

**ÁCIDO SALICÍLICO E PROLINA COMO INDUTORES DE
TOLERÂNCIA A ESTRESSE HÍDRICO EM FEIJÃO-CAUPI**

RENATO CARDOSO JALES FILHO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CAMPINA GRANDE- PB

MAIO DE 2019

ÁCIDO SALICÍLICO E PROLINA COMO INDUTORES DE TOLERÂNCIA A ESTRESSE HÍDRICO EM FEIJÃO-CAUPI

RENATO CARDOSO JALES FILHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre (M.Sc.) em Ciências Agrárias/Área de concentração: Agricultura Familiar e Sustentabilidade

Orientador: Prof. Dr. Alberto Soares de Melo (UEPB)

Coorientador: D.r. Yuri Lima Melo (UEPB)

CAMPINA GRANDE – PB

MAIO DE 2019

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

J26a Jales Filho, Renato Cardoso.
Ácido salicílico e prolina como indutores de tolerância a estresse hídrico em feijão-caupi [manuscrito] / Renato Cardoso Jales Filho. - 2019.
52 p.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2019.
"Orientação : Prof. Dr. Alberto Soares de Melo , Coordenação de Curso de Biologia - CCBS."
"Coorientação: Prof. Dr. Yuri Lima Melo , Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa"
1. Ácido salicílico. 2. Prolina. 3. Deficiência hídrica. 4. Feijão-caupi. 5. Estresse oxidativo. I. Título
21. ed. CDD 635.652


**ÁCIDO SALICÍLICO E PROLINA COMO INDUTORES DE
TOLERÂNCIA A ESTRESSE HÍDRICO EM FEIJÃO-CAUPI**

RENATO CARDOSO JALES FILHO

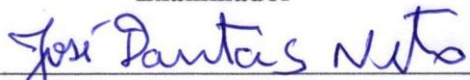
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre (M.Sc.) em Ciências Agrárias/Área de concentração: Agricultura Familiar e Sustentabilidade

Aprovada em 10 de Maio de 2019


Banca Examinadora:



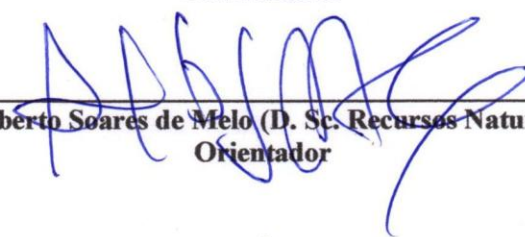
Prof.^a. Dr.^a. Liziane Maria de Lima (D.Sc. Ciências Biológicas)- Embrapa Algodão
Examinador



Prof. Dr. José Dantas Neto (D. Sc. Agronomia)- UFCG
Examinador



Prof. Dr. Yuri Lima Melo (D. Sc. Fitotecnia)- UEPB
Coorientador



Prof. Dr. Alberto Soares de Melo (D. Sc. Recursos Naturais)- UEPB
Orientador

*Dedico a minha família e aos meus amigos
Por todo apoio durante essa árdua jornada*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças para chegar até este momento de minha jornada de vida

A CAPES pela bolsa de estudos durante os dois anos de mestrado.

A UEPB pela disponibilização do espaço físico para a realização das análises, bem como pelo fornecimento do material necessário.

Ao grupo de pesquisa ECOlab pela ajuda durante o período de análises.

A Embrapa pela disponibilização de espaço físico e pessoal capacitado para a realização das análises de Proteínas.

Ao Laboratório de Genética pela disponibilização da centrífuga para extração de enzimas.

Ao meu orientador Prof. D.r. Alberto Soares de Melo, pelas orientações, correções e pela disponibilidade durante a elaboração da pesquisa.

Ao Prof. D.r. Yuri Lima Melo, pela paciência, disponibilidade e por ter conduzido instruído em todos os momento da pesquisa.

A coordenação do mestrado de Ciências agrárias pela facilitação proporcionada na elaboração de documentos e burocracias pertinentes ao curso.

A minha mãe Maria Vilma e a meu Pai Renato, por toda paciência e disposição a lutar comigo durante todo esse tempo para que eu realizasse todos meus objetivos de vida.

A minha irmã Taiza e aos meus sobrinhos Ícaro, Ígor e Yasmin por ter tornado meus momentos de descontração mais felizes.

A minha tia Maria pelo apoio emocional nos dias difíceis.

A minhas estimadas colegas de turma, Cinthya, D'Ávilla, Iara, Larysse e Thauane que me deram total apoio e funcionaram como uma segunda família durante minha graduação.

Aos amigos Lucas Lócio, Lucas Almeida, Leandro e Rogério pela amizade e convivência durante a graduação e minha estadia em Campina Grande.

A Auta e a Venâncio pelo apoio enorme durante o desenvolvimento da pesquisa e pelo incentivo nos dias difíceis.

Aos amigos que adquiri durante a estadia no Ecolab: Rosa, Ígor, Kamila, Anderson, Louise, Wellerson e Durval.

Aos amigos que mesmo distantes se mantiveram presentes por meio de redes sociais ou por ligações, em especial Lucas, Gabbe, Maria Aparecida e Ravena.

Aos meus colegas e amigos de turma Bárbara, Leandro, Kathyane e Josivaldo, pelo incentivo e amizade durante o mestrado

De maneira geral, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta na minha formação acadêmica e pessoal durante os anos do mestrado.

Lupus est homo homini lupus

Plauto (254-184 a.C.)

We're the masters of our own fate
We're the captains of our own souls
(Invictus- William Ernest Henley)

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de abreviaturas/ siglas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1.INTRODUÇÃO.....	11
1.1 OBJETIVO GERAL.....	11
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2.REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 CULTURA DO FEIJÃO-CAUPI	14
2.1.1 Estádio Fenológico V5.....	15
2.2 ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO.....	15
2.3 USO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM PLANTAS	16
2.4 APLICAÇÃO DE PROLINA EXÓGENA EM PLANTAS.....	18
2.5 AJUSTAMENTO OSMÓTICO.....	19
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO E COMPONENTES ANTIOXIDANTES.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO.....	21
3.2 VARIÁVEIS ANALISADAS.....	22
3.2.1 Indicadores de status hídrico.....	23
3.2.2 Variáveis de Crescimento e Ecofisiológicas.....	23
3.2.3 Avaliações Bioquímicas	24
3.2.3.1 <i>Carboidratos Solúveis Totais (AST)</i>	24
3.2.3.2 <i>Aminoácidos Livres Totais (AALT) e Prolina (PRO)</i>	24
3.2.3.3 <i>Extração de Enzimas e Proteínas solúveis Totais (PST)</i>	25
3.2.3.4 <i>Superóxido Dismutase (SOD)</i>	25
3.2.3.5 <i>Catalase (CAT)</i>	26
3.2.3.6 <i>Ascorbato Peroxidase (APX)</i>	26

3.3 Análises Estatísticas	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 CONTEÚDO RELATIVO DE ÁGUA E UMIDADE FOLIAR	28
4.2 AJUSTAMENTO OSMÓTICO.....	30
4.3 VARIÁVEIS DE CRESCIMENTO.....	35
4.4 AÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	40
5 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Variáveis de status hídrico, (A) Conteúdo relativo de água (CRA) (B). Letras minúsculas diferenciam os tratamentos pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Letras maiúsculas diferenciam as lâminas de irrigação dentro de cada tratamento pelo teste t ($P > 0,05$)..... 29
- Figura 2.** Variáveis de ajustamento osmótico do genótipo Paulistão submetido a 100% (W100) e 50% (W50) da reposição hídrica com base na ETo, com aplicações foliares de ácido salicílico (AS) e prolina (PRO) de forma isolada e conjunta: concentrações de açúcares solúveis totais (AST) (A), concentrações de aminoácidos livres totais (AALT) (B), concentrações de prolina (PRO) (C) e (D) concentrações de proteínas (PTS) (D). Letras minúsculas diferenciam os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,01$). Letras maiúsculas diferenciam as lâminas de irrigação dentro de cada tratamento pelo teste t ($P < 0,01$)..... 31
- Figura 3.** Variáveis de crescimento do genótipo Paulistão, (A) Taxa de expansão absoluta (TEA), (B) Taxa de Crescimento Crescimento (TCA), (C) Matéria Fresca Total (MFT), (D) Área foliar total (AFT). Letras minúsculas diferenciam os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,01$). Letras maiúsculas diferenciam as lâminas de irrigação dentro de cada tratamento pelo teste t ($P < 0,01$)..... 37
- Figura 4.** Variáveis de enzimas antioxidantes do genótipo Paulistão, (A) Atividade da SOD mg de proteínas⁻¹ (B) Atividade da CAT em μmol de H_2O_2 por mg de proteínas⁻¹, (C) Atividade da APX em μmol de ASC min^{-1} por mg de proteínas⁻¹. Letras minúsculas diferenciam os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,01$). Letras maiúsculas diferenciam as lâminas de irrigação dentro de cada tratamento pelo teste t ($P < 0,01$)..... 42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Quadrado médio das variáveis: Conteúdo relativo de água (CRA) e umidade foliar (U%) sob duas condições de regime hídrico, diferentes tratamentos com ácido salicílico e prolina, no estágio fenológico V5..... 28
- Tabela 2** Quadrado médio das variáveis: açúcares solúveis totais (AST), aminoácidos livres totais (AALT), prolina (PRO) e proteínas solúveis (PTS) de feijão-caupi submetidos a duas condições de regime hídrico e diferentes tratamentos com ácido salicílico e prolina, no estágio fenológico V5..... 30
- Tabela 3** Quadrado médio das variáveis de crescimento do genótipo Paulistão no estágio V5 submetido a 100% e 50% da reposição hídrica com base na ETo, com aplicações foliares de ácido salicílico (AS) e prolina (PRO) de forma isolada e conjunta: taxa de expansão absoluta (TEA), taxa de crescimento absoluto (TCA), matéria fresca total (MFT) e área foliar total (AFT)..... 35
- Tabela 4** Quadrado médio das variáveis de enzimas antioxidantes do genótipo Paulistão no estágio V5 submetido a 100% e 50% da reposição hídrica com base na ETo, com aplicações foliares de ácido salicílico (AS) e prolina (PRO) de forma isolada e conjunta: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato Peroxidase (APX)..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS

AALT	Aminoácidos Livres Totais
APX	Ascorbato Peroxidase
AFT	Área Foliar Total
AST	Açúcares Solúveis Totais
CRA	Conteúdo Relativo de Água
DAS	Dias após a sementeira
EDTA	ácido etilodiaminotetracético
ERRO	Espécie Reativa de Oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
NBT	NitroblueTetrazolium
MFT	Massa Fresca Total
O ₂ • ⁻	ânion superóxido
¹ O ₂ .	Oxigênio singleto
PST	Proteínas Solúveis Totais
PVP	Polivinilpirrolidona
RPM	Rotação por minuto
SOD	Superóxido Dismutase
TCA	Taxa de Crescimento Absoluta
TEA	Taxa de Expansão Absoluta
U%	Porcentagem de Umidade
W100	Lâmina com reposição de 100% da evapotranspiração
W50	Lâmina com reposição de 50% da evapotranspiração

RESUMO

JALES-FILHO, RENATO CARDOSO. M.Sc., Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, Março de 2019. **Ácido salicílico e prolina como indutores de tolerância a estresse hídrico em feijão-caupi**. Campina Grande, PB, 2019. 58p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Orientador: Prof. Dr. Alberto Soares de Melo; Coorientador: Dr. Yuri Lima Melo.

O uso do ácido salicílico e da prolina pode mitigar os efeitos deletérios da deficiência hídrica em plantas. Portanto, a pesquisa tem como objetivo avaliar em condições de campo o efeito do ácido salicílico e da prolina na atenuação do estresse por deficiência hídrica em feijão-caupi (genótipo Paulistão) no seu período fenológico V5. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado usando o esquema fatorial 2 x 4, em um sistema de cinco repetições. Os fatores foram constituídos por duas lâminas de irrigação: 100% da evapotranspiração (W100) e 50% da evapotranspiração (W50) e quatro tratamentos: Controle, AS (550 mg L⁻¹), Prolina (690 mg L⁻¹) e Prolina+AS (690 mg L⁻¹ de prolina e 550 mg L⁻¹ de AS). Realizaram-se avaliações de status hídrico, crescimento e bioquímicas a fim de elucidar os efeitos do estresse sob estes parâmetros. Sob restrição hídrica durante o período de sete dias o genótipo avaliado não apresentou diferença significativa para as variáveis de *status* hídrico (CRA e U%) esta não diferenciação possivelmente se deu devido ao acentuado aumento nas variáveis prolina (PRO), açúcares solúveis totais (AST) e proteínas hidrossolúveis (PST) que demonstraram-se responsivos ao estresse e as diferentes fontes de atenuação. O crescimento foi afetado pela restrição hídrica contudo o uso de prolina e Prolina+AS contribuíram para um melhor desenvolvimento da planta mesmo sob estas condições. A atividade da enzima CAT foi intensificada deficiência hídrica e pelo uso dos atenuadores Prolina e Prolina+AS. A atividade das enzimas SOD e APX foi reduzida com o uso dos atenuadores, possivelmente pela ação não enzimática de remoção de EROs. Os compostos Prolina e Prolina+AS diminuíram os danos causados pela deficiência hídrica uma vez que as plantas submetidas a eles apresentaram as melhores respostas em relação ao desenvolvimento e acúmulo de osmólitos compatíveis, o AS promoveu incremento no aumento da atividade de enzimas sob deficiência hídrica.

Palavras-chave: Aminoácidos livres totais, metabolismo antioxidativo, deficiência hídrica.

ABSTRACT

JALES-FILHO, RENATO CARDOSO. M.Sc., Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, Março de 2019. **Ácido salicílico e prolina como indutores de tolerância a estresse hídrico em feijão-caupi**. Campina Grande, PB, 2019. 58p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Orientador: Prof. Dr. Alberto Soares de Melo; Coorientador: Prof. Dr. Yuri Lima Melo.

The use of salicylic acid and proline may mitigate the deleterious effects of water deficiency on plants. Therefore, the research aims to evaluate in field conditions the effect of salicylic acid and proline on stress attenuation due to water deficiency in cowpea (Paulistão genotype) in its phenological period V5. The experimental design was completely randomized using the 2 x 4 factorial scheme in a five replicate system. The factors were constituted by two irrigation slides: 100% of the evapotranspiration (W100) and 50% of the evapotranspiration (W50) and four treatments: Control, AS (550 mg L⁻¹), Proline (690 mg L⁻¹) and Proline + AS (690 mg L⁻¹ proline and 550 mg L⁻¹ AS). Water, growth and biochemical status assessments were performed to elucidate the effects of stress under these parameters. Under water restriction during the seven day period, the genotype did not present a significant difference for the water status variables (CRA and U%). This non-differentiation was possibly due to the marked increase in the variables PRO, total soluble sugars) and water soluble proteins (PST) that have been shown to be responsive to stress and the different sources of attenuation. Growth was affected by water restriction however the use of proline and Proline + AS contributed to a better development of the plant even under these conditions. The activity of the CAT enzyme was enhanced water deficit and by the use of the attenuators Proline and Proline + AS. The activity of the SOD and APX enzymes was reduced with the use of attenuators, possibly by the non-enzymatic action of removing ROS. The compounds Proline and Proline + AS diminished the damages caused by the water deficiency since the plants submitted to them presented the best responses in relation to the development and accumulation of compatible osmolytes, the AS promoted increase in the increase of the activity of enzymes under water deficiency.

Key words: Total free amino acids, antioxidative metabolism, water deficiency.

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) é uma das principais fontes de renda e alimento na região do semiárido brasileiro (SILVA et al., 2018). Apesar do seu amplo cultivo e rusticidade, a produtividade dessa cultura é amplamente afetada pela limitação hídrica, característica dessa região que submete as plantas a um período de estresse por deficit hídrico em, pelo menos, uma fase do seu desenvolvimento (SOUZA et al., 2015; SOUZA et al., 2018).

O deficit hídrico proporciona limitação da produtividade dos vegetais pois com ele há uma série de alterações nas condições fisiológicas das plantas. Tais efeitos repercutem no aumento da temperatura foliar, relação temperatura foliar/ambiente, redução do potencial hídrico foliar, condutância estomática e produtividade de grãos (BASTOS et al., 2012).

Mediante os danos de caráter fisiológico, as plantas exibem resposta morfológica, como a redução da área foliar, do tamanho da planta e do enchimento de grãos (CARVALHO et al., 2017). Neste contexto, sob condições de restrição hídrica o vegetal tem alterações em nível celular, as quais geram menor turgescência das células e, conseqüentemente, menor divisão celular (NASCIMENTO et al., 2011; FREITAS et al., 2017).

Para atenuar o estresse pela deficiência hídrica, os vegetais promovem estratégias como o acúmulo de osmólitos compatíveis em nível de citoplasma celular, visando à redução do potencial hídrico (OLIVEIRA-NETO et al., 2016). Desse modo, compostos como prolina, glicina betaína e carboidratos podem se acumular nos tecidos vegetais e beneficiar a planta no processo de absorção de água do solo (COELHO et al., 2018).

Além do ajustamento osmótico, a ação de enzimas antioxidantes é um importante fator na mitigação dos danos ocasionados pelo deficit hídrico, pois, à medida que o estresse acomete um vegetal ele gera danos a suas estruturas celulares e promove o surgimento de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs interagem com proteínas e membranas da célula ocasionando desestruturação e perda de sua estabilidade, desse modo, essas enzimas intensificam sua atividade para as manterem em níveis adequados e reduzem os efeitos seus danos a estruturas celulares (BARBOSA et al., 2014).

Tendo em vista os danos promovidos pelo deficit hídrico, há uma necessidade de se identificar procedimentos e compostos que atenuem os efeitos deletérios na limitação hídrica sob

o rendimento dos vegetais. Neste sentido, o ácido salicílico tem sido pesquisado como um importante atenuador dos efeitos do estresse por déficit hídrico nas plantas (DURANGO et al., 2013; DUTRA et al., 2017; SILVA et al., 2017).

Seu uso têm demonstrado efeitos positivos na atenuação do estresse por déficit hídrico por meio do incremento da atividade de enzimas antioxidativas (DUTRA et al., 2017), no conteúdo de compostos fenólicos (DURANGO et al., 2013) e na remoção, por ação não enzimática, de radicais livres (LEE et al., 2019).

Assim como o ácido salicílico, a aplicação exógena de prolina promove benefícios consideráveis na tolerância ao estresse, pois, ela reduz os danos a estruturas celulares e promove um melhor crescimento e rendimento às plantas (MERWAD et al., 2018), exerce ação regulatória nas trocas gasosas (YANCEY, 2005; BEKKA et al., 2018), promove aumento no tamanho dos vegetais por participar da composição de proteínas celulares e do ajustamento osmótico com o ambiente (DAWOOD et al., 2014).

Nessa perspectiva, o desenvolvimento de técnicas que promovam melhorias no cultivo das culturas agrícolas em regiões de precipitação irregular é de grande importância pois pode garantir melhor rendimento mesmo em períodos de precipitação desfavoráveis a lavoura, deste modo, elucidar os efeitos da ação conjunta dos compostos ácido salicílico e prolina é fundamental para a compreensão de seus efeitos na indução da tolerância a estresses ambientais.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da aplicação de ácido salicílico e da prolina na mitigação do estresse abiótico no crescimento inicial do feijão-caupi.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o conteúdo relativo de água, umidade foliar e indicadores de crescimento, do feijoeiro em condições de irrigação plena e deficiência hídrica, tratados com ácido salicílico e prolina no seu desenvolvimento inicial.

Quantificar a atividade de enzimas antioxidantes em feijoeiro sob condições de irrigação plena e de deficiência hídrica, tratados com ácido salicílico e prolina no seu desenvolvimento inicial.

Analisar a produção dos osmólitos compatíveis prolina, aminoácidos e carboidratos solúveis em feijoeiro, sob condições de irrigação plena deficiência hídrica, tratados com ácido salicílico e prolina no seu desenvolvimento inicial.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CULTURA DO FEIJÃO-CAUPI

O feijão-caupi é uma dicotiledônea pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) (FREIRE-FILHO, 2011). Dentre as leguminosas, o feijão-caupi destaca-se pela sua rusticidade, sendo cultivado principalmente nos países da África, América Latina e Ásia, exercendo importante papel no suprimento das necessidades nutricionais das camadas mais carentes desses países (FREIRE FILHO et al., 2005).

É uma importante cultura do ponto de vista alimentício pelo seu alto teor de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais. Sua importância para as regiões Norte e Nordeste do Brasil está relacionada a fatores de nível econômico e de nível nutricional, exercendo função social no suprimento das necessidades nutricionais e na geração de renda (PÚBLIO-JÚNIOR et al., 2017).

Embora a cultura adapte-se razoavelmente bem às condições de solo, clima e sistemas de cultivo, em relação a outras leguminosas, nem sempre alcança bons níveis de produtividade (SILVA et al., 2016). Fato este atrelado ao uso de sementes não melhoradas, o cultivo em solos de baixa fertilidade e a ocorrência de precipitações irregulares ao longo do desenvolvimento da cultura nas condições naturais (NASCIMENTO et al., 2011; SABOYA et al., 2013).

Existem fatores de ordem logística que possivelmente influenciam na produção da cultura do feijão-caupi, a falta de assistência técnica e a ausência de um programa de produção de sementes de alta qualidade podem limitar a produtividade do feijoeiro devido a maior parte da produção da cultura ser proveniente da agricultura familiar (80%). E como esses produtores têm recursos limitados, muitas vezes utilizam sementes de baixa qualidade e não desfrutam de assistência técnica, o que pode comprometer a qualidade da produção (SILVA et al., 2018).

O uso de práticas de irrigação e de adubação é necessário durante o desenvolvimento da cultura uma vez que em determinados períodos o vegetal terá uma maior susceptibilidade as condições abióticas. Estas práticas visam uma manutenção das condições ideais de cultivo promovendo um desenvolvimento adequado e um desempenho produtivo ideal. Além das práticas de irrigação e adubação, a seleção de genótipos adequados é um importante fator a ser

avaliado quando nos referimos à cultura do feijão-cupi, uma vez que os diferentes genótipos desta cultura apresentam respostas contrastantes aos níveis de estresse ao qual são submetidas (FREIRE-FILHO, 2011).

2.1.1 Estádio fenológico V5

Considera-se atualmente a existência de dez fases do período fenológico do feijão. Essas são divididas em fases do período vegetativo, representadas pela letra V, e do período reprodutivo, representadas pela letra R (OLIVEIRA et al., 2018). Para o feijão-caupi observa-se a presença de 15 fases sendo 10 do período vegetativo e 5 do período reprodutivo (CAMPOS, 2000)

Durante o desenvolvimento do feijoeiro nas lavouras, o mesmo pode ser acometido por períodos de precipitação irregular em pelo menos um período fenológico acima descrito. Quando o estresse por déficit hídrico ocorre no período vegetativo, pode gerar danos de maneira indireta na produtividade, uma vez que haverá redução de área foliar e consequente diminuição da área de absorção de CO₂ provocando uma menor produção de fotoassimilados (FIGUEIREDO et al., 2008). Quando ocorre no período reprodutivo, o estresse hídrico promove o abortamento de órgãos reprodutivos e um menor enchimento de grãos (DIDONET, 2010).

O período fenológico V5, assim como os períodos de pré-floração e enchimento de grãos, apresentam uma grande susceptibilidade a estresses abióticos no feijoeiro. Tendo em vista que quando o vegetal é acometido pelo estresse nesses estádios, pode apresentar produtividade reduzida, havendo a necessidade de implementação de compostos que sejam capazes de mitigar a ação do estresse nesse período para que se consiga induzir a tolerância nas plantas, auxiliando na mitigação dos efeitos desfavoráveis a sua produção.

2.2 ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO

O déficit hídrico é um dos principais estresses que acomete as diversas culturas produzidas em todo o mundo. A restrição hídrica provoca alterações fisiológicas em nível de área foliar, matéria seca total, fotossíntese, condutância estomática, transpiração, concentração interna de CO₂ e potencial hídrico foliar (FREITAS et al., 2017).

Quando submetida à deficiência hídrica, a planta tende a balancear o conteúdo hídrico interno através do fechamento dos estômatos e da redução da área de suas folhas. Deste modo,

gera uma interação conflitante entre a assimilação de CO₂ e a produção de fotoassimilados (NASCIMENTO et al., 2011; SOARES et al., 2017).

O estresse por déficit hídrico ocasiona nos vegetais respostas bioquímicas, envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio e a produção de solutos compatíveis como a prolina. Mediante a produção de EROs, a planta demonstra uma acentuada elevação da atividade de enzimas como a Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato peroxidase (APX), que visam a degradação dos radicais livres, prejudiciais em altas concentrações nas plantas (DUTRA et al., 2017).

Em condições de restrição hídrica no solo, as plantas apresentam um processo denominado ajustamento osmótico, promovido pelo acúmulo de osmólitos compatíveis em nível de citoplasma (OLIVEIRA NETO et al., 2016). O mecanismo consiste na diminuição do potencial hídrico da planta e, conseqüentemente, a manutenção da turgescência por meio da absorção de água do solo; além de atuarem na proteção de estruturas celulares e estímulo do crescimento radicular (GONZALEZ et al., 2010).

As respostas das plantas acometidas pelo estresse variam de acordo com o estágio fenológico, espécie, cultivar, tempo de exposição e fatores edáficos (CARVALHO et al., 2017). Existem fases nas quais há uma maior susceptibilidade do vegetal a incidência do estresse, estas podem prejudicar o desenvolvimento e a produção das culturas, tanto no período vegetativo quanto no período reprodutivo (FIGUEIREDO et al., 2008; DIDONET, 2010).

Com isso, as plantas desenvolvem estratégias para lidar com a deficiência hídrica, classificadas em três tipos: escape de seca, em que a planta completa seu ciclo durante a estação chuvosa; conservação de água, na qual a planta mantém o estado da água em detrimento da produção fotossintética; e tolerância à seca, que corresponde a mecanismos para tentar manter os estomas abertos o maior tempo possível, mesmo à custa do potencial hídrico reduzido. Estes procedimentos adotados pelo vegetal variam de acordo com a espécie (SALEHI-LISAR et al., 2016).

2.3 USO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM PLANTAS

O ácido salicílico (AS) é um composto de origem fenólica, classificado como um fitormônio por atuar na sinalização de processos fisiológicos, de defesa e em condições adversas no vegetal. Ele é um indutor de resistência que retarda a senescência foliar em um processo antagônico ao fitormônio etileno (BORSATTI, 2014). Devido à sua característica dual de indução de tolerância

a estresses bióticos e abióticos, ele é considerado uma molécula promissora a realização de estudos (KANG et al., 2014).

O efeito do AS nas plantas é inteiramente dependente de fatores como a cultura, a concentração de AS utilizada no tratamento, o estágio fenológico da planta, o método de aplicação e o balanço oxidativo das células (PÁL et al., 2014). Assim como os outros fitormônios vegetais, mesmo em pequenas concentrações, pode promover efeitos consideráveis na planta (TAIZ et al., 2017).

Tendo em vista que na planta acometida pelo estresse hídrico haverá a formação de EROs, o uso do AS é uma alternativa por promover a sinalização e remoção das espécies reativas, propiciando um incremento a atividade enzimática especialmente das enzimas SOD, CAT e APX (DUTRA et al., 2017).

Além disso, o AS é responsável por garantir a aclimação bem como a defesa da planta a agentes externos como patógenos e estresses ambientais que fragilizam o vegetal exercendo uma função crucial na sinalização e indução da tolerância a estresse ambiental (VICENTE; PLASENCIA, 2011).

Sua ação relaciona-se a vias de sinalização importantes do ponto de vista da tolerância a estresse abiótico, dentre estas a via dependente do gene NPR1 e a síntese de prolina que são processos integrativos de controle redox sob a seca, que promove, além da ação de incremento da atividade enzimática, uma alternativa não-enzimática para o controle do acúmulo de EROs nos vegetais condicionados a deficiência hídrica (LEE et al., 2019).

Carvalho et al. (2007) avaliaram o efeito da interação do estresse hídrico com o estresse térmico em sementes de Calêndula (*Calendula officinalis* L.) e observaram uma ação positiva do AS em relação ao processo da velocidade de germinação e taxa de germinação.

Em mudas de eucalipto (híbrido *E. urophylla* x *E. grandis*) submetidas à deficiência hídrica, Mazzuchelliet al. (2014) verificaram que a aplicação de AS reverteu à limitação estomática, permitindo a manutenção do potencial fotossintético. Segundo estes autores o AS pode ser empregado em técnica de manejo auxiliar para processos de rustificação.

Araújo et al. (2018), Dutra et al. (2017), Durango et al. (2013) e Nazar et al. (2011) destacaram a ampla ação do AS na cultura do feijoeiro, desde o estímulo ao desenvolvimento do vegetal até respostas antioxidativas que geraram tolerância a estresses ambientais como déficit hídrico e salinidade.

Apesar da ampla gama de trabalhos publicados que fazem alusão ao efeito atenuador do AS em plantas submetidas ao estresse hídrico, os mecanismos exatos do modo de ação deste composto ainda não são bem elucidados, especialmente pela influência que o ambiente exerce

sobre ele. Deste modo, a elaboração de estudos que visem elucidar a ação deste composto na planta é necessária (PÁL et al., 2014).

2.4 APLICAÇÃO EXÓGENA DE PROLINA EM PLANTAS

A prolina é um aminoácido comumente associado à aclimação ao estresse por déficit hídrico, sendo acumulada principalmente em plantas que se apresentam tolerantes a estresses ambientais (BEKKA et al., 2018; CARVALHO et al., 2019). Além do déficit hídrico, alterações nos níveis de prolina estão associadas a temperaturas elevadas (CHEN et al., 2014), salinidade (SILVA et al., 2016) e estresse oxidativo (LEE et al., 2019). Devido ao seu acúmulo nos tecidos vegetais, ela atua sobre a redução do potencial osmótico de modo a promover o ajustamento da planta com o ambiente, garantindo a absorção de água mesmo em solos secos e/ou salinos (MONTEIRO et al., 2014).

Além de estar associada à melhorias no potencial osmótico, a prolina atua como molécula osmoprotetora, tal característica garante a estabilidade de estruturas celulares que geralmente são expostas a ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, em deficiência hídrica, se acumulam e geram prejuízos no desenvolvimento do vegetal (REJEB et al., 2014; LEE et al., 2019). O papel não enzimático da remoção de radicais livres pela prolina é de fundamental importância na homeostase celular, este aminoácido atua como um “*scavenger*” de EROs nas plantas e promove a remoção de moléculas como o radical hidroxila (OH) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (SIGNORELLI et al., 2014, REJEB et al., 2014, LEE et al., 2019).

A aplicação exógena de prolina, assim como a de silício e metionina, promove benefícios para o desenvolvimento e produção do feijoeiro, uma vez que esses compostos atuam na mitigação dos efeitos danosos do estresse por deficiência hídrica em diferentes níveis, por causar melhorias na estabilidade de membranas, conteúdo relativo de água e atividade de enzimas antioxidantes (MERWAD et al., 2018). Esse tipo de prática tem sido uma alternativa viável para a diminuição dos danos ocasionados pelo déficit hídrico e favorece o crescimento de culturas como o milho (CAMARA et al., 2000) e o tomate (KAHLAOUI et al., 2013) submetidos ao estresse salino.

Em culturas como o pimentão, aplicações exógenas de prolina em concentrações de 12,8 a 16,8 mmol L⁻¹ aumentaram a atividade de trocas gasosas, reduziram o efeito do estresse salino, influenciaram positivamente a variável fluorescência e diminuíram a eficiência quântica do fotossistema II (SÁ et al., 2016).

Para culturas como o tomateiro irrigado com águas salinas, a adição de prolina ou glicinabetaína ao meio de cultura inibiu seriamente o crescimento das plantas. Este efeito deletério pode ser explicado pelo fato de altas concentrações destes aminoácidos apresentarem efeitos tóxicos (HEUER, 2003). Deste modo, é necessária a realização de mais estudos que elucidem a ação do caráter atenuador da prolina na determinação das doses, períodos e maneiras adequados de aplicação.

2.5 AJUSTAMENTO OSMÓTICO

O ajustamento osmótico consiste no acúmulo de solutos orgânicos no citoplasma celular. Através dele, a planta mantém a condição homeostática com o ambiente ao qual ela está acondicionada, garantindo a absorção de água em níveis adequados a sua sobrevivência (OLIVEIRA-NETO et al., 2016).

O potencial osmótico pode ser regulado através de mudanças na concentração de alguns osmorreguladores como prolina, açúcares solúveis e proteínas solúveis que em altas concentrações contribuem na absorção de água em solos que apresentam um baixo potencial hídrico (KHAN et al., 2015; COELHO et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

Através do ajuste osmótico a planta consegue contornar os efeitos causados por estresses que tendem a diminuir a disponibilidade de água, a exemplo do déficit hídrico e da salinidade. A ação dos osmorreguladores cria um gradiente de concentração de solutos compatíveis elevado, regulando o potencial osmótico, atuando na diminuição dos efeitos deletérios destes tipos de estresse e promovendo a proteção de estruturas celulares (KHAN et al., 2015; ZHANG et al., 2018).

Entretanto, deve-se ressaltar que o ajuste osmótico exige um grande gasto energético por parte do vegetal. Deste modo, mesmo ajustando-se osmoticamente com o ambiente, a planta que é acometida por estresse ambiental apresentará redução, seja em seu porte ou em sua produtividade, adquirindo com esse a capacidade de tolerar melhor a condição estressante (RODRÍGUEZ et al., 1997).

2.6 ESTRESSE OXIDATIVO E COMPONENTES ANTIOXIDANTES

Sobre a ação de estresses ambientais, a geração de danos, principalmente relacionados a proteínas do aparato respiratório e/ou fotossintético, desencadeia a liberação de elétrons livres que comumente reagem com a molécula de oxigênio, formando as conhecidas espécies reativas de oxigênio (EROs) (BARBOSA et al., 2014, HOLZEROVÁ e PROKISCH, 2015). Essas moléculas são radicais livres que atuam em uma série de mecanismos de sinalização a respostas bioquímicas na célula. Contudo, seu acúmulo em níveis elevados causa prejuízos para estruturas celulares (TRIPATHY e OELMÜLLER, 2012, REJEB et al., 2014).

Em concentrações elevadas, devido a ação de estresses ambientais, as EROs causam um tipo de estresse adjacente, denominado estresse oxidativo. Esse estresse pode representar uma ameaça às células por causar a peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas, danos aos ácidos nucleicos, inibição enzimática, ativação da morte celular programada e, finalmente, levando à morte das células (SHARMA et al., 2012).

Devido ao caráter prejudicial do acúmulo das EROs, a manutenção dos níveis homeostáticos dessas moléculas nas células é fundamental para os organismos manterem a integridade e estabilidade celular. Tal manutenção envolve uma série de mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos. Pode-se incluir dentro dos mecanismos enzimáticos a ação de enzimas que atuam na eliminação de EROs, tais como: a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidases como ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX), peroxidase (POD) e glutathione reductase (GR) (ZHANG et al., 2018).

Estudos com feijoeiro *Vigna* tem demonstrado que a ação de enzimas como SOD, CAT e APX são de fundamental importância para a manutenção da homeostase celular no que diz respeito à concentração de EROs. Para esse gênero, tais enzimas atuam na eliminação dos radicais livres e tem sua atividade intensificada pela ação de diferentes tipos de compostos ditos como atenuadores de estresse como o AS e o nitrato de potássio (DUTRA et al., 2017; ARAÚJO et al., 2017, ARAÚJO et al., 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Viveiro Florestal, situado a 07° 12' 42,99'' de latitude Sul, 35° 54' 36,27'' longitude Oeste a uma altitude de 521 metros, pertencente à Universidade Estadual da Paraíba, Campus I, Campina Grande – PB durante os meses de novembro e dezembro de 2019.

O clima da região é do tipo BSw'h', segundo classificação de Köppen, caracterizando-se por ser semiárido quente, com duas estações distintas, uma chuvosa com precipitação irregular e outra sem precipitação. A precipitação média anual é de 850 mm, temperatura média de 27°C com período chuvoso concentrando-se entre os meses de fevereiro e abril.

Em campo foram estudados os fatores: déficit hídrico (DH) e aplicação de ácido salicílico (AS) e prolina (PRO). O fator DH foi constituído de duas condições (controle: irrigação com lâmina de 100% da evapotranspiração diária e déficit hídrico moderado (lâmina de 50% da evapotranspiração diária). Para os fatores AS e PRO, os mesmos foram testados de forma isolada e conjunta (0,0 mg L⁻¹ – controle; 550 mg L⁻¹ de AS; 690 mg L⁻¹ de PRO e 550 mg L⁻¹ de AS + 690 mg L⁻¹ de PRO), no genótipo Paulistão de feijão-caupi (UFPB-Pombal) no estádio V5. A combinação dos dois fatores (2 DH x 4 AS+PRO) resultou em 8 tratamentos, organizados em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo a parcela experimental composta por 2 plântulas por vaso, constituindo 40 unidades experimentais.

3.1 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO

As sementes do genótipo de feijão-caupi Paulistão, obtidas no município de Pombal-PB, passaram por uma prévia triagem com o objetivo de eliminar aquelas que continham danos físicos, biológicos e/ou má formação. Após a triagem, as sementes foram pesadas e tratadas com fungicida Capitán[®] na dosagem de 0,22 g 100 g⁻¹ de sementes, ficando em repouso por 24 horas. A semeadura foi realizada manualmente em vasos de polietileno com capacidade volumétrica de 20 litros, preenchidos com material de solo de textura franco-arenosa. Após se elevar a umidade do solo ao nível próximo ao da capacidade de campo de vaso, foram alocadas seis sementes por vaso a uma profundidade média de 2 cm.

Foram coletadas amostras de solo da área experimental, para as análises químicas e físicas, obtendo-se os seguintes resultados: pH (H₂O) = 5,00 P = 36 mg dm⁻³; K⁺ = 0,19 cmolc dm⁻³; Na⁺ = 0,21 cmolc dm⁻³; Ca⁺² = 1,37 cmolc dm⁻³; Mg⁺² = 2,81 cmolc dm⁻³; Al⁺³ 0,0 cmolc dm⁻³; H⁺ = 3,22 cmolc dm⁻³; M.O = 1,53%; N[%] = 0,09 areia = 659 g/kg⁻¹; silte= 101g kg⁻¹; argila = 240g kg⁻¹; densidade aparente = 1,38g cm⁻³; densidade real= 2,63g cm⁻³; porosidade total = 0,48m³ m⁻³; umidade = 75 g kg⁻¹; argila natural = 240 g kg⁻¹; classe textural = Franco argilo arenosa.

O solo utilizado no experimento foi corrigido conforme a necessidade nutricional da espécie (MELO et al., 2005). Ainda, foram realizados tratamentos culturais de modo a manter a cultura livre de plantas invasoras, doenças e pragas. Após a emergência das plântulas, foram realizados desbastes, deixando-se aos 7 dias após a emergência (DAE), apenas duas plântulas por vaso. As irrigações foram realizadas normalmente até 25 DAE, sendo então iniciadas as duas formas de manejo hídrico no solo através da evapotranspiração diária observada pelo Evaporímetro através da equação citada por Villa-Nova e Ometto (1981) (Equação 1) em que foi considerada a evapotranspiração em mm/dia(Pi) e a função da temperatura do ar ($W=0,483+0,01 \times T < T < 32^{\circ}\text{C}$):

$$\text{Equação 1. ETPi} = \frac{0,28 \times \text{Pi}}{(1-w)}$$

A aplicação dos tratamentos com AS e PRO (0,0 mgL⁻¹ – controle; 550 mgL⁻¹ de AS; 690 mgL⁻¹ de PRO e a associação de 550 mgL⁻¹ de AS + 690 mgL⁻¹ de PRO) foi realizada via foliar, por meio de pulverização, no início do estágio V5, correspondendo a 25 DAE. As folhas de plântulas de feijoeiro, submetidas aos diferentes tratamentos propostos no presente estudo, foram coletadas no início do estágio R2.

3.2 VARIÁVEIS ANALISADAS

Para comprovar os efeitos dos diferentes tratamentos propostos no presente estudo, aferições quanto ao *status* hídrico, indicadores de crescimento, indicadores bioquímicos do ajustamento osmótico e da atividade enzimática foram realizadas em plantas de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico, tratadas ou não com ácido salicílico e prolina.

3.2.1 Indicadores de status hídrico

O conteúdo relativo de água (CRA) foi aferido por meio da metodologia de Irigoyen et al. (1992), utilizando-se a expressão matemática: $CRA = (MF - MS / MT - MS) \times 100$ Onde: “MF”, “MS” e “MT” correspondem à massa fresca, seca e túrgida do tecido vegetal, respectivamente. O percentual de umidade foi aferido com base na expressão matemática de Slavick (1974), utilizando-se a relação: $\%U = [(MF - MS) / MF] \times 100$.

Para a determinação da massa seca, as plantas coletadas foram acondicionadas em sacos de papel e mantidas em estufa de circulação e ar forçada a 65 °C para secagem, durante um período de 72 horas. Em seguida, o material vegetal foi pesado, obtendo-se a massa seca (MS). A massa fresca (MF) foi obtida através da pesagem da massa foliar no momento da retirada do experimento e a massa túrgida (MT) foi obtida pela pesagem da folha submetida ao período de 24h sob embebição em água destilada (SILVA et al., 2000).

3.2.2 Variáveis de crescimento e ecofisiológicas

A área foliar (AF) de cada planta foi obtida utilizando um medidor de área foliar Li-cor 3100 (Li-Cor Corporation, USA) expressa em cm^2 .

O diâmetro do caule (DC) foi medido utilizando o paquímetro digital (mm). A altura da planta (ALT) foi medida do colo à gema apical com uma régua graduada em centímetros. Foram realizadas duas avaliações de plantas, uma no início do ciclo e outra na fase final (SILVA et al., 2000).

De posse dos dados de diâmetro e altura foi possível realizar a determinação da Taxa de crescimento absoluta (TCA $cm\ dia^{-1}$) para a altura, aplicando-se a equação $(TCA = M2 - M1 / T2 - T1)$ e para a taxa de expansão absoluta (TEA $mm\ dia^{-1}$) através da equação $(TEA = D2 - D1 / T2 - T1)$ seguindo os procedimentos desenvolvidos por Benicasa (2003) e Floss (2004): em que para TCA, M1 corresponde à medida de altura da planta na primeira coleta (T1) e M2 medidas realizadas em intervalo até a última coleta (T2). Para a TEA, D1 corresponde a medida de diâmetro na coleta 1 (T1) e D2 medidas realizadas em intervalo até a última coleta (T2).

3.2.3 Avaliações Bioquímicas

3.2.3.1 Açúcares Solúveis Totais (AST)

Para a determinação dos níveis de carboidrato nas folhas de feijoeiro, foram macerados 200 mg de material vegetal fresco em Etanol 80%. Após a maceração, 2ml dos extratos, foram transferidos para microtubos e acondicionados em banho maria a 60°C por 20 minutos. Posteriormente foi centrifugado a 2000xg por cinco minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo de ensaio, repetindo-se o processo por duas vezes, gerando um total de 6 mL de extrato.

A determinação de AST seguiu o método do fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956). Utilizou-se 50 μL de material vegetal, ao qual foram adicionados 450 μL de água, 2,5 mL de ácido sulfúrico (80%) e 500 μL de fenol (5%).Posteriormente, os tubos foram passados pelo vórtex e, após o resfriamento, as amostras foram lidas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 490 nm, com resultados expressos em $\mu\text{g/gMF}^{-1}$.

3.2.3.2 Aminoácidos Livres Totais (AALT) e Prolina (PRO)

Quanto aos aminoácidos livres totais (AALT), o extrato foi obtido a partir da massa fresca do tecido vegetal, utilizando 250 mg da massa para 5 mL de ácido sulfosalicílico. A solução líquida foi centrifugada e o sobrenadante foi armazenado a -20 °C, para posterior dosagem de osmorreguladores. A concentração de AALT foi determinada segundo o método descrito por Peoples et al. (1989), com modificações.

Nessa determinação, alíquotas de 100 μL do extrato foram colocadas em tubos de ensaio acrescidas de 400 μL de água destilada e em seguida adicionados 250 μL de solução de Tampão Citrato a 200 mM (pH = 5,0) e 250 μL de reagente de ninhidrina (0,1 mmol L^{-1} de KCN e 5% de ninhidrina em methoxy etanol). Os tubos foram hermeticamente fechados, agitados em vórtex e levados ao banho-maria a 100 °C por 15 minutos. Em seguida, a reação da solução foi interrompida imediatamente com banho de gelo. Por fim, foram adicionados à solução 1,5 mL de etanol a 50% (v/v). Após nova agitação em vórtex, os tubos permaneceram por 20 minutos em temperatura ambiente para posterior leitura em espectrofotômetro a 570 nm, com resultados expressos em μmol de AALT mg de mf^{-1} .

O mesmo extrato vegetal foi utilizado para determinação dos níveis de Prolina livre, segundo Bates et al (1973).Em tubos de ensaio foram colocadas alíquotas de 500 μL do extrato

obtido e adicionado 1 mL do reagente de ninhidrina ácida, mais 1 mL de ácido acético glacial (98%). Após homogeneização os tubos foram hermeticamente fechados, agitados em vórtex e levados ao banho-maria por 1 hora a 100 °C. Logo após, a reação foi interrompida imediatamente com banho de gelo e posteriormente foram adicionados à solução 2 mL de tolueno (97%); na ocasião os tubos foram agitados em vórtex por 20 segundos. Após estabilização, duas fases se formaram, a fase aquosa superior formada pelo tolueno + cromóforo de coloração avermelhada foi aspirada e submetida à leitura em espectrofotômetro a 520 nm.

3.2.3.3 *Extração de Proteínas solúveis Totais (PST)*

O extrato vegetal para a determinação de enzimas e proteínas solúveis totais foi obtido com 200 mg de tecido foliar fresco, macerados em 2 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM e pH 7,8), acrescido de ácido ascórbico (0,1 mM), EDTA (0,1 mM) e polivinilpirrolidona (0,3%). Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 5000 rpm, 4°C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos, os quais foram mantidos em freezer a -20 até o momento das análises.

Para a determinação de proteínas hidrossolúveis totais foram utilizados 23,4µL do extrato vegetal e 700 µL de Bradford, para a leitura do branco utilizou-se essa mesma quantidade de reagentes sendo substituído o extrato por água. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em 595 nm de comprimento de onda (BRADFORD, 1976). A concentração foi expressa em mg de proteínas g mf⁻¹.

3.2.3.4 *Superóxido Dismutase (SOD)*

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada com base na capacidade de inibição da fotorredução do cloreto de nitrotetrazólio azul (NBT) pela enzima presente no extrato vegetal (GIANOPOLIS e REIS 1977). Alíquotas de 100µL foram adicionados em tubos de ensaio, protegidos da luz, contendo o meio de reação (1900 µL) composto por tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,8) acrescido de EDTA (0,1 mM), metionina (13 mM) e NBT (750 µM). Em seguida, iniciou-se a reação pela adição de riboflavina (7 µM) e a transferência dos tubos para a caixa de reação vedada, com iluminação interna (35 w) e temperatura ambiente, onde permaneceram durante 15 minutos. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro regulado em 560 nm.

Os tubos com extrato mantidos no escuro (os quais representam 0% da inibição de NBT-branco do escuro) foram considerados como branco da reação e os tubos sem o extrato mantidos sob iluminação (os quais representam 100% da inibição do NBT-branco do claro). Deve-se ressaltar que uma unidade de SOD foi considerada como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT em comparação com o branco do claro, sendo a atividade expressa em $U \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$.

3.2.3.5 *Catalase (CAT)*

A atividade da catalase (CAT) foi quantificada conforme Kar e Mishra (1976), a qual é definida com base no consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima presente no extrato. Iniciou-se a reação pela adição do extrato enzimático (150 μL) a cubeta de quartzo, contendo 1950 μL tampão de determinação (100 mM, pH:7,0); 150 μL tampão de extração (50 mM, pH: 7,5) e 750 μL solução de H_2O_2 (50 mM).

Após uma leve agitação, a solução foi levada a espectrofotômetro, regulado em 240 nm, onde foi observado o decréscimo da absorvância, durante o período de 2 minutos, com leituras realizadas a cada 10 segundos. Os cálculos foram mensurados pela lei de Lambert Beer, conforme a equação a baixo:

$$\text{Equação 2: } A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Em que: A = decréscimo da absorvância (média da triplicata); ϵ = coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio ($39,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); b = caminho óptico; c = concentração da enzima expressa em mol L^{-1} . A atividade da catalase foi expressa em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$

3.2.3.6 *Ascorbato Peroxidase (APX)*

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi calculada com base no consumo do ascorbato (NAKANO e ASADA, 1981) por meio do monitoramento do decréscimo da absorvância a 290 nm em cubeta de quartzo. Foram misturados 100 μL de extrato enzimático ao meio de reação (2,7 mL) composto por tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0) acrescido de ácido ascórbico (0,8 mM). Em seguida, a reação foi iniciada pela adição de 200 μL de peróxido de hidrogênio (2 mM) e monitorado o decréscimo da absorvância durante 1 minuto, com leituras realizadas a cada 10 segundos. Já os cálculos foram realizados pela equação de Lambert Beer

(Equação 1), tendo como coeficiente de extinção molar o ascorbato ($2,8 \text{ mM cm}^{-1}$). A atividade final de APX foi expressa em $\text{nmol de ascorbato min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$

3.3 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados por análise de variância (teste F até 5% de probabilidade). Foi realizado teste de comparação de médias (Tukey, $p < 0,05$) para os atenuadores Prolina, AS, Prolina+AS e para o tratamento controle e o teste de pares independentes (t de Student) para as lâminas de irrigação W100 e W50, utilizando-se do software SISVAR 5.6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONTEÚDO RELATIVO DE ÁGUA E UMIDADE FOLIAR

A restrição hídrica e a aplicação dos atenuadores Prolina e AS isolados ou em associação não exerceram influência nas variáveis de conteúdo relativo de água (CRA) e umidade (U%) ($P>0,05$) no estágio fenológico V5 da cultivar “Paulistão” (Tabela 1).

Tabela 1 Quadrado médio das variáveis: Conteúdo relativo de água (CRA) e umidade foliar (U%) sob duas condições de regime hídrico e diferentes tratamentos com ácido salicílico e prolina, no estágio fenológico V5

Quadrado Médio Indicadores de Status Hídrico			
FV	GL	CRA	U%
AS, Prolina e Prolina+AS	3	123,082 ^{ns}	47,77 ^{ns}
Lâminas	1	274,276 ^{ns}	94,7 ^{ns}
Atenuadores*lâminas	3	68,90 ^{ns}	26,26 ^{ns}
Resíduo	32	84,518	29,37
CV(%)	-	12,26	6,51

FV= fator de variação, GL= grau de liberdade, C.V= coeficiente de variação, **, * - Significativo a 1 e 5% respectivamente; ns – Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Campina Grande-PB, 2019.

As manutenções nos níveis de CRA e %U tanto na ausência (Controle) quanto na presença dos diferentes atenuadores apresentaram porcentagens de CRA entre 82 e 70% e de %U entre 89 e 80% (Figura 1 A e B).

Para o CRA, observa-se diminuição de 2,42% na lâmina W50 em relação à lâmina W100 para o tratamento sem o uso de atenuador (Controle). No cultivo na lâmina W50 e com o

uso de atenuadores observou-se que houve redução de 12,20, 10,78 e 6,14% em relação à lâmina W100, para os tratamentos com AS, Prolina e Prolina+AS, respectivamente (Figura 1 A). A %U foi reduzida em 8,25% no tratamento controle, com a aplicação dos atenuadores as diminuições foram de: 1,82, 5,59, 0,62% para os tratamentos Com AS, Prolina, Prolina+AS (Figura 1 B) .

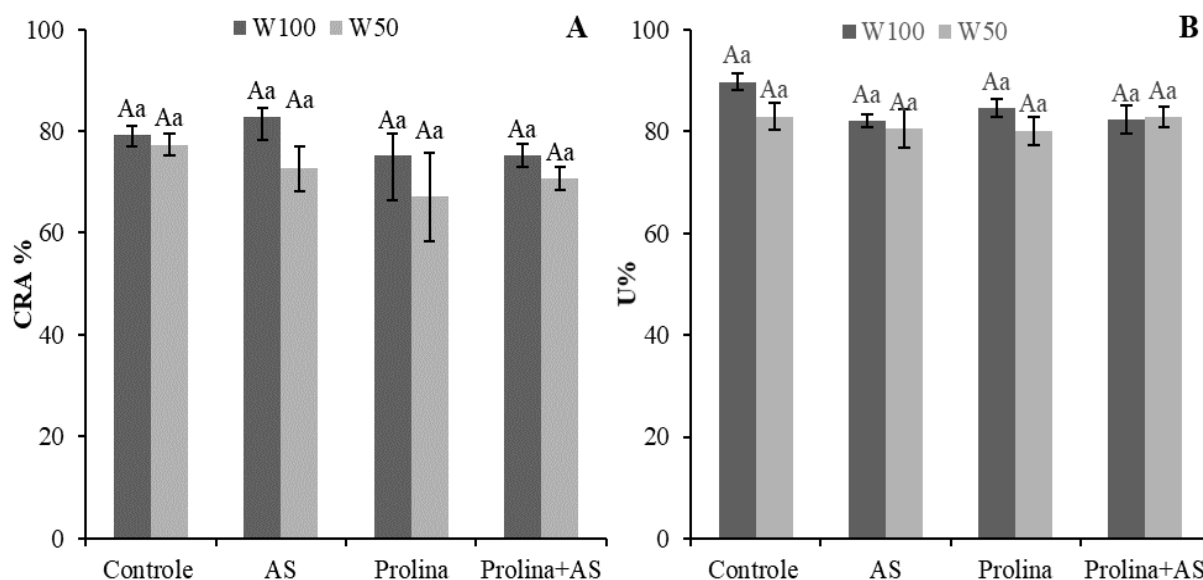


Figura 1. Variáveis de status hídrico, (A) Conteúdo relativo de água(CRA) e (B) Umidade (U%). Letras minúsculas diferenciam os tratamentos pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Letras maiúsculas diferenciam as lâminas de irrigação dentro de cada tratamento pelo teste t ($P > 0,05$).

Em estudo de Nascimento et al. (2011), o CRA de feijão-caupi foi afetado severamente quando acondicionado em um ambiente seco, havendo diminuições de até 62% em comparação às plantas irrigadas. De forma contrária, o presente estudo realizado com o genótipo Paulistão não apresentou variações representativas entre as lâminas de irrigação quando as plantas foram submetidas a sete dias de estresse. Adicionalmente, em trabalhos com trigo e lentilha, Bekka et al. (2018) observaram que a aplicação exógena de prolina apresenta um importante papel na diminuição dos efeitos deletérios do estresse, uma vez que esse aminoácido reduz a transpiração através do seu efeito regulador na abertura e fechamento dos estômatos, além de manter o conteúdo interno de água em níveis adequados.

Assim como no presente estudo, ao analisar a cultivar de feijão-caupi “Pele de Moça”, Coelho et al. (2014) observaram que não houve redução considerável nos níveis de umidade foliar, quando a cultura foi submetida a estresse hídrico e salino, o que denota uma alta tolerância das cultivares dessa espécie à desidratação.

Um fator que possivelmente colaborou para a manutenção do CRA e U% em níveis adequados foi o ajuste osmótico, realizado pelas plantas quando essas são expostas a condições

hídricas desfavoráveis. Tal mecanismo permite, através do acúmulo de osmólitos compatíveis, a absorção e manutenção de água nos tecidos vegetais, garantindo que suas condições fisiológicas se mantenham estáveis mesmo sob estresse (OLIVEIRA-NETO et al., 2016).

4.2 AJUSTAMENTO OSMÓTICO

O uso de ácido salicílico e prolina, de maneira conjunta ou isolada, promoveram alterações nos níveis de açúcares solúveis totais (AST), aminoácidos livres totais (AALT), prolina (PRO) e proteínas solúveis (PST) nas diferentes condições de irrigação ($P < 0,01$) (Tabela 2).

Tabela 2 Quadrado médio das variáveis: açúcares solúveis totais (AST), aminoácidos livres totais (AALT), prolina (PRO) e proteínas solúveis (PTS) de feijão-caupi submetidos a duas condições de regime hídrico e diferentes tratamentos com ácido salicílico e prolina, no estádio fenológico V5.

Quadrado Médio Variáveis de Ajuste Osmótico					
FV	GL	AST	AALT	Prolina	PTS
AS, Prolina e Prolina+AS	3	318,799**	0,999**	1,912**	124,017**
Lâminas	1	24,242*	0,157*	2,309**	96,498**
Tratamentos*lâminas	3	121,843**	0,251**	2,104**	53,042**
Resíduo	32	3,836	0,035	0,048	2,672
CV(%)	-	10,35	11,06	13,22	18,19

FV= fator de variação, GL= grau de liberdade, C.V= coeficiente de variação, **, * - Significativo a 1 e 5% respectivamente; ns – Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Campina Grande-PB, 2019.

Sem a aplicação dos atenuadores (Controle), a restrição hídrica (W50) influenciou positivamente o acúmulo de osmólitos compatíveis no feijoeiro em relação aos níveis de açúcares solúveis totais (AST), com um aumento de 58,54% (Figura 2 A).

O aumento nos níveis de AST obtido quando se induziu as plantas ao estresse, pode estar relacionado ao processo de ajuste osmótico, pois o acúmulo de carboidratos no citoplasma é um dos mecanismos utilizados pelas plantas quando estão condicionadas a ambientes com restrição hídrica. O aumento de AST no citoplasma pode ainda estar relacionado à quebra de

amido que intensifica ainda mais o processo de ajustamento osmótico vegetal (COELHO et al., 2018).

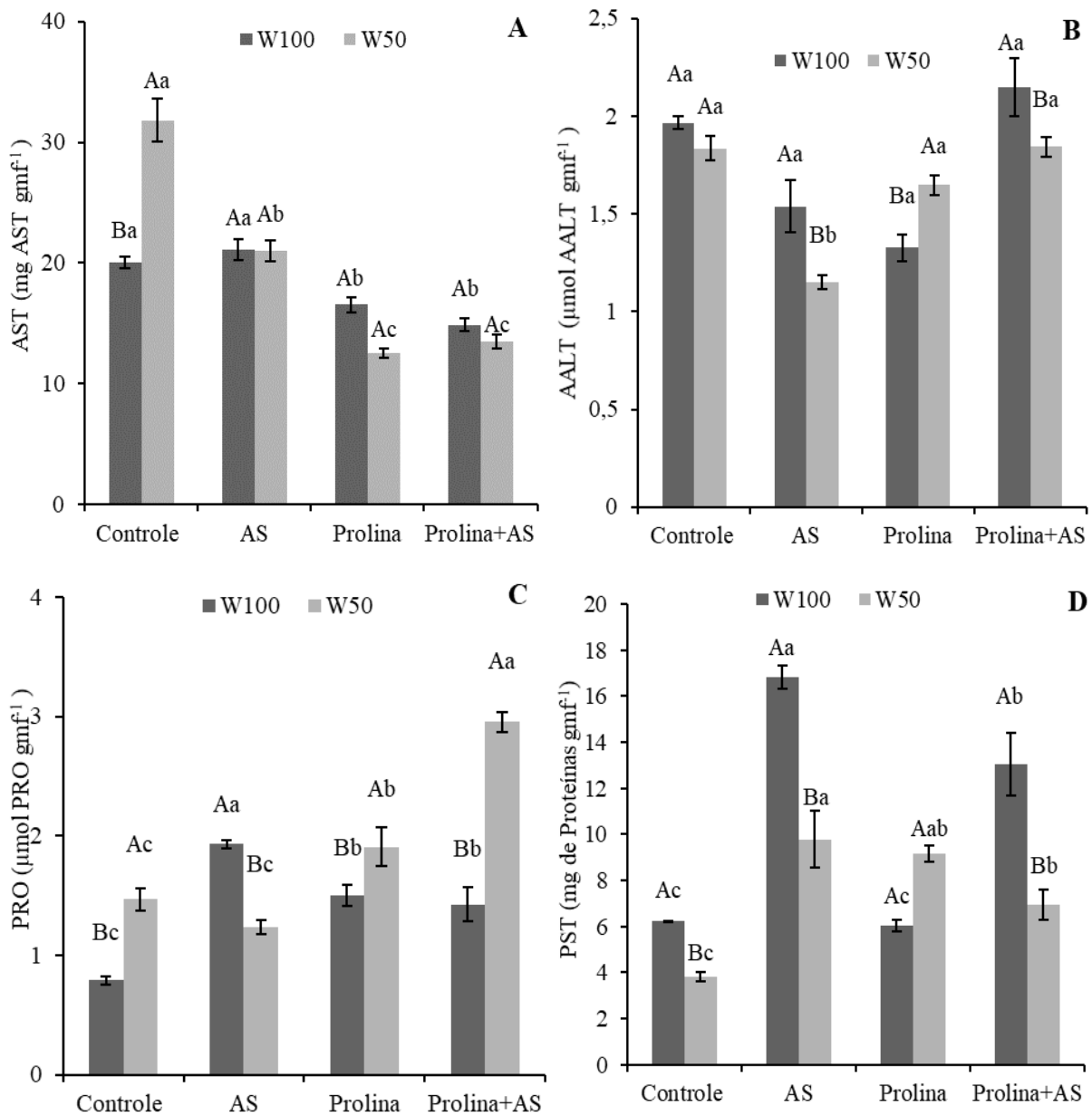


Figura 2. Variáveis de ajustamento osmótico do genótipo Paulistão submetido a 100% (W100) e 50% (W50) da reposição hídrica com base na ETo, com aplicações foliares de ácido salicílico (AS) e prolina (PRO) de forma isolada e conjunta: (A) concentrações de açúcares solúveis totais (AST), (B) concentrações de aminoácidos livres totais (AALT), (C) concentrações de prolina (PRO) e (D) concentrações de proteínas (PTS) (D). Letras minúsculas diferenciam os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,01$). Letras maiúsculas diferenciam as lâminas de irrigação dentro de cada tratamento pelo teste t ($P < 0,01$).

Comparando-se as lâminas W100 com W50, na presença da aplicação dos diferentes atenuadores, não foram identificadas diferenças ($P > 0,05$) em nenhum dos tratamentos avaliados (Figura 2 A). Contudo, a aplicação isolada de prolina exógena e aplicação associada Prolina+AS

promoveram reduções de 17 e 26%, respectivamente, nos níveis de AST na lâmina W100. Na lâmina W50 o uso dos atenuadores diminuíram a concentração interna de AST em 34%, após aplicação de AS, 60% após aplicação de PRO e 57%, após a aplicação de Prolina+AS (Figura 2 A).

Sob déficit hídrico o AS restringiu a formação de ASTs nas plantas em estudo, Nazar et al. (2011) ao avaliar a ação do AS em duas cultivares de *Vigna radiata*, observaram que houve redução da condutância estomática, concentração de CO₂ intracelular e fluorescência da clorofila nas plantas que foram submetidas a 1,0 mM de AS. A aplicação de AS causou para o tratamento controle efeito inibição para os parâmetros fotossintéticos. Nesta perspectiva, ao utilizar-se de uma dose superior em quatro vezes a dose de AS estudada pelos autores, no o tratamento em estudo podemos aferir que a redução dos níveis de AST observada pode estar relacionada ao caráter inibidor do AS aos parâmetros fotossintéticos.

O uso de prolina de maneira isolada ou associada ao AS promoveu reduções dos níveis de AST, principalmente quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico. Este aminoácido, quando aplicado via foliar, reduz a abertura dos estômatos (RAI; SHARMA, 1991; YACER, 2005; BEKKA et al., 2018), o que restringe a formação de compostos derivados da fotossíntese pela menor captação de CO₂ atmosférico. Nas condições do presente estudo, o fechamento estomático pode ter diminuído a perda excessiva de água através da transpiração.

Além da maior conservação de água, ressalta-se que para os indivíduos que foram submetidos ao tratamento com prolina exógena ela possivelmente tenha atenuado os danos relacionados a deficiência hídrica e, deste modo, tenha garantido que as plantas de feijoeiro tenham um bom desenvolvimento mesmo sem o acúmulo de AST no citoplasma.

Quanto aos AALT, Comparou-se as lâminas de irrigação W100 e W50 no tratamento sem a aplicação de atenuadores (Controle) e não foram observadas diferenças significativas (Figura 2 B). Neste caso, é possível que os AALT não participem do metabolismo de ajustamento osmótico do genótipo Paulistão, nas condições do presente estudo. Contudo, a aplicação de AS de forma isolada (AS) e conjunta com PRO (AS+PRO) reduziram os níveis de AALT em 25 e 14%, respectivamente na lâmina W50, comparada a lâmina W100. Contrariamente, a aplicação isolada de PRO aumentou os níveis de AALT em 24% na lâmina W50, comparada a W100 (Figura 2 B). Logo, a redução observada no tratamento Prolina+AS possivelmente se deve a ação do AS.

Avaliando a ação da presença e ausência dos diferentes atenuadores, na lâmina W50, observou-se que a aplicação de AS reduziu significativamente a concentração de AALT em

37%, quando comparado ao tratamento Controle sob a mesma disponibilidade hídrica (Figura 1 B).

O AS isolado reduziu os teores de AALT nas plantas de feijoeiro, pois a produção de aminoácidos demanda muitos esqueletos de carbono, assim há maior conversão de amido em sacarose e maior gasto dos compostos carbonados (ROCHA, 2018) como podemos observar reduções significativas nos teores de ASTs podemos aferir de maneira indireta que a produção dos aminoácidos foi afetada pela pouca disponibilidade de carboidratos no tratamento com AS. Pois, como observa-se neste trabalho houve redução nos níveis de AALT tanto no tratamento com AS isolado, como no associado com prolina.

Diferentemente do AS, a aplicação de Prolina exógena exerceu influência positiva no acúmulo de AALT no feijoeiro sob condição de estresse, segundo Santos et al. (1996) a prolina exógena atua como fonte de nitrogênio e como osmorregulador, deste modo a maior formação de aminoácidos nos tratamentos observados se deu em decorrência da suplementação de nitrogênio provida pela aplicação foliar de prolina.

Comparando-se as lâminas W100 e W50, no tratamento sem a aplicação de atenuadores, observou-se que sob a condição de restrição hídrica houve um incremento de 85% nos níveis de PRO das plantas de feijoeiro, comparado à lâmina W100.

O aumento da concentração de PRO, quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico, pode ser ocasionado pela ação das proteinases, que geram a manutenção do potencial hídrico da folha ao aumentarem a concentração deste aminoácido no citoplasma, isso assegura que a planta ajuste-se osmoticamente e evite a desidratação (SOUSA et al., 2015; CARVALHO et al., 2019) além da hidrólise proteica que desencadeia o acúmulo desse aminoácido outros mecanismos como a síntese mediada pela via do glutamato e da ornitina asseguram concentrações de prolina adequadas sob estresse ambiental (HAYAT et al., 2012).

Nos tratamentos com aplicação exógena de prolina de forma isolada e associada ao AS (Prolina+AS), observaram-se aumentos de 27 e 107% dos níveis desse aminoácido no tratamento W50, respectivamente, comparados aos seus respectivos tratamentos W100 (Figura 1 C). Ainda, quando foram avaliados os diferentes tratamentos na ausência e presença dos atenuadores, na lâmina W50, observaram-se aumentos de aproximadamente 30 e 101%, após a aplicação de Prolina e Prolina+AS, respectivamente, em relação ao tratamento sem atenuador (Controle) (Figura 2 C).

As tendências dos valores médios observados no presente estudo condizem com o trabalho de Merwad et al. (2018), realizado com aplicação de prolina exógena, no qual observaram incremento de 18% no acúmulo de prolina endógena nas plantas submetidas à

deficiência hídrica em relação aos controles irrigados. No estudo citado, a aplicação de prolina exógena indica que a mesma desempenha importante papel de ajuste sob condições desfavoráveis uma vez que ela ajudou as plantas a ter um melhor desempenho em termos de crescimento e produtividade. No entanto, o tratamento realizado com ácido salicílico de maneira isolada promoveu uma redução de 36% dos níveis de prolina endógena na lâmina W50, comparada a W100. O menor acúmulo de prolina nos tratamentos com AS pode ser tido como decorrência da ação antagônica do AS em relação ao ácido abscísico (ABA), pois o ABA atua como mediador da síntese de prolina relacionada ao cobre, nesse sentido, a síntese de prolina possivelmente pode ter sido prejudicada nos tratamentos com AS isolado (HAYAT et al., 2012).

Em relação às proteínas solúveis totais dos feijoeiros cultivados na ausência de atenuadores, observou-se que o déficit hídrico (W50) provocou redução de 38% nos níveis de PTS, comparado ao tratamento W100 (Figura 1 D).

Com a deficiência hídrica houve redução dos níveis endógenos de proteínas no tratamento sem o uso de atenuadores (Controle) este comportamento é esperado, pois o déficit hídrico induz uma série de alterações no metabolismo celular dentre as quais incluem-se a proteólise, dificuldades nos processos de síntese proteica, distúrbios no metabolismo de aminoácidos, problemas nos processos de tradução.

As aplicações de AS de forma isolada e conjunta com a prolina (Prolina+AS) causaram reduções de 41 e 46% nas concentrações de PTS no tratamento W50, comparados aos seus respectivos tratamentos W100 (Figura 1 D). Já a aplicação de prolina de forma isolada aumentou os níveis de PTS em 51% na lâmina W50, comparada a W100 (Figura 1 D). Ressalta-se que os valores médios encontrados nas concentrações de PTS, seguem a mesma tendência dos valores médios encontrados em AALT, o que sugere distúrbios no metabolismo de aminoácidos que pode ter dificultado a síntese proteica, neste caso.

Avaliando apenas o efeito dos diferentes atenuadores sobre PTS na lâmina W50, observou-se que houve aumento de 173, 140 e 82% nos níveis de PTS dos feijoeiros tratados com AS, Prolina e Prolina+AS, respectivamente, comparados ao tratamento com a mesma lâmina na ausência de atenuadores (Figura 1 D).

O favorecimento no aumento nos níveis de PST, após a aplicação de prolina exógena, quando os feijoeiros foram submetidos ao déficit hídrico, sugere a participação desse aminoácido na composição de proteínas essenciais às plantas, que assegura a integridade das moléculas proteicas e evitam sua desnaturação enquanto os vegetais estão submetidos a algum estresse (SHARMA et al., 2012; QU et al., 2013).

O efeito de incremento da concentração proteica com o uso do AS, observado após sua aplicação na lâmina W50, possivelmente se deve ao fato de que esta molécula é um sinalizador celular que desencadeia cascatas de eventos bioquímicas que culminam em reações que estão relacionadas à mitigação dos efeitos deletérios dos diferentes estresses ambientais (PÁL et al., 2014).

4.3 VARIÁVEIS DE CRESCIMENTO

Houve interação para todos os tratamentos e lâminas de irrigação em relação às variáveis de crescimento do feijoeiro ($P < 0,01$) (Tabela 3). A restrição hídrica provocou alterações sobre os indicadores de crescimento, porém a aplicação dos atenuadores proporcionaram ajustes importantes nesses parâmetros.

Tabela 3 Quadrado médio das variáveis de crescimento do genótipo Paulistão no estágio V5 submetido a 100% e 50% da reposição hídrica com base na ETo, com aplicações foliares de ácido salicílico (AS) e prolina (PRO) de forma isolada e conjunta: taxa de expansão absoluta (TEA), taxa de crescimento absoluto (TCA), matéria fresca total (MFT) e área foliar total (AFT).

Quadrado Médio Variáveis de Crescimento					
FV	GL	TEA	TCA	MFT	AFT
AS, Prolina e Prolina+AS	3	0,006370**	0,008298**	19,758603**	742,654965 ^{ns}
Lâminas	1	0,002759 ^{ns}	0,001148 ^{ns}	20,377562**	1198,017128 ^{ns}
Atenuadores*lâminas	3	0,003681**	0,003188**	21,825876**	2619,992686**
Resíduo	32	0 000744	0,000446	0,695165	371,738898
CV(%)	-	27,96	20,76	8,73	13,07

FV= fator de variação, GL= grau de liberdade, C.V= coeficiente de variação, **, * - Significativo a 1 e 5% respectivamente; ns – Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Campina Grande, 2019.

Ao avaliar os indicadores de crescimento dos feijoeiros submetidos ao tratamento W50, na ausência de atenuadores, verificou-se que o déficit hídrico provocou reduções de 47% na TEA e de 15% na MFT, comparados aos seus respectivos tratamentos W100 (Figura 3 A e C). Contrariamente, a submissão das plantas à lâmina W50, na ausência de atenuadores, aumentou os valores médios da TCA em 40%, comparado à lâmina W100 (Figura 3 B). Já a AFT não

apresentou variações significativas quando as plantas foram submetidas ao tratamento W50, comparado ao tratamento irrigado (W100) (Figura 3 D).

Observou-se que a deficiência hídrica promoveu limitações no crescimento dos vegetais, isso ocorre pois sob déficit hídrico a perda do potencial hídrico celular gera nas células uma menor turgescência e impede a divisão celular, deste modo, promove redução da área foliar e do tamanho da planta, além disso, alterações como fechamento estomático, menor aquisição de fotoassimilados contribuem para o menor incremento de tamanho dos vegetais submetidos a deficiência hídrica (NASCIMENTO et al., 2011; CARVALHO et al., 2017).

As manutenções nos valores médios da TCA e da AFT em feijoeiros submetidos ao déficit hídrico na ausência de atenuadores, sugerem que o ajustamento osmótico atribuído em parte aos osmorreguladores avaliados foi eficiente em manter os processos básicos da fotossíntese (SANTOS; CARLESSO, 1998;). A manutenção da AFT, mesmo em condições de estresse, favoreceu o aumento da síntese de carboidratos que contribuíram para o ajustamento osmótico nestas condições.

Após a aplicação de AS nas plantas submetidas à lâmina W50, observou-se redução de 34% nos valores médios apenas da MFT, comparada ao tratamento W100. Os demais indicadores de crescimento dos feijoeiros submetidos ao déficit hídrico (W50) não foram influenciados significativamente pela aplicação de AS foliar, comparados aos seus respectivos tratamentos W100 (Figura 3 A, B e D).

Segundo Colli (2008), o AS pode inibir a germinação e o crescimento da planta, interferir na absorção das raízes, reduzir a transpiração e causar abscisão das folhas, em estudo com feijoeiro submetido a salinidade, Nazar et al. (2011) verificam que a dose de 1,0 mM desse composto pode interferir significativamente na redução da condutância estomática, concentração de CO₂ intracelular e fluorescência da clorofila o que pode desta maneira ter influenciado no crescimento dos vegetais tratados com esse elicitor.

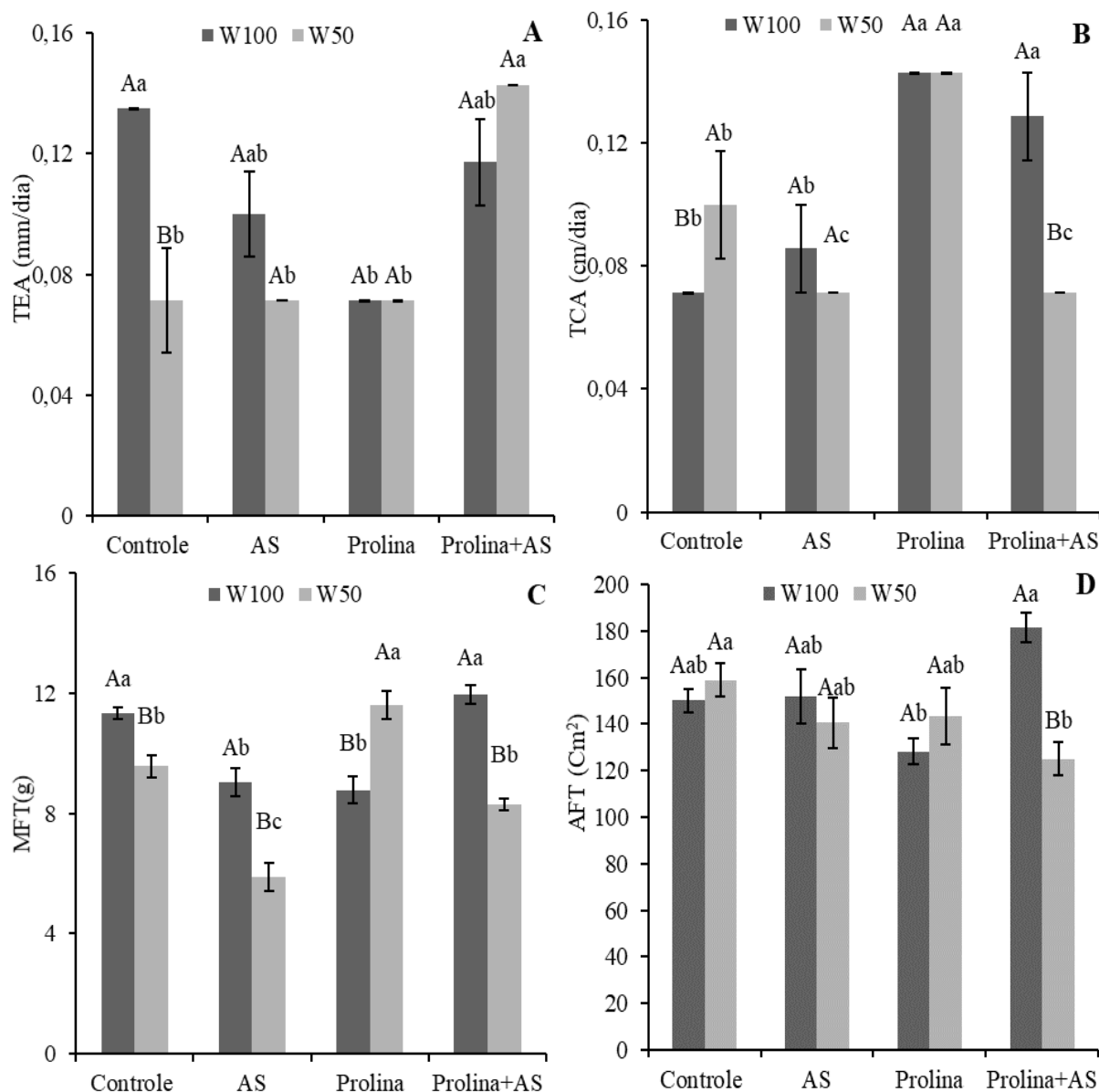


Figura 3. Variáveis de crescimento do genótipo Paulistão, (A) Taxa de expansão absoluta (TEA), (B) Taxa de Crescimento Crescimento absoluto (TCA), (C) Matéria Fresca Total (MFT), (D) Área foliar total (AFT). Letras minúsculas diferenciam os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,01$). Letras maiúsculas diferenciam as lâminas de irrigação dentro de cada tratamento pelo teste t ($P < 0,01$).

Avaliando a ação da aplicação de AS apenas na lâmina W50, observaram-se reduções de 16 e 34% na TCA e MFT, respectivamente, quando comparados ao tratamento Controle na mesma condição hídrica (Figura 3 B e C).

Para Araújo et al. (2018) a aplicação isolada do AS promove incremento no crescimento do feijoeiro sob condição de estresse e seu desenvolvimento inicial. Portanto, a manutenção da TEA, TCA e AFT sugerem o efeito benéfico do AS sobre indicadores de crescimento mesmo em condições de restrição hídrica. Contudo, é importante destacar que a ação do AS, no tocante ao crescimento, demonstra-se variável dependendo de fatores como a cultura, a concentração de AS

utilizada no tratamento, o estágio fenológico da planta, o método de aplicação e o balanço oxidativo das células (PÁL et al., 2014).

A aplicação foliar de prolina de forma isolada também não provocou alterações significativas nos indicadores de crescimento avaliados em plantas submetidas ao déficit hídrico (W50), com exceção da MFT, quando comparados aos seus tratamentos W100 (Figura 3). A aplicação de prolina exógena promoveu um aumento de 32% na MFT das plantas submetidas ao déficit hídrico, comparado ao tratamento irrigado (Figura 3 C).

A aplicação de prolina de forma isolada, na lâmina W50, também favoreceu o aumento de 32% nos valores médios da MFT, comparado ao tratamento controles submetido ao déficit hídrico (Figura 3 C).

No que se refere à ação da prolina, em estudo de Merwad et al. (2018) em feijão submetido ao déficit hídrico, foi comprovada que a aplicação exógena desse composto promove melhorias no crescimento e desenvolvimento dos vegetais, auxiliando a uma maior tolerância a estes tipos de estresse que restringem a disponibilidade de água no solo. A prolina é um aminoácido constituinte de proteínas celulares, deste modo sua aplicação é benéfica a planta, tendo em vista que uma maior disponibilidade deste aminoácido, mais proteínas serão formadas, contribuindo para o crescimento da planta mesmo em condição de estresse (SHARMA et al., 2012).

A aplicação conjunta de prolina e AS (Prolina+AS) reduziram a maioria dos indicadores de crescimento em condições de déficit hídrico (W50), com exceção da TEA, quando comparados aos seus respectivos tratamentos W100 (Figura 3). Em contrapartida, na lâmina W50, o tratamento atenuador Prolina+AS aumentou os valores médios da TEA em 22%, mas também reduziu em 44 e 31% a TCA e a AFT, respectivamente, quando comparados aos seus respectivos tratamentos Controles na lâmina W50 (Figura 3 A).

A ação do atenuador Prolina+AS restringiu a TCA e AFT das plantas analisadas, segundo Taiz et al. (2017) a diminuição da área foliar é a primeira linha de defesa biofísica contra o estresse por déficit hídrico, isso ocorre, pois, diminuindo-se a área foliar a planta perde diminui sua superfície de perda de água para o ambiente, contudo, isso provoca diminuição da área de absorção de CO₂ e deste modo influencia nos processos fotossintéticos e no ganho de matéria fresca pelo vegetal, o que pode ter influenciado a redução nos níveis de AST.

Rocha (2018) ao avaliar a ação do ácido salicílico nas características morfofisiológicas e bioquímicas em mudas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. e *Cedrela fissilis* VELL, verificou diminuição para as variáveis de crescimento quando as plantas foram submetidas ao AS. Para o

autor, o AS pode ter gerado fitotoxicidade e influenciou de maneira negativa os parâmetros de crescimento como a área foliar e a matéria seca total.

O uso de ácido salicílico e prolina isolados bem como em conjunto diminuíram a taxa de expansão relativa (TEA) na lâmina W100 obtendo-se valores que são 25,89% (tratamento com AS isolado); 47,13% (tratamento com prolina isolada) e 13,18% (tratamento com associação entre AS e Prolina) inferiores ao obtido no tratamento sem atenuadores (Controle) para esta mesma lâmina de irrigação (Figura 3 A).

Apesar da redução na TEA na lâmina W100 o uso associado de Prolina e AS amenizou os efeitos deletérios do estresse na lâmina com restrição hídrica (W50), para essa lâmina as plantas aumentaram sua TEA em cerca de 100% quando comparadas as plantas cultivadas no tratamento controle.

O uso de prolina exógena dobrou a TCA das plantas na lâmina W100 quando comparada ao tratamento Controle, já na lâmina W50 observa-se aumento de 42,88% para esta variável (Figura 3 B). Deste modo a aplicação de prolina exógena demonstra ação positiva no que se refere ao crescimento das plantas seja em condições adequadas de irrigação ou sob deficiência hídrica.

A prolina exógena e o AS diminuíram em 22,46 e 20,26% a matéria fresca total (MFT) das plantas analisadas na lâmina W100 (Figura 3 C), na lâmina W50 o AS, de mesmo modo, diminuem a MFT em 38,47 % em relação ao tratamento Controle. A prolina exerceu ação positiva na lâmina com restrição hídrica proporcionando aumento de 21,44% da matéria fresca total quando comparado ao tratamento controle.

Notou-se que com a restrição hídrica nos tratamentos com Prolina+AS, controle e com AS houve redução da variável MFT de 30,58, 15,50 e 34,80% respectivamente. Por outro lado o uso do atenuador Prolina isolado promoveu o incremento de 32,35% na MFT das plantas analisadas na lâmina W50 em relação a W100.

A área foliar (AF) foi afetada pelo tratamento Prolina+AS na lâmina W50, havendo uma diminuição de 31,10% em relação a W100. Possivelmente a diminuição da AF pode estar relacionada com mecanismos que são ativados com a presença do AS em contrações foliares elevadas, por isso os tratamentos com esse composto podem ter exercido uma sinalização a diminuição dessa variável morfológica na planta já que a diminuição da área foliar representa uma importante estratégia para diminuição da perda de água pela evapotranspiração (DÍAZ-LÓPEZ et al., 2012)

Houve diminuição tanto na matéria fresca total quanto na TEA nas plantas tratadas com Prolina+AS, de mesmo modo que a concentração interna de AST foi diminuída para estes

mesmos tratamentos, neste sentido, a conjectura de que a prolina exerce uma forte influência no que diz respeito a assimilação de compostos carbonados ganha ênfase, pois com a aplicação desse tratamento a planta apresentou atraso em seu ganho de matéria fresca e TEA na situação de deficiência hídrica.

Esta diminuição possivelmente está relacionada com o alto investimento energético que a planta submetida à deficiência hídrica investe no ajustamento osmótico com o ambiente, pois, mesmo mantendo os níveis de AST consideravelmente altos houve uma redução do tamanho do vegetal sugerindo que estes compostos participam do ajuste osmótico da planta com o ambiente nestas condições de estudo e não do incremento de tamanho.

4.4 AÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para este estudo houve interação entre os fatores lâmina e atenuadores ($P < 0,01$) para todas as variáveis estudadas em relação à atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato Peroxidase (APX) (**Tabela 4**).

Tabela 4 Quadrado médio das variáveis de enzimas antioxidantes do genótipo Paulistão no estádio V5 submetido a 100% e 50% da reposição hídrica com base na ETo, com aplicações foliares de ácido salicílico (AS) e prolina (PRO) de forma isolada e conjunta: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato Peroxidase (APX).

Quadrado Médio Enzimas Antioxidantes				
FV	GL	SOD	CAT	APX
AS, Prolina e Prolina+AS	3	224704,810248**	0,105540**	111.350099**
Lâminas	1	250719,040586**	0,002237 ^{ns}	24.504986**
Tratamentos*lâminas	3	44529,359290**	0,124472**	64.610010**
Resíduo	32	1314,342782	0,006255	1.752896
CV(%)	-	12,50	22,64	14.87

FV= fator de variação, GL= grau de liberdade, C.V= coeficiente de variação, **, * - Significativo a 1 e 5% respectivamente; ns – Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. Campina Grande-PB, 2019.

Quando comparadas as lâminas W100 e W50, na ausência de atenuadores (Controle), notou-se aumentos de 124; 32 e 88% nas atividades das enzimas SOD, CAT e APX,

respectivamente, quando os feijoeiros foram submetidos à lâmina W50, comparado ao tratamento W100 (Figura 4 A, B e C).

O aumento da atividade das enzimas do complexo antioxidativo, na condição de deficiência hídrica, é considerado um mecanismo comum para promover a remoção de espécies reativas de oxigênio que se formam em condições de estresse, essa remoção auxilia na integridade e estabilidade de membranas e estruturas celulares e facilita o processo de osmorregulação por parte dos ajustadores osmóticos (BARBOSA et al., 2014). O aumento da atividade dessas enzimas garantem a remoção de radicais livres e regulam suas concentrações para níveis adequados. Dutra et al. (2017), ao analisarem o feijoeiro após submissão ao déficit hídrico, durante o desenvolvimento inicial, também verificaram incremento da atividade das enzimas SOD, CAT e APX.

A aplicação foliar de AS aumentou cerca de 700% a atividade de SOD e aproximadamente 75% a atividade da enzima CAT, quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica na lâmina W50, comparada às suas respectivas lâminas W100 (Figura 4 A e B). Contrariamente, observou-se a redução de 21% na atividade da APX após aplicação do AS via foliar no tratamento W50, comparado a W100 (Figura 4 C).

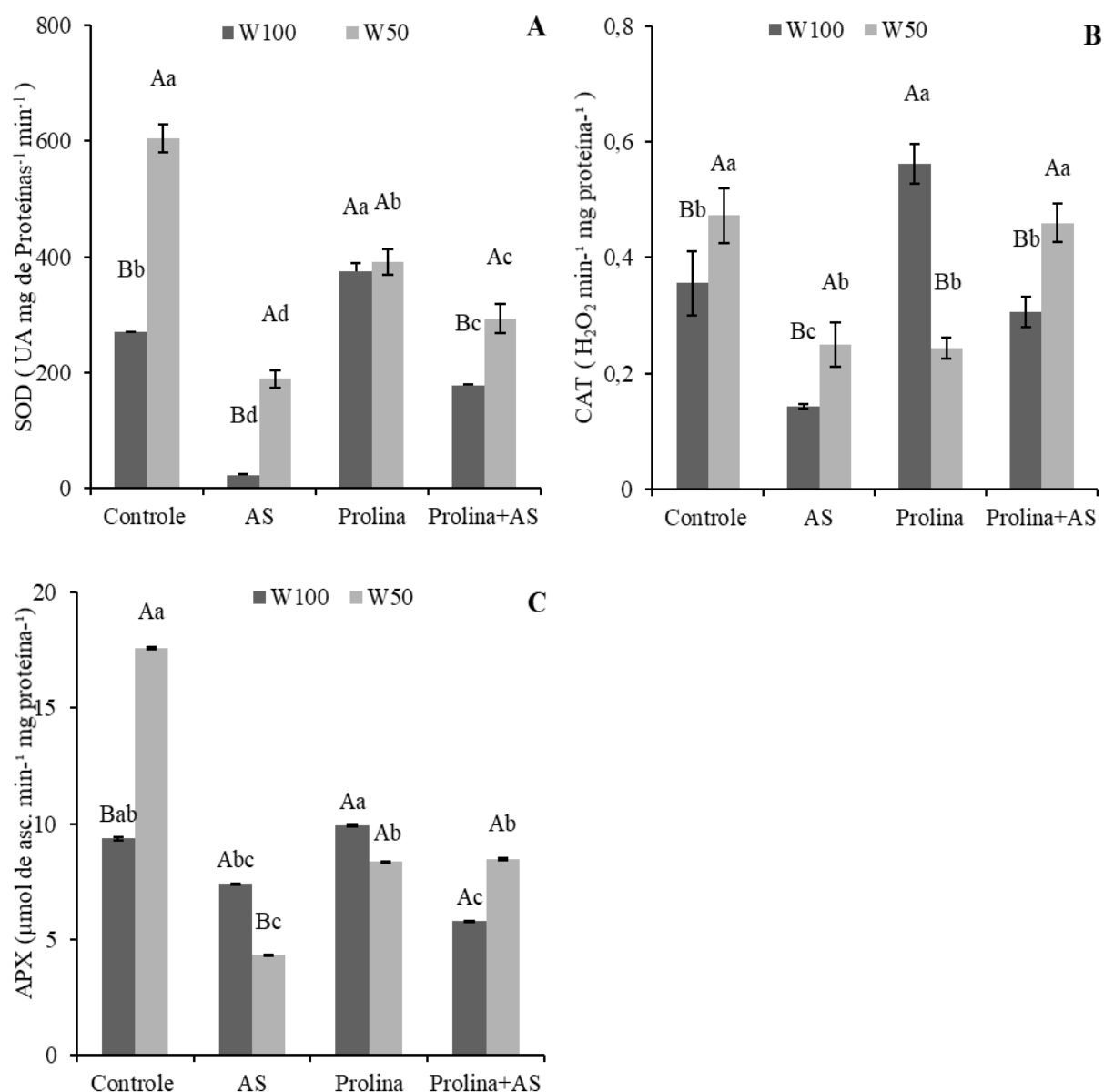


Figura 4. Variáveis de enzimas antioxidantes do genótipo Paulistão, (A) Atividade da SOD mg de proteínas⁻¹ (B) Atividade da CAT em μmol de H₂O₂ por mg de proteínas⁻¹, (C) Atividade da APX em μmol de ASC min⁻¹ por mg de proteínas⁻¹. Letras minúsculas diferenciam os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,01$). Letras maiúsculas diferenciam as lâminas de irrigação dentro de cada tratamento pelo teste t ($P < 0,01$).

O aumento na atividade das enzimas SOD e CAT no tratamento com AS está de acordo com os resultados descritos por Dutra et al. (2017), os quais afirmam que a aplicação de AS é um importante estimulador da atividade destas enzimas em feijoeiro submetido ao déficit hídrico, agindo como agente atenuador do estresse. A redução na atividade da APX, que atua na remoção de H₂O₂ nas células, após aplicação do AS, pode estar relacionada à supressão da sua atividade em detrimento ao aumento expressivo da atividade da enzima CAT, que também atua na remoção de H₂O₂ (BARBOSA et al., 2014). Contudo, os mecanismos não enzimáticos, a

exemplo da síntese de osmorreguladores mediados pela ação do AS, podem ter favorecido ao menor acúmulo de EROs neste tratamento.

Após a aplicação foliar de prolina nos feijoeiros submetidos à lâmina W50, verificou-se que as atividades das enzimas SOD e APX não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao tratamento W100 (Figura 4 A e C). No entanto, a aplicação de prolina diminuiu em 56% a atividade da CAT em comparação ao tratamento irrigado, com 100% da reposição hídrica da evapotranspiração (Figura 4 B).

No presente estudo, é possível que a aplicação foliar de prolina tenha causado efeitos preponderantes sobre a osmorregulação por meio de compostos nitrogenados, a exemplo da síntese de aminoácidos, proteínas e da própria prolina endógena. Neste caso, o papel não enzimático da prolina tanto na remoção de radicais livres, quanto no auxílio ao ajustamento osmótico, pode ter contribuído para a redução na atividade das enzimas antioxidantes estudadas (SIGNORELLI et al., 2014).

Em condições de déficit hídrico (W50), a aplicação foliar conjunta de prolina e AS (Prolina+AS) aumentaram as atividades enzimáticas de SOD, CAT e APX em 51; 50 e 46%, respectivamente, comparados aos seus respectivos tratamentos W100 (Figura 4 A, B e C). Neste caso, é possível que o efeito no aumento das atividades enzimáticas tenha ocorrido principalmente pela presença do AS na solução atenuadora, já que a aplicação de prolina de forma isolada não causou variações representativas nos valores médios apresentados.

Os incrementos nas atividades enzimáticas devido a ação conjunta da prolina e AS, além de provocarem efeito atenuador sobre a produção de EROs, por meio não enzimático, atuam no estímulo à atividade de enzimas antioxidantes sob condições de estresse, o que contribui para a tolerância do feijoeiro a deficiência hídrica (DUTRA et al., 2017; MERWAD et al., 2018). Meward et al. (2018) afirmaram que a atividade das enzimas do complexo antioxidante é intensificada com o uso de prolina exógena. Nesta mesma perspectiva, Dutra et al. (2017) registraram que o AS é um importante estimulador da atividade das enzimas SOD, CAT e APX.

Esta assertiva se confirma, através de estudos como os de Rejeb et al. (2014), Signorelli et al. (2014) e Lee et al. (2019) que afirmam que estes compostos desempenham papel tanto no incremento da atividade enzimática quanto na ação não enzimática de remoção de EROs em plantas, garantindo níveis homeostáticos destas moléculas, deste modo mitigando os efeitos danosos dos estresses ambientais.

Avaliando a ação dos agentes atenuadores sobre a lâmina W50, observaram-se reduções nas atividades de todas as enzimas estudadas, quando comparadas ao tratamento Controle na

mesma lâmina de irrigação. Nestas condições, as reduções nos valores médios da atividade da SOD, após a aplicação de AS, Prolina e Prolina+AS, foram de 68, 35 e 51%, respectivamente (Figura 4 A). Para a atividade da CAT, as reduções nas atividades das enzimas nos tratamentos AS; Prolina e AS+Prolina foram de 32 ; 75 e 50% respectivamente (Figura 4 B). Já a atividade da enzima APX foi reduzida em 75; 52 e 52% na lâmina W50, após a aplicação dos tratamentos AS, Prolina e Prolina+AS, respectivamente, comparados ao tratamento Controle na mesma condição hídrica (Figura 4 C).

De maneira geral a atividade das enzimas quando não intensificadas pelos atenuadores Prolina, AS e Prolina+AS foi devidamente suprida pela remoção de forma não enzimática das EROs ou pelo acúmulo de ajustadores osmóticos nas células que possibilitaram melhor tolerância da cultura avaliada às condições de estresse, deste modo, destaca-se a ação do atenuador Prolina e Prolina+AS no que se refere ao incremento de crescimento e AS no aumento da atividade das enzimas do complexo antioxidativo.

5 CONCLUSÕES

Em condições de estresse hídrico ou não os atenuadores ácido salicílico e prolina não influenciaram nas variáveis CRA e U%.

Sob deficiência hídrica houve maior produção de prolina nos vegetais analisados no tratamento Prolina+AS, assim podemos aferir que este aminoácido atua no ajuste osmótico do genótipo Paulistão no estágio fenológico V5.

Prolina e Prolina+AS garantiram crescimento adequado do vegetal mesmo sob deficiência hídrica gerando ação positiva na TEA, TCA e MFT.

A atividade das enzimas SOD e APX foi reduzida com o uso dos atenuadores AS, Prolina e Prolina+AS, o que pode estar associado a ação não enzimática de remoção de EROs na cultura analisada.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, E. D. de; MELO, A. S. de; ROCHA, M. do S.; CARNEIRO, R. F.; ROCHA, M. de M. Genotypic variation on the antioxidative response of Cowpea cultivars exposed to osmotic stress. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 4, p. 928, 2017.

ARAÚJO, E. D. de; MELO, A. S. de; ROCHA, M.,do S.; CARNEIRO, R. F.; ROCHA, M. de M. Germination and initial growth of cowpea cultivars under osmotic stress and salicylic acid. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 1, p. 80-89, 2018.

BARBOSA, M. R.; MEDEIROS; SILVA, M.M de A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, 2014.

BASTOS, E. A.; RAMOS, H. M. M.; ANDRADRE JÚNIOR, A. S.; NASCIMENTO, F. N.; CARDOSO, M. J. Parâmetros fisiológicos e produtividade de grãos verdes do feijão-caupi sob déficit hídrico. **Water Resources and Irrigation Management**, v.1, n.1, p.31-37, 2012.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v.39, n.1, p.205-207, 1973.

BEKKA, S.; ABROUS-BELBACHIR, O.; DJEBBAR, R. Effects of exogenous proline on the physiological characteristics of *Triticum aestivum* L. and *Lens culinaris* Medik. under drought stress. **Acta agriculturae Slovenica**, v.111, n.2, p. 477-491, 2018

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 42 p.

BORSATTI, F. C. **Ácido salicílico na qualidade pós-colheita de frutos, hortaliças folhosas e flores**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

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

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

CAMARA, T. R.; WILLANO, L. I. L. I. A.; TORNÉ, A. M.; SANTOS, M. A. Efeito do estresse salino e da prolina exógena em calos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v 12, n 2, 146-155, 2000.

CARVALHO, M.; LINO-NETO, T.; ROSA, E.; CARNIDE, V. Cowpea: a legume crop for a challenging environment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.97: p.4273–4284, 2017.

CARVALHO, M., MATOS, M., CASTRO, I., MONTEIRO, E., ROSA, E., LINO-NETO, T.; CARNIDE, V. Screening of worldwide cowpea collection to drought tolerant at a germination stage. **Scientia Horticulturae**, v. 247, p. 107-115, 2019.

COELHO, J.; BARROS, M. D. F.; NETO, E. B.; SOUZA, E. R. de. Ponto de murcha permanente fisiológico e potencial osmótico de feijão caupi cultivado em solos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n.7, p.708–713, 2014.

COELHO, J.B.M.; NETO, E.B.; BARROS, M.D.F.C.; ALBUQUERQUE, E.R.G.M. de. Crescimento e Acúmulo de solutos Orgânicos no Feijão Vigna Submetido ao estresse salino. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 13, p. 242-256, 2018.

COELHO, D. S.; SIMÕES, W. L.; SALVIANO, A. M.; MESQUITA, A. C.; ALBERTO, K. D. C. Gas exchange and organic solutes in forage sorghum genotypes grown under different salinity levels. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 22, n 4, 231-236, 2018.

COLLI, S. Outros reguladores: brassinosteróides, poliaminas, ácidos jasmônico e salicílico. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 2 ed., cap. 14, p. 296-302.

CHEN, W.L., YANG, W.J., LO, H.F., YEH, D.M. Physiology, anatomy, and cell membrane thermostability selection of leafy radish (*Raphanus sativus* var. *Oleiformis* Pers.) with different tolerance under heat stress. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 367–375, 2014.

DAWOOD, M. G.; TAIE, H. A. A.; NASSAR, R. M. A.; ABDELHAMID, M. T., SCHIMIDHALTER, U. The changes induced in the physiological, biochemical and anatomical characteristics of *Vicia faba* by the exogenous application of proline under seawater stress. **South African Journal of Botany**, v.93, p.54–63, 2014.

DÍAZ-LÓPEZ, L. et al. *Jatropha curcas* seedlings show a water conservation strategy under drought conditions based on decreasing leaf growth and stomatal conductance. **Agricultural Water Management**, v.105, p.48-56, 2012.

DIDONET, A. D. Importância do período de pré-floração na produtividade do feijoeiro. Pesquisa **Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 4, p. 505-512, 2010.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

DUTRA, W. F.; MELO, A.S. de; SUASSUNA, J. F.; MAIA, J. M.; Dutra, A. F.; SILVA, D. C. .Antioxidative Responses of Cowpea Cultivars to Water Deficit and Salicylic Acid Treatment. **Agronomy Journal**, v.109, p.895-905, 2017.

DURANGO, D.; PULGARIN, N.; ECHEVERRI, F.; ESCOBAR, G.; QUIÑONES, W. Efeito do ácido salicílico e compostos estruturalmente relacionados no acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Moléculas**, v. 18, n. 9, p. 10609-10628, 2013.

FLOSS, E. L. **Fisiologia das plantas cultivadas**. Passo Fundo: UPF, 2004.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. A. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. p. 29-92.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S.; RODRIGUES, E. V. Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84p.

FREITAS, R.; DOMBROSKI, J. L. D.; FREITAS, F. C. L. D.; NOGUEIRA, N. W.; PINTO, J. R. D. S Physiological Responses of Cowpea Under Water Stress and Rewatering In No-Tillage And Conventional Tillage Systems. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 3, p. 559-567, 2017

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977

GONZALEZ, A.; BERMEJO, V.; GIMENO, B. S. Effect of different physiological traits on grain yield in barley grown under irrigated and terminal water deficit conditions. **Journal Agricultural Science**, v.148, p.319–328, 2010.

HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M. N.; WANI, A. S.; PICHTEL, J.; AHMAD, A. Role of proline under changing environments: a review. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 11, p. 1456-1466, 2012.

HEUER, B. Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. **Plant Science**, v. 165, n. 4, p. 693-699, 2003.

HOLZEROVÁ, E.; PROKISCH, H. Mitochondria: much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production?. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 63, p. 16-20, 2015.

IRIGOYEN, J. J.; EMERICH, D. W.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulatedalfafa (*Medicago sativa*) plants. **Physiologia Plantarum**, v.84, n.1, p.55-60, 1992.

KAHLAOUI B ., HACHICHA M ., TEIXEIRA J ., MISLE E ., FIDALGO F ., HANCHI B. Response of Two Tomato Cultivars to Field-applied Proline and Salt Stress. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, V. 9, n.3, 2013.

KANG, G.; LI, G.; GUO, T. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.36, n.9, p.2287-2297, 2014.

KHAN M.S.A, KARIM M.A, ABULLAH A.M, PARVEEN S, BAZZAZ M.M, HOSSAIN M.A. Plant water relations and proline accumulations in soybean under salt and water stress environment. **Journal Plant Science** v3 p. 272–278, 2015.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. **Plant physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

LEE, B. R.; ISLAM, M. T.; PARK, S. H.; JUNG, H. I.; BAE, D. W.; KIM, T. H. Characterization of salicylic acid-mediated modulation of the drought stress responses: Reactive oxygen species, proline, and redox state in *Brassica napus*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 157, p. 1-10, 2019.

MAZZUCHELLI, E. H. L., SOUZA, G. M., & PACHECO, A. C. Rustificação de mudas de eucalipto via aplicação de ácido salicílico. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 44, n.4, p. 443-450, 2014

MELO, F. B.; CARDOSO, M. J.; SALVIANO, A. A. C. Fertilidade do solo e adubação.

In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. Cap. 6. p. 229-242.

MERWAD, A. R. M.; DESOKY, E. S. M.; RADY, M. M. Response of water deficit stressed *Vigna unguiculata* performances to silicon, proline or methionine foliar application. **Scientia Horticulturae**, v.228, p.132-144, 2018

MORANDO, R.; SILVA, A.O. da; CARVALHO, L.C.; PINHEIRO, M.P.M.A. déficit hídrico: efeito sobre a cultura da soja. **Journal of Agronomic Sciences**, v.3, n. especial, p.114-129, 2014.

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

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplast. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n.5, p. 867-880, 1981.

NASCIMENTO, S. P.; BASTOS, E. A.; ARAÚJO, E. C. E.; FREIRE FILHO, F. R.; SILVA, E. M. Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão caupi. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 15, n. 8, p.853-860, 2011.

NAZAR, R.; IQBAL, N.; SYEED, S.; KHAN, N. A. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v.168, n.8, p. 807–815, 2011.

OLIVEIRA, A. R.; BRAGA, M. B.; WALKER, A. M. Comportamento vegetativo e qualidade tecnológica de cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao estresse hídrico em condições semiáridas do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, p. 525-541, 2015.

OLIVEIRA-NETO, C. F. DE; OLIVEIRA, T. B. DE; SILVA, K. R. S.; NOGUEIRA, G. A. DOS S.; MALTAROLO, B. M.; COSTA, T. C.; CARDOSO, K. P. S; SOUZA, L. C. SILVA, R. T. L. de, SIQUEIRA, J. A. M.da. Nitrogen compounds and enzyme activity in Young muruçi (*Byrsonima crassifolia* L.) plant subjected to water stress. **Australian Journal of Crop Science**, v.10, n.1, p. 111-117, 2016.

OLIVEIRA, M. G. de C.; OLIVEIRA, L. F. C. de; WENDLAND, A.; GUIMARÃES, C. M.; QUINTELA, E. D.; BARBOSA, F. R.; CARVALHO, M. da C. S.; LOBO JUNIOR, M.; SILVEIRA, P. M. da Conhecendo a fenologia do feijoeiro e seus aspectos fitotécnicos. Brasília, DF: **Embrapa**, 2018. 59 p. II.

PÁL, M.; KOVÁCS, V.; SZALAI, G.; SOÓS, V.; MA, X.; LIU, H.; MEI, H.; JANDA, T. Salicylic acid and abiotic stress responses in rice. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.200, n.1, p.1-11, 2014.

PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; REAKASEM, B.; HERRIDGE, D. F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. **Australian Centre for International Agricultural Research Canberra**, 1989. 76 p

PÚBLIO JÚNIOR, E. ; MORAIS, O. M.; ROCHA, M.M.; PÚBLIO, A. P.P. B. ;BANDEIRA, A. da S. Características agrônômicas de genótipos de feijão-caupi cultivados no sudoeste da Bahia. **Científica**, v.45, n.3, p.223-230, 2017.

QU, AI-LI; YAN-FEI D.; QIONG, J.; CHENG, Z. Molecular mechanisms of the plant heat stress response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 432, n. 2, p. 203-207, 2013.

RAI, V.K.; SHARMA, U.D. Amino acids can modulate ABA induced stomatal closure, stomatal resistance and K⁺ fluxes in *Vicia faba* leaves. **Beitr Biol Pflanzenphysiol**, v. 66, p.393-405. 1991.

REJEB, K. B.; ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 278-284, 2014.

ROCHA, M. E. L. (2018). **Ação do ácido salicílico nas características morfofisiológicas e bioquímicas em mudas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. e *Cedrela fissilis* VELL.** Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Paraná, p. 168. 2018.

RODRÍGUEZ, H.G.; ROBERTS, J.K.M.; JORDAN, W.R.; DREW, M.C. Growth, water relation, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. **Plant Physiology**, v.113, n.3, p.881-893, 1997

SÁ, F. V. DA S., DE LIMA, G. S., DOS SANTOS, J. B., GHEY, H. R., DOS ANJOS SOARES, L. A., CAVALCANTE, L. F.; DE PÁDUA SOUZA, L Growth and physiological aspects of Bell pepper (*Capsicum annuum*) under saline stress and exogenous application of proline. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 36, p. 1970-1976, 2016.

SABOYA, R.C.C.; BORGES, P.R.S.; SABOYA, L.M.F.; MONTEIRO, F.P.R.; SOUZA, S.E.A.; SANTOS, A.F.; SANTOS, E.R. Response of cowpea to inoculation with nitrogen- fixing strains in Gurupi-TO. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, p. 40-48, 2013.

SALEHI-LISAR, S. Y.; BAKHSHAYESHAN-AGDAM, H. Drought Stress in Plants: Causes, Consequences, and Tolerance. In.: HOSSAIN, M. A. et al. (Eds.). Drought Stress Tolerance in Plants: Physiology and Biochemistry. New York: **Springer International Publishing**, v. 1, cap.1, p. 1-16, 2016.

SANTOS, M. A.; CAMARA, T.; RODRIGUEZ, P.; CLAPAROLS, I.; TORNE, J. M. Influence of exogenous proline on embryogenic and organogenic maize callus subjected to salt stress. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 47, n. 1, p. 59-65, 1996.

SANTOS R.F.; CARLESSO R. Water deficit and morphologic and physiologic behavior of the plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2 p. 287- 294, 1998.

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

SIGNORELLI, S.; COITIÑO, E. L.; BORSANI, O.; MONZA, J. Molecular mechanisms for the reaction between •OH radicals and proline: insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 1, p. 37-47, 2013.

SILVA, L. C.; BELTERÃO, N. E. M.; AMORIM NETO, M. S. **Análise do Crescimento de Comunidades Vegetais**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2000. 18 p. (EMBRAPA Algodão. Circular técnica, 34).

SILVA, A. R. da; BEZERRA, F. M.; LACERDA, C. F. D.; MIRANDA, R. D. S.; MARQUES, E. C.; GOMES-FILHO, E. Organic solutes in *Coco nutpalm* seed lings under water and salt stresses. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 11, p. 1002-1007, Campina Grande, 2016.

SILVA, A. C. D., SUASSUNA, J. F., MELO, A. S. D., COSTA, R. R., ANDRADE, W. L. D., & SILVA, D. C. D. Salicylic acid as attenuator of drought stress on germination and initial development of sesame. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 156-162, 2017.

SILVA, A. C. da; VASCONCELOS, P. L. R. de; Melo, L. D. F. de A.; SILVA, V. S. G. da; JÚNIOR, J. L. D. A. M.; Santana, M. de B. Diagnóstico da produção de feijão-caupi no nordeste brasileiro. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 2, 2018.

SLAVICK, B. Methods of studying plant water relations. New York: Springer Verlong, 449p. 1974.

SOARES, F. C., PARIZI, A. R. C., DA SILVA, G. U., ESSI, R., RUSSI, J. L., BEN, L. H., & SANTOS, P. R. Irrigação suplementar na produção de grãos e na eficiência de uso da água da cultura do feijoeiro. **Agrarian**, v. 9, n. 34, p. 374-382, 201

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

SOUZA, J. S. DE; PINTO, L. A.; DE FREITAS, M. G.; FEITOSA, A. J. S.; SILVA, C. L. da; ALVAREZ-PIZARRO, J. C. Parâmetros morfológicos e fisiológicos de *Brachiaria brizantha* submetida ao déficit hídrico. **Acta Iguazu**, v.7, n.5 , p. 71-81, 2018.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Science**, v.161, n.3, p.613-619, 2001.

TAIZ, L. ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TRIPATHY, B. C.; OELMÜLLER, R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 12, p. 1621-1633, 2012.

VICENTE, M.R-S.; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 10, p. 3321-3338, 2011.

VILLA NOVA, N.A.; OMETTO, J.C. Adaptação e simplificação do método de Penman às condições climáticas do Estado de São Paulo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE HIDROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS, 4., Fortaleza, 1981. **Anais**. Fortaleza : Associação Brasileira de Recursos Hídricos, 1981. v.3., p.281-299.

YANCEY, PH. Organic osmolytes compatible metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stress. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 2819-2830, 2005.

ZHANG W, YU X, LI M, LANG D, ZHANG X, XIE Z. Silicon promotes growth and root yield of *Glycyrrhi zauralensis* under salt and drought stresses through enhancing osmotic adjustment and regulating antioxidant metabolism. **Crop Protection**, v. 107, n. January, p. 1–11, 2018.