

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

**ALTERAÇÕES NA FISIOLOGIA DE PLANTAS DE
FEIJOEIRO CRIoulos COMO INDICADORES DE
VULNERABILIDADE AO DÉFICIT HÍDRICO E AO
AUMENTO DE TEMPERATURA DO AMBIENTE DE
CRESCIMENTO**

Autora: Daniela Silva Ataidés
Orientador: Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho

RIO VERDE – GO
DEZEMBRO– 2018

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

**ALTERAÇÕES NA FISIOLÓGIA DE PLANTAS DE
FEIJOEIRO CRIoulos COMO INDICADORES DE
VULNERABILIDADE AO DÉFICIT HÍDRICO E AO
AUMENTO DE TEMPERATURA DO AMBIENTE DE
CRESCIMENTO**

Autora: Daniela Silva Ataiides
Orientador: Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Conservação dos Recursos Naturais.

RIO VERDE – GO
DEZEMBRO – 2018

ATAÍDES, Daniela Silva, VASCONCELOS FILHO, Sebastião Carvalho, COSTA, Alan Carlos. **Alterações na fisiologia de plantas de feijoeiro crioulos como indicadores de vulnerabilidade ao déficit hídrico e ao aumento de temperatura do ambiente de crescimento**, 2018. 51 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) – Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2018.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A862a	<p>Ataídes, Daniela Silva.</p> <p>Alterações na fisiologia de plantas de feijoeiro crioulos como indicadores de vulnerabilidade ao déficit hídrico e ao aumento de temperatura do ambiente de crescimento / Daniela Silva Ataídes, 2018.</p> <p>51 f. : il., color.</p> <p>Orientador: Prof^o. Dr^o. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho</p> <p>Co-Orientador: Prof^o Dr^o. Alan Carlos Costa</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano – IFGoiano, Mestrado em Biodiversidade e Conservação, Campus Rio Verde, 2019.</p> <p>Inclui índice de tabelas e figuras.</p> <p>1. Estresses Abióticos. 2. Fotossíntese. 3. Enzimas Antioxidantes. 4. Feijão. I. Título. II. Vasconcelos Filho, Sebastião Carvalho. III. Costa, Alan Carlos. IV. Instituto Federal Goiano - IFGoiano.</p> <p>CDU - 633.35</p>
-------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Catalogação na fonte: Bibliotecária Mariana Oliveira Soldera – CRB1/3100

All rights reserved.

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.

A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO


ALTERAÇÕES NA FISIOLOGIA DE PLANTAS DE
FEIJOEIROS CRIoulos COMO INDICADORES DE
VULNERABILIDADE AO DÉFICIT HÍDRICO E AO
AUMENTO DA TEMPERATURA NO AMBIENTE DE
CRESCIMENTO

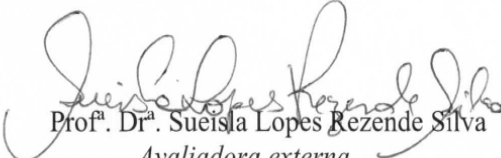
Autora: Daniela Silva Ataídes

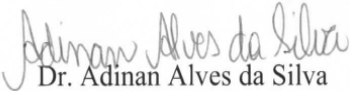
Orientador: Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho

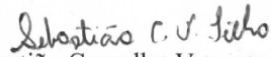
TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação – Área de
concentração Conservação dos Recursos Naturais.

APROVADA em 19 de dezembro de 2018.


Prof. Dr. Alan Carlos da Costa
Presidente da Banca
IF Goiano / Rio Verde


Prof.^ª Dr.^ª Suelis Lopes Rezende Silva
Avaliadora externa
UFG / Jataí


Dr. Adinan Alves da Silva
Avaliador externo
IF Goiano / Rio Verde


Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho
Orientador
IF Goiano / Rio Verde

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha família e amigos pelo amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos. E por entender os momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tantas bênçãos, por permitir a realização desta etapa, pela vida plena de verdades e alegrias!

Ao meu esposo Joseph, por toda paciência, companheirismo e dedicação nos momentos que mais precisei, à minha filha por todo bom humor e diversão nas horas de nervosismo.

À minha mãe Josina, *in memoriam*.

À minha avó Alba do coração por todo incentivo, força e ensinamentos desde que nasci e transformou-me em uma pessoa que crê no poder da educação e por sempre lembrar que o aprendizado é constante.

Às minhas primas Luciene, Lucivaine, Thirzzia e Gabriela, pela paciência e carinho sempre e aos tios Luceni e Gerson, pelo apoio.

Ao meu amigo Aurélio Ferreira Melo, por ter me apresentado o curso de Mestrado em Biodiversidade e Conservação.

À Faculdade Almeida Rodrigues e todos funcionários, por colaborar e incentivar meu aprendizado.

Ao professor Alan Carlos Costa, pela sua conduta e profissionalismo, pelos ensinamentos e oportunidades de treinamentos que fizeram parte da minha formação em Fisiologia Vegetal e compreensão durante todo o período do mestrado.

Ao professor Sebastião, por todo amparo e disponibilidade no Laboratório de Anatomia Vegetal, estendo meus agradecimentos na pessoa dos alunos e irmãos Arthur e Douglas Almeida.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de tecidos, na pessoa do Márcio Rosa e Agda Centofante, pelo apoio e compreensão.

Ao meu companheiro de estudo e vários resumos na disciplina Fisiologia Vegetal e muitas risadas o doutorando Lucas Loram Lourenço, obrigada pela amizade, ajuda e por dividir os momentos de tensão.

Aos coorientadores Caroline Muller e Adinan Silva, pela orientação, pelas valiosas sugestões e contribuição para o desenvolvimento e finalização deste trabalho.

Aos amigos Luciana Minervina, Roberto Vital, Camila Vilela, Priscila Ferreira, Ariana Bertola, Verônica Junqueira, Yasmin Barros, Gabriel Almeida, Emilly, Mariela e Samara, do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, pela ajuda durante a condução do experimento, coletas e pelos momentos de descontração regados com bolos e café.

Aos professores Cláudio Barbosa, Regina Celi Moreira Vilarinho e Sérgio Fonseca Zaiden, por me inspirarem na trajetória acadêmica.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, pela oportunidade de realização do mestrado.

À toda equipe de Diretoria e Pós-graduação do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, às secretárias Renata, Dayane, Lilian, obrigada por sempre nos receber cordialmente e pela competência.

A todos meus colegas e amigos de pós-graduação e do Instituto Federal Goiano, pela amizade, companheirismo e pela troca de conhecimentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, pela dedicação e ensinamentos repassados durante toda minha jornada de acadêmica.

Ao CNPq, CAPES, FAPEG, pelo incentivo e equipamentos utilizados na realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito de minha trajetória.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Daniela Silva Ataides, natural de Rio Verde – Goiás, filha de Josina Maria da Silva e Waldomiro de Souza Ataídes. Sua formação iniciou em 1994, no curso de Licenciatura Plena em Biologia pela Universidade de Rio Verde. Em agosto de 2016, iniciou a Pós-Graduação *Strictu Sensu* – Mestrado em Biodiversidade e Conservação – Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE.....	4
3. OBJETIVOS	5
3.1. Objetivo Geral.....	5
3.2. Objetivos Específicos	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	6
4.1 Local de estudo, material vegetal e condições de cultivo.....	6
4.2 Avaliações.....	7
4.2.1 Relações hídricas e osmóticas.....	7
4.2.2 Trocas gasosas	7
4.2.3 Fluorescência da clorofila <i>a</i> e imagem da fluorescência da clorofila <i>a</i>	7
4.3 Determinação do teor de clorofilas (Índice de Clorofila Falker – ICF).....	8
4.4 Taxa de liberação de eletrólitos	8
4.5 Avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT e POX.....	9
4.5.1 Determinação da atividade da SOD.....	9
4.5.2 Determinação da atividade da CAT.....	10
4.5.3 Determinação da atividade da POX.....	10
4.5.4 Teor de proteínas nos extratos enzimáticos	10

4.6 Análises sintomas visuais	10
4.7 Análises estatísticas	10
5. RESULTADOS.....	11
5.1 Relações hídricas	11
5.2. Trocas gasosas	12
5.3. Fluorescência da clorofila a	16
5.4. Índice de clorofilas Falker (ICF)	18
5.5. Taxa de liberação de eletrólitos	20
5.6. Atividades das enzimas antioxidantes	20
5.7. Sintomas visuais	21
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO	27
8. REFERÊNCIAS.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Potencial hídrico foliar na antemanhã (ψ_w) [A; D], potencial osmótico (ψ_s) [B; E] e conteúdo relativo de água (CRA) [C; F] em plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperaturas ótimas: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$).</p>	12
<p>Figura 2. Taxa fotossintética (A) [A; D], condutância estomática (g_s) [B; E], taxa transpiratória (E) [C; F] em plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperaturas ótimas: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$).</p>	13
<p>Figura 3. Eficiência instantânea do uso da água (EUA) [A; E], eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) [B; F], relação entre concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) [C; G] e relação entre concentração interna de CO_2 e condutância estomática (C_i/g_s) [D; H] em plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperaturas ótimas: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$).</p>	15
<p>Figura 4. Fluorescência mínima (F_o) [A], rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) [B], taxa de transporte de elétrons (ETR) [C], rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y_{II}) [D], rendimento quântico de dissipação regulada de energia ($Y_{(NPQ)}$) [E] e o rendimento quântico da dissipação não regulada no fotossistema II ($Y_{(NO)}$) [F] em plantas de feijão Amarelinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da</p>	

capacidade de campo do substrato; temperatura ótima: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$). 16

Figura 5. Fluorescência mínima (F_o) [A], rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) [B], taxa de transporte de elétrons (ETR) [C], rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y_{II}) [D], rendimento quântico de dissipação regulada de energia (Y_{NPQ}) [E] e o rendimento quântico não regulado da dissipação de energia não fotoquímica do fotossistema II (Y_{NO}) [F] em plantas de feijão Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperatura ótima: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$). 18

Figura 6. Clorofila *a* (A, D), clorofila *b* (B, E) e clorofila total (C, F) em plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperaturas ótimas (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperaturas ótimas: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$). 19

Figura 7. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE) em plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperaturas ótimas: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$). 20

Figura 8. Dismutase do superóxido (SOD) [A, D], Catalase (CAT) [B, E] e Peroxidase (POX) [C, F] em plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperaturas ótimas: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$). 21

Figura 9. Plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). 22

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

<i>A</i>	Taxa fotossintética líquida	($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
<i>A/C_i</i>	Eficiência instantânea de carboxilação	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$)
<i>A/E</i>	Eficiência do uso da água	($\mu\text{mol mmol}^{-1}$)
CAT	Catalase	
<i>C_i</i>	Concentração interna de CO ₂	
<i>C_i/C_a</i>	Relação entre concentração interna e externa de CO ₂	
cm	Centímetro	
CO ₂	Dióxido de carbono	
CRA	Conteúdo relativo de água	(%)
DIC	Delineamento inteiramente ao acaso	
dm ²	Decímetro quadrado	
DTT	Ditiotreitol	
<i>E</i>	Taxa transpiratória foliar	($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético	
ETR	Taxa aparente de transporte de elétrons	
<i>F₀</i>	Fluorescência mínima	
<i>F_v/F_m</i>	Rendimento quântico potencial do fotossistema II	
<i>g_s</i>	Condutância estomática	($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio	
kg	Quilograma	
m	metro	
m ²	Metro quadrado	
m ² kg ⁻¹	Metro quadrado por quilograma	
MF	Massa fresca	
mL	Mililitro	
mm	Milímetro	
mM	Milimol	
mM ⁻¹ cm ⁻¹	Milimol por centímetro	
mm ²	Milímetro quadrado	
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido	
NBT	Azul de p-nitro tetrazólio	
nm	Nanômetro	

nmol	Nanomol	
O ₂	Oxigênio	
p/v	Peso por volume	
Pa	Pressão atmosférica	
PBS	Tampão fosfato salino	
PCA	Análise de componentes principais	
pH	Potencial hidrogeniônico	
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfônico	
POX	Peroxidase	
PVPP	Polivinilpirrolidona	
ROS	Espécies reativas de oxigênio	
rpm	Rotações por minuto	
SISVAR	Sistema de Análises Estatísticas e Planejamento de Experimentos	
SOD	Superóxido dismutase	
TA	Teor de água	
TBA	ácido 2-tiobarbitúrico	
TCA	Ácido tricloroacético	
TLE	Taxa de liberação de eletrólitos	(%)
Y _(NO)	Rendimento quântico da dissipação não regulada no fotossistema II	
Y _(NPQ)	Rendimento quântico de dissipação regulada de energia	
Y _{II}	Rendimento quântico efetivo do fotossistema II	
μL	Microlitro	
μL L ⁻¹	Microlitro por litro	
μM	Micromolar	
μmol	Micromol	
Ψ _s	Potencial osmótico	(MPa)
Ψ _w	Potencial hídrico antemanhã	(MPa)

RESUMO

ATAIDES, DANIELA SILVA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, dezembro 2018. **Alterações na fisiologia de plantas de feijoeiro crioulos como indicadores de vulnerabilidade ao déficit hídrico e ao aumento de temperatura do ambiente de crescimento.** Orientador: Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho. Coorientadores: Dr. Adinan Alves da Silva, Dr. Alan Carlos Costa e Dr^a Caroline Müller.

Ao longo das últimas décadas, o aquecimento global tem provocado e intensificado diversas alterações climáticas, acarretando em desbalanços ambientais observado por meio da redução e má distribuição das chuvas, e também pelo aumento das temperaturas médias. A combinação desses fatores abióticos de estresse pode impactar negativamente o rendimento das culturas em função da geração de danos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos gerados afetando a sobrevivência das plantas e o rendimento de culturas. Neste trabalho, foram utilizados dois materiais genéticos de feijão crioulo conhecidos como Amarelinho e Roxinho, tradicionalmente cultivadas por comunidades do interior do Mato Grosso, onde avaliou-se a plasticidade desses genótipos sob às condições de restrição hídrica, alta temperatura e combinação desses fatores. Avaliações antes da submissão aos estresses foram utilizadas como referência para comparação. Objetivou-se com este estudo gerar informações sobre o impacto da restrição hídrica, da temperatura alta sobre a fisiologia de feijoeiros não comerciais, a fim de prever sobre a vulnerabilidade das plantas aos estresses e a necessidade de conservação desses genótipos. O experimento foi conduzido, em câmara de crescimento de plantas, no

delineamento de blocos ao acaso em esquema fatorial 2 x 2 sendo dois genótipos (Amarelinho e Roxinho) duas tensões hídricas 100% (plena irrigação) a 40% (déficit hídrico), da capacidade de campo do substrato de cultivo e duas temperaturas (25°C e 40°C) com cinco repetições. Quando as plantas se encontravam no estágio R1, um grupo delas foi submetido à restrição hídrica por 7 dias e, ao final, realizadas as coletas e avaliações. Neste primeiro momento, a temperatura da câmara foi mantida a 25°C. Em seguida, outro grupo de plantas foi exposto ao estresse térmico no horário das 11h às 18h, período em que a temperatura da câmara foi mantida a 40°C, permanecendo assim por mais 7 dias, quando as plantas foram novamente avaliadas. Nos dois momentos foram realizadas avaliações das trocas gasosas, do potencial hídrico e osmótico, do conteúdo relativo de água (CRA) da fluorescência modulada e de imagem da clorofila *a*, da taxa de liberação de eletrólitos, do teor de clorofilas e da atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX). A restrição hídrica reduziu as trocas gasosas, a taxa de transporte de elétrons e rendimento do fotossistema II, evidenciando que houve dano fotoquímico em ambos genótipos de feijoeiro. A combinação de seca e calor prejudicou significativamente a atividade fotoquímica e esses efeitos foram aumentados pela alta temperatura. Sob alta temperatura, o genótipo Roxinho apresentou aumento nos valores de dissipação não fotoquímica e na concentração de clorofilas, sugerindo um possível mecanismo de fotoproteção. Ainda nestas condições, a atividade das enzimas do sistema antioxidante, sobretudo a SOD, aumentou tanto em resposta ao déficit hídrico isolado, quanto na condição combinada com a temperatura elevada.

PALAVRAS-CHAVE: estresses abióticos, fotossíntese, enzimas antioxidantes, feijão.

ABSTRACT

ATAIDES, DANIELA SILVA. Goiano Federal Institute – Rio Verde Campus – GO, december 2018. **Physiology Changes of Creole bean plants as vulnerability indicators to water deficit and to the growth ambient temperature increase.** Advicer: Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho; Co-Advicer: Dr. Adinan Alves Silva, Dr. Alan Carlos Costa and Dr^a Caroline Müller.

Over the last decades, global warming has provoked and intensified several climatic changes, leading to environmental unbalances observed through the reduction and poor rainfall distribution, as well as to the average temperatures increase. The combination of these abiotic stress factors may negatively impact the plants yield due to the morphological, biochemical and physiological damages generated, negatively affecting plant survival and crop yield. In this work, two genetic materials of Creole beans known as Amarelinho and Roxinho, traditionally cultivated by communities in the interior of Mato Grosso, were used to evaluate these genotypes plasticity under water restriction conditions, high temperature and a combination of these factors. Evaluations prior to stress submission were used as a benchmark for comparison. The objective of this study was to generate information on the biology impact of water restriction and high temperature of non-commercial genetic material, in order to predict the conservation vulnerability of these genotypes. The experiment was carried out in a randomized complete block design in a 2 x 2 factorial scheme, with two genotypes (Amarelinho and Roxinho), two water stresses 100% (full irrigation) at 40% (water deficit), capacity

cultivar substrate with five replicates. When the plants were in the R1 stage, a group of them were subjected to water restriction for 7 days and, at the end, the evaluations of the plants submitted to stress and control plants were done. At this time, the chamber temperature was maintained at 25 ° C. On the following days, from 11:00 a.m. to 6:00 p.m., the chamber temperature was increased to 40 ° C, remaining for another 7 days, when the plants were again evaluated. In the two moments, gas exchange, water and osmotic potential, relative water content (CRA) of the modulated fluorescence and chlorophyll a image, electrolyte release rate, chlorophyll content and enzyme activity antioxidants: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POX) were evaluated. The water restriction reduced the gas exchange, the electron transport rate and photosystem II yield, showing that there was photochemical damage in both common bean genotypes. The combination of drought and heat significantly impaired photochemical activity and these effects are increased by high temperature. At high temperature, the genotype Roxinho presented increase in the values of non-photochemical dissipation and in the chlorophyll concentration, suggesting a possible mechanism of photoprotection. Even under these conditions, the activity of the antioxidant system enzymes, especially SOD, increased both in response to the isolated water deficit and in the combined condition with the elevated temperature.

KEY WORDS: abiotic stresses, photosynthesis, antioxidant enzymes, bean.

1. INTRODUÇÃO

Plantas crioulas constituem variedades locais, compostas de alta diversidade genotípica, adaptadas à agricultura familiar, em que são cultivadas e assim conservadas, porém pouco caracterizadas (Ceccarelli et al., 2012; Casanãs et al., 2017). A conservação dessas variedades locais de feijão visam a manutenção da variabilidade genética e a preservação de genes com tolerância aos estresses abióticos, sendo fonte de características interessantes para o desenvolvimento de novas cultivares. A importância de preservar estas espécies é relevante, devido a possibilidade de possuírem genes que conferem baixa vulnerabilidade frente às mudanças climáticas (Brozynska et al., 2016).

O crescimento das plantas e o rendimento final são geralmente determinados por fatores ambientais, como radiação solar, temperatura e água (Yu et al., 2014). O relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), concluiu que ocorreu aumento das temperaturas do ar e dos oceanos e das concentrações dos gases do efeito estufa (IPCC, 2014), conseqüentemente, um aumento na frequência das ondas de calor combinadas com a seca também é esperado. Reduções na produtividade das culturas, assim como, risco de extinção de espécies sensíveis poderão ser intensificados pelas mudanças do clima (Daryanto et al., 2016).

Dentre as implicações ocasionadas pela deficiência hídrica nas plantas, observa-se o aumento da temperatura foliar, redução do conteúdo de água, diminuição do potencial hídrico foliar, perda da turgescência, fechamento dos estômatos, diminuição de crescimento celular, senescência prematura e morte (Fernandes et al., 2015). O aumento na temperatura do ar também se tornou grande ameaça aos sistemas de produção agrícola (Zandalinas et al., 2017). Na célula vegetal temperaturas elevadas podem resultar na desnaturação das proteínas, instabilidade dos ácidos nucleicos e

danos em membranas (Wahid et al.,2007; Hanifet al.,2018), além da perda excessiva de água levando a danos oxidativos e ao mesmo tempo, à senescência acelerada, degradação da clorofila, menor assimilação de CO₂ e aumento da fotorrespiração (Sehgal et.al.,2018). Nessas condições, a melhor eficiência do uso da água pela planta torna-se um mecanismo importante, proporcionando maior plasticidade para enfrentarem os diferentes tipos de estresses ao qual podem estar predispostas. Isso permite a manutenção da turgescência celular, fotossíntese e outras importantes atividades fisiológicas, possibilitando a redistribuição de carbono e nitrogênio na planta (Zhao et al,2013).

Normalmente, o efeito dos estresses térmico e hídrico individualmente, no entanto, as plantas estão sujeitas, frequentemente, a combinação desses fatores (Zandalinas et al.,2016a). Condições combinadas de estresse hídrico e alta temperatura influenciam vários processos metabólicos das plantas, como o controle estomático e a taxa transpiratória, fotossíntese e, conseqüentemente, a taxa de crescimento (Chaves et al., 2016; Zandalinas et al., 2017; Lamaoui et al., 2018). Avaliações fisiológicas das trocas gasosas são úteis para determinar os efeitos do estresse na planta e suas relações hídricas, enquanto as medições do teor de clorofila e fluorescência da clorofila *a*, bem como as enzimas antioxidantes que ajudam a avaliar o nível de estresse induzido por danos às estruturas fotossintéticas e então, indicar a tolerância ao calor (Feller, 2016; Zandalinas et al.,2016b). Embora, em alguns casos, a condutância estomática e o conteúdo de clorofila aumentam sob estresse por calor, enquanto, normalmente, diminuem sob o estresse por seca (Zhou et al, 2015). Assim, há a necessidade de compreender como a interação entre fatores abióticos, variações genótípicas e alterações nos parâmetros fisiológicos contribuem para a tolerância ao estresse.

A combinação dos estresses de seca e calor, pode intensificar os danos na planta (Pradhan et al., 2012; Fahad et al., 2017), enquanto as respostas a esses fatores isolados são variáveis. Assim, plantas tolerantes à seca podem não ser necessariamente tolerantes ao estresse térmico, bem como o oposto pode ocorrer (Jagdish et al., 2011; Feller, 2016). Dessa forma a compreensão dos processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos que regulam a dupla tolerância é fundamental para entender e identificar os mecanismos utilizados pelas plantas nessas condições. Variedades de plantas crioulas podem contribuir nesse sentido, pela capacidade de adaptação e rusticidade que apresentam. Além disso, estas avaliações podem contribuir significativamente para a

compreensão da vulnerabilidade destas plantas num cenário de mudanças no clima, sobretudo com intensificação das ondas de calor associadas com restrição hídrica.

Plantas alimentícias crioulas possuem alta diversidade genética, composta por genes adaptados a habitats específicos e representam uma interface entre as espécies silvestres e cultivadas (Dwivedi et al.,2016). O sistema de agricultura atual representa uma ameaça à biodiversidade destas plantas, pois com o passar dos anos houve perda significativa de genes, que são conhecidos por apresentarem características de tolerância, aos estresses abióticos, rendimento estável e sementes com alto valor nutricional (Ceccarelli, 2012). Assim, genótipos crioulos representam um recurso com elevada importância para a segurança alimentar global, devendo-se priorizar a criação de bancos de germoplasma para fins de conservação e identificação de possíveis genes úteis para o aumento da produção de alimentos em condições ambientais adversas (Warschefsky e al.,2014; Sinkovič et al., 2019).

As pesquisas relacionadas aos efeitos do déficit hídrico e alta temperatura sobre a fisiologia de feijoeiros crioulos são ainda incipientes na literatura. Em função disso, no presente estudo espera -se gerar informações que contribuam para o entendimento do impacto de fatores como temperatura e restrição hídrica combinados na fisiologia e bioquímica das plantas de feijoeiro crioulas e assim avaliar a vulnerabilidade destas plantas frente a episódios de seca combinados com temperatura alta. Além disso, os resultados obtidos podem gerar informações para estudos futuros de melhoramento genético da espécie para tolerância a esses fatores de estresse.

2. HIPÓTESE

Plantas de feijoeiro crioulo possuem rusticidade e tolerância aos estresses por restrição hídrica e alta temperatura.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a vulnerabilidade de plantas de feijoeiro crioulo à restrição hídrica combinada com alta temperatura.

3.2. Objetivos Específicos

Caracterizar alterações nos parâmetros de trocas gasosas e na fluorescência da clorofila *a* em plantas de feijoeiro crioulo submetidas aos estresses por restrição hídrica e alta temperatura.

Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes em plantas de feijoeiro crioulo submetidas aos estresses por restrição hídrica e alta temperatura.

Identificar características de tolerância ou suscetibilidade à restrição hídrica combinada com alta temperatura em plantas de feijoeiro crioulo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de estudo, material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi conduzido no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, no Estado de Goiás, Brasil. Foram utilizados dois genótipos de feijão, conhecidas nas comunidades de origem do material genético como Amarelinho e Roxinho, representando as cores dopericarpo das vagens das plantas. As plantas são oriundas de cultivos de subsistência em São Pedro de Joselândia, distrito de Barão de Melgaço, no Pantanal de Mato Grosso e foram previamente caracterizadas como não comerciais, além de não constarem na Coleção Nuclear de Feijão da Embrapa (Oliveira GP, dados não publicados).

As sementes foram inicialmente germinadas em sementeiras contendo substrato comercial Bioplant e, após emergência das folhas primárias as plantas foram transplantadas para vasos contendo 2 kg do mesmo substrato e posteriormente, transferidas para câmara de crescimento (Instalafrio, Pinhais, PR, Brasil), com umidade relativa de ~65%, irradiância de $\sim 650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas foram mantidas no período das 7h às 18h na temperatura de 25°C e após às 18h à temperatura de 20°C, com fotoperíodo de 12 horas durante todo o período experimental. Quando as plantas chegaram no estágio de desenvolvimento reprodutivo R1 (em que ocorre o aparecimento da primeira flor aberta, dois tratamentos foram impostos: plena irrigação (Referência) e déficit hídrico (DH) na temperatura de 25°C. Após sete dias de tratamento foram realizadas as avaliações de trocas gasosas do potencial hídrico e osmótico, do conteúdo relativo de água (CRA) da fluorescência de imagem da clorofila *a*, da taxa de liberação de eletrólitos, do teor de clorofilas e da atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX). Após esta primeira coleta a

temperatura do ambiente foi elevada a 40°C (estresse térmico) das 11h às 17h. Outras duas condições foram caracterizadas neste momento: plantas bem irrigadas sob alta temperatura (AT) e déficit hídrico combinado com alta temperatura (DH + AT). Após sete dias de estresse térmico a segunda coleta foi realizada. Durante o período de condução do experimento, os tratamentos culturais foram realizados sempre que necessário. As condições de temperatura, umidade relativa, radiação e fotoperíodo da câmara de crescimento foram controladas por meio do Software (LAB VIEW, Instalafrio, Pinhais, PR, Brasil). O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, composto por duas temperaturas (25°C e 40°C), dois tratamentos hídricos (plena irrigação e déficit hídrico) com cinco repetições.

4.2 Avaliações

4.2.1 Relações hídricas e osmóticas

O potencial hídrico de antemanhã (Ψ_{am}) foi medido por meio de uma câmara de pressão do tipo Scholander. O conteúdo relativo de água (CRA) foi avaliado mediante a pesagem da massa fresca (MF), túrgida (MT) e seca (MS) de discos foliares e calculado de acordo com a fórmula: $CRA = (MF - MS) / (MT - MS) \times 100\%$. Para a avaliação do potencial osmótico foi realizada extração do sulco celular de folhas e raízes e as leituras realizadas utilizando osmômetro (VAPRO 5600, Wescor, EUA).

4.2.2 Trocas gasosas

As trocas gasosas das plantas foram avaliadas para registro das taxas fotossintética (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática [g_s , $\text{mol (H}_2\text{O) m}^{-2} \text{s}^{-1}$], transpiração (E , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e da relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a). A eficiência instantânea do uso da água foi obtida pela razão entre A e E ($EUA = A/E$), a razão da eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) e a razão da condutância estomática (C_i/g_s). Essas avaliações serão realizadas utilizando o Conjunto Analisador de Fotossíntese e Fluorescência (Modelo IRGA LI-6800F-2), Li-Cor, Nebraska, (EUA), com radiação fotossinteticamente ativada de $1.500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.2.3 Fluorescência da clorofila *a* e imagem da fluorescência da clorofila *a*

As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram avaliadas utilizando o Conjunto Analisador de Fotossíntese e Fluorescência (Modelo IRGA LI-6800F-2), Li-Cor, Nebraska, (EUA), na mesma folha em que foram realizadas as medições de trocas

gasosas. Para obtenção das imagens da fluorescência da clorofila *a* foi utilizado um fluorômetro modulado (Imaging-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, Alemanha). Os sinais de fluorescência em todos os pontos da área foliar analisada foram capturados por uma câmera CCD (*Charge Coupled Device*) acoplada ao aparelho que forneceu as imagens para o computador. Inicialmente foram avaliadas folhas adaptadas ao escuro por pelo menos 40 minutos. Foram obtidas as variáveis de fluorescência: fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m) e, a partir desses valores, calculado o rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII), $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Genty et al., 1989). Posteriormente, com as folhas expostas à iluminação actínica, acrescido de um pulso de luz actínica saturante determinou-se a fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F) e a fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m'). A partir desses parâmetros foi possível calcular a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado, $F_0' = F_0 / [(F_m - F_0)/F_m + (F_0/F_m')]$ (Oxborough e Baker, 1997), e utilizada para o cálculo do coeficiente de extinção fotoquímico pelo modelo *lake*, fornecendo a estimativa de centros de reações abertos do FSII, $qL = (F_m' - F)/(F_m' - F_0') \times (F_0'/F)$ (Kramer et al., 2004). O rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no FSII, $Y_{II} = (F_m' - F)/F_m'$, e os rendimentos quânticos da dissipação de energia regulada, $Y_{(NPQ)} = (F/F_m') - (F/F_m)$, e da dissipação de energia não regulada, $Y_{(NO)} = F/F_m$, foram calculados de acordo com Genty et al. (1989) e Hendrickson et al. (2004). O Y_{II} foi utilizado para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons, $ETR = Y_{II} \cdot PAR \cdot Leaf_{ABS} \cdot 0,5$ (BILGER et al., 1995), onde PAR é o fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha; $Leaf_{ABS}$ correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas e 0,5 à fração de energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996).

4.3 Determinação do teor de clorofilas (Índice de Clorofila Falker – ICF)

As medições não destrutivas do teor de clorofila foram feitas utilizando um clorofilômetro (medidor eletrônico portátil, de marca comercial ClorofiLOG, modelo CFL 1030 – FALKER, Porto Alegre, Brasil). As características avaliadas foram índice de clorofila a (Cl *a*), índice de clorofila b (Cl *b*) e índice de clorofila total (Cl *t*). As leituras foram feitas sempre em folhas completamente expandidas.

4.4 Taxa de liberação de eletrólitos

A avaliação da tolerância protoplasmática dos tecidos foliares foi realizada mediante a taxa de liberação de eletrólitos segundo adaptação da metodologia descrita por Vasquez-Tello et al. (1990) e Pimentel et al. (2002). Discos foliares (8 mm²) foram previamente lavados com água ultrapura e, então, submersos em 30 mL de água, por um período de 24 horas à temperatura ambiente. Após este período foi mensurado a condutividade livre (CL, $\mu\text{S}/\text{cm}$), utilizando um condutivímetro portátil (CD-850, marca, país). Posteriormente, os mesmos frascos serão mantidos em estufa por uma hora sob temperatura de 100°C e, após retornados na temperatura ambiente, foi medida a condutividade total (CT, $\mu\text{S cm}$) da solução. A taxa de liberação de eletrólitos foi obtida utilizando a fórmula $\text{TLE (\%)} = \text{CL}/\text{CT} \times 100$.

4.5 Avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT e POX

Os extratos enzimáticos para a determinação da atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e peroxidase (POX, EC1.11.1.7), foram obtidos pela maceração de aproximadamente 300 mg de folhas em 2mL de meio de extração, constituído de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF)

1 mM e PVP 1% (p/v). O extrato foi submetido à centrifugação a 12.000 xg, por 15 min, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

4.5.1 Determinação da atividade da SOD

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático a 5 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM . A reação foi conduzida a 25°C, em uma câmara sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W durante 10 minutos. Em seguida, a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida pela absorvância a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). Os resultados foram expressos em unidades de SOD (U SOD) $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

4.5.2 Determinação da atividade da CAT

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático a 2,9 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância pela degradação de H₂O₂ foi medida a 240 nm, no primeiro minuto da reação, a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e expressa em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

4.5.3 Determinação da atividade da POX

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático a 4,9 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogallol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

4.5.4 Teor de proteínas nos extratos enzimáticos

Foi realizada a determinação do teor de proteínas nos extratos enzimáticos, segundo metodologia proposta por Bradford (1976), no comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) e utilizados para expressar a atividade enzimática em base de proteína.

4.6 Análises sintomas visuais

Ao final da primeira e segunda coleta, foram realizados os registros fotográficos para posteriores análises visuais das plantas.

4.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F (P < 0,05), e comparadas pelo teste de médias Scott-Knott por meio do Sistema de Análise de Variância (SISVAR – Versão 5.3).

5. RESULTADOS

5.1 Relações hídricas

A imposição do déficit hídrico (DH), da alta temperatura (AT) e dos estresses combinados (DH+AT) não promoveu diferenças no potencial hídrico (ψ_w) (Figura 1A, D), potencial osmótico (ψ_s) (Figura 1B, E) e conteúdo relativo de água foliar (CRA) em ambos genótipos (Figura 1C, F).

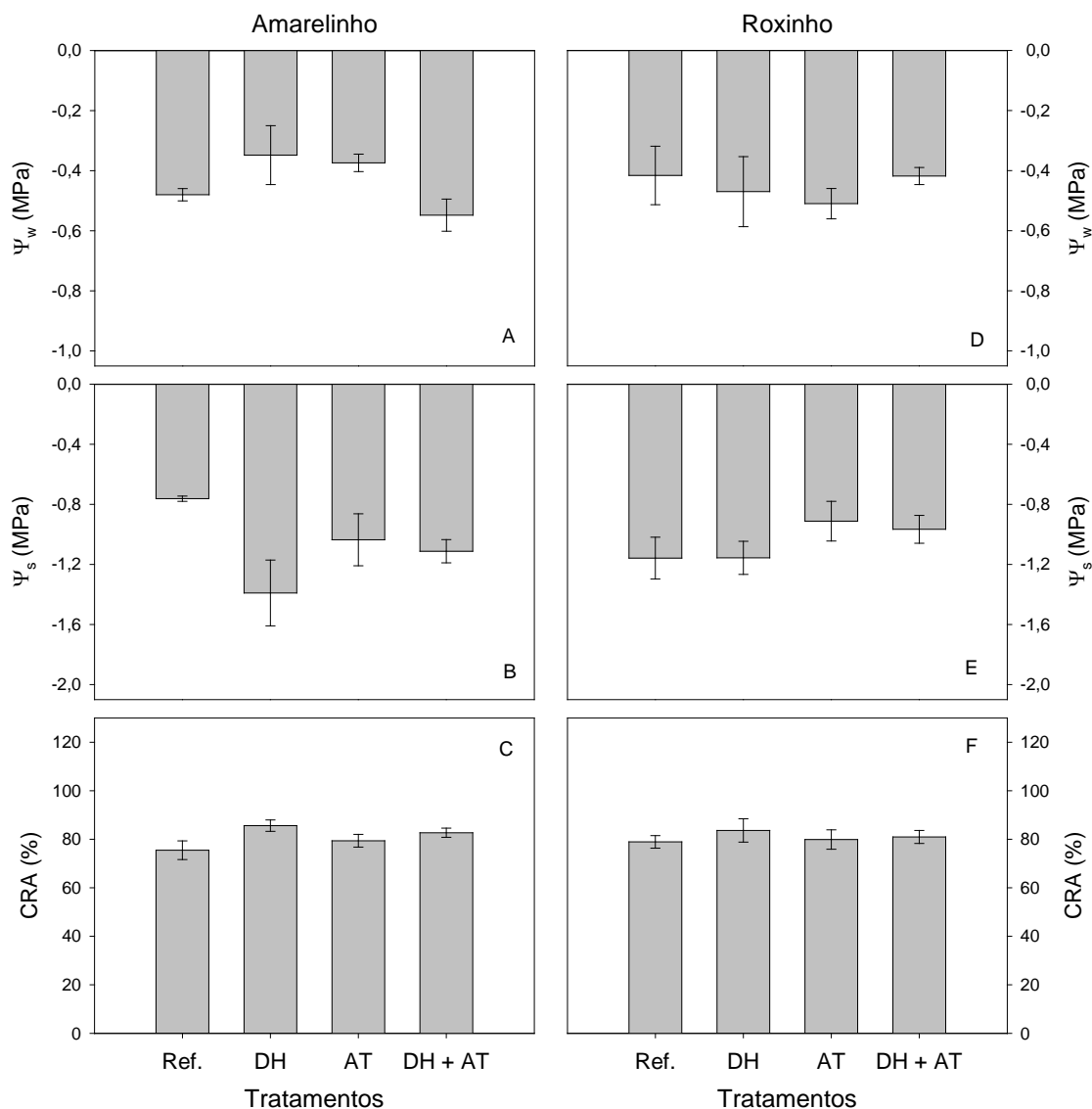


Figura 1. Potencial hídrico foliar na antemanhã (Ψ_w) [A; D], potencial osmótico (Ψ_s) [B; E] e conteúdo relativo de água (CRA) [C; F] em plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperaturas ótimas: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n=5$).

5.2. Trocas gasosas

Houve redução na taxa fotossintética (A), em ambos os genótipos, para todos os tratamentos (Figura 2A, E). Os decréscimos observados foram de 24% e 44% para DH, 25% e 33% para AT e 62% e 73% para DH + AT em relação ao Referencial para os genótipos Amarelinho e Roxinho, respectivamente. A condutância estomática (g_s) não diferiu entre os tratamentos no genótipo Amarelinho (Figura 2B). Em contrapartida,

o genótipo Roxinho demonstrou redução de 85% na g_s na condição de DH + AT (Figura 2F).

Para o genótipo Amarelinho foi observada redução de 76% na taxa transpiratória (E) na condição de DH + AT (Figura 2C). Já para o genótipo Roxinho as reduções foram de 45% e 83 % para AT e DH + AT, respectivamente, em relação ao Referencial (Figura 2F). A razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) do genótipo Amarelinho não diferiu entre as condições avaliadas (Figura 3C), enquanto no, genótipo Roxinho houve decréscimo de 22% na C_i/C_a na condição de estresses combinados (DH+AT) (Figura 3G).

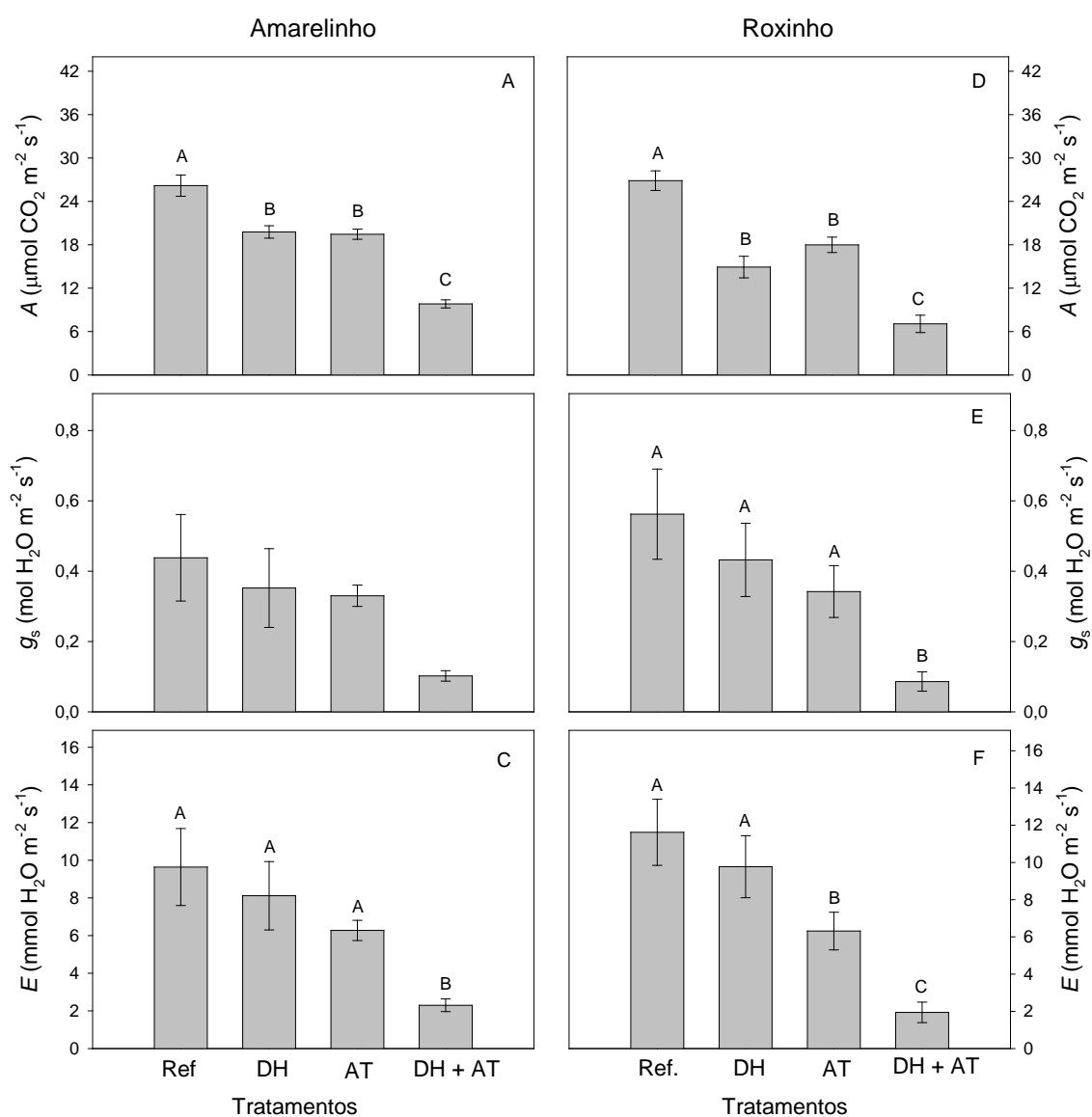


Figura 2. Taxa fotossintética (A) [A; D], condutância estomática (g_s) [B; E], taxa transpiratória (E) [C;F] em plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima

(DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperaturas ótimas: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$).

A eficiência instantânea do uso da água (*EUA*) não diferiu nas condições impostas aos genótipos Amarelinho e Roxinho (Figura 3A, E). Houve redução na eficiência de carboxilação (A/C_i) em ambos os genótipos para todas as condições de estresse, em relação ao referencial, mas de forma mais proeminente na combinação dos estresses (DH+ AT) (Figura 3B, F). A razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) do genótipo Amarelinho não diferiu entre as condições avaliadas (Figura 3C), enquanto no, genótipo Roxinho houve decréscimo de 22% na C_i/C_a na condição de estresses combinados (DH+AT) (Figura 3G). A razão C_i/g_s aumentou somente na condição de DH+AT para ambos os genótipos de feijão, em relação aos demais tratamentos (Figura 3D, H).

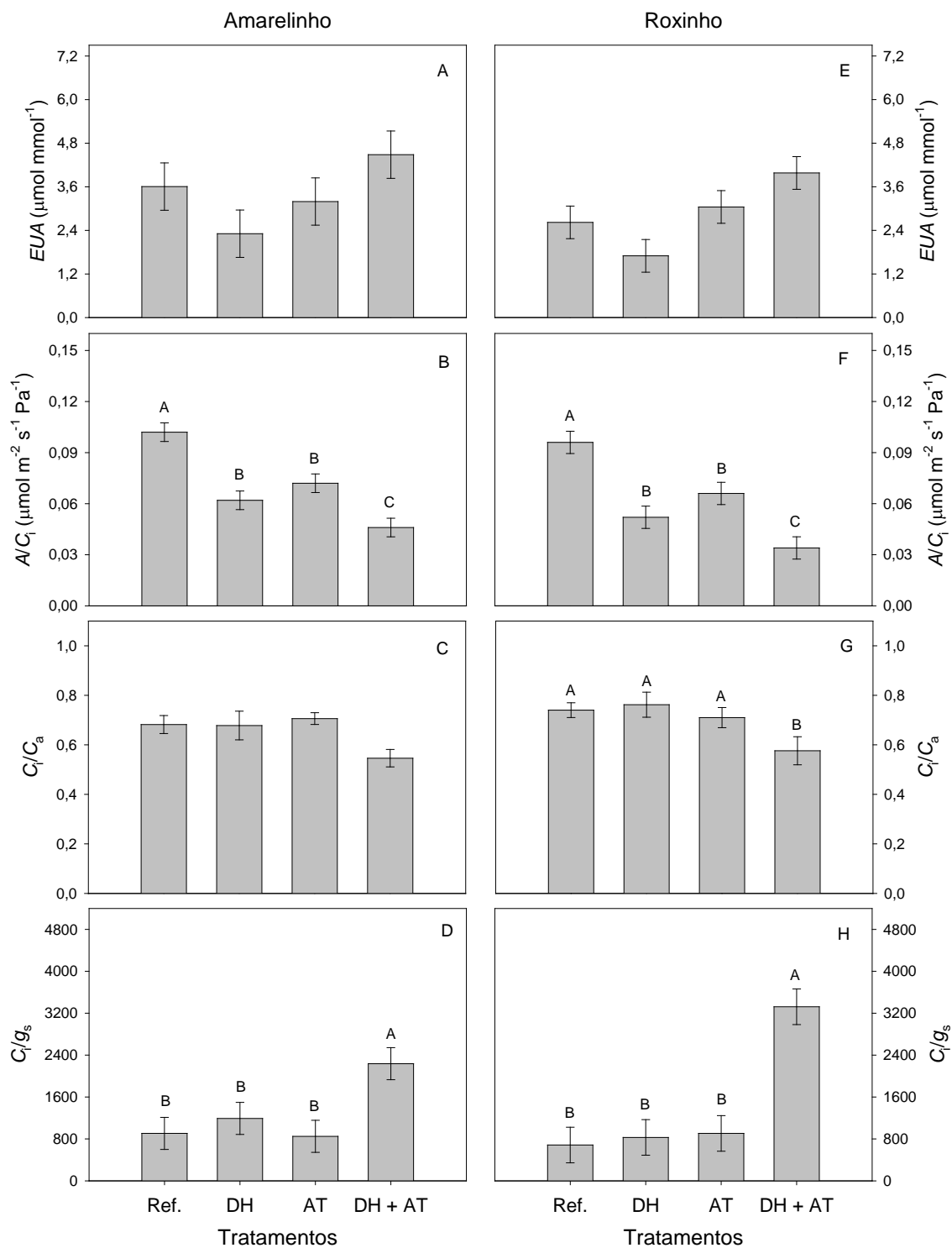


Figura 3. Eficiência instantânea do uso da água (EUA) [A; E], eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) [B; F], relação entre concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) [C; G] e relação entre concentração interna de CO_2 e condutância estomática (C_i/g_s) [D; H] em plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperaturas ótimas: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$).

5.3. Fluorescência da clorofila *a*

Os resultados de fluorescência da clorofila *a* observados no genótipo Amarelinho demonstram que não houve diferença na fluorescência mínima (F_o) para as condições avaliadas (Figura 4A). O rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) foi mantido estável nas condições de DH e AT e diminuiu somente sob DH + AT, quando comparado ao Referencial (Figura 4B). A taxa de transporte de elétrons (ETR) e o rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y_{II}) reduziram nas plantas de feijão sob DH e DH+AT (Figura 4C, D). O rendimento quântico de dissipação regulada de energia $Y_{(NPQ)}$ e o rendimento quântico da dissipação não regulada de energia no fotossistema II $Y_{(NO)}$ não diferiram entre os tratamentos (Figura 4E, F).

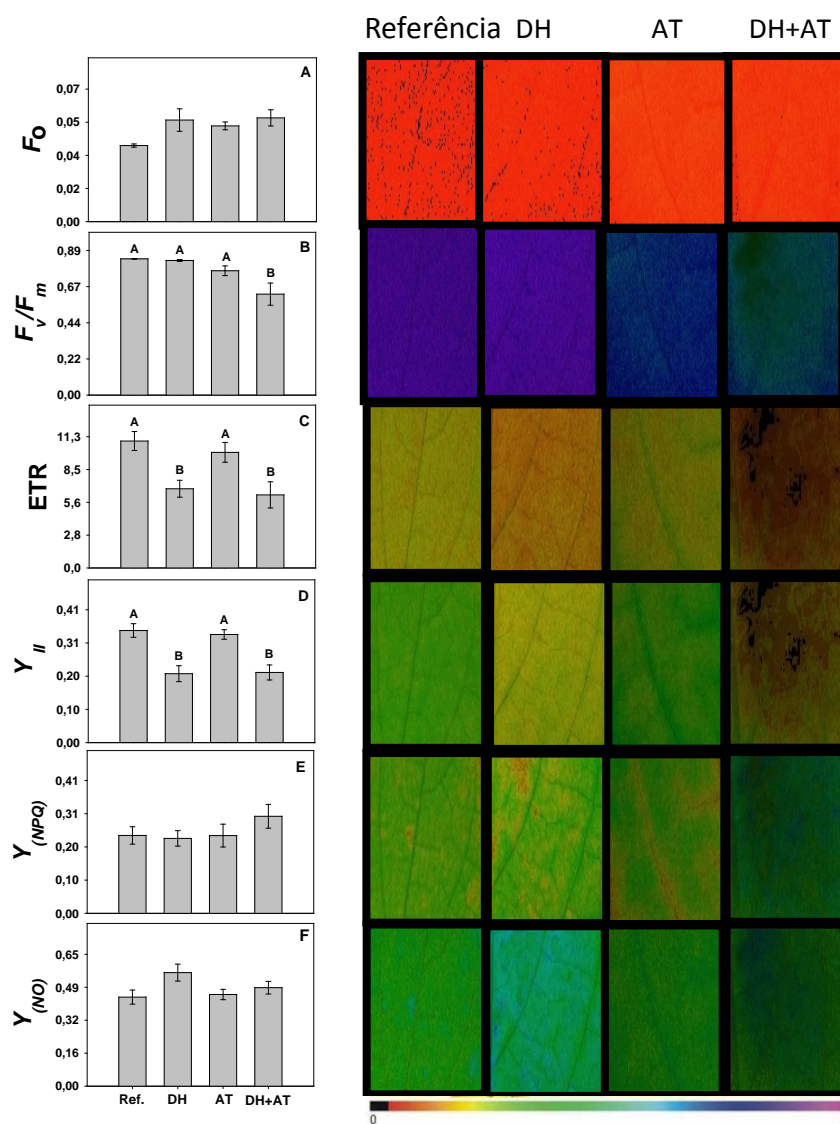


Figura 4. Fluorescência mínima (F_o) [A], rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) [B], taxa de transporte de elétrons (ETR) [C], rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y_{II}) [D], rendimento quântico de dissipação

regulada de energia ($Y_{(NPQ)}$) [E] e o rendimento quântico da dissipação não regulada do fotossistema II ($Y_{(NO)}$) [F] em plantas de feijão Amarelinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperatura ótima: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$).

O genótipo de feijão Roxinho também não demonstrou diferença na F_o entre os tratamentos (Figura 5A). Houve redução na F_v/F_m para as condições de AT e DH + AT (Figura 5B). A ETR e o Y_{II} diminuíram nas plantas de feijão sob DH e DH+AT (Figura 5C, D). O $Y_{(NPQ)}$ e o $Y_{(NO)}$ aumentaram nas plantas sob DH e DH + AT, respectivamente (Figura 5E, F).

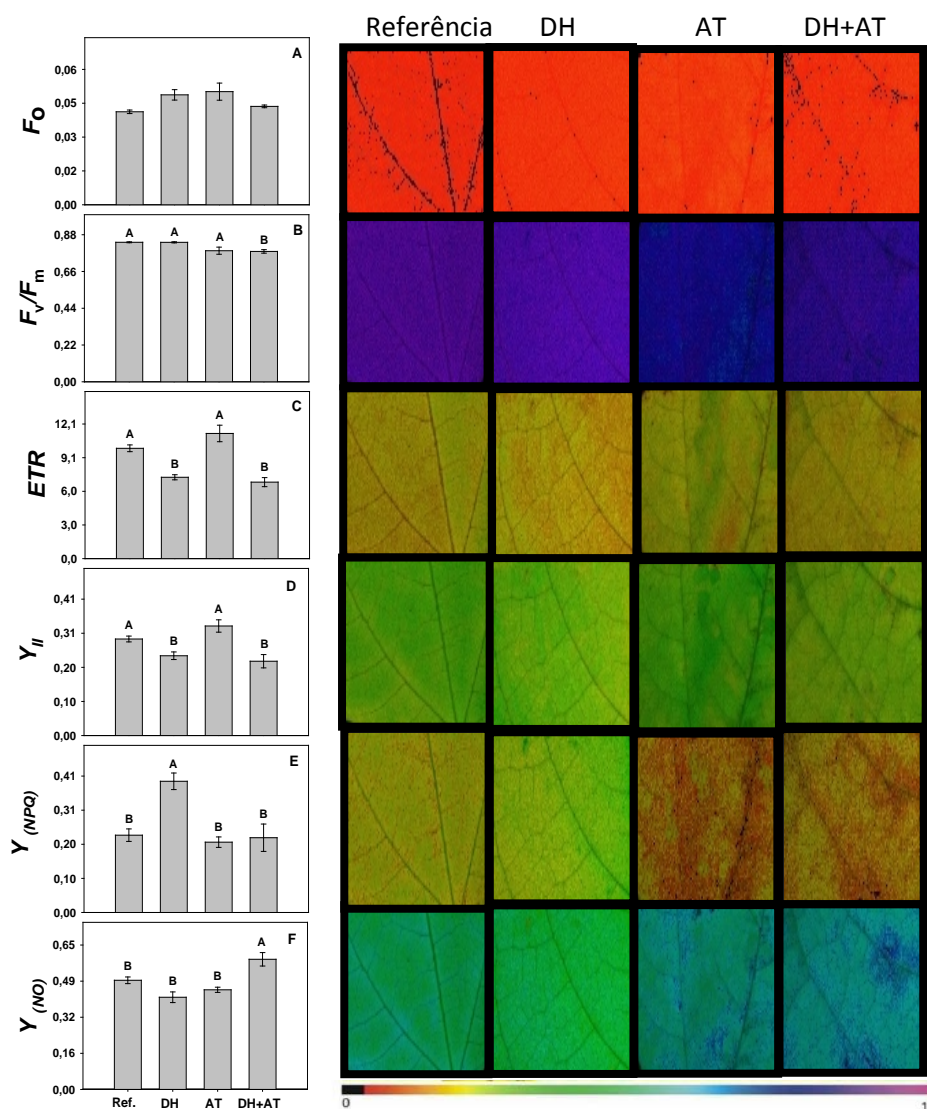


Figura 5. Fluorescência mínima (F_o) [A], rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) [B], taxa de transporte de elétrons (ETR) [C], rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y_{II}) [D], rendimento quântico de dissipação regulada de energia (Y_{NPQ}) [E] e o rendimento quântico não regulado da dissipação de energia não-fotoquímica do fotossistema II (Y_{NO}) [F] em plantas de feijão Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperatura ótima: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$).

5.4. Índice de clorofilas Falker (ICF)

Os índices de clorofila *a* (Figura 6A), clorofila *b* (Figura 6B) e clorofila total (Figura 6C) não diferiram entre os tratamentos impostos às plantas de feijão do genótipo Amarelinho. Por outro lado, o genótipo Roxinho apresentou redução de clorofila *a* sob condições de DH e DH + AT, enquanto clorofila *b* e clorofila total aumentaram nas plantas sob condições de AT, em comparação ao Referencial (Figura 6D, E, F).

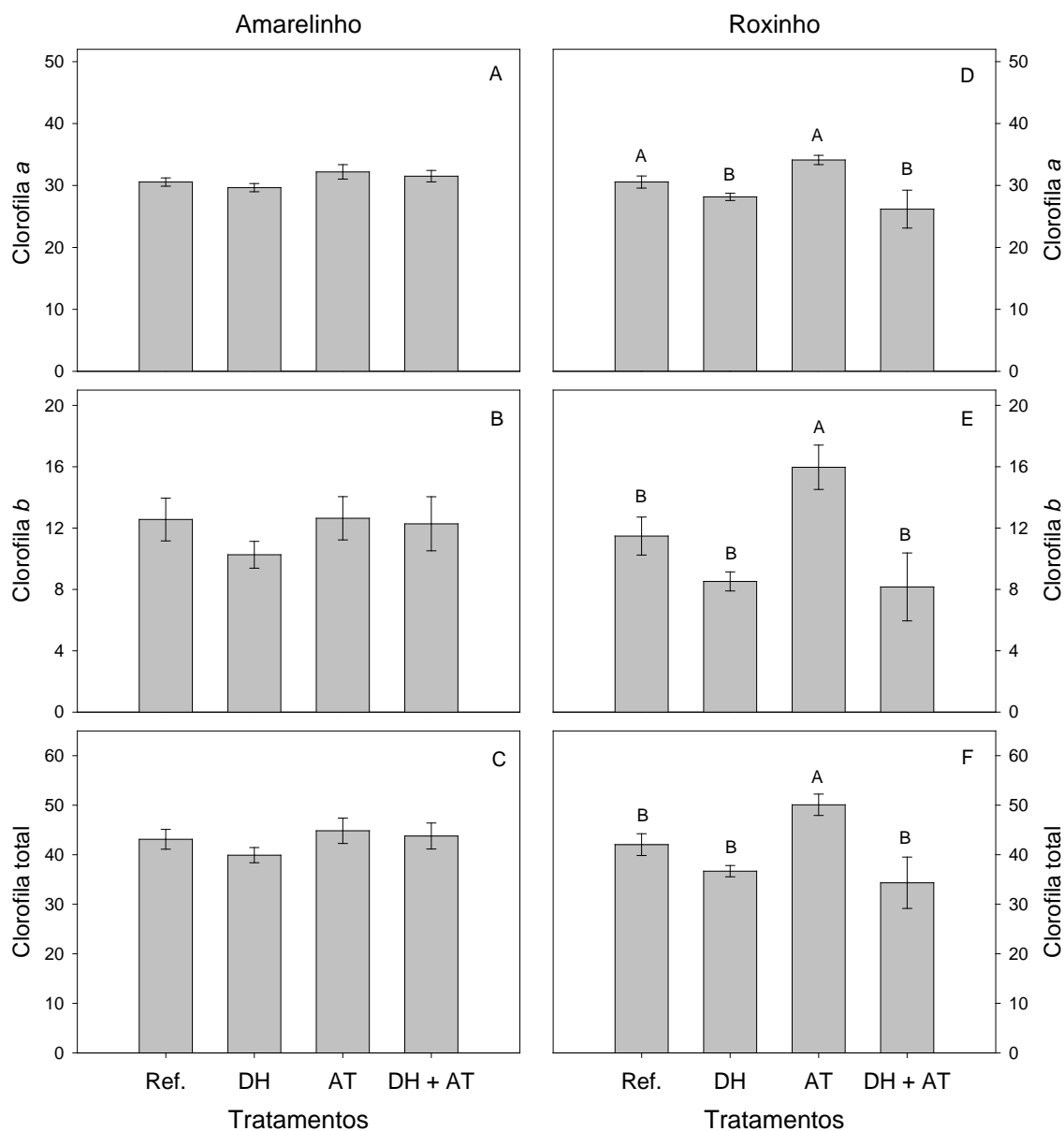


Figura 6. Clorofila *a* (A, D), clorofila *b* (B, E) e clorofila total (C, F) em plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperaturas ótimas (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperaturas ótimas: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$).

5.5. Taxa de liberação de eletrólitos

A taxa de liberação de eletrólitos (TLE) não diferiu entres as condições de DH, AT e DH + AT impostas a ambos os genótipos de feijão, Amarelinho e Roxinho (Figura 7A, B).

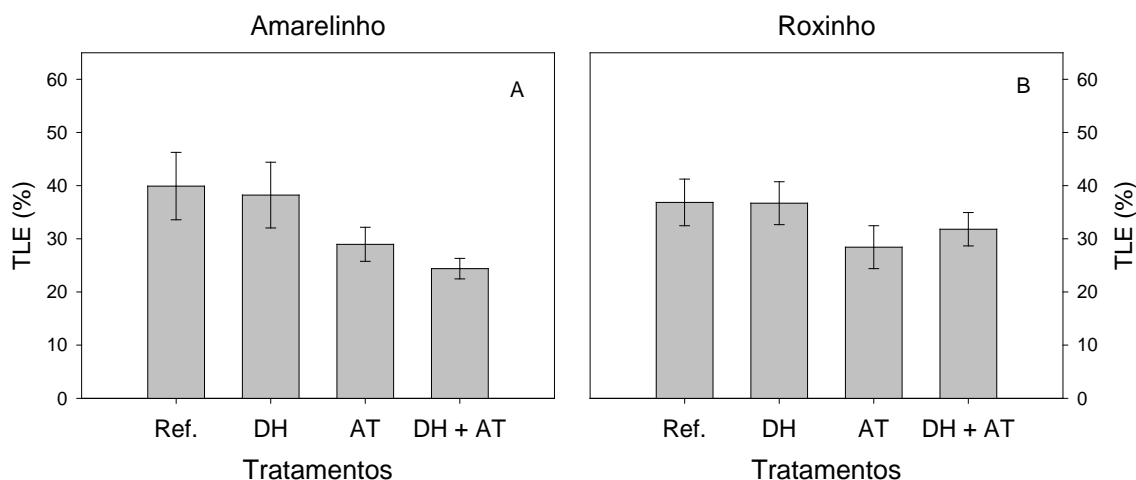


Figura 7. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE) em plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperaturas ótimas: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$).

5.6. Atividades das enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) não foi afetada pelo DH, AT e DH + AT no genótipo Amarelinho (Figura 8A, B, C). No genótipo Roxinho, houve aumento na atividade da SOD sob DH e DH + AT, quando comparada ao referencial (Figura 8D). A atividade da CAT e a POX não diferiu entre os tratamentos (Figura 8E, F).

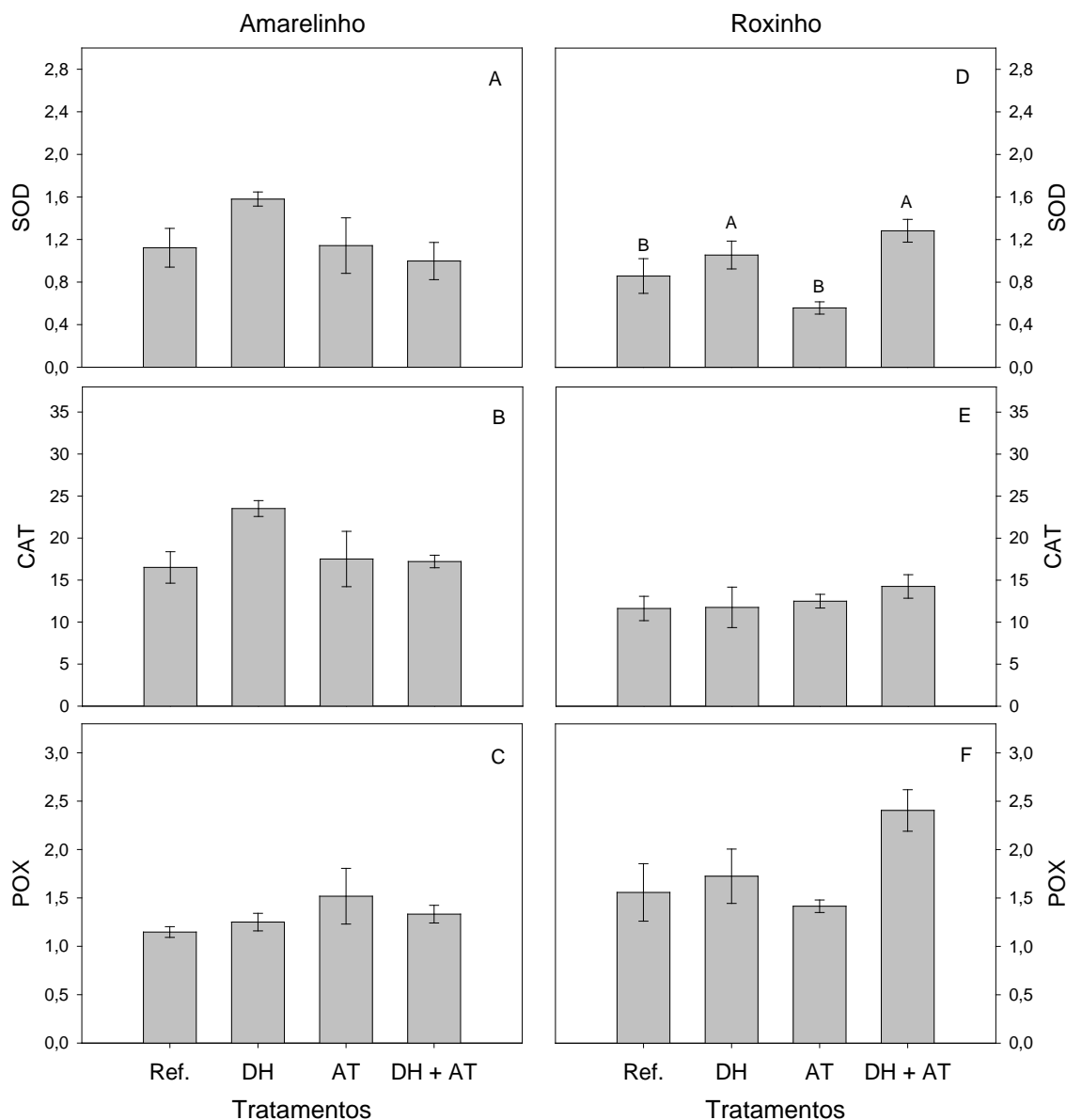


Figura 8. Dismutase do superóxido (SOD) [A, D], Catalase (CAT) [B, E] e Peroxidase (POX) [C, F] em plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT). Plena irrigação: 100% da capacidade de campo do substrato; déficit hídrico: 40% da capacidade de campo do substrato; temperaturas ótimas: 25/20°C (dia/noite); alta temperatura: 40/20°C (dia/noite). Barras representam médias \pm EP ($n = 5$).

5.7. Sintomas visuais

Quanto aos sintomas visuais, foi verificado um leve amarelecimento das folhas em ambas plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob a condição de estresse de alta temperatura (AT), observou-se ainda incremento no amarelecimento acompanhado pela murcha foliar e início de senescência foliar em ambas plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob a condição de déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT).

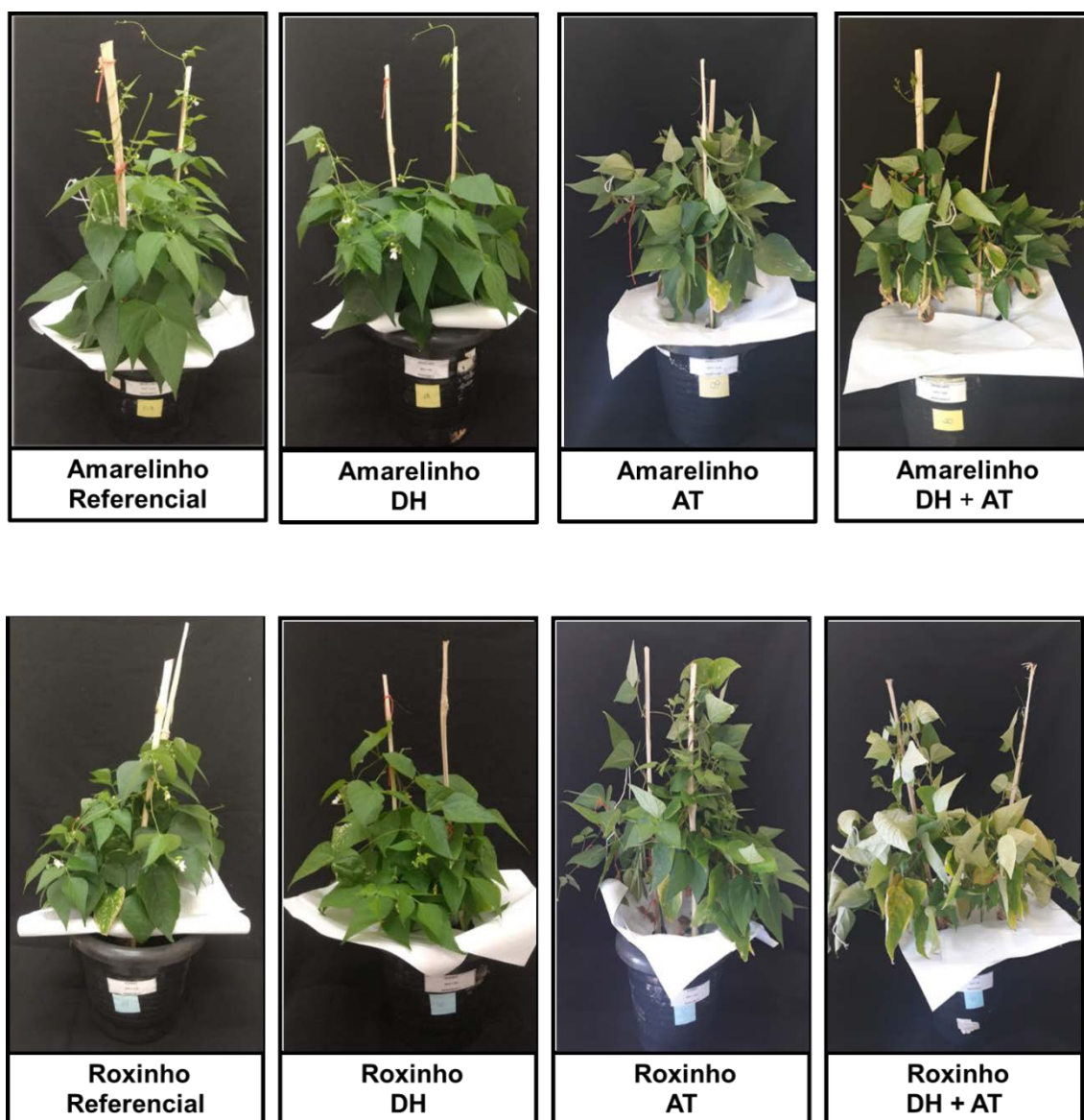


Figura 9. Plantas de feijão Amarelinho e Roxinho sob condições de plena irrigação e temperatura ótima (Referencial); déficit hídrico e temperatura ótima (DH); plena irrigação e alta temperatura (AT) e déficit hídrico + alta temperatura (DH+AT).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido utilizando plantas de feijão crioulas, cultivadas no interior do Mato Grosso e que, em tese, estão adaptadas a seus ambientes naturais. Tais genótipos são resultado de uma seleção natural que sofreram ajustes morfológicos, fisiológicos e metabólicos, conforme as mudanças climáticas as quais foram aclimatados ao longo dos anos. Esses feijoeiros podem ser reservatórios de genes de tolerância a estresses como seca e calor como de fato ficou evidenciado pela ausência de alterações no Ψ_w , Ψ_s e CRA nas plantas deste estudo.

A manutenção de um elevado CRA, mesmo sob condições de estresse, é uma característica de genótipos resistentes ao déficit hídrico (Zegaoui et al., 2017). Portanto, é um indicativo que os genótipos Amarelinho e Roxinho sejam tolerantes aos estresses impostos. Em plantas sob déficit hídrico a redução do potencial hídrico foliar é esperada, ocasionando redução na condutância estomática (Zandalinas et al., 2016). Sob alta temperatura ou a combinação de alta temperatura e déficit hídrico, é comum o aumentada taxa de condutância estomática para que a planta consiga se resfriar (Chaves et al., 2016; Goraya et al., 2017; Zhou et al., 2017). Entretanto, foram observados, nas plantas deste estudo, em ambos os genótipos, que em todas as condições impostas o status hídrico das plantas não foi alterado de forma significativa, mesmo com o déficit hídrico imposto no substrato de crescimento.

A manutenção de um bom status hídrico, mesmo sob estresse, provavelmente pode estar relacionada ao mecanismo adotado pelas plantas para lidar com as limitações de água e garantir a sua sobrevivência. Estes mecanismos de adaptação ao déficit hídrico estão subdivididos nas estratégias de fuga, evitação e tolerância (Sade et al., 2012; Chaves et al., 2016). Nas condições deste estudo, os resultados sugerem que os

genótipos de feijão utilizaram a estratégia de evitação, em que é possível a manutenção de um elevado potencial hídrico na planta, por exemplo, pela diminuição da abertura estomática evitando assim a perda de água. Este rápido fechamento estomático destas plantas é característico da estratégia de evitação e também já foi observado em videiras (Chaves et al., 2016).

As condições impostas neste estudo diminuíram as trocas gasosas dos feijoeiros crioulos, conforme constatado pela diminuição da taxa fotossintética acompanhada da taxa transpiratória. A redução da fotossíntese pelo déficit hídrico já foi relatada em feijões (Farooq et al., 2017; Boydston et al., 2018), quinoa (Killi, 2017) e em plantas sob combinação de estresses hídrico e térmico em arroz, trigo e milho (Perdomo et al., 2017). Nas plantas do genótipo Roxinho, este efeito está possivelmente relacionado à limitação estomática (g_s), metabólica (A/C_i) e alterações na eficiência carboxilativa da Rubisco sob condições restritivas, principalmente na condição de estresses combinados conforme observado em estudos com *Arabidopsis* (Vile et al., 2012) e pinhão-mansão (Silva et al., 2018).

Aparentemente, ao observar o aumento da eficiência do uso de água de ambos os genótipos sob a combinação dos estresses por déficit hídrico e alta temperatura, embora não significativos, pode-se inferir uma vantagem adaptativa destas plantas.

O mesmo também pode ocorrer ao analisar a relação C_i/C_a , sobretudo no genótipo Roxinho, em que se observa a diminuição nesta razão e que, podem indicar a ausência de danos dos fatores de estresse no Ciclo de Calvin, e não condiz com os demais parâmetros avaliados, tendo em vista a diminuição da A , A/C_i e dos parâmetros da fluorescência da clorofila.

Visando melhor análise da atividade do Ciclo de Calvin, da concentração de carbono interno e da regulação do influxo deste carbono, propôs-se neste estudo, uma nova equação que relaciona a concentração do carbono interno (C_i) e a condutância estomática (g_s), obtendo-se então a relação C_i/g_s . Esta relação explica melhor a proporcionalidade entre a concentração de carbono na cavidade subestomática e o grau de abertura dos estômatos, permitindo aferir com maior precisão, se o acúmulo de CO_2 no mesófilo ocorre pela limitação estomática ou a limitação metabólica do Ciclo de Calvin. Assim, observou-se, nas plantas deste estudo, que a diminuição da relação C_i/C_a não está relacionada à maior atividade do Ciclo de Calvin, o que é contraposto pela relação C_i/g_s , em que se constata elevada concentração de CO_2 na cavidade subestomática, mesmo quando os estômatos estão praticamente fechados, limitando a

entrada do CO₂ para o mesofilo. Por meio destes resultados, é possível sugerir, que nestas condições, houve a predominância da limitação nãoestomática da fotossíntese, em que ocorre a entrada de CO₂ no mesofilo, mas o mesmo não é sendo metabolizado no Ciclo de Calvin indicando uma restrição na etapa bioquímica.

De acordo com Singh et al. (2014) e Mathobo et al. (2017), foi demonstrado que há combinação de efeitos estomáticos e não estomáticos na fotossíntese, dependendo da extensão do déficit hídrico. Masondo et al. (2018) concluíram que o déficit hídrico pode inibir a fotossíntese por meio da diminuição da atividade, inativação ou desnaturação da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), causado por baixa síntese de ATP, também pode ocasionar o aumento da atividade da oxigenase da RuBPCarboxilase/oxigenase (Rubisco), reduzindo a eficiência da carboxilação. A alta temperatura afeta os principais processos fisiológicos das plantas, dentre eles a fotossíntese é o mais sensível, acarretando inúmeras lesões nos estromas e nas lamelas dos tilacoides dos cloroplastos, como inchaço e perda do empilhamento de grana, conforme relatado em estudos com milho e trigo (Ashraf e Hafeez, 2004) e trigo (Akter e Rafiqul, 2017). No geral, a combinação de estresse hídrico e alta temperatura tem impacto negativo na fisiologia das plantas, no conteúdo de clorofilas, fotossíntese foliar, conforme observado neste estudo com os feijoeiros crioulos.

A atividade fotoquímica foi limitada pelo déficit hídrico nas plantas de feijão Amarelinho e Roxinho, como indicado pela redução Y_{II} e ETR, porém o aumento do $Y_{(NPQ)}$ sugere a ativação de mecanismos de dissipação térmica no genótipo Roxinho. A combinação dos estresses intensificou o dano fotoquímico do FSII, como observado pela queda do F_v/F_m no genótipo Amarelinho e pelo aumento do $Y_{(NO)}$ no genótipo Roxinho. Embora o F_v/F_m tenha decaído nas plantas de feijão Roxinho os valores permaneceram dentro da faixa adequada de 0,75 -0,85 (Baker, 2008). Sob condições de estresse a dissipação regulada $Y_{(NPQ)}$ e a não regulada $Y_{(NO)}$ de energia estão entre os mecanismos utilizados pelas plantas para evitar danos na maquinaria fotossintética quando expostas a estresse por déficit hídrico e temperaturas altas (Hendrickson et al., 2004; Kramer et al., 2004). Valores elevados de $Y_{(NPQ)}$ indicam que a dissipação do excesso de energia está ativo, e que parte desta energia é perdida na forma de calor, associada à dissipação térmica através da ativação do ciclo das xantofilas, ao invés de ter sido utilizada no processo fotossintético (Pontasch et al., 2017). Dos genótipos estudados, este mecanismo foi eficiente apenas no feijão Roxinho, em que foi

observado aumento do $Y_{(NPQ)}$ nas plantas sob déficit hídrico, evidenciando a capacidade fotoprotetora do seu aparato fotossintético.

A redução do ETR e do Y_{II} , no genótipo Roxinho, pode estar relacionada com o decréscimo no teor de clorofilas, conforme observado em canola (Din et al., 2011) e tomates (Al Hassan et al., 2015). Geralmente, a degradação dos pigmentos fotossintéticos induzido pelo déficit hídrico, individualmente ou em combinação com alta temperatura, leva à redução no desempenho fotossintético (Zandalinas et al., 2017). A oxidação dos pigmentos fotossintéticos é consequência do estresse oxidativo, efeito secundário de diversos estresses abióticos (Al Hassan et al., 2017). Em contrapartida, a manutenção dos valores de F_o , TLE e pigmentos fotossintéticos no genótipo Amarelinho e de F_o e TLE no genótipo Roxinho indicam a ausência de danos nas membranas celulares, corroborando a tolerância fisiológica destas plantas aos estresses por déficit hídrico e alta temperatura, isolados e combinados.

Os mecanismos antioxidantes também desempenham papel importante na resposta das plantas a estresses abióticos, incluindo o déficit hídrico e a alta temperatura ou a combinação destes (Suzuki, 2014). As enzimas mais ativas em resposta às condições de estresses ambientais são CAT e SOD (Soengas et al., 2018). A SOD geralmente atua como a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo uma vez que catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Caverzan et al., 2016). Já a CAT e a POX neutralizam o excesso de H_2O_2 convertendo-o em H_2O e O_2 (Pandey et al., 2017), evitando a formação do radical hidroxila (OH) (Kaushik e Roychoudhury, 2014). É possível que não tenha ocorrido a geração de estresse oxidativo nos feijoeiros crioulos, em razão dos estresses impostos. A ausência de variações significativas no status hídrico das plantas reforçam essa hipótese. Logo, não foi necessária uma atuação específica de enzimas antioxidantes não sendo esta via crucial para a proteção das plantas.

As imposições do déficit hídrico e do estresse combinado aumentaram a atividade da SOD, somente nas plantas de feijão do genótipo Roxinho. O aumento da atividade da SOD em resposta ao déficit hídrico também já foi observado em cultivares de arroz (Sharma e Dubey, 2005) e feijão (Zlatev et al., 2006). Em casos de estresse térmico existem relatos de aumento da atividade de SOD em cultivares de ervilha, milho e arroz (Agrawal et al., 2009).

7. CONCLUSÃO

Os genótipos de feijoeiro crioulos deste estudo, são suscetíveis à restrição hídrica, à temperatura elevada e à combinação desses fatores de estresse, ao se considerar os efeitos negativos na eficiência fotoquímica e nas trocas gasosas. Assim, ainda que genótipos de feijoeiro sejam rústicos, são também suscetíveis aos estresses estudados. Por outro lado, a manutenção do status hídrico das plantas diante dos estresses, sugere que mecanismos de defesa também atuam nesses genótipos crioulos, quando expostos ao déficit hídrico e alta temperatura. Considerando o potencial ainda desconhecido das plantas, estudos adicionais em diferentes condições de cultivo podem revelar características úteis para o melhoramento genético do feijoeiro, diante de outros estresses abióticos e também, estresses bióticos.

8. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, S. B., SINGH, S., AGRAWAL, M. Ultraviolet-B induced changes in gene expression and antioxidants in plants. **Adv. Bot. Res.** 52, 47–86, 2009. doi: 10.1016/S0065-2296(10)52003-2

AKTER, N. & RAFIQUUL ISLAM, M. Heat stress effects and management in wheat. A review. **Agron. Sustain. Dev.** 37, 37, 2017. doi.org/10.1007/s13593-017-0443-9

AL HASSAN, M., CHAURA, J., DONAT-TORRES, M. P., BOSCAIU, M., VICENTE, O. Antioxidant responses under salinity and drought in three closely related wild monocots with different. **AoB Plants.** 9(2), plx009, 2017. Doi:10.1093/aobpla/plx009

AL HASSAN, M., MARTÍNEZ FUERTES, M., RAMOS SÁNCHEZ, F. J., VICENTE, O., BOSCAIU, M. Effects of salt and water stress on plant growth and on accumulation of osmolytes and antioxidant compounds in cherry tomato. **Not. Bot. Horti Agrobi.** 43, 1–11, 2015. DOI:10.15835/nbha4319793

ANDERSON, M. D., PRASAD, T. K., STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiol.** 109, 1247-1257, 1995.

ASHRAF, M. & HAFEEZ, M. Thermotolerance of pearly millet and maize at early growth stages: growth and nutrients relations. **Biologia Plantarum** 48, 81- 86, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000024279.44013.61>

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology** 59, 89-113, 2008.

BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem.** 44, 276-287, 1971.

BILGER, W., SCHREIBER, U., BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia** 102, 425-432, 1995.

BOYDSTON, R. A., PORTER, L. D., CHAVES-CORDOBA, B., KHOT, L. R., MIKLAS, P. N. The impact of tillage on pinto bean cultivar response to drought induced by deficit irrigation. **Soil and Tillage Research** 180, 63-72, 2018. doi.org/10.1016/j.still.2018.02.011

BROZYNSKA, M., FURTADO, A., HENRY, R. J. Genomics of crop wild relatives: expanding the gene pool for crop improvement. **Plant Biotechnol J.** 14, 1070–1085, 2016. Doi:10.1111/pbi.12454

CASAÑAS, F., SIMÓ, J., CASALS, J., PROHENS, J. Toward an evolved concept of landrace. **Front. Plant Sci.** 08, 1–7, 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.00145.eCollection2017.

CAVERZAN, A., CASASSOLA, A., BRAMMER, S. P. Antioxidant responses of wheat plants under stress. **Genet Mol Biol.** 39, 1-6, 2016. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2015-0109.

CECCARELLI, S. Landraces: importance and use in breeding and environmentally friendly agronomic systems. **Agrobiodiversity conservation: securing the diversity of crop wild relatives and landraces.** April, 103–117, 2012.

CHANCE, B., MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Method Enzymol** 2: 764-775, 1955. doi.org/10.1002/9780470110171.ch14

CHAVES, M. M., COSTA, J. M., ZARROUK, O., PINHEIRO, C., LOPES, C. M., PEREIRA, J. S. Controlling stomatal aperture in Semi-Arid regions - The dilemma of saving water or being cool?. **Plant Sci.** 251, 54-64, 2016. doi:10.1016/j.plantsci.2016.06.015

COSTA, A. C., ROSA, M., MEGGUER, C. A., SILVA, F. G., PEREIRA, F. D., OTONI, W. C. A reliable methodology for assessing the in vitro photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 117, 443-454, 2014.

DARYANTO, S., WANG, L., JACINTHE, P-A. Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. **PLoS ONE** 11(5), e0156362, 2016. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156362

DIN, J., KHAN, S. U., ALI, I., GURMANI, A. R. Physiological and agronomic response of canola varieties to drought stress. **J. Anim. Plant Sci.** 21(1), 78-82, 2011.

DWIVEDI, S. L., CECCARELLI, S., BLAIR, M. W., UPADHYAYA, H. D., ARE, A. K., ORTIZ, R. Landrace germplasm for improving yield and abiotic stress adaptation. **Trends Plant Sci.** 21, 31-42, 2016. doi: 10.1016/j.tplants.2015.10.012

FAHAD, S., BAJWA, A. A., NAZIR, U., ANJUM, S. A., FAROOQ, A., ZOHAIB, A., SADIA, S., NASIM, W., ADKINS, S., SAUD, S., IHSAN, M. Z., ALHARBY, H., WU, C., WANG, D., HUANG, J. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. **Front Plant Sci.** 8, 1147, 2017. Doi: 10.3389/fpls.2017.01147.

FAROOQ, M., GOGOI, N., BARTHAKUR, S., BAROOWA, B., BHARADWAJ, N., ALGHAMDI, S. S., SIDDIQUE, K. H. M. Drought Stress in grain legumes during reproduction and grain filling. **J Agro Crop Sci** 203, 81–102, 2017.

FELLER, U. Drought stress and carbon assimilation in a warming climate: reversible and irreversible impacts. **Journal of Plant Physiology** 203, 84-94, 2016. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.04.002>

FERNANDES, F. B. P., LACERDA, C. F., ANDRADE, E. M., NEVES, A. L. R., SOUSA, C. H. C. Effect of soil management on water deficit, gas exchange and cowpea yield in the emi-Arid region. **Rev. Ciênc. Agron.** 46, 506-5015, 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20150032>

GENTY, B., BRIANTAIS, J.M., BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochim. Biophys. Acta** 990, 87-92, 1989.

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

GORAYA, G. K., KAUR, B., ASTHIR, B., BALA, S., KAUR, G., FAROOQ, M. Rapid injuries of high temperature in plants. **J. Plant Biol.** 60, 298–305, 2017. DOI 10.1007/s12374-016-0365-0

HANIF, A. & WAHID, A. Seed yield loss in mungbean is associated to heat stress induced oxidative damage and loss of photosynthetic capacity in proximal trifoliolate leaf. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**55(4), 777–786, 2018. DOI: 10.21162/PAKJAS/18.7461

HAVIR, E. A. & McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol.** 84, 450-455, 1987.

HENDRICKSON, L.; FURBANK, R.T.; CHOW, W.S. A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. **Photosynthesis Research**, v.82, p.73-81, 2004.

IPCC. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II 133 and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. **IPCC**, Geneva, 135 Switzerland, 2014. 151 pp.

JAGADISH, K. S. V., CAIRNS, J. E., KUMAR, A., SOMAYANDA, I. M., CRAUFURD, P. Q. Does susceptibility to heat stress confound screening for drought tolerance in rice?. **Funct. Plant Biology.** 38, 261–269, 2011.

KAR, M. & MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant physiol.** 57, 315-319, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>

KAUSHIK, D. & ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS - scavengers during environmental stress in plants. **Front. Environ. Sci.** 2, 53, 2014. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

KILLI, D., BUSSOTTI, F., RASCHI, A. HAWORTH, M. Adaptation to high temperature mitigates the impact of water deficit during combined heat and drought stress in C3 sunflower and C4 maize varieties with contrasting drought tolerance. **Physiol. Plant.** 159, 130–147, 2017. doi: 10.1111/ppl.12490.

KRAMER, D. M., JHONSON, G., KIIRATS, O., EDWARDS, G. E. New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. **Photosynthesis Research** 79, 209-218, 2004.

LAISK, A., LORETO, F. Determining photosynthetic parameters from leaf CO_2 exchange and chlorophyll fluorescence. **Plant Physiol.** 110, 903-912, 1996.

LAMAOU, M., JEMO, M., DATLA, R., BEKKAOU, F. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. **Front. Chem.** 6, 1–14, 2018. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00026>

MASONDO, N. A., AREMU, A. O., KULKARNI, M. G., PLAČKOVÁ, L., ŠUBRTOVÁ, M., NOVÁK, O., GRŮZ, J., DOLEŽAL, K., STRNAD, M., FINNIE, J. F., STADEN, J. V. How do different watering regimes affect the growth, chlorophyll fluorescence, phytohormone, and phenolic acid content of greenhouse-grown *Ceratocarpus trilocularis*? **J Plant Growth Regul** 50, 389–394, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9848-1>

MATHOBO, R., MARAIS, D., STEYN, J. M. The effect of drought stress on yield, leaf gaseous exchange and chlorophyll fluorescence of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agricultural Water Management** 180, 118–125, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2016.11.005>.

MOURA, L. M. F., COSTA, A. C., MÜLLER, C., SILVA-FILHO, R. O., ALMEIDA, G. M., VITAL, R. G., CASTRO, J. N., TEIXEIRA, M. B. Drought tolerance in potential oilseed plants for biofuel production. **Australian Journal of Crops Science**, 12(2), 289-298, 2018. DOI: 10.21475/ajcs.18.12.02.pne836

OXBOROUGH, K. & BAKER, N. R. Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components - calculation of qP and F_v/F_m ; without measuring F_o ; **Photosynthesis Research** 54, 135-142, 1997.

PANDEY, S., FARTYAL, D., AGARWAL, A., SHUKLA, T., JAMES, D., KAUL, T., NEGI, Y. K., ARORA, S., REDDY, M. K. Abiotic stress tolerance in plants: Myriad

roles of ascorbate peroxidase. **Front Plant Sci.** 8, 581, 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.00581

PERDOMO, J. A., CAPÓ-BAUÇÀ, S., CARMO-SILVA, E., GALMÉS, J. Rubisco and rubisco activase play an important role in the biochemical limitations of photosynthesis in rice, wheat, and maize under high temperature and water deficit. **Front Plant Sci.** 8, 490, 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.00490

PIMENTEL, C., SARR, B., DIOUF, O., ABOUD, A.C.S., ROY-MACAULEY, H. Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivados em campo (Leaf protoplasmic tolerance to drought, in two cowpea genotypes cultivated at the field). **Revista Universidade Rural Série Ciências da Vida** 22, 07-14, 2002.

PONTASCH, S., FISHER, P. L., KRUEGER, T., DOVE, S. Photoacclimatory and photoprotective responses to cold versus heat stress in high latitude reef corals. **Journal of Phycology** 321, 308–321, 2017. DOI: 10.1111/jpy.12492

PRADHAN, G. P., PRASAD, P. V. A., FRITZ, A. K., KIRKHAM, M. B., GILL, B. S. Effects of drought and high temperature stress on synthetic hexaploid wheat. **Functional Plant Biology** 39, 190-198, 2012. <https://doi.org/10.1071/FP11245>

SADE, N., GEBREMEDHIN, A., MOSHELION, M. Risk-taking plants: anisohydric behavior as a stress-resistance trait. **Plant Signal Behav.** 7(7), 767–770, 2012. Doi: 10.4161/psb.20505.

SEHGAL, A., SITA, K., SIDDIQUE, K. H. M., KUMAR, R., BHOGIREDDY, S., VARSHNEY, R. K., RAO, B. H., NAIR, R. M., PRASAD, P. V. V., NAYYAR, H. Drought or/and heat-stress effects on seed filling in food crops: impacts on functional biochemistry, seed yields, and nutritional quality. **Front. Plant Sci.** 9, 1–19, 2018.

SHARMA, P. & DUBEY, R.S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regul.** 46, 209-221, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-0002-2>.

SILVA, E. N., SILVEIRA, J. A. G., RIBEIRO, R. V., OLIVEIRA, J. Ê., CARDOSO, R. A. Photosynthetic and antioxidant responses of *Jatropha curcas* plants to heat stress: On the relative sensitivity of shoots and roots. **J Plant Growth Regul.** 37, 255–265, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9723-5>

SILVA, F. B., COSTA, A. C., ALVES, R. R. P., MEGGUER, C. A. Chlorophyll fluorescence as an indicator of cellular damage by glyphosate herbicide in *Raphanussativus* L. plants. **American Journal of Plant Sciences** 5, 2509-2519, 2014. DOI: 10.4236/ajps.2014.516265

SINGH, J., PANDEY, P., JAMES, D., CHANDRASEKHAR, K., ACHARY, V. M., KAUL, T., TRIPATHY, B. C., REDDY, M. K. Enhancing C3 photosynthesis: an outlook on feasible interventions for crop improvement. **Plant BiotechnolJ.** 12, 1217-1230, 2014. doi: 10.1111/pbi.12246

SINKOVIČ, L., PIPAN, B., SINKOVIČ, E., MEGLIČ, V. Morphological seed characterization of Common (*Phaseolus vulgaris* L.) and Runner (*Phaseolus coccineus* L.) Bean Germplasm: A Slovenian Gene Bank Example. **BioMed Research International**, vol. 2019, Article ID 6376948, 1–13, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6376948>.

SOENGAS, P., RODRÍGUEZ, V. M., VELASCO, P., CARTEA, M. E. Effect of temperature stress on antioxidant defenses in *Brassicaoleracea*. **ACS Omega** 3(5), 5237–5243, 2018. Doi: 10.1021/acsomega.8b00242

SUZUKI, N., RIVERO, R. M., SHULAEV, V., BLUMWALD, E., MITTLER, R. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytol.** 203, 32–43, 2014. doi: 10.1111/nph.12797.

VASQUEZ-TELLO, A.Y., ZUILY-FODIL, A.T., PHAM THI, J., VIEIRA, S. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. **J. Exp. Bot.** 41, 827-832, 1990.

VILE, D., PERVENT, M., BELLUAU, M., VASSEUR, F., BRESSON, J., MULLER, B., GRANIER, C., SIMONNEAU, T. Arabidopsis growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects?. **Plant Cell Environ.** 35, 702-718, 2012. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02445.x.

WAHID, A., GELANI, S., ASHRAF, M., FOOLAD, M. R.. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany** 61, 199–223, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>.

WARSCHEFSKY, E., PENMETS, R. V., COOK, D. R., VON WETTBERG, E. J. Back to the wilds: tapping evolutionary adaptations for resilient crops through systematic hybridization with crop wild relatives. **Am J Bot.** 101, 1791–1800, 2014. doi: 10.3732/ajb.1400116.

YU, J., YANG, Z., JESPERSEN, D., HUANG, B. Photosynthesis and protein metabolism associated with elevated CO₂ mitigation of the heat stress damages in tall fescue. **Environ. Exp. Bot.** 99, 75-85, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.007>.

ZANDALINAS, S. I., BALFAGÓN, D., ARBONA, V., GÓMEZ-CADENAS, A., INUPAKUTIKA, M. A., MITTLER, R. ABA is required for the accumulation of APX1 and MBF1c during a combination of water deficit and heat stress. **J Exp Bot.** 67, 5381–5390, 2016b. doi: 10.1093/jxb/erw299.

ZANDALINAS, S. I., RIVERO, R. M., MARTÍNEZ, V., GÓMEZ-CADENAS, A., ARBONA, V. Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration modulated by a reduction in abscisic acid levels. **BMCPlant Biol.** 16, 105, 2016a. doi: 10.1186/s12870-016-0791-7.

ZANDALINAS, S. I., SALES, C., BELTRÁN, J., GÓMEZ-CADENAS, A., ANDARBONA, V. Activation of secondary metabolism in citrus plants is associated to

sensitivity to combined drought and high temperatures. **Front Plant Sci.** 7, 1954, 2017. doi: 10.3389/fpls.2016.01954.

ZEGAOUI, Z., PLANCHAIS, S., CABASSA, C., DJEBBAR, R., BELBACHIR, O. A., CAROL, P. Variation in relative water content, proline accumulation and stress gene expression in two cowpea landraces under drought. **J Plant Physiol.** 218, 26-34, 2017. doi: 10.1016/j.jplph.2017.07.009.

ZHAO, J., HARTMANN, H., TRUMBORE, S., ZIEGLER, W., ZHANG, Y. High temperature causes negative whole-plant carbon balance under mild drought. **New Phytologist** 200, 330–339, 2013. <https://doi.org/10.1111/nph.12400>.

ZHOU, R., YU, X., KJÆR, K. H., ROSENQVIST, E., OTTOSEN, C-O., WU, Z. Screening and validation of tomato genotypes under heat stress using F_v/F_m to reveal the physiological mechanism of heat tolerance. **Environmental and Experimental Botany** 118, 1–11, 2015.0<http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.006>>.

ZHOU, R., YU, X., OTTOSEN, C.-O., ROSENQVIST, E., ZHAO, L., WANG, Y., YU, W., ZHAO, T., WU, Z. Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. **BMC Plant Biol.** 17, 24, 2017. Doi: 10.1186/s12870-017-0974-x

ZLATEV, Z. S., LIDON, F. C., RAMALHO, J. C., YORDANOV, I. T. Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. **Biol Plant.** 50, 389-394, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0054-9>