos demais tratamentos com estresse moderado e severo.

A comparação relativa dos resultados obtidos analisando a PC2, entre as plantas POEMCB e POEMSB, mostrou incrementos de 24,53% (APX), 7,43% (CAT), 10,39% (Prolina), 18,77% (EUA), quando aplicado o bioestimulante. Já para o genótipo Sempre verde, a aplicação de bioestimulante quando as plantas estavam sob déficit hídrico moderado, proporcionou incrementos de 30,75% (APX), 5,02% (CAT), 25,29% (prolina) e 24,48% (EUA), em relação ao tratamento que não recebeu bioestimulante.

A variação dos valores normalizados das variáveis em todos os tratamentos dos quatro grupos formados pode ser visualizada na figura 14. É possível observar a análise de agrupamento integrada a um heatmap. O primeiro grupo incluiu os tratamentos irrigados, com e sem aplicação de bioestimulante. Esse grupo está fortemente relacionadas as variações fisiológicas, apresentando as maiores médias de fotossíntese, condutância estomática, transpiração, índice SPAD, potencial hídrico e teor relativo de água, principalmente quando receberam aplicação de bioestimulante. Além disso, apresentaram as menores médias no que diz respeito ao metabolismo enzimático (APX e SOD), MDA, EE e Prolina.

Figura 14 – Heatmap mostrando a relação entre variáveis estudadas e a interação com os tratamentos.



Onde temos, Fotossintética líquida (A), Condutância estomática (gs), Transpiração (E), Eficiência do Uso da Água (EUA), Razão Ci/Ca, Índice SPAD, eficiência fotoquímica potencial (Fv/Fm), rendimento quântico efetivo do FSII (Φ PSII), taxa de transporte de elétrons (ETR), quenching

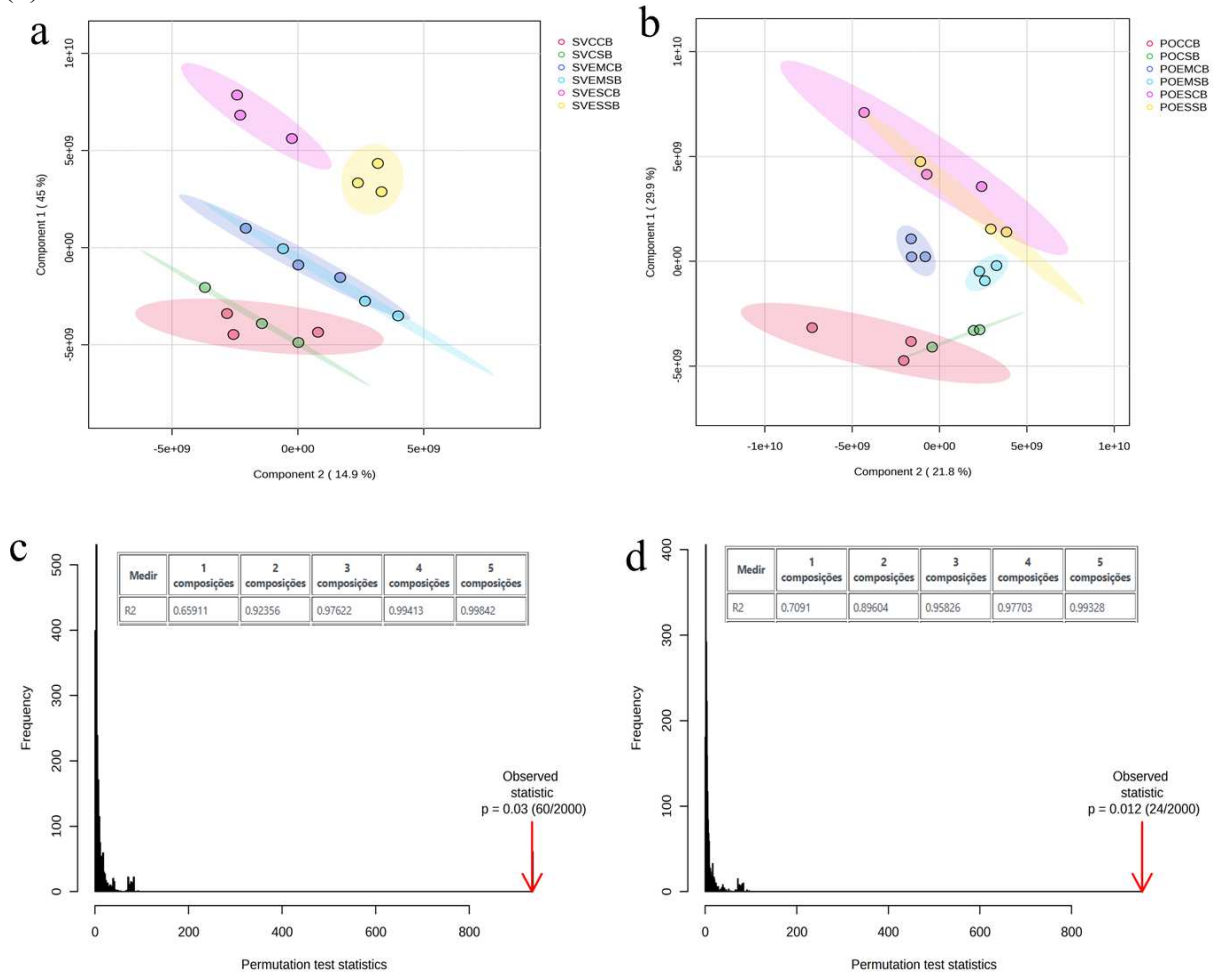
fotoquímico (qP), quenching não-fotoquímico (qN) e o coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ), Prolina, MDA, Teor Relativo de Água (TRA), Potencial Hídrico (Pw), Extravasamento de eletrólitos (EE), APX, CAT, SOD, Número de Folhas (NF), Altura da Planta (ALT), Diâmetro do Caule (DC), Área Foliar (AF), Massa seca das Folhas (MSF), Massa seca das Raízes (MSR), Massa seca do Caule (MSC), Massa seca Total (MST).

O segundo grupo foi composto pelos tratamentos POEMCB, POEMSB e SVEMCB, que apresentaram as maiores médias de eficiência do uso da água e metabolismo enzimático, com destaque para os tratamentos que receberam bioestimulante. Além disso, os danos oxidativos indicado pelo aumento de MDA e EE, foram menores em comparação ao grupo 3 e 4. Esses grupos foram compostos pelos tratamentos sob estresse severo e SVEMSB, onde as menores médias de trocas gasosas e de conteúdo de água foram observados.

Avaliando o perfil metabólico de folhas do genótipo SV por meio da análise de Mínimos Quadrados Parciais - Análise Discriminante (PLS-DA), foi observado que o componente 1 explicou 45% da variação total dos dados nos dois primeiros componentes (59,9%) (Figura 15A). Enquanto os componentes 1 e 2 explicaram, respectivamente, 29,9% e 21,8% da variação observada no genótipo PO (Figura 15B). Em ambas as cultivares, o componente 1 foi capaz de agrupar distintamente plantas de acordo com o seu regime hídrico, ou seja, controle (SVC, POC), estresse moderado (SVEM, POEM) e estresse severo (SVES, POES).

Por outro lado, o componente 2 explicou a diferença entre plantas submetidas, ou não, à aplicação do bioestimulante, especialmente em condições específicas de disponibilidade de água, como nas plantas do genótipo SV sob estresse hídrico severo e nas plantas do genótipo PO sob estresse hídrico moderado. Além disso, com base nos testes de validação cruzada e permutação ($p < 0,05$), ficou evidente que o PLS - DA foi o que melhor discriminou os diferentes grupos formados (Figura 15C, D).

FIGURA 15 - Mínimos quadrados parciais - análise discriminante (PLS-DA) de perfis metabólicos em folhas de feijão-caupi dos genótipos Sempre Verde (SV) e Pingo de Ouro, sob irrigação (C), estresse hídrico moderado (EM) e estresse hídrico severo (ES). Acompanhados da aplicação (CB), ou não (SB), do bioestimulante. Gráficos de pontuação SV(a) e PO (b), e testes de validação cruzada e permutação PLS-DA para SV (c) e para PO (d).

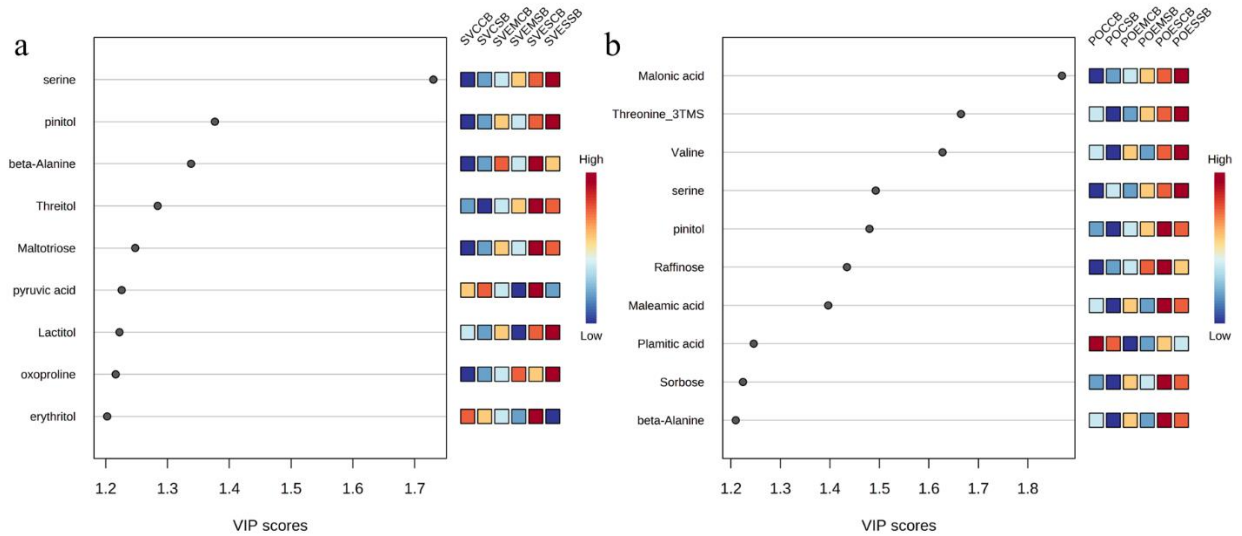


Fonte: elaborado pelo autor.

Ao todo foram identificados 50 metabólitos foliares nos genótipos avaliados SV e PO, incluindo açúcares (11), açúcares álcoois (8), aminoácidos e derivados (11), e ácidos orgânicos (19) (Tabela Suplementar 1). Porém, as respostas modulatórias foram diferentes em razão dos tratamentos avaliados. No genótipo SV, 29 metabólitos foram estatisticamente modificados em suas abundâncias relativas a depender do regime hídrico e da aplicação do bioestimulante. Já no genótipo PO esse número foi reduzido a 15 metabólitos.

No genótipo SV, os metabólitos que melhor explicaram a separação de plantas em diferentes regimes hídricos, nessa ordem, foram serina, beta – alanina, pinitol, theritol, maltotriose, galactinol, alpha – lactose, alanina, glicina, lactinol, threonina, ácido ascórbico, ácido málico, frutose e ácido cítrico (Figura 16a).

Figura 17 – VIP score de metabólitos dos genótipos SV (b) e PO (c) de maior peso ((VIP > 1,2) na explicação da variação observada no componente 2 pela análise de PLS – DA.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.4. Discussão

O presente estudo revela efeitos positivos do uso do bioestimulante para mitigação do déficit hídrico, uma vez que ao ser aplicado de forma exógena, promoveu maior ativação do sistema de defesa antioxidante e melhorou as respostas fisiológicas do feijão-caupi. Em condições de déficit hídrico, as células enfrentam uma disponibilidade limitada de água, em grande parte devido à restrição da condutância hidráulica levando a uma menor regulação do controle estomático (JAYAWARDHANE *et al.*, 2022). Além disso, as respostas iniciais ao déficit hídrico envolvem o ajustamento osmótico, ou seja, o aumento da concentração de solutos orgânicos para ajudar as plantas a reter água e manter a pressão de turgescência celular (ZHANG; YANG; DU, 2022).

Fica claro à mudança significativa dos processos morfológicos, fisiológicos e metabólicos das plantas de feijão-caupi sob deficiência hídrica. O déficit hídrico progressivo contribuiu para uma redução do teor relativo de água e potencial hídrico nas plantas a partir do déficit hídrico moderado. O TRA e Ψ_w são bons indicadores do grau de hidratação das células e dos tecidos, sendo de extrema importância para o bom desempenho dos processos de crescimento e funcionamento fisiológico (SEHAR *et al.*, 2021). Além disso, a diminuição no potencial hídrico das plantas acarreta efeitos na divisão e expansão celular mais severamente do que em outros processos, dessa forma, o crescimento das folhas e caules tende a sofrer os primeiros danos visuais (FALAHY *et al.*, 2018), conforme observados neste trabalho.

A aplicação exógena de bioestimulante sob estresse moderado ajudou a aliviar os efeitos deletérios nos índices TRA e Ψ_w , com incrementos de 3,16% (TRA) e 20% (Ψ_w) para o genótipo PO, e 3,14% (TRA) e 10% (Ψ_w) para o genótipo SV. Outros trabalhos encontraram respostas semelhantes, em que a aplicação de bioestimulante à base de extrato da alga *Ascophyllum nodosum* (L.) e ácidos fúlvicos em plantas de Soja favoreceu o potencial hídrico (ROSA *et al.*, 2021). Essas respostas estão relacionadas aos incrementos de prolina observados, sugerindo ajuste osmótico das plantas sob estresse.

A escassez de água, tem um impacto substancial na taxa de assimilação de CO₂ em plantas de feijão-caupi. A manutenção das trocas gasosas pode determinar o grau de resposta adaptativa das culturas ao balanço hídrico e, subsequentemente, o seu desempenho sob o déficit hídrico (SULEIMAN *et al.*, 2022). Uma das primeiras limitações impostas à fotossíntese é o fechamento parcial da abertura estomática (SILVA *et al.*, 2021). Esse fechamento estomático é uma estratégia aclimatativa que visa conservar a água, mas também impede a entrada adequada de dióxido de carbono (CO₂) que é matéria-prima essencial para a produção de açúcares pela planta nas folhas (HLAVÁČOVÁ *et al.*, 2018).

A limitação na disponibilidade de CO₂, decorrente do fechamento estomático, compromete diretamente a fixação do carbono via ciclo de Calvin-Benson e ocorre uma redução na taxa de assimilação de carbono (SEHAR *et al.*, 2021). Como resultado, a síntese de carboidratos é prejudicada, afetando o crescimento e o desenvolvimento da planta. Além disso, a taxa de transpiração também é reduzida devido ao fechamento estomático, reduzindo a absorção de nutrientes pelas raízes e a eficiência na utilização da água (GUO *et al.*, 2023).

No presente estudo, a aplicação de bioestimulante foi eficaz na atenuação dos efeitos do déficit hídrico moderado em ambos os genótipos avaliados. Essa mitigação dos efeitos adversos do déficit hídrico está diretamente relacionada a uma maior eficiência no uso da água, como evidenciado nos tratamentos Pingo de Ouro – Estresse moderado – Com bioestimulante (POEMCB) e Sempre-Verde – Estresse moderado – Com bioestimulante (SVEMCB) (Figura 13). Nestes tratamentos, observamos níveis significativamente mais elevados de fotossíntese, condutância estomática e transpiração em comparação com os tratamentos que não receberam bioestimulante, resultando assim, em uma maior eficiência no uso da água (EUA) e estabilização dos processos fisiológicos, mesmo sob condições de estresse. Os resultados corroboram com a pesquisa de Dehkordi *et al.* (2021), que destacou o potencial dos bioestimulantes em aprimorar diversos processos fisiológicos nas plantas, com ênfase nas trocas gasosas, por meio da indução de alterações nas vias de sinalização e regulação hormonal.

No presente trabalho também foi possível observar efeitos positivos do uso do bioestimulante em outro indicador-chave do *status* das plantas, que é a fluorescência da clorofila *a*, onde o efeito mais pronunciado foi no tratamento SVEMCB, em comparação com o SVEMSB. O Fotossistema II (PSII) é um componente fotossintético altamente sensível às condições de estresse e uma ferramenta rápida e confiável para avaliar o grau de tolerância (LUO *et al.*, 2016). Logo, o prolongamento do estresse pode provocar um excesso de energia nos fotossistemas e causar danos permanentes ao aparato fotossintético, sendo necessários mecanismos eficientes que dissipem o excesso de energia (HAGHIGHI *et al.*, 2023). Nesse sentido, a aplicação do bioestimulante estimulou a ativação de enzimas fotoprotetoras que refletiu nos resultados da fluorescência da clorofila *a*.

Neste estudo, muitas variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram analisadas para avaliar a resposta das plantas ao bioestimulante e ao estresse hídrico. O valor Fv/Fm é um indicador da eficiência potencial do fotossistema II (PSII) e reflete a integridade do PSII (HAGHIGHI *et al.*, 2023). Já o Φ PSII indica uma maior eficiência efetiva na conversão de luz em energia química, enquanto que NPQ sugere uma melhor capacidade de dissipar o excesso de energia luminosa como calor, protegendo o PSII contra danos por excesso de energia (VISHNUPRADEEP *et al.*, 2022). Além disso, o ETR reflete um transporte de elétrons mais eficiente, contribuindo para uma fotossíntese aprimorada, enquanto o qN indica uma melhor capacidade de dissipação de energia em resposta ao estresse, evitando danos a maquinaria fotossintética (XU *et al.*, 2020). Comparando os tratamentos SVEMCB com SVEMSB, constata-se que a aplicação do bioestimulante resultou em plantas com um PSII mais saudável, maior eficiência fotossintética e capacidade de proteção contra estresse fotossintético.

Diante dos resultados obtidos, é evidente que o uso do bioestimulante pode desempenhar um papel importante para auxiliar as plantas na mitigação dos efeitos adversos do estresse hídrico em plantas de feijão-caupi. No entanto, para uma compreensão abrangente das adaptações fisiológicas das plantas a condição de déficit, é essencial explorar o contexto das enzimas antioxidantes, que desempenham um papel central na resposta ao estresse hídrico. Os resultados apresentados na análise de componente principal 2 (PC2) revelam uma associação significativa entre as variáveis relacionadas ao metabolismo enzimático e na osmoregulação, com a aplicação do bioestimulante em condições de estresse hídrico moderado.

A alteração nas médias dessas variáveis quando comparadas aos tratamentos sob estresse moderado, indica que a aplicação do bioestimulante teve um papel relevante em

ativar o metabolismo enzimático e a resposta fisiológica das plantas de feijão-caupi, evitando assim o acúmulo de excessivos de EROs. Sabe-se que as EROs, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical superóxido (O_2^-), são moléculas altamente reativas que podem causar danos às estruturas celulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA, se não forem adequadamente controlados (ARAÚJO *et al.*, 2021; SEHAR *et al.*, 2021). Estudos anteriores demonstraram que, sob condições de seca, as plantas desenvolvem mecanismos antioxidantes para neutralizar o excesso de EROs e minimizar os danos celulares (LIMA *et al.*, 2018; MITTLER, 2017; SANTOS *et al.*, 2019). Esses mecanismos incluem a ativação de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD), que ajudam a decompor as EROS e prevenir danos oxidativos (LIMA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019).

Portanto, a atividade das enzimas antioxidantes CAT e APX, desempenham um papel fundamental na eliminação de EROs, e foi facilmente perceptível uma maior atividade dessas enzimas nos tratamentos que receberam o bioestimulante. Isso sugere que o bioestimulante pode ter contribuído para a ativação dessas enzimas, melhorando assim a capacidade da planta de mitigar os danos oxidativos causados pelo estresse hídrico (MAZEPA *et al.*, 2021). Além disso, a concentração de prolina, um importante aminoácido envolvido na osmoregulação, também aumentou nos tratamentos com bioestimulante. Sabe-se que a prolina desempenha um papel crucial na regulação do balanço osmótico, ajudando as plantas a manter a turgidez celular e a resistir ao estresse hídrico (NGUYEN *et al.*, 2021), o que corroborou com os resultados de EUA obtidos neste estudo. Portanto, seu aumento pode indicar uma melhor adaptação das plantas à falta de água (SHARMA *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos são importantes para traçar estratégias diante do cenário atual das mudanças climáticas, em que se espera que o aumento da temperatura e condições de secas sejam mais intensos e frequentes, e, com isso, novas tecnologias e técnicas de manejos devem ser desenvolvidas, aprimoradas e disponibilizadas, a fim de mitigar os efeitos dos múltiplos estresses. No presente estudo a comparação entre genótipos e os tratamentos, demonstrou que a aplicação do bioestimulante teve um leve efeito positivo em ambos, resultando em incrementos significativos nas variáveis relacionadas ao metabolismo enzimático e à eficiência do uso da água. Esses resultados corroboram com estudos anteriores que destacaram o potencial dos bioestimulantes em aprimorar diversos processos fisiológicos em plantas de soja sob déficit hídrico, incluindo as trocas gasosas e a resposta ao estresse (ROSA *et al.*, 2021).

Em nossos resultados, reduções nas variáveis de crescimentos foram perceptíveis, no entanto, a comparação entre os tratamentos POEMCB e POEMSB; e SVEMCB e SVEMSB, revelaram leves incrementos significativos nas variáveis de crescimento, como número de folhas (NF), diâmetro do caule (DC), altura (ALT) e massa seca das folhas (MSF), caule (MSC) e raízes (MSR). Isso demonstra que a aplicação do bioestimulante promoveu a manutenção do crescimento e manteve a produção de biomassa nas plantas sob estresse moderado, contrabalançando os efeitos negativos do déficit hídrico, esses resultados podem estar relacionados as melhoras observadas na eficiência do uso da água e acúmulo de prolina, ambos importantes na osmoregulação.

O ganho em número de folhas e área foliar são essenciais para uma maior absorção de luz solar sendo fundamental para aumentar a área de superfície disponível para a fotossíntese e, conseqüentemente, para a captação de CO₂ e a produção de carboidratos (CHOWMASUNDARAM *et al.*, 2023). Enquanto que o DC e ALT estão correlacionados com uma maior capacidade de transporte de água e nutrientes nas plantas, o que pode auxiliar na tolerância. Outros estudos têm destacado o potencial dos bioestimulantes na manutenção dos processos morfológicos (ROSA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2023).

Para a metabolômicas, os resultados corroboram com estudos anteriores, que denotam como o déficit hídrico afeta significativamente o metabolismo vegetal, resultando em alterações no perfil metabólico como meio de aclimação às condições ambientais adversas (GAFFNEY *et al.*, 2021). Outros estudos têm demonstrado que a aplicação de bioestimulantes pode direcionar as respostas fisiológicas das plantas, promovendo alterações específicas e eficazes no metabolismo (KHAN *et al.*, 2009; MOTA *et al.*, 2018; WUN; QUAN; ZHUANG, 2020). Assim, existem evidências de que a aplicação de bioestimulantes desencadeia uma resposta diferenciada no padrão de modulação de metabólitos nas folhas de feijão-caupi, embora a magnitude e os metabólitos afetados modifiquem de acordo com o grau de déficit hídrico e a cultivar.

Todos esses metabólitos, com exceção da maltotriose e do ácido cítrico, foram regulados positivamente em resposta ao déficit hídrico severo. Isso é uma resposta comum a plantas que buscam a homeostase a ambientes de baixo suprimento de água. Pois o acúmulo desses osmorreguladores, de baixo peso molecular, leva ao ajustamento osmótico necessário a manutenção da hidratação celular mesmo em situações de déficit hídrico (CHAVES FILHO; STACCIARINI-SERAPHIN, 2001; GHATAK; CHATURVEDI; WECKWERTH, 2018).

A análise de metabólitos revelou a presença de um número limitado de metabólitos regulados de forma positiva em resposta ao estresse hídrico que pode ser

explicada pelo fato de que as modulações observadas nos perfis metabólicos foliares de feijão-caupi refletem uma estratégia conservadora de adaptação à seca (GOUFO et al., 2017). Portanto, são esperadas alterações mínimas nos perfis metabólicos das folhas sob condições de estresse hídrico.

Embora o número de metabólitos significativos observado seja pequeno, isso não exime os benefícios oriundos da aplicação foliar de bioestimulantes. Pois a utilização dessas novas tecnologias pode atuar na reconfiguração das principais vias metabólicas envolvidas na tolerância à seca, como por exemplo a homeostase redox, fortalecimento da parede celular vegetal, osmorregulação, produção de energia e reestruturação de membranas (NEPHALI et al., 2021).

Agrupando todos os dados, o bioestimulante teve um efeito sutil, porém significativo, no perfil metabólico foliar das plantas de feijão-caupi. Sutil porque observou-se poucas modulações metabólicas. Como por exemplo o aumento considerável de beta-alanina, com importância para adaptação a estresses ambientais (Wang et al., 2021) na cv. SV sob estresse hídrico severo, ou a redução nos conteúdos de threonine, serina e pinitol na cv. PO sob estresse moderado (Tabela suplementar 1). Ainda assim, essas mudanças nos perfis metabólicos podem estar associadas às melhorias observadas nas respostas bioquímicas e fisiológicas das plantas quando aplicado o bioestimulante. Contudo, mais estudos são necessários, uma vez que esses resultados abrem novos *insights* para o entendimento de como esses metabólitos são regulados no metabolismo das plantas, pois a abordagem metabolômica possibilita uma visão holística das respostas dos vegetais aos estresses abióticos (FAHAD et al., 2018; RAZZAQ et al., 2019).

Em resumo, os resultados deste estudo destacam a importância do bioestimulante na melhoria do metabolismo enzimático, nas respostas fisiológicas e metabólicas das plantas de feijão-caupi sob estresse hídrico. A ativação das enzimas antioxidantes, o aumento na concentração de prolina e a melhoria na eficiência do uso da água são indicativos dos mecanismos pelos quais o bioestimulante atua nesse processo, proporcionando um ambiente mais favorável para o crescimento e desenvolvimento das plantas sob seca, além disso a modulação de certos metabólitos auxiliam na osmoproteção e osmorregulação de plantas estressadas. Esses achados fornecem uma base sólida para futuras pesquisas e práticas agrícolas visando aprimorar a resistência das culturas ao estresse hídrico e, conseqüentemente, a produtividade agrícola.

3.5. Conclusão

O uso do bioestimulante a base de *Ascophyllum nodosum* e ácidos fúlvicos (FH Attivus[®]) mostra-se uma estratégia promissora, para auxiliar na tolerância do feijão-caupi às condições desfavoráveis de estresse hídrico. Sua aplicação teve um impacto positivo significativo nas plantas de feijão-caupi submetidas às condições de déficit hídrico moderado, principalmente. Isso é evidenciado pelo incremento na taxa fotossintética, eficiência do uso da água, número de folhas, diâmetro do caule, altura, área foliar e massa seca das folhas, caule e raízes. Além disso, houve associação significativa entre as variáveis enzimáticas (APX e CAT) e a aplicação do bioestimulante, em condições de estresse hídrico moderado. A análise dos perfis metabólicos em folhas das duas cultivares de feijão-caupi, mostrou tolerância diferencial ao estresse hídrico, com alteração significativamente maior no genótipo sempre-verde sob estresse severo. Alguns metabólitos como a Beta-Alanina, Raffinose, Pinitol e Eritritol foram importantes para a tolerância das plantas sob déficit hídrico. Entretanto mais pesquisas ainda se fazem necessárias para compreender as vias de sinalização envolvidas nos processos de aclimação e tolerância em cultivares de feijão-caupi.

REFERÊNCIAS

- ANDROCIOLO, Leonardo Godoy *et al.* Effect of water deficit on morphoagronomic and physiological traits of common bean genotypes with contrasting drought tolerance. **Water (Switzerland)**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–13, 2020.
- ARALDI, R. *et al.* Efeitos na taxa de transporte de elétrons de plantas daninhas após aplicação de amicarbazono. **Planta Daninha**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 647–653, 2011.
- ARAÚJO, Gyedre dos Santos *et al.* H₂O₂ priming promotes salt tolerance in maize by protecting chloroplasts ultrastructure and primary metabolites modulation. **Plant Science**, [s. l.], v. 303, n. October 2020, 2021.
- BASHIR, Sheikh Shanawaz *et al.* Plant drought stress tolerance: understanding its physiological, biochemical and molecular mechanisms. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 1912–1925, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.2020161>.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, [s. l.], v. 207, p. 205–207, 1973.
- BAWA, George *et al.* Surviving the enemies: Regulatory mechanisms of stomatal function in response to drought and salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 209, n. February, p. 105291, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105291>.
- BAYAT, Hassan *et al.* Comparative effects of humic and fulvic acids as biostimulants on growth, antioxidant activity and nutrient content of yarrow (*Achillea millefolium* L.). **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 279, n. December 2020, p. 109912, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109912>.
- BERTOLIN, Danila Comelis *et al.* Increase of the productivity of the soybean crop with the application of biostimulants. **Bragantia**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 339–347, 2010.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 52, p. 302–310, 1978.
- CHOWMASUNDARAM, Yamuna A P *et al.* Recent developments , applications and challenges for carbon quantum dots as a photosynthesis enhancer in agriculture. [s. l.], p. 25093–25117, 2023.
- COWIE, Blair W. *et al.* Parthenium avoids drought: Understanding the morphological and physiological responses of the invasive herb *Parthenium hysterophorus* to progressive water stress. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 171, n. November 2019, p. 103945, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103945>.
- DEHKORDI, Roghayeh Aminian *et al.* Effect of biostimulants on morpho-physiological traits of various ecotypes of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) under water deficit stress. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 283, n. February, p. 110077, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110077>.
- DEL BUONO, Daniele. Can biostimulants be used to mitigate the effect of anthropogenic climate change on agriculture? It is time to respond. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 751, p. 141763, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141763>.

DEOLU-AJAYI, Ayodeji O. *et al.* The power of seaweeds as plant biostimulants to boost crop production under abiotic stress. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 45, n. 9, p. 2537–2553, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pce.14391>.

DIAS, Maria Celeste *et al.* Chlorophyll fluorescence and oxidative stress endpoints to discriminate olive cultivars tolerance to drought and heat episodes. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 231, p. 31–35, 2018.

DIAS, Adaan S *et al.* Gas exchanges and photochemical efficiency of West Indian cherry cultivated with saline water and potassium fertilization TT - Trocas gasosas e eficiência fotoquímica da aceroleira cultivada com águas salinas e adubação potássica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 628–633, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662018000900628&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v22n9/1415-4366-rbeaa-22-09-0628.pdf.

DU JARDIN, Patrick. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 196, p. 3–14, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.

DUBOIS, Michel *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **ANALYTICAL CHEMISTRY**, [s. l.], v. 28, p. 350–356, 1956.

ETESAMI, Hassan; JEONG, Byoung Ryong; GLICK, Bernard R. Potential use of *Bacillus* spp. as an effective biostimulant against abiotic stresses in crops—A review. **Current Research in Biotechnology**, [s. l.], v. 5, n. December 2022, p. 100128, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2023.100128>.

FALAH, Hadi *et al.* Water stress alleviation by polyamines and phenolic compounds in *Scrophularia striata* is mediated by NO and H₂O₂. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 130, n. July, p. 139–147, 2018.

FLEXAS, J. *et al.* Mesophyll conductance to CO₂ and Rubisco as targets for improving intrinsic water use efficiency in C₃ plants. **Plant Cell and Environment**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 965–982, 2016.

GHARAGOZLOO, Patricia E. *et al.* Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. **Agronomy**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1–22, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/9/4/192>.

GOÑI, Oscar; QUILLE, Patrick; O'CONNELL, Shane. Ascophyllum nodosum extract biostimulants and their role in enhancing tolerance to drought stress in tomato plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 126, n. March, p. 63–73, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.024>.

GUO, Zhaolai *et al.* Effects of Heavy Metals on Stomata in Plants : A Review. [s. l.], 2023.

HAGHIGHI, Tahereh Movahhed *et al.* The use of silicon and mycorrhizal fungi to mitigate changes in licorice leaf micromorphology, chlorophyll fluorescence, and rutin content under water-deficit conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 197, n. November 2022, p. 107662, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107662>.

HAVIR, Evelyn A; MCHALE, Neil A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiol**, [s. l.], v. 84, p. 450–455, 1987.

- HAZRATI, Saeid *et al.* Effects of water stress and light intensity on chlorophyll fluorescence parameters and pigments of Aloe vera L. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 106, p. 141–148, 2016.
- HLAVÁČOVÁ, Marcela *et al.* Interactive effects of high temperature and drought stress during stem elongation, anthesis and early grain filling on the yield formation and photosynthesis of winter wheat. **Field Crops Research**, [s. l.], v. 221, n. February, p. 182–195, 2018.
- HORIKE, Hiroki *et al.* Responses of leaf photosynthetic traits, water use efficiency, and water relations in five urban shrub tree species under drought stress and recovery. **Trees - Structure and Function**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 53–67, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02083-1>.
- HUNTER, Mitchell C. *et al.* Agriculture in 2050: Recalibrating targets for sustainable intensification. **BioScience**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 386–391, 2017.
- JACOMASSI, Lucas Moraes *et al.* A Seaweed Extract-Based Biostimulant Mitigates Drought Stress in Sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 13, n. April, 2022.
- JAYAWARDHANE, Jayamini *et al.* The Response of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Plants to Three Abiotic Stresses Applied with Increasing Intensity: Hypoxia, Salinity, and Water Deficit. **Metabolites**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2022.
- KAR, M; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 57, p. 315–319, 1976.
- KHODADADI, Mostafa; FOTOKIAN, Mohammad Hossein; KAREEM, Shadia Hama Salih. Genetics of water deficit stress resistance through phenotypic plasticity in coriander. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 286, n. April, p. 110233, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110233>.
- KOLEŠKA, Ivana *et al.* Biostimulant prevents yield loss and reduces oxidative damage in tomato plants grown on reduced NPK nutrition. **Journal of Plant Interactions**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 209–218, 2017.
- LIMA, Cristina Silva *et al.* Antioxidant protection and PSII regulation mitigate photo-oxidative stress induced by drought followed by high light in cashew plants. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 149, n. February, p. 59–69, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.02.001>.
- LIU, Binghua *et al.* Drought stress affects on growth, water use efficiency, gas exchange and chlorophyll fluorescence of Juglans rootstocks. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 250, n. November 2018, p. 230–235, 2019.
- LLANES, Analía *et al.* Metabolomic Approach to Understand Plant Adaptations to Water and Salt Stress. **Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress**, [s. l.], n. April, p. 133–144, 2018.
- LUO, Hong Hai *et al.* Combining gas exchange and chlorophyll a fluorescence measurements to analyze the photosynthetic activity of drip-irrigated cotton under different soil water deficits. **Journal of Integrative Agriculture**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 1256–1266, 2016. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61270-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61270-9).

- MA, Ying; FREITAS, Helena; DIAS, Maria Celeste. Strategies and prospects for biostimulants to alleviate abiotic stress in plants. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 13, n. December, p. 1–15, 2022.
- MALIK, Anurag *et al.* Biostimulant-treated seedlings under sustainable agriculture: A global perspective facing climate change. **Agronomy**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–24, 2021.
- MANSOOR, Sheikh *et al.* Reactive Oxygen Species in Plants: From Source to Sink. **Antioxidants**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1–14, 2022.
- MAZEPA, Ester *et al.* Plant growth biostimulant activity of the green microalga *Desmodesmus subspicatus*. **Algal Research**, [s. l.], v. 59, n. July, 2021.
- MENG, Zhaojiang *et al.* Suitable indicators using stem diameter variation-derived indices to monitor the water status of greenhouse tomato plants. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1–15, 2017.
- MITTLER, Ron. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 11–19, 2017.
- MUNJONJI, Lawrence *et al.* Stomatal Behavior of Cowpea Genotypes Grown Under Varying Moisture Levels. **Sustainability**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1–16, 2018.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 867–880, 1981.
- NEPHALI, Lerato *et al.* Biostimulants for plant growth and mitigation of abiotic stresses: A metabolomics perspective. **Metabolites**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1–26, 2020.
- NGUYEN, Ha Thi Thuy *et al.* Rapid accumulation of proline enhances salinity tolerance in Australian wild rice *Oryza australiensis* domin. **Plants**, [s. l.], v. 10, n. 10, 2021.
- NIU, Chenxu *et al.* Biostimulants alleviate temperature stress in tomato seedlings. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 293, n. November 2021, p. 110712, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110712>.
- OANCEA, Florin; VELEA, Sanda. Micro-algae based plant biostimulant and its effect on water stressed tomato plants Sequential processes of closing the side streams from bioeconomy and innovative (bio) products resulting from it-SECVENT View project. **Romanian Journal of Plant Protection**, [s. l.], v. 6, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/318489795>.
- OLALEKAN SULEIMAN, Sakariyawo *et al.* Grain yield and leaf gas exchange in upland NERICA rice under repeated cycles of water deficit at reproductive growth stage. **Agricultural Water Management**, [s. l.], v. 264, n. February, p. 107507, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2022.107507>.
- PEREIRA, Jacqueline Wanessa de Lima *et al.* Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico moderado. **Revista Ciencia Agronomica**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 766–773, 2012.
- PETROPOULOS, Spyridon. A. *et al.* Biostimulants Application Alleviates Water Stress Effects on Yield and Chemical Composition of. **Agronomy**, [s. l.], v. 10, p. 181, 2020.

- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, [s. l.], 2021.
- RATTIS, Ludmila *et al.* Climatic limit for agriculture in Brazil. **Nature Climate Change**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 1098–1104, 2021.
- RIVAS, R. *et al.* Drought tolerance in cowpea species is driven by less sensitivity of leaf gas exchange to water deficit and rapid recovery of photosynthesis after rehydration. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 103, p. 101–107, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2015.08.008>.
- ROSA, Vanessa do Rosário *et al.* Increased soybean tolerance to water deficiency through biostimulant based on fulvic acids and *Ascophyllum nodosum* (L.) seaweed extract. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 158, n. November 2020, p. 228–243, 2021.
- SANTANIELLO, Antonietta *et al.* *Ascophyllum nodosum* seaweed extract alleviates drought stress in *Arabidopsis* by affecting photosynthetic performance and related gene expression. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 8, n. August, p. 1–15, 2017.
- SANTOS, Ivanildes Conceição dos *et al.* Physiological, biochemical and molecular responses to drought conditions in field-grown grafted and ungrafted citrus plants. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 162, p. 406–420, 2019.
- SANTOS, Cárilton Vieira dos; DE OLIVEIRA, Aryeverton Fortes; FILHO, Joaquim Bento De Souza Ferreira. Potential Impacts Of Climate Change On Agriculture And The Economy In Different Regions of Brazil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 1–24, 2022.
- SEHAR, Zebus *et al.* Hydrogen peroxide potentiates defense system in presence of sulfur to protect chloroplast damage and photosynthesis of wheat under drought stress. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 172, n. 2, p. 922–934, 2021.
- SELEIMAN, Mahmoud F. *et al.* Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. **Plants**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 1–25, 2021.
- SHARMA, Anket *et al.* Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. **Biomolecules**, [s. l.], v. 9, n. 7, 2019.
- SHUKLA, Pushp Sheel *et al.* *Ascophyllum nodosum*-based biostimulants: Sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 10, n. May, p. 1–22, 2019.
- SILVA, Johny de Souza *et al.* Mechanisms of tolerance to water deficit and physiological responses to rehydration in cowpea. **Revista Ciencia Agronomica**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 1–10, 2021.
- SILVA, Johny de Souza *et al.* The application of a biostimulant based on *Ascophyllum nodosum*, fulvic acid and nutrients mitigates water deficit in soybean. **Australian Journal of Crop Science**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 539–548, 2023.
- SILVA, Bruno do Nascimento *et al.* Traditional Varieties of Caupi Submitted to Water Deficit: Physiological and Biochemical Aspects. **Journal of Agricultural Science**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 424, 2019.

- SINGH, Shardendu K.; RAJA REDDY, K. Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under drought. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 40–50, 2011.
- SONG, Wei *et al.* Research on the characteristics of drought stress state based on plant stem water content. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, [s. l.], v. 56, n. July 2022, p. 103080, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seta.2023.103080>.
- SOUSA, Carmem C.M. *et al.* Growth and enzymatic responses of cowpea under water stress and root-knot nematode. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 113–118, 2015.
- TALBI, Sihem *et al.* Effect of drought on growth, photosynthesis and total antioxidant capacity of the saharan plant *Oudeneya africana*. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 176, n. May, p. 104099, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104099>.
- TATAGIBA, Sandro Dan *et al.* LIMITAÇÕES FOTOSSINTÉTICAS EM FOLHAS DE PLANTAS DE TOMATEIRO SUBMETIDAS A CRESCENTES CONCENTRAÇÕES SALINAS - DOI: 10.13083/1414-3984.v22n02a05. **REVISTA ENGENHARIA NA AGRICULTURA - REVENG**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 138–149, 2014.
- TOUNTA, Vivian *et al.* Metabolomics in infectious diseases and drug discovery. **Molecular Omics**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 376–393, 2021.
- VISHNUPRADEEP, R. *et al.* Plant growth promoting bacteria improve growth and phytostabilization potential of *Zea mays* under chromium and drought stress by altering photosynthetic and antioxidant responses. **Environmental Technology and Innovation**, [s. l.], v. 25, p. 102154, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102154>.
- WANG, Yulin *et al.* Metabolite profiling in two contrasting Tibetan hulless barley cultivars revealed the core salt-responsive metabolome and key salt-tolerance biomarkers. **AoB PLANTS**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1–14, 2019.
- XU, Qiang *et al.* Effects of water stress on fluorescence parameters and photosynthetic characteristics of drip irrigation in rice. **Water (Switzerland)**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2020.
- YANG, Zhen *et al.* Antioxidant Effects and Potential Molecular Mechanism of Action of Limonium aureum Extract Based on Systematic Network Pharmacology. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 8, n. January, p. 1–17, 2022.
- ZHANG, Xianbo; YANG, Hui; DU, Taisheng. Osmotic adjustment of tomato under mild soil salinity can enhance drought resistance. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 202, n. July, p. 105004, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105004>.

APÊNDICE A - VALORES NÃO NORMALIZADOS DE INTENSIDADE RELATIVA DE METABÓLITOS EM FOLHAS DO GENÓTIPO PINGO DE OURO (PO).

Metabólitos	Classe de metabólitos	Intensidade relativa (a,b)																							
		POCB				POCSB				POEMCB				POEMSB				POESCB				POESSB			
Sacarose	Açúcar	4919,76	±	331,14		3239,56	±	196,31		8620,80	±	132,75		3896,38	±	302,88		6701,28	±	1285,22		3328,31	±	0,00	
Frutose	Açúcar	383,22	±	89,71	B	218,08	±	38,30	B	556,65	±	5,92	B	154,83	±	11,78	B	3626,56	±	607,75	A	402,60	±	21,73	B
alpha-Lactose	Açúcar	30,68	±	12,20		22,28	±	5,35		33,06	±	0,90		13,82	±	1,02		35,64	±	8,80		25,52	±	6,04	
Ác. láctico	Ácido orgân.	323,83	±	82,48		146,98	±	21,96		192,72	±	12,31		126,74	±	11,91		269,27	±	71,11		236,32	±	70,60	
Glicerol	Açúcar álcoo	75,80	±	11,16		45,40	±	7,27		61,29	±	3,12		36,51	±	3,19		50,24	±	25,56		85,86	±	31,62	
Sorbose	Açúcar	207,57	±	45,98	B	124,27	±	11,97	B	296,87	±	63,07	B	219,25	±	16,57	B	825,23	±	156,03	A	336,33	±	106,25	B
Mannose	Açúcar	41,66	±	6,63	C	40,11	±	6,92	C	418,95	±	25,70	A	224,74	±	16,38	B	420,63	±	60,72	A	149,54	±	25,96	BC
Maltose	Açúcar	45,08	±	10,74	A	11,35	±	4,52	B	14,25	±	1,59	B	7,88	±	0,73	B	16,51	±	2,88	B	10,58	±	1,07	B
Valina	Aminoácido	42,00	±	13,86	B	18,92	±	1,45	B	122,86	±	3,82	AB	34,22	±	14,30	B	335,46	±	77,22	A	345,81	±	100,27	A
Leucina	Aminoácido	13,81	±	0,53		4,53	±	1,76		30,54	±	5,47		14,33	±	3,26		55,53	±	12,88		42,35	±	15,90	
Ácido benzóico	Ác. orgânico	8,31	±	0,67		5,35	±	0,89		4,96	±	0,25		4,17	±	0,23		4,94	±	0,94		5,86	±	1,49	
Serina	Aminoácido	1,81	±	0,32	B	4,68	±	0,29	AB	2,38	±	1,07	B	11,54	±	2,37	AB	11,57	±	0,90	AB	15,87	±	5,73	A
beta-Alanina	Derivado de aminoácido	9,07	±	3,09		4,43	±	0,26		14,55	±	0,38		7,23	±	1,70		20,39	±	6,14		14,17	±	3,47	
Ácido fumárico	Ácido orgânico	9,30	±	2,04		11,42	±	3,97		3,86	±	1,70		13,84	±	3,27		9,66	±	1,78		10,65	±	4,66	
Threonina_3TMS	Aminoácido	38,24	±	12,16		23,23	±	0,45		35,35	±	4,98		142,25	±	13,93		204,06	±	33,67		231,30	±	56,81	
Threitol	Açúcar álcool	31,32	±	13,64		14,41	±	1,75		40,25	±	3,36		18,81	±	2,00		58,69	±	3,56		56,51	±	16,16	
Glicina	Aminoácido	95,17	±	18,61		75,57	±	7,79		244,62	±	100,00		95,64	±	14,57		157,59	±	16,78		150,09	±	20,55	
Erythritol	Açúcar álcool	278,37	±	9,79		197,75	±	22,68		210,10	±	13,59		214,24	±	38,92		251,63	±	24,82		233,50	±	36,88	
Rafinose	Açúcar	134,68	±	24,35	B	145,68	±	0,79	B	358,35	±	116,98	AB	435,63	±	41,48	AB	621,44	±	101,86	A	331,33	±	2,04	AB
Alanina	Aminoácido	33,05	±	12,18	C	41,82	±	6,91	BC	326,27	±	58,78	A	141,04	±	35,73	ABC	239,99	±	43,79	AB	163,95	±	61,64	ABC
Putrescina	Aminoácido	54,02	±	20,48		27,01	±	10,63		50,27	±	12,93		33,76	±	11,24		43,98	±	6,86		48,11	±	16,45	
Glucose	Açúcar	918,01	±	194,94	BC	218,36	±	34,74	C	1545,91	±	40,81	B	809,47	±	6,94	BC	2611,24	±	374,45	A	1308,36	±	290,38	B
Galactitol	Açúcar álcool	40,22	±	6,12		32,07	±	7,08		63,63	±	6,34		33,56	±	4,18		61,47	±	17,86		51,99	±	8,15	

Prolina	Aminoácido	78,57	±	3,02		14,23	±	1,14		160,98	±	4,25		11,26	±	0,91		2587,94	±	664,67		202,71	±	65,22	
Ácido maleâmico	Ácido orgânico	166,18	±	72,39	B	145,57	±	49,50	B	296,67	±	30,69	AB	187,51	±	21,54	B	965,97	±	230,27	A	785,10	±	277,73	AB
Oxoprolina	Derivado de aminoácido	33,99	±	16,86		21,95	±	16,91		22,28	±	11,03		29,97	±	13,85		37,57	±	13,44		33,49	±	14,27	
Mannitol	Açúcar álcool	302,00	±	99,25		147,59	±	12,70		192,58	±	16,24		92,47	±	6,77		302,66	±	41,45		126,24	±	6,48	
Lactitol	Açúcar álcool	249,76	±	121,45		129,41	±	4,60		256,63	±	43,18		102,82	±	13,42		210,30	±	41,99		159,30	±	17,94	
Ácido glicérico	Ácido orgânico	56,04	±	17,21	B	110,75	±	24,79	AB	215,20	±	12,71	A	148,27	±	35,89	AB	211,91	±	22,23	A	227,98	±	49,50	A
Quinic acid	Ácido orgânico	292,06	±	115,46		199,53	±	45,18		112,62	±	12,46		248,90	±	35,84		126,19	±	34,79		143,21	±	10,95	
Arabitol	Açúcar álcool	273,15	±	11,29	A	138,16	±	8,10	B	166,60	±	27,03	BC	216,50	±	16,22	ABC	256,21	±	23,96	AB	179,01	±	20,10	BC
Ácido ascórbico	Ácido orgânico	7,65	±	1,14		5,10	±	0,96		11,84	±	1,14		4,79	±	0,35		17,56	±	4,82		10,58	±	3,48	
Maltotriose	Açúcar	921,49	±	364,12		470,29	±	81,16		1033,19	±	104,49		402,50	±	40,22		829,20	±	147,97		812,66	±	155,48	
Ácido kojic	Ácido orgânico	12,33	±	1,96		7,99	±	2,20		11,37	±	1,28		11,55	±	2,00		16,84	±	2,59		14,33	±	2,57	
Ácido Málico	Ácido orgânico	228,54	±	59,53		213,72	±	45,11		289,22	±	51,60		227,97	±	25,65		534,10	±	125,66		326,96	±	106,81	
Ácido threonic	Ácido orgânico	254,81	±	4,25		179,46	±	23,51		182,26	±	12,88		208,69	±	34,58		264,91	±	26,82		220,98	±	35,43	
GABA	Derivado de aminoácido	346,48	±	18,03		398,32	±	51,15		857,36	±	72,36		533,20	±	25,61		817,13	±	210,94		675,87	±	255,52	
Pinitol	Açúcar álcool	295,55	±	47,32	B	187,71	±	78,65	B	359,88	±	191,81	B	419,55	±	27,61	AB	915,93	±	142,32	A	642,83	±	49,56	AB
Ácido pirúvico	Ácido orgânico	86,69	±	23,28		30,83	±	8,91		66,30	±	5,21		34,72	±	3,09		80,11	±	31,82		51,73	±	28,49	
Ácido malônico	Ácido orgânico	23,53	±	1,75	A	33,62	±	7,62	A	39,08	±	24,28	A	116,10	±	38,71	A	143,44	±	34,18	A	156,27	±	38,95	A
Ácido shiquímico	Ácido orgânico	1587,61	±	400,85		1682,89	±	377,62		811,48	±	175,14		1255,19	±	101,67		949,94	±	79,11		988,88	±	116,84	
Glycolic acid	Ácido orgânico	76,08	±	11,11		52,15	±	5,71		55,85	±	3,01		49,13	±	3,78		75,05	±	13,84		75,18	±	18,14	
Ribose	Açúcar	29,95	±	3,43	AB	20,90	±	5,68	B	55,51	±	9,85	A	30,29	±	3,01	AB	47,18	±	7,02	AB	21,14	±	0,00	B
Ácido propiônico	Ácido orgânico	9,09	±	0,20		8,46	±	2,00		6,21	±	1,02		7,57	±	1,24		9,50	±	1,03		9,83	±	1,04	
Ácido succínico	Ácido orgânico	364,76	±	67,17		568,82	±	227,49		494,23	±	224,80		420,47	±	89,89		538,53	±	210,05		380,28	±	18,75	

Ácido cítrico	Ácido orgânico	64,20	±	11,99		105,63	±	47,58		45,43	±	6,42		52,57	±	16,69		21,10	±	6,86		22,91	±	7,78
Ácido palmítico	Ácido orgânico	1001,09	±	36,66		768,96	±	169,63		534,60	±	72,14		576,08	±	96,60		636,60	±	69,70		624,27	±	50,10

Plantas cultivadas sob condições: sem estresse hídrico (c), déficit hídrico moderado (em) e déficit hídrico severo (es), com aplicação (cb) e sem aplicação do bioestimulante (cb). Valores representam a média de três repetições ± erro padrão. A- As letras maiúsculas comparam os quatro tratamentos dos grupos, conforme teste de Tukey ($p < 0,05$).

B- Razão entre a área do pico do metabólito e a área do pico do ribito

APÊNDICE B - VALORES NÃO NORMALIZADOS DE INTENSIDADE RELATIVA DE METABÓLITOS EM FOLHAS DO GENÓTIPO SEMPRE VERDE (SV)

Metabólitos	Classe de metabólitos	Intensidade realtiva (a, b)																											
		SVCB					SVCSB					SVEMCB					SVEMSB					SVESCB					SVESSB		
Sacarose	Açúcar	3641,95	±	54,49	CD	3380,71	±	368,68	CD	5646,72	±	620,43	BC	3129,03	±	282,08	D	10004,64	±	975,46	A	6672,75	±	203,46	B				
Frutose	Açúcar	337,46	±	71,78	D	439,05	±	77,63	CD	1329,20	±	249,86	B	356,05	±	20,19	D	2228,13	±	257,30	A	1163,78	±	70,12	BC				
alpha-Lactose	Açúcar	2,48	±	0,44	C	3,07	±	0,54	C	5,46	±	0,75	C	1,48	±	0,56	C	45,91	±	5,25	A	20,16	±	3,99	B				
Ácido láctico	Ácido orgânico	167,36	±	21,11		193,62	±	41,21		161,85	±	16,43		216,97	±	82,34		344,55	±	53,46		218,97	±	7,75					
Glicerol	Açúcar álcool	40,78	±	4,06	B	50,00	±	12,39	AB	40,24	±	2,89	B	49,67	±	17,58	AB	89,71	±	7,16	A	61,96	±	3,63	AB				
Sorbose	Açúcar	217,45	±	55,18	C	429,09	±	146,97	BC	650,81	±	143,05	BC	230,58	±	25,10	C	1398,42	±	135,33	A	844,09	±	0,00	B				
Mannose	Açúcar	457,53	±	102,60	AB	44,15	±	3,05	C	609,72	±	94,92	A	165,15	±	56,48	BC	443,78	±	55,71	AB	243,44	±	16,40	BC				
Maltose	Açúcar	5,96	±	0,71		8,68	±	2,84		8,48	±	1,22		8,04	±	3,27		11,23	±	1,97		7,35	±	0,88					
Valina	Aminoácido	1,49	±	0,32	C	35,45	±	8,69	BC	71,74	±	13,57	B	60,81	±	15,34	BC	210,50	±	22,78	A	58,06	±	1,51	BC				
Leucina	Aminoácido	11,54	±	1,21	C	7,65	±	3,02	C	48,17	±	8,12	AB	21,44	±	0,79	C	59,85	±	6,14	A	24,81	±	7,87	BC				
Ácido benzóico	Ácido orgânico	3,80	±	0,79		6,10	±	1,25		4,34	±	0,65		5,82	±	2,42		8,20	±	0,84		6,46	±	0,21					
Serina	Aminoácido	1,94	±	0,18	C	10,56	±	1,73	C	21,46	±	6,13	BC	35,61	±	16,07	ABC	47,36	±	6,71	AB	65,05	±	2,89	A				
beta-Alanina	Derivado de aminoácido	1,54	±	0,35	D	3,71	±	0,65	CD	20,60	±	4,68	B	15,31	±	2,90	BC	33,56	±	2,25	A	19,70	±	1,63	B				
Ácido fumárico	Ácido orgânico	17,71	±	6,96	B	31,07	±	5,56	B	48,06	±	15,73	AB	28,07	±	12,47	B	122,61	±	33,98	A	43,98	±	7,35	AB				
Threonina 3TMS	Aminoácido	10,54	±	1,39	B	9,57	±	1,95	B	195,76	±	10,92	AB	99,63	±	28,85	B	463,75	±	160,23	A	299,50	±	67,47	AB				
Threitol	Açúcar álcool	21,06	±	3,07	B	11,79	±	1,86	B	27,75	±	3,69	B	31,34	±	3,93	B	168,48	±	10,71	A	128,69	±	28,17	A				
Glicina	Aminoácido	36,69	±	1,26	B	67,57	±	23,93	B	117,16	±	38,83	B	100,22	±	20,94	B	308,25	±	71,31	A	360,38	±	5,38	A				
Erythritol	Açúcar álcool	335,84	±	34,64		322,33	±	90,59		232,67	±	40,17		243,31	±	74,00		446,29	±	40,06		164,89	±	71,06					
Rafinose	Açúcar	84,41	±	11,77	DE	65,30	±	14,52	E	741,59	±	101,47	B	352,94	±	86,83	CD	1073,37	±	39,58	A	552,06	±	33,41	BC				
Alanina	Aminoácido	30,51	±	24,03	B	76,74	±	32,81	B	167,53	±	16,08	AB	183,63	±	80,48	AB	313,80	±	37,57	A	200,95	±	6,96	AB				
Putrescina	Aminoácido	28,13	±	4,91		50,55	±	21,01		69,06	±	4,72		29,34	±	11,62		73,42	±	10,10		92,41	±	42,57					
Glucose	Açúcar	1696,02	±	439,31	AB	257,64	±	16,66	C	1800,96	±	261,58	A	579,38	±	43,72	BC	2057,49	±	254,79	A	1257,03	±	88,82	ABC				
Galactitol	Açúcar	41,74	±	11,16	BC	48,04	±	14,52	BC	49,14	±	9,42	BC	32,61	±	6,07	C	105,13	±	11,44	A	87,58	±	5,48	AB				

	álcool																					
Prolina	Aminoácido	59,56	± 8,10	BC	21,40	± 2,76	C	204,20	± 32,87	B	104,32	± 9,55	BC	433,31	± 85,47	A	170,21	± 10,08	B			
Ácido maleâmico	Ácido orgânico	648,63	± 148,35	B	431,13	± 172,01	B	424,97	± 36,33	B	160,01	± 53,99	B	1222,68	± 141,53	A	1236,86	± 28,17	A			
hexacosane		12,77	± 2,08		10,13	± 1,67		11,00	± 3,41		11,77	± 1,92		12,33	± 0,99		16,86	± 0,50				
Oxoprolina	Derivado de aminoácido	1,03	± 0,09		46,83	± 45,35		50,56	± 20,06		44,57	± 28,10		65,13	± 42,37		102,10	± 46,61				
Mannitol	Açúcar álcool	107,73	± 5,40	B	57,30	± 6,54	B	144,57	± 12,85	B	68,48	± 8,92	B	338,55	± 57,68	A	152,02	± 9,81	B			
Lactitol	Açúcar álcool	97,82	± 7,88	B	43,79	± 10,02	B	64,95	± 6,16	B	43,98	± 9,82	B	373,44	± 64,18	A	450,04	± 85,83	A			
Ácido glicérico	Ácido orgânico	155,72	± 3,96		85,23	± 16,14		165,88	± 51,52		50,35	± 13,87		199,63	± 28,30		158,90	± 10,66				
Quinic acid	Ácido orgânico	78,20	± 21,43		88,46	± 16,68		130,90	± 53,43		48,63	± 8,58		47,01	± 3,57		71,61	± 38,78				
Arabitol	Açúcar álcool	303,01	± 67,89		322,25	± 90,61		201,83	± 48,65		179,74	± 52,89		305,93	± 9,88		213,24	± 20,43				
Ácido ascórbico	Ácido orgânico	2,20	± 0,21	B	3,03	± 1,84	B	5,78	± 0,77	B	2,48	± 0,49	B	12,88	± 1,10	A	7,11	± 2,56	AB			
Maltotriose	Açúcar	367,97	± 36,28	B	459,16	± 184,65	AB	522,87	± 18,71	AB	483,59	± 59,38	AB	1009,61	± 125,56	A	834,58	± 177,58	AB			
Ácido kojic	Ácido orgânico	5,72	± 1,23	B	6,94	± 1,36	B	6,72	± 0,51	B	4,53	± 0,97	B	13,65	± 2,11	A	6,20	± 1,14	B			
Ácido Málico	Ácido orgânico	610,62	± 185,38	B	359,66	± 36,52	B	628,81	± 0,00	B	231,93	± 19,28	B	1311,53	± 170,16	A	1285,29	± 2,53	A			
Ácido threonic	Ácido orgânico	258,32	± 59,17		299,44	± 90,00		201,64	± 46,66		212,49	± 42,93		303,38	± 10,01		222,91	± 9,61				
GABA	Derivado de aminoácido	392,55	± 24,87		502,43	± 28,52		571,55	± 113,01		476,08	± 167,47		907,53	± 245,24		493,14	± 16,49				
Pinitol	Açúcar álcool	120,14	± 36,28	C	269,60	± 41,63	BC	587,49	± 230,97	ABC	390,59	± 124,47	ABC	822,56	± 113,57	AB	958,75	± 195,04	A			
Ácido pirúvico	Ácido orgânico	62,46	± 18,28		81,35	± 7,24		55,57	± 12,85		42,02	± 20,66		83,20	± 10,62		38,72	± 5,16				
Ácido malônico	Ácido orgânico	234,13	± 146,17		211,97	± 52,10		208,65	± 48,63		120,09	± 64,47		367,44	± 156,05		481,10	± 63,20				
Ácido shiquímico	Ácido orgânico	1066,61	± 271,49		1040,15	± 152,88		1017,19	± 405,08		515,91	± 124,82		422,45	± 16,64		299,70	± 16,25				
p-Coummaric acid	Ácido orgânico	59,12	± 15,44		106,45	± 13,63		84,85	± 23,74		66,10	± 23,10		132,93	± 13,29		123,90	± 7,20				
Leucrose	Açúcar	49,08	± 7,86		59,43	± 14,78		48,32	± 8,32		49,33	± 15,23		73,08	± 5,07		70,36	± 2,40				
Glycolic acid	Ácido	67,87	± 4,19		94,47	± 26,87		75,83	± 9,82		82,18	± 30,38		144,50	± 16,80		113,79	± 4,57				

	orgânico																								
Ribose	Açúcar	63,88	±	4,36		40,88	±	6,42		52,17	±	7,34		29,64	±	1,07		68,17	±	8,23		35,05	±	4,41	
Ácido propiônico	Ácido orgânico	9,17	±	2,07		13,97	±	2,35		11,51	±	3,04		10,52	±	4,08		20,36	±	2,07		17,36	±	1,19	
Ácido succínico	Ácido orgânico	698,46	±	168,26	A	3283,90	±	1068,84	B	933,01	±	342,11	B	582,88	±	222,40	B	825,87	±	111,21	B	542,16	±	102,63	B
Ácido cítrico	Ácido orgânico	86,34	±	30,87	B	190,25	±	17,63	A	37,30	±	21,01	B	42,68	±	15,50	BC	23,89	±	6,35	B	9,33	±	1,95	B
Ácido palmítico	Ácido orgânico	808,17	±	176,69		1203,47	±	220,41		918,85	±	237,75		781,85	±	307,16		1371,67	±	82,25		1031,33	±	51,54	

Plantas cultivadas sob condições: sem estresse hídrico (c), déficit hídrico moderado (em) e déficit hídrico severo (es), com aplicação (cb) e sem aplicação do bioestimulante (cb). Valores representam a média de três repetições ± erro padrão. A- As letras maiúsculas comparam os quatro tratamentos dos grupos, conforme teste de Tukey ($p < 0,05$).

B- Razão entre a área do pico do metabólito e a área do pico do ribito