LUCAS SANTOS LOPES

BIOREGULADORES VEGETAIS EM PLANTAS DE FEIJOEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa *Campus* Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

RIO PARANAÍBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

LUCAS SANTOS LOPES

BIORREGULADORES VEGETAIS EM PLANTAS DE FEIJOEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 06 de setembro de 2017.

Danúbia Aparecida Costa Nobre

Vinícius Ribeiro Faria

Geraldo Humberto Silva
(Coorientador)

Willian Rodrigues Macedo
(Orientador)

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca da Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Rio Paranaíba

T
L864r
2017

Lopes, Lucas Santos, 1991-
Biorreguladores vegetais em plantas de feijoeiro / Lucas Santos Lopes. –Rio Paranaíba, MG, 2017.
vi, 19f : il. ; 29 cm.

Orientador: Willian Rodrigues Macedo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Ácido salicílico. 2. Brassinolideo. 3. Biorreguladores. I. Universidade Federal de Viçosa. Campus UFV - Rio Paranaíba. Mestrado em Agronomia-Produção Vegetal (campus CRP). II. Título.

635.652

A Deus pela força e cada uma das bençõe concedidas ao longo desta caminhada.

Ao meu pai André e aos meus irmãos André Luiz e Antônio Augusto, pelo apoio e por cada um dos conselhos e ensinamentos ao longo desta jornada.

A toda a minha família por sempre me apoiarem e por cada ensinamento transmitido.

Ao professor Willian pela orientação, compreensão e amizade.

A cada um dos grandes amigos conquistados em Rio Paranaíba.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida, fé e também pela força em todos os momentos de ansiedade e cansaço.

Ao meu pai e meus irmãos, por estarem sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins durante toda a minha vida e por nunca permitirem que eu desistisse.

A minha avó, meus padrinhos e ao meu tio Uilson por cada um dos conselhos que me levaram à vitória.

A minha namorada Juliana por fazer parte desta jornada e sempre me apoiar.

Ao Professor Dr. Willian Rodrigues Macedo, por ter sido o maior companheiro ao longo deste mestrado, realizando um papel que foi além de orientador.

Aos meus grandes amigos e companheiros do mestrado.

A Universidade Federal de Viçosa – *Campus* de Rio Paranaíba e ao Programa de Pós – Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, pelo financiamento deste projeto de pesquisa (APQ – 02110-15).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, a qual possibilitou a realização deste.

Aos professores membros da banca Vinicius, Geraldo e Danúbia Aparecida Costa Nobre pela participação.

Aos três grandes amigos e companheiros de trabalho Paulo Henrique, Danilo e Bruno.

Ao grupo LAFIMEPRO pelo apoio, incentivo e participação na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO v
ABSTRACT vi
1. INTRODUÇÃO 1
2. MATERIAL E MÉTODOS 3
3. RESULTADOS 8
4. DISCUSSÃO 14
5. CONCLUSÕES 16
6. LITERATURA CITADA 17

RESUMO

LOPES, Lucas Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, setembro de 2017. **Bioreguladores vegetais em plantas de feijoeiro.** Orientador: Willian Rodrigues Macedo. Coorientador: Geraldo Humberto Silva.

Uma nova abordagem agrícola que vem ganhando destaque global para indução de tolerância aos estresses abióticos em vegetais refere-se à aplicação exógena de compostos reguladores do crescimento e desenvolvimento vegetal, os chamados biorreguladores. Objetivou-se avaliar o potencial uso de dois biorreguladores associados a três níveis de água no solo, como ativadores dos mecanismos de defesa em plantas de feijoeiro e atenuadores dos efeitos do estresse hídrico. Análises foram feitas na casa de vegetação e no Laboratório de Fisiologia e Metabolismo da Produção Vegetal (LAFIMEPRO) da Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba, no município de Rio Paranaíba. Análises de trocas gasosas: taxa de fotossíntese, condutância estomática; enzimas do metabolismo antioxidante, teor de proteína total solúvel, pigmentos fotossintetizantes, conteúdo relativo de água nas folhas e parâmetros biométricos foram avaliadas nesse experimento. Plantas submetidas à 60% de capacidade de campo (CC) apresentaram redução significativa em todos os pigmentos fotossintéticos analisados. A taxa fotossintética e a condutância estomática foram significativamente menores em plantas submetidas a 60% da capacidade de campo. O uso de BR e AS levaram as plantas em bom status hídrico a incrementarem as atividades das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), apesar de não apresentarem diferença significativa. Plantas submetidas à baixos níveis de água no solo, sem aplicação dos biorreguladores, expressaram maior atividade da CAT e APX. O AS e o BR, são alternativas para a indução da tolerância ao estresse hídrico em plantas de feijoeiro, pois eles têm o efeito de aumentar a concentração de enzimas que combatem este tipo de estresse.

ABSTRACT

LOPES, Lucas Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, September, 2017. **Plant bioregulators in common bean plants.** Willian Rodrigues Macedo. Co-adviser: Geraldo Humberto da Silva.

A recent and global approach which has been gaining prominence to induce tolerance to abiotic stress in plants refers to the application of plant growth regulators, the bioregulators. The objective of this study was to evaluate the potential use of two bioregulators associated to three irrigation levels, as activators of the defense mechanisms in common bean plants and attenuators of the effects of water stress. Analysis were made in the green house and in the Laboratório de Fisiologia e Metabolismo da Produção Vegetal (LAFIMEPRO) of the Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba, in the city of Rio Paranaíba. Analyzes of photosynthesis, stomatal conductance, antioxidant enzymes, total soluble protein, photosynthetic pigments, relative water content in leaves, were evaluated. Plants submitted to 60% of field capacity (CC) presented a significant reduction in all photosynthetic pigments analyzed. The photosynthetic rate and stomatal conductance were significantly lower in plants under conditions of 60% field capacity. The use of BR and AS led plants under 100% of field capacity to increase the activities of the catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) enzymes. Plants subjected to low levels of water, without application of bioregulators, expressed higher of CAT and APX activity. AS and BR are alternatives for the induction of water stress tolerance in common bean plants, since they have the effect of increasing the concentration of enzymes that combat this type of stress.

1. INTRODUÇÃO

Novas mudanças são necessárias ao agronegócio para atender as crescentes exigências por alimentos, energias renováveis e bens de consumo de origem agropecuária. Essa realidade exige incrementos na produção, em cerca de 2% ao ano, além de aperfeiçoamento no uso eficiente de nutrientes minerais e água pelas plantas ao longo dos próximos 8 anos (SPIERTZ; EWERT, 2009).

Os fatores abióticos têm influenciado negativamente o sucesso da agricultura, pois as condições ambientais adversas apresentam grande impacto sobre o crescimento e o desenvolvimento vegetal. O estresse hídrico apresenta grande amplitude de ocorrência nas áreas agrícolas do mundo (MUÑOZ-PEREA *et al.*, 2006), com efeitos mais intensos sobre a fotossíntese, o crescimento e a produtividade das plantas (ZLATEV; LIDON, 2012).

Os vegetais desenvolvem-se em ambientes com elevada e constante pressão natural. Esta condição, fez com que estes indivíduos sésseis desenvolvessem sofisticados mecanismos para suportar o estresse e, assim, sobreviver (HOPKINS; HÜNER, 2004). Dentre esses mecanismos, os hormônios vegetais participam ativamente como sinalizadores no crescimento, diferenciação e desenvolvimento das plantas (DAVIES, 1995). Eles destacam-se pela eficaz sinalização entre os diferentes órgãos vegetais, conferindo-lhes eficientes mecanismos de defesa.

Significativos progressos foram alcançados nos últimos anos, com relação aos conhecimentos de biossíntese, metabolismo e sinalização desses compostos (PELEG; BLUMWALD, 2011). Estes avanços científicos permitiram a descoberta de novas classes hormonais (brassinoesteróides, ácido salicílico, jasmonatos e estrigolactonas). Estes necessitam de melhor caracterização para que haja o completo entendimento nos processos metabólicos e fisiológicos dos vegetais, para a sua aplicação na agricultura.

Moléculas sintéticas com atividades similares aos hormônios foram desenvolvidas, os biorreguladores (CASTRO *et al.*, 2009). A utilização de biorreguladores vem aumentando na agricultura, devido à crescente evolução nas técnicas de cultivos. Os brassinoesteróides, e o ácido salicílico estão entre as novas classes hormonais já exploradas como potenciais biorreguladores para atenuação dos estresses vegetais. Eles têm apresentado significativos mecanismos de resposta em vegetais submetidos à estresse salino em solos (JAVID *et al*., 2011).

É possível caracterizar cada hormônio por sua biossíntese e resposta fisiológica. O brassinoesteróide é descrito como um composto esteroidal que tem sua síntese originada por uma ramificação na rota dos terpenos, assim como a giberelina, a citocinina e o ácido abscísico (TAIZ; ZEIGER, 2009). Este composto tem como principais efeitos fisiológicos: o alongamento do caule, inibição do crescimento radicular, aumento na absorção de nutrientes, diferenciação dos vasos do xilema, promoção da germinação, redução no abortamento, queda de frutos, indução da senescência, síntese de etileno e estimulação da resistência ao frio, doenças, herbicidas e estresse salino (ASHRAF *et al.,* 2010).

O ácido salicílico pode ser definido como uma molécula vegetal sintetizada a partir do ácido trans-cinâmico, via rota dos fenilpropanóides. Ele está diretamente relacionado com mecanismos de defesa do vegetal, mas também possui características de inibição da síntese de etileno e redução da germinação em sementes e transpiração foliar (RASKIN, 1995). Este biorregulador altera o conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e massa seca radicular e da parte aérea (KAYDAN *et al.* 2007) e estimula o acúmulo de osmorreguladores, como a prolina e a glicina (MISRA; SAXENA, 2009).

O uso do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) foi devido ao grande interesse social e econômico, principalmente, aos pequenos e médios agricultores. Esta é uma espécie sensível às intempéries ambientais, como a deficiência e o excesso hídrico no solo (SOUZA; LIMA, 2012). A produtividade média dos maiores produtores brasileiros é de 1.900 $kg.ha^{-1}$ (CONAB, 2012), valor considerado baixo se comparado ao rendimento médio de 2.700 kg $há^{-1}$, de produtores de Minas Gerais, obtidos na safra de verão de 2012 (CONAB, 2012).

Logo, o emprego dos biorreguladores é de grande importância como atenuante de situações estressoras em sistemas de produção agrícola. O presente trabalho objetivou caracterizar o efeito interativo dos biorreguladores 2,4-epibrassinolídeo e ácido salicílico com diferentes níveis de condições hídricas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições experimentais e de crescimento de plantas

O experimento, realizado entre os meses de fevereiro e abril, foi conduzido em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa – *Campus* de Rio Paranaíba. Durante a condução do experimento, antes da imposição do estresse, as plantas foram cultivadas em solos com aproximadamente 90% da capacidade de campo, condição em que as plantas não se encontravam sob estresse. As temperaturas mínima e máxima apresentadas durante o experimento foram de 21 e 38 °C, respectivamente.

A capacidade de campo foi determinada em laboratório através do método proposto por Fernandes & Syke (1968). Uma amostra de solo foi adicionada no fundo de uma proveta de 1000 mL contendo um pequeno orifício no fundo, coberto com papel toalha, para permitir a passagem de ar. A amostra de solo seco em estufa por 48h a 72 °C peneirada, foi adicionada até aproximadamente a altura de 50 cm da proveta. Foram adicionados 100 mL de água destilada, e coberto com um plástico filme para evitar a perda por evaporação. Após 48 horas, foi retirada uma camada superficial de 2 cm de profundidade e descartada, e assim coletada uma amostra de 5 a 7 cm de profundidade para posterior aferição da umidade. O peso da amostra posteriormente seca multiplicado por 100, foi dividido pelo peso dessa mesma amostra de solo ainda úmida, obtendo-se assim a capacidade de campo do solo, sendo expresso em porcentagem (%).

A semeadura foi feita em vasos plásticos com capacidade para 5 dm^3, com solo adubado segundo as recomendações Foi utilizado um latossolo argiloso, com as seguintes características químicas: Matéria Orgânica: 22 g dm^{-3}; P: 11,0 mg dm^{-3}; K: 1,2 mmol dm^{-3}; Ca: 18 mmol dm^{-3}; Mg: 5,3 mmolc dm^{-3}; pH 5,3. Foram utilizadas 6 sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca) por vaso, com realização de desbaste 14 dias após a semeadura (DAS), mantendo-se duas plântulas homogêneas por vaso.

Os vasos foram irrigados e mantidos na capacidade de campo em todos os tratamentos durante as fases iniciais de desenvolvimento da cultura. O estresse hídrico foi imposto durante 8 dias, quando as plantas já alcançaram o estádio fenológico R5 de desenvolvimento.

2.2 Imposição dos tratamentos

O tratamento hídrico foi constituído de três níveis: 60%, 80% e 100% da capacidade de campo. A umidade do solo foi controlada diariamente durante a imposição do estresse, quantificando a perda de água através da pesagem de cada vaso e adicionando-se a quantidade de água perdida.

A aplicação foliar dos biorreguladores 24-epibrassinolídeo (24-epiBL) e ácido salicílico (AS), adicionados à 0,1% do surfactante Tween-20®, foi realizada nos primeiro e terceiro dias (51 e 53 dias após a semeadura), concomitante ao início do estresse hídrico. A aplicação foliar é o modo mais efetivo para promover as respostas de crescimento, ou mediar os diferentes processos fisiológicos vegetais sob condições de estresse (ASHRAF *et al.*,2010).

No sétimo dia de imposição do estresse, foram realizadas as coletas das folhas de cada um dos tratamentos, as mesmas foram acondicionadas em caixa de isopor e levadas imediatamente para o laboratório para realização das análises bioquímicas.

2.3 Análises Bioquímicas

Em laboratório, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz de porcelana, para obtenção do extrato proteico (PEIXOTO *et al.*, 1999). Este extrato foi utilizado posteriormente para análise da proteína total solúvel (PTS), atividade de superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT). Estas amostras vegetais foram utilizadas ainda para a quantificação dos pigmentos fotossintéticos.

Para a determinação dos teores de proteínas totais solúveis (PTS) foliares, foi feito uso da metodologia descrita por Bradford (1976). A reação foi preparada com 20 µL do extrato proteico, somado a 1,0 mL de reagente de Bradford, pronto para uso (LGC Biotecnologia, Cotia, SP). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm, e a concentração de PTS foi calculada a partir da curva padrão preparada com albumina de soro bovino (BSA). Os resultados obtidos foram expressos em mg PTS g^{-1} de matéria fresca.

A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela adição de 50 µL do extrato proteico em uma solução contendo 23 mM de metionina, 75 µM de p-nitroblue tetrazolium (NBT), 100 nM EDTA e 2 µM de riboflavina em 50 mM de tampão fosfato de sódio a pH 7,8 (DEL LONGO *et al.*, 1993). A reação ocorreu em câmara sob iluminação controlada, coberta com papel alumínio e mantida a 25 °C. A

reação teve início com o acendimento da lâmpada e finalizou 5 minutos depois, com o desligamento da mesma (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A redução do NBT foi determinada através de leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm. O branco apresenta a mesma composição, porém foi mantido no escuro. Uma unidade enzimática (U) da atividade da superóxido dismutase foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% da inibição da razão de redução do nitroblue tetrazolium medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm.

A atividade de ascorbato peroxidase (APX) foi determinada conforme o método descrito por Nakano e Asada (1981). A mistura da reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 80 mM pH 7,0; ascorbato (5mM); EDTA (1mM); H_2O_2 (1mM) e extrato vegetal. A atividade foi determinada pela degradação do peróxido de hidrogênio durante um minuto, por alterações na absorbância a 290nm. A mistura de reação contendo tampão fosfato, ascorbato e EDTA permaneceu em banho-maria a 30 °C e o peróxido de hidrogênio foi adicionado somente no início da leitura em espectrofotômetro.

A atividade de catalase (CAT) foi determinada conforme Peixoto *et al.* (1999) pela adição de 100 µL do extrato proteico, em 2,9 mL de uma solução contendo 12,5 mM H_2O_2 e 50mM de tampão fosfato de potássio, em pH 7,0, com medições na diminuição da absorbância a 240 nm, em espectrofotômetro, a 30 °C. A atividade da enzima foi calculada através do coeficiente de extinção molar de 36 M^{-1} cm^{-1}.

2.4 Análise de Pigmentos Foliares

Para avaliação do conteúdo de pigmentos, foi utilizada a metodologia de extração com uso de solvente (80% acetona), modificado de acordo com (MACEDO *et al*, 2013), sem o processo de maceração dos tecidos vegetais.

A leitura foi feita em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645, 652 e 663 nm para as clorofilas a, b e total (WITHAM *et al.*, 1971), e de 470 nm para os carotenóides (LICHTENTHALER; WELLBURN, 1983). As leituras foram aplicadas nas seguintes fórmulas:

$$Clorofila\ a = [(12{,}7 * A_{663} - \ 2{,}69 * A_{645}) * \frac{V}{1000 * W}$$

$$Clorofila\ b = [(22{,}9 * A_{645} - \ 4{,}68 * A_{663}) * \frac{V}{1000 * W}$$

$$Clorofila\ total = [(20{,}2 * A_{645} + \ 8{,}02 * A_{663}) * \frac{V}{1000 * W}$$

$$Carotenóides = \frac{[(1000 * A_{470} - \ 3{,}27 * Cl\ a - 104 * Cl\ b)/229]}{1000 * W}$$

Os resultados foram expressos em miligrama do pigmento por grama de peso fresco de tecido foliar (mg g^{-1}).

2.5 Análises Biométricas

A contagem do número de nós e de botões florais foi realizada no sexto dia após a imposição do estresse. Foi feita a contagem do número total de nós e número de botões em duas plantas de cada vaso e utilizada a média de cada vaso para a posterior análise.

O conteúdo relativo de água (CRA) das folhas foi aferido coletando-se amostras de tamanho padrão (4cm x 4cm), das folhas do terço médio superior de cada vaso. Estas amostras foram pesadas individualmente para obtenção do peso fresco (PF). Logo após a obtenção do peso fresco, as amostras foram colocadas em água durante 24 horas e pesadas novamente para a obtenção do peso úmido (PU). Por fim, as amostras foram levadas para estufa de circulação forçada de ar por 72 horas a 70 °C e posteriormente pesadas para obtenção do peso seco (PS). Os valores foram expressos em percentagem, onde foi feito o calculo do CRA a partir da formula:

$$CRA = \frac{\mathrm{PF} - \mathrm{PS}}{\mathrm{PU} - \mathrm{PS}}\ x\ 100$$

2.5 Determinação de trocas gasosas

A leitura de trocas gasosas foi realizada utilizando-se o IRGA (Infra-red Gas Analyzer) no quinto dia após a imposição do estresse. Foram gerados dados referentes à Fotossíntese (Photo), Condutância estomática (g_s), Transpiração (E) e Concentração intercelular de CO_2 (C_I), com auxílio de um sistema de trocas gasosas portátil (LI-6400XT; LI-COR Inc., Lincoln, NE, EUA) equipado com um fluorímetro modulado (LCF-40 LI-COR Inc.). Com saturação de radiação fotossinteticamente ativa (Q) de 1200 μmol m^{-2} s^{-1}e o fluxo de ar de 300 μmol s^{-1}.

As leituras foram realizadas dentro da casa de vegetação no período de 9 às 11 horas da manhã, em dia com alta incidência solar, permitindo assim que as plantas estivessem em condições de máxima taxa fotossintética.

2.6 Análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, em fatorial 3x3 com 4 repetições, constituído por três aplicações de reguladores vegetais (ácido salicílico, 24-epibrassinolídeo e água) e três níveis de umidade no solo (60, 80 e 100% da CC), com 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância para comparar o efeito dos níveis de água no solo, utilizando-se a análise de regressão, e para avaliar os reguladores vegetais utilizamos o teste *t* (LSD). As análises foram realizadas no Software R.

3. RESULTADOS

Durante o experimento não houve interação significativa entre os tratamentos de umidade com a utilização dos biorreguladores. Dentro dos níveis de água (60, 80 e 100%) observamos que não houve influencia dos biorreguladores, porém quando as plantas se encontravam na condição hídrica ideal (100%) o uso de BR e AS expressaram maior síntese de clorofila a. A análise dos níveis de água mostram que o aumento do status hídrico, levou ao incremento do conteúdo de clorofila a. (**Tabela 1**).

Tabela 1. Valores médios de clorofila A, 7 dias após a imposição de estresse, nos diferentes níveis de umidade (CC), combinados com a aplicação de biorreguladores.

Clorofila a (mg g^{-1} MF)				
	60	80	100	Média
H2O	1,74	1,879	1,689	1,769 A
BR	1,292	1,737	1,704	1,578 A
AS	1,421	1,791	2,023	1,745 A
Média	1,484 b	1,802 a	1,805 a	
CV	10,91%			

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas referem-se à análise dentro dos níveis de água e as letras maiúsculas referem-se à análise dentro dos tratamentos.

Para clorofila b, não observamos interação dos tratamentos, porém ao avaliarmos os fatores isolados, verificou-se que foi significativo o efeito dos níveis de água sobre essa variável, onde o aumento do conteúdo de água no solo, incrementou o conteúdo de clorofila b (**Tabela 2**).

Tabela 2. Valores médios de Clorofila B, 7 dias após a imposição de estresse, nos diferentes níveis de umidade impostos às plantas de feijão, em diferentes níveis de capacidade de campo (CC).

Clorofila b (mg g^{-1} MF)				
	60	80	100	Média
H2O	0,6	0,621	0,57	0,597 A
BR	0,44	0,541	0,567	0,581 B
AS	0,475	0,595	0,673	0,516 AB
Média	0,505 b	0,586 a	0,603 a	
CV	11,40%			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo test Tukey ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas referem-se à análise dentro dos níveis de água e as letras maiúsculas referem-se à análise dentro dos tratamentos.

Com relação à análise de clorofila total não houve efeito significativo da interação entre níveis de água e o uso dos biorreguladores, porém plantas em condições de 60% de CC tratadas com BR e AS apresentaram uma redução na quantidade de clorofila total, quando comparadas com as plantas do tratamento controle, e assim como ocorreu com o conteúdo de clorofila a, foi perceptível o incremento de pigmentos com o uso de BR e AS, quando se elevou gradativamente o conteúdo de água no solo (**Tabela 3**).

Tabela 3. Valores médios de clorofila total, 7 dias após a imposição de estresse, nos diferentes níveis de umidade (CC), combinados com a aplicação de biorreguladores.

Clorofila total (mg g^{-1} MF)				
	60	80	100	Média
H2O	2,34	2,501	2,259	2,367 A
BR	1,733	2,278	2,271	2,094 A
AS	1,896	2,386	2,696	2,326 A
Média	1,990 b	2,388 a	2,409 a	
CV	11,04%			

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas referem-se à análise dentro dos níveis de água e as letras maiúsculas referem-se à análise dentro dos tratamentos.

Apesar de não haver uma interação significativa entre os níveis de água e o uso dos biorreguladores, as plantas submetidas a 100% da capacidade de campo,

combinadas com a aplicação de AS, concentraram maior quantidade de carotenoides quando comparadas com as plantas tratadas com BR e H_2O. De modo que o incremento do status hídrico do solo também elevou o conteúdo de carotenoides nos tecidos foliares (**Tabela 4**).

Tabela 4. Valores médios de Carotenóides 7 dias após a imposição de estresse, nos diferentes níveis de umidade (CC), combinados com a aplicação de biorreguladores.

Carotenóides (mg g^{-1} MF)				
	60	80	100	Média
H2O	0,062	0,063	0,059	0,062 AB
BR	0,048	0,06	0,057	0,055 B
AS	0,054	0,063	0,071	0,062 A
Média	0,055 b	0,062 a	0,062 a	
CV	9,08%			

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna ou linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo test Tukey ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas referem-se à análise dentro dos níveis de água e as letras maiúsculas referem-se à análise dentro dos tratamentos.

Com relação a análise de conteúdo relativo de água do tecido foliar, não observamos interação significativa do conteúdo de água e o uso de biorreguladores, mas verificamos um incremento no conteúdo de água foliar, quando se forneceu o aumento gradativo de água ao substrato, sendo que o tratamento de 80% de CC, foi aquele que mostrou-se mais adequado para a regulação do status hídrico foliar, possivelmente por manter uma transpiração mais satisfatória (**Tabela 5**).

Tabela 5. Valores médios do conteúdo relativo de água (CRA), 7 dias após a imposição de estresse**,** em diferentes níveis de capacidade de campo (CC).

CRA (%)				
	60	80	100	Média
H2O	47,226	64,103	79,542	63,624 A
BR	69,389	88,411	70,574	76,125 A
AS	56,673	85,625	66,531	69,610 A
Média	57,763 b	79,380 a	72,216 ab	
CV	22,57%			

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna ou linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas referem-se à análise dentro dos níveis de água e as letras maiúsculas referem-se à análise dentro dos tratamentos.

Para as variáveis de trocas gasosas, não constatamos efeito da interação dos tratamentos conteúdo de água e biorreguladores, mas observamos efeito significativo dos níveis de água sobre esses parâmetros. Para a taxa fotossíntética, à medida que se reduziu a quantidade de água disponível para a planta, ocorreu uma diminuição da taxa fotossintética (**Tabela 6**).

Tabela 6. Valores médios de taxa fotossintética (*A*), 6 dias após a imposição de estresse, em diferentes níveis de capacidade de campo (CC).

Taxa fotossintética ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)				
	60	80	100	
H2O	2,411	12,912	12,704	9,342 A
BR	5,124	17,382	16,405	12,970 A
AS	3,781	13,468	16,865	11,371 A
	3,772 b	14,588 a	15,324 a	
CV	40,57%			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas referem-se à análise dentro dos níveis de água e as letras maiúsculas referem-se à análise dentro dos tratamentos.

Para a variável condutância estomática (*gs*) notou-se uma resposta similar ao de fotossíntese, onde a redução do nível de água no solo, levou a diminuições na condutância estomática (**Tabela 7**).

Tabela 7. Valores médios de condutância estomática (*gs*) 6 dias após a imposição de estresse, em diferentes níveis de capacidade de campo (CC).

Gs (mmol m-^{2} s^{-1})				
	60	80	100	Média
H2O	0,015	0,149	0,181	0,115 A
BR	0,04	0,171	0,177	0,129 A
AS	0,048	0,118	0,179	0,115 A
Média	0,034b	0,146 a	0,179 a	
CV	45,63%			

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna ou linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas referem-se à análise dentro dos níveis de água e as letras maiúsculas referem-se à análise dentro dos tratamentos.

Ao avaliar o efeito dos tratamentos, níveis de água e biorreguladores, verificou-se um efeito positivo da interação sobre o metabolismo antioxidante, sendo que as plantas bem hidratadas e sem a aplicação de biorreguladores apresentaram baixos níveis de catalase (**Tabela 09**) e ascobarto peroxidase (**Tabela 10**).

O uso de BR levou as plantas sob bom status hídrico a incrementarem as atividades da catalase. Verificamos que o aumento dos níveis de água para os tratamentos controle e BR, apresentram um efeito decrescente (**Tabela 09**), enquanto para o AS esse efeito foi menor na condição de 80% (**Tabela 10**).

Tabela 09. Valores médios de Catalase 6 dias após a imposição de estresse, nos diferentes níveis de umidade (CC), combinados com a aplicação de biorreguladores.

Catalase (µmol min^{-1} mg^{-1} proteína)				
	60	80	100	Média
H2O	1,41	1,312	0,887	1,203 A
BR	1,095	1,29	1,327	1,237 A
AS	1,375	1,327	1,375	1,359 A
Média	1,31 a	1,293 a	1,196 a	
CV	23,34%			

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna ou linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas referem-se à análise dentro dos níveis de água e as letras maiúsculas referem-se à análise dentro dos tratamentos.

Tabela 10. Valores médios de Ascorbato Peroxidase 6 dias após a imposição de estresse, nos diferentes níveis de umidade (CC), combinados com a aplicação de biorreguladores.

Ascobarto peroxidase (µmol min^{-1} mg^{-1} proteína)				
	60	80	100	Média
H2O	0,262	0,297	0,132	0,230 A
BR	0,367	0,27	0,237	0,291 A
AS	0,31	0,202	0,29	0,267 A
Média	0,313 a	0,256 ab	0,220 b	
CV	27,75%			

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna ou linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas referem-se à análise dentro dos níveis de água e as letras maiúsculas referem-se à análise dentro dos tratamentos.

Para o número de botões florais, não constatamos efeito da interação dos tratamentos, somente os níveis de água apresentaram efeito sobre essa variável, onde o aumento no nível do conteúdo de água no solo, levou ao incremento na quantidade de botões fixados nas plantas (**Tabela 11**). Apesar de não apresentar efeito significativo, foi possível notar que a aplicação de AS e BR aumentaram a quantidade de botões fixados nas plantas (**Tabela 11**).

Tabela 11. Valores médios de botões florais 6 dias após a imposição de estresse, nos diferentes níveis de umidade (CC).

Número de Botões Florais por Planta				
	60	80	100	Média
H2O	6,00	8,00	8,50	7,5 A
BR	6,50	8,25	9,50	8,08 A
AS	8,25	9,25	9,00	8,83 A
Média	6,9 a	8,5 a	9,0 a	
CV	28,50%			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Letras minúsculas referem-se à análise dentro dos níveis de água e as letras maiúsculas referem-se à análise dentro dos tratamentos.

4. DISCUSSÃO

A redução dos pigmentos fotossintetizantes em plantas submetidas às condições de déficit hídrico pode ser explicada pela rápida degradação devido à baixa disponibilidade de água (KIANI et al., 2008). Esta degradação ocorre devido ao aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio que danificam e reduzem a funcionalidade dos cloroplastos (REDDY et al., 2004). Em condições de 100% da CC de campo, os biorreguladores tiveram efeito no aumento dos pigmentos fotossintetizantes, enquanto em condições de 60% de CC, eles reduziram a concentração de pigmentos. O aumento das concentrações de enzimas antioxidantes pode explicar a maior concentração de pigmentos fotossintéticos, pois eles combatem as espécies reativas de oxigênio. A redução da concentração dos pigmentos, pode ser atribuída ainda a uma maior taxa de degradação da clorofila combinada a uma redução na biossíntese da mesma, como demonstrado em trigo por NIKOLAEVA (2010).

A aplicação de AS provocou um aumento na quantidade de carotenoides das plantas submetidas a 100% da CC. Apesar de não apresentar efeito significativo, foi possível notar que a utilização dos biorreguladores AS e BR levaram ao aumento da fotossíntese.

A reposta das plantas com relação aos parâmetros de trocas gasosas foi um reflexo da disponibilidade de água para as mesmas. Foi observado que quanto maior a disponibilidade de água no solo, maior foi o conteúdo relativo de águas nas folhas, maior a taxa fotossintética, maior condutância estomática e maior transpiração foliar.

Em condições de déficit hídrico, há o acumulo de espécies reativas de oxigênios (ROS) que são responsáveis por causarem danos extensivos nas plantas, incluindo a peroxidação lipídica, degradação da clorofila e perda de atividade fotossintética e integridade da membrana (RIVAS-SAN & PLASCENCIA, 2011).

Em condições de baixa disponibilidade de água, as plantas tiveram uma redução na taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração. Este resultado pode ser explicado pelo fechamento estomático, que ao ser realizado reduz a entrada de CO_2 e evita perdas de água. A partir do momento em que a planta fecha os estômatos, ela reduz ou até mesmo deixa de realizar fotossíntese. As plantas com maior disponibilidade de água tiveram maiores taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração, que pode ser explicado pelo aumento da turgescência celular e consequente abertura estomática.

Para o número de botões florais, constatamos que o aumento na umidade do solo, levou ao incremento linear na quantidade de botões fixados nas plantas. Este resultado era esperado, pois a falta de água durante o período de florescimento pode causar o abortamento das flores. A falta de água durante o período de floração causa o abortamento de flores, devido a uma competição fonte-dreno, ocorrendo a eliminação de flores anormais, por falta de nitrogênio ou carboidratos (HOSTALÁCIO & VALIO, 1984). Não houve efeito significativo no uso de biorreguladores.

Neste estudo, não observou-se efeito significativo para o conteúdo de PTS e de SOD, quando as plantas foram submetidas a diferentes níveis de água ou diferentes reguladores vegetais, porém a aplicação de AS e BR provocou um aumento nas concentrações de CAT e APX em condições de 100% de CC, indicando que o aumento das espécies reativas de oxigênio simples (O_2) excedem a produção e atuação da enzima SOD. Este fato pode ser explicado pela forma em que a SOD atua, onde ela reduz o O_2 molecular a O^-_2 seguida pela dismutação espontânea ou catalisada de O^-_2 a H_2O_2 (RESENDE *et al,* 2003).

É possível notar que, quando tratadas com BR e AS em condições de 100% da CC, houve aumentos nas concentrações de CAT e APX. Isto mostra que a utilização destes biorreguladores ativaram a produção destas enzimas mesmo em condições de boa disponibilidade de água.

Ao analisarmos a utilização de biorreguladores de forma isolada, foi possível notar que a média das enzimas antioxidantes foi maior onde houve a utilização do AS e BR em relação ao tratamento controle.

5. CONCLUSÕES

Os bioreguladores podem ser uma alternativa para a mitigação do estresse hídrico em feijoeiro, uma vez que eles aumentam a produção de enzimas antioxidantes mesmo em condições de boa disponibilidade de água. A restrição de água afeta todo o metabolismo de crescimento, desenvolvimento e defesa do feijoeiro.

6. LITERATURA CITADA

ASHRAF, M.; AKRAM, N. A.; ARTECA, R. N.; FOOLAD, M. R. The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plants process and salt tolerance. Crit Rev Plant Sci. 29:162-190, 2010.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72:248-254, 1976.

CASTRO, P. R. C.; SERCILOTO, C. M.; PEREIRA, M. A.; RODRIGUES, J. L. M.; ROSSI, G. Agroquímicos de controle hormonal, fosfitos e potencial de aplicação dos aminoácidos na agricultura tropical. ESALQ-Divisão de biblioteca e documentação: Piracicaba, 2009. 83p.

CONAB. Séries históricas – produtividade feijão, 2017. Acesso em: http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos

DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: DAVIES, P. J. (Ed.). Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology (2ª ed.). Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1995. p.1-12.

DEL LONGO, O. T.; GONZÁLEZ, C. A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. Plant Cell Physiol, 34:1023-1028, 1993.

FERNANDES, B.; SYKES, D.J. Capacidade de campo e retenção de água em três solos de Minas Gerais. R. Ceres, 15:1-39, 1968.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência & Agrotecnologia, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez., 2011.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol, 59:309-314, 1977.

HOPKINS, W. G.; HÜNER, N. P. A. Introduction to Plant Physiology, 3rd edition. New York :John Wiley & Sons, Inc., p559 2004..

HOSTALACIO, S.; VALIO, I.F.M. Desenvolvimento dos frutos de feijão em diferentes regimes de irrigação. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.19, n.1, p.53-57, 1984.

JAVID, M. G.; SOROOSHZADEH, A.; MORADI, F.; SANAVY, S. A. M. M.; ALLAHDADI, I. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. Aust J Crop Sci. 5: 726:734, 2011.

KAYDAN, D.; YAĞMUR, M.; OKUT, N. Effects of salycilic acid on the growth and some physiological characters in salt stresses wheat (*Triticum aestivum* L.). Tarim Bilimeri Dergisi. 13:114-119, 2007.

KIANI, S.P.; P. MAURY, A. SARRAFI.; P. GRIEU. QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus L.*) under well-watered and water-stressed conditions. Plant Sci. 175: 565–573, 2008.

LARQUÉ, S. A.; MARTIN, M. R. Effects of salicylic acid on bioproductivity of plants. In: Hayat S , Ahmad A (Eds) Salicylic acid: a plant hormone, Springer, Dordrecth. pp. 15-23, 2007.

LICHTENTHALER, H.; WELLBURN, A. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions, n. 603, 1983, p. 591-592.

MACEDO, W. R.; ARAUJO, D. K. ; Unravelling the physiologic and metabolic action of thiamethoxam on rice plants. Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 107, p. 244-249, 2013.

MISRA, N.; SAXENA, P. Effect of salicylic acid on proline metabolism in tentil grown under salinity stress. Plant Science. 177:181-189, 2009.

MUNDSTOCK C. M.; THOMAS; A. L. Soja – Fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos. Catalogação Internacional na Publicação: Evangraf 31p, 2005.

MUÑOZ-PEREA, C. G.; TERÁN, H.; ALLEN, R. G.; WRIGHT, J. L.; WESTERMANN, D. T.; SINGH, S. P. Selection for drought resistence in dry bean landraces and cultivars. Crop Science. 46:2111-2120, 2006.

NAKANO, Y. AND ASADA, K Hydrogen Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. Plant and Cell Physiology, 22:867-880, 1981.

NIKOLAEVA, M. K.; MAEVSKAYA, S. N.; SHUGAEV, A. G.; BUKHOV, N. G. Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. Russian Journal of Plant Physiology, 57: 87-95, 2010.

OLIVEIRA, A. D.; FERNANDES, E. J.; RODRIGUES, T. J. D. Condutância estomática como indicador de estresse hídrico em feijão. Eng Agríc. 25:86-95, 2005.

PACHECO, A.C.; CABRAL, C. S.; ALEMAN, E. S. F. C. C. Salicylic acid-induced changes to growth, flowering and flavonoids production in marigold plants.. Journal of Medicinal Plant Research, v. 7, p. 3158-3163, 2013.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation ando n the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. Rev Bras Fisiol Veg. 11:137-143, 1999.

PELEG, Z; BLUMWALD, E. Hormone balance and abiotic stress tolerane in crop plants. Curr Opin Plant Biol. 14:290-295, 2011.

RASKIN, I.; DAVIES, P. J. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology (2ª ed.). Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. p.188-205, 1995.

REDDY, A.R.; K.V. CHAITANYA; M. VIVEKANANDAN. Droughtinduced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. J. Plant Physiol., 161: 1189–1202, 2004.

RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. Fitopatologia Brasileira 28:123-130. 2003.

RIVAS, S. V. M., PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. J. Exp. Bot. 62:3321–3338, 2011.

SCOPEL, W.; BARBOSA, J. Z.; VIEIRA, L. M. Extração de pigmentos foliares em plantas de canola. Unoesc & Ciência – ACET. 2:87-94, 2011.

SOUZA, M. A.; LIMA, M. D. B. Índice de área foliar e produtividade do feijoeiro sob estresse hídrico e profundidade de incorporação do adubo. Gl Sci Technol. 5:45-55, 2012.

SPIERTZ, J. H. J.; EWERT, F. Crop production and resource use to meet the growing demand for food, feed and fuel: opportunities and constraints. NJAS. 56:281-300, 2009.

TAIZ, L; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Tradução: SANTARÉM, E.R. [*et al.*]. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 848 p., 2009.

WITHAM, F. H.; BLAYDES, D. F.; DEVLIN, R. M. Experiments in Plant Physiology. New York: D. Van Nostrand Company, p. 55-58, 1971.

ZLATEV, Z.; LIDON, F. C. An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. Emir J Food Agric. 24:57-72, 2012.