UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITOS DO ESTRESSE INDUZIDO POR POLIETILENO GLICOL (PEG 6000) EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L)

VANDEIR FRANCISCO GUIMARÃES

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Agricultura.

BOTUCATU –SP
Março – 2001

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITOS DO ESTRESSE INDUZIDO POR POLIETILENO GLICOL (PEG 6000) EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L)

VANDEIR FRANCISCO GUIMARÃES

Orientador: **Prof. Dr. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Agricultura.

BOTUCATU –SP
Março – 2001

Dedico este trabalho a Deus,

aos meus pais, meus irmãos e

à minha noiva Márcia

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista FCA/UNESP, Botucatu, pela oportunidade de realização do curso e à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Professores João Domingos Rodrigues e José Figueiredo Pedras pela dedicada orientação, atenção durante a realização da pesquisa e, principalmente pela amizade, minha admiração e mais sincera gratidão.

Aos Professores e funcionários do Depto. de Produção Vegetal do Setor de Agricultura e Melhoramento Vegetal da FCA/UNESP e do Depto. de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, pela amizade e apoio, meu muito obrigado.

À professora Giusephina P. P. Lima, do Departamento de Química e ao professor Paulo Roberto R. Ramos do Departamento de Biofísica, da UNESP/Botucatu, pela orientação nas análises bioquímicas e pela permissão da utilização dos laboratórios para realização de análises.

Aos Companheiros de República Fernando Collen, Renato Braga, João Ismael e Emílio Hara.

Aos colegas da Pós-Graduação, pela amizade e convivência.

À Márcia de Moraes Echer, pela amizade, compreensão e colaboração.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE QUADROS viii
LISTA DE FIGURAS ix
LISTA DE SÍMBOLOS xii
1 RESUMO 1
2 SUMMARY 3
3 INTRODUÇÃO 5
4 REVISÃO DE LITERATURA 8
4.1 Estresse Hídrico, Relações Hídricas, Trocas Gasosas e Adaptação à Seca 8
4.2 Estresse Hídrico e Metabolismo de Compostos Nitrogenados 19
4.3 Polietileno Glicol e Indução de Estresse Hídrico 26
5 MATERIAIS E MÉTODOS 31
5.1 Localização do Experimento. 31
5.2 Condições Climáticas da Casa de Vegetação 32
5.3 Material Vegetal 32
5.4 Instalação e Condução do Experimento 33
5.4.1 Imposição do Estresse Hídrico 34
5.4.2 Período de Recuperação 37
5.5 Parâmetros Avaliados 38
5.5.1 Relações Hídricas 38
5.5.1.1 Consumo Médio Diário de Água 38
5.5.1.2 Conteúdo Relativo de Água das Folhas (CRA) 38

5.5.1.3 Potencial Hídrico Foliar de Base (Ψh_f) 39

Página

5.6 Trocas Gasosas 39
5.7 Bioquímicos 40
5.7.1 Níveis de Prolina nas Folhas 40
5.7.2 Níveis de Poliaminas nas Folhas 40
5.8 Teores de Macro e Micronutrientes nas Folhas 41
5.9 Biometria 42
5.10 Delineamento Experimental 42
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
6.1 Relações Hídricas 44
6.1.1 Consumo Médio Diário de Água 44
6.1.2 Conteúdo Relativo de Água nas Folhas (CRA) 46
6.1.3 Potencial Hídrico Foliar de Base (Ψh_f) 48
6.2 Trocas Gasosas 50
6.3 Parâmetros Bioquímicos 66
6.3.1 Níveis de Prolina nas Folhas 66
6.3.2 Níveis de Poliaminas nas Folhas 69
6.4 Teores de Nutrientes nas Folhas 72
6.5 Parâmetros Biométricos 76
6.6 Estimativa de Produção 80
6.7 Considerações Finais 83
7 CONCLUSÕES 85
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87

LISTA DE QUADROS

Quadro **Página**

1 Variações no potencial osmótico da solução nutritiva completa de Hoagland & Arnon (1950), em função de variações no volume de água e concentração relativa de PEG 6000..... 35

2 Teor de macronutrientes nas folhas de dois cultivares e uma linhagem de feijão submetidos ao estresse pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). SE – sem estresse; CE – com. estresse (-0,2 MPa). Cada valor corresponde à média de quatro repetições..... 74

3 Teor de micronutrientes nas folhas de dois cultivares e uma linhagem de feijão submetidos ao estresse pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). SE – sem estresse; CE – com estresse (-0,2 MPa). Cada valor corresponde à média de quatro repetições..... 75

4 Área foliar, massa seca de folhas, massa seca total, massa seca de raízes, volume de raízes e razão raiz/parte aérea de dois cultivares e uma linhagem de feijão após imposição do estresse pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). SE – sem estresse; CE – com estresse. Cada valor corresponde à média de quatro repetições..... 78

5 Área foliar específica (AFE), peso específico foliar (PEF) e razão de peso de folha (RPF) de dois cultivares e uma linhagem de feijão após imposição do estresse pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). SE – sem estresse; CE – com estresse. Cada valor corresponde à média de quatro repetições..... 79

6 Estimativa de produção (massa seca de vagens, massa seca de 1 vagem e número de vagens) de dois cultivares e uma linhagem de feijão após imposição do estresse pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). SE – sem estresse; CE – com estresse. Cada valor corresponde à média de quatro repetições..... 82

LISTA DE FIGURAS

Figura **Página**

1 Esquema metabólico para biossíntese e degradação de prolina em plantas, proposto por Kir'van & Shevyakova (1984)..... 21

2 Caminhos da biossíntese das principais poliaminas de plantas (putrescina, espermidina e espermina). (1) arginina descarboxilase; (2) ornitina descarboxilase; (3) arginase; (4) agmatina iminohidrolase; (5) N-carbamoilputrescina amidohidrolase; (6) SAM descarboxilase; (7) espermidina sintase; (8) – espermina sintase; ACC – ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico. (Evans & Malmberg,1989)..... 25

3 Médias diárias de temperatura (ºC) e umidade relativa do ar (%), em casa-de-vegetação, no período de condução do experimento. Botucatu – SP, 2000..... 32

4 Escala em dimensões reais, utilizada para o acompanhamento e controle do nível (cm) e Ψs (MPa) da solução nutritiva, nos vasos que foram submetidos ao estresse..... 36

5 Taxa de consumo médio diário de água de dois cultivares e uma linhagem de feijão submetidos ao estresse por adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva. Letras iguais na comparação para regime hídrico dentro de cada genótipo, não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05). Valores médios de quatro repetições. As barras transversais correspondem ao desvio padrão..... 45

6 Conteúdo relativo de água (CRA) e potencial hídrico foliar de base (Ψh_f) de dois cultivares e uma linhagem de feijão, submetidos ao estresse pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) na solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). Cada ponto corresponde à média de 4 repetições. As barras transversais correspondem ao desvio padrão..... 47

7 Relação entre o conteúdo relativo de água nas folhas (CRA) e variações no potencial hídrico da solução nutritiva por adição de PEG 6000, em dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris* L.). Cada ponto corresponde à média de 4 repetições. * Significativo pelo teste t de Student (P ≤ 0,05), ** Significativo pelo teste t de Student (P ≤ 0,01)..... 48

8 Relação entre o potencial hídrico foliar de base (Ψh_f) e variações no potencial hídrico da solução nutritiva pela adição de PEG 6000, em dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris* L.). Cada ponto corresponde à média de 4 repetições. *Significativo pelo teste t de Student (P≤0,05),; ** Significativo pelo teste t de Student (P ≤ 0,01)..... 50

Figura **Página**

9 Taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) de dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris*), as 9 e 15 horas, em função de variações no potencial hídrico da solução nutritiva, por adição de PEG 6000. Cada ponto corresponde à média de quatro repetições e as barras transversais correspondem ao desvio padrão..... 52

10 Condutância estomática (g_s) de dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris*), às 9 e 15 horas, em função de variações no potencial hídrico da solução nutritiva, por adição de PEG 6000. Cada ponto corresponde à média de quatro repetições e as barras transversais correspondem ao desvio padrão..... 54

11 Taxa de transpiração de folhas (E) de dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris*), às 9 e 15 horas, em função de variações no potencial hídrico da solução nutritiva, por adição de PEG 6000. Cada ponto corresponde à média de quatro repetições e as barras transversais correspondem ao desvio padrão..... 56

12 Eficiência no uso de água (EUE) de dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris*), às 9 e 15 horas, em função de variações no potencial hídrico da solução nutritiva, por adição de PEG 6000. Cada ponto corresponde à média de quatro repetições e as barras transversais correspondem ao desvio padrão..... 58

13 Concentração de CO_2 nos espaços intercelulares (Ci) de dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris*), às 9 e 15 horas, em função de variações no potencial hídrico da solução nutritiva, por adição de PEG 6000. Cada ponto corresponde à média de quatro repetições e as barras transversais correspondem ao desvio padrão..... 60

14 Relação entre taxa de assimilação líquida de CO_2 (**A**) de dois cultivares e uma linhagem de feijão e potencial hídrico da solução nutritiva (Ψh_{sn}) durante estresse por adição de PEG 6000, às 9 horas (A, C, E) e às 15 horas (B, D, F). ** Significativo pelo teste t de Student ($P \leq 0,01$). 9 horas: Manteigão Fosco [A (t = -9,66), Gs (t = -14,56), E (t = -12,64)]; BAT 477 [A (t = -8,03), Gs (t = -7,12), E (t = -9,29); Pérola [A (t = -9,43), Gs (t = -8,89), E (t = -5,41)]. 15 horas: Manteigão Fosco [A (t = -7,72), Gs (t = -7,74), E (t = -10,70)]; BAT 477 [A (t = -6,48), Gs (t = -19,91), E (t = -11,35); Pérola [A (t = -11,88), Gs (t = -10,79), E (t = -6,48)]..... 62

15 Relação entre a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) e a taxa de transpiração (E) de folhas de dois cultivares e uma linhagem de feijão, submetidos ao estresse em condições de solução nutritiva pela adição de polietileno glicol (PEG 6000), às 9 e 15 horas, durante o período de 01 a 17 de maio de 2000. ** $P \leq 0,01$ pelo teste t de Student. A (t = 9,97); B (t = 7,01); C (t = 14,42); D (t = 9,91); E (t = 13,24); F (t = 16,03)..... 64

Figura **Página**

16 Relação entre a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) e a condutância estomática (Gs) de folhas de dois cultivares e uma linhagem de feijão, submetidos ao estresse em condições de solução nutritiva pela adição de PEG 6000, às 9 e 15 horas, durante o período de 01 a 17 de maio de 2000. ** $P \leq 0,01$ pelo teste t de Student. A (t = 13,50); B (t = 11,85); C (t = 14,37); D (t = 14,04); E (t = 18,18); F (t = 18,04)..... 65

17 Níveis de prolina nas folhas de dois cultivares e uma linhagem de feijão submetidos ao estresse por adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva. Valores médios de quatro repetições. As barras transversais correspondem ao desvio padrão. SE – sem estresse (controle); CE – com estresse..... 68

18 Níveis de poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) nas folhas de dois cultivares e uma linhagem de feijão submetidos ao estresse por adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva. Valores médios de quatro repetições. As barras transversais correspondem ao desvio padrão. SE – sem estresse (controle); CE – com estresse..... 71

LISTA DE SÍMBOLOS

CRA → Conteúdo relativo de água;

Ψh_f → Potencial hídrico foliar de base;

Ψh_{sn} → Potencial hídrico da solução nutritiva;

A → Taxa de assimilação líquida de CO_2;

g_s → Condutância estomática;

E → Taxa de transpiração da folha;

EUA → Eficiência no uso de água;

Ci → Concentração de CO_2 nos espaços intercelulares;

FFFA → Fluxo de fótons fotossinteticamente ativos;

PEG → Polietileno glicol;

DAT → Dias após a transferência para a solução nutritiva;

MSF → Massa seca de folha;

MFF → Massa fresca de folha;

AFE → Área foliar específica;

PFE → Peso específico foliar;

RPF → Razão de peso de folha.

1 RESUMO

Objetivando estudar os efeitos do estresse induzido por PEG 6000 no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), através da avaliação de relações hídricas, trocas gasosas e metabolismo de compostos nitrogenados (prolina e poliaminas), foi conduzido um experimento em casa de vegetação, no Departamento de Botânica da UNESP, Campus de Rubião Júnior, em Botucatu, SP. Foram avaliados os cultivares Manteigão Fosco e Pérola e linhagem BAT 477 em dois regimes hídricos: sem estresse e com estresse, em um arranjo fatorial, em blocos casualizados, com quatro blocos. O estresse foi imposto no início da fase reprodutiva (32 DAT), pelo aumento da concentração relativa de PEG 6000 na solução nutritiva devido à perda de água por evapotranspiração. CRA, Ψh_f, A, g_s, E, Ci e teores de prolina e poliaminas nas folhas, foram determinados durante o período de estresse e reidratação. Medidas de trocas gasosas foram feitas com um IRGA 6200 da LI-COR, as 9 e 15 horas. Parâmetros biométricos foram determinados após a imposição do estresse em ambas as plantas sem e com imposição de estresse. O CRA foi mais eficiente indicador do status hídrico da planta do que o Ψh_f, nas condições de estudo. O estresse reduziu drasticamente A, g_s e E, levando a aumentos na EUA nos níveis iniciais de estresse. Ci foi um eficiente indicador de inibição mesofílica na fotossíntese em níveis mais elevados de estresse. O cultivar Manteigão Fosco foi mais sensível ao estresse induzido por PEG 6000, sendo o primeiro a apresentar sintomas visuais nas folhas, caracterizados por descolorações internervais que posteriormente evoluíram a necroses. Reduções em CRA, A, g_s e E ocorreram de forma mais intensa e

precoce neste cultivar, que apresentou maior acúmulo relativo de prolina nas folhas, em reposta à deficiência hídrica. Os teores de poliaminas não mostraram relação direta com o estresse, ocorrendo pequeno acumulo de espermina e espermidina nos níveis iniciais de estresse para Manteigão Fosco e BAT 477. A utilização de polietileno glicol para indução de estresse hídrico permitiu diferenciar materiais de feijão quanto à tolerância ao estresse, baseando-se nos parâmetros avaliados neste estudo. O acúmulo de prolina em folhas de plantas sensíveis sugere este aminoácido como indicador de estresse, entretanto, o alto nível natural em plantas tolerantes indica seu envolvimento em processos de adaptação ao estresse hídrico.

EFFECTS OF THE WATER STRESS INDUCED BY POLYETHYLENE GLYCOL (PEG 6000) IN BEAN (*Phaseoulus vulgaris* L). Botucatu, 2001. 105p. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: VANDEIR FRANCISCO GUIMARÃES

Adviser: JOÃO DOMINGOS RODRIGUES

SUMMARY

One assay was carried out, in greenhouse conditions, to study the effects of induced stress by PEG 6000 in bean (*Phaseolus vulgaris* L.), by the evaluation of water relation, gas changes and metabolism of nitrogen compounds (proline and polyamines). The assay was conducted in the Botany Department of the College of Agronomic Science – UNESP – Botucatu, state of São Paulo. The cultivars evaluated were Manteigão Fosco and Perola and the inbred BAT477 under two water regimes: with and without stress in a factorial design, in randomized blocks with four replications. The stress was imposed at the beginning of the reproductive stage (32 DAT) increasing of the relative concentration of PEG 6000 in the nutritive solution proportional to the water loose by evapotranspiration. RWC, Ψh_f, A, g_s, E, Ci and amounts of proline and polyamines in the leaves were measured during the stress period and re-hydration. Measurements of gas exchange were done with an IRGA LI-COR (Li-6200), at 9 and 15 h. Biometric parameters were determined after imposition of the stress in both plants with and without stress. The RWC was the most efficient indicator of the plant water status than the Ψ_{hf}, in the study. The stress reduced drastically A, g_s and E, increasing the WUE in the initial levels of stress. Ci was an efficient indicator of mesofilic inhibition of photosynthesis under severe stress. The cultivar Manteigão Fosco was the most sensitive to stress induced by PEG 6000 and it was the first to show visible symptoms on leaves characterized by internerval discoloration that became necrotic. The reduction in RWC, A, g_s and E began early and was higher in this cultivar, which a greater accumulation of proline in the leaves, of stressed plants. The amounts of polyamines didn't show direct correlation with the stress imposition occurring a slight accumulation of spermine and spermidine in the initial

levels of stress for Manteigão fosco and BAT477. The utilization of polyethylene glycol to induce water stress allowed to discriminate stress tolerance in bean genotypes. The proline accumulation in the sensible plant's leaves, suggest this amino acid as a stress parameter. The natural high level of proline in tolerant plants could have some relationship in the adaptation process of water stress.

Keywords: Bean, polyethylene glycol, water stress, nitrogen compounds, gas exchange

3 INTRODUÇÃO

Em países de terceiro mundo, as leguminosas de grãos ocupam importante papel como fonte de proteínas para a classe de baixa renda. No Brasil, destaca-se o feijão (*Phaseolus vulgaris*), com a maior produção mundial, porém com baixa produtividade média, ficando em torno de 600 kg/ha nos últimos cinco anos (Agrianual, 2001). Nos últimos anos, em algumas regiões, têm-se conseguido rendimentos superiores a 3.000 kg/ha, sendo um avanço extraordinário quando comparado às produtividades máximas de 1.000 kg/ha, obtidas há 20 anos atrás. Esses resultados advêm da adoção de alta tecnologia, como cultivares melhoradas, preparo do solo, controle de ervas daninhas, pragas e doenças e mais especificamente, técnicas avançadas de irrigação (Portes, 1996), não refletindo a realidade nacional.

O feijoeiro, quando comparado a outras leguminosas de grãos, como a soja, se mostra muito sensível à falta d'água e seu rendimento é significativamente reduzido em casos de déficit hídrico moderado (Lopes et al., 1986). A deficiência hídrica, aliada à instabilidade climática, determina, em grande parte, a oscilação da produção mundial de feijão (Singh, 1995), sendo um dos principais fatores que contribuem para a grande distância existente entre o potencial produtivo das culturas e a produção conseguida de fato (Subbarao et al., 1995). Mais de 60% dos cultivos de feijão em países da América Latina, África e Ásia sofrem efeitos do déficit hídrico em algum estádio de desenvolvimento (Singh, 1995).

Alguns autores mostraram a existência de diversidade fenológica entre cultivares de *P. vulgaris*, indicando ser este um efeito importante na determinação do potencial produtivo e a adaptação ao déficit hídrico (Wallace, 1985; White & Izquierdo, 1991; White et al., 1992). Mecanismos de adaptação, através de estratégias de escape, "evitamento" e tolerância à desidratação, podem ser selecionados para aumentar a produtividade em regiões com baixa pluviosidade.

Efeitos do estresse hídrico na taxa de assimilação de CO_2, têm sido muito estudado nos últimos anos, buscando relaciona-los com o comportamento estomático, transpiração e economia de água pelas plantas. Entretanto, controvérsias ainda persistem quanto a contribuição de limitações estomáticas e não estomáticas para a fotossíntese (Boyer, 1976; Kaiser, 1987; Chaves, 1991). Relações entre potencial hídrico do substrato, potencial hídrico da folha e taxa de assimilação de CO_2 e concentração de CO_2 no interior da folha são utilizadas para o entendimento de diferenças entre estas limitações (Von Caemmerer & Farquhar, 1981; Castonguay & Markhart, 1991).

Parâmetros bioquímicos também são investigados, devido ao conhecido efeito do estresse hídrico no metabolismo secundário das plantas (Hsiao, 1973; Rabe, 1990), particularmente o acúmulo de prolina (Rena & Masciotti, 1976; Hanson & Hitz, 1982; Lazcano-Ferrat & Lovatt, 1999), poliaminas (Galston, 1988; Galston & Kaur-Sawhney, 1990), suas relações com o estresse e prováveis funções quanto à adaptação à deficiência hídrica. A capacidade de acumular prolina em reposta à deficiência hídrica, tem sido associada com tolerância à seca em plantas cultivadas.

Além de estudos tradicionais de relações hídricas em substratos sólidos em casa de vegetação e campo, são realizadas também simulações de estresse hídrico em meio líquido, com plantas intactas ou órgãos destacados. Em estudos desta natureza, o polietileno glicol (PEG) é muito utilizado, sendo vantajoso por proporcionar maior controle dos níveis de estresse a serem aplicados (Lawlor, 1970; Jarvis, 1973; Oertli, 1986; Raggi, 1992). Este polímero é considerado superior a sais, açúcares ou outros compostos orgânicos para simulação de estresses (Janes, 1974), principalmente devido ao seu alto peso molecular e por ser inerte, quando em alta pureza. Estudos específicos abrangendo aspectos fisiológicos e bioquímicos, na cultura do feijoeiro, relacionados ao estresse induzido por PEG são escassos.

Tendo em vista a grande influência da deficiência hídrica em perdas na produção da cultura do feijão no Brasil e em outros países, torna-se imprescindível o estudo cada vez mais detalhado dos processos envolvidos nas respostas e adaptação à falta d'água, além de maximização do uso da água e devido a seu alto custo para agricultura. Neste contexto, o presente trabalho teve como principais objetivos:

- Estudar efeitos do estresse induzido por polietileno glicol (PEG 6000) em parâmetros de relações hídricas e trocas gasosas na cultura do feijoeiro;
- Investigar respostas do metabolismo de compostos nitrogenados, particularmente prolina e poliaminas e suas relações com adaptações do feijoeiro nestas condições.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Estresse Hídrico, Relações Hídricas, Trocas Gasosas e Adaptação à Seca

A água é a substância mais comum e importante na superfície da terra, sendo essencial para a existência da vida. Na planta, a água desempenha várias funções, como constituinte dos tecidos e solvente, tendo grande importância na manutenção da turgescência e crescimento celular (Kramer & Boyer, 1995).

Os efeitos do déficit hídrico foram investigados nas últimas décadas a diferentes níveis de organização, funcionamento e metabolismo celular (Hsiao, 1973; Schulze, 1986; Turner, 1986). Controle do "status" hídrico (Mansfield & Davies, 1985), seus efeitos na fotossíntese (Boyer, 1976; Kaiser, 1987; Chaves, 1991) bem como crescimento, produção e adaptação das plantas (Turner & Bagg, 1981), são discutidos.

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é muito sensível ao estresse hídrico, tendo perdas significativas na produção em déficit hídrico moderado. Este desencadeia um complexo de respostas, iniciando-se com sua percepção, que leva à transdução do sinal, manifestando-se em mudanças a nível celular, fisiológico e de desenvolvimento. O conjunto de respostas observadas depende de sua severidade e duração, genótipo, estádio fenológico e outros fatores ambientais (Bray, 1993). Mudanças na expansão celular, condutância

estomática, fotossíntese e, conseqüentemente, no acúmulo de matéria seca, são verificadas (Hsiao, 1990).

No feijoeiro, os estádios iniciais do período reprodutivo são os mais afetados, podendo a produtividade decrescer mais de 50%, quando o déficit hídrico ocorre durante a pré-floração e floração (Magalhães & Millar, 1979). A maior sensibilidade nestes estádios provavelmente se deve ao efeito direto da desidratação na fotossíntese (Westgate & Boyer, 1986; Kramer & Boyer, 1995) e ao curto período de floração, com fixação de vagens praticamente nula a partir do 10º dia de floração (Magalhães & Millar, 1979).

Estudando os efeitos do déficit hídrico em diferentes estádios de desenvolvimento do feijoeiro (pré-floração, florescimento e desenvolvimento das vagens), Gunton & Evenson (1980), verificaram decréscimo da matéria seca, de 31 a 41% e 31 a 52%, quando as plantas foram submetidas ao déficit no pré-florescimento e florescimento, respectivamente.

Segundo Guimarães (1998) área foliar e massa seca da parte aérea foram os parâmetros biométricos mais afetados pelo déficit hídrico, em quatro cultivares de feijão, com perdas de 50 a 60% para área foliar e 40 a 50% para a massa seca da parte aérea, em relação ao controle, após 10 dias de suspensão da irrigação. Dados também observados por Pimentel et al. (1990); Costa et al. (1991); Pimentel & Perez (2000).

Plantas de feijão quando submetidas ao déficit hídrico, durante o estádio vegetativo, apresentaram efeito indireto na produção de grãos, pela redução da área assimilatória. Quando o déficit ocorreu durante a floração, provocou aborto e queda de flores, reduziu o número de vagens por planta e durante o enchimento de grãos, prejudicou a formação das sementes, diminuindo o seu peso (Guimarães, 1996). Costa et al. (1999) afirmou que o déficit hídrico durante os estádios de florescimento e enchimento de vagens, reduziu significativamente a iniciação de vagens e a taxa de crescimento das vagens. Segundo estes autores, na maioria das leguminosas cultivadas, o número de vagens por planta tem clara correlação com a produção final sobre várias condições ambientais, incluindo deficiência hídrica.

Dentre os parâmetros fisiológicos que expressam o “status” hídrico da planta o potencial hídrico foliar é amplamente utilizado. Além deste, outros são propostos, sendo o teor relativo de água (TRA) ou conteúdo relativo de água (CRA), também um bom

indicador em estudos de relações hídricas (Sinclair & Ludlow, 1985). Este parâmetro reflete o balanço entre o fornecimento de água na folha e a taxa de transpiração (Schonfeld et al., 1988), sendo uma técnica barata e de rápida determinação.

Rodrigues (1973) relata que as medições do teor de água na planta são geralmente realizadas nas folhas, mas também podem ser feitas em outros tecidos e órgãos. Para tecidos não fotossintetizantes, a avaliação do teor de água, com base em peso de matéria seca é geralmente satisfatória. No entanto, para os tecidos foliares, a expressão com base em peso de matéria seca pode não ser representativa, devido às alterações diurnas provocadas pela fotossíntese. De acordo com o autor, para os tecidos foliares, a determinação mais consistente parece ser o teor de água, obtido pela flutuação do tecido em água, até eliminar o déficit existente no momento da amostragem, surgindo o conceito de turgescência relativa, atualmente denominada de teor relativo de água, que pode refletir o potencial hídrico do solo.

Estudando a influência de diferentes regimes de umidade do solo em gladíolos, Rodrigues (1973) verificou que o teor relativo de água apresentou correlação positiva com o teor de umidade do solo, sendo o mesmo verificado por Minarelli (1990) em plantas de feijão e Aguiar Netto (1993) em plantas de ervilha.

O potencial hídrico foliar tem sido muito utilizado em estudos de relações hídricas de plantas (Passioura, 1997). É um bom indicador do “status” hídrico, principalmente em plantas que não fazem ajustamento osmótico, como parece ser o caso do feijão (Kramer & Boyer, 1995). Normalmente, mesmo em hidratação satisfatória, o potencial hídrico foliar decresce nas horas mais quentes do dia, devido ao aumento da taxa transpiratória em função da temperatura e déficit de pressão de vapor (Schönher, 1982). Em muitos casos, as determinações têm sido realizadas antes do nascer do sol (“pre-down”), por proporcionar menor influência de variações climáticas que ocorrem durante o dia e influenciam no “status” hídrico da folha, e dificultam a interpretação dos resultados (Hsiao, 1990).

Produtos da fotossíntese constituem a matéria-prima para todos os processos metabólicos, sendo a base da produtividade agrícola e estando sujeita a fatores inerentes à própria planta como a capacidade de fixar CO_2, tipo e idade de folhas, área fotossinteticamente ativa, etc. e também ambientais como a concentração de CO_2, intensidade luminosa, disponibilidade de água, temperatura e nutrição mineral. A fotossíntese só poderia revelar sua máxima capacidade estando todos estes fatores no ótimo.

Pimentel et al. (1995) afirmaram que valores máximos de assimilação fotossintética, transpiração e condutância estomática, no feijoeiro, ocorrem na pré-floração, Neste estádio, portanto, a cultura se torna muito sensível a estresses ambientais (Magalhães & Millar, 1979).

O'Toole et al. (1977) trabalhando com feijoeiro, verificaram que a fotossíntese líquida e a transpiração começaram a ser reduzidas quando o potencial hídrico foliar estava entre –0,3 e –0,5 MPa. Com o decréscimo do potencial hídrico para –0,9 a –1,0 MPa, a fotossíntese líquida e transpiração foram praticamente nulas. Em soja, a fotossíntese é praticamente inalterada até que o potencial hídrico foliar atinja valores inferiores a –1,1MPa (Boyer, 1970).

Estudos de Krampitz et al. (1984); O'Toole et al. (1976; 1977); Sharkey & Seemann (1989) mostram que a assimilação de CO_2 em *P. vulgaris* cessa completamente a potencial hídrico foliar em torno de –1,0 MPa. Ludlow et al. (1985) entretanto, notaram que em condições de campo, ajustamento estomático é verificado quando o estresse se dá lentamente, ocorrendo assim um processo de aclimatação. Neste caso, a condutância estomática e a fotossíntese líquida foram mantidas a potenciais hídricos foliares mais baixos. Estes autores também afirmam que quando o estresse é aplicado em plantas crescidas em potes pequenos, onde potenciais hídricos do solo e da folha caem rapidamente, ajustamentos estomáticos são muito pequenos ou não ocorrem.

O fechamento estomático é considerado a primeira linha de defesa contra a desidratação, sendo um processo mais rápido e flexível que alternativas como mudanças no ciclo de vida, crescimento de raiz ou área foliar, que são adaptações a longo prazo. Quando os estômatos fecham, protegendo a planta contra a perda d'água, eles simultaneamente restringem a assimilação de carbono pelas plantas. O controle estomático representa a maior fração da limitação total da fotossíntese, porém aumento na eficiência do uso de água é observado em genótipos bem adaptados (Chaves, 1991).

Castonguay & Markhart (1992) estudando *P. vulgaris e P. acutifolius*, verificaram que sob estresse hídrico, reduções na fotossíntese estavam associadas às mudanças na condutância da folha. Em ambas as espécies, houve aumento na eficiência do uso de água (EUA) com o decréscimo do potencial hídrico foliar e da condutância estomática. Estes autores sugerem que alta EUA combinada a estômatos mais responsivos à reduções no

potencial hídrico foliar, poderia contribuir com outras adaptações já descritas, como profundidade do sistema radicular (Markhart, 1985; Guimarães, 1996) e respostas na orientação foliar (Parsons & Howe, 1984). Diferenças genotípicas na resposta dos estômatos ao déficit hídrico, são mencionadas para várias espécies e podem ser usadas na seleção de genótipos com maior EUA.

Alguns autores demonstraram que a assimilação de carbono pelas folhas pode ser limitada pelo fechamento estomático em resposta ao déficit hídrico, ou por aumento na diferença de pressão de vapor entre a folha e o ar (Lange et al., 1971; Bunce, 1986). Evidências sobre o efeito direto do secamento do solo na condutância estomática, não mediado por mudanças no "status" hídrico foliar, também são mencionadas (Blackman & Davies, 1985; Davies & Zhang, 1991; Zhang & Davies, 1991; Tardieu, 1996).

Segundo Passioura (1988) e Davies & Zhang (1991) não parece existir relação direta entre potencial hídrico foliar e condutância estomática ou taxa de alongamento de folhas. Sinais especiais envolvendo respostas ao déficit hídrico do sistema radicular ou parte dele, mostram que a condutância estomática, fotossíntese e taxa de expansão foliar são, em sua maior parte, independentes do "status" hídrico da folha, principalmente no início da percepção do déficit hídrico. As raízes têm função primordial na percepção do estresse hídrico via emissão de sinais químicos, os quais viajam para a parte aérea via xilema. Esta mensagem contribui para o controle da abertura estomática, taxa de expansão foliar e, provavelmente, muitos outros processos (Tardieu, 1996). A natureza da mensagem, até o momento, ainda gera controvérsias, porém o ácido abscísico (ABA) tem, provavelmente, contribuição crucial no processo, verificada pelo aumento da concentração de ABA na seiva do xilema em reposta ao déficit hídrico (Zhang & Davies, 1991; Tardieu et al., 1993). É importante ressaltar ocorrência de fechamento estomático em resposta ao déficit hídrico sem aumento da concentração de ABA na seiva do xilema, sugerindo que outros componentes, além do ABA, podem contribuir como sinais entre raiz e parte aérea. Citocinina, pH e composição mineral da seiva podem estar envolvidos (Schurr et al., 1992).

O dióxido de carbono é um dos fatores limitantes ao crescimento das plantas. Embora sua concentração no ambiente seja muito estável, a concentração no interior das plantas depende da abertura estomática e pode variar com as condições ambientais, afetando desse modo o crescimento das mesmas. A concentração interna de CO_2 (Ci) é então

um importante parâmetro para estudo, mas somente a concentração externa pode ser determinada diretamente (Renou et al., 1990). O método mais freqüente para se estimar a Ci tem sido baseado em aplicações da lei de Fick para difusão de gases, para a troca de CO_2 e vapor d'água entre a planta e a atmosfera (Renou et al., 1990). Este parâmetro vem sendo utilizado em estudos de relações hídricas, com objetivo de distinguir limitações estomáticas e mesofílicas na fotossíntese.

Há mais de duas décadas é aceito que a inibição na fotossíntese em folhas de plantas, sob déficit hídrico, se deve à reduções na condutância estomática e inibição no metabolismo dos cloroplastos. Medidas de trocas gasosas têm contribuído para a distinção de efeitos estomáticos e não estomáticos na inibição da fotossíntese, porém resultados quanto à magnitude e o momento que se iniciam limitações mesofílicas, sob déficit hídrico são conflitantes, em parte pela dificuldade metodológica na obtenção de medidas diretas desta limitação como discutido por Renou et al. (1990). Assume-se que a não ocorrência de mudança aparente na Ci, indica decréscimo na fotossíntese no mesofilo em paralelo à condutância estomática, contudo, não parece ser totalmente correto esta afirmação (Chaves, 1991).

Medidas de fotossíntese em altos níveis de CO_2 em várias plantas C_3 e condições de saturação de luz mostram que a capacidade fotossintética somente foi reduzida quando o conteúdo relativo de água (CRA) atingiu valores abaixo de 70%, evidenciando a grande resistência do aparato fotossintético (Kaiser, 1987). Conseqüentemente, no caso de plantas C_3, decréscimo na taxa de assimilação de CO_2 de folhas sujeitas a condições de déficit hídrico moderado é atribuído ao fechamento estomático (Brestic et al., 1995). Esta conclusão implica que durante a desidratação, a concentração de CO_2 no cloroplasto de uma folha iluminada é baixa e provavelmente perto do ponto de compensação, quando a taxa de assimilação líquida de CO_2 está próxima de zero. Realmente, estudos de fotossíntese em folhas desidratadas, usando medidas de fluorescência de clorofila (Cornic & Briantais, 1991) e absorção de $^{18}O_2$ (Renou et al., 1990), mostram que o Ci é baixo.

Farquhar & Sharkey (1982) em revisão sobre condutância estomática e fotossíntese, indicam que inibição da assimilação de carbono em alta pressão parcial de CO_2 intercelular, ocorrendo simultaneamente com fechamento estomático, levando a concluir que grau similar de limitação é encontrado em folhas estressadas e não estressadas, onde o aparato

fotossintético já estava inibido por algum tempo, antes dos estômatos começarem a fechar. Esta afirmação concorda com Boyer (1976) e Kaiser (1987), que sugerem que a pressão parcial de CO_2 tem permanecido inalterada em folhas de plantas sob estresse hídrico, em função do declínio de ambas, a condutância estomática e fixação de CO_2.

Relações entre taxa de assimilação líquida de CO_2 e concentração de CO_2 da nos espaços intercelulares (A:Ci) são utilizadas por pesquisadores como ferramenta para o entendimento de diferenças entre espécies quanto à capacidade do maquinário fotossintético. Castonguay & Markhart (1992) notaram em estudos com *P. vulgaris* e *P. acutifolius*, reduções significativas na taxa de assimilação de CO_2 em alta Ci, o que não ocorreu em baixa Ci, concordando com o descrito por Von Caemmerer & Farquhar (1981). Segundo estes autores, os resultados sugerem que o estresse hídrico tem impacto na capacidade de regeneração da ribulose-1,5-bifosfato (RuBP), como indicam Sharkey & Seemann (1989) e com menor efeito na atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (RuBPcase). O'Toole et al. (1976) também verificaram redução na atividade da RuBPcase com o estresse hídrico. Esta redução pode ser devido a decréscimo na síntese da enzima ou aumento de sua degradação (Vu et al., 1987).

Von Caemmerer & Farquhar (1981), relataram que em plantas C_3, a inclinação inicial da curva de resposta da fotossíntese à concentração de CO_2 é função da quantidade e atividade da RuBPcase na folha. Esta relação também foi utilizada por outros autores para estudar e comparar espécies, quanto à eficiência de carboxilação em condições de déficit hídrico.

Johnson et al. (1987) estudando espécies de trigo, relacionaram a Ci com o potencial hídrico foliar, verificando que quando o mesofilo é severamente afetado pelo estresse hídrico a Ci fica constante ou até aumenta. Castonguay & Markhart (1992) verificaram em *P. vulgaris* e *P. acutifolius*, entretanto, que a Ci decresceu com reduções no potencial hídrico, levando a crer que reduções na condutância estomática foram relativamente maiores que as reduções na atividade do aparato fotossintético. Segundo os autores, uma relação linear entre fotossíntese líquida e condutância estomática, não implica necessariamente que as mudanças na fotossíntese líquida sejam devido à mudanças na condutância difusiva de CO_2 para dentro da folha. O decréscimo da fotossíntese líquida em resposta à redução do

potencial hídrico foliar, pode ser resultado de reduções na condutância estomática e condutância mesofílica para a fotossíntese.

Efeitos relacionados a fechamento heterogêneo dos estômatos em resposta ao déficit hídrico também têm sido discutidos (Downton et al., 1988; Sharkey & Seeman, 1989; Gunasekera & Berkowitz, 1992). Downton et al. (1988) estudando causas não estomáticas na inibição da fotossíntese de videira sob estresse hídrico, utilizou medidas de fluorescência e auto-diagramas de folhas expostas a pequenos pulsos de $^{14}CO_2$, confirmando desuniformidade no fechamento estomático nas folhas. Estes resultados levaram os autores a sugerir que a pressão parcial de CO_2 intercelular, derivada de dados de trocas gasosas, pode ser superestimada. Medidas de fluorescência de clorofila são importantes para maior precisão nas determinações. Porém os resultados de Gunasekera & Berkowitz (1992) indicam que este não é um fenômeno universal, não sendo verificado, por exemplo, em plantas de espinafre, ocorrendo, no entanto, em folhas de feijão sob estresse moderado (Sharkey & Seemann, 1989; Gunasekera & Berkowitz, 1992).

Segundo Brestic et al. (1995) o aumento da fotorrespiração em detrimento da redução da assimilação de CO_2 em plantas sob déficit hídrico poderia estar relacionado ao decréscimo da Ci em folhas de plantas C3, favorecendo a atividade da ribulose-1,5-bisfosfato oxigenase (RuBPoxi). Estes autores relataram, estudando folhas de feijão iluminadas, sob estresse hídrico, que a fotorrespiração não protegeu o aparato fotossintético contra danos da alta luminosidade, sendo a dissipação do excesso de energia pela antena do fotossistema 2 (PSII) o principal mecanismo que protegeu contra os efeitos da alta luminosidade, em condições de estresse hídrico.

Outra característica importante é verificada, quando plantas sob estresse hídrico são reidratadas. A turgescência das plantas retorna ao nível inicial antes dos eventos metabólicos. Este atraso é notado na atividade estomática em plantas reidratadas, após serem submetidas ao estresse hídrico (Bengstson et al., 1979).

São verificadas diferenças específicas na habilidade de recuperação das plantas após desidratação severa, muitas relacionadas a características de toda a planta e outras associadas a algumas propriedades da parede celular, como estabilidade e rigidez (Kaiser, 1987) ou por diferenças na eficiência dos “mecanismos de reparo” (Levitt, 1980).

É conhecido grande número de mecanismos de adaptação ao déficit hídrico desenvolvido pelas plantas. Em condições naturais, estes são mais importantes para a sobrevivência da planta que para alta produtividade (Subarao et al., 1995). Estes mecanismos podem ser selecionados em plantas para aumentar a produtividade agrícola em regiões com baixa pluviosidade (Turner, 1986). O importante é identificar os atributos que contribuem para a adaptação à seca nos ambientes nativos e utilizá-los para combinar com cultivares já utilizadas nos sistemas de produção dos dias atuais (Subbarao et al., 1995). O que se busca em plantas cultivadas é a manutenção de produtividade sob estresse relativamente brando. Ao se considerar uma planta tolerante, deve-se levar em conta aquelas que possuem a habilidade de manter rendimentos razoáveis na ocorrência de déficit hídrico moderado, e não a habilidade de sobreviver na ocorrência de prolongados períodos de déficit hídrico (Tardieu, 1997).

Dentre as estratégias desenvolvidas pelas plantas como mecanismos de adaptação à seca, Subbarao et al. (1995) em sua revisão, baseando-se em estudos de Fischer & Turner (1978); Levitt (1972; 1980) e Turner (1986), classificou-as nas seguintes estratégias: escape, "evitamento" e tolerância à desidratação. A primeira se baseia num rápido desenvolvimento fenológico durante o período de disponibilidade de água, antes que a seca se estabeleça, minimizando o impacto na produção das culturas em ambientes onde a estação de crescimento é curta. A segunda estratégia é caracterizada por mecanismos que buscam manter o "status" hídrico da planta dentro de limites que permitam o funcionamento normal do metabolismo, quando o suprimento de água é limitado ou a demanda evapotranspiratória é excessiva, podendo ser dividida em dois grupos: maximização da absorção de água através de um aumento na capacidade do sistema radicular e controle das perdas de água e otimização do uso da água absorvida para a produção de matéria seca. A terceira estratégia se caracteriza pela habilidade das células em continuar o metabolismo, mesmo com certo nível de desidratação dos tecidos. Além destas estratégias, Subbarao et al. (1995) ainda evidencia a importância de características que contribuem para uma boa performance das culturas como estabelecimento de plântulas, rápido vigor de crescimento e manutenção de área foliar. Estas são determinadas pela integração de mecanismo que podem contribuir tanto para o "evitamento" como para a tolerância.

Controle estomático (O'Toole et al., 1977; Schulze, 1986) e desenvolvimento do sistema radicular (Kuruvadi & Aguilera, 1990; Guimarães, 1996), são

considerados os principais mecanismos de tolerância à seca em feijão. Estes são importantes estratégias de "evitamento", reduzindo a perda de água por transpiração e maximizando a absorção de água sob estresse hídrico, contribuindo assim para a manutenção do "status" hídrico da planta (Turner, 1986; Subbarao et al., 1995; Tardieu, 1997). O potencial hídrico foliar, por sofrer progressivo abaixamento mediante o dessecamento progressivo do solo (Pimentel, et al., 1990; Correia & Pereira, 1994; 1995), permite avaliar a performance das plantas sob estresse hídrico (Passioura, 1997), podendo ser utilizado para mostrar respostas quanto à eficiência dos mecanismos de "evitamento" (Tardieu, 1997).

A magnitude da redução da condutância estomática é variável entre cultivares (Bascur et al., 1985). Guimarães et al. (1996) trabalhando com feijão, relataram que a umidade do solo exerce grande influência sobre o comportamento estomático e com a intensificação progressiva do estresse hídrico houve diminuição da condutância estomática, minimizando as perdas de água por transpiração. Esta função dos estômatos em prevenir a desidratação da planta, provoca limitações na difusão de CO_2, diminuindo a taxa fotossintética (Farquhar & Sharkey, 1982); assim, este mecanismo de adaptação é desejável quando o estresse hídrico não é muito longo. O fechamento estomático, durante a seca é uma característica positiva, e um critério que pode ser utilizado para o melhoramento, buscando plantas tolerantes ao déficit hídrico (Lafray & Louguet, 1990). Markhart (1985) comparou o desempenho de *P. vulgaris* e *P. acutifolius*. *P. vulgaris,* considerado sensível à seca, manteve seus estômatos relativamente abertos quando o potencial hídrico foliar estava entre -1,0 e -1,4 MPa, enquanto os estômatos de *P. acutifolius* fecharam com valores próximos de -1,0 MPa. Este comportamento, segundo o autor, é uma estratégia de adiamento de desidratação.

Segundo Schulze (1986) três respostas dos estômatos são consideradas de maior importância para explicar o controle da troca gasosa sob déficit hídrico: resposta direta à umidade do ar; resposta direta ao funcionamento das raízes e resposta às condições do mesófilo, sendo as duas primeiras consideradas de importância primária para a performance das plantas sob estresse hídrico.

O papel do sistema radicular na adaptação à seca também deve ser destacado. Sendo as raízes heterotróficas, seu crescimento depende do suprimento de assimilados provenientes da parte aérea. Este suprimento não parece ser diminuído por estresse hídrico moderado, mas freqüentemente parece ser aumentado por ele (Hsiao &

Acevedo, 1974). Tem sido observado que o déficit hídrico aumenta a razão raiz/parte aérea, com evidências no aumento do crescimento radicular (Hsiao & Acevedo, 1974; Schultz, 1974). Esta resposta, provavelmente se deve ao fato do estresse hídrico afetar o crescimento da parte aérea mais que a fotossíntese, aumentando assim os assimilados disponíveis para as raízes (Hsiao & Acevedo, 1974). Aumento na razão raiz/parte aérea durante o déficit hídrico, pode ser vantajoso, ajudando a planta a igualar seu suprimento de água à demanda evaporativa das folhas, mas esta resposta tem um alto custo respiratório, podendo reduzir a eficiência do uso de água (Passioura, 1982).

White & Castilho (1988) mostram que genótipos de feijão tolerantes à seca estenderam suas raízes até 1,2m enquanto genótipos sensíveis não conseguiram estender além de 0,80m. Guimarães et al. (1996) estudaram os cultivares Carioca, BAT 477 e RAB 96 em três tratamentos hídricos: irrigado continuamente, déficit moderado e severo. BAT 477 e Carioca apresentaram, nos tratamentos com estresse hídrico, em relação ao irrigado, maior densidade radicular nas camadas mais profundas, do que a RAB 96. Observou-se ainda que, a eficiência radicular na absorção de água aumentou com a profundidade do solo, independente do nível de deficiência hídrica ou dos genótipos estudados. A eficiência foi superior na BAT 477 e na Carioca, principalmente nas camadas mais profundas. Isto mostra a existência de variabilidade nesta característica, podendo ser mais explorada em programas de melhoramento.

Segundo Kuruvadi e Aguillera (1990) o peso do sistema radicular mostra alta correlação com o rendimento da cultura, número de vagens/planta, peso seco da porção vegetativa e número de dias até a maturação fisiológica, podendo, estes parâmetros, serem de fácil determinação, utilizados na identificação indireta de cultivares com maior sistema radicular.

Alguns autores têm sugerido a análise de parâmetros morfológicos da parte aérea das plantas em estudos de tolerância ao déficit hídrico. Boyer (1983) afirma que para o melhoramento genético, a performance da cultura sob condições de seca depende da manutenção da área foliar, o que permitirá rápida recuperação após o estresse.

Gwathmey & Hall (1992) estudando dois genótipos de caupi, em regime irrigado e sob déficit hídrico, verificaram diferenças entre eles quanto à manutenção da área foliar. Blum (1997) salienta que existe grande correlação entre a área foliar e a

produtividade da cultura. Em muitos casos, a manutenção da área foliar é fator determinante da produção em condições de seca (Fischer & Turner, 1978).

Estudando o efeito do déficit hídrico em parâmetros morfo-fisiológicos de quatro cultivares de feijão, Guimarães (1998) verificou que a área foliar, massa seca da parte aérea e massa seca radicular forma parâmetros indicadores do estresse hídrico, apresentando maiores diferenças entre cultivares que parâmetros fisiológicos, mostrando uma estreita relação com a produção de grãos. Blum (1997) comenta que a fenologia e a área foliar têm importante função nas respostas das plantas e adaptação à seca. Segundo este autor, estas características devem ser consideradas, antes de se buscar parâmetros fisiológicos mais complexos para explicar as respostas ou adaptações das plantas ao estresse hídrico.

Para o feijoeiro (*P. vulgaris*), em estudos buscando o entendimento dos mecanismos de tolerância à seca e a seleção de genótipos mais tolerantes, Singh (1995) evidenciou a variabilidade genética dentro desta espécie. Este fato possibilita avanços nesta área, podendo trazer grandes benefícios, principalmente para os países de terceiro mundo, que não têm recursos para investimento em altas tecnologias, como irrigação, tendo a maioria de suas áreas agricultáveis sujeitas à ocorrência de déficit hídrico.

4.2 Estresse Hídrico e Metabolismo de Compostos Nitrogenados

Estresses ambientais como deficiências minerais, déficit e excesso de água, estresse salino, temperaturas extremas e doenças levam ao acúmulo de vários compostos contendo nitrogênio em plantas. Rabe (1990) enumera os seguintes compostos nitrogenados que normalmente acumulam durante condições de estresse: aminoácidos proteicos (arginina, prolina, lisina, histidina, glicina e serina); aminoácidos não proteicos (citrulina e ornitina); amidas (glutamina, e asparagina); diaminas (agmatina, N-carbamyl putrescina e putrescina); polimiaminas (espermina e espermidina).

Efeitos do estresse hídrico no metabolismo das plantas têm sido muito discutidos (Hsiao, 1973), sendo que grandes alterações são verificadas no metabolismo secundário. As concentrações de aminoácidos livres nas folhas são significativamente aumentadas com o déficit hídrico (Barnett & Naylor, 1966), em especial o acúmulo de prolina (Rena & Masciotti, 1976; Hanson & Hitz, 1982), que normalmente, quando comparada a

outros aminoácidos, apresenta baixas concentrações, em hidratação satisfatória. Decréscimo de carboidratos e ácidos orgânicos, produtos de assimilação primária, também são verificados (Lawlor & Fock, 1977), além do aumento dos teores de substâncias com atividade fito-hormonal (ABA e etileno) (Hanson & Hitz, 1982; Smith, 1985; Galston & Kaur-Sawhney, 1990).

A função da prolina parece diferir de espécie para espécie (Ford, 1984; Treichel et al., 1984), sendo seu aumento explicado por diferentes caminhos (Joyce et al., 1992). Seu acúmulo pode ser considerado sintoma do estresse (Jäger & Meyer, 1977; Becker & Fock, 1986), um processo de armazenamento de carbono e nitrogênio para sobrevivência devido à sua grande solubilidade (Barnett & Naylor, 1966; Jäger & Meyer, 1977; Sivaramakrishman et al., 1988), podendo ser utilizado rapidamente após reidratação (Hsiao, 1973) e um mecanismo de ajustamento osmótico, no mínimo em algumas plantas, quando em déficit hídrico (Ford, 1984; Shevyakova, 1984; Treichel et al., 1984; Sivaramakrishman et al., 1988; Voetberg & Sharp, 1991). A prolina poderia também funcionar como protetora de enzimas e membranas (Hanson & Hitz, 1982) e ter importante função na estabilização de proteínas (Cyr et al., 1990).

Kir'yan & Shevyakova (1984) propuseram um esquema metabólico simplificado, onde se destacam os caminhos de biossíntese e degradação para prolina em plantas (Figura 1).

Raggi (1994) também verificou aumento progressivo no "pool" de aminoácidos livres em folhas estressadas de feijão, quando comparadas ao controle. Segundo o mesmo autor, nenhum caminho metabólico sozinho parece ser responsável por ampliação ou mudanças no "pool" de aminoácidos livres, sendo propostas algumas causas prováveis: inibição da síntese de proteínas (Dhindsa & Cleland, 1975); degradação de proteínas (Roy-Macauley, 1992) e decréscimo na exportação de aminoácidos e amidas (Tully et al., 1979). Lazcano-Ferrat & Lovatt (1999), no entanto, estudando o efeito do estresse hídrico em *P. vulgaris* e *P. acutifolius*, não encontraram correlação entre queda no teor de proteínas e acúmulo de prolina em folhas de ambos os genótipos, sugerindo que o acúmulo de prolina induzido pelo déficit hídrico não foi dependente da inibição da síntese de proteínas ou aumento de sua degradação.

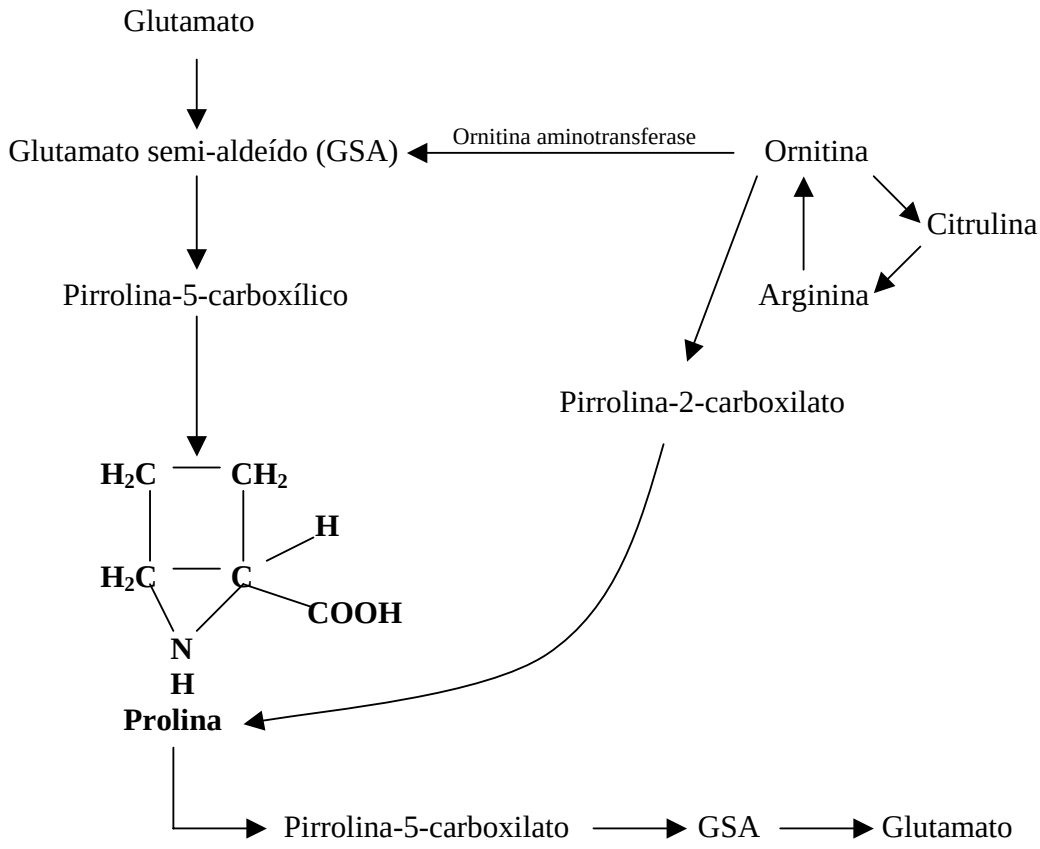

Figura 1. Esquema metabólico para biossíntese e degradação de prolina em plantas, proposto por Kir'yan & Shevyakova (1984).

Raggi (1994) também verificou aumento progressivo no "pool" de aminoácidos livres em folhas estressadas de feijão, quando comparadas ao controle. Segundo o mesmo autor, nenhum caminho metabólico sozinho parece ser responsável por ampliação ou mudanças no "pool" de aminoácidos livres, sendo propostas algumas causas prováveis: inibição da síntese de proteínas (Dhindsa & Cleland, 1975); degradação de proteínas (Roy-Macauley, 1992) e decréscimo na exportação de aminoácidos e amidas (Tully et al., 1979). Lazcano-Ferrat & Lovatt (1999), no entanto, estudando o efeito do estresse hídrico em *P. vulgaris* e *P. acutifolius*, não encontraram correlação entre queda no teor de proteínas e acúmulo de prolina em folhas de ambos os genótipos, sugerindo que o acúmulo de prolina induzido pelo déficit hídrico não foi dependente da inibição da síntese de proteínas ou aumento de sua degradação.

Segundo Guimarães (1998) houve acúmulo de aminoácidos livres nas folhas de quatro cultivares de feijão em resposta ao abaixamento do potencial hídrico foliar. Com a reidratação, o pool de aminoácios livres voltou aos níveis do controle, provavelmente pela retomada da atividade fotossintética, restabelecendo-se o crescimento e síntese de proteínas.

Jäger & Meyer (1977) através da indução do estresse hídrico em plantas de feijão, por adição de PEG 6000 em solução nutritiva, e por suspensão da irrigação em solo, verificaram aumento do conteúdo de aminoácidos livres, com o estresse, especialmente no conteúdo de prolina livre nas plantas. Com a reidratação, a prolina acumulada foi rapidamente metabolizada voltando a valores similares ao controle, sugerindo que o acúmulo deste composto seria um indicador sensível das relações hídricas da planta. Estes autores evidenciaram a importância ecológica desta resposta para a planta, podendo ser um mecanismo de adaptação para superar períodos curtos de déficit hídrico. Com a suspensão do estresse, a redução dos níveis de prolina livre nos tecidos provavelmente se deve à sua oxidação e à incorporação em proteínas (Stewart, 1972; Singh et al., 1973). Bengston et al. (1978) sugerem que a prolina acumulada seja utilizada para a biossíntese de clorofila imediatamente após a reidratação, além de ser utilizada para outros caminhos metabólicos na síntese de proteínas.

De acordo com Stewart (1972), o aumento de prolina nas folhas destacadas de feijão, quando submetidas à falta d'água, não é afetado pelos níveis de carboidratos, mas a função dos carboidratos seria prevenir a oxidação da prolina. Stewart et al. (1977) afirmam que os altos níveis de prolina encontrados em plantas de cevada sob estresse hídrico parecem estar ligados à inibição da atividade de enzimas de oxidação de prolina. Outros fatores podem, porém, ser requeridos para o aumento da concentração de prolina nestas condições.

Sawazaki et al. (1981b) encontraram em vinte linhagens e cultivares de feijão, diferentes taxas de acúmulo de prolina em função da disponibilidade de água no solo, tendo reunido o material estudado segundo a capacidade de acumular este aminoácido. Sawazaki et al. (1981a) verificaram também que os cultivares de feijão mais afetados pelo déficit hídrico foram os que apresentaram maiores teores de prolina. Sendo assim, os autores consideram muito difícil conciliar o acúmulo de prolina com alguma função adaptativa na

planta durante o estresse hídrico. Lopes & Arrieta-Maza (1991), no entanto, observaram, em plantas de feijão, maior acúmulo de prolina no cultivar tolerante à seca do que no suscetível, em função da redução do potencial hídrico.

Machado et al. (1976) estudando o efeito da desidratação osmótica no acúmulo de prolina livre em discos foliares de cultivares de feijão, observou variabilidade entre os cultivares, o que permitiu agrupamento desses em três níveis de prolina: alto, médio e baixo, destacando-se Vermelho Rajado 1162 e Manteigão Fosco 11, com maiores teores de prolina entre os cultivares estudados.

A capacidade de acumular prolina, observada durante a falta de água, tem sido associada com tolerância das plantas a essa condição desfavorável (Sawazaki et al. 1981a). Singh et al., (1972) sugeriram a utilização do acúmulo de prolina como parâmetro para medir a tolerância à seca e Bates (1973), para selecionar cultivares com esta característica. Hanson et al. (1977a; 1979), demonstraram, em cultivares de cevada, que a simples correlação positiva entre o acúmulo de prolina livre e tolerância à seca poderia levar a erros, não devendo ser uma prática válida como critério em programas de melhoramento. Isto pela possibilidade do potencial de acúmulo deste aminoácido estar simplesmente relacionado com a diminuição de água nos tecidos (Hanson et al., 1977b). Hanson & Hitz (1982) não recomendam o uso da prolina como indicador de tolerância à seca.

Estudos mais recentes mostram também o acúmulo de poliaminas com o estresse hídrico (Galston & Kaur-Sawhney, 1990). São várias as funções destes compostos aminados já citados na literatura, como: protetoras contra injúrias foliares por detoxificação de radicais livres de oxigênio (Bors et al., 1989); protetoras de membranas (Palavam & Galston, 1982); inibidores da síntese de etileno e da senescência de folhas por inibição da atividade de proteinases ácidas (Shih et al., 1982). Estão casualmente envolvidas na divisão celular, embriogênese e iniciação floral, atuando no crescimento e desenvolvimento de plantas como “segundo mensageiro” (Smith, 1985; Galston & Kaur-Sawhney, 1990) e na regulação do metabolismo dos ácidos nucléicos (Kaur-Sawhney & Galston, 1991).

Galston (1988) afirma que desde a década de 60 é conhecida a resposta de plantas a ambientes desfavoráveis através do acúmulo de putrescina, podendo ser um indicador metabólico do estresse. Pode-se levantar duas situações: (i) o aumento do teor de putrescina pode ser a causa das “injúrias” apresentadas pelas plantas; (ii) simples resposta

metabólica das plantas às exigências externas. Aumento nos níveis de putrescina também poderia ocorrer, não devido a causa ou efeito de injúria, mas simplesmente como uma reação do estresse, induzindo reação metabólica que levaria à sua síntese e, portanto sem relação direta com o estresse.

O termo poliaminas tem sido utilizado para designar, num sentido geral, putrescina, espermidina, espermina, outras aminas e vários derivados (Evans & Malmberg, 1989). Estas três poliaminas são de ocorrência comum nas plantas superiores e são metabólitos essenciais para o crescimento e desenvolvimento (Flores et al., 1989). Três grupos são considerados de maior importância entre as poliaminas livres: (i) a diamina putrescina [H_3N^+-$(CH_2)_4$-NH_3^+]; (ii) a triamina espermidina [H_3N^+-$(CH_2)_4$-NH_2^+-$(CH_2)_3$-NH_3^+]; (iii) a tetramina espermina [H_3N^+-$(CH_2)_3$-NH_2^+-$(CH_2)_4$-NH_2^+-$(CH_2)_3$-NH_3^+].

Evans & Malmberg (1989) propõem um caminho metabólico para a síntese de poliaminas, proveniente da ornitina e arginina (Figura 2). A putrescina é formada a partir da descarboxilação da ornitina, estando envolvida a enzima ornitina descarboxilase (ODC) ou indiretamente, através de uma série de intermediários, pela descarboxilação de arginina, estando envolvida a enzima arginina descarboxilase (ADC). A espermidina e espermina são formadas a partir da putrescina (Slocum et al., 1984; Evans & Malmberg, 1989).

Na síntese de espermidina e espermina a partir da putrescina, ocorre a adição de grupos aminopropil derivados da metionina (Met). Neste processo, a metionina é convertida a S-adenosilmetionina (SAM), sendo então, transferidos grupos aminopropil da SAM para espermina e espermidina. A espermidina é formada pela ação da espermidina sintetase e a espermina pela ação da espermina sintetase. Outra possibilidade é que a SAM seja metabolizada, formando o ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC), que é convertido a etileno (Faust & Wang, 1993).

O processo de oxidação e degradação de poliaminas em plantas é pouco estudado (Evans & malmberg, 1989). Smith (1985) mostra a ação das enzimas diamina oxidase (DAO) e poliamina oxidase (PAO) no catabolismo de poliaminas. Na ação da enzima DAO a putrescina é oxidada a pirrolina e a espermidina, oxidada a aminopropilpirrolina. Segundo Galston (1988) a putrescina pode ser desviada para outros caminhos metabólicos, formando ácido δ-aminobutírico (GABA), pirrolina e vários alcalóides conjugados como os

ácidos fenólicos ou proteínas. De acordo com Smith (1985), as poliaminas espermidina e espermina são oxidadas pela enzima PAO formando pirrolina e aminopropilpirrolina.

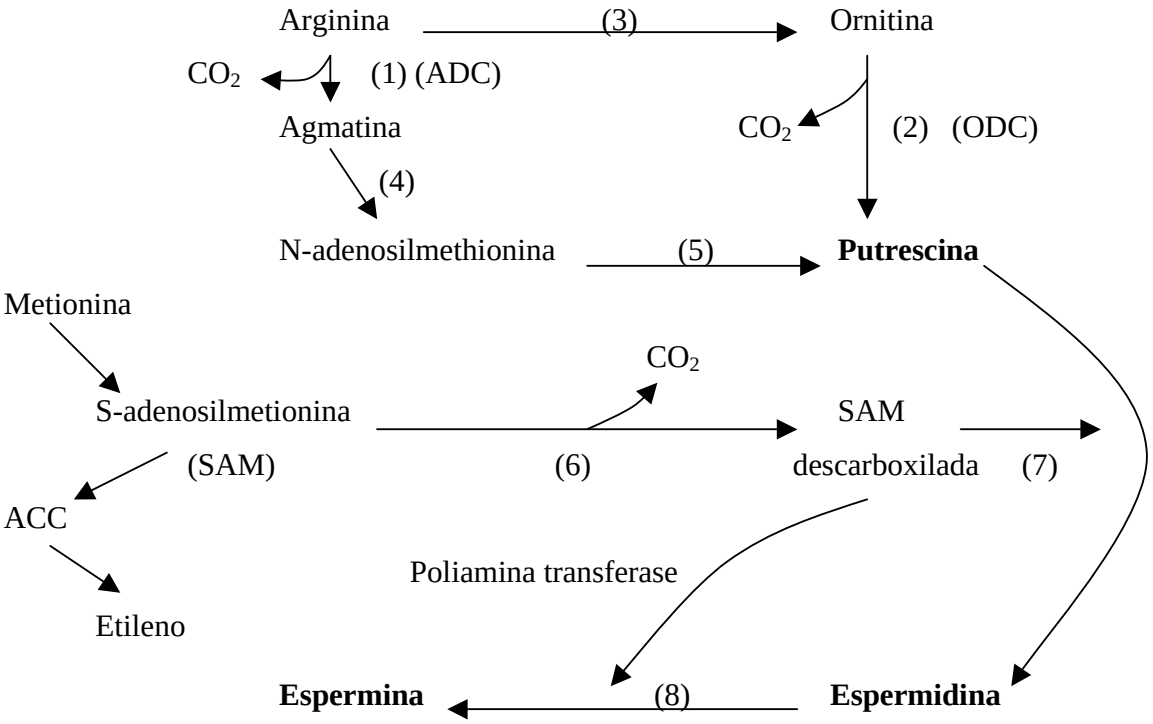

Figura 2. Caminhos da biossíntese das principais poliaminas de plantas (putrescina, espermidina e espermina). (1) arginina descarboxilase; (2) ornitina descarboxilase; (3) arginase; (4) agmatina iminohidrolase; (5) N-carbamoilputrescina amidohidrolase; (6) SAM descarboxilase; (7) espermidina sintase; (8)– espermina sintase; ACC – ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico. (Evans & Malmberg,1989).

O estresse induzindo acúmulo de putrescina é fenômeno geral nas plantas (Faust & Wang, 1993) podendo esta diamina acumular em plantas em função de vários tipos de estresse: Estresses osmóticos (Flores & Galston, 1982a e b; Slocum et al., 1984; Bagga et al., 1997; Aziz et al., 1999), deficiência de potássio (Crocomo & Basso, 1974; Young & Galston, 1984; Zaidan et al., 1999), por acidificação (Young & Galston, 1983) estresse hídrico (Turner & Stewart, 1986, Fumis, 1996), dentre outros. Em geral, as concentrações de espermidina e espermina são pouco responsivas ao estresse (Young & Galston, 1984; Smith, 1984; 1985).

São vários os estudos que descrevem os efeitos do choque osmótico no metabolismo de poliaminas em tecidos destacados, porém poucos trabalhos detalhados têm sido feitos em plantas intactas submetidas ao déficit hídrico. O conteúdo de putrescina nas folhas mostra aumentos em condições de estresse hídrico em cereais, mas o grau de estresse no qual isto ocorre não foi determinado (Flores & Galston, 1982b, 1984).

Basso (1987) afirma que muitos agentes estressantes produzem alterações metabólicas, características que levam ao acúmulo de altas concentrações de putrescina em tecidos vegetais, enquanto as poliaminas espermidina e espermina não mostraram tendência definida. Estes resultados foram também encontrados por Fumis (1996), trabalhando com cultivares de trigo submetidos ao déficit hídrico.

Turner & Stewart (1986) estudando o efeito do estresse hídrico sobre níveis de poliaminas em folhas de cevada, verificaram acúmulo de putrescina em alguns cultivares e queda em outros. O acúmulo desta diamina ocorreu em estresse moderado, cessando quando atingiu grau mais severo de estresse. Estes autores notaram que o nível de putrescina permanece inalterado quando as plantas são estressadas rapidamente.

Efeitos do estresse hídrico no acúmulo de compostos nitrogenados em plantas já foram bem discutidos. O acúmulo de prolina representa o principal caminho do metabolismo do nitrogênio em plantas estressadas (Hanson et al., 1977a). Porém, o acúmulo de poliaminas, principalmente a diamina putrescina, também é significativo. Estudos com folhas destacadas indicam que a síntese de prolina via α-cetoglutarato e glutamato é a principal fonte de prolina livre acumulada durante o estresse hídrico (Delauney & Verma, 1993; Bartels & Nelson, 1994). Segundo Rabe (1990), a biossíntese de prolina e putrescina está metabolicamente ligada através de substratos comuns (ornitina e arginina), sendo, a arginina, o mais importante precursor, durante o estresse, para a síntese de ambos os compostos em várias espécies de plantas, incluindo *P. vulgaris* L. (Stewart & Boggess, 1977).

4.3 Polietileno Glicol e Indução de Estresse hídrico

A busca por novos conhecimentos leva a constantes propostas de tecnologias e metodologias. O polietileno glicol (PEG), um polímero inerte, solúvel em água, não aniônico, de cadeia longa [$HOCH_2$ $(CH_2OCH_2)_x$ CH_2OH], tem sido amplamente usado em

estudos de relações hídricas em plantas (Jarvis, 1963; Lawlor, 1970; Oertli, 1986; Raggi, 1992), fungos (Mexal & Reid, 1973; Money & Webster, 1988, 1989; Walters, 2000) e animais (Zimmerberg & Parsegian, 1986), pré-condicionamento osmótico de sementes (Heydecker et al., 1975) e estudos de qualidade fisiológica de sementes (Branccini et al., 1998). A disponibilidade destes polímeros de vários pesos moleculares permite medidas de porosidade de parede celular (Gerhardt & Black, 1961; Carpita et al., 1979; Money & Webster, 1988). Outra importante aplicação é o uso de PEG para promover a transformação e fusão de protoplastos (Ballas et al., 1987).

O uso do PEG para reduzir o potencial hídrico de soluções nutritivas tornou-se técnica aceita para induzir estresse hídrico em plantas (Janes, 1974). A maioria dos pesquisadores obtiveram resultados satisfatórios e consideram o PEG superior a sais, açúcares ou outros compostos orgânicos (Jarvis, 1963; Janes, 1966; Kaul, 1966; Lawlor, 1970; Kaufmann & Eckard, 1971). Assume-se freqüentemente que as relações hídricas da planta são similares, quando crescem em solo ou em solução de PEG que tenha o mesmo potencial hídrico. No entanto, Kaufmann & Eckard (1971), estudando efeitos do estresse hídrico induzido por PEG 400 e 6000 em *Capsicum frutencens* L., sugerem que moléculas de PEG com maior peso molecular, como PEG 6000, são mais indicadas para simular o estresse hídrico que ocorre em condições de solo que as de menor peso molecular, como PEG 400, devido a este resultar em redução no potencial osmótico da seiva do xilema. Segundo Hasegawa et al. (1984), o PEG tem sido utilizado com sucesso para simular os efeitos do déficit hídrico nas plantas, por não penetrar nas células, não ser degradado e não causar toxidez, devido ao seu alto peso molecular.

Alguns estudos foram realizados, buscando relacionar a concentração de PEG com o potencial osmótico da solução (Michel & Kaufmann, 1973; Steurter, 1981; Money, 1989). Michel & Kaufmann (1973) utilizando psicrômetro termopar e osmômetro de pressão de vapor, estudaram os efeitos da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura, no potencial osmótico de soluções. Eles verificaram que o potencial osmótico aumenta linearmente com o aumento da temperatura em uma dada concentração de solução, possivelmente pela redução de pontes de hidrogênio entre o PEG e a água, e que sob temperatura constante ocorre uma redução de forma curvilínea do potencial osmótico com a

elevação da concentração de PEG na solução, provavelmente pelo aumento exponencial da viscosidade da solução.

O PEG é considerado, na maioria das vezes, como agente osmótico, o qual altera o potencial osmótico da solução. A lei de Van't Hoff prediz que o potencial osmótico de uma solução verdadeira é uma função direta do número de partículas na solução. Todavia, Steuter (1981) notou em seus estudos, que PEGs de alto peso molecular, por exemplo PEG 20000, dissolvidos em água exibem características de colóides, não funcionando como uma solução verdadeira. Sendo assim, segundo o autor, esta terminologia tem levado a enganos sobre as propriedades e utilidades do PEG em pesquisas de relações hídricas em plantas. PEGs de alto peso molecular e nas concentrações utilizadas nas soluções em experimentos de fisiologia vegetal, se comportam como colóides, sendo as forças matriciais o principal componente do potencial hídrico resultante. Isto leva a sugerir que o PEG poderia ser considerado agente matricial, em vez de agente osmótico.

Os métodos de ponto de congelamento e déficit de pressão de vapor, utilizados para determinar o potencial osmótico de uma solução com PEG, aparentemente não integram o potencial osmótico e potencial matricial na determinação do potencial hídrico. Altas concentrações e/ou alto peso molecular (polímeros de cadeias longas), poderiam reduzir a energia livre da água mais por forças matriciais que por forças osmóticas (Steuter, 1981). O PEG 6000, um dos polímeros mais utilizados em estudos de relações hídricas, é referido na maioria dos estudos como agente osmótico (Janes, 1966; Cox & Boersma, 1967; Michel & Kaufmann, 1973; Money, 1989).

Estudando indução de estresse hídrico através da adição de PEG 6000 na solução nutritiva, em feijoeiro, Guimarães et al. (1999) verificaram quedas no teor relativo de água, área foliar e matéria seca da planta, bem como na taxa de crescimento absoluto (TCA), taxa de crescimento relativo (TCR) e taxa assimilatória líquida (TAL). Segundo estes autores, em níveis mais severos de estresse, as taxas de crescimento foram negativas. O efeito do estresse induzido por PEG 6000 foi rápido e severo. Raggi (1992) também verificou queda significativa no CRA, massa seca de raiz, caule e particularmente folha de plantas de feijão sob estresse induzido por PEG 6000 em dois experimentos, sendo acrescentado 6% v/v de PEG na solução, permanecendo de forma constante e acrescentando-se PEG de forma gradativa de 2 a 7% v/v.

Raggi (1992) verificou, em plantas de feijão submetidas a estresse com PEG 6000, que o potencial hídrico foliar permaneceu inalterado ou aumentou. Segundo o autor, a princípio foi uma surpresa, porém o acúmulo de água no apoplasto, induzido pela rápida redução da condutância estomática, parece ter sido responsável por estes resultados verificados em experimentos sucessivos. A discrepância ocorrida entre o decréscimo do conteúdo hídrico relativo e não alteração ou aumento do potencial hídrico foliar, indica um desbalanço entre apoplasto e simplasto, sendo contrário ao que tem sido sugerido em plantas não tratadas com PEG (Boyer, 1985).

Assimilação líquida de CO_2 e condutância estomática, decrescem abrupta e precocemente em folhas de feijoeiro sob estresse induzido por PEG 6000 em solução nutritiva, sendo a assimilação líquida de CO_2 negativamente correlacionada com a concentração de PEG 6000 (Raggi, 1992). Segundo o autor, o decréscimo na condutância estomática pode ser devido à concentração de PEG nos sítios de evaporação, que em feijão deveria ser predominantemente locado na superfície das células do mesofilo no ambiente da câmara subestomática, como paredes das células-guarda e nas paredes de células adjacentes à epiderme. A concentração de CO_2 nos espaços intercelulares (Ci) caiu nos primeiros dias de estresse e depois se recuperou, aumentando em condições de estresse mais severo, indicando inibição da fotossíntese por fechamento estomático e por razões não estomáticas (inibição mesofílica), como mencionado por Sharkey & Seeman (1989).

Existem informações sobre efeitos deletérios ou tóxicos resultantes da utilização do PEG em estudos de relações hídricas de plantas (Lagerwerff et al., 1961; Leshem, 1966; Parmar & Moore, 1968; Michel, 1970). Estes autores verificaram a possibilidade de algumas formulações de PEG conterem substâncias tóxicas, resultantes do processo de fabricação. Variações em respostas das plantas também podem estar ligadas ao uso de PEGs de diferentes pesos moleculares (Janes, 1974).

O PEG, quando penetra na planta, fica confinado no apoplasto das células (Carpita et al. 1979; Handa et al. 1982, Raggi, 1992); sendo assim, o protoplasto parece ficar protegido contra choques osmóticos (Rubinstein, 1982), não ocorrendo interferências deste polímero com o ajustamento osmótico das células (Handa et al., 1982; Rubinstein, 1982). O PEG 6000 tem diâmetro médio maior que os espaços da parede celular

(Carpita et al., 1979). Porém moderadas interações deste composto com a membrana, não podem ser descartadas (Raggi, 1992).

Os sintomas mais comuns, verificados em plantas crescidas em solução com PEG são descoloração marginal e internerval (Raggi, 1992), provavelmente por reduzir pigmentação e diminuir o número de cloroplastos, como verificado em plântulas de laranja tratadas com PEG 4000 (Zekri & Parsons, 1990), podendo evoluir para manchas necróticas (Järger & Meyer, 1977). Ondulações marginais moderadas também são notadas em *P. vulgaris* (Raggi, 1992).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Localização do Experimento

A multiplicação de sementes foi realizada na Fazenda Experimental de Pesquisa, Ensino e Pós-Graduação da UNESP/Botucatu, localizada no município de São Manuel – SP, no período de setembro a novembro de 1999. Posteriormente, de março a maio de 2000, conduziu-se experimento em casa-de-vegetação no Departamento de Botânica - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista da UNESP/Botucatu, para avaliação dos efeitos do estresse induzido por PEG 6000 em feijão.

A casa de vegetação utilizada está orientada no sentido norte-sul, coberta com filme duplo de polietileno (PEBD), aditivado contra raios UV (ultravioleta). Possui sistema de resfriamento evaporativo do tipo meio poroso associado a exaustor (“pad-fan”), que foi utilizado objetivando evitar umidade relativa do ar e temperaturas extremas. O experimento foi instalado em duas bancadas, também em sentido norte-sul de aproximadamente 1m de altura.

5.2 Condições Climáticas da Casa de Vegetação

Para acompanhamento das condições climáticas, instalou-se um termohigrógrafo, onde foram registradas variações diárias de temperatura e umidade relativa do ar. Os dados obtidos semanalmente foram utilizados para cálculo das médias diárias de temperatura e umidade relativa do ar, através das equações propostas pelo Instituto Nacional de Meteorologia, citados por Varejão-Silva (1979).

As médias de temperatura e umidade relativa do ar foram de 21,7 ± 2,1 ºC e 72,0 ± 7,0 %, durante o período experimental. Médias diárias de temperatura e umidade relativa do ar, as 9 e 15 horas, durante a avaliação do experimento (imposição do estresse e recuperação) são apresentadas na Figura 3.

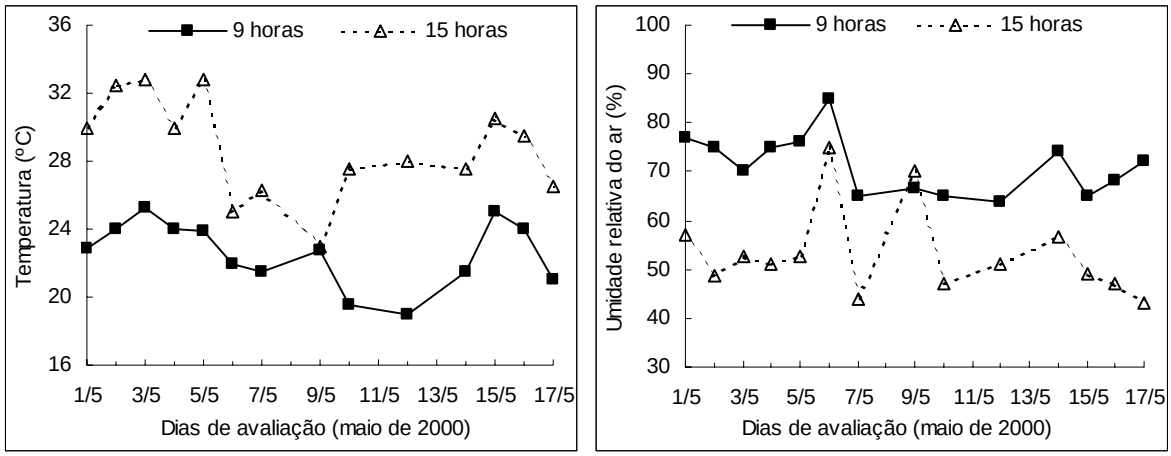

Figura 3. Médias diárias de temperatura (ºC) e umidade relativa do ar (%), em casa-de-vegetação, durante o período de avaliação do experimento (imposição do estresse e recuperação), as 9 e 15 horas. Botucatu – SP, 2000.

5.3 Material Vegetal

Os materiais de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizados no experimento, descritos a seguir, foram obtidos junto ao banco de germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão (EMBRAPA/CNPAF-GO).

- **BAT 477** → Linhagem avançada desenvolvida pelo CIAT – Colômbia, adaptada aos trópicos e introduzida no Brasil pela EMBRAPA/CNPAF. Apresenta hábito de crescimento indeterminado, tipo II, porte ereto, semente de cor creme e início de floração aos 41 dias. Estudos de Portes (1996) indicam que esta linhagem apresenta características desejáveis para tolerância à seca como raízes profundas;

- **Manteigão Fosco** → Cultivar brasileira, com hábito de crescimento determinado, tipo II, porte ereto, semente cor creme/bege, com ciclo de 98 dias. Em estudos de Machado et al. (1976) e Sawazaki et al. (1981a; 1981b), foi considerada como cultivar com alto acúmulo de prolina em resposta ao déficit hídrico;

- **Pérola** → Cultivar desenvolvido pela EMBRAPA/CNPAF-GO, Apresenta hábito de crescimento indeterminado, entre tipo II e III, porte semi-ereto, início de floração aos 46 dias e ciclo de 90 dias. Pertencente ao grupo carioca, sendo atualmente a mais plantada no Brasil.

5.4 Instalação e Condução do Experimento

O experimento foi instalado no dia 21 de março de 2000. Sementes de Manteigão Fosco, BAT 477 e Pérola, depois de submetidas a um banho de hipoclorito de sódio a 5% durante 2 minutos, foram lavadas em água corrente. Em seguida, foram colocadas para germinar em bandejas plásticas com papel filtro umedecido em água destilada, e mantidas em laboratório, em temperatura em torno de 25ºC, até o início do desenvolvimento da radícula. Foram então transferidas para bandejas plásticas com areia lavada, previamente desinfetada com HCl a 10% e levadas para a casa de vegetação. Seis dias após, as plantas foram irrigadas com solução nutritiva completa de Hoagland & Arnon (1950), diluída a 1/5, conforme determinação de Dantas et al. (1979). No dia 31 de março de 2000, realizou-se uma seleção das plantas mais uniformes e vigorosas, sendo então transferidas para vasos plásticos transparentes, previamente pintados com tinta prateada, contendo 3,5 L da mesma solução nutritiva, diluída a 25% (pH = 6,0 – 6,5 e CE = 0,76 $\mu S\ cm^{-1}$). Foram colocadas duas plantas por vaso, mantidas com aeração artificial. As plantas passaram por período de aclimatação de

uma semana, sendo depois utilizada a solução nutritiva diluída a 50%. A partir da terceira semana utilizou-se solução nutritiva a 100% (pH = 6,0 – 6,5 e CE = 2,10 μS cm^{-1}). Até o período de imposição dos tratamentos a solução nutritiva foi trocada semanalmente, sendo o pH corrigido quando necessário, com a utilização de solução concentrada de KOH 10M.

5.4.1 Imposição do Estresse hídrico

No dia 1º de maio de 2000, 32 dias após a transferência para os vasos (DAT), momento em que as plantas estavam no início da fase reprodutiva, iniciou-se a imposição do estresse. Os vasos destinados ao tratamento controle foram mantidos em solução completa, com potencial osmótico de –0,03 MPa, determinado em um crioscópio digital eletrônico 312-L da LAKTRON, do Laboratório de Físico-química do Setor de Inspeção Sanitária de Alimentos de Origem Animal da FMVZ, UNESP/Botucatu. Os vasos destinados ao estresse tiveram a solução substituída por uma nova solução nutritiva com 325,42 g de polietileno glicol 6000 (PEG 6000) e 3231,54 mL de água destilada, resultando num nível inicial de estresse de -0,15 MPa.

Como estratégia para imposição do estresse, optou-se pela variação do nível da solução nutritiva no vaso, em função de perdas de água por transpiração, proporcionando variação gradativa e decrescente do potencial hídrico da solução nutritiva (Ψh_{sn}).

Cálculos de potenciais osmóticos foram baseados na equação, proposta por Michell e Kaufmann (1973), que utilizando psicrômetro termopar e osmômetro de pressão de vapor, estudaram os efeitos da concentração do PEG 6000 e da temperatura, no potencial osmótico de soluções. Para os cálculos, utilizou-se 25ºC como temperatura de referência, desconsiderando o potencial osmótico da solução nutritiva devido aos íons (-0,03 MPa).

$$\Psi S = - (1{,}18 \times 10^{-2})\, C - (1{,}18 \times 10^{-4})\, C^2 + (2{,}67 \times 10^{-4})\, CT + (8{,}39 \times 10^{-7})\, C^2T$$

Onde:

$\Psi_s \rightarrow$ Potencial osmótico da solução (bar);

C $\rightarrow$ Concentração de PEG 6000 (g de PEG 6000/kg de água);

T $\rightarrow$ Temperatura (ºC);

Obs: A estimativa de erro padrão para o potencial osmótico determinado pela equação é de ± 0,028 MPa (Michell & Kaufmann, 1973).

Variações no potencial osmótico da solução nutritiva durante o período de imposição do estresse, baseados na equação proposta por Michell & Kaufmann (1973) são mostradas no Quadro 1.

Quadro 1. Variações no potencial osmótico da solução nutritiva completa de Hoagland & Arnon (1950), em função de variações no volume de água e concentração relativa de PEG 6000.

Ψs da sol. nutritiva (MPa)	Volume de água (mL)	Massa de PEG 6000 (g)	Volume de PEG 6000[1] (mL)	Volume da solução molal (mL)	Nível da sol. no vaso (cm)
-0,15	3231,54	325,42	268,94	3500,00	16,00
-0,20	2721,55	325,42	268,94	2990,50	13,67
-0,30	2149,38	325,42	268,94	2418,32	11,06
-0,40	1824,69	325,42	268,94	2093,63	9,57
-0,50	1609,96	325,42	268,94	1878,90	8,59
-0,70	1336,51	325,42	268,94	1605,45	7,34
-0,80	1242,31	325,42	268,94	1511,25	6,91

[1] Densidade do PEG 6000 = 1,21 g cm^{-3}.

A partir dos dados do Quadro 1, confeccionou-se uma escala relacionando o nível da solução no vaso (cm) com o Ψs (MPa) (Figura 4).

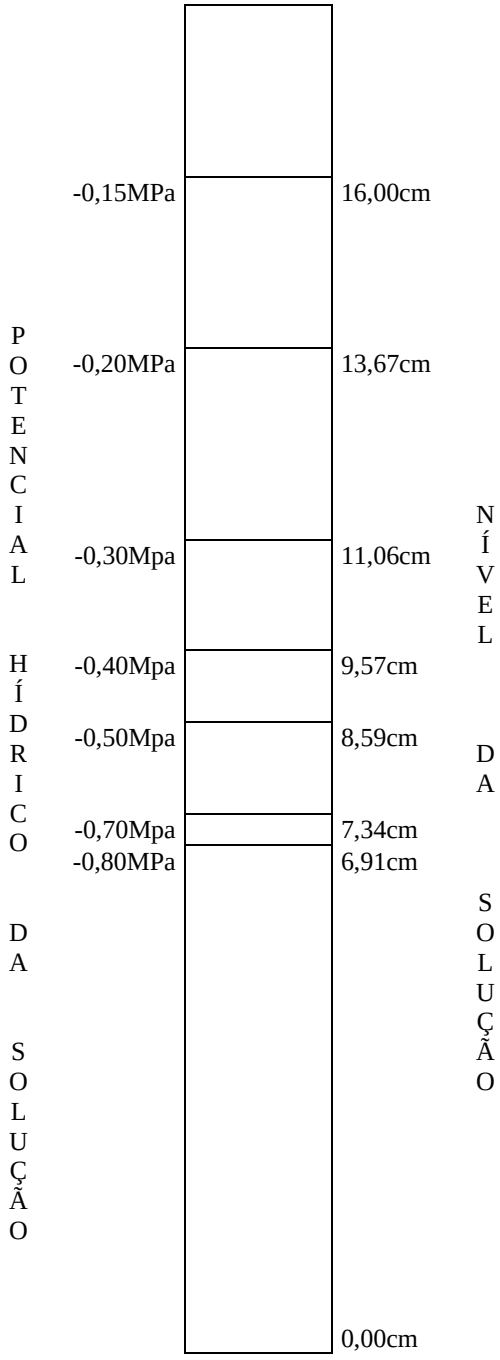

Figura 4. Escala utilizada para o acompanhamento e controle do nível (cm) e Ψs (MPa) da solução nutritiva, nos vasos que foram submetidos ao estresse.

A escala foi afixada nos vasos com fita adesiva transparente, ao lado de uma faixa de aproximadamente 1cm de largura, que ficou sem receber tinta, para realização

periódica da leitura do nível da solução. Com objetivo de evitar desenvolvimento de algas na solução pela entrada de luz, a faixa que ficou sem receber pintura foi recoberta com fita adesiva de coloração escura, sempre retirada e recolocada nos momentos de leitura.

Devido a variações no consumo de água entre os materiais testados, houve necessidade de controle individual no nível de solução nos vasos, buscando manter aqueles que estavam submetidos ao estresse hídrico, no mesmo nível durante o dia em que eram realizadas as avaliações. Quando as repetições atingiam o nível desejado no vaso, correspondente a um determinado potencial osmótico (Figura 4), estas eram mantidas neste nível durante todo o dia, acrescentando-se água destilada, com o auxílio de uma proveta. No final do dia, a partir das 15 horas, após as realizações das medidas de trocas gasosas (parâmetro discutido à frente), interrompia-se a reposição de água, até que estas atingissem o próximo nível de estresse e assim sucessivamente.

5.4.2 Período de Recuperação

Utilizou-se como referência para reidratação, a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A). Quando esta atingia valores médios próximos de zero em um determinado genótipo realizava-se a reidratação, levando a diferentes níveis de estresse na solução nutritiva e diferentes momentos de reidratação para cada genótipo: Manteigão fosco (-0,40 MPa); BAT 477 (-0,70 MPa) e Pérola (-0,80 MPa). Dias 07, 10 e 12 de maio de 2000, aos 6, 9 e 11 dias após o início do estresse para cada material, respectivamente.

Para reidratação ou recuperação, as plantas foram retiradas da solução com PEG 6000, suas raízes lavadas em recipiente com água destilada e então transferidas para vasos com solução nutritiva completa, idêntica ao controle. Durante o período de recuperação (quatro dias para cada material), foram avaliados os mesmos parâmetros do período de estresse, que serão descritos em seguida.

5.5 Parâmetros Avaliados

5.5.1 Relações Hídricas

Foram realizadas medidas do consumo médio diário de água (L dia^{-1}), conteúdo relativo de água (CRA) e potencial hídrico foliar de base (Ψh_f), quando as plantas atingiam níveis de estresse pré-determinados, em plantas controle e submetidas ao estresse por PEG 6000.

5.5.1.1 Consumo Médio Diário de Água

Com o auxílio de uma proveta, o nível da solução era corrigido quatro vezes ao dia com água destilada, anotando-se o consumo de água de cada vaso. Com base nestes dados, calculou-se o consumo médio diário de água por material vegetal em L dia^{-1}, durante o período de imposição do estresse.

5.5.1.2 Conteúdo Relativo de Água das Folhas (CRA)

Seguindo a metodologia de Barrs (1968), foram retirados cinco discos de 10 mm de diâmetro, da folha mais nova, completamente desenvolvida, sempre antes do nascer do sol (entre 5:30 e 6:30 da manhã). Estes foram imediatamente pesados em balança de precisão de 0,001g para obtenção do peso fresco (PF). Em seguida, acondicionados em placas de petry com solução de 0,001 molar de cianeto de potássio, utilizado como inibidor metabólico e levados à geladeira. Depois de 5 horas, os discos foram novamente pesados, após a retirada do excesso de água superficial com um lenço de papel toalha, obtendo-se o peso túrgido ou saturado (PT). Finalmente, foram colocados em estufa de circulação forçada a 60ºC, até atingirem peso constante (≅ 24 horas), sendo então pesados para obtenção do peso seco (PS).

O Conteúdo relativo de água (CRA) é definido como a relação entre o teor de água de uma amostra de folha imediatamente após a sua coleta (PF) e o teor de água da

mesma amostra após a recuperação total da turgescência (PT), comparativamente ao peso seco (PS), sendo determinado pela equação:

$$CRA = [(PF - PS) / (PT – PS)] \times 100$$

5.5.1.3 Potencial Hídrico Foliar de Base (Ψh_f)

Seguindo a metodologia proposta por Scholander (1964), com uma câmara de pressão (soil moisture), realizou-se determinações do potencial hídrico foliar de base (Ψh_f). Utilizou-se sempre o folíolo central da folha mais nova completamente desenvolvida. O folíolo foi envolvido em filme plástico, o peciólulo cortado com uma lâmina e imediatamente acondicionado na câmara de pressão, ficando somente o peciólulo para fora, sendo, a câmara imediatamente vedada. Em seguida o folíolo foi submetido a um acréscimo constante de pressão até o momento do aparecimento da primeira gota de seiva no corte do peciólulo. A pressão deste instante, registrada no manômetro, correspondia ao Ψh_f. As medidas foram realizadas sempre antes do nascer do sol (entre 5:30 e 6:30 horas da manhã).

5.6 Trocas Gasosas

Durante o período de avaliação, também foram medidas as trocas gasosas sempre no folíolo central de folhas novas completamente desenvolvidas. Utilizou-se um medidor portátil de fotossíntese, com sistema fechado, IRGA LI-6200 da LI-COR. As medidas foram realizadas sempre as 9:00 e 15:00 horas, nas plantas controle e sob estresse, toda vez que o nível de estresse pré-determinado era atingido na solução nutritiva. Os parâmetros medidos foram os seguintes:

- Taxa de assimilação líquida de CO_2 nas folhas (A) em $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$;
- Condutância estomática (g_s) em $mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$;
- Taxa de transpiração nas folhas (E) em $mol\ m^{-2}\ s^{-1}$;
- Concentração de CO_2 nos espaços intercelulares (Ci) em $mmol\ mol^{-1}$;
- Fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (FFFA), em $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$.

A eficiência no uso de água (EUA) foi obtida através da relação entre a taxa de assimilação líquida de CO_2 e a taxa de transpiração das folhas (A/E).

5.7 Bioquímicos

5.7.1 Níveis de Prolina nas Folhas

Para determinação do nível de prolina nas folhas, utilizou-se o método de Bates et al. (1973), modificado por Torello & Rice (1986). Folhas coletadas e previamente secas em estufa a 60ºC até atingirem peso constante, foram trituradas e homogeneizadas em 10mL de ácido sulfosalicílico a 3% e, após agitação por 60 minutos, o extrato foi filtrado em papel filtro Whatman nº 2. Posteriormente, retirou-se uma alíquota de 2mL do filtrado e adicionou-se 2mL de uma solução de ninhidrina ácida e 2mL de ácido acético glacial. Os tubos de ensaio foram levados a banho-maria (100ºC) por 60 minutos, sendo resfriados em seguida com banho de gelo. A leitura foi realizada a 520nm em espectrofotômetro digital B 342 II, Micronal, contra um branco que teve o volume da amostra substituído por ácido sulfosalicílico a 3%. O valor da absorbância foi comparado com uma curva padrão de prolina, sendo os resultados expressos em micromoles de prolina por miligrama de massa seca de folhas ($\mu mol\ mg^{-1}$ de MSF).

5.7.2 Níveis de Poliaminas nas Folhas

Na determinação dos níveis de poliaminas nas folhas, utilizou-se o método de Flores & Galston (1982a), com algumas modificações. Extrato obtido de folhas frescas foram homogeneizados em ácido perclórico 5% gelado (100mg/mL $HCLO_4$), colocado em banho de gelo por 30 minutos e centrifugado a 15.000 g por 15 minutos. A fase sobrenadante, contendo as frações de poliaminas livres, foi acondicionada em frascos plásticos e armazenada a –20ºC, para posterior análise. Foram retiradas desta amostra 200µl e acrescentados 400µl de cloreto de dansil (5mg/mL de acetona) e 200µl de carbonato de sódio saturado, sendo incubado por 60 minutos a 60ºC. Removeu-se o excesso de dansil

acrescentando-se 100µl de prolina (100mg/mL de água destilada) incubando-se por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. As poliaminas dansiladas foram extraídas com 500µl de benzeno e agitadas por 30 segundos. Alíquotas de 20 µl foram retiradas da fase orgânica e submetidas à cromatografia em camada delgada por aproximadamente 60 minutos com uma mistura de clorofórmio e trietilamina (25:2 v/v). As poliaminas foram quantificadaspor espectroscopia de emissão de fluorescência (Image Mater VDS, Amersham Pharmacia Biotech) e os resultados expressos em µmoles de poliaminas por grama de massa fresca de folhas (µmol g^{-1} de MFF).

5.8 Teores de Macro e Micronutrientes nas Folhas

No dia 04/05/2000, quando as plantas estavam sob estresse de -0,2 MPa, na solução nutritiva, momento em que já eram observados sintomas visuais de provável toxidez do PEG 6000 nas folhas do Cultivar Manteigão Fosco (descolorações internervais), retirou-se amostras de folhas de todos os materiais, sob estresse e controle, objetivando verificar possível relação destes sintomas com deficiências nutricionais.

Coletou-se uma folha trifoliolada completamente expandida de todas as plantas, sendo estas devidamente acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada a 60º C até atingir peso constante. Posteriormente, procedeu-se a análise foliar no Laboratório de Relações Solo-Planta do Setor de Agricultura, do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP de Botucatu, SP.

De acordo com Malavolta et al. (1989), amostras de folhas foram submetidas à digestão nitrico-perclórica para determinação do P, K, Ca, S, Cu, Fe, Mn e Zn, e digestão sulfúrica para determinação do nitrogênio pelo método de Kjeldahl. Os macronutrientes foram expressos em g kg^{-1} de massa seca de folha (MSF) e os micronutrientes em mg kg^{-1} de MSF.

5.9 Biometria

Variáveis biométricas foram determinadas após a imposição do estresse e recuperação, aos 40, 42 e 43 DAT, para Manteigão Fosco, BAT 477 e Pérola, respectivamente, com o objetivo de verificar o efeito do estresse no acúmulo e distribuição de matéria seca dos diferentes órgãos das plantas.

Realizaram-se coletas de quatro vasos para cada tratamento, sendo as plantas seccionadas em diferentes partes. A área foliar (AF) foi determinada com um medidor de área foliar da LI-COR (LI-3100). O volume de raízes foi determinado com auxílio de uma proveta, contendo volume conhecido de álcool etílico 70%. As raízes foram submersas no álcool e seu volume obtido em função do volume de álcool deslocado. As vagens foram contadas, obtendo-se o número de vagens (NV). Em seguida folhas, caules mais pecíolos, estruturas reprodutivas e sistema radicular foram acondicionados em sacos de papel devidamente etiquetados e levados à estufa de circulação forçada a 60ºC até atingir peso constante. Posteriormente, estes foram pesados em balanças de precisão (0,01g) obtendo-se a massa seca de folha (MSF), massa seca de vagens (MSV) e massa seca de raízes (MSR). Foram obtidos também a massa seca total (MST), Área foliar específica (AFE = AF/MSF), peso específico foliar (PEF = MSF/AF), razão de peso de folha (RPF = MSF/MST), massa seca de uma vagem e razão entre massa seca das raízes e massa seca da parte aérea (RRA). Dados de massa seca de vagens, massa seca de uma vagem e número de vagens foram utilizados para inferir sobre os efeitos do estresse hídrico no potencial produtivo de cada cultivar, uma vez que o experimento não foi conduzido até a maturação das vagens.

5.10 Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, em esquema fatorial, com três materiais de feijão (cultivares Manteigão fosco e Pérola e a linhagem BAT 477), dois regimes hídricos (sem estresse - SE e com estresse - CE) e 4 blocos, o que resultaria em 24 vasos. Porém, devido à necessidade de coleta de 24 vasos após o estresse para análises biométricas, o experimento totalizou 48 vasos. Como cada material atingiu nível de estresse diferente em função de respostas quanto à assimilação líquida de CO_2

(A), os níveis de estresse não foram considerados como um fator no delineamento experimental.

Os dados foram tabulados, os resultados de biometria e análise do teor de macro e micronutrientes nas folhas, submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Utilizou-se também análise de regressão para relacionar dados de relações hídricas e trocas gasosas com os níveis de estresse, para cada material.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Relações Hídricas

6.1.1Consumo Médio Diário de Água

As taxas de consumo médio diário de água em L dia^{-1} dos cultivares Manteigão Fosco e Pérola e da linhagem BAT 477, durante o período de imposição do estresse são mostradas na Figura 5. No controle, o cultivar Pérola apresentou consumo médio de 0,62 ± 0,089 L dia^{-1}. Aproximadamente 60% do consumo de água do Manteigão Fosco (0,93 ± 0,089 L dia^{-1}) e BAT 477 (1,0 ± 0,12 L dia^{-1}), provavelmente pela menor área foliar e massa seca de raiz do cultivar Pérola (Quadros 4 e 5), com menor perda de água por transpiração.

Com o estresse ocorreu diminuição significativa na taxa de consumo diário de água para os três materiais. Pérola apresentou a menor queda na taxa de consumo de água em relação ao controle, com 35%, enquanto Manteigão fosco e BAT 477 apresentaram queda de 65% e 57%, respectivamente. Este resultado refletiu a sensibilidade de cada material ao tratamento com PEG 6000, concordando com os dados de trocas gasosas apresentados (Figuras 9 a 13). O cultivar Manteigão Fosco mostrou drástica redução na condutância estomática (g_s) e transpiração (E) das folhas (Figuras 10 e 11), e mesmo com maior área foliar, teve maior redução no consumo de água, quando comparado ao controle. Evidências como

descoloração internerval nas folhas mais velhas, evoluindo para necroses e presença de material esbranquiçado na superfície foliar, também verificado por Lagerwerff et al. (1961) em folhas de feijão e por Yaniv & Werker (1983) em plântulas da família solanaceae, poderiam indicar maior penetração de PEG nesta cultivar. Uma das hipóteses é que o PEG estaria bloqueando as vias de movimento de água (Lawlor, 1970). Diferenças entre cultivares quanto à penetração de PEG, via apoplasto, podem explicar os sintomas mais drásticos verificados no cultivar Manteigão Fosco.

Os resultados obtidos podem auxiliar na determinação da eficiência do uso de água para produção biológica e/ou econômica, uma vez que este método estima a transpiração total da planta. Em situações de determinações periódicas de área foliar, os dados poderiam ser expressos em litros de água m^{-2} de folha dia^{-1}.

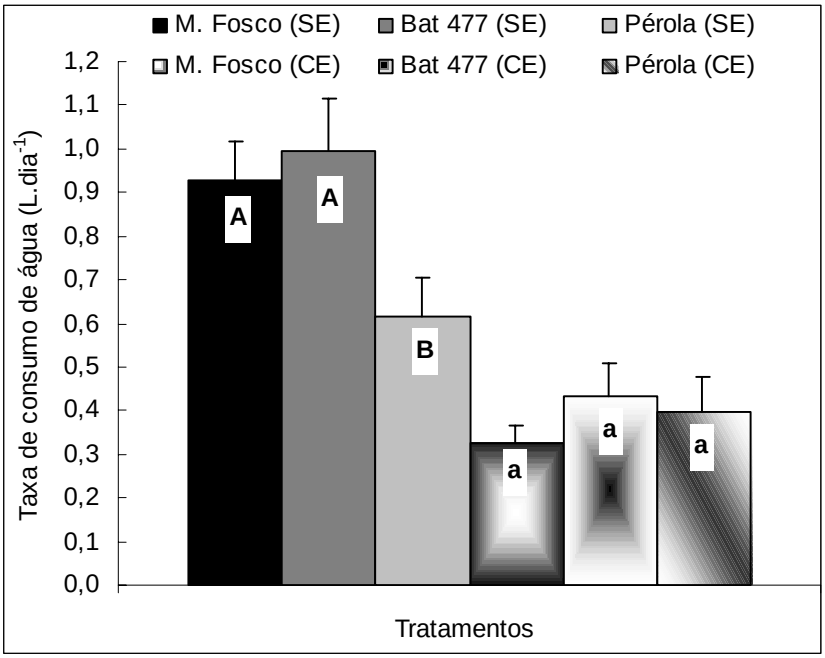

Figura 5. Taxa consumo médio diário de água de três cultivares de feijão submetidos ao estresse por adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva. Letras maiúsculas iguais e Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). Valores médios de quatro repetições. As barras transversais correspondem ao desvio padrão. SE – sem estresse (controle); CE – com estresse.

6.1.2 Conteúdo Relativo de água nas Folhas (CRA)

Resultados referentes ao conteúdo relativo de água (CRA) são apresentados na Figura (6 a, c, e). Houve decréscimo no CRA para os três genótipos estudados, em função do estresse induzido pelo PEG 6000. Com a reidratação, verificou-se rápida recuperação do CRA, atingindo valores similares ao controle. Estes resultados concordam com Raggi (1992), que verificou queda significativa no CRA de folhas de plantas de feijão (*P.* vulgaris), tratadas com PEG 6000 quando comparadas ao controle, no 2º e 3º dia em dois experimentos [6% p/v de PEG constante na solução (-4,0 MPa)] e com acréscimo gradativo de PEG 6000 [de 2% p/v (-2,5 MPa) até 7% p/v (-5,0 MPa). O cultivar Manteigão Fosco apresentou a maior queda para esta variável (Figura 4 a), com valores de aproximadamente 55%, quando o potencial hídrico da solução nutritiva (Ψh_{sn}) era de -0,40 MPa (momento da reidratação para este cultivar). BAT 477 e Pérola apresentavam CRA em torno de 77% e 81% respectivamente (Figura 6 c, e). Com -0,20 MPa o cultivar Manteigão Fosco já apresentava uma queda significativa, mostrando grande sensibilidade ao estresse (Figura 6 a), o que não ocorreu com os outros dois materiais. BAT 477 e Pérola apresentavam CRA $\cong$ 64 e 65%, quando o Ψh_{sn} era de -0,70 MPa e -0,80 MPa, respectivamente, não atingindo valores tão baixos, mesmo em níveis mais elevados de estresse. O cultivar Pérola iniciou queda no CRA somente quando o Ψh_{sn} atingiu -0,40 MPa.

Este parâmetro mostrou ser um bom indicador do "status" hídrico da planta como verificado por outros autores (Rodrigues, 1973; Sinclar & Ludlow, 1985), refletindo o balanço entre o fornecimento de água na folha e a taxa de transpiração (Schonfed et al., 1988), sendo uma técnica barata e de fácil determinação.

Ajustes para valores de CRA em função do Ψh_{sn} durante o período de estresse são mostrados na Figura 7, indicando relação linear entre CRA e Ψh da solução nutritiva, ficando clara a maior sensibilidade do cultivar Manteigão Fosco ao tratamento com PEG 6000, que apresentou coeficiente de inclinação da reta (b) aproximadamente três vezes maior que os outros cultivares (Manteigão Fosco: b = 105,74; BAT 477: b = 39,01; Pérola: b = 29,83). Raggi (1992) também encontrou relação linear entre a queda no CRA e aumentos na concentração de PEG 6000 na solução nutritiva em estudos com *P. vulgaris*.

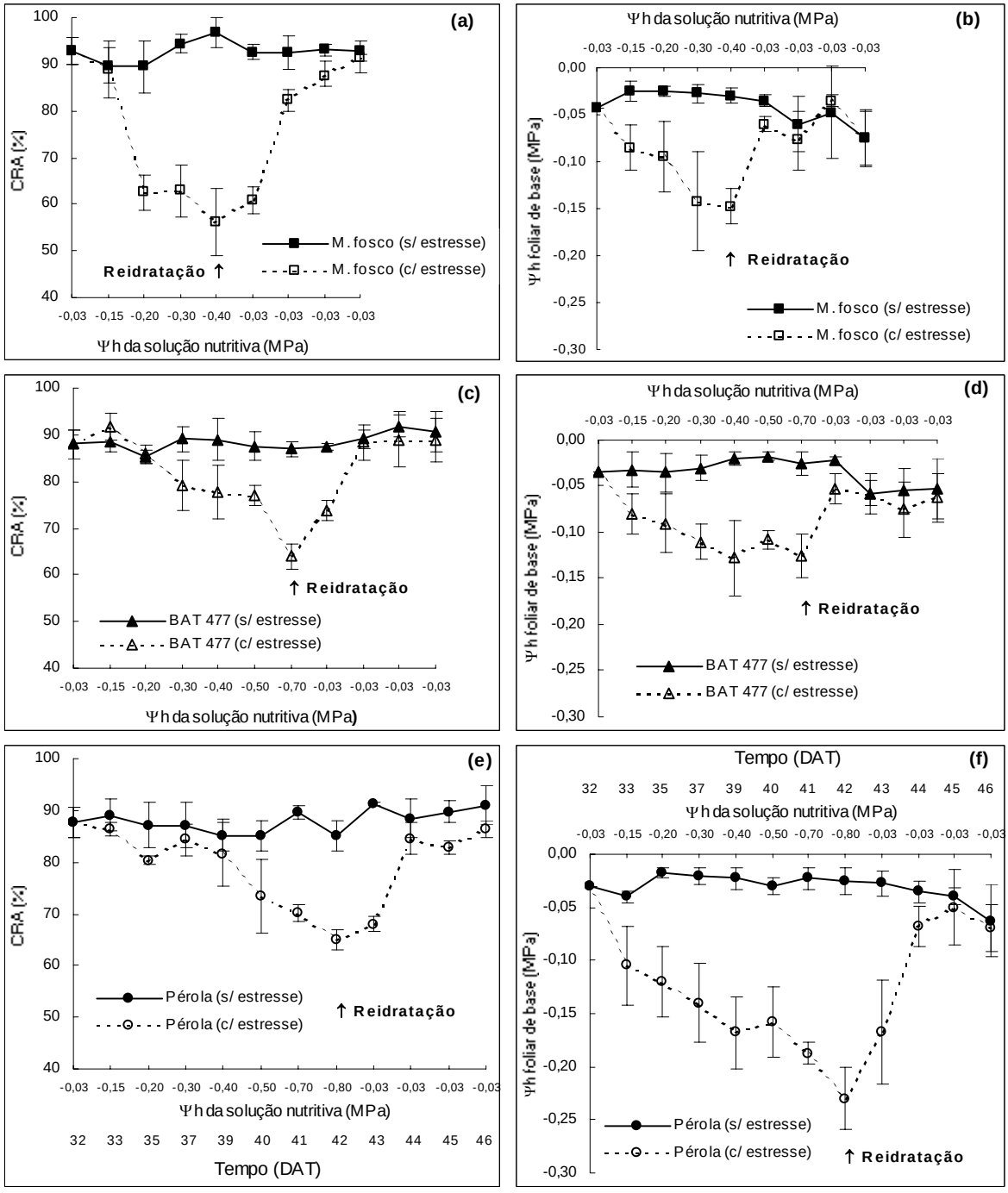

Figura 6. Conteúdo relativo de água (CRA) e potencial hídrico foliar de base (Ψh_f) de dois cultivares e uma linhagem de feijão, submetidos ao estresse pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) na solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). Cada ponto corresponde à média de 4 repetições. As barras transversais correspondem ao desvio padrão.

Os resultados do presente experimento concordam com outros experimentos. Relações estreitas entre CRA e teor de umidade solo, verificadas por Rodrigues (1973); Minarelli (1990) e Aguiar Neto (1993) e entre o CRA e o potencial hídrico da solução nutritiva com PEG por Raggi (1992) e Guimarães (1999).

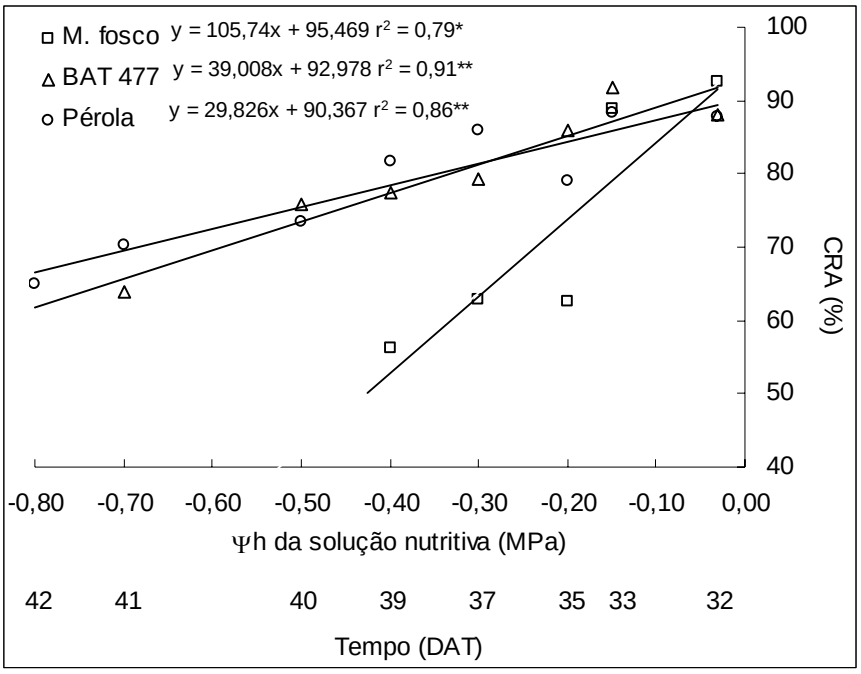

Figura 7. Relação entre o conteúdo relativo de água nas folhas (CRA) e variações no potencial hídrico da solução nutritiva por adição de PEG 6000, em dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris* L.). Cada ponto corresponde à média de quatro repetições. * Significativo pelo teste t de Student ($P \leq 0,05$); ** Significativo pelo teste t de Student ($P \leq 0,01$).

6.1.3 Potencial Hídrico Foliar de Base (Ψh_f)

A Figura (6 b, d, f) e Figura 8 mostram dados de potencial hídrico foliar de base (Ψh_f). Valores do controle foram similares para os três cultivares, ficando bem próximos ao Ψh_{sn} ($\cong$ -0,03MPa), confirmando que o Ψh_f no "pre-dawn" (antes do nascer do sol) se correlaciona com o Ψh imposto ao sistema radicular (Hsiao, 1990). O Ψh_f decresceu nos três materiais em função do estresse, quando comparado ao controle. Em déficit moderado (-0,15MPa) reduções no Ψh_f ocorreram mesmo antes de ser notado queda no CRA. Com a

reidratação, houve rápida recuperação no Ψh_f. Num primeiro momento (primeiro dia após a reidratação) Manteigão Fosco e BAT 477 já tinham atingido valores similares ao controle, o que ocorreu com o cultivar Pérola no segundo dia de reidratação. Este resultado, provavelmente, ocorreu em função do maior nível de estresse imposto a este cultivar (-0,80 MPa).

A redução no Ψh_f, apesar de apresentar relação estreita com a queda no Ψh_{sn}, não condiz com experimentos de estresse hídrico em solo, mesmo com decréscimo de até 45% no CRA em relação ao controle. Raggi (1992) obteve respostas similares em repetidos experimentos, com feijão crescidos em solução nutritiva com PEG 6000, ficando o Ψh_f, inalterado ou até mesmo aumentado com a elevação da concentração de PEG. Segundo este autor, o desbalanço hídrico entre apoplasto e simplasto, induzidos pela rápida e drástica redução na condutância estomática (g_s), parece ter sido responsável pela resposta. Alterações no coeficiente de elasticidade da parede celular, impregnada com PEG, podem também ocorrer (Davies & Van Volkenburch, 1983).

Janes (1974) verificou que o Ψh_f de plantas de pimentão decresceu 25 MPa quando o Ψh do substrato tratado com PEG 4000 decresceu 50 MPa abaixo do controle, concordando com nossos resultados. Já Plant & Federman (1985) verificaram em plantas de tomate crescidas em solução com PEG 6000 a –30 MPa, decréscimo idêntico no Ψhf.

A Figura 8 mostra a relação entre o Ψh_f e Ψh_{sn} no período de imposição do estresse (–0,03 a -0,8 MPa). O ajuste foi linear para a cultivar Manteigão Fosco e cúbico para BAT 477 e Pérola. Os dados evidenciam a influência do estresse causado pelo PEG 6000, onde não se observou grande queda no Ψh_f, mesmo com queda no CRA. Para os cultivares BAT 477 e Pérola, ocorreu estabilização no Ψh_f entre –0,30 e –0,5 MPa, quando voltou a decrescer.

A “incoerência” verificada em experimentos de Raggi (1992) e nos resultados aqui mostrados, deixa dúvidas quanto à afirmação de que soluções com PEG reproduzem a deficiência hídrica observada em condições de solo. Apesar das evidências aqui apresentadas, estudos para determinar com precisão a penetração de PEG nas plantas e seus reais efeitos no equilíbrio em apoplasto e simplasto, bem como no coeficiente de elasticidade da parede celular são necessários.

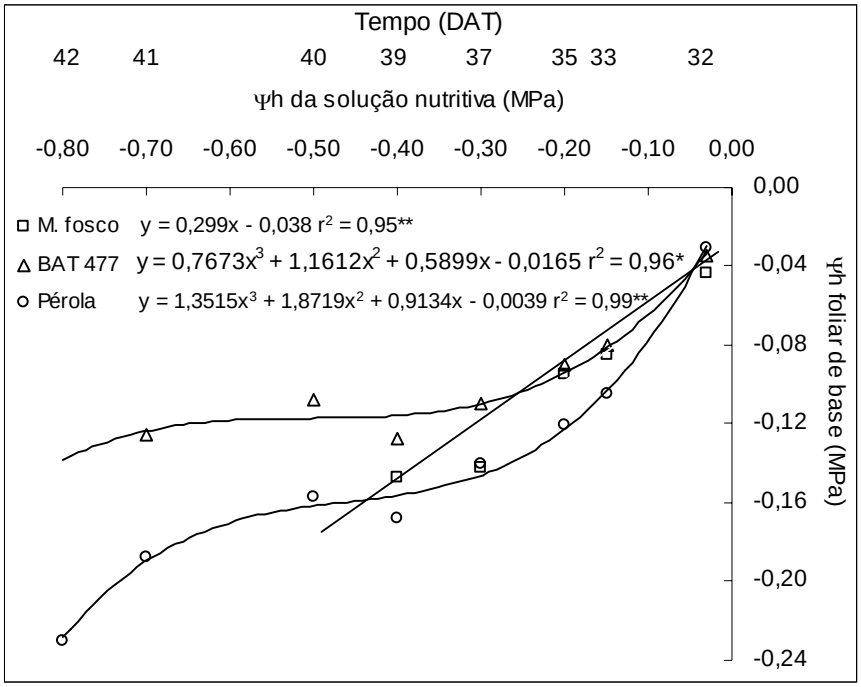

Figura 8. Relação entre o potencial hídrico foliar de base (Ψh_f) e variações no potencial hídrico da solução nutritiva pela adição de PEG 6000, em dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris* L.). Cada ponto corresponde à média de quatro repetições. *Significativo pelo teste t de Student (P≤0,05); ** Significativo pelo teste t de Student (P ≤ 0,01) .

6.2 Trocas Gasosas

Durante o período de avaliações, os valores médios de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (FFFA) foram de 695,6 ± 107,9 e 809,1 ± 244,4 μmoles m^{-2} s^{-1}, às 9 e 15 horas respectivamente. A cobertura plástica da estufa limitou em até 50% do FFFA registrado no exterior. Os níveis médios de CO_2 registrados no ambiente com o IRGA durante as medições foram de 346,9 ± 11,3 e 343,2 ± 10,9 μmoles mol^{-1}, às 9 e 15 horas respectivamente.

Nas Figuras 9 a 13 são apresentados os resultados de trocas gasosas: taxa de assimilação líquida de CO_2 (A); condutância estomática (g_s); taxa de transpiração (E), eficiência no uso de água (EUA) e concentração de CO_2 nos espaços intercelulares (Ci) dos cultivares de feijão Manteigão Fosco e Pérola e da linhagem BAT 477, as 9 e 15 horas, submetidos ao estresse por adição de PEG 6000 em solução nutritiva.

A taxa de assimilação líquida de CO_2 no controle se manteve em torno de 20 μmoles CO_2 m^{-2} s^{-1}, para os três cultivares, às 9 horas (Figura 9). Às 15 horas observou-se valores entre 10 e 25 μmoles CO_2 m^{-2} s^{-1}, devido a variações climáticas como: FFFA, temperatura e umidade relativa do ar (Figura 1).

Aumentos nos níveis de estresse levaram à queda na taxa líquida de assimilação de CO_2 nas medições realizadas às 9 e 15 horas, para os três materiais, mas com diferenças de respostas entre eles. Com Ψh_{sn} = -0,15 MPa houve queda drástica na assimilação de CO_2 do cultivar Manteigão Fosco às 9 e 15 horas (Figuras 9 a, b), o que não ocorreu para BAT 477 e principalmente Pérola (Figuras 9 c, d, e, f). Ocorreram reduções de 69,8; 43,2 e 20,0% às 9 horas e 83,2; 49,5 e 32,1% às 15 horas, para os três materiais respectivamente, em relação ao controle. Quando o Ψh_{sn} atingiu -0,4 MPa, momento da reidratação do cultivar Manteigão fosco, este apresentava valores quase nulos de assimilação líquida de CO_2, às 9 horas e 15 horas, com queda de 96,7 e 89,7%, respectivamente. BAT 477 e Pérola também mostraram queda, contudo bem menores: 63,5 e 39,0% às 9 horas e 51,3 e 19,8% às 15 horas, respectivamente. Estes cultivares foram submetidos a maiores níveis de estresse, sendo iniciada a reidratação a –0,7 MPa para BAT 477, com reduções de 85,6 e 94,9 %, as 9 e 15 horas respectivamente e –0,8 MPa para Pérola, com reduções de 93,3 e 96,7%, as 9 e 15 horas respectivamente, quando comparados ao controle.

Com a reidratação houve recuperação na taxa de assimilação líquida de CO_2, porém sem atingir valores similares ao controle nos quatro dias de avaliação. Limitações na condutância estomática e provavelmente comprometimento do maquinário fotossintético foram responsáveis por esta resposta (Figura 9). BAT 477 e Pérola atingiram taxas de assimilação líquida de CO_2 entre 10 e 15 μmoles m^{-2} s^{-1} no quarto dia de reidratação, enquanto Manteigão Fosco apresentou pequena recuperação no mesmo período (entre 5 e 10 μmoles m^{-2} s^{-1}), evidenciando maior sensibilidade e menor capacidade de recuperação, quando comparados aos outros materiais. BAT 477 e Pérola certamente atingiriam valores similares ao controle, além da possibilidade de lançarem folhas novas (crescimento indeterminado). Porém, Manteigão Fosco apresentava lesões necróticas nas folhas, possivelmente pelo acúmulo de PEG, tendo pequena possibilidade de total recuperação na atividade fotossintética das folhas, fato agravado por ser de crescimento determinado.

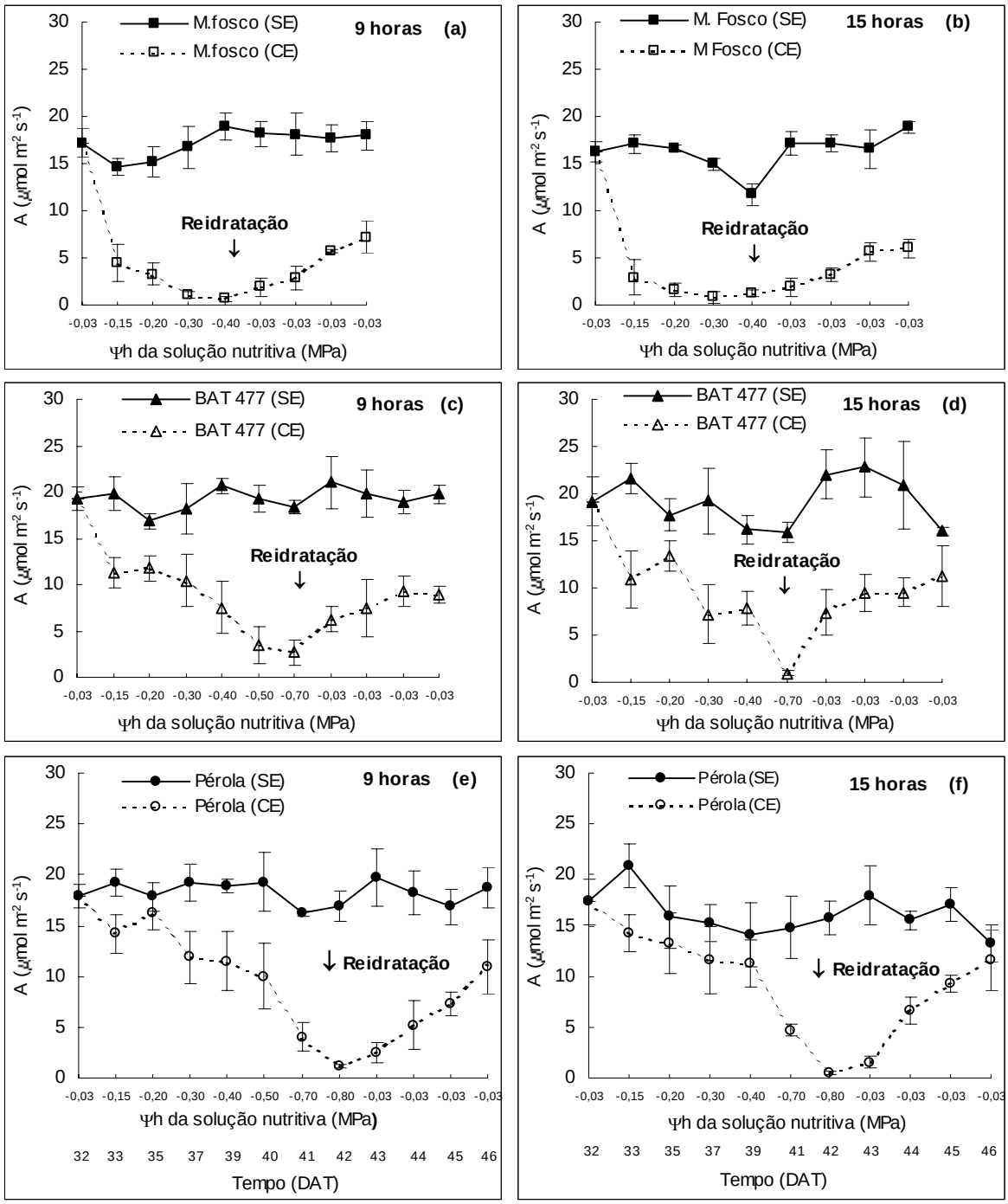

Figura 9. Taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) de dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris*), as 9 e 15 horas, em função de variações no potencial hídrico da solução nutritiva, por adição de PEG 6000. Cada ponto corresponde à média de quatro repetições e as barras transversais correspondem ao desvio padrão.

O atraso da recuperação de eventos metabólicos em comparação à recuperação do "status" hídrico e turgescência das plantas, em resposta à reidratação, são confirmados por Bengston et al. (1979), sendo notado com mais intensidade na atividade estomática.

Diferenças na habilidade de recuperação após a desidratação são verificadas na literatura (Levitt, 1980). Além de limitações estomáticas, limitações no próprio aparato fotossintético provocados pelo estresse, podem estar envolvidas na capacidade de recuperação das plantas. Ocorrem efeitos da desidratação na capacidade de regeneração da RuBP (Von Caemmerer & Farquhar, 1981), atividade da RuBPcase (O'Toole et al, 1976), bem como danos diretos no aparato fotossintético, apesar de sua comprovada tolerância (Kaiser, 1987).

Valores de g_s oscilaram entre 0,3 a 1,1 mmoles m^{-2} s^{-1}, às 9 horas e 0,2 a 0,9 mmoles m^{-2} s^{-1} às 15 horas. Quedas bruscas foram observadas para Manteigão Fosco e BAT 477 (Figuras 10 a, b, c, d) quando o Ψh_{sn} era de -0,15 MPa (90,8 e 81,4% as 9 horas e 91,7 e 71,1% as 15 horas, respectivamente), o que não ocorreu com o Pérola com queda de 61,1 e 53,6% as 9 e 15 horas (Figura 10 e, f). A –0,4 MPa observavam-se quedas de 97,7; 91,3 e 69,8% às 9 horas e 96,1; 92,2 e 69,9% às 15 horas, para os três materiais respectivamente. BAT 477 apresentava queda de 95,2 e 96,9% às 9 e 15 horas a –0,7 MPa e o cultivar Pérola 94,9 e 97,6% nos mesmos horários quando o Ψh_{sn} era de –0,8 MPa.

Estudos de Raggi (1992) com *P. vulgaris* também mostraram decréscimo precoce e agudo na condutância estomática de folhas com o aumento da concentração de PEG 6000 em solução nutritiva. O referido autor, através da quantificação do polímero na seiva do xilema, notou que o PEG foi absorvido em maiores quantidades nas primeiras 48 horas, após o início do tratamento, sugerindo ser este o motivo para a queda na g_s, devido ao acúmulo do PEG nos sítios evaporativos. Parece lógico, este fato, já que o cultivar Manteigão Fosco, primeiro a mostrar sinais da presença do PEG na superfície foliar foi o que apresentou maior redução na g_s, quando o potencial hídrico da solução nutritiva estava a – 0,15 MPa.

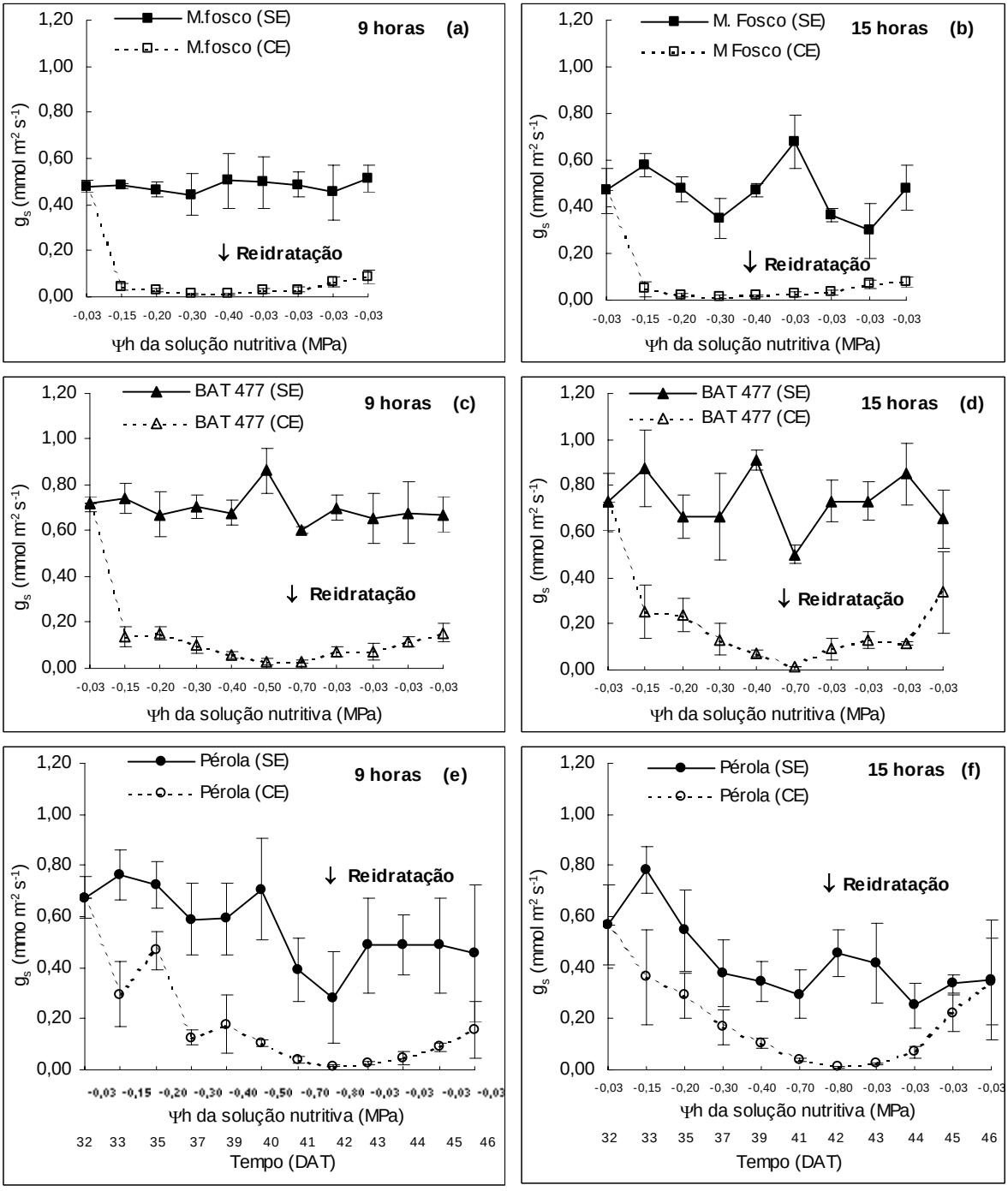

Figura 10. Condutância estomática (g_s) de dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris*), às 9 e 15 horas, em função de variações no potencial hídrico da solução nutritiva, por adição de PEG 6000. Cada ponto corresponde à média de quatro repetições e as barras transversais correspondem ao desvio padrão.

As taxas de transpiração durante a avaliação (Figura 11) ficaram, para o controle, entre 0,004 a 0,008 moles m^{-2} s^{-1} e 0,003 a 0,010 moles m^{-2} s^{-1}, as 9 e 15 horas respectivamente. Com Ψh_{sn} de -0,15 MPa, as quedas eram de 88,5; 63,8; 46,9%, às 9 horas e 84,6; 48,4; 40,8, `as 15 horas, para os três cultivares respectivamente. A –0,4 MPa somente o cultivar Pérola ainda mantinha níveis de transpiração razoáveis, com queda de aproximadamente 60% em relação ao controle nos dois horários (Figuras 11 e, f). Quando o Ψh_{sn} estava em –0,7 MPa, BAT 477 apresentava queda de 93,2 e 93,6%, as 9 e 15 horas respectivamente (Figuras 11 c, d), enquanto o cultivar Pérola mostrou queda de 96,2 e 98,3% a –0,8 MPa (Figuras 11 e, f).

A grande queda na taxa de transpiração nas folhas, observada para o cultivar Manteigão Fosco em estresse moderado foi responsável pela maior redução na taxa média diária de consumo de água deste cultivar (Figura 5), verificado também para a linhagem BAT 477, porém com menor intensidade. Respostas em transpiração condizem com respostas estomáticas após a reidratação, mantendo maior eficiência no uso de água (EUA) nos primeiros dias após reidratação (Figura 12) em função do controle estomático.

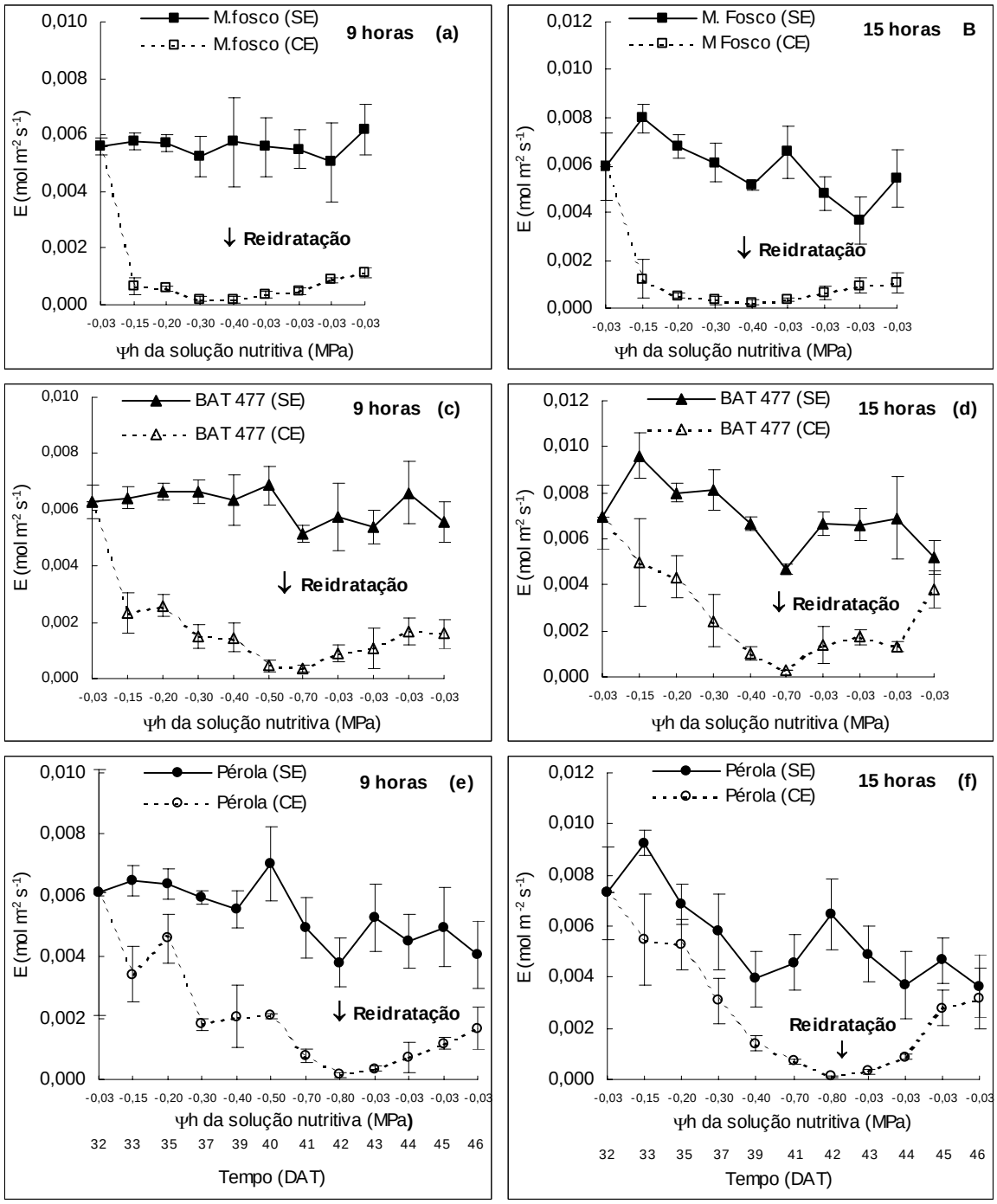

Figura 11. Taxa de transpiração de folhas (E) de dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris*), às 9 e 15 horas, em função de variações no potencial hídrico da solução nutritiva, por adição de PEG 6000. Cada ponto corresponde à média de quatro repetições e as barras transversais correspondem ao desvio padrão.

A razão entre A e E, permite avaliar o comportamento dos cultivares, quanto à economia de água, na utilização em processos metabólicos, como assimilação de CO_2. A eficiência no uso de água (EUA) apresentada na Figura 12 mostra que a imposição do estresse por PEG 6000 levou a um aumento nesta variável, em comparação ao controle, para todos os cultivares nos dois horários de avaliação. Às 9 horas, BAT 477 mostrou a maior EUA sob estresse. Castonguay & Markhart (1992) também verificaram aumento na eficiência do uso de água com o decréscimo do Ψh_f e g_s. Segundo estes autores, a manutenção de maior eficiência do uso de água com o estresse, combinada com estômatos mais responsivos ao Ψh_f, poderia contribuir com outras características de adaptação ao déficit hídrico.

Queda na EUA, principalmente para o cultivar Manteigão Fosco foi verificada em estresse mais severo, indicando taxas de assimilação líquida de CO_2 praticamente nulas para este cultivar a –0,4 MPa (Figura 9). Com a reidratação, a EUA apresentou tendência de queda que levaria a igualar-se ao controle, exceto para o cultivar Manteigão Fosco, devido a grande comprometimento na capacidade mesofílica para fotossíntese (Figura 13) e pela transpiração (E) ter se recuperado mais lentamente que a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A).

Ás 15 horas, devido a temperaturas mais altas e umidade relativa do ar mais baixa (Figura 1), a EUA não aumentou com o estresse moderado. Aumentos só foram verificados a partir de –0,4 MPa, momento de reidratação para o Cultivar Manteigão Fosco. Com condições de temperatura e umidade relativa do ar desfavoráveis, menores reduções ocorreram na transpiração em relação à fotossíntese líquida das folhas, explicando esta resposta.

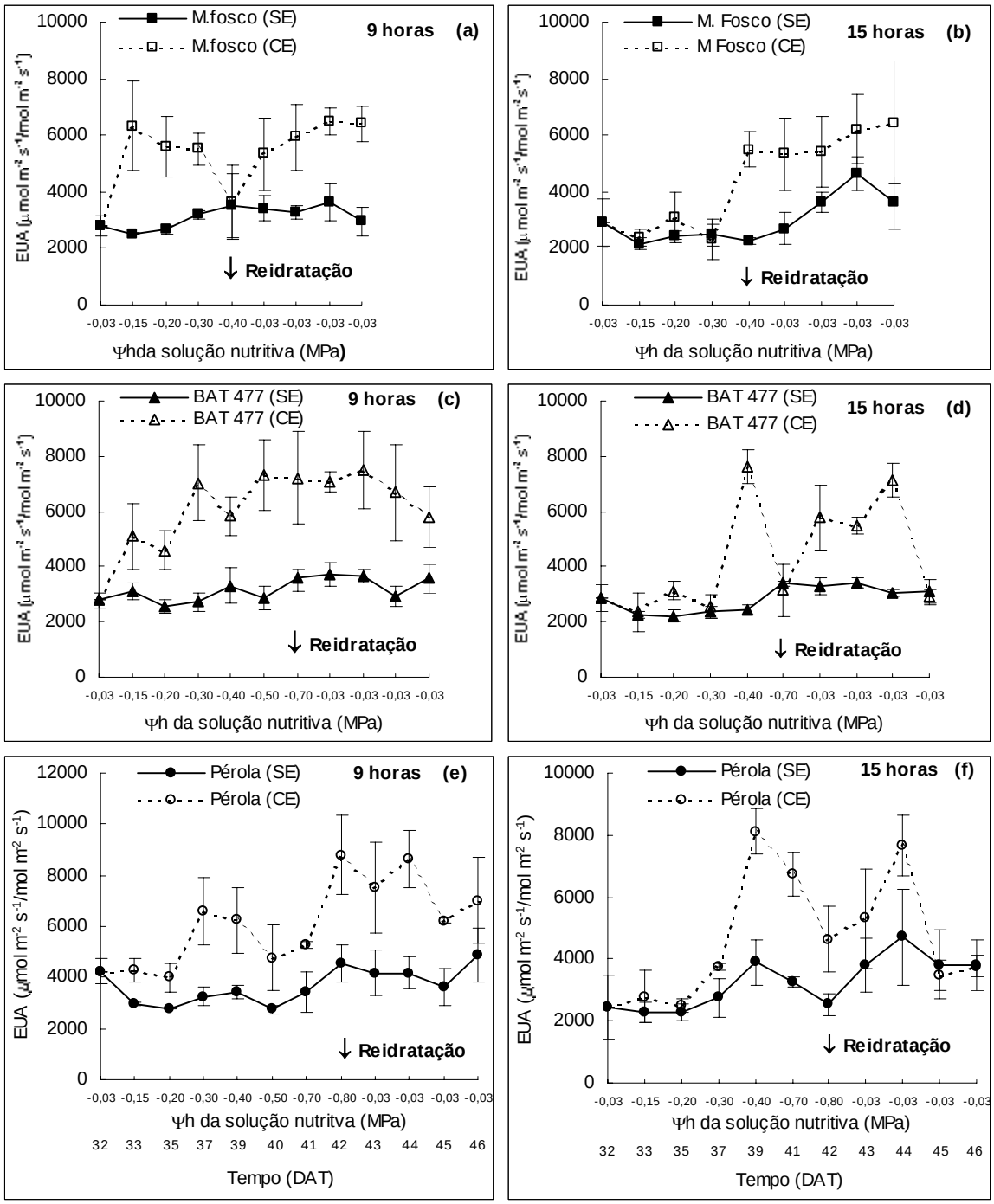

Figura 12. Eficiência no uso de água (EUA) de dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris*), às 9 e 15 horas, em função de variações no potencial hídrico da solução nutritiva, por adição de PEG 6000. Cada ponto corresponde à média de quatro repetições e as barras transversais correspondem ao desvio padrão.

A concentração de CO_2 nos espaços intercelulares (Ci) é uma variável importante, pois permite inferir sobre o "funcionamento do maquinário fotossintético" e, conseqüentemente, restrições na condutância mesofílica, bem como distinção entre limitações estomáticas e mesofílicas (Von Caemmerer & Farquhar, 1981; Johnson et al., 1987; Castonguay & Markhart, 1992). A Figura 13 mostra variações ocorridas na Ci durante a imposição do estresse. A Ci nas plantas controle permaneceu com 50 a 100 μmoles mol^{-1} a menos que o CO_2 ambiente (340 a 350 μmoles mol^{-1}). Sob estresse, a tendência foi de queda inicial, sendo explicada por limitações estomáticas (Figura 10), reduzindo a entrada de CO_2 pelos estômatos. Porém em níveis mais altos de estresse, a Ci voltou a aumentar. Os dados deste experimento concordam com Raggi (1992) que verificou, em plantas de feijão, queda inicial na Ci seguida de aumento em concentrações mais altas de PEG 6000 na solução nutritiva, sugerindo limitação não estomática na fotossíntese. Fechamento desigual de estômatos na superfície foliar, verificado por Sharkey & Seemanm (1989), pode também explicar aumentos na Ci a níveis mais elevados de estresse.

Nos cultivares BAT 477 e Pérola, aumentos na Ci iniciaram em torno de –0,4 e -0,5 MPa respectivamente (Figuras 13 c, d, e, f). Os altos níveis de Ci, verificados a –0,4; -0,7 e –0,8 MPa, para Manteigão Fosco, BAT 477 e Pérola, respectivamente, sugerem limitações mesofílicas, além de estomáticas. Baseados no Ψh_{sn}, e Ψhf deste experimento, o estresse não deveria ter sido tão severo, principalmente comparados a experimentos de solo com *P. vulgaris*, onde a assimilação de CO_2 cessa em potencial hídrico foliar em torno –1,0 MPa (Krampitz et al., 1984; O'Toole et al., 1977; Sharkey & Seemann, 1989), além de Ludlow et al. (1985) afirmarem que em condições de campo, ajustamento estomático pode ocorrer lentamente, levando à aclimatação, podendo, a condutância estomática e fotossíntese serem mantidas a valores mais baixos de Ψhf.

Indicações de grande tolerância do aparato fotossintético (transporte de elétrons, formação de "poder redutor" ($NADPH^+ + H^+$) e ATP), com a capacidade fotossintética do mesofilo reduzida somente quando o CRA atinge valores abaixo de 70%, segundo estudos de Kaiser (1987), também nos leva a acreditar em possíveis efeitos do PEG 6000 no aparato fotossintético.

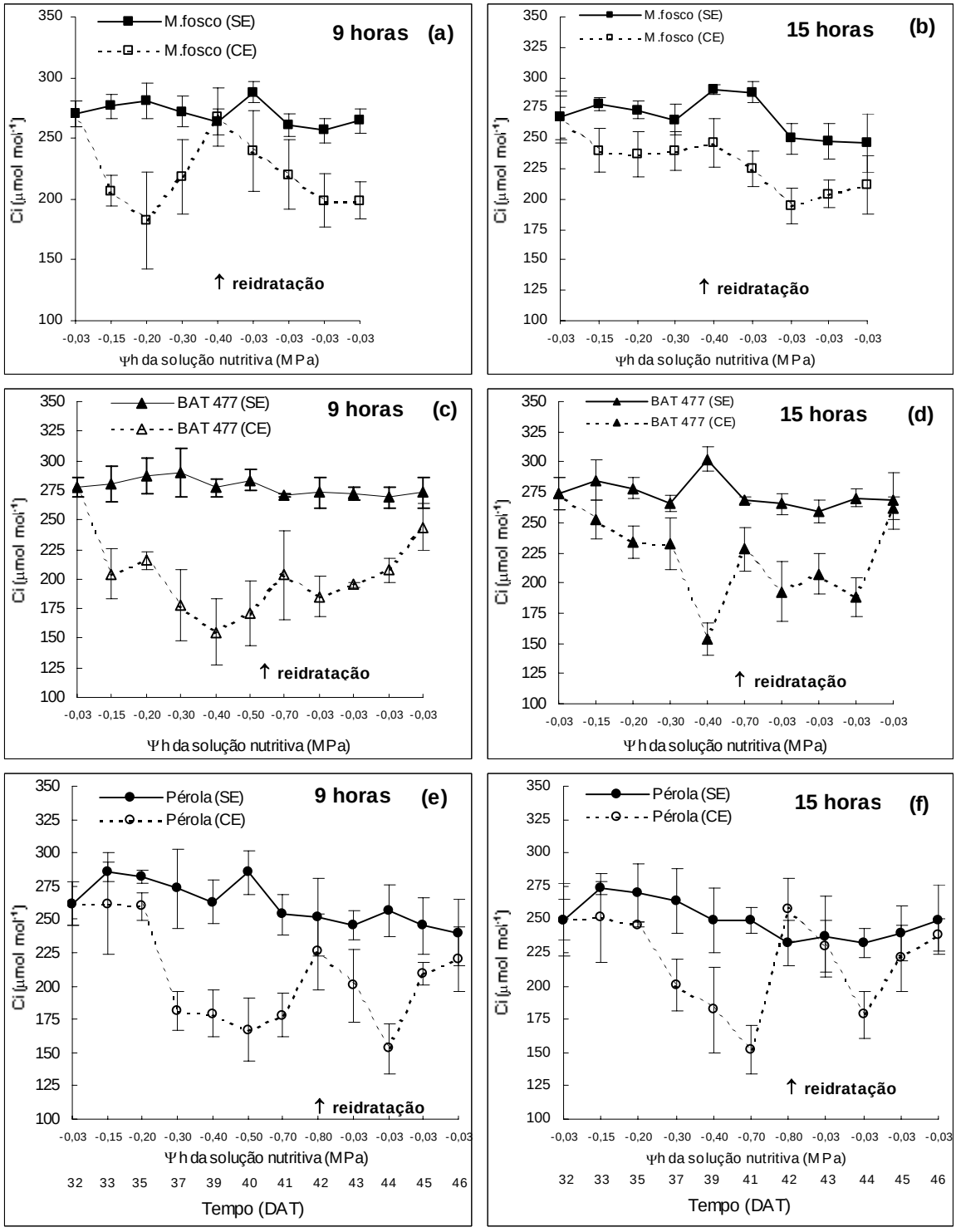

Figura 13. Concentração de CO_2 nos espaços intercelulares (Ci) de dois cultivares e uma linhagem de feijão (*P. vulgaris*), as 9 e 15 horas, em função de variações no potencial hídrico da solução nutritiva, por adição de PEG 6000. Cada ponto corresponde à média de quatro repetições e as barras transversais correspondem ao desvio padrão.

Com a reidratação houve queda inicial da Ci, explicada provavelmente por aumentos na assimilação de CO_2. Em BAT 477 e Pérola, os níveis de Ci após uma queda, retornaram a valores similares ao controle, indicando uma retomada na atividade fotossintética, o que não foi observado para o cultivar Manteigão Fosco. Quatro dias após a reidratação, apesar de indicar aumento na Ci, este cultivar não tinha atingido valores do controle, o que sugere grande comprometimento do aparato fotossintético.

A desuniformidade no fechamento estomático em resposta à deficiência hídrica, mostrada por Downton et al. (1988) e Sharkey & Seeman (1989), sugere uma superestimação da Ci determinada por dados de trocas gasosas com o IRGA, podendo dificultar, em parte, interpretações de aumentos na Ci, devido a efeitos não estomáticos na inibição da fotossíntese. Infelizmente não foi possível medidas mais específicas como fluorescência de clorofila, porém, apesar de provável superestimação da Ci, os dados aqui apresentados deixam bem claro, interferências não estomáticas na inibição da fotossíntese.

Em estudos de regressão relacionando taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E) com o potencial hídrico da solução nutritiva (Ψh_{sn}) no período de estresse (-0,03 a –0,08 MPa), estabeleceram claras diferenças de sensibilidade ao tratamento com PEG 6000 entre os materiais testados (Figura 14). Para o cultivar Manteigão Fosco o melhor ajuste foi potencial para todas as variáveis nos dois horários com exceção da taxa líquida de assimilação de CO_2 às 9 horas, que mostrou comportamento exponencial. Nota-se queda brusca nas variáveis de trocas gasosas deste cultivar a níveis moderados de estresse, principalmente em comparação aos BAT 477 e Pérola. O cultivar Pérola mostrou menor sensibilidade ao estresse. Este apresentou comportamento linear quanto à taxa de assimilação líquida de CO_2 nos dois horários de avaliação (Figuras 14 a, b) e exponencial para condutância estomática (Figuras 14 c, d) e transpiração (Figuras 14 e, f). Diferenças entre Pérola e BAT 477 foram verificadas para taxa de assimilação líquida de CO_2 as 9 e 15 horas e condutância estomática às 9 horas, quando os dados foram ajustados. Comportamento desejável, devido a maior economia de água principalmente às 15 horas, onde temperatura e déficit de pressão de vapor são mais elevados.

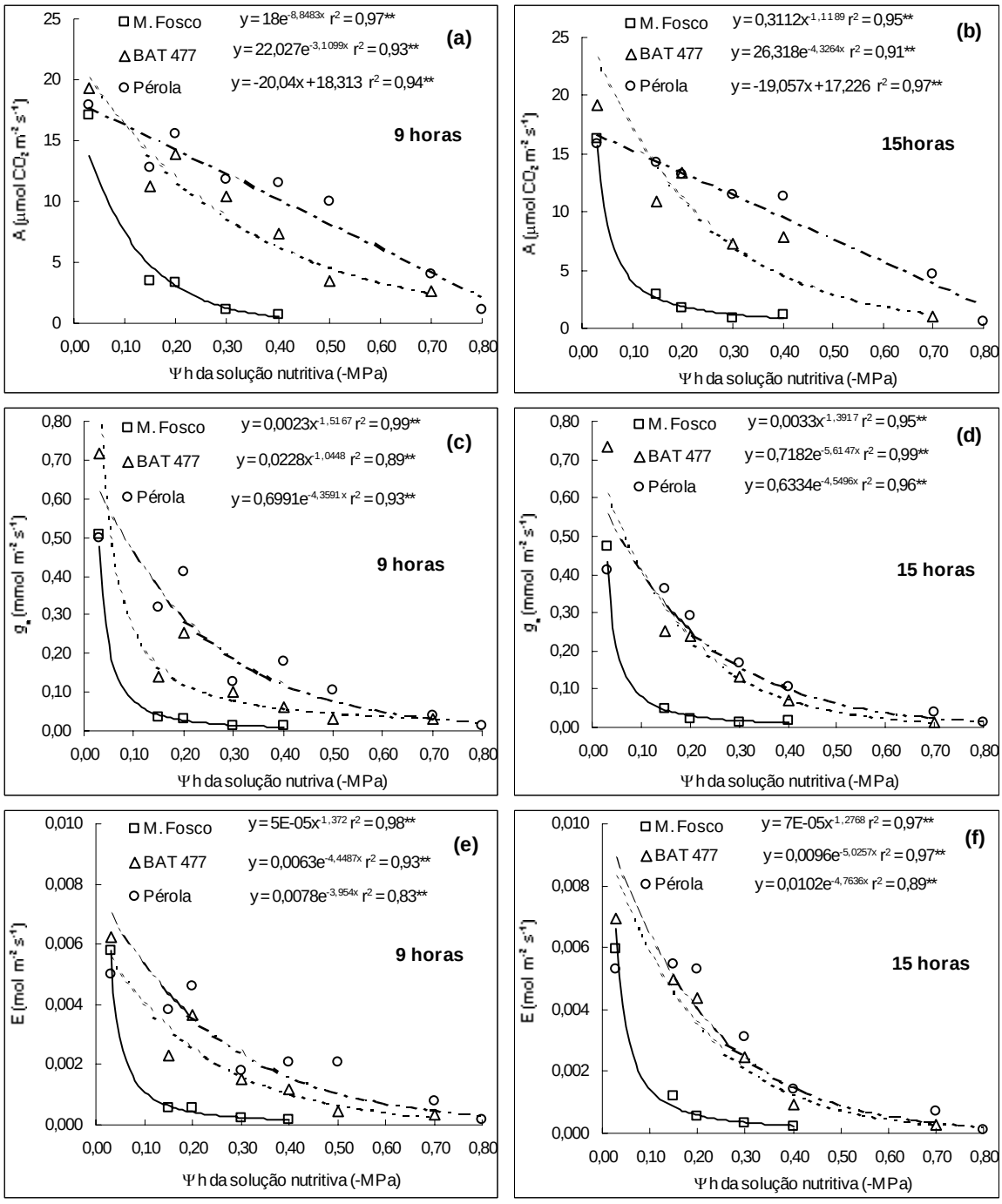

Figura 14. Relação entre taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) de dois cultivares e uma linhagem de feijão e potencial hídrico da solução nutritiva (Ψh_{sn}) durante estresse por adição de PEG 6000, às 9 horas (A, C, E) e às 15 horas (B, D, F). ** Significativo pelo teste t de Student ($P \leq 0,01$). 9 horas: M. Fosco [A (t = -9,66), g_s (t = -14,56), E (t = -12,64)]; BAT 477 [A (t = -8,03), g_s (t = -7,12), E (t = -9,29); Pérola [A (t = -9,43), g_s (t = -8,89), E (t = -5,41)]. 15 horas: M. Fosco [A (t = -7,72), g_s (t = -7,74), E (t = -10,70)]; BAT 477 [A (t = -6,48), g_s (t = -19,91), E (t = -11,35); Pérola [A (t = -11,88), g_s (t = -10,79), E (t = -6,48)].

Relações entre taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) e transpiração (E) são mostradas na Figura 15 e podem ser utilizadas para inferir sobre a eficiência do uso de água para assimilação de CO_2 e acúmulo de matéria seca. O cultivar Manteigão Fosco, apesar de demonstrar maior economia de água, teve grande redução da taxa de assimilação líquida de CO_2, mostrando grande sensibilidade ao estresse. BAT 477 e Pérola se comportaram de forma semelhante.

A eficiência do uso de água aqui discutida é obtida relacionando a taxa de assimilação de CO_2 com a transpiração, o que pode refletir a eficiência do uso de água ao nível de produção de matéria seca, bem como produção econômica. Porém, deve-se tomar certos cuidados, pois no acúmulo de matéria seca, vários processos metabólicos estão envolvidos, podendo ser estes mais ou menos afetados pelo estresse hídrico, em função de diferenças inter e intraespecíficas. Como exemplo, podem ser mencionadas a translocação e síntese de proteínas, consideradas mais tolerantes à desidratação que a assimilação de CO_2 e respiração (Boyer, 1976)

A queda da condutância estomática parece ter sido o principal fator responsável pelo decréscimo da taxa de assimilação líquida de CO_2 com o aumento progressivo do estresse, principalmente em estresse moderado. O que pode ser verificado pela estreita relação entre estas duas variáveis (Figura 16). Em BAT 477 e Pérola verificou-se decréscimo inicial acentuado na condutância estomática (Figuras 16 c, d, e, f), acompanhado pela taxa de assimilação de CO_2, com redução mais evidente em torno de 12 μmoles CO_2 m^{-2} s^{-1} para os dois horários de avaliação, momento que a condutância estomática estava entre 0,10 e 0,20 mmoles m^{-2} s^{-1}. Este comportamento possibilitou maior eficiência do uso de água nos níveis iniciais de estresse, o que é resposta desejável para condição de restrição hídrica. A economia de água se verifica com redução na transpiração das folhas em função do fechamento estomático.

A transpiração estomática rege as perdas d'água pelas plantas, estando em condições de estresse ou bem hidratadas. Perdas de água por outra forma, como cuticular, são no máximo responsáveis por 10% da transpiração total da planta, fator que impede a planta cessar totalmente a perda de água, além de diferenças do potencial água no contínuo solo-planta-atmosfera estarem sempre favoráveis à perda de água para a atmosfera.

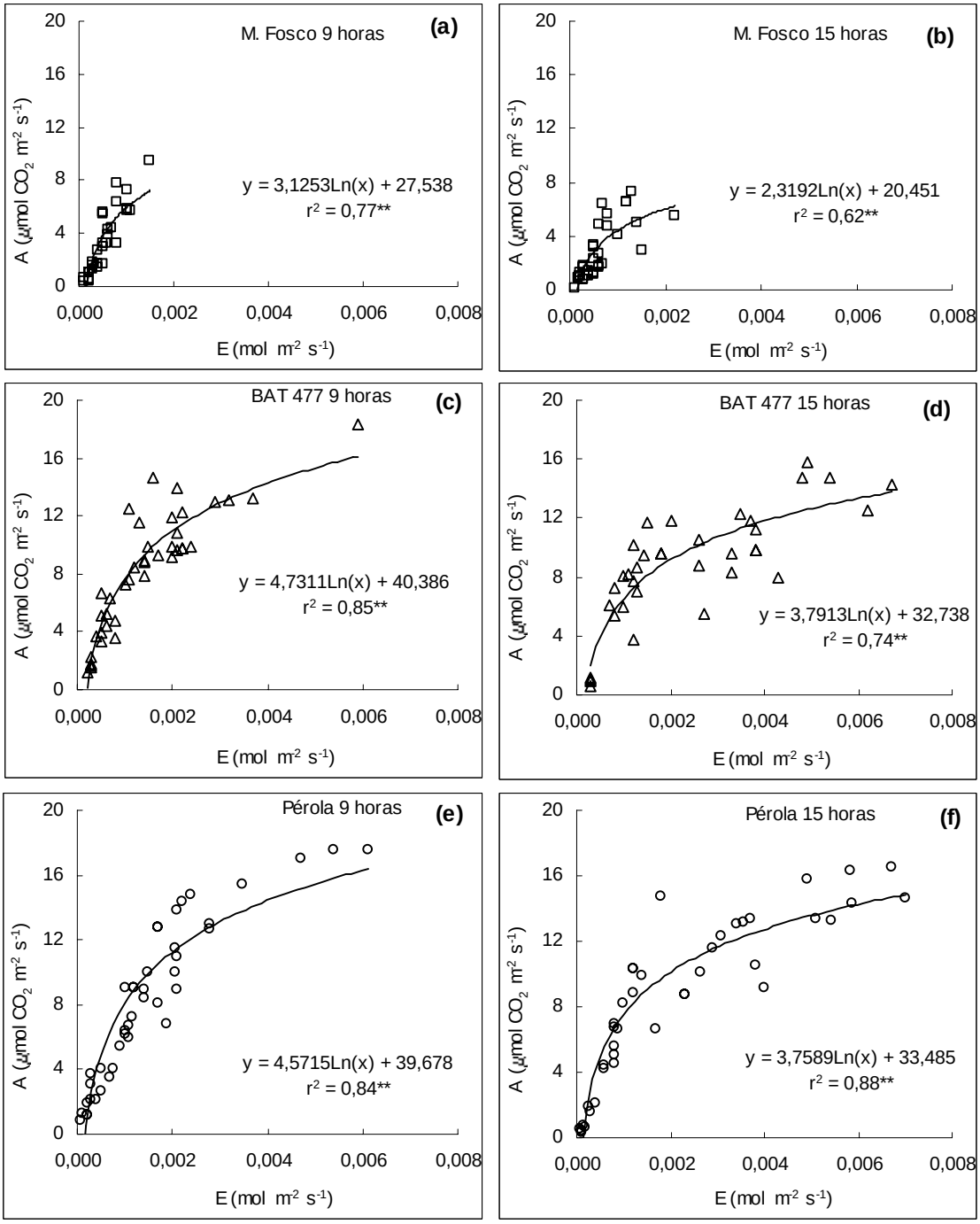

Figura 15. Relação entre a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) e a taxa de transpiração (E) de folhas de dois cultivares e uma linhagem de feijão, submetidos ao estresse em condições de solução nutritiva pela adição de polietileno glicol (PEG 6000), às 9 e 15 horas, durante o período de 01 a 17 de maio de 2000. ** $P \leq 0,01$ pelo teste t de Student. A (t = 9,97); B (t = 7,01); C (t = 14,42); D (t = 9,91); E (t = 13,24); F (t = 16,03).

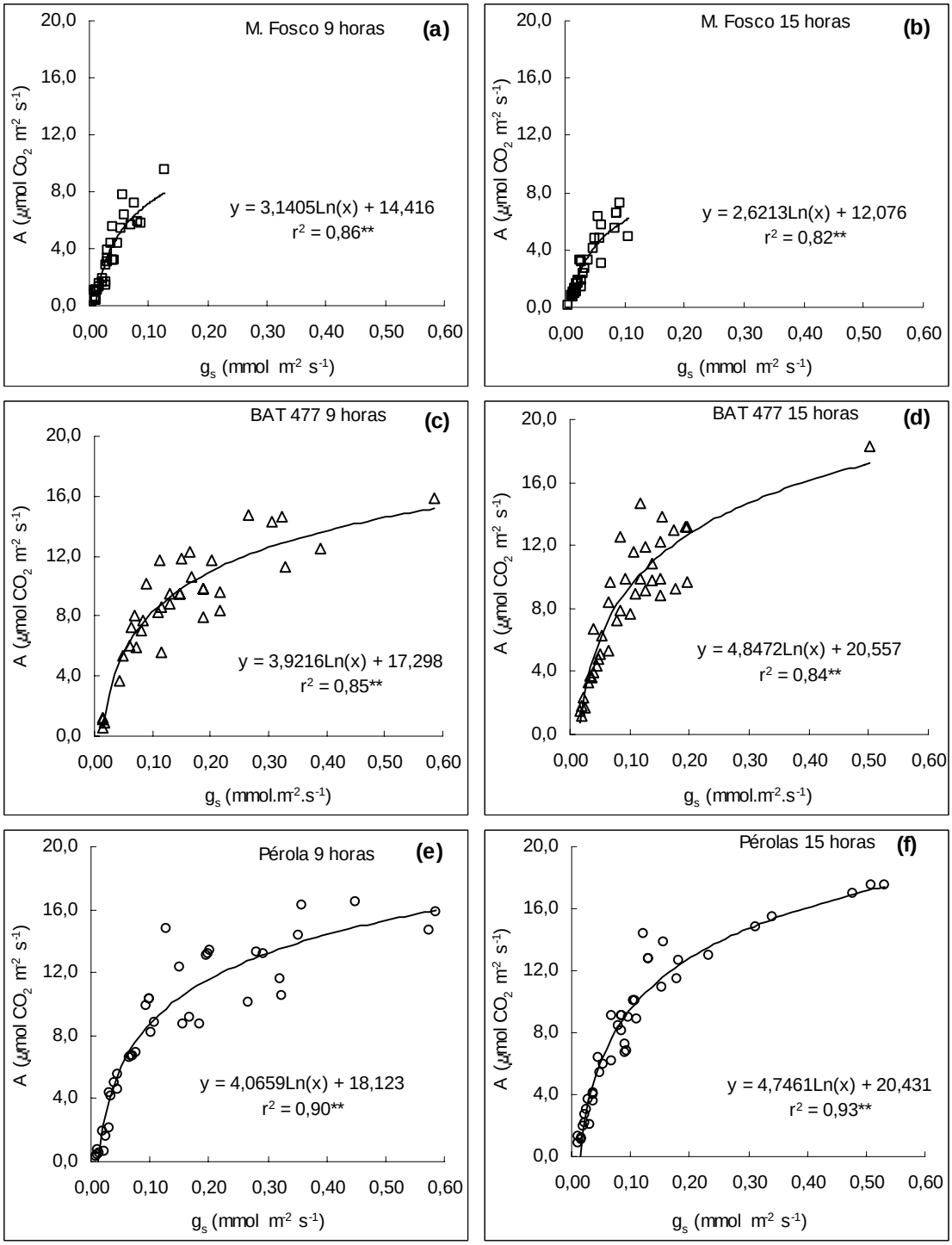

Figura 16. Relação entre a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) e a condutância estomática (g_s) de folhas de dois cultivares e uma linhagem de feijão, submetidos ao estresse em condições de solução nutritiva pela adição de PEG 6000, às 9 e 15 horas, durante o período de 01 a 17 de maio de 2000. ** $P \leq 0,01$ pelo teste t de Student. A (t = 13,50); B (t = 11,85); C (t = 14,37); D (t = 14,04); E (t = 18,18); F (t = 18,04).

6.3 Parâmetros Bioquímicos

6.3.1 Níveis de Prolina nas Folhas

Verificando os níveis de prolina (Figura 17), notou-se que o estresse influenciou mais significativamente o cultivar Manteigão Fosco (Figura 17 a). Porém este efeito foi relativo, pois mesmo acumulando prolina em resposta ao estresse quando comparado ao controle, os níveis deste aminoácido foram inferiores a BAT 477 e Pérola. Os máximos acúmulos, ocorreram a –0,4 MPa para Manteigão Fosco (78,37 ± 17,22 μmoles g^{-1} de MSF), a -0,5 MPa para BAT 477 (136,87 ± 22,09 μmoles g^{-1} de MSF) e a –0,4 MPa para Pérola (91,38 ± 6,35 μmoles g^{-1} de MSF), com queda no nível de prolina em estresse mais severos para BAT 477 e Pérola (Figura 17 b, c). Pérola não acumulou este aminoácido em função do estresse, quando comparado ao controle (Figura 17 c). Contudo, o acúmulo de prolina esteve relacionado ao estresse no cultivar mais sensível, funcionando como um indicador desse estresse.

O cultivar mais sensível ao tratamento com PEG 6000 foi o que relativamente, acumulou mais prolina, enquanto que o Pérola, cultivar que mostrou menor sensibilidade a este tratamento, praticamente não acumulou este aminoácido nas folhas, quando comparado ao controle. Controvérsias quanto à função da prolina em planta submetida ao estresse são freqüentes na literatura, podendo também a natureza e intensidade do estresse influenciarem na resposta. O nível naturalmente mais alto de prolina nas folhas da linhagem BAT 477 e cultivar pérola poderiam estar relacionados com a maior tolerância destes materiais.

Alguns autores afirmam, baseados em seus resultados, que a prolina teria funções ligadas a processos de adaptação ao déficit hídrico (Singh et al., 1972; Bates, 1973). Outros, entretanto sugerem ser a prolina indicador de estresse (Hanson et al., 1977b; Becker & Fock, 1986), o que parece mais provável. A possibilidade do acúmulo de prolina ter função de armazenamento de nitrogênio para retomada na síntese de proteínas em eventual recuperação do estresse também é discutida (Barnett & Naylor, 1966; Jäger & Meyer, 1977; Hsiao, 1973), concordando com o comportamento do cultivar Manteigão Fosco, onde os

níveis de prolina retornaram a valores do controle após quatro dias de reidratação. Degradação e reutilização como fonte de carbono, nitrogênio para síntese de proteínas também é discutido (Stewart, 1972; Singh et al., 1973).

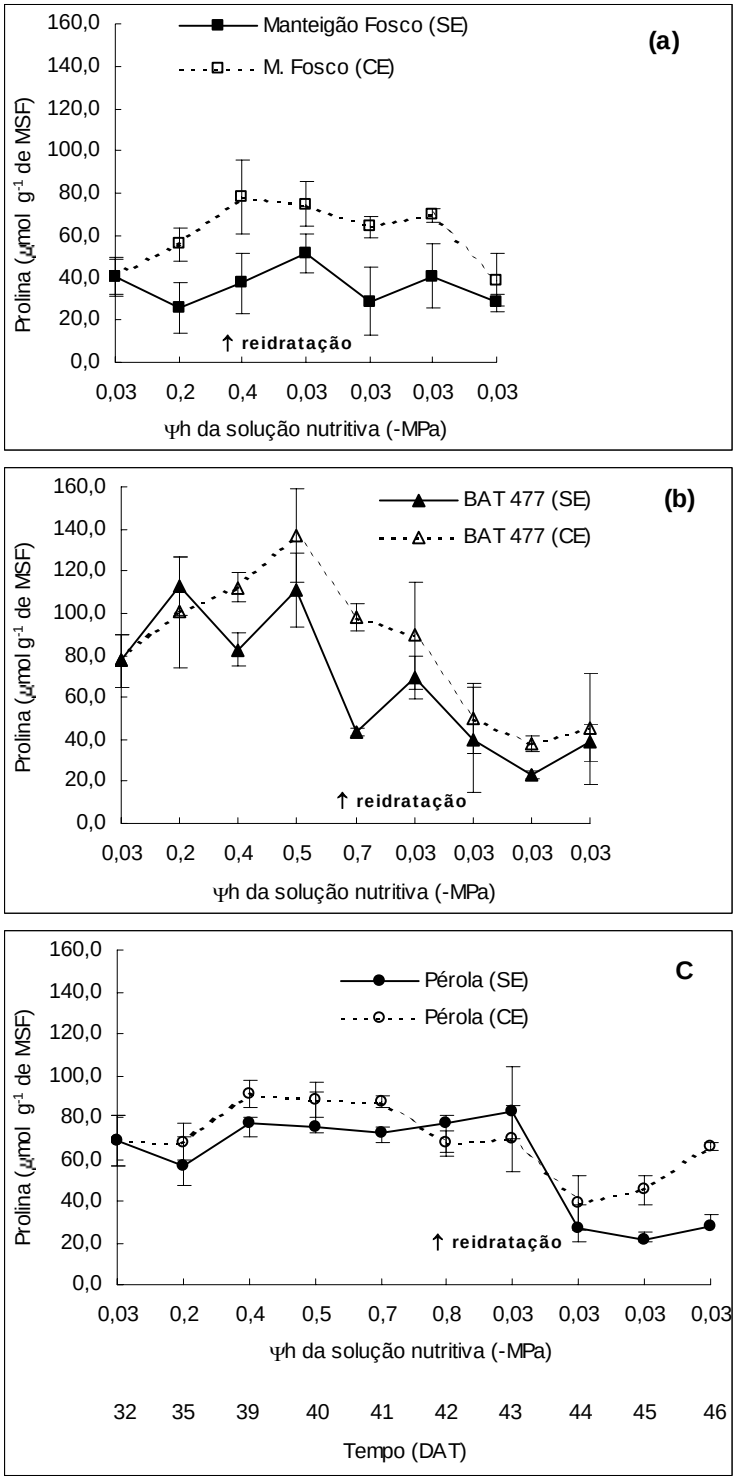

Figura 17. Níveis de prolina nas folhas de dois cultivares e uma linhagem de feijão, submetidos ao estresse, por adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva. Valores médios de quatro repetições. As barras transversais correspondem ao desvio padrão. SE – sem estresse (controle); CE – com estresse.

6.3.2 Níveis de Poliaminas nas Folhas

Os níveis das poliaminas espermina e espermidina nas folhas dos cultivares Manteigão Fosco e Pérola e da linhagem BAT 477 são mostrados nas Figura 18. A diamina putrescina praticamente não esteve presente em quantidades mensuráveis em folhas de plantas mantidas sem e com estresse e suas concentrações foram baixas e bastante variáveis, quando comparada às outras duas poliaminas. Os níveis médios de putrescina nas folhas dos três materiais foram de 4,07 ± 3,16 e 3,36 ± 3,52 μmoles g^{-1} de MFF para Manteigão Fosco; de 0,92 ± 2,31 e 0,34 ± 0,59 μmoles g^{-1} de MFF para BAT 477 e de 0,57 ± 0,70 e 0,50 ± 0,86 μmoles g^{-1} de MFF para Pérola, sem e com estresse, respectivamente.

O estresse imposto por PEG 6000 não resultou em acúmulo de poliaminas nas folhas dos genótipos de feijão estudados, porém, nos níveis iniciais de estresse (-0,15 e –0,20 MPa) os teores de espermina e espermidina aumentaram nas folhas de BAT 477 e Pérola, porém se igualou ao controle com a intensificação do estresse. Para o cultivar Manteigão Fosco este acúmulo inicial não foi verificado.

Os resultados deste experimento diferem da maioria dos resultados encontrados na literatura, principalmente para gramíneas, quando submetidas a estresse hídrico, osmótico e por deficiência de potássio. Nestes casos, normalmente verifica-se maior acúmulo da diamina putrescina. Porém, Turner & Stewart (1986) notaram que, cultivares de cevada em condições de estresse hídrico, tiveram respostas diferentes quanto ao acúmulo de putrescina, sendo que alguns cultivares acumularam, outro não diferiu do controle e até ocorreram quedas nos níveis desta diamina. Estes autores ainda verificaram que os níveis de putrescina permaneceram inalterados, quando as plantas foram estressadas rapidamente.

Verificou-se para os três materiais, tanto para o controle quanto para as plantas sob estresse, queda nos níveis de poliaminas nas folhas com o decorrer do período de avaliação. Uma possível explicação seria o desvio de compostos nitrogenados livres das folhas para as estruturas reprodutivas que se tornaram o principal dreno, pois estavam no início da fase reprodutiva.

Os baixos níveis de putrescina verificados nas folhas podem estar relacionados à ação das enzimas espermina e espermidina sintase, que convertem putrescina em espermina e espermidina, além de possível degradação daquela diamina.

Palavan & Galston (1982) estudaram a biossíntese de poliaminas em diferentes tecidos de *P. vulgaris*, nas fases vegetativa e reprodutiva, e verificaram que o conteúdo das principais poliaminas (putrescina, espermina e espermidina), bem como a atividade das enzimas específicas na biossíntese de poliaminas, arginina descarboxilase (ADC) e ornitina descarboxilase (ODC) foi alto em tecidos em crescimento, como folhas novas, botões florais, sementes e vagens em desenvolvimento, e baixa em tecidos maduros como folhas. Este pode ser também um dos motivos para o baixo nível de putrescina nas folhas, bem como a não ocorrência de acúmulo de poliaminas em resposta ao estresse neste experimento.

Respostas do metabolismo de poliaminas em função do estresse induzido por PEG 6000 não foram conclusivas. Para as cultivares e a linhagem de feijão utilizados, estes compostos nitrogenados não funcionaram como indicadores de estresse, podendo a fenologia das plantas ter influenciado esta resposta.

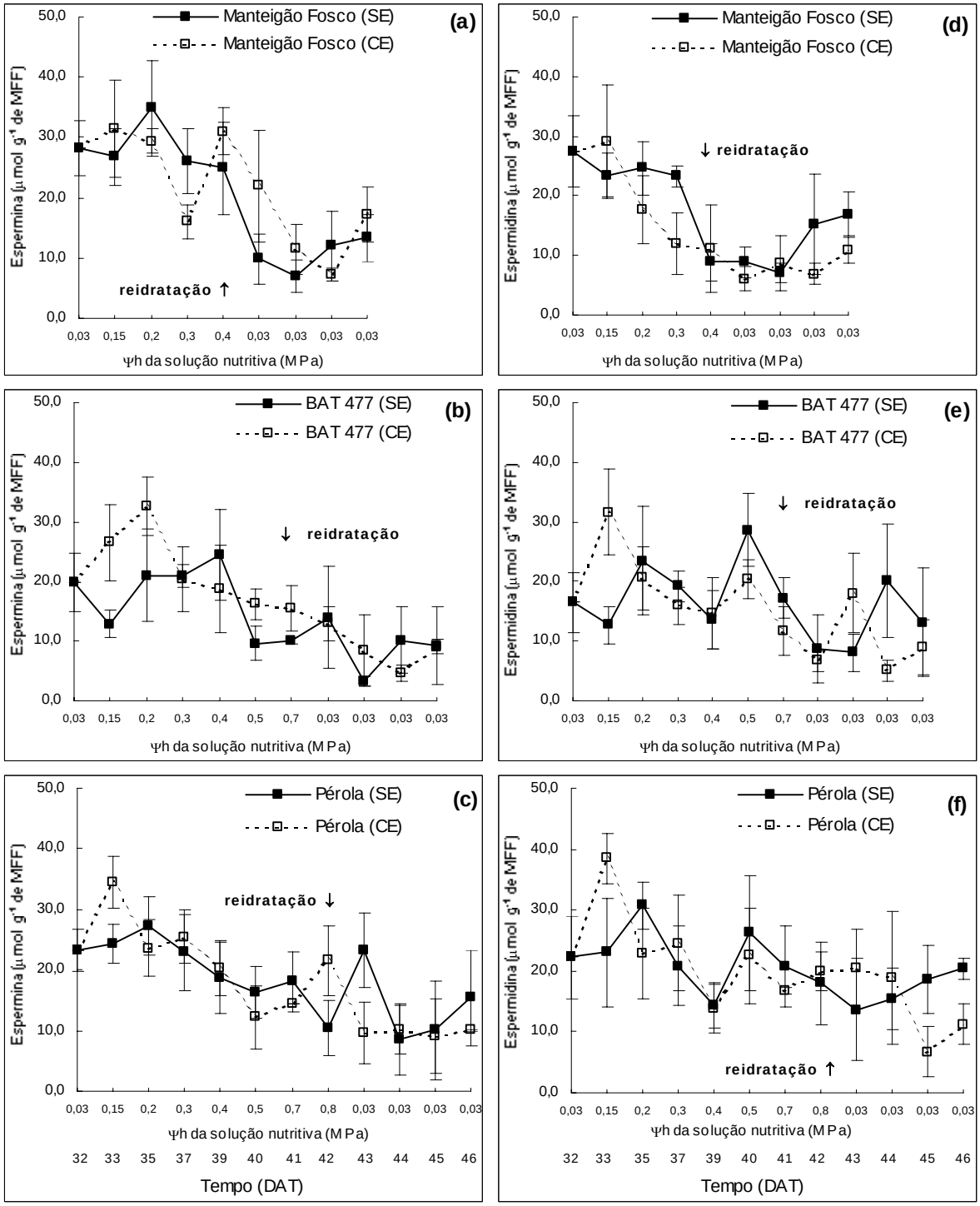

Figura 18. Níveis de poliaminas (Espermina e Espermidina) nas folhas de dois cultivares e uma linhagem de feijão submetidos ao estresse por adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva. Valores médios de quatro repetições. As barras transversais correspondem ao desvio padrão. MFF – massa fresca de folha; SE – sem estresse (controle); CE – com estresse.

6.4 Teores de Nutrientes nas Folhas

O principal objetivo da análise do teor de nutrientes nas folhas, foi verificar se os sintomas observados nas folhas, principalmente do cultivar Manteigão Fosco, já descritos anteriormente, ocorreram por fatores nutricionais ou devido ao efeito do PEG 6000. Nos Quadros 2 e 3 são apresentados os teores de macro e micronutrientes nas folhas das plantas de feijão em solução nutritiva sem estresse e sob estresse (-0,2 MPa).

Os teores médios de macro e micronutrientes (Quadros 2 e 3), em ambos os regimes hídricos, encontraram-se dentro dos intervalos considerados adequados para a cultura do feijoeiro, de acordo com Wilcox & Fageria (1976), apesar de algumas diferenças serem observadas entre os materiais. Os níveis adequados segundo os referidos autores são: nitrogênio (28 a 60 g kg^{-1}); fósforo (2,5 a 5,0 g kg^{-1}); potássio (18 a 25 g kg^{-1}); cálcio (8 a 30 g kg^{-1}); magnésio (2,5 a 7 g kg^{-1}); ferro (100 a 450 mg kg^{-1}); zinco (20 a 100 mg kg^{-1}); manganês (30 a 300 mg kg^{-1}) e cobre (10 a 20 mg kg^{-1}). Para enxofre, dados da Cooperativa Agrícola de Cotia (1991), indicam 0,5 a 1,0 g kg^{-1} como teores foliares considerados adequados para a cultura do feijoeiro.

O cultivar Pérola mostrou maiores teores de N nas folhas, em plantas controle, não diferindo de Manteigão Fosco e BAT 477, quando sob condição de estresse. O estresse levou ao aumento no teor de N nas folhas do cultivar Manteigão Fosco e da linhagem BAT 477, provavelmente pela redução na taxa de acúmulo de massa seca, em função de maior sensibilidade da taxa de assimilação líquida de CO_2, em relação ao cultivar Pérola (Figura 9). Os teores de P e Mg, independente do regime hídrico, foram superiores nas folhas do cultivar Pérola, o que não ocorreu para teores de K, Ca e S, que não diferiram para os três materiais.

De forma geral, o estresse levou a um maior acúmulo de macronutrientes nas folhas, apesar de diferenças estatísticas ocorrerem somente para o N. Este resultado provavelmente ocorreu pela redução do crescimento das plantas em condições de estresse, principalmente para área foliar e massa seca de folha, parâmetros mais afetados (Quadro 4).

Quanto aos micronutrientes nas folhas (Quadro 3), diferenças significativas só ocorreram para Cu, verificando interação significativa entre cultivares e

regime hídrico. Para BAT 477 e Pérola, os teores de Cu nas folhas foram menores em condições de estresse.

Os resultados mostram que em –0,2 MPa, quando apareceram os primeiros sintomas nas folhas, estes não foram devidos à deficiência ou toxidez nutricional, mas sim pelo próprio efeito do PEG 6000, como verificado por alguns autores em plântulas de laranja (Zekri & Parsons, 1990), feijão (Jäger & Meyer, 1977; Raggi, 1992) e algumas solanáceas (Yaniv & Werker, (1983).

Quadro 2. Teor de macronutrientes nas folhas de dois cultivares e uma linhagem de feijão submetidos ao estresse pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). SE – sem estresse; CE - com estresse (-0,2 MPa). Cada valor corresponde à média de quatro repetições.

	Nitrogênio (N)**			Fósforo (P)			Potássio (K)		
	----------g.kg^{-1}----------			----------g.kg^{-1}----------			----------g.kg^{-1}----------		
	SE	CE	média	SE	CE	média	SE	CE	média
M. fosco	41,89 b B[1]	51,37 a A	46,63	5,54	7,33	6,44 b	27,11	33,30	30,21 a
BAT 477	44,48 b B	46,55 a A	45,52	6,66	9,10	7,88 ab	28,12	32,29	30,21 a
Pérola	53,90 a A	49,84 a A	51,87	8,40	10,40	9,40 a	32,88	30,72	31,80 a
Média	46,76	49,25	---	6,87 A	8,94 A	---	29,37 A	32,10 A	---
CV		7,63%			16,63%			15,60%	

	Cálcio (Ca)			Magnésio (Mg)			Enxofre (S)		
	----------g.kg^{-1}----------			----------g.kg^{-1}----------			----------g.kg^{-1}----------		
	SE	CE	média	SE	CE	média	SE	CE	média
M. fosco	21,11	30,64	25,88 a	3,47	4,36	3,92 b	1,76	2,58	2,17 a
BAT 477	24,28	31,25	27,77 a	3,89	5,00	4,45 ab	2,20	2,38	2,29 a
Pérola	23,83	24,38	24,10 a	4,74	4,83	4,78 a	2,64	2,33	2,49 a
Média	23,07 B	28,76 A	---	4,03 B	4,73 A	---	2,20 A	2,43 A	---
CV		16,18%			13,43%			19,97%	

** Interação significativa pelo teste F (P≤0,01)

[1]Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05). Letras minúsculas (comparação entre cultivares na coluna); Letras maiúsculas (comparação entre regime hídrico na linha)

Quadro 3. Teor de micronutrientes nas folhas de dois cultivares e uma linhagem de feijão submetidos ao estresse pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). SE – sem estresse; CE - com estresse (-0,2 MPa). Cada valor corresponde à média de quatro repetições.

	Cobre (Cu)*			Zinco (Zn)			Manganês (Mn)			Ferro (Fe)		
	----------mg.kg^{-1}----------			----------mg.kg^{-1}----------			----------mg.kg^{-1}----------			----------mg.kg^{-1}----------		
	SE	CE	média	SE	CE	média	SE	CE	média	SE	CE	média
M. fosco	15,31 a A[1]	15,62 a A	15,47	45,94	42,81	44,37 a	137,19	285,00	211,09 a	258,75	345,31	302,03 a
BAT 477	19,58 a A	15,94 a B	12,76	38,23	42,81	40,52 a	205,21	361,25	288,23 a	279,27	332,50	305,88 a
Pérola	15,42 a A	7,71 b B	11,56	38,58	41,87	40,73 a	210,83	210,62	210,73 a	228,75	209,69	219,22 a
Média	13,44	13,09	---	41,25 A	42,50 A	---	184,41 B	285,62 A	---	255,59 A	295,83 A	---
CV		30,87%			29,22%			28,06%			26,32%	

* Interação significativa pelo teste F (P≤0,05)

[1]Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05). Letras minúsculas (comparação entre cultivares na coluna); Letras maiúsculas (comparação entre regime hídrico na linha).

6.5 Parâmetros Biométricos

No Quadro 4 são apresentados dados referentes às variáveis biométricas, após a imposição do estresse com PEG 6000. O cultivar Pérola apresentou menor área foliar e massa seca dos diferentes órgãos que os demais, em condições controle e em estresse. Interação significativa entre cultivar e regime hídrico ocorreu somente para área foliar, que mostrou reduções drásticas em função do estresse, com perdas de 55,8%, 59,4% e 62,2% para Manteigão Fosco, BAT 477 e Pérola, respectivamente. Reduções em área foliar devido à redução na expansão (Hsiao, 1973) e aumento na senescência de folhas afetam significativamente a taxa fotossintética das plantas (Taiz & Zeiger, 1998), podendo refletir diretamente na produção (Guimarães, 1996). Queda superior em área foliar para Pérola, pode estar relacionado ao maior nível de estresse a que este cultivar foi submetido.

Muitos trabalhos com a cultura do feijoeiro têm mostrado que a área foliar é uma das variáveis morfológicas mais afetadas pela deficiência hídrica, tanto em experimento em solo (Pimentel et al., 1990; Costa et al., 1991; Guimarães, 1998; Pimentel & Perez, 2000), como em experimentos com PEG em solução nutritiva (Raggi, 1992; Guimarães et al., 1999). Reduções em área foliar conseqüentemente comprometem os componentes de produção por reduções na área útil para fotossíntese, principalmente no caso deste experimento, por estar em estádios bastante críticos quanto à sensibilidade ao déficit hídrico. O cultivar Manteigão fosco, por ser de crescimento determinado, seria o mais prejudicado, já que com a reidratação não ocorreu desenvolvimento de folhas novas. Segundo Taiz & Zeiger (1998) o estresse hídrico limita não somente o tamanho de folhas individuais, mas também o número de folhas em uma determinada planta, devido a decrescer tanto o número quanto a taxa de crescimento de brotações.

A linhagem BAT 477 foi superior estatisticamente em área foliar no controle e sob estresse, o que levou a maior consumo de água por esta linhagem (Figura 5) devido a uma maior área de transpiração. A retenção de área foliar durante deficiência hídrica é desejável, por permitir rápida retomada na produção de matéria seca e, conseqüentemente, menor perda na produção. Para o cultivar Manteigão Fosco, os sintomas de toxidez nas folhas, que evoluíram para necroses, causadas provavelmente pelo PEG, parecem ter sido mais

limitantes para as trocas gasosas que a perda de folhas, em função de alto comprometimento da área útil para a fotossíntese.

O estresse reduziu significativamente todas as variáveis biométricas, em comparação ao controle nos três materiais testados, porém a razão raiz/parte aérea não foi afetada, não diferindo em função do tratamento com PEG 6000. Normalmente em condições de estresse hídrico em solo, têm-se verificado aumento na razão raiz/parte aérea (Hsiao & Acevedo, 1974; Schultz, 1974). Segundo Hsiao & Acevedo (1974) esta resposta se deve, provavelmente, ao estresse hídrico afetar o crescimento da parte aérea antes e em maior intensidade que a fotossíntese, aumentando assim, a disponibilidade de fotoassimilados para as raízes. Nas nossas condições experimentais isto não foi verificado, o que pode ser devido à rápida queda na assimilação líquida de CO_2, bem como pelo efeito do PEG na aeração da solução nutritiva, que segundo Mexal et al. (1975), diminui a solubilidade do oxigênio na solução, podendo prejudicar o desenvolvimento do sistema radicular.

A ausência de interação para os dados biométricos, com exceção da área foliar, deve estar relacionada à rápida imposição do estresse proporcionado pelo PEG 6000, bem como à fenologia, pois as plantas estavam na fase reprodutiva, fatores que provavelmente impossibilitaram ajustes morfológicos.

Quadro 4. Área foliar, massa seca de folhas, massa seca total, massa seca de raízes, volume de raízes e razão raiz/parte aérea de dois cultivares e uma linhagem de feijão após imposição do estresse pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). SE – sem estresse; CE – com estresse. Cada valor corresponde à média de quatro repetições.

Cultivares	Área foliar (m^2)**			Massa seca de folhas (10^{-3} kg)			Massa seca total (10^{-3} kg)		
	SE	CE	Média	SE	CE	Média	SE	CE	Média
Manteigão fosco	1,28bA	0,56abB	0,92	31,66	20,20	25,93b	97,21	56,65	76,93a
BAT 477	1,66aA	0,67aB	1,17	39,18	25,28	32,23a	106,65	66,02	86,34a
Pérola	0,95cA	0,36bB	0,63	29,09	17,32	23,20b	70,10	41,93	56,02b
Média	1,30	0,53	---	33,31A	20,93B	---	91,32A	54,87B	---
CV (%)	---------- 16,28 ----------			---------- 12,15 ----------			---------- 13,53 ----------		

Cultivares	Massa seca de raízes (10^{-3} kg)			Volume de raízes (10^{-6} m^3)			Razão raiz/parte aérea		
	SE	CE	Média	SE	CE	Média	SE	CE	Média
Manteigão fosco	10,35	7,05	8,70a	177,50	103,33	140,42a	0,12	0,14	0,13a
BAT 477	10,27	6,67	8,47a	162,50	108,75	135,62a	0,11	0,11	0,11ab
Pérola	5,54	3,85	7,70b	86,25	56,67	71,46b	0,09	0,10	0,09b
Média	8,72A	5,86B	---	142,08A	89,58B	---	0,10A	0,12A	---
CV (%)	---------- 20,90 ----------			---------- 27,75 ----------			---------- 17,24 ----------		

** Interação significativa pelo teste F (P≤0,01)

[1]Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05). Letras minúsculas (comparação entre cultivares na coluna); Letras maiúsculas (comparação entre regime hídrico na linha).

Alguns parâmetros de crescimento, obtidos após o período de imposição do estresse são mostrados no Quadro 5. Não houve interação significativa entre material vegetal e regime hídrico para área foliar específica (AFE), peso específico foliar (PEF) e razão de peso de folha (RPF). O estresse hídrico reduziu a AFE e levou ao aumento do PEF nos dois cultivares e na linhagem, porém não teve efeito sobre a RPF para nenhum dos materiais. Estes resultados concordam com relatos de Guimarães et al. (1999), trabalhando com diferentes níveis de estresse induzido por PEG 6000 no cultivar de feijão Carioca.

Quadro 5. Área foliar específica (AFE), peso específico foliar (PEF) e razão de peso de folha (RPF) de dois cultivares e uma linhagem de feijão submetidos ao estresse pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). SE – sem estresse; CE - com estresse. Cada valor corresponde à média de quatro repetições.

	AFE			PEF			RPF		
	--------- $m^2 kg^{-1}$ --------			---------- $kg\ m^{-2}$ ----------			----------$kg\ kg^{-1}$----------		
	SE	CE	média	SE	CE	média	SE	CE	média
Mant. fosco	40,31	27,92	34,1 a	0,025	0,036	0,031 b	0,33	0,35	0,34 c
BAT 477	42,43	26,69	34,6 a	0,024	0,038	0,031 b	0,37	0,38	0,36 b
Pérola	32,78	20,80	26,8 b	0,031	0,048	0,040 a	0,42	0,41	0,41 a
Média	38,51A	25,14 B	-------	0,026 B	0,041A	-------	0,37 A	0,38 A	-------
CV		7,1%			9,0%			5,6%	

[1]Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05). Letras minúsculas (comparação entre cultivares na coluna); Letras maiúsculas (comparação entre regime hídrico na linha).

Diferenças entre os materiais vegetais foram verificados nos dois regimes hídricos para os três parâmetros de crescimento mostrados no Quadro 5. O cultivar Pérola mostrou diferença estatística quando comparado ao cultivar Manteigão Fosco e à linhagem BAT 477, sendo inferior quanto à AFE e superior quanto ao PEF e RPF. Para RPF também houve diferença entre Manteigão Fosco e BAT 477.

Resultados quanto à AFE e ao PEF mostram que o cultivar Pérola tem folhas mais espessas, com menor área, como verificado no Quadro 4. Esta característica parece ter sido positiva para a tolerância à desidratação induzida por PEG 6000, como mostrados nos parâmetros de relações hídricas e trocas gasosas.

A ausência de efeitos do estresse induzido por PEG 6000 na RPF sugere maior tolerância da translocação ao estresse hídrico, quando comparado a parâmetros à assimilação de CO_2, como relatado por Boyer (1976). Porém, como este parâmetro é baseado na relação entre a massa seca de folha e a massa seca total da planta, a igualdade estatística dos dois regimes hídricos, para os três materiais, também pode ser devido às reduções observadas nestes dois parâmetros (Quadro 4).

A redução da AFE devido ao estresse hídrico, verificado para os três materiais, confirma a grande sensibilidade da expansão foliar à desidratação, como afirma Hsiao (1973). Este resultado se deve à expansão foliar depender muito da expansão celular, sendo os princípios que estão por trás dos dois processos semelhantes. Segundo Taiz & Zeiger (1998) a inibição da expansão celular resulta em uma redução na velocidade da expansão foliar no estágio inicial do déficit hídrico.

A análise de parâmetros morfológicos tem sido considerada importante em estudos de relações hídricas. Segundo Blum (1997) é necessário estudar características biométricas e fenológicas, que em alguns casos podem ser mais importantes que parâmetros mais complexos para explicar mecanismos de adaptação ao déficit hídrico.

6.6 Estimativa de Produção

O Quadro 5 mostra alguns parâmetros que podem ser usados para inferências sobre os componentes de produção, uma vez que o experimento foi encerrado antes da maturação de vagens. Diferenças entre cultivares se devem principalmente às diferenças no estádio fenológico.

O estresse levou a uma grande redução nos parâmetros avaliados, porém, o cultivar Pérola, não apresentou diferença para massa seca de vagens entre regimes hídricos, provavelmente, por ser o cultivar menos sensível aos efeitos do tratamento com PEG 6000, mantendo taxas de assimilação de CO_2 superiores em níveis mais severos de estresse (Figura 9). O cultivar Manteigão Fosco foi mais sensível, diminuindo drasticamente o acúmulo de matéria seca em vagens em função do estresse (redução de 67,7%), concordando com a maior sensibilidade apresentada nos parâmetros de troca gasosa. Um dos prováveis motivos é que este cultivar estava em enchimento pleno de vagens, pois a maior parte da

matéria seca acumulada nos órgãos reprodutivos é produzida pela fotossíntese no momento deste acúmulo (Kramer & Boyer, 1995).

Vários estudos mostram que para o feijoeiro, os estádios iniciais do período reprodutivo são os mais sensíveis à deficiência hídrica, podendo levar à reduções drásticas na produção (Magalhães & Millar, 1979; Halterlain, 1983). Os motivos seriam o efeito direto do estresse hídrico na fotossíntese e o curto período de floração da cultura (Magalhães & Millar, 1979).

O acúmulo de massa seca em vagens foi mais afetado que o número de vagens (Quadro 5). Para Manteigão Fosco (Tipo I), as vagens já estavam fixadas. Quanto ao Pérola e BAT 477, mostrou-se uma característica vantajosa, por estarem no estádio de formação e início de desenvolvimento de vagens, período crítico quanto à deficiência hídrica. Segundo Costa et al (1999) o número de vagens por planta é altamente correlacionado com o índice de colheita, na maioria das leguminosas de grãos.

Quadro 6. Estimativa de produção (massa seca de vagens, massa seca de 1 vagem e número de vagens) de dois cultivares e uma linhagem de feijão após imposição do estresse pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) em solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950). SE – sem estresse; CE – com estresse. Cada valor corresponde à média de quatro repetições.

Cultivares	Massa seca de vagens (10^{-3} kg)**			Massa seca de 1 vagem (10^{-3} kg)**			Número de vagens		
	SE	CE	% redução	SE	CE	% redução	SE	CE	% redução
Manteigão fosco	28,83aA[1]	9,34abB	67,6%	0,74aA	0,26aB	64,9%	39,25	37,25	5,1%
BAT 477	25,54aA	13,36aB	47,7%	0,32bA	0,20aA	37,5%	79,75	65,00	18,5%
Pérola	7,17bA	3,53bA	50,8%	0,09cA	0,05bA	44,4%	85,75	71,67	16,4%
Média	20,52	8,75	---	0,38	0,17	---	68,25A	57,97A	---
CV (%)	---------- 27,53 ----------			---------- 28,58 ----------			---------- 23,87 ----------		

** Interação significativa pelo teste F (P≤0,01)

[1]Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05). Letras minúsculas (comparação entre cultivares na coluna); Letras maiúsculas (comparação entre regime hídrico na linha).

6.7 Considerações Finais

As condições deste estudo proporcionaram diferentes respostas quanto aos efeitos do déficit hídrico induzido por PEG 6000, em plantas de feijão. A utilização de três materiais distintos possibilitou detectar diferenças intraespecíficas.

O cultivar Manteigão Fosco mostrou sintomas nas folhas idênticos aos descritos na literatura, logo nas primeiras 48 horas após o tratamento com PEG 6000, o que foi verificado no BAT 477 e Pérola apenas sob estresse severo. Manteigão Fosco foi o único a apresentar evidências de excreção de PEG pela folha, com presença de substância esbranquiçada na superfície foliar. Outros autores também encontraram esta substância e a identificaram como sendo PEG, evidenciando a penetração deste polímero em plantas de feijão, permanecendo no apoplasto.

Os efeitos do PEG 6000 na indução de deficiência hídrica em plantas de feijão foram rápidos e drásticos, mesmo iniciando em níveis moderados de estresse. Neste caso, a estratégia adotada no presente experimento, buscando uma desidratação gradual, não parece ter sido alcançada. Os índices de trocas gasosas foram rapidamente afetados, mostrando que este tipo de indução de estresse não permitiu um ajuste das plantas.

O potencial hídrico foliar de base não foi reduzido na mesma proporção do estresse hídrico imposto na solução nutritiva, sendo sugerido na literatura que o PEG 6000 poderia estar influenciando o equilíbrio das relações hídricas entre apoplasto/simplasto, bem como interferindo no coeficiente de elasticidade da parede celular. Neste caso, o conteúdo hídrico relativo foi mais eficiente como indicador do “status” hídrico da planta que o potencial hídrico foliar de base.

A inibição da fotossíntese das plantas devido a causas não estomáticas, com efeitos ligados ao mesófilo e aparato fotossintético é sugerida pelo aumento da concentração de carbono nos espaços intercelulares (Ci) em níveis de estresse mais severos.

O acúmulo de prolina nas folhas em resposta ao estresse hídrico induzido por PEG 6000 sugere que este parâmetro seja indicador de estresse em plantas sensíveis, contudo materiais mais tolerantes apresentavam altos níveis de prolina nas folhas de plantas sem estresse, não descartando o envolvimento deste aminoácido com processos de

tolerância à deficiência hídrica. Os teores de poliaminas nas folhas não mostraram relação direta com o estresse, com elevação de espermina e espermidina nos níveis iniciais de estresse.

A área foliar foi o parâmetro biométrico mais afetado pelo estresse induzido por PEG 6000, levando a uma queda na AFE e aumento do PEF. A maior espessura foliar, característica morfológica marcante do cultivar Pérola, parece ter sido positiva para tolerância à condição de estresse imposta neste trabalho, estando relacionada aos resultados de relações hídricas e trocas gasosas.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo pôde-se chegar às seguintes conclusões:

- A utilização de polietileno glicol (PEG 6000) para indução de estresse hídrico permitiu diferenciar materiais de feijão quanto à tolerância ao estresse, baseando-se nos parâmetros avaliados;
- O Cultivar Manteigão Fosco foi o mais sensível ao estresse imposto por PEG 6000 nas condições deste experimento;
- Com a indução de estresse com PEG 6000, o conteúdo relativo de água foi mais eficiente como indicador do "status" hídrico das plantas que o potencial hídrico de base;
- O cultivar Pérola, que apresentou menor área foliar específica, foi o mais tolerante à condição de estresse imposta, mostrando relação desta característica com tolerância ao déficit hídrico;

- O acúmulo de prolina em folhas de plantas sensíveis sugere este aminoácido como indicador de estresse, entretanto, o alto nível natural em plantas tolerantes indica seu envolvimento em processos de adaptação ao estresse hídrico;

- Resultados da literatura e do presente estudo, levam ao questionamento sobre a afirmação de que soluções com PEG reproduzem a deficiência hídrica observada em condições de solo. Estudos para determinar com precisão a penetração de PEG nas plantas, possíveis efeitos no equilíbrio apoplasto/simplasto, bem como no coeficiente de elasticidade da parede celular são necessários

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGUIAR-NETTO, A.O. *Comportamento fisiológico e produtivo da ervilha (Pisum sativum L.), submetida a diferentes potencias de água no solo.* Botucatu, 1993. 150p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: Editora Arcos, 2001. p.329-36.

AZIZ, A., MARTIN-TANGUY, J., LARHER, F. Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Sci.*, v.145, p.83-91, 1999.

BAGGA, S., ROCHFORD, J., KLAENE, Z., KUEHN, G.D., PHILLIPS, G.C. Putrescine aminopropyltransferase is responsible for biosynthesis of spermidine, spermine, and multiple uncommon polyamines in osmotic stress-tolerant alfalfa. *Plant Physio.*, v.144, p.445-54, 1997.

BALLAS, N., ZAKAIS, N., LOYTER, A. Transient expression of the plasmid pCaMVCAT in plant protoplasts following transformation with polyetilene glycol. *Exp. Cell Res.*, v.170, p.228-34, 1987.

BARNNET, N.M., NAYLOR, A.W. Amino acid and protein metabolism in bermuda grass during water stress. *Plant Physiol.*, v.41, p.1222-30, 1966.

BARRS, H.D. Effect of cycle variations in gas exchange under constant environmental conditions on the ratio of transpiration to net photosynthesis. *Plant Physiol.*, v.21, p.918-29, 1968.

BARTELS, D., NELSON, D. Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. *Plant Cell Environ.*, v.17, p.659-67, 1994.

BASCUR, G., OLIVA, M.A., LAING, D. Termometria infraroja en selection de genotipos de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes a sequia. I. Bases fisiológicas; II. Crescimento y productividad. *Turrialba*, v.35, p.3-13, 1985.

BASSO, L. C. Significado fisiológico das poliaminas em plantas. In: SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA, 5, 1987, Piracicaba. p.403-21.

BATES, L.S., WALDREN, R.P., TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, v.39, p. 205-7, 1973.

BRANCCINI, A. de L., REIS, M.S., SEDIYAMA, C.S., SEDYIAMA, T., ROCHA, V.S. Influência do potencial hídrico induzido por polietilenoglicol na qualidade fisiológica de sementes de soja. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.33, p.1451-9, 1998.

BECKER, T.W., FOCK, H.P. The activity of nitrate reductase and the pool sizes of some amino acids and some sugars in water-stressed maize leaves. *Photosynth. Res.*, v.8, p.267-74, 1986.

BENGSTON, C., FALK, S.O., LARSSON, S. Effects of kinetin on transpiration rate and abscisic acid content of water stressed young wheat plants. *Physiol. Plant.*, v.45, p.183-8, 1979.

BENGSTON, C., KLOCKARE, R., LARSSON, S., SUNDGVIST, C. The after-effect of water stress on chlorophyll formation during greening and the levels of abscisic acid and proline in dark grown in wheat seedlings. *Physiol. Plant.*, v.43, p.205-12, 1978.

BLACKMAN, P.G., DAVIES, W.J. Root to shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. *J. Exp. Bot*., v.36, p.39-48, 1985.

BLUM, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In: BELHASSEN, E. (Ed.) Drought tolerance in higher plants: genetical, physiological and molecular biological analysis. Dordrecht: Kluwer. 1997. p.57-70.

BORS, W., LANGEBARTELS, C.,SANDERMANN, H. Polyamines as radical scavengers and protectans against ozone damage. *Phytochemistry*, v. 28, p.1589-95, 1989.

BOYER, J.S. Differing sensivity of photosynthesis to low leaf water potentials in corn and soybean. *Plant Physiol.*, v.6, p.236-9, 1970.

BOYER, J.S. Photosynthesis at low water potential. *Philosophical Trans. Royal Soc. London*, v.273, p.501-12, 1976.

BOYER, J.S. Subcellular mechanisms of plant response to low water potential. *Agric. Eater Manage*, v.7, p.239-48, 1983.

BOYER, J.S. Water transport. *Annu. Ver. Plant Physiol.*, v.36, p.473-516, 1985.

BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.*, v.103, p.1035-40, 1993.

BRESTIC, M., CORNIC, G., FRYER, M.J., BAKER, N.R. Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in French bean leaves from photoinhibition during drought stress? *Planta*, v.196, p.450-7, 1995.

BUNCE, J.A. Comparative responses of leaf conductance to humidity in single attached leaves. *J. Exp. Bot.*, v.32, p.629-34, 1981.

BUNCE, J.A. Responses of gas exchange to humidity in populations of three herbs from environments differing in atmospheric water. *Oecologia*, v.71, p.117-20, 1986.

CARPITA, N., SABULARSE, D., MONTESINOS, D., DELMER, D.P. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science*, v.205, p.1144-7, 1979.

CASTONGUAY, Y, MARKHART, A.H. Leaf gas exchange in water-stressed common bean and Terapy bean. *Crop Sci.*, v.32, p.980-6, 1992.

CASTONGUAY, Y, MARKHART, A.H. Saturated rates of photosynthesis in water-stressed leaves of common bean and terapy bean. *Crop Sci.*, v.31, p.1605-11, 1991.

CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.*, v.42, p.1-16, 1991.

COOPERATIVA AGRÍCOLA DE COTIA. *Manual de adubação e calagem*. São Paulo, Departamento de adubos/Ger. Co. Assist. Téc./Sç. Assistência Técnica, 1991. 56p.

CORNIC, G., BRIANTAIS, J.M. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO_2 and O_2 reduction in a C_3 leaf (*Phaseoulus vulgaris* L.) at different CO_2 concentrations and during drought stress. *Planta*, v.183, p.178-84, 1991.

CORREIA, M.J., PEREIRA, J.S. Abscisic acid in apoplastic sap can account for the restriction in leaf conductance of white lupins during moderate soil drying and after rewatering. *Plant, Cell Environ.*, v.17, p.845-52, 1994.

CORREIA, M.J., PEREIRA, J.S. The control of leaf conductance of white lupin by xylem ABA concentration decreases with the severity of water deficits. *J. Exp. Bot.*, v.46, p.101-10, 1995.

COSTA, R.C.L., LOPES, N.F., OLIVA, M.A. Crescimento, morfologia, partição de assimilados e produção de matéria seca em *Phaseolus vulgaris* L. submetido a três níveis de nitrogênio e dois regimes hídricos. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.26, p.1453-65, 1991.

COSTA, W.A.J.M. DE., SHANMUGATHASAN, K.N., JOSEPH, K.D.S.M. Physiology of yield determination of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) under various irrigation regimes in the dry and intermediate zones of Sri Lanka. *Field Crop Res.*, v.61, p.1-12, 1999.

COX, L., BOERSMA, L. Transpiration as a function of soil temperature and soil water stress. *Plant Physiol.*, v.42, p.550-6, 1967.

CROCOMO, O.J., BASSO, L.C. Accumulation of putrescine and related aminoacids in potassium deficient *Sensamun*. *Phytochemistry*, v.13, p.2659-65, 1974.

CYR, D.R., BUXTON, G.F., WEBB, D.P., DUMBROFF, E.B. Accumulation of free amino acids in the shoots and roots of tree northern conifers during drought. *Tree Physiol.*, v.6, p.293-303, 1990.

DANTAS, J.P., BERGAMIN FILHO, H., MALAVOLTA, E. Estudos sobre a nutrição mineral do feijão macassar (*Vigna sinensis* (L.) ENDL.): I. Deficiências minerais. *An. Esc. Super. Agric. - Luiz de Queiroz -Univ.* São Paulo, v.36, p.231-45, 1979.

DAVIES, W.J., VAN VOLKENBURGH, E. The influence of water deficit on the factors controlling the daily pattern of growth of *Phaseolus trifoliates. J. Exp. Bot.*, v.34, p.987-99, 1983.

DAVIES, W.J., ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v.42, p.55-76, 1991.

DELAUNEY, A.J., VERNA, D.P.S. Proline biosynthesis and osmorregulation in plants. *Plant J.*, v.4, p.215-23, 1993.

DHINDSA, R.S., CLELAND, R.E. Water stress and protein synthesis. *Plant Physiol.*, v.55, p.781-8, 1975.

DOWNTON, W.J.S., LOVEYS, B.R., GRANT, W.J.R. Non-uniform stomatal closure induced by water stress causes putative non-stomatal inhibition of photosynthesis. *New Phytol.*, v.110, p.503-09, 1988.

EVANS, P. T., MALMBERG, R. L. Do polyamines have roles in plant development? *Annual Review Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v.40, p.235-60, 1989.

FARQUHAR, G.D., SHARKEY, T.D. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review Plant Physiol.*, v.33, p.317-45, 1982.

FAUST, M., WANG, S.Y. Polyamines in horticulturally important plants. In: JANICK, J. *Horticultural reviews.* New York: John Wiley, 1993. v.14, p.333-56.

FISCHER, R.A., TURNER, N.C. Plant productivity in the arid and semiarid zones. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v29, p.277-317, 1978.

FLORES, H.E., GALSTON, A.W. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.*, v.69, p.701-6, 1982a.

FLORES, H.E., GALSTON, A.W. Osmotic stress-induced polamine accumulation in cereal leaves. II. Relation to amino acid pools. *Plant Physiol.*, v.75, p.110-3, 1984.

FLORES, H.E., GALSTON, A.W. Polyamines and plant stress: activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. *Science*, v.217, p.1259-61, 1982b.

FLORES, H.E., PROTACIO, C.M., SIGNS, M.W. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. *Rec. Adv. Photochemistry*, v.23, p.329-93, 1989.

FORD. C.W. Accumulation of low molecular weight solutes in water-stressed tropical legumes. *Phytochemistry*, v.23, p.1007-15, 1984.

FUMIS, T. de F. *Variação nos teores de prolina e poliaminas em cultivares de trigo (**Triticum aestivum** L.) submetidos a déficits hídricos.* Botucatu, 1996. 121p. Tese Doutorado em Ciencias Biológicas/Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

GALSTON, A.W. Polyamines and plant response to stress. In: BACHRACH, V., HEIMER, Y. M. *A physiology of polyamines*. Florida: CRC Press, 1988. v.2, p.99-106.

GALSTON, A.W., KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines in plant Physiology. *Plant Physiol.*, v.94, p.406-10, 1990.

GERHARDT P, BLACK, S.H. Permeability of bacterial spores. II. Molecular variables affecting solute permeation. *J. Bacteriol.*, v.82, p.750-60, 1961.

GUIMARÃES, C.M. Relações hídricas. In: ARAÚJO, R.S., RAVA, C.A., STONE, L.F., ZIMMERMANN, M.J. DE O. (Ed.). *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba: Potafos, 1996. p.139-68.

GUIMARÃES, V. F., RODRIGUES, J. D., PEDRAS, J. F. Utilização de polietileno glicol em solução nutritiva para a indução de estresse hídrico em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 7, 1999, Brasília. *Resumos...* Brasília: *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.11, p.115, 1999.

GUIMARÃES, V.F. *Estudo de parâmetros morfo-fisiológicos para avaliação da tolerância à seca em genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris *L.), visando o consórcio com o milho (*Zea mays *L.)*. Seropédica, 1998. 108p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

GUNASEKERA, D., BERKOWITZ, G.A. Heterogeneous stomatal closure in response to leaf water deficits is not a universal phenomenon. *Plant Physiol.*, v.98, p.660-5, 1992.

GUNTON, J.L., EVENSON, J.P. Moisture stress in navy beans. I. Effect of withholding irrigation at different phonological stages on growth and yield. *Irrig. Sci.*, v.2, p.49-58, 1980.

GWATHMEY, G.O., HALL, A.E. Adaptation to midseason drought of cowpea genotypes with contrasting senescence traits. *Crop Sci.*, v.32, p.773-8, 1992.

HANDA, A.K., BRESSAN, R.A, HANDA, S., HASEGAWA, P.M. Characteristics of cultured tomato cells after prolonged exposure to medium containing polyethylene glycol. *Plant Physiol.*, v.69, p.514-21, 1982.

HANSON, A.D., HINCKLEY, T.M., BROWN, G.N. The effects of dehydration-rehydration cycles on protein synthesis of black locust seedlings. *Physiol. Plant*, v.40, p.1-5, 1977b.

HANSON, A.D., HITZ, W.D. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v.33, p.163-203, 1982.

HANSON, A.D., NELSEN, C.E., EVERSON, E.H. Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars. *Crop Sci.*, v.17, p. 720-6, 1977a.

HANSON, A.D., NELSEN, C.E., PEDERSEN, A.R., EVERSON, E.H. Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance. *Crop Sci.*, v.19, p. 489-93, 1979.

HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A., HANDA, S., HANDA, A.K. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. *Hort Sci.*, v.19, p.371-7, 1984.

HEYDECKER, W., HIGGINS, J., TURNER, Y.J. Invigoration of seeds? *Seed Sci. Technol.*, v.3, p.881-8, 1975.

HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn.* Bull, n.347, 32p., 1950.

HSIAO, T.C. Measurements of plant water status. In: STEWART, B.A.; NIELSEN, D.R. (Ed.) *Irrigation of agricultural crops.* New York: American Society of Agronomy, 1990. p.244-80.

HSIAO, T.C. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v.24, p.519-70, 1973.

HSIAO, T.C., ACEVEDO, E.A. Plant responses to water deficits, water-use efficiency, and drought resistance. *Agric. Meteorol.*, v.14, p.59-84, 1974.

JÄGER, H.J., MEYER, H.R. Effect of water stress on growth and proline metabolism of *Phaseolus vulgaris* L. *Oecologia*, v.30, p.83-96, 1977.

JANES, B.E. Adjustment mechanisms of plants subjected to varied osmotic pressures of nutrient solution. *Soil Sci.*, v.101, p.180-8, 1966.

JANES, B.E. The effect of molecular size, concentration in nutrient solution, and exposure time on the amount and distribution of polyethylene glycol en pepper plants. *Plant Physiol.*, v.54, p.226-30, 1974.

JARVIS, P.G., KARVIIS M. S. Effects of several osmotic substrates on the growth of *Lupinus albus* seedlings. *Physiol. Plant*., v.16, p.485-500, 1963.

JOHNSON, R.C. MORNHINWEG, D.W., FERRIS, D.M., HEITHOLT, J.J. Leaf photosynthesis and conductance of selected *Triticum* species at different water potential. *Plant Physiol.*, v.83, p.1014-17, 1987.

JOYCE, P.A, ASPINALL, D. PALLEG, L.G. Photosynthesis and the accumulation of proline in response to water deficit. *Aust. J. Plant Physiol.*, v.19, p.249-61, 1992.

KAISER, W.M. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiol. Plant.*, v.71, p.142-9, 1987.

KATONA, E., NEIMAIS, S., SCHÖNKNECHST, G., HEBER, U. Photosystem I-dependent cyclic electron transport is important in controlling photosystem II activity in leaves under conditions of water-stress. *Photosynth. Res.*, v.34, p.449-69, 1992.

KAUFMANN, M.R., ECKARD, A.N. Evaluation of water stress control with polyethylene glycols by analysis of guttation. *Plant Physiol*., v.47, p.453-6, 1971.

KAUL, R. Relative growth rates of spring wheat, oats end barley under polyethylene glycol induced water stress. *Can. J. Plant Sci.*, v.46, p.611-7, 1966.

KAUR-SAWHNEY, R., GALSTON, A.W. Physiological and biochemical studies on the antisenescence properties of polyamines in plants. In: SLOCUM, R.D., FLORES, H.E.

(Ed.). *Biochemistry and physiology of polyamines in plants*. Boca Raton: CRC, 1991. cap.14, p.201-11.

KIR'YAN, I.G., SHEVYAKOVA, N.I. Pathways of accumulation of free proline in an NaCl-resistant cell line of *Nicotiana Sylvestris*. *Sov. Plant Physiol.*, v.31, p.551-624, 1984.

KRAMER, P.J., BOYER, J.S. *Water relations of plants and soils*. San Diego: Academic Press, 1995. 495p.

KRAMPITZ, M.J., KLUG, K., FOCK, H.P. Rates of photosynthetic CO_2 evolution and dark respiration in water-stressed sunflower and bean leaves. *Photosynthetica*, v.18, p.322-8, 1984.

KURUVADI, S., AGUILERA, D.M. Patrones del sistema radical en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L). *Turrialba*, v.40, p.491-8, 1990.

LAFRAY, D., LOUGUET, P. Stomatal responses and drought resistence. *Bull. Soc. Botany Fr*., 137. *Actual Botany*, v.1, p.47-60, 1990.

LAGERWRFF, J.V., OGATA, G, EAGLE, H.E. Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene glycol. *Science*, v.133, 1486-7, 1961.

LANGE, O.L., LÖSCH, R., SCHULZE, E.D., KAPPEN, L. Response of stomata to changes in humidity. *Planta*, v.100, p.76-86, 1971.

LAWLOR, D.W. Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. *New Phytol.*, v.69, p.501-13, 1970.

LAWLOR, D.W., FOCK, H.P. Water stress induced changes in the amounts of some photosynthetic assimilation products and respiratory metabolites of sunflower leaves. J. *Exp. Bot.*, v.28, p.3329-37, 1977.

LAZCANO-FERRAT, I., LAVATT, C.J. Relationship between relative water content, nitrogen pools, and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray during water deficit. *Crop Sci.*, v.39, 467-75, 1999.

LESHEM, B. Toxic effects of carbowaxes (polyethylene glycols) on *Pinus halepensis* Mill. Seedlings. *Plant Soil*, v.24, p.322-3, 1966.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stress. In: __. *Water, Radiation, Salt and other estresses*. 2.ed. New York: Academic Press, 1980. p. 25-92.

LEVITT, J. *Responsses of plants to environmental stress*. New York: Academic Press, 1972. 697p.

LOPES, N.F., ARRIETA-MAZA, E.E. Atividade da redutase do nitrato e acúmulo de prolina livre em plantas de *Phaseolus vulgaris* L. em função de níveis de água e doses de nitrogênio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 3, 1991, Viçosa. *Resumos*... Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. p.15.

LOPES, N.F., OLIVA, M.A., CARDOSO, M.J., GOMES, M.M.S., SOUZA, V.F. de. Crescimento e conversão de energia solar em feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) submetido a três densidades de fluxo radiante e dois regimes hídricos. *Rev. Ceres*, v.33, p.142-64, 1986.

LUDLOW, M.M, FISCHER, M.J., WILSON, J.R. Stomatal adjustment to water deficits in three tropical grasses and a tropical legume grown in controlled conditions and in the field. *Aust. J. Plant Physiol.*, v.12, p.131-49, 1985.

MACHADO, R.C.R., RENA, A.B., VIEIRA, C. Efeito da desidratação osmótica no acúmulo de prolina livre em discos foliares de vinte cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rev. Ceres*, v.23, p. 302-9, 1976.

MAGALHÃES, A.A., MILLAR, A.A. Efeito de déficit de água no período reprodutivo sobre a produção de feijão. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.3, p. 55-60, 1979.

MALAVOLTA, E., VITTI, G.C., OLIVEIRA, S. A. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.* Piracicaba: NAGY, 1989. 201p.

MANSFIELD, T.A., DAVIES, W.J. Mechanisms for leaf control of gas exchange. *Bioscience*, v.35, p.158-64, 1985.

MARKHART, A.H. Comparative water relations of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus acutifolius* Gray. *Plant Physiol.*, v.77, p.113-7, 1985.

MEXAL, J., FISCHER, J.T., OSTERYOUNG, J., REID, C.P.P. Oxygen availability in PEG solutions and its implications in plant – water relations. *Plant Physiol.*, v.55, p.20-4, 1975.

MEXAL, J., REID, C.P.P. The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress. *Can. J. Bot.*, v.51, p.1579-88, 1973.

MICHEL, B.E. Carbowax 6000 compared with manitol as a suppressant of cucumber hypocotyls elongation. *Plant Physiol.*, v.45, p.507-9, 1970.

MICHEL, B.E., KAUFMANN, M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.*, v.51, p.914-6, 1973.

MINARELLI, A.M. *Efeitos de diferentes níveis de umidade do solo e fitorreguladores em feijoeiro*. Botucatu, 1990. 86p. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

MONEY, N.P. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols. Relationship between molecular weight and vapor pressure deficit. *Plant Physiol.*, v.91, p.766-9, 1989.

MONEY, N.P., WEBSTER, J. Cell wall permeability and its relationship to spore release in *Achlya intricata*. *Exp. Mycol.*, v.12, p.169-79, 1988.

MONEY, N.P., WEBSTER, J. Mechanism of sporangial emptying in *Saprolegnia*. *Mycol. Res.*, v.92, p.45-9, 1989.

O'TOOLE, J.C., CROOKSTON, R.K., TREHARNE, K.J., OZBUN, J.L. Mesophyll resistance and carboxylase activity: A comparison under stress conditions. *Plant Physiol.*, v. 57, p.465-8, 1976.

O'TOOLE, J.C., OZBUN, J.L., WALLACE, D.H. Photosynthetic response to water stress in *Phaseoulus vulgaris. Physiol. Plant.*, v.40, p.111-4, 1977.

OERTLI, J.J. The effect of cell size on cell collapse under negative turgor pressure. *Journal Plant Physiol.*, v.124, p.365-70, 1986.

PALAVAN, N., GALSTON, A.W. Polyamine biosyntesis and titer during various development stages of *Phaseolus vulgaris. Plant Physiol.*, v.55, p.438-44, 1982.

PARMAR, M.T., MOORE, R.P. Carbowax 6000, manitol, and sodium chloride for stimulating drought conditions in germination studies of corn (*Zea mays* L.) of strong and weak vigor. *Agron. J.*, v.60, p.192-5, 1968.

PARSONS, R.L., HOWE, T.K. Effects of water stress on the water relations of *Phaseolus vulgaris* and the drought resistant *Phaseolus acutifolius*. *Physiol. Plant*., v.60, p.197-202, 1984.

PASSIOURA, J.B. Drought and drought tolerance. In: BELHASSEN, E. (Ed*.). Drought Tolerance in Higher Plants*: g*enetical, physiological and molecular biological analysis.* Dordrecht: Kluwer. 1997. p.1-6.

PASSIOURA, J.B. Root signals control leaf expansion in wheat seedlings growing in dry soil. *Aust. J. Plant Physiol.*, v.15, p.687-93, 1988.

PASSIOURA, J.B. Water in the soil-plant-atmosphere continuum. In*:* LANGE, O., NOBEL, P.S., OSMOND, C., ZIEGLER, H. (Ed.). *Physiological plant ecology II:* Water Relations and Carbon Assimilation. New York: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1982. p.5-33.

PIMENTEL, C., JACOB-NETO, J., GOI, S.R., PESSANHA, G.G. Estresse hídrico em cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. em simbiose com o *Rhizobium leguminosarus* biovar *phaseoli*. *Turrialba*, v.40, p.520-6, 1990.

PIMENTEL, C., LAFRAY, D., LOUGUET, P. Trocas gasosas diurna e em 4 estádios de desenvolvimento, em *Phaseolus vulgaris* L. CV. Carioca. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 5, 1995, Lavras. *Resumos*... Lavras: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, 1995. p.364.

PIMENTEL, C., PEREZ, J. D.L.CRUZ. Estabelecimento de parâmetros para avaliação de tolerância à seca, em genótipos de feijoeiro. *Pesqui. Agropecu. Bras.* v.35, p.31-9, 2000.

PORTES, T. de A. Ecofisiologia. In: ARAÚJO, R.S., RAVA, C.A., STONE, L.F., ZIMMERMANN, M.J. de O. (Ed.). *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba: Potafos, 1996. p.101-37.

RABE, E. Stress physiology: The functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds. *J. Hortic. Sci.*, v.65, p.231-43, 1990.

RAGGI, V. Changes in free amino acids and osmotic adjustment in leaves of water-stressed bean. *Physiol. Plant.*, v.91, p.427-34, 1994.

RAGGI, V. Changes in water relations and in some physiological functions of bean under very light osmotic shock induced by polyethylene glycol. *Physiol. Plant.*, v.84, p.537-48, 1992.

RENA, A.B., MASCIOTTI, G.Z. Efeito do déficit hídrico sobre o metabolismo do nitrogênio e o crescimento de quatro cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rev. Ceres*, v.23, p.288-301, 1976.

RENOU, J.L., GERBAUD, A., JUST, D., ANDRÉ, M. Differing substomatal and chloroplastic CO_2 concnetrations in water-stressed wheat. *Planta*, v.182, p.415-9, 1990.

RODRIGUES, J.D. *A influência de diferentes regimes de umidade do solo em gladíolos*. Botucatu, 1973. 92p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, Universidade Estadual Paulista.

ROY-MACAULEY, H., ZUILY-FODIL, Y., KIDRIC, M., THI, A.T.P., DA SILVA, J.V. Effect of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. *Physiol. Plant.*, v.85, p.90-6, 1992.

RUBINSTEIN, B. Regulation of H^+ excretion. Effects of osmotic shock. *Plant Physiol.*, v.69, p.939-44, 1982.

SAWAZAKI, H E., TEIXEIRA, J.P.F., ALMEIDA, L.D.A. Estresse de água no crescimento, produtividade e acúmulo de prolina em feijão. *Bragantia*, v.40, p.155-66, 1981a.

SAWAZAKI, H.E., TEIXEIRA, J.P.F., ALMEIDA, L.D.A. Variação do teor de prolina em folhas de feijão em função da disponibilidade de água no solo. *Bragantia*, v.40, p.501-11, 1981b.

SCHOLANDER, P.F.H., HAMMEL, H.T.; HERMMINGSEN, E., BRADSTREET, E.D. Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and dome other plants. *Botany*, v.52, p.119-25, 1964.

SCHONFELD, M.A., JOHNSON, R.C., CARVER, B.F. Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Sci.*, v.28, p.521-31, 1988.

SCHULTZ, J.E. Root development of wheat at the flowering stage under different cultural practices. *Agric. Res.*, v.1, p.12-7, 1974.

SCHULZE, E.D. Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and in the soil. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v.37, p.247-74, 1986.

SCHURR, U., GOLLAN, T., SCHULZE, E.D. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the sap composition of *Helianthus annuus*. II Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. *Plant, Cell Environ.*, v.15, p.561-7, 1992.

SHARKEY, T.D., SEEMANN, J.R. Mild water stress effects on caarbon-reduction-cycle intermediates, ribulose biphosphate carboxulase activity, and spatial homogeneity of photosynthesis in intact leaves. *Plant Physiol.*, v.89, p.1060-65, 1989.

SHEVYAKOVA, N.I. Metabolism and the physiological role of proline in plants under conditions of water and salt stress. *Sov. Plant Physiol.*, v.30, p.597-608, 1984.

SHIH, L.M., KAUR-SAWHNEY, R., FÜHRER, J., ASMAT, S., GALSTON, A.W. Effect of exogenous 1,3-diaminopropane and spermidine on senescence of oat leaves. I. Inhibition of protease activity, ethylene production and chlorophyll loss as related to polyamine content. *Plant Physiol.*, v.70, p.1592-96, 1982.

SINCLAIR, T.R., LUDLOW, M.M. Who taught plantas thermodynamics? The unfulfilled potential of plant water potential. *Aust. J. Plant Physiol.*, v.12, p.213-7, 1985.

SINGH, S.P. Selection for water-stress tolerance in interracial populations of common bean. *Crop Sci.*, v.35, p.118-24, 1995.

SINGH, T.N., ASPINALL, D., PALEG, L.G. Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance. *Nature New Biol.*, v.236, p.188-9, 1972.

SINGH, T.N., PALEG, L.G., ASPINALL, D. Stress metabolism. I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.26, p.45-56, 1973.

SIVARAMAKRISHNAN, S., PATELL, V.Z., FLOWER, D.J., PEACOCK, J.M. Proline accumulation and nitrate reductase activity in contrasting sorghum lines during mid-season drought stress. *Physiol. Plant.*, v.74, p.418-26, 1988.

SLOCUM, R.D., KAUR-SAWWHNEY, R., GALSTON, A.W. The Physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.235, p.283-303, 1984.

SMITH, T. A. Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v.36, p.117-43, 1985.

SMITH, T. A. Putrescine and inorganic ions. *Adv. Photochemistry*, v.18, p.1-10, 1984.

STEUTER, A.A. Water potential of aqueous polyethylene glycol. *Plant Physiol.*, v.67, p.64-7, 1981.

STEWART, C.R. Proline content and metabolism during rehydratation of wilted excised leaves in the dark. *Plant Physiol.*, v.50, p.679-81, 1972.

STEWART, C.R., BOGESS, S.F. The effect of wilting on the conversion of arginine, ornithine, and glutamate to proline in bean leaves. *Plant Sci. Lett.*, v.8, 9.147-53, 1977.

STEWART, C.R., BOGESS, S.F., ASPNALL, D., PALEG, L. G. Inhibition of proline oxidation in water stress. *Plant Physiol.*, v.59, p.930-2, 1977.

SUBBARAO, G.V., JOHANSEN A.C., SLINKARD, R.C., RAO, N., SAXENA, N.P., CHAUHAN, Y.S. Strategies for improving drought resistance in grain legumes. *Crit. Rev. Plant Sci.*, v.14, p.469-523, 1995.

TAIZ, L., ZAIGER, E. Plant Physiology. In: __. *Stress Physiology*. 2.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1998. p.725-57.

TARDIEU, F. Drought perception by plants. Do cells of droughted plants experience water stress. In: BELHASSEN, E. (Ed.). *Drought tolerance in higher plants: genetical, physiological and molecular biological analysis*. Dordrecht: Kluwer, 1997. p.15-26.

TARDIEU, F. Drought perception by plants. Do cells of droughted plants experience water stress? *Plant Growth Regul.*, v.20, p.93-104, 1996.

TARDIEU, F. ZHANG, J. GOWING, D.J.G. Stomatal control by both [ABA] in the xylem sap and leaf water status: test of a model and of alternative hypotheses for droughts or ABA-fedfield-grown maize. *Plant, Cell Environ.*, v.16, p.413-20, 1993.

TORELLO, W.A., RICE,L.A. Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive tolerance turfgrass. *Plant Soil*, v.93, p.241-7, 1986.

TREICHEL, S., BRINCKMANN, E., SCHEITLER, B., VON WILLERT, D.J. Occurrence and changes of proline content in plants in the southern Namib desert in relation to increasing and decreasing drought. *Planta*, v.162, p.236-42, 1984.

TULLY, R.E., HANSON, A.D., NELSEN, C.E. Proline accumulation in water-stressed barley in relation to translocation and the nitrogen budget. *Plant Physiol.*, v.63, p.518-23, 1979.

TURNER, L.B., STEWART, G. R. The effect of water stress upon polyamine levels in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *J. Exp. Bot.*, v.37, p.170-7, 1986.

TURNER, N.C. Crop water deficits: a decade of progress. *Adv. Agron.* v.39, p.1-51, 1986.

TURNER, N.C., BEGG, J.E. Plant-water relations and adaptation to stress. *Plant Soil*, v.58, p.97-131, 1981.

VAREJÃO-SILVA, M.A. *Instrumentos meteorológicos convencionais para estações de superfície.* Campina Grande: Universidade Federal da Paraiba, 1979. 42p.

VASSEY,. T.L., QUICK, W.P., SHARKEY, T.D., STITT, M. Water stress, carbon dioxide and light effects on sucrose phosphate synthase activity in *Phaseolus vulgaris*. *Physil. Plant.*, v.81, p.37-44, 1991.

VOETBERG, G.S., SHARP, R.E. Growth of the maize primary root at low water potentials. III. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiol.*, v.96, p.1125-30, 1991.

VON-CAEMMERER, S, FARQUHAR, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, v.153, p.376-87, 1981.

VU, J.C.V., ALLEN, J.L.H., BEWES, G. Drought Stress and Elevated CO_2 Effects on Soybean Ribulose Bisphosphate Carboxylase Activity and Canopy Photosynthetic Rates. *Plant Physiol.*, v.83, p.573-8, 1987.

WALLACE, D.H. Physiological genetics of plant maturity, adaptation, and yield. *Plant Breed. Rev.*, v.3, p.21-167, 1985.

WALTERS, D.R. Polyamines in plant-microbe interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v.57, p.137-46, 2000.

WESTGATE, M.E., BOYER, J.S. Reproduction at low silk and pollen water potentials in maize. *Crop Sci.e*, v.26, p.951-6, 1986.

WHITE, J.W., CASTILLO, J.A. Studies at CIAT on mechanisms of drought tolerance in beans. In: WHITE, J.W., HOOGENBOOM, G., IBARRA, SINGH, S.P. (Ed.). *Research on drought tolerance in common bean*. Cali, CIAT, 1988. p.146-51.

WHITE, J.W., ENGELKE, M.C., MORTON, S.J., RUEMMELE, B.A. Competitive turgor maintenance in tall fescue. *Crop Sci.*, v.32, p.251-6, 1992.

WILCOX, G.E., FAGERIA, N.K. *Deficiências nutricionais do feijão, sua identificação e correção*. Goiânia: CNPAF-EMBRAPA, 1979. 21p. (Boletim Técnico, 5).

YOUNG, N.D., GALSTON, A.W. Physiological control of arginine decarboxylase activity in K-deficient oat shoots. *Plant Physiol.*, v.76, p.331-5, 1984.

YOUNG, N.D., GALSTON, A.W. Putrescine and acid stress. *Plant Physiol.*, v.71, p.767-71, 1983.

ZAIDAN, H. A., BROETO, F., OLIVEIRA, E.T.de, GALLO, L. A., CROCOMO, O.J. Influence of potassium nutrition and the nitrate/ammonium ratio on the putrescine and spermidine contents in banana vitroplants. *J. Plant Nutr.*, v.22, p.1123-40, 1999.

ZEKRI, M., PARSONS, L.R. Response of split-root, sour orange seedlings to NaCl and polyethylene glycol stresses. *J. Exp. Bot.*, v.41, p.35-40, 1990.

ZHANG, J., DAVIES, W.J. Does ABA in the xylem control the rate of leaf growth in doil-dried maize and sunflower plants? *J. Exp. Bot.*, v.41, p.1125-32, 1991.

ZIMMERBERG, J., PARSEGIAN, V.A. Polymer inaccessible volume changes during opening and closing of a voltage-dependent ionic channel. *Nature*, v.323, p.36-9, 1986.