



CLERISTON CORREIA DA SILVA SOUZA

**ALTERAÇÕES OXIDATIVAS EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI E
FEIJÃO-MUNGO SUBMETIDAS AOS ESTRESSES SALINO E POR
ALUMÍNIO ISOLADOS OU COMBINADOS COM SOMBREAMENTO**

TERESINA-PI

2020

CLERISTON CORREIA DA SILVA SOUZA

**ALTERAÇÕES OXIDATIVAS EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI E FEIJÃO-MUNGO
SUBMETIDAS AOS ESTRESSES SALINO OU POR ALUMÍNIO ISOLADOS OU
COMBINADOS COM SOMBREAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Agricultura Tropical para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientadora

Dra. Aurenívia Bonifácio

TERESINA-PI

2020

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processos Técnicos

S729a

Souza, Cleriston Correia da Silva.

Alterações oxidativas em plantas de feijão-caupi e feijão-mungo submetidas aos estresses salino ou por alumínio isolados ou combinados com sombreamento / Cleriston Correia da Silva Souza. -- 2020.

97 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Agricultura Tropical, Teresina, 2020.

“Orientadora: Dra. Aurenívia Bonifácio.”

1. Leguminosas. 2. Feijão-caupi. 3. Feijão-mungo. 4. Co-estresse. 5. Estresse oxidativo. 6. Homeostase redox. I. Bonifácio, Aurenívia. II. Título.

CDD 635.659 2

CLERISTON CORREIA DA SILVA SOUZA

**ALTERAÇÕES OXIDATIVAS EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI E FEIJÃO
MUNGO SUBMETIDAS AOS ESTRESSES SALINO E POR ALUMÍNIO
ISOLADOS OU COMBINADOS COM BAIXA IRRADIÂNCIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

APROVADA em 30 de outubro de 2020.

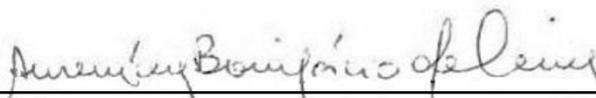
Comissão Julgadora:



Prof. Dr. Marcio de Oliveira Martins – UFAC



Prof. Dr. Milton Costa de Lima Neto – UNESP



Profa. Dra. Aurenivia Bonifacio de Lima – CGN/UFPI
(Orientador)

**TERESINA-PI
2020**

“Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e tudo que há em mim bendiga o seu santo nome. Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e não te esqueça de nenhum de seus benefícios. É ele quem perdoa todas as tuas iniquidades e sara todas as tuas enfermidades.”

Salmos 103. 1-3

AGRADECIMENTOS

Ao meu senhor e salvador Jesus Cristo que me deu sabedoria e entendimento neste percurso e me ajudou a suportar a distância de casa e dos que deixei na minha cidade de Jacobina-BA.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos para que eu me dedicasse neste tempo somente a pesquisa.

A Universidade Federal do Piauí (UFPI) pela oportunidade de fazer parte do corpo discentes durante estes dois anos.

A minha orientadora Dra. Aurenívia Bonifácio pelos seus ensinamentos, paciência, estímulos e incentivos para que eu desse o meu melhor.

Ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (CCN/UFPI) pelos insumos e equipamentos utilizados nas análises laboratoriais.

A Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), na pessoa do Prof. Francisco Alcântara Neto, que cedeu suas instalações e equipamentos para as análises laboratoriais.

A equipe de professores e todos que compõem o corpo de funcionários do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/UFPI.

Aos meus pais Pedro Francisco de Souza e Célia Cristina Correia da Silva Souza por apoiar e me incentivar em busca dos meus sonhos e pelos ensinamentos que me tornaram na pessoa que eu sou.

Aos meus avós Juvenal Correia da Silva, Cleonice Cruz, Maria Rosa e Liberino Souza pelos conselhos, correções e orações.

Ao amor da minha vida, minha melhor amiga, companheira e esposa Lumaise Machado Santana, por me ajudar a carregar a minha cruz a cada dia, pelos conselhos e estímulos, sei que esse amor nasceu no coração de Deus.

Ao meu irmão Emerson Correia da Silva Souza (*in memoriam*) pelo incentivo, e por me aturar em todos esses anos.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio que sempre me deram apoio físico, psicológico, espiritual e financeiro.

A Igreja Batista Unida em Cristo que me recebeu calorosamente e me ajudaram a permanecer e desempenhar a minha vocação.

Aos meus colegas Victor Breno Campelo Lima, Ana Raquel Pereira de Melo e Vicente Paulo da Costa Neto que foram peças fundamentais durante esta jornada.

RESUMO

As espécies vegetais são submetidas a diversas e simultâneas condições ambientais adversas, tais como o excesso de sais ou alumínio, que reduzem a produtividade vegetal, principalmente em leguminosas. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos isolados do estresse salino ou por alumínio e a combinação destes estresses com sombreamento no crescimento vegetativo, *status* hídrico foliar, pigmentos fotossintéticos e metabolismo antioxidativo de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo. Isoladamente, o estresse salino e por alumínio reduziram o crescimento, o *status* hídrico foliar e a produção de biomassa do feijão-caupi e feijão-mungo. Enquanto a salinidade reduziu os pigmentos fotossintéticos do feijão-caupi e feijão-mungo, a exposição ao alumínio induziu diferentes respostas nas duas espécies. Houve aumento no peróxido de hidrogênio e na peroxidação lipídica em resposta a salinidade e ao alumínio, enquanto que ascorbato e glutatona reduzidas e a atividade de dismutase do superóxido e peroxidase de fenóis foram diferentemente modulados nestas plantas. A exposição combinada ao alumínio (80 μM de AlCl_3) e sombreamento reduziu os níveis de peróxido de hidrogênio nas plantas de feijão-caupi e feijão-mungo, enquanto que a salinidade (100 mM de NaCl) combinada com sombreamento reduziu os níveis deste composto apenas no feijão-caupi. A combinação de salinidade e sombreamento reduziu a peroxidação lipídica e a glutatona reduzida nas duas espécies, enquanto que a combinação de alumínio e sombreamento aumentou a peroxidação lipídica e o ascorbato reduzido no feijão-mungo. As atividades das enzimas catalase, dismutase do superóxido, peroxidase do ascorbato e peroxidase de fenóis foram reduzidas nas duas espécies vegetais em resposta à combinação de alumínio e sombreamento. Os resultados reforçam que não se pode estimar os efeitos de estresses abióticos combinados a partir de estresses aplicados isoladamente. Conclui-se que a combinação de estresses induziu maior tolerância das plantas de feijão-caupi e feijão-mungo que os estresses isolados.

Palavras-chave: leguminosas, co-estresse, estresse oxidativo, homeostase redox.

ABSTRACT

Plant species are subjected to different and simultaneous adverse environmental conditions, such as excess salts or aluminum, which provides plant productivity, especially in legumes. The present study aimed to evaluate the isolated effects of salt or aluminum stress and the combination of these stresses with low irradiance on vegetative growth, leaf water status, photosynthetic pigments and antioxidative metabolism of cowpea and mung bean plants. In isolation, salt and aluminum stress reduced growth, leaf water status and biomass production of cowpea and mung bean. While salinity reduced the photosynthetic pigments of cowpea and mung bean, exposure to aluminum induced different responses in the two species. There was an increase in hydrogen peroxide and lipid peroxidation in response to salinity and aluminum, while reduced ascorbate and glutathione and the activity of superoxide dismutase and phenol peroxidase were differently modulated in these plants. The combined exposure to aluminum (80 μM AlCl_3) and low irradiance (400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) reduced the levels of hydrogen peroxide in cowpea and mung bean plants, while the salinity (100 mM NaCl) combined with low irradiance reduced the levels of this compound only in cowpea. The combination of salinity and low irradiance reduced lipid peroxidation and reduced glutathione in both species, while the combination of aluminum and low irradiance increased lipid peroxidation and reduced ascorbate in mung bean. The enzymes activities catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and phenol peroxidase were reduced in both plant species in response to the combination of aluminum and low irradiance. The results reinforce that the effects of combined abiotic stresses cannot be estimated from stresses applied alone. It was concluded that the combination of stresses induced greater tolerance of cowpea and mung bean plants than isolated stresses.

Keywords: leguminous, co-stresses, oxidative stress, redox homeostasis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Taxa de crescimento absoluto (A), comprimento (B) e volume (C) das raízes, conteúdo relativo de água (D), massa fresca da parte aérea (E) e das raízes (F) de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas à salinidade (0 a 150 mM de NaCl). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de salinidade, enquanto o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de salinidade (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$). 42
- Figura 2.** Teores de clorofila *a* (A) e *b* (B), carotenoides (C), antocianinas (D) e relação clorofila *a*:*b* (E) de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas à salinidade (0 a 150 mM de NaCl). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de salinidade, enquanto o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de salinidade (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$). 43
- Figura 3.** Teores de peróxido de hidrogênio (A), peroxidação lipídica (B), ascorbato (C) e glutathiona (D) reduzidos de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas à salinidade (0 a 150 mM de NaCl). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de salinidade, enquanto o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de salinidade (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$). 44
- Figura 4.** Atividades de dismutase de superóxido (A) e peroxidase de fenóis (B) de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas à salinidade (0 a 150 mM de NaCl). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de salinidade, enquanto o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de salinidade (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$). 45
- Figura 5.** Análise de componentes principais (A e B) e escalonamento multidimensional não-métrico (C) dos dados obtidos após a exposição de plantas de feijão-caupi (Δ) e feijão-mungo (\circ) à salinidade (0 a 150 mM de NaCl). As elipses mostram os grupos formados e confirmados pela análise multivariada permutacional de variância (PERMANOVA). 46

CAPÍTULO II

- Figura 1. Taxa de crescimento absoluto (A) e conteúdo relativo de água (B) de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas ao alumínio (0 a 100 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de alumínio, enquanto o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de alumínio (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$). 62
- Figura 2. Comprimento (A) e volume (B) das raízes, massa fresca da parte aérea e das raízes (C) de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas ao alumínio (0 a 100 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de alumínio, enquanto o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de alumínio (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$). 63
- Figura 3. Conteúdo de clorofila *a* (A) e *b* (B), carotenoides (C), antocianina (D) e relação clorofila *a*:*b* (E) de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas ao alumínio (0 a 100 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de alumínio, enquanto o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de alumínio (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$). 64
- Figura 4. Conteúdo de peróxido de hidrogênio (A), peroxidação lipídica (B), ascorbato (C) e glutathiona (D) reduzidos de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas ao alumínio (0 a 100 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de alumínio, enquanto o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de alumínio (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$). 65
- Figura 5. Atividades da dismutase do superóxido (A) e peroxidase de fenóis (B) de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas ao alumínio (0 a 100 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que

não houve diferença significativa entre os níveis de alumínio, enquanto o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de alumínio (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$). 66

Figura 6. Análise de componentes principais (A e B) e escalonamento multidimensional não-métrico (C) dos dados obtidos após a exposição de plantas de feijão-caupi (Δ) e feijão-mungo (\circ) ao estresse por alumínio (0 a 100 μM de AlCl_3). As elipses mostram os grupos formados e confirmados pela análise multivariada permutacional de variância (PERMANOVA). 67

CAPÍTULO III

Figura 1. Massa seca da parte aérea (A) e das raízes (B) em plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas aos estresses isolados de salinidade e alumínio e a combinação destes com ou sem sombreamento. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas iguais indicam que não houve efeito do sombreamento naquele tratamento (Duncan; $p < 0,05$). O asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada tratamento (Duncan; $p < 0,05$). 83

Figura 2. Peróxido de hidrogênio (A) e peroxidação lipídica (B) em plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas aos estresses isolados de salinidade e alumínio e a combinação destes com ou sem sombreamento. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas iguais indicam que não houve efeito do sombreamento naquele tratamento (Duncan; $p < 0,05$). O asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada tratamento (Duncan; $p < 0,05$). 84

Figura 3. Formas reduzidas do ascorbato (A) e glutathiona (B) em plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas aos estresses isolados de salinidade e alumínio e a combinação destes com ou sem sombreamento. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas iguais indicam que não houve efeito do sombreamento naquele tratamento (Duncan; $p < 0,05$). O asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada tratamento (Duncan; $p < 0,05$). 85

Figura 4. Atividade das enzimas catalase (A) e dismutase do superóxido (B) em folhas de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas ou não aos estresses isolados e combinados de salinidade, alumínio e com ou sem sombreamento. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas iguais indicam que não houve efeito do sombreamento naquele tratamento (Duncan; $p < 0,05$). O asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada tratamento (Duncan; $p < 0,05$). 87

Figura 5. Atividade das enzimas peroxidase do ascorbato (A) e peroxidase de fenóis (B) em folhas de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas ou não aos estresses isolados e combinados de salinidade, alumínio e com ou sem sombreamento. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas iguais indicam que não houve efeito do sombreamento naquele tratamento (Duncan; $p < 0,05$). O asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada tratamento (Duncan; $p < 0,05$). 88

Figura 6. Análise de componentes principais dos dados obtidos após a exposição de plantas de feijão-caupi (A) e feijão-mungo (B) aos estresses isolados de salinidade e alumínio e a combinação destes com sombreamento. As elipses mostram os grupos formados e confirmados pela análise multivariada permutacional de variância (PERMANOVA). Setas azuis e vermelhas indicam os *loadings* mais significativos na PC1 e PC2, respectivamente. 89

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Análise de variância (quadrado médio) das variáveis analisadas após a exposição das espécies de feijão à salinidade. 41

CAPÍTULO II

Tabela 1. Análise de variância (quadrado médio) das variáveis analisadas após a exposição das espécies de feijão ao alumínio. 61

CAPÍTULO III

Tabela 1. Análise de variância (quadrado médio) das variáveis analisadas após a exposição das espécies de feijão ao sombreamento (com ou sem) isolado e combinado com alumínio ou salinidade. 82

APÊNDICES

Apêndice 1. Visão geral da estrutura utilizada no experimento com estresses isolados e combinados de sombreamento, alumínio e salinidade. A cobertura feita de sombrite de 75% e as plantas foram mantidas dentro da casa durante todo período experimental..... 97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Leguminosas de grãos secos: feijões e <i>pulses</i>	15
2.2 Estresses causados por toxicidade iônica: estresse salino e por alumínio.....	17
2.2.1 Estresse salino.....	17
2.2.2 Estresse por alumínio.....	19
2.3 Excesso ou baixa luminosidade: efeitos da oferta de luz nas plantas.....	21
2.4 Os estresses abióticos múltiplos ou combinados.....	23
2.5 Alterações oxidativas em plantas submetidas à estresses abióticos múltiplos.....	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
CAPÍTULO I.....	33
Respostas fisiológicas de duas espécies de <i>Vigna</i> submetidas ao estresse salino durante o estágio de crescimento vegetativo.....	33
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Delineamento experimental.....	37
2.2 Instalação e condução do experimento.....	37
2.3 Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos.....	38
2.4 Compostos e enzimas relacionadas às respostas oxidativas.....	38
2.5 Análise estatística.....	40
3. RESULTADOS.....	40
3.1 Análise geral dos dados.....	40
3.2 Crescimento e pigmentos fotossintéticos.....	41
3.3 Respostas do sistema redox.....	43
3.4 Análise Multivariada.....	45
4. DISCUSSÃO.....	46
5. CONCLUSÃO.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
CAPÍTULO II.....	53
O estresse por alumínio afeta diferentemente a performance fisiológica e as respostas bioquímicas em duas espécies de feijão.....	53
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1 Instalação, delineamento e condução experimental.....	57
2.2 Análises biométricas e conteúdo relativo de água.....	58
2.3 Determinações bioquímicas.....	58
2.3.1 Pigmentos fotossintéticos.....	58
2.3.2 Indicadores oxidativos e antioxidantes não-enzimáticos.....	59

2.3.4 Enzimas antioxidativas	60
2.4 Análise estatística	60
3. RESULTADOS	61
3.1 Análise geral dos dados.....	61
3.2 Crescimento e pigmentos fotossintéticos.....	61
3.3 Respostas do sistema redox.....	64
3.4 Análise multivariada.....	66
4. DISCUSSÃO.....	67
5. CONCLUSÃO.....	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
CAPÍTULO III	74
Respostas oxidativas em leguminosas submetidas aos estresses de salinidade ou alumínio isolados e em combinação com sombreamento	74
RESUMO.....	75
ABSTRACT	76
1. INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1 Delineamento experimental e tratamentos utilizados.....	78
2.2 Instalação e condução do experimento	79
2.3 Análises bioquímicas	79
2.4 Análise estatística	81
3. RESULTADOS	81
3.1 Análise geral dos dados.....	81
3.2 Efeito dos estresses combinados nas respostas de crescimento	82
3.3 Efeito dos estresses combinados nos indicadores de estresse oxidativo.....	83
3.4 Efeito dos estresses combinados nos antioxidantes hidrofílicos.....	85
3.5 Efeito da combinação dos estresses na atividade das enzimas antioxidantes	86
3.6 Análise de componentes principais (PCA).....	88
4. DISCUSSÃO.....	90
5. CONCLUSÃO.....	92
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICES.....	96

1 1. INTRODUÇÃO GERAL

2 As leguminosas são um grupo diverso de espécies vegetais com grande
3 importância socioeconômica, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.
4 Atualmente, feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.)
5 Walp.), feijão-mungo (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), ervilha secas (*Pisum sativum* L.),
6 lentilhas (*Lens culinaris* Medikus) e grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) são exemplos de
7 leguminosas coletivamente chamadas de *pulses*, pois possuem sementes secas
8 comestíveis ricas em proteínas, fibras, aminoácidos e vitaminas (EMBRAPA, 2015).
9 Dentre as *pulses* supracitadas, o feijão-caupi e o feijão-mungo merecem destaque. O
10 feijão-caupi é uma leguminosa largamente cultivada e consumida no Brasil, em
11 especial na região Nordeste (MUÑOZ-AMATRIAÍN et al., 2017), enquanto que o
12 feijão-mungo tem sido cultivado no Brasil devido a sua elevada qualidade nutricional
13 e a necessidade de atender as demandas externas dos países asiáticos (NAIR et al.,
14 2013; ZHANG et al., 2013).

15 Os estresses abióticos, tais como seca, alagamento, salinidade, altas e baixas
16 temperaturas, toxicidade mineral e aos metais pesados e sombreamento, são
17 adversidades relacionadas ao ambiente que afetam a adaptabilidade e produção
18 agrícola das leguminosas (ZANDALINAS et al., 2018; MOUSAVI-DERAZMAHALLEH
19 et al., 2019). As situações estressantes interferem negativamente no crescimento e
20 desenvolvimento vegetal uma vez que causam alterações em processos do
21 metabolismo primário das plantas, tais como fechamento estomático, redução da taxa
22 fotossintética e transpiratória, aumento na respiração e fotorrespiração, estresse
23 oxidativo, retardo no desenvolvimento vegetativo e redução significativa na produção
24 das culturas comerciais (RIHAN et al., 2017). Dentre os estresses abióticos
25 conhecidos, seca, salinidade e toxicidade ao alumínio são problemas ambientais
26 frequentes em regiões áridas e semiáridas e limitam o cultivo agrícola, principalmente
27 de leguminosas, reduzindo a produtividade vegetal (KAISER et al., 2016).

28 A salinidade do solo é notadamente uma ameaça a produção agrícola em todo
29 o mundo. Segundo dados da FAO (2011), 34 milhões de hectares das terras cultivadas
30 no mundo que utilizam a irrigação encontram-se afetados pela salinidade em algum
31 nível. A irrigação de terras aráveis com água salina, práticas culturais inadequadas,
32 baixa precipitação, altas temperaturas e elevada transpiração são os principais fatores
33 que aumentam a salinidade (SHRIVASTAVA; KUMAR, 2014). A salinidade causa

34 estresse nas plantas por dificultar a captação de água pelas raízes e também por
35 causar toxicidade devido ao acúmulo de altas concentrações de sais, principalmente
36 de íons sódio (Na^+), nos tecidos vegetais (MUNNS; TESTER, 2008). Além de induzir
37 concomitantemente os estresses osmótico e iônico, o estresse salino causa
38 desnaturação de proteínas, desestabilização de membranas, menor crescimento da
39 parte aérea, redução na absorção de nutrientes, citotoxicidade, inibição da
40 fotossíntese e da biossíntese de importantes biomoléculas (MITTLER, 2017a).

41 Além da salinidade, a toxicidade ao alumínio está entre os estresses iônicos
42 mais difundidos em áreas agrícolas. O estresse por alumínio se caracteriza pelo
43 acúmulo de quantidades excessivas de alumínio (Al^{+3}) na solução do solo em níveis
44 que resultam em toxicidade para as espécies vegetais. Este tipo de estresse é
45 frequente em solos ácidos ($\text{pH} \leq 5,5$) de regiões tropicais e subtropicais e apresenta-
46 se em quase 50% das terras aráveis do mundo e aproximadamente 66% da superfície
47 terrestre do Brasil (VITORELLO et al., 2005; SADE et al., 2016). A toxicidade ao
48 alumínio causa severos danos nutricionais à planta, prejudicando a divisão celular nas
49 células do ápice radicular, região responsável pelo crescimento das raízes (SINGH et
50 al., 2017). Além de prejudicar o crescimento radicular, o estresse por alumínio afeta
51 negativamente a homeostase do cálcio, o equilíbrio nos transportadores de membrana
52 e várias outras reações metabólicas bem como diminui a absorção, translocação e
53 uso de água e nutrientes pelas plantas (FREITAS et al., 2015; MOTA et al., 2016).

54 Estima-se que 90% das terras aráveis apresentam um ou mais tipos de
55 estresses abióticos (WAQAS et al., 2019) e, portanto, as espécies vegetais estão
56 naturalmente sujeitas a combinação de diferentes tipos de estresses. Estudos indicam
57 que as plantas apresentam respostas metabólicas diferenciadas quando o estresse é
58 aplicado individualmente e quando dois ou mais estresses são aplicados em
59 combinação (MITTLER, 2017b). Assim, não se pode inferir sobre as respostas
60 fisiológicas de uma determinada planta submetidas a combinação de diferentes
61 estresses abióticos através da exposição desta planta apenas a um dos estresses
62 isoladamente uma vez que a combinação dos estresses pode induzir respostas
63 sinérgicas ou negativas no que concerne ao crescimento e desenvolvimento das
64 espécies vegetais (MILLER et al., 2010).

65 Diversos estudos têm sido realizados com estresses abióticos múltiplos, tais
66 como a combinação de salinidade e estresse térmico em *Arabidopsis thaliana*
67 (SUZUKI et al., 2016), déficit hídrico combinado com alumínio em arroz (PANDEY et

68 al., 2016), aplicação de molibdênio e tungstênio com estresse salino em *Agropyron*
69 *cristatum* (BABENKO et al., 2015) e salinidade combinado com seca e altas
70 temperaturas em cana-de-açúcar (MORAIS et al., 2018), entretanto, é imprescindível
71 mais estudos visando ampliar o entendimento acerca das alterações fisiológicas e
72 bioquímicas nas plantas expostas aos estresses abióticos múltiplos.

73 O presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos do excesso de alumínio e
74 da salinidade de forma isolada e combinada com sombreamento, no crescimento
75 vegetativo, pigmentos fotossintéticos e metabolismo antioxidativo de plantas de feijão-
76 caupi e feijão-mungo. Para atingir o objetivo proposto, o presente estudo foi realizado
77 em três experimentos separados. O primeiro e o segundo experimento foram
78 desenvolvidos simultaneamente e visaram avaliar as respostas das duas espécies de
79 feijão aos estresses isolados de salinidade e alumínio (resultados descritos nos
80 capítulos I e II, respectivamente). Após a determinação dos níveis da salinidade e
81 alumínio que induziram efeitos significativos no desenvolvimento das plantas de feijão-
82 caupi e feijão-mungo, realizou-se o terceiro experimento (descrito no capítulo III).
83 Neste, a salinidade e o alumínio foram combinados com sombreamento visando
84 avaliar as respostas de crescimento e do sistema redox a combinação destes
85 estresses. Após mensurar e descrever os efeitos deletérios da combinação de
86 estresses nas espécies vegetais estudadas, nossos resultados podem dar suporte a
87 programas de manejo e melhoramento de diferentes espécies de feijão e outras
88 leguminosas agronomicamente importantes e cultivadas em condições estressantes.

89

90 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

91 **2.1 Leguminosas de grãos secos: feijões e *pulses***

92 Os *pulses* são leguminosas domesticadas pelos humanos desde os tempos
93 remotos do início da agricultura que produzem um a doze grãos secos e comestíveis
94 em cada vagem. Estes grãos apresentam tamanho, forma e cores variadas, são ricos
95 em proteínas, aminoácidos essenciais, carboidratos, micronutrientes e fibra dietética
96 e possuem baixo teor de lipídeos. Os feijões secos dos gêneros *Phaseolus* e *Vigna*
97 (feijão comum, feijão-caupi, feijões-fava, feijão-azuki, feijão preto em vários tons,
98 feijão-mungo, feijão-corredor, feijão-arroz, feijão-traça, feijão-tepário, feijão vermelho,
99 feijão-cannellini, feijão-borlotti, feijão-haricot e feijão-bambara) são *pulses*
100 encontrados nas Américas, Ásia e África. Além dos feijões, lentilhas (*Lens culinaris*

101 Medik), lupinos (*Lupinus albus* L. e *L. mutabilis* Sweet), fava (*Vicia faba* L.), grão-de-
102 bico (*Cicer arietinum* L.) e ervilhas seca (*Pisum sativum* L.) são *pulses* mais resistente
103 a terras áridas e temperaturas extremas (JAVALOYES et al., 2016).

104 Desde 2016, declarado o Ano Internacional dos Pulses na 38ª Sessão da
105 Conferência da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura,
106 tem se buscado aumentar a consciência pública sobre os benefícios do consumo de
107 *pulses* (EMBRAPA, 2015). Bem como evidenciar os efeitos positivos dos pulses na
108 produção agrícola que visa a produtividade e sustentabilidade ambiental com
109 segurança alimentar, nutrição e inovação uma vez que estas plantas podem ser úteis
110 na erradicação da fome, desnutrição e subnutrição humana que atinge cerca de 800
111 milhões de pessoas em todo mundo (EMBRAPA, 2015). Mundialmente, 169 países
112 são produtores de *pulses* e 95.978.510 toneladas destes grãos foram produzidos no
113 ano de 2017 (FAOSTAT, 2017). O Brasil ocupa a 8ª posição no ranking mundial de
114 produtores de pulses e as principais pulses cultivadas no território brasileiro são os
115 feijões secos (3.033.017 t), fava (10.092 t), e ervilhas secas (2.763 t) (FAOSTAT,
116 2017).

117 O feijão-caupi é originário da África e o feijão seco mais cultivado no Brasil,
118 sendo a sua produção concentrada nas regiões Centro-Oeste e Nordeste onde se
119 destacam os estados do Mato Grosso, Ceará, Bahia e Piauí (CONAB, 2019). O cultivo
120 de feijão-caupi é normalmente associado a agricultura familiar com predominância de
121 práticas tradicionais de produção, baixo uso de tecnologias e, conseqüentemente,
122 menor produtividade de grãos, entretanto tem sido crescente a adoção de tecnologias
123 para o cultivo deste grão com vistas ao mercado externo que tem resultado em maior
124 escala de produção e incremento na produtividade (ROCHA et al., 2017). Em 2019,
125 165.653 mil toneladas de feijões secos, principalmente feijão-caupi, foram exportadas
126 no Brasil, sendo 74,2 mil toneladas destes grãos produzidos no Piauí (CONAB, 2020).
127 Atualmente, o governo brasileiro planeja diversificar seu portfólio de exportação de
128 feijão e incluir o feijão-mungo, feijão-azuki, feijão vermelho e outros (BARD, 2020).

129 O feijão-mungo, originária da Ásia e também chamada de feijão chinês e feijão
130 *moyashi*, possui reconhecida importância econômica, sendo amplamente cultivada e
131 comercializada na Índia, Paquistão, China, Japão e outros países asiáticos bem como
132 no continente europeu e americano, principalmente em locais quentes e secos
133 (ZHANG et al., 2013; NAIR et al., 2015). Esta leguminosa está incluída no Plano
134 Nacional de Desenvolvimento de Feijões e Pulses do governo brasileiro (MAPA, 2018)

135 e, desde 2014, 20 linhagens de feijão-mungo têm sido testadas nos estados do Mato
136 Grosso e Piauí visando o melhoramento desta cultura e recomendações de cultivo e
137 manejo (EMBRAPA, 2017). Apesar da produção brasileira ser incipiente, têm-se uma
138 expectativa de crescimento uma vez que existe grande procura do mercado externo
139 vinda dos países asiáticos, e elevada demanda interna devido ao consumo nacional
140 do feijão-mungo germinado (broto do feijão *moyashi*) por conta da sua qualidade
141 nutricional (VIEIRA et al., 2003; MACHADO et al., 2009).

142

143 **2.2 Estresses causados por toxicidade iônica: estresse salino e por alumínio**

144 O estresse é, por definição, qualquer condição ambiental adversa, natural ou
145 induzida (antrópica), que impede a planta de expressar plenamente o seu potencial
146 genético e que induz alterações no metabolismo, limitação do crescimento e
147 desenvolvimento devido ao menor acúmulo de biomassa, florescimento e fechamento
148 de ciclo precoces (MITTLER, 2017a). Os estresses podem ser classificados em
149 biótico, quando causados por patógenos e pragas, competição intra e interespecífica
150 ou herbivoria, e abiótico, quando são provocados por alterações no ambiente, tais
151 como excesso de sais (salinidade), restrição da disponibilidade hídrica (seca), altas e
152 baixas temperaturas, excesso ou baixa luminosidade, toxicidade por metais pesados
153 e outros (MAHAJAN; TATEJA, 2005; MITTLER, 2017a). Dentre os estresses abióticos
154 conhecidos, a salinidade e a toxicidade ao alumínio (um tipo de metal pesado) são
155 problemas ambientais frequentes em regiões áridas e semiáridas que reduzem a
156 produtividade vegetal (KAISER et al., 2016).

157

158 **2.2.1 Estresse salino**

159 A salinidade é um tipo de estresse abiótico que dificulta ou prejudica o
160 desenvolvimento das espécies vegetais (MUNNS; TESTER, 2008). Este estresse é
161 resultado do excesso de sais no solo que pode ser originado de forma natural, como
162 resultado do intemperismo das rochas matrizes, do contato com a água do mar e da
163 adesão dos sais nos sedimentos marinhos e ainda por deposição atmosférica, ou por
164 ações antrópicas, como resultado de instalações de drenagens deficientes, do uso de
165 água subterrânea salobra para irrigação, da irrigação contínua por longos períodos,
166 da intrusão de água do mar em áreas costeiras e do inadequado manejo de recursos
167 hídricos em propriedades rurais (FAO; ITPS, 2015). Apesar da escassez de dados

168 atuais, a salinidade é mais acentuada nas regiões semiáridas do Nordeste brasileiro.
169 Nestas áreas, a salinidade é agravada pelas características químicas e físicas dos
170 solos, pelo baixo índice pluviométrico e também pelas elevadas temperaturas
171 (RIBEIRO et al., 2003).

172 Os solos afetados pelo excesso de sais podem ser classificados em função de
173 suas características químicas, principalmente pH, condutividade elétrica do extrato de
174 saturação (CE) e porcentagem de sódio trocável (ABIALA et al., 2018). No geral, os
175 solos afetados pelo excesso de sais podem ser divididos em solos salinos, sódicos ou
176 salino-sódicos. Os solos salinos são aqueles com pH inferior a 8,5, porcentagem de
177 sódio trocável menor que 15% e sais solúveis igual ou superior a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, podendo
178 ser levemente salinos (CE de $2,0$ a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$), moderadamente salinos (CE de $4,0$ a
179 $8,0 \text{ dS m}^{-1}$) ou fortemente salinos (CE superior a 16 dS m^{-1}) (NACKLEY; KIM, 2015).
180 Já os solos sódicos são aqueles que apresentam pH acima de 8,5 e CE inferior a
181 $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ em combinação com grandes quantidades de sódio trocável presa a
182 partículas de argila (porcentagem de sódio trocável superior a 15%) (CHI et al., 2012).
183 Finalmente, os solos salino-sódicos possuem propriedades características de solos
184 salinos e sódico, tais como CE igual ou superior a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, porcentagem de sódio
185 trocável superior a 15% e pH acima de 8,5 (CHI et al., 2012; NACKLEY; KIM, 2015).

186 Quando a condutividade elétrica da solução do extrato de saturação do solo é
187 igual ou superior a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ (equivalente a 40 mM de cloreto de sódio (NaCl)) e isto
188 gera uma pressão osmótica de aproximadamente 0,2 MPa que reduz de forma
189 significativa a produtividade da maioria das culturas (MUNNS; TESTER, 2008). Este
190 excesso de sais no solo, principalmente do íon sódio (Na^+), induz toxicidade iônica
191 que pode provocar a clorose e/ou necrose foliar, interferir em processos fisiológicos
192 do ciclo de vida dos vegetais, como germinação de sementes e emergência das
193 plântulas, e até levar a morte das plantas (ORLOVSKY et al., 2016). Além do estresse
194 iônico, a salinidade induz o estresse osmótico e isso diminui o movimento da água em
195 direção as raízes e, logo, dificulta a absorção de água pelas plantas. Adicionalmente,
196 ocorre inativação ou redução na funcionalidade das proteínas, perda de fluído do
197 vacúolo, desarranjo da integridade estrutural das células por conta da desidratação e
198 murchamento da planta (DEINLEIN et al., 2014; LITALIEN; ZEEB, 2020).

199 Dentre os processos fisiológicos dos vegetais que são afetados pela salinidade,
200 a fotossíntese merece destaque. A salinidade provoca danos na estrutura e
201 fluorescência da clorofila, altera o transporte fotossintético de elétrons, inibe a

202 atividade da Rubisco, desequilibra a captação de íons necessários para atividades
203 das enzimas envolvidas no ciclo de Calvin-Benson, principalmente potássio (K^+) e
204 magnésio (Mg^{2+}), e induz o fechamento dos estômatos com consequente limitação na
205 captação e assimilação de CO_2 (FLOWERS et al., 2015; ACOSTA-MOTOS et al.,
206 2017; FOYER, 2018). As alterações provocadas pela salinidade nestes processos,
207 principalmente no transporte fotossintético de elétrons e no comportamento
208 estomático, podem resultar no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio
209 (EROs), tais como o oxigênio singlete (1O_2), radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de
210 hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}), e ainda induzir aumento na atividade de
211 enzimas removedoras destes compostos tóxicos derivados do oxigênio molecular
212 (MITTLER, 2017a,b).

213 De acordo com sua capacidade de crescer em ambientes salinos, as plantas
214 podem ser classificadas em glicófitas ou halófitas (ACOSTA-MOTOS et al., 2017). A
215 maioria das plantas cultivadas são glicófitas, ou seja, toleram apenas baixos teores
216 de sais nos solos (CE inferior a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$) (ABIALA et al., 2018). De fato, trabalhos
217 mostram os efeitos negativos da salinidade na fisiologia de diversas espécies
218 vegetais, com destaque para leguminosas. Em plantas de feijão comum, a exposição
219 à salinidade induziu redução no conteúdo relativo de água e na concentração dos
220 pigmentos fotossintéticos além de diminuição significativa no crescimento e
221 rendimento de grãos (RADY et al., 2019). Já plantas de feijão-mungo submetidas ao
222 estresse salino apresentaram redução significativa no conteúdo relativo de água,
223 aumento dos níveis intracelulares de sódio, redução no índice de clorofila, aumento
224 no vazamento de eletrólitos e, conseqüentemente, redução no aporte de biomassa na
225 parta aérea e nas raízes (TORABIAN et al., 2018).

226

227 **2.2.2 Estresse por alumínio**

228 O alumínio (Al) é o terceiro elemento metálico de maior abundância na crosta
229 terrestre, sendo oriundo do intemperismo natural de minerais primários e secundários
230 presentes na rocha matriz do solo (CABALLERO et al., 2015; MATSUMOTO et al.,
231 2015). O estresse por alumínio se caracteriza pelas quantidades excessivas deste
232 metal, principalmente na forma trivalente (Al^{+3}), na solução do solo e estes níveis
233 elevados resultam em toxicidade para as plantas. Este tipo de estresse é frequente
234 em solos ácidos ($pH \leq 5,5$) de regiões tropicais e subtropicais uma vez que, quando o

235 pH do solo é inferior a 5,5, o alumínio (Al^{+3}) é liberado e se acumula na solução do
236 solo (SADE et al., 2016). Estima-se que 50% das terras agricultáveis no mundo são
237 ácidas, naturalmente ou por ação antrópica, e nestas a produção agrícola é limitada
238 devido a toxicidade ao alumínio (ZHENG, 2010; AYENI et al., 2014). No Brasil,
239 aproximadamente 66% das terras aráveis são ácidas e apresentam excesso de
240 alumínio na solução do solo (VITORELLO et al., 2005).

241 A toxicidade ao alumínio causa severos danos as plantas e pode induzir
242 respostas de curto prazo, que são observadas dentro de alguns minutos até uma hora
243 após a exposição ao alumínio, ou respostas de longo prazo, as quais requerem horas
244 ou dias de exposição (BOJÓRQUEZ-QUINTAL et al., 2017). Por exemplo, a divisão
245 celular no ápice da raiz primária e das raízes laterais é severamente reduzida minutos
246 após a exposição aos níveis tóxicos de alumínio (SINGH et al., 2017). Adicionalmente,
247 nas raízes, a toxicidade ao alumínio induz redução na replicação do DNA, rigidez da
248 parede celular, supressão no alongamento celular, redução no desenvolvimento dos
249 pelos radiculares e encurvamento do ápice radicular (KOPITTKKE et al., 2015; SINGH
250 et al., 2017). Este estresse interfere no equilíbrio dos transportadores de membrana
251 dependentes do cálcio e outras reações no metabolismo vegetal, reduzindo também
252 os processos de captação, condução pelo xilema e floema e utilização da água, dos
253 cátions e ânions pelas plantas (MOTA et al., 2016).

254 Além de afetar o funcionamento das raízes, os níveis tóxicos de alumínio
255 podem induzir alterações em importantes processos fisiológicos e bioquímicos de
256 outros órgãos das plantas uma vez que promovem aumento na concentração de
257 EROs, danos às membranas biológicas, redução na condutância estomática,
258 diminuição de parâmetros da fotossíntese (redução nos pigmentos fotossintéticos, na
259 fluorescência da clorofila, na atividade da Rubisco e de outras enzimas do
260 metabolismo de carboidratos) e indução da morte celular programada (XU et al., 2018;
261 CÁRCAMO et al., 2019). Segundo Bojórquez-Quintal et al. (2017), os efeitos da
262 toxicidade do alumínio no crescimento e desenvolvimento das plantas dependem da
263 concentração de alumínio e das suas formas químicas que estejam presentes na
264 solução do solo, das espécies vegetais, dos genótipos, da idade da planta e das
265 condições de cultivo. Estes autores também afirmam que baixas concentrações de
266 alumínio podem aumentar a tolerância aos estresses bióticos e abióticos.

267 A presença de alumínio em plantas de feijão-mungo reduz consideravelmente
268 altura das plantas e, mais severamente, o comprimento das raízes, afetando também

269 a área foliar e a biomassa vegetal e reduzindo o conteúdo de pigmentos fotossintéticos
270 (clorofila e carotenoides) (ALI, 2017). Houve decréscimo na condutância estomática,
271 eficiência do uso de água, taxa fotossintética líquida e no teor relativo de água, sendo
272 estes efeitos negativos proporcionais as concentrações de 1,0 e 10,0 mM de alumínio
273 (na forma de Al^{+3}). Apesar de haver aumento da atividade das enzimas antioxidantes,
274 o estresse oxidativo também foi perceptível uma vez que houve aumento dos níveis
275 de H_2O_2 e dos danos aos lipídios das membranas celulares, mensurado pelos níveis
276 de malondialdeído, e conseqüentemente redução do índice de estabilidade da
277 membrana (ALI, 2017).

278 Em plantas de feijão-mungo expostas ao estresse por alumínio, Nahar et al.
279 (2017) constataram que houve interrupção na absorção de água e conseqüentemente
280 redução da água no tecido vegetal, do crescimento e da biomassa na parte aérea e
281 raízes, sendo maiores os danos quando o tempo de exposição ao estresse foi maior.
282 Segundo estes autores, o estresse por alumínio provocou redução nos teores dos
283 pigmentos fotossintéticos, aumento na concentração do $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 e, por
284 conseqüente, redução na concentração de ascorbato e glutatona. Entretanto, a
285 atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do
286 ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (GPX), S-transferase da glutatona (GST) e
287 redutase da glutatona (GR) foi estimulada, diferentemente da catalase (CAT),
288 redutase do dehidroascorbato (DHAR) e redutase do monodehidroascorbato
289 (MDHAR) que foram reduzidas em resposta ao estresse (NAHAR et al., 2017).

290

291 **2.3 Excesso ou baixa luminosidade: efeitos da oferta de luz nas plantas**

292 As plantas necessitam obrigatoriamente de luz para crescer, desenvolver e
293 completar seu ciclo de vida, tendo como fonte essencial a energia solar, a qual é
294 captada, principalmente, pelos cloroplastos durante o processo fotossintético e estes
295 utilizam seus fotorreceptores para detectar a qualidade e intensidade de luz
296 (COURBIER; PIERIK, 2019). Devido à localização geográfica e condições ambientais,
297 as plantas naturalmente são expostas às condições de alta (1000 a 1800 μmol de
298 fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ou baixa luz (abaixo de 500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), até mesmo às
299 flutuações que ocorrem no decorrer do dia entre a nascente e poente do sol
300 (ALMEIDA; DIAS, 2018). Estas condições acarretam diferentes respostas de
301 aclimação e complexas modulações em espécies vegetais domesticadas.

302 Sob alta luz é afetado principalmente a fotossíntese, reduzindo sua eficiência,
303 resultando em processos denominados de fotoinibição e fotodegradação em curto
304 prazo ou quando o estresse se prolonga a ponto de não haver reparo do processo (LU
305 et al., 2017). A inibição do fluxo de elétrons na cadeia transportadora pela alta luz
306 afeta o complexo pigmento-proteína PSII, especificamente com a degradação da
307 proteína D1 do centro de reação por EROs (em especial, $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e HO^{\bullet}) que
308 tem a produção aumentada sob estresse (GAO et al., 2019). Ocorre também o
309 fechamento dos estômatos, inativação da Rubisco, mudança nas estruturas proteicas
310 (tais como a fosforilação das proteínas), alteração na localização dos cloroplastos,
311 alteração na atividade enzimática e não enzimática antioxidante, peroxidação lipídica
312 e consequentemente com declínio das funções foliares há alterações no padrão de
313 crescimento, desenvolvimento e reprodução, com menor acúmulo de massa,
314 precocidade em florescimento, senescência e perda de rendimento da cultura
315 (SZYMAŃSKA et al., 2017).

316 Em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) submetidas a alta
317 luminosidade em ambiente controlado, os autores notaram elevação na taxa
318 fotossintética líquida e condutância estomática acompanhado de aumento no teor de
319 clorofila, carotenoides e carboidratos (amido), além da mudança da orientação das
320 folhas e aumento do peso seco foliar (ZHOU et al., 2020). Chen et al. (2017), ao
321 testarem a alta luz combinado com o estresse térmico a curto e longo prazo em plantas
322 de trigo, verificaram redução na concentração de pigmentos fotossintéticos, no teor
323 relativo de água e proteínas totais, bem como, aumento nas concentrações de EROS
324 ($\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2), na peroxidação lipídica e no vazamento de eletrólitos que leva à
325 variação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX, peroxidases (POX),
326 GPX e GR de acordo com o tempo de exposição.

327 Ainda há condições no ambiente de baixa luminosidade, seja por condições de
328 competição interespecífica por espaço ou por baixa luz onde se encontra a espécie
329 vegetal, que induzem a variações no padrão morfofisiológico das culturas. Devido à
330 baixa luminosidade as espécies têm a sua capacidade fotossintética, fixação de
331 carbono e captação de nitrogênio afetadas, os níveis de carboidratos são reduzidos
332 devido a elevada demanda destes para atender o crescimento e concomitantemente
333 ocorre o alongamento caulinar e foliar (principal característica deste estresse), que
334 torna estes órgãos mais finos, acompanhado ainda da floração precoce e redução na
335 biomassa (ROIG-VILLANOVA; MARTÍNEZ-GARCÍA, 2016; LI et al., 2017). A baixa

336 luminosidade também provoca o estresse oxidativo uma vez que ocorre produção de
337 EROs (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet}) e peroxidação lipídica (ZHANG et al., 2011).

338 De acordo com Zhang et al. (2018), plântulas de *Festuca alta* crescidas em
339 baixa luz apresentam alterações drásticas nos parâmetros biométricos (altura da
340 planta, largura foliar, número de perfilhos e biomassa), nos teores de clorofila, na
341 condutância estomática e, conseqüentemente, na taxa fotossintética líquida e a
342 transpiração. Além disso, ocorrem danos oxidativos uma vez que os níveis de H_2O_2 e
343 $O_2^{\bullet-}$ bem como a peroxidação lipídica são aumentados, mesmo com a indução do
344 sistema enzimático antioxidante. Em mudas de pimenta (*Capsicum annuum* L.) sob
345 condições de baixa luminosidade há redução nos parâmetros de crescimento (área
346 foliar, altura da planta e diâmetro do caule), porém há aumento nos teores de
347 pigmentos fotossintéticos, bem como, alterações positivas na atividade das enzimas
348 antioxidantes SOD e POX (LI et al., 2020).

349

350 **2.4 Os estresses abióticos múltiplos ou combinados**

351 As espécies vegetais, cultivadas ou não, são submetidas a diversas e
352 simultâneas condições ambientais adversas, tais como seca e temperaturas elevadas,
353 salinidade e seca, luminosidade extrema e temperaturas elevadas, seca e metais
354 pesados, e, portanto, têm crescido os estudos acerca das repostas fisiológicas das
355 plantas nestas condições, principalmente no tocante ao ajuste hídrico e osmótico,
356 fotossíntese e metabolismo oxidativo, uma vez que estas condições levam a muitas
357 perdas na produção agrícola em todo mundo (HOQUE et al., 2016). As situações
358 estressantes múltiplas, que resultam das alterações ambientais repentinas e
359 inesperadas, podem ser severas ou de longo prazo e podem induzir um ajuste e
360 reequilíbrio do metabolismo vegetal culminando em atraso ou aceleração do ciclo de
361 vida das plantas ou levar a morte dos vegetais quando os limites de tolerância das
362 plantas são ultrapassados (DEBNATH, et al., 2011; KÖHL, 2016).

363 A combinação de condições ambientais adversas é uma situação comum no
364 campo e as repostas fisiológicas, bioquímicas e metabólicas das plantas submetidas
365 a estas condições são, em geral, únicas e podem ser sinérgicas ou antagônicas
366 (MAHALINGAM, 2015). Por exemplo, seca e salinidade frequentemente ocorrem
367 simultaneamente no campo e são responsáveis por reduzir mundialmente a produção
368 agrícola (AHMED et al., 2015). A exposição simultânea à salinidade, alumínio e seca

369 resulta em mais severa redução na altura, comprimento das raízes e concentração de
370 pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenoides) em plantas de alface que as
371 alterações registradas quando os estresses são aplicados isoladamente
372 (SILAMBARASAN et al., 2019). Em contrapartida, plantas de tomate apresentam
373 redução nos efeitos deletérios do calor e da salinidade quando estes estresses são
374 aplicados de forma combinada (RIVERO et al., 2014).

375 Outros resultados sinérgicos são relatados em plantas expostas à estresses
376 abióticos múltiplos. Plantas de *Arabidopsis thaliana* (cv. Columbia) exibiram redução
377 de biomassa e no teor de clorofila e sobrevivência de 40% das plantas em resposta à
378 combinação dos estresses por calor e salinidade, porém não houve elevação no
379 acúmulo foliar de sódio em comparação ao registrado nos estresses isolados (SUZUKI
380 et al., 2016). Plantas de festuca tolerantes e sensíveis às altas temperaturas
381 submetidas aos estresses combinados de calor e seca apresentaram redução nos
382 danos celulares e o genótipo tolerante exibiu maiores taxas de atividade de enzimas
383 do metabolismo antioxidante em comparação aos estresses isolados (BI et al., 2016).
384 Plantas de feijão-caupi submetidas ao excesso ou deficiência de zinco combinado
385 com alta luz (MICHAEL; KRISHNASWAMY, 2011) ou a combinação da radiação
386 ultravioleta B (UVB), alta concentração de CO₂ e calor (SINGH et al., 2010) exibiram
387 alterações significativas e positivas no sistema de defesa antioxidante.

388 Há estudos com a cultura da cevada, clones de álamo (*Populus* spp.) e mudas
389 de trigo (*Triticum aestivum*) que apresentam efeitos negativos de múltiplos estresses,
390 tais como salinidade, calor e seca, metal pesado (cádmio) e ozônio, alta temperatura
391 e elevada concentração de CO₂, que resultando em redução da capacidade
392 antioxidante e fotossintética bem como no aumento nos níveis de EROs (CASTAGNA
393 et al., 2015; WANG et al., 2016; KUCZYŃSKA et al., 2019). Há também trabalhos com
394 interações benéficas entre estresses para *Medicago truncatula* e alface. Estresses
395 combinados de seca e ozônio, salinidade ou luminosidade combinadas com altas
396 concentrações de CO₂ resultam no aumento nos níveis de antioxidantes, com
397 ascorbato e glutathiona, na redução da condutância estomática e ainda no aumento na
398 produção de biomassa (IYER et al., 2013; PÉREZ-LÓPEZ et al., 2013).
399

400 **2.5 Alterações oxidativas em plantas submetidas à estresses abióticos múltiplos**

401 A exposição a estresses ambientais únicos ou múltiplos pode desencadear
402 inúmeras reações e dentre estas está o aumento na produção de espécies reativas
403 de oxigênio (EROs). EROs são moléculas mais reativas derivadas do oxigênio e
404 incluem ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet})
405 e o oxigênio singlete (1O_2) (MITTLER, 2017b). Apesar de estarem presentes nas
406 células vegetais sob condições normais como subprodutos de processos da
407 fotossíntese e das reações aeróbicas, quando a produção excede a capacidade da
408 eliminação destas EROs pode ocorrer o estresse oxidativo que influencia na estrutura
409 e funcionamento das células (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2010; NOCTOR;
410 FOYER, 2017). Para controlar os níveis de EROs e evitar o estresse oxidativo, as
411 plantas apresentam mecanismos intracelulares de defesa que atuam sintetizando
412 metabólitos e ativando enzimas antioxidantes aceleram a degradação das EROs
413 (AHMED et al., 2015; YOU; CHAN, 2015; NOCTOR; FOYER, 2017).

414 O mecanismo intracelular de defesa antioxidante se distribui as células vegetais
415 em diferentes locais, tais como citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos,
416 glioxissomos, e trabalham simultaneamente para eliminação das EROs afim de
417 manter a homeostase celular (NOCTOR; FOYER, 2016). O sistema intracelular de
418 defesa antioxidante se divide em compostos hidrofílicos, com destaque para
419 ascorbato e glutathione, e enzimas antioxidantes, principalmente SOD, CAT, APX, GR,
420 GPX, GST, DHAR, MDHAR e peroxirredoxina (PRX) (NOCTOR; FOYER, 2017). As
421 enzimas APX, MDHAR, DHAR, GR, GPX, GST e PRX, juntamente com ascorbato e
422 glutathione, atuam no ciclo ascorbato-glutathione ou ciclo Halliwell-Asada e
423 conjuntamente reduzem H_2O_2 em água e oxigênio molecular (MEYER et al., 2012;
424 NOCTOR et al., 2014; FOYER, 2018).

425 Adicionalmente, merecem destaque as enzimas SOD e CAT. SOD atua na
426 dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e, portanto, é considerada a primeira linha de defesa
427 antioxidante nas células vegetais (FOYER, 2018). Esta enzima apresenta de três
428 isoformas que diferem em seus cofatores e localização subcelular. Enquanto a
429 isoforma Mn-SOD está localizada na mitocôndria e peroxissomos e a isoforma Cu/Zn-
430 SOD está localizado no cloroplasto e citosol, a isoforma Fe-SOD é encontrada apenas
431 nos cloroplastos (GUPTA et al., 2016). Em contrapartida, CAT está localizada apenas
432 no peroxissomos e atua convertendo H_2O_2 em água e O_2 (BONIFACIO et al., 2016).

433 Por ser capaz de reduzir cerca de seis milhões de moléculas de H₂O₂ por minuto
434 (JAHAN; ANIS, 2014), CAT é considerada uma das principais enzimas antioxidantes,
435 especialmente durante a fotorrespiração (BONIFACIO et al., 2016). A elevada taxa
436 catalítica da CAT é essencial para eliminar as altas concentrações de H₂O₂ produzido
437 pela oxidase do glicolato (GO) nos peroxissomos (MHAMDI et al., 2012).

438 No geral, a atuação do sistema de defesa antioxidante contra o estresse se dá
439 de maneira diferente quando os estresses são aplicados individualmente ou de forma
440 combinada (MILLER et al., 2010). Segundo estes autores, as respostas metabólicas
441 de plantas submetidas aos estresses múltiplos não podem ser baseadas no registrado
442 quando cada estresse é analisado isoladamente. Silva et al. (2013) relatam aumento
443 na atividade de SOD e APX quando plantas de pinhão-mansão são expostas ao calor
444 e salinidade isoladamente; enquanto, quando os estresses são aplicados em
445 combinado, houve aumento na atividade de CAT e redução no estado redox do
446 ascorbato. Em dois genótipos de algodoeiro, um sensível e outro tolerante ao estresse
447 salino, a combinação de seca e salinidade induz aumento na atividade de CAT, SOD,
448 APX e POX (IBRAHIM et al., 2019), principalmente no genótipo tolerante. A ação
449 simultânea de CAT, SOD e APX indica proteção metabólica e sugere tolerância aos
450 estresses abióticos múltiplos (MORAIS et al., 2018).

451 Alguns autores apontam que o aumento na atividade enzimática não está
452 necessariamente relacionado a redução nos danos oxidativos. Silambarasan et al.
453 (2019) relatam acréscimo na atividade das enzimas CAT, SOD e POX em plantas de
454 alface submetidas simultaneamente aos estresses por alumínio, salinidade e seca e
455 ressaltam que este aumento não foi suficiente para evitar danos oxidativos uma vez
456 que a peroxidação lipídica, mesurada pelos níveis de malondialdeído, foi aumentada.
457 A combinação da deficiência ou excesso de zinco com a alta luz induziu maior
458 vazamento de eletrólitos e alterações significativas na concentração de H₂O₂, na
459 peroxidação lipídica e na atividade de SOD, POX e polifenoloxidase (PPO) em plantas
460 de feijão-caupi (MICHAEL; KRISHNASWAMY, 2011). Adicionalmente, a exposição do
461 feijão-caupi à combinação da salinidade e cádmio, um metal pesado, estimulou a
462 atividade das enzimas SOD, CAT, POX e GR e provocou maior vazamento de
463 eletrólitos e peroxidação lipídica indicando que houve interação sinérgica dos
464 estresses e isto induziu maior dano celular (HOWLADAR, 2014).

465

466 **3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 467 ACOSTA-MOTOS, J.R.; ORTUÑO, M.F.; BERNAL-VICENTE, A.; DIAZ-VIVANCOS, P.; SANCHEZ-
468 BLANCO, M.J.; HERNANDEZ, J.A. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. **Agronomy**,
469 v. 7, n. 1, p. 18, 2017.
- 470 AHMED, I.M.; NADIRA, U.A.; BIBI, N.; ZHANG, G.; WU, F. Tolerance to combined stress of drought
471 and salinity in barley. In: MAHALINGAM, R. (Ed.). **Combined stresses in plants**. Switzerland: Springer
472 International Publishing, 2015. p. 93-121.
- 473 ALMEIDA, E.J.; DIAS, J.P.T. Ecofisiologia de hortaliças. In: DIAS, J.P.T (Org.). **Ecofisiologia de**
474 **Culturas Agrícolas**. 1 ed. Belo Horizonte: EdUEMG, 2018. p. 44-59.
- 475 ALI, B. Salicylic acid induced antioxidant system enhances the tolerance to aluminium in mung bean
476 (*Vigna radiata* L. Wilczek) plants. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 178-189, 2017.
- 477 AYENI, O.; KAMBIZI, L.; LAUBSCHER, C.; FATOKI, O.; OLATUNJI, O. Risk assessment of wetland
478 under aluminium and iron toxicities: A review. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 17, n. 2,
479 p. 122-128, 2014.
- 480 BARD, D. **Brazil struggles to boost dry bean exports in 2019/20**. Disponível em:
481 [https://pulsepod.globalpulses.com/pod-feed/post/brazil-struggles-to-boost-dry-bean-exports-in-2019-](https://pulsepod.globalpulses.com/pod-feed/post/brazil-struggles-to-boost-dry-bean-exports-in-2019-20)
482 [20](https://pulsepod.globalpulses.com/pod-feed/post/brazil-struggles-to-boost-dry-bean-exports-in-2019-20). Global Pulse Confederation: Dubai, 2020.
- 483 BI, A.; FAN, J.; HU, Z.; WANG, G.; AMOMBO, E.; FU, J.; HU, T. Differential acclimation of enzymatic
484 antioxidant metabolism and photosystem II photochemistry in tall fescue under drought and heat and
485 the combined stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1, p. 453, 2016.
- 486 BONIFACIO, A.; CARVALHO, F.E.; MARTINS, M.O.; LIMA NETO, M.C.; CUNHA, J.R.; RIBEIRO, C.W.;
487 MARGIS-PINHEIRO, M.; SILVEIRA, J.A.G. Silenced rice in both cytosolic ascorbate peroxidases
488 displays pre-acclimation to cope with oxidative stress induced by 3-aminotriazole-inhibited catalase.
489 **Journal of Plant Physiology**, v. 201, n.1, p. 17-27, 2016.
- 490 BOJÓRQUEZ-QUINTAL, E.; ESCALANTE-MAGAÑA, C.; ECHEVARRÍA-MACHADO, I.; MARTÍNEZ-
491 ESTÉVEZ, M. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. **Frontiers in Plant Science**, v. 8,
492 n.1, p. 1767, 2017.
- 493 CABALLERO, E.C.; ÁLVAREZ V.V.H.; LIMA, N.J.C. Comparação de métodos químicos como extrator
494 de alumínio em solos tiomórficos do Brasil e Colômbia. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v.
495 68, n. 1, p. 7569-7579, 2015.
- 496 CÁRCAMO, M.P.; REYES-DÍAZ, M.; RENGEL, Z.; ALBERDI, M.; OMENA-GARCIA, R.P.; NUNES-
497 NESI, A.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C. Aluminum stress differentially affects physiological
498 performance and metabolic compounds in cultivars of highbush blueberry. **Scientific Reports**, v. 9, n.
499 1, p. 1-13, 2019.
- 500 CASTAGNA, A.; DI BACCIO, D.; RANIERI, A.M.; SEBASTIANI, L.; TOGNETTI, R. Effects of combined
501 ozone and cadmium stresses on leaf traits in two poplar clones. **Environmental Science and Pollution**
502 **Research**, v. 22, n. 3, p. 2064-2075, 2015.
- 503 CHEN, Y.E.; ZHANG, C.M.; SU, Y.Q.; MA, J.; ZHANG, Z.W.; YUAN, M.; ZHANG, H.Y.; YUAN, S.
504 Responses of photosystem II and antioxidative systems to high light and high temperature co-stress in
505 wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v. 135, n. 1, p. 45-55, 2017.
- 506 CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos:**
507 v. 6 - Safra 2018/19 - Décimo primeiro levantamento. Brasília, 2019, 104p.
- 508 COURBIER, S., PIERIK, R. Canopy light quality modulates stress responses in plants. **Science**, v.22,
509 n.1, p.441-452, 2019.

- 510 DEBNATH, M.; PANDEY, M.; BISEN, P.S. An omics approach to understand the plant abiotic stress.
511 **OMICS: A Journal Integrative Biology**, v. 15, n. 11, p. 739-762, 2011.
- 512 DEINLEIN, U.; STEPHAN, A.B.; HORIE, T.; LUO, W.; XU, G.; SCHROEDER, J.I. Plant salt-tolerance
513 mechanisms. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 6, p. 371-379, 2014.
- 514 EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Organização das Nações Unidas para**
515 **Alimentação e Agricultura (FAO) declara 2016 como o “Ano Internacional dos Pulses**. 2015.
516 Disponível em: [https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/7127460/organizacao-das-nacoes-](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/7127460/organizacao-das-nacoes-unidas-para-alimentacao-e-agricultura-fao-declara-2016-como-o-ano-internacional-dos-pulses)
517 [unidas-para-alimentacao-e-agricultura-fao-declara-2016-como-o-ano-internacional-dos-pulses](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/7127460/organizacao-das-nacoes-unidas-para-alimentacao-e-agricultura-fao-declara-2016-como-o-ano-internacional-dos-pulses)
518 Acesso: 15/08/2019
- 519 EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Feijão-caupi puxa a fila e Embrapa**
520 **amplia pesquisa com pulses em Mato Grosso**. 2017. Disponível em: [https://www.embrapa.br/busca-](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/20361811/feijao-caupi-puxa-a-fila-e-embrapa-amplia-pesquisa-com-pulses-em-mato-grosso)
521 [de-noticias/-/noticia/20361811/feijao-caupi-puxa-a-fila-e-embrapa-amplia-pesquisa-com-pulses-em-](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/20361811/feijao-caupi-puxa-a-fila-e-embrapa-amplia-pesquisa-com-pulses-em-mato-grosso)
522 [mato-grosso](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/20361811/feijao-caupi-puxa-a-fila-e-embrapa-amplia-pesquisa-com-pulses-em-mato-grosso) Acesso em: 15/08/2019
- 523 FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The state of the world’s land and**
524 **water resources for food and agriculture (SOLAW) – Managing systems at risk**. London, 2011.
- 525 FAO; ITPS (Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical
526 Panel on Soils). **Status of the World’s Soil Resources (SWSR) – Main Report**. Italy, 2015.
- 527 FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database). **Production, Crops:**
528 **Pulses**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Roma, 2017.
- 529 FLOWERS, T.J.; MUNNS, R.; COLMER, T.D. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt
530 tolerance in halophytes. **Annals of Botany**, v. 115, n. 3, p. 419-431, 2015.
- 531 FOYER, C.H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis.
532 **Environmental and Experimental Botany**, v. 154, n. 1, p. 134-142, 2018.
- 533 FREITAS, L.B.; FERNANDES, D.M.; MAIA, S.C. M. Silício na nutrição mineral e acúmulo de alumínio
534 em plantas de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 4, p. 440-448, 2015.
- 535 GAO, Y.B.; ZHENG, W.W.; ZHANG, C.; ZHANG, L.L.; XU, K. High temperature and high light intensity
536 induced photoinhibition of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) by disruption of D1 turnover in
537 photosystem II. **Scientia Horticulturae**, v. 248, n. 1, p. 132-137, 2019.
- 538 GUPTA, K.; SENGUPTA, A.; CHAKRABORTY, M.; GUPTA, B. Hydrogen peroxide and polyamines act
539 as double edged swords in plant abiotic stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1343,
540 2016.
- 541 GUO, J.; ZHOU, Y.; LI, J.; SUN, Y.; SHANGGUAN, Y.; ZHU, Z.; HU, Y.; LI, T.; HU, Y.; ROCHAIX, J.D.;
542 MIAO, Y.; SUN, X. COE 1 and GUN1 regulate the adaptation of plants to high light stress. **Biochemical**
543 **and Biophysical Research Communications**, v. 521, n. 1, p. 184-189, 2020.
- 544 HOQUE, T.S.; HOSSAIN, M.A.; MOSTOFA, M.G.; BURRITT, D.J.; FUJITA, M.; TRAN, L.S.P.
545 Methylglyoxal: an emerging signaling molecule in plant abiotic stress responses and tolerance.
546 **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1, p. 1341, 2016.
- 547 HOWLADAR, S.M. A novel *Moringa oleifera* leaf extract can mitigate the stress effects of salinity and
548 cadmium in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, n.
549 1, p. 69-75, 2014.
- 550 IBRAHIM, W.; QIU, C.; ZHANG, C.; CAO, F.; SHUIJIN, Z.; WU, F. Comparative physiological analysis
551 in the tolerance to salinity and drought individual and combination in two cotton genotypes with
552 contrasting salt tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 165, n. 2, p. 155-168, 2019.

- 553 IYER, N.J.; TANG, Y.; MAHALINGAM, R. Physiological, biochemical and molecular responses to a
554 combination of drought and ozone in *Medicago truncatula*. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, n. 3, p.
555 706-720, 2013.
- 556 JAHAN, A. A.; ANIS, M. Changes in antioxidative enzymatic responses during acclimatization of in vitro
557 raised plantlets of *Cardiospermum halicacabum* L. against oxidative stress. **Journal Plant Physiology**
558 **Pathology**, v. 4, n. 2, 10-4172, 2014.
- 559 JAVALOYES, P.; O'BROIN, S.; BRUQUE, R.; PUZZILLI, F.; UМЕНА, M.; DOUGHERTY, S.; CALLES,
560 T.; DELIGIA, C.; TAYYIB, S.; CASTALDI, L.; BRIVIO, R. **Pulses: Nutritious seeds for sustainable future.**
561 FAO (Food and Agriculture Organization) International Year of Pulses. 2016, 196p.
- 562 KÖHL, K. Metabolomics on combined abiotic stress effects in crops. In: HOSSAIN, M.A.; WANI, S.H.;
563 BHATTACHARJEE, S.; BURRITT, D.J.; TRAN, L.P. **Drought stress tolerance in plants.** Switzerland:
564 Springer International Publishing, 2016. v. 2, p. 251-276.
- 565 KOPITTKE, P.M.; MOORE, K.L.; LOMBI, E.; GIANONCELLI, A.; FERGUSON, B.J.; BLAMEY, F.P.C.;
566 MENZIES, N.W.; NICHOLSON, T.M.; MCKENNA, B.A.; WANG, P.; GRESSHOFF, P.M.;
567 KOUROUSIAS, G.; WEBB, R.I.; GREEN, K.; TOLLENAERE, A. Identification of the primary lesion of
568 toxic aluminum in plant roots. **Plant Physiology**, v. 167, n. 4, p. 1402-1411, 2015.
- 569 KUCZYŃSKA, A.; CARDENIA, V.; OGRODOWICZ, P.; KEMPA, M.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.;
570 MIKOŁAJCZAK, K. Effects of multiple abiotic stresses on lipids and sterols profile in barley leaves
571 (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 141, n. 1, p. 215-224, 2019.
- 572 LI, L.; TIAN, S.L.; JIANG, J.; WANG, Y. Regulation of nitric oxide to *Capsicum* under lower light
573 intensities. **South African Journal of Botany**, v. 132, n. 1, p. 268-276, 2020.
- 574 LI, Y.F.; FAN, Y.; MA, Y.; ZHANG, Z.; YUE, H.B.; WANG, L.J.; LI, J.; JIAO, Y. Effects of exogenous γ -
575 aminobutyric acid (GABA) on photosynthesis and antioxidant system in pepper (*Capsicum annuum* L.)
576 seedlings under low light stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 36, n.1, p. 1-14, 2017
- 577 LITALIEN, A.; ZEEB, B. Curing the earth: A review of anthropogenic soil salinization and plant-based
578 strategies for sustainable mitigation. **Science of the Total Environment**, v. 698, 134235, 2020.
- 579 LU, T.; MENG, Z.; ZHANG, G.; QI, M.; SUN, Z.; LIU, Y.; LI, T. Sub-high temperature and high light
580 intensity induced irreversible inhibition on photosynthesis system of tomato plant (*Solanum*
581 *lycopersicum* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 1, p. 365, 2017.
- 582 MACHADO, A.L.L.; BARCELOS, M.F.P.; TEIXEIRA, A.H.R.; NOGUEIRA, D.A. Avaliação de
583 componentes químicos em brotos de Fabaceae para o consume humano. **Ciência e Agrotecnologia**,
584 v. 33, n. 4, p. 1071-1078, 2009.
- 585 MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of**
586 **Biochemistry and Biophysics**, v. 2, n. 444, 139-158, 2005.
- 587 MAHALINGAM, R. Consideration of combined stress: a crucial paradigm for improving multiple stress
588 tolerance in plants. In: MAHALINGAM, R. (Ed.). **Combined stresses in plants.** Switzerland: Springer
589 International Publishing, 2015. p. 1-25.
- 590 MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Plano Nacional de Desenvolvimento**
591 **da Cadeia de Feijões e Pulses.** Brasília-DF, 2018.
- 592 MATSUMOTO, H.; RIECHERS, D.E.; LYGIN, A.V.; BALUSKA, F.; SIVAGURA, M. Aluminum signaling
593 and potential links with safener-induced detoxification in plants. In: PANDA, S.K.; BALUSKA, F. (Eds.).
594 **Aluminum Stress Adaptation in Plant, Signaling and Communication in Plants.** Cham: Springer
595 International Publishing, 2015. p. 1-35.
- 596 MEYER, Y.; BELIN, C.; DELORME-HINOUX, V.; REICHHELD, J.P.; RIONDET, C. Thioredoxin and
597 glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance.
598 **Antioxidant Redox Signal**, v. 17, n. 1, p. 1124-1160, 2012.

- 599 MHAMDI, A.; NOCTOR, G.; BAKER, A. Plant catalases: peroxisomal redox guardians. **Archives of**
600 **Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 181-194, 2012.
- 601 MICHAEL, P.I.; KRISHNASWAMY, M. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on
602 membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. **Environmental and Experimental**
603 **Botany**, v. 74, n. 1, p. 171-177, 2011.
- 604 MITTLER, R. Estresse abiótico. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. (Org.).
605 **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 761-791.a
- 606 MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.b
- 607 MORAIS, M.B.; CAMARA, T.R.; ULISSES, L.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; WILLADINO, L. Multiple
608 stresses on the oxidative metabolism of sugarcane varieties. **Ciência Rural**, v. 48, n. 4, e20141487,
609 2018.
- 610 MOTA, M.F.C.; PEGORARO, R.F.; BATISTA, P.S.C.; PINTO, V.O.; MAIA, V.M.; SILVA, D.F. Acúmulo
611 de macronutrientes e crescimento de cultivares de abacaxi submetidas ao estresse com alumínio.
612 **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 11, p. 978-983, 2016.
- 613 MOUSAVI-DERAZMAHALLEH, M.; BAYER, P. E.; HANE, J. K.; VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T.;
614 NELSON, M. N.; ERSKINE, W.; VARSHNEY, R.K.; PAPA, R.; EDWARDS, D. Adapting legume crops
615 to climate change using genomic approaches. **Plant, Cell & Environment**, v. 42, n. 1, p. 6-19, 2019.
- 616 MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59,
617 n. 1, p. 651-681, 2008.
- 618 NAHAR, K.; HASANUZZAMAN, M.; SUZUKI, T.; FUJITA, M. Polyamines-induced aluminum tolerance
619 in mung bean: A study on antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems.
620 **Ecotoxicology**, v. 26, n. 1, p. 58-73, 2017.
- 621 NAIR, R.M.; YANGB, R.Y.; EASDOWNA, W.J.; THAVARAJAHC, D.; THAVARAJAHC, P.; HUGHESB,
622 J.A.; KEATINGE, J.D.H. Biofortification of mungbean (*Vigna radiata*) as a whole food to enhance human
623 health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 1, p. 1805-13, 2013.
- 624 NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in
625 regulation and signaling. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 1581-1592, 2016.
- 626 NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Update on redox compartmentation intracellular redox compartmentation
627 and ROS-related communication in regulation and signaling. **Plant Physiology**, v. 171, n. 1, p. 1581-
628 1592, 2017.
- 629 NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C.H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so
630 cut and dried. **Plant Physiology**, v. 164, n. 1, p. 1636-1648, 2014.
- 631 ORLOVSKY, N.; JAPAKOVA, U.; ZHANG, H.; VOLIS, S. Effect of salinity on seed germination, growth
632 and ion content in dimorphic seeds of *Salicornia europaea* L. (Chenopodiaceae). **Plant Diversity**, v. 38,
633 n. 4, p. 183-189, 2016.
- 634 PANDEY, M.K.; ROORKIWAL, M.; SINGH, V.K.; RAMALINGAM, A.; KUDAPA, H.; THUDI, M.;
635 CHITIKINEN, A.; RATHORE, A.; VARSHNEY, R.K. Emerging genomic tools for legume breeding:
636 current status and future prospects. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n.1, p. 455, 2016.
- 637 PÉREZ-LÓPEZ, U.; MIRANDA-APODACA, J.; MUÑOZ-RUEDA, A.; MENA-PETITE, A. Lettuce
638 production and antioxidant capacity are differentially modified by salt stress and light intensity under
639 ambient and elevated CO₂. **Journal of plant Physiology**, v. 170, n. 17, p. 1517-1525, 2013.
- 640 PIRZADAH, T.B.; MALIK, B.; TAHIR, I.; REHMAN, R.U.; HAKEEM, K.R.; ALHARBY, H.F. Aluminium
641 stress modulates the osmolytes and enzyme defense system in *Fagopyrum* species. **Plant Physiology**
642 **and Biochemistry**, v. 144, n. 1, p. 178-186, 2019.

- 643 RADY, M.M.; DESOKY, E.S.M.; ELRYS, A.S.; BOGHDADY, M.S. Can licorice root extract be used as
644 an effective natural biostimulant for salt-stressed common bean plants? **South African Journal of**
645 **Botany**, v. 121, n. 1, p. 294-305, 2019.
- 646 RIBEIRO, M.R.; FREIRE, F.J.; MONTENEGRO, A.A.A. Solos halomórficos no Brasil: Ocorrência,
647 gênese, classificação, uso e manejo sustentável. In: CURI, N.; MARQUES, J.J.; GUILHERME, L.R.G.;
648 LIMA, J.M.; LOPES, A.S; ALVAREZ, V.H. (Eds.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade
649 Brasileira de Ciência do Solo, v. 3, p. 165-208, 2003.
- 650 RIVERO, R.M.; MESTRE, T.C.; MITTLER, R.; RUBIO, F.; GARCIA-SANCHEZ, F.; MARTINEZ, V. The
651 combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular
652 response in tomato plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 5, p. 1059-1073, 2014.
- 653 ROCHA, M.M.; SILVA, K.J.D.; MENEZES JUNIOR, J.A.N. **Cultivo de Feijão-caupi**: Importância
654 econômica. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br>. Acessado em: 24 Jul. 2017
- 655 ROIG-VILLANOVA, I.; MARTÍNEZ-GARCÍA, J.F. Plant responses to vegetation proximity: a whole life
656 avoiding shade. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1, p. 236, 2016.
- 657 SADE, H.; MERIGA, B.; SURAPU, V.; GADI, J.; SUNITA, M. S. L.; SURAVAJHALA, P.; KISHOR, P.K.
658 Toxicity and tolerance of aluminium in plants: tailoring plants to suit to acid soils. **Biometals**, v. 29, n.
659 1, p. 187-210, 2016.
- 660 SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E.; RUBIO-WILHELMI, M.; CERVILLA, L.M.; BLASCO, B.; RIOS, J.J.;
661 ROSALES, M. A.; ROMERO, L.; RUIZ, J.M. Genotypic differences in some physiological parameters
662 symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. **Plant Science**, v. 178, n. 1,
663 p. 30-40, 2010.
- 664 SHABNAM, N.; KIM, H. Non-toxicity of nano alumina: A case on mung bean seedlings. **Ecotoxicology**
665 **and Environmental Safety**, v. 165, n.1, p. 423-433, 2018.
- 666 SILAMBARASAN, S.; LOGESWARI, P.; CORNEJO, P.; ABRAHAM, J.; VALENTINE, A. Simultaneous
667 mitigation of aluminum, salinity and drought stress in *Lactuca sativa* growth via formulated plant growth
668 promoting *Rhodotorula mucilaginosa* CAM. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, n. 1, p.
669 63-72, 2019.
- 670 SILVA, E.N.; VIEIRA, S.A.; RIBEIRO, R.V.; PONTE, L.F.A.; SILVA, S.L.F.; SILVEIRA, J.A.G. contrasting
671 physiological responses of *Jatropha curcas* plants to single and combined stresses of salinity and heat.
672 **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 1, p. 159-169, 2013.
- 673 SINGH, S.K.; KAKANI, V.G.; SURABHI, G.K.; REDDY, K.R. Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.)
674 genotypes response to multiple abiotic stresses. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:**
675 **Biology**, v. 100, n. 3, p. 135-146, 2010.
- 676 SINGH, S.; TRIPATHI, D.K.; SINGH, S.; SHARMA, S.; DUBEY, N.K.; CHAUHAN, D.K.; VACULÍK, M.
677 Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. **Environmental and**
678 **Experimental Botany**, v. 137, n.1, p. 177-193, 2017.
- 679 SOUSA, A.; SALEH, A.M.; HABEEB, T.H.; HASSAN, Y.M.; ZRIEQ, R.; WADAAN, M.A.; HOZZEIN,
680 W.N.; SELIM, S.; MATOS, M.; ABDELGAWAD, H. Silicon dioxide nanoparticles ameliorate the
681 phytotoxic hazards of aluminum in maize grown on acidic soil. **Science of the Total Environment**, v.
682 693, 133636, 2019.
- 683 SUZUKI, N., BASSIL, E., HAMILTON, J. S., INUPAKUTIKA, M. A., ZANDALINAS, S. I., TRIPATHY, D.;
684 LUO, Y.; DION, E.; FUKUI, G.; KUMAZAKI, A.; NAKANO, R.; RIVERO, R.M.; VERBECK, G.F.; AZAD,
685 R.K.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. ABA is required for plant acclimation to a combination of salt and
686 heat stress. **PloS One**, v. 11, n. 1, e0147625, 2016.

- 687 SZYMAŃSKA, R.; ŚLESIAK, I.; ORZECZOWSKA, A.; KRUK, J. Physiological and biochemical
688 responses to high light and temperature stress in plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.
689 139, n. 1, p. 165-177, 2017.
- 690 TORABIAN, S.; FARHANGI-ABRIZ, S.; RATHJEN, J. Biochar and lignite affect H⁺-ATPase and H⁺-
691 PPase activities in root tonoplast and nutrient contents of mung bean under salt stress. **Plant**
692 **Physiology and Biochemistry**, v. 129, n. 1, p. 141-149, 2018.
- 693 VIEIRA, R.F.; OLIVEIRA, V.R.; VIEIRA, C. Cultivo do feijão-mungo-verde no verão em Viçosa e em
694 Prudente de Morais. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 37-43, 2003.
- 695 VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and
696 resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 129-143, 2005.
- 697 XU, L.M.; CHAN, L.; CUI, B.M.; NING, W.; ZHUO, Z.; ZHOU, L.N.; HUANG, K.F.; DING, J.Z.; DU, H.M.;
698 JIANG, W.; ZHANG, S.Z. Transcriptomic responses to aluminum (Al) stress in maize. **Journal of**
699 **Integrative Agriculture**, v. 17, n. 9, p. 1946-1958, 2018.
- 700 WAQAS, M.A.; KAYA, C.; RIAZ, A.; LI, Y.E. Potential mechanisms of abiotic stress tolerance in crop
701 plants induced by thiourea. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n.1, p. 1336, 2019.
- 702 WANG, X.; LI, Y.; LU, H.; WANG, S. Combined effects of elevated temperature and CO₂ concentration
703 on Cd and Zn accumulation dynamics in *Triticum aestivum* L. **Journal of Environmental Sciences**, v.
704 47, n. 1, p. 109-119, 2016.
- 705 YOU, J.; CHAN, Z. ROS Regulation during abiotic stress responses in crop plants. **Frontiers in Plant**
706 **Science**, v. 6, p. 1092, 2015.
- 707 ZANDALINAS, S.I.; MITTLER, R.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A. Plant
708 adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 162, n.
709 1, p. 2-12, 2018.
- 710 ZHANG, X.; LIU, Y.; LIU, Q.; ZONG, B.; YUAN, X.; SUN, H.; WANG, J.; ZANG, L.; MA, Z.; LIU, H.; ELE,
711 S.; GHU, X.; XU, Y. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced photosynthesis and antioxidant
712 system of tall fescue seedlings response to low-light stress. **Environmental and Experimental Botany**,
713 v. 155, n. 1, p. 226-238, 2018.
- 714 ZHANG, X.; SHANG, P.; QIN, F.; ZHOU, Q.; GAO, B.; HUANG, H.; YANG, H.; SHI, H.; YU, L. Chemical
715 composition and antioxidative and anti-inflammatory properties of tem commercial mung bean samples.
716 **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 171-178, 2013.
- 717 ZHANG, X.L.; JIA, X.F.; YU, B.; GAO, Y.; BAI, J.G. Exogenous hydrogen peroxide influences antioxidant
718 enzyme activity and lipid peroxidation in cucumber leaves at low light. **Scientia Horticulturae**, v. 129,
719 n. 4, p. 656-662, 2011.
- 720 ZHENG, S.J. Crop production on acidic soils: overcoming aluminium toxicity and phosphorus deficiency.
721 **Annals of Botany**, v. 106, n. 1, p. 183-184, 2010.
- 722 ZHOU, R.; YU, X.; LI, X.; SANTOS, T.M.; ROSENQVIST, E.; OTTOSEN, C.O. Combined high light and
723 heat stress induced complex response in tomato with better leaf cooling after heat priming. **Plant**
724 **Physiology and Biochemistry**, v. 151, n. 1, p. 1-9. 2020.
- 725

CAPÍTULO I

1

2

3 **Respostas fisiológicas de duas espécies de *Vigna* submetidas ao estresse**
4 **salino durante o estágio de crescimento vegetativo**

5

6 (Comparative physiological responses of two *Vigna* species submitted to salt stress
7 during vegetative growth stage)

8

9

10

RESUMO

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

A salinidade afeta o crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas, gerando muitos prejuízos ao redor do globo terrestre, e devido as mudanças climáticas, preveem que esse cenário ainda pode piorar. O presente estudo teve por objetivo avaliar as alterações vegetativas e metabólicas de *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) e *V. radiata* (feijão-mungo) em resposta a salinidade. Em casa de vegetação, as plantas de feijão-caupi e feijão-mungo foram submetidas a ausência (controle) ou presença de 25, 50, 75, 100 e 150 mM de cloreto de sódio (NaCl) por 11 dias. A salinidade influenciou negativamente o crescimento (conteúdo relativo de água, taxa de crescimento absoluto, diâmetro do caule, comprimento e volume das raízes, biomassa fresca da parte aérea e das raízes), produção de biomassa, a concentração das clorofilas (*a* e *b*) e a relação clorofila total/carotenoides, enquanto que a relação clorofila *a/b* e as concentrações de carotenoides e antocianinas foram aumentadas. O conteúdo relativo de água foi reduzido nas duas espécies vegetais, sendo esta redução mais acentuada no feijão-caupi. O nível de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e glutathione reduzida foram aumentados no feijão-caupi e feijão-mungo. Em resposta à salinidade, os níveis de ascorbato reduzido foram aumentados nas plantas de feijão-caupi e reduzidos nas plantas de feijão-mungo. Enquanto a atividade da dismutase do superóxido (SOD) foi linearmente reduzida nas plantas de feijão-caupi, as plantas de feijão-mungo exibiram incremento na atividade de SOD até 100 mM de NaCl e redução quando estas foram expostas à 150 mM de NaCl. Quando as plantas foram expostas à salinidade, observa-se que a atividade de peroxidase de fenóis foi aumentada e este aumento foi numericamente maior no feijão-caupi. As plantas de feijão-caupi e feijão-mungo mostraram diferenças metabólicas em resposta à salinidade, principalmente no que tange as respostas antioxidativas. Baseado nas maiores variações na peroxidação lipídica as plantas de feijão-mungo são mais sensíveis ao estresse salino resultando em maiores danos bioquímicos, celulares e no crescimento.

Palavras chave: feijão-caupi, feijão-mungo, salinidade, antioxidantes.

ABSTRACT

42

43

44 Salinity affects the growth, development and crop productivity, generating many losses
45 around the globe, and due to climate change, they predict that this scenario may still
46 get worse. The present study aimed to evaluate the vegetative and metabolic changes
47 of *Vigna unguiculata* (cowpea) and *V. radiata* (mung bean) in response to salinity. In a
48 greenhouse, cowpea and mung bean plants were subjected to the absence (control)
49 or presence of 25, 50, 75, 100 and 150 mM sodium chloride (NaCl) for 11 days. Salinity
50 negatively influenced growth (relative water content, absolute growth rate, stem
51 diameter, length and volume of roots, fresh shoot and root biomass), biomass
52 production, chlorophyll (a and b) concentration and total chlorophyll/carotenoids ratio,
53 while the chlorophyll a/b ratio and the concentrations of carotenoids and anthocyanins
54 were increased. The relative water content was reduced in the two plant species, this
55 reduction being more accentuated in cowpea. The level of hydrogen peroxide, lipid
56 peroxidation and reduced glutathione were increased in cowpea and mung bean. In
57 response to salinity, the levels of reduced ascorbate were increased in cowpea plants
58 and reduced in mung bean plants. While the activity of superoxide dismutase (SOD)
59 was linearly reduced in cowpea plants, mung bean plants exhibited an increase in SOD
60 activity up to 100 mM NaCl and a reduction when they were exposed to 150 mM NaCl.
61 When the plants were exposed to salinity, it is observed that the activity of phenols
62 peroxidase was increased and this increase was numerically greater in cowpea. The
63 cowpea and mung bean plants showed metabolic differences in response to salinity,
64 especially with regard to antioxidative responses. Based on the greatest variations in
65 lipid peroxidation, mung bean plants are more sensitive to salt stress resulting in
66 greater biochemical, cellular and growth damage.

67

68 **Keywords:** cowpea, mung bean, salinity, antioxidants.

69 1. INTRODUÇÃO

70 As espécies vegetais estão sujeitas a diversos estresses ambientais, dentre
71 estes a salinidade. O estresse salino é um fator abiótico que impõe limitações severas
72 ao crescimento e desenvolvimento de várias culturas de importância econômica,
73 causando grandes prejuízos em todo o planeta, podendo ser mais drásticos quando
74 se considera as mudanças climáticas (DIAZ-BAENA et al., 2019). O excesso de sais
75 no solo provoca redução do crescimento vegetativo, declínio da expansão foliar e
76 diminuição na biomassa vegetal e incapacita a produção agrícola (ABIALLA et al., 2018;
77 MUNNS et al., 2020). As mudanças induzidas pelo estresse salino influenciam
78 diretamente no comportamento estomático e, portanto, reduzem a taxa de
79 transpiração e fotossíntese (MUNNS; GILLIHAM, 2015). A salinidade interfere
80 negativamente na translocação dos fotoassimilados e, conseqüentemente, a
81 quantidade e qualidade do produto final são afetados, principalmente em espécies
82 graníferas.

83 A salinidade induz variados efeitos nas plantas que podem ser subdivididos em
84 resultantes dos estresses osmótico ou iônico (DEINLEIN et al., 2014). Ainda segundo
85 estes autores, o estresse osmótico induz redução no potencial hídrico que provoca
86 diminuição na captação de água pelas raízes e perda de turgor das folhas.
87 Adicionalmente, ocorre inativação ou redução na funcionalidade das proteínas, perda
88 de fluído do vacúolo, desarranjo da integridade estrutural das células por conta da
89 desidratação e murchamento da planta (LITALIEN; ZEEB, 2020). O estresse iônico é
90 induzido pelo excesso de sais, principalmente do íon sódio (Na^+), que provoca
91 toxicidade iônica que interfere em importantes processos fisiológicos das espécies
92 vegetais, com destaque para a fotossíntese (ORLOVSKY et al., 2016). A salinidade
93 interfere no transporte fotossintético de elétrons, na atividade da Rubisco e na
94 captação e assimilação de CO_2 (ACOSTA-MOTOS et al., 2017; FOYER, 2018).

95 A salinidade pode provocar aumento da produção de espécies reativas de
96 oxigênio (EROs), com destaque para o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de
97 hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}) (FOYER, 2018). O estresse oxidativo,
98 desequilíbrio entre a produção e inativação de EROs, é um estresse secundário que
99 se estabelece nas plantas expostas ao estresse salino (MITTLER, 2017). O estresse
100 oxidativo provoca danos aos carboidratos, lipídios, proteínas e ácido nucléicos bem
101 como aos processos respiratórios e fotossintéticos e desencadeia alterações na
102 atividade de enzimas e nos níveis de compostos antioxidantes (CHICONATO et al.,

103 2019). Para controlar os níveis de EROs e evitar o estresse oxidativo, as plantas
104 sintetizam compostos antioxidantes de baixo peso molecular e ativam enzimas
105 antioxidantes que aceleram a degradação das EROs (AHMED et al., 2015; NOCTOR;
106 FOYER, 2017).

107 A salinidade é um estresse abiótico frequente em regiões áridas e semiáridas,
108 sendo acentuado devido as condições climáticas, características químicas e físicas
109 do solo e ações antrópicas presentes nestas regiões (PEDROTTI et al., 2015). Nas
110 regiões áridas e semiáridas do Nordeste brasileiro, as leguminosas, em especial os
111 feijões, têm grande importância socioeconômica, alimentar e ambiental. Os feijões
112 secos dos gêneros *Phaseolus* e *Vigna*, com destaque para o feijão-caupi (*Vigna*
113 *unguiculata* (L.) Walp.), feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e feijão-mungo (*V.*
114 *radiata* (L.) Wilczek), são *pulses* resistentes a terras áridas e temperaturas extremas
115 (JAVALOYES et al., 2016). O estudo das respostas destas plantas em condições
116 ambientalmente adversas pode contribuir para a manutenção da produção agrícola
117 em um cenário de mudanças climáticas (FAO, 2016). Neste contexto, o presente
118 estudo teve por objetivo avaliar as alterações vegetativas e metabólicas de feijão-
119 caupi e feijão-mungo em resposta a salinidade.

120

121 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

122 **2.1 Delineamento experimental**

123 O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado em
124 fatorial 6 x 2, sendo seis tratamentos (0; 25; 50; 75; 100; e 150 mM de cloreto de sódio)
125 baseados em trabalhos (PEREIRA NETO; BONIFACIO, 2019) e duas espécies
126 vegetais (feijão-caupi e feijão-mungo), com três repetições. A unidade experimental
127 foi constituída de duas plantas por vaso.

128

129 **2.2 Instalação e condução do experimento**

130 O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de
131 Biologia localizada no Centro de Ciências da Natureza (UFPI; Teresina/PI). Sementes
132 de feijão-caupi e feijão-mungo foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por
133 60 s, seguidas de tríplex lavagem, e então semeadas em vasos contendo 3,5 kg de
134 areia lavada. Após a germinação, as plantas foram regadas de forma alternada com
135 água destilada e solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) diluída 1/2. Após a
136 emissão do primeiro trifólio definitivo, aplicou-se a solução nutritiva de Hoagland e

137 Arnon (1950) completa até o momento da diferenciação dos tratamentos. Após
138 apresentarem o terceiro trifólio, as plantas de feijão-caupi e feijão-mungo foram
139 regadas intercalados diariamente com água ou solução nutritiva, ambos em plantas
140 sem NaCl (controle) e com 25, 50, 75, 100 e 150 mM de NaCl (a depender do
141 tratamento). O dia da coleta se deu com a manifestação dos sintomas visuais
142 (murchamento e clorose das folhas em plantas sob estresse com 150 mM NaCl) em
143 40 dias após a semeadura.

144 Durante o período experimental, altura das plantas foi mensurada a cada cinco
145 dias e os dados utilizados para o cálculo da taxa de crescimento absoluto (TCA). Para
146 calcular a TCA, utilizou-se a fórmula $TCA = (AF - AI) / T$, onde AF e AI é a altura final
147 e inicial, respectivamente, e T indica o tempo entre as observações (BENINCASA,
148 2003). Na ocasião da coleta, mensurou-se o comprimento e volume das raízes, o
149 conteúdo relativo de água, massa fresca da parte aérea e das raízes. (BARRS;
150 WEATHERLEY, 1962; BENINCASA, 2003). Amostras foliares frescas (terceiro trifólio)
151 foram coletadas e congeladas em freezer -20 °C e posteriormente utilizadas na
152 determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos e de compostos e
153 enzimas relacionadas às respostas oxidativas.

154

155 **2.3 Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos**

156 Para mensurar a concentração das clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides, segmentos
157 foliares foram pesados e macerados em presença de etanol 95% (v/v). Em seguida, o
158 sobrenadante foi lido a 649, 664 e 470 nm. Com base nas leituras, calculou-se a
159 concentração das clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides utilizando as equações propostas
160 por Lichtenthal e Wellburn (1983) e os dados foram expressos em mg g⁻¹ MF (massa
161 fresca). A relação clorofila *a*:*b* foi calculada pela razão entre as concentrações de
162 clorofilas *a* e *b*. Para a mensuração das antocianinas (GITELSON et al., 2001),
163 amostras foliares foram pesadas e maceradas na presença de metanol (em HCl 0,1%)
164 (v/v) e então lidas em espectrofotômetro a 530 nm. A concentração das antocianinas
165 foi calculada com base em coeficiente de extinção molar de 26,9 mM⁻¹ cm⁻¹ e os
166 resultados expressos em mg g⁻¹ MF.

167

168 **2.4 Compostos e enzimas relacionadas às respostas oxidativas**

169 Segmentos foliares foram macerados na presença de ácido tricloroacético
170 (TCA) 5% (p/v) e a mistura foi centrifugada a 10.000 g (15 min a 4 °C). Em seguida, o

171 sobrenadante (extrato não-enzimático) foi recolhido e utilizado na determinação do
172 conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxidação lipídica e formas reduzidas
173 do ascorbato (ASA) e glutathiona (GSH). Para determinação da atividade das enzimas
174 SOD e peroxidase de fenóis (POX) foi preparado o extrato enzimático. Segmentos
175 foliares foram macerados na presença de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH
176 7,0) adicionado de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1,0 mM e ácido
177 ascórbico 1,0 mM. Após a maceração, a mistura foi centrifugada a 14.000g (4 °C) por
178 25 min e o sobrenadante (extrato enzimático) foi coletado. As metodologias utilizadas
179 estão descritas a seguir.

180 Para a quantificação do conteúdo de H_2O_2 (BRENNAN; FRENKELL, 1977),
181 alíquotas do extrato não-enzimático foram misturadas com $FeSO_4$ 100 μM , $(NH_4)_2SO_4$
182 250 μM , H_2SO_4 25 mM, alaranjado de xilenol 100 μM e sorbitol 99 mM. Após repouso
183 a 25 °C por 30 min, a mistura foi lida a 560 nm. A concentração do H_2O_2 foi calculada
184 com base na curva-padrão e os resultados expressos em $\mu mol H_2O_2 g^{-1} MF$. Na
185 determinação da peroxidação lipídica (HEATH; PACKER, 1968) com modificações,
186 alíquotas do extrato não-enzimático foram misturadas com TCA 20% (p/v) e ácido
187 tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) e então aquecidos em banho-maria a 100 °C (1 h).
188 Após este procedimento, os tubos foram resfriados e lidos a 532 e 660 nm em
189 espectrofotômetro. A peroxidação lipídica foi calculada com base no coeficiente de
190 extinção molar de 155,0 $mM^{-1} cm^{-1}$ e os resultados expressos em $\eta mol TBA-MDA$
191 (malonaldeído) $g^{-1} MF$.

192 Na determinação da concentração do ASA (KAMPFENKEL et al., 1995),
193 alíquotas do extrato não-enzimático foram misturadas com tampão fosfato de potássio
194 200 mM (pH 7,4), TCA 10% (p/v) e biperidil 4% (p/v). Após agitação em vórtex,
195 adicionou-se $FeCl_3$ 3% (p/v) e H_2PO_4 45% (v/v). Após 15 min a 42 °C, a mistura foi
196 lida a 525 nm no espectrofotômetro. A concentração do ASA foi calculada com base
197 na curva-padrão e os resultados expressos em $\mu mol ASA g^{-1} MF$. Para a mensuração
198 dos níveis da GSH baseou na metodologia de Griffith (1980) com modificações.
199 Alíquotas do extrato não-enzimático foram colocadas em tubos de ensaio e então
200 adicionou-se tampão fosfato de potássio 150 mM (pH 7,6) e 5,5-ditio-bis-2-ácido
201 nitobenzóico (DTNB) 6,0 mM. Os tubos foram levados ao banho-maria a 30 °C (10
202 min) e em seguida a mistura foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. A concentração
203 da GSH foi calculada com base na curva-padrão e os resultados expressos em μmol
204 GSH $g^{-1} MF$.

205 Para determinação da enzima SOD (BEAUCHAMP; FRIDOVICH 1971),
206 alíquotas do extrato foram transferidas para tubos escurecidos e misturadas com
207 tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0) contendo EDTA 0,1 mM e metionina 13
208 mM, azul de nitrotetrazólio (NBT) 750 μ M e riboflavina 1,0 mM. Em seguida, a mistura
209 foi exposta a luz utilizando lâmpadas fluorescentes de 30 watts por 5 min. Após o
210 desligamento da luz, os tubos foram escurecidos e então a mistura foi lida a 560 nm.
211 Uma unidade de atividade (UA) da SOD foi definida como a quantidade da enzima
212 necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).
213 Após calculados, os dados foram expressos em UA mg proteína⁻¹ min⁻¹. Para a
214 quantificação da atividade da POX (KAR; MISHRA, 1976), alíquotas do extrato
215 enzimático foram misturadas com tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8) contendo
216 pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM e, após 1 min, adicionou-se H₂SO₄ 0,5% (v/v) para
217 parar a reação. Em seguida, a mistura foi lida a 420 nm. A atividade da POX foi
218 calculada com base no coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ e os
219 resultados expressos em μ mol pirogalol mg proteína⁻¹ min⁻¹.

220

221 **2.5 Análise estatística**

222 Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) precedido pelo
223 teste F, ambos a 5% de probabilidade. O teste Ducan a 5% foi utilizado para testar a
224 diferença entre os níveis de salinidade dentro da mesma espécie vegetal e para
225 comparar as duas espécies na mesma concentração de NaCl. Após transformados,
226 os dados foram submetidos a análise de componentes principais e ao escalonamento
227 multidimensional não-métrico. Para validação dos agrupamentos formados, os dados
228 foram submetidos a análise multivariada permutacional de variância (PERMANOVA).
229 As análises estatísticas univariadas foram realizadas utilizando o software R Studio
230 1.2.5 com o pacote easyanova, enquanto as análises estatísticas multivariadas foram
231 realizadas no software Past 4.3.

232

233 **3. RESULTADOS**

234 **3.1 Análise geral dos dados**

235 De acordo com a análise de variância (ANOVA), nota-se que houve efeito
236 significativo dos níveis de salinidade em todos os parâmetros avaliados (Tabela 1) e
237 apenas o comprimento das raízes e a atividade da enzima superóxido dismutase não
238 foram significativos quando o fator 'espécies' foi analisado. A interação entre os

239 fatores 'salinidade' e 'espécies' foi significativo em todas as variáveis, exceto para o
 240 conteúdo relativo de água, massa fresca das raízes e total. O coeficiente de variação
 241 dos dados analisados variou entre 3 e 10%.

242

243 **Tabela 1.** Análise de variância (quadrado médio) das variáveis analisadas após a
 244 exposição das espécies de feijão à salinidade.

245

Varáveis analisadas	Fonte de Variação (Quadrado médio)			
	Salinidade (S)	Espécies (E)	S x E	CV (%)
Taxa de crescimento absoluto	2024 *	6697 *	253,7 *	8,15
Comprimento das raízes	204,5 *	3,33 ns	9,33 *	4,16
Volume das raízes	4568 *	1122 *	561,5 *	6,67
Conteúdo relativo de água	493,2 *	834,9 *	17,08 ns	4,39
Massa fresca da parte aérea	0,98 *	0,28 *	0,09 *	5,74
Massa fresca das raízes	1,57 *	1,46 *	0,02 ns	5,82
Clorofila <i>a</i>	0,12 *	0,14 *	0,003*	4,77
Clorofila <i>b</i>	0,03 *	0,14 *	0,01 *	8,08
Carotenoides	0,08 *	0,06 *	0,01 *	6,24
Antocianinas	0,08 *	0,01 *	0,01*	5,07
Relação clorofila a:b	2,52 *	18,23 *	1,16 *	7,23
Peróxido de hidrogênio	0,69 *	0,41 *	0,18 *	4,56
Peroxidação lipídica	9529 *	12435 *	858,3 *	5,14
Ascorbato reduzido	0,15 *	22,97 *	0,94 *	7,86
Glutationa reduzida	3,86 *	4,87 *	0,26*	7,79
Dismutase do superóxido	0,26 *	0,01 ns	0,37 *	4,60
Peroxidase de fenóis	16,59 *	71,58 *	1,25 *	6,17
Graus de liberdade	5	1	5	-

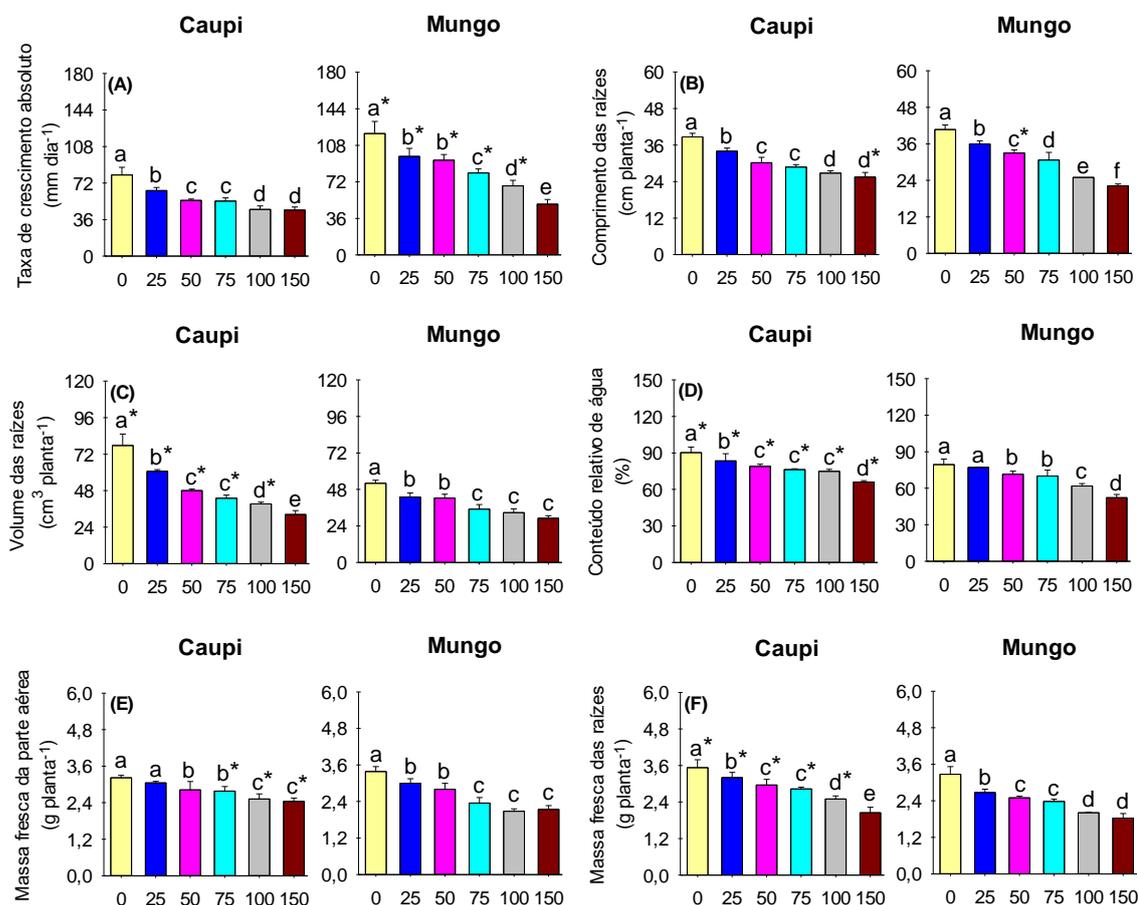
246 * = significativo a 5%; ns = não significativo; CV = coeficiente de variação. CLT = clorofila total. CAR =
 247 Carotenoides

248

249 3.2 Crescimento e pigmentos fotossintéticos

250 O crescimento (taxa de crescimento absoluto, comprimento e volume das
 251 raízes, conteúdo relativo de água) e produção de massa fresca (parte aérea e raízes)
 252 das plantas de feijão-caupi e feijão-mungo foram afetados negativamente pela
 253 salinidade apresentando diferença em relação as plantas não estressadas a partir da
 254 exposição a 25 mM de NaCl, com exceção do conteúdo relativo de água em plantas
 255 de feijão-mungo que foi reduzido partir de 50 mM NaCl (Figura 1). Quando expostas
 256 a 150 mM de NaCl, as plantas exibiram redução de até 58% nas variáveis analisadas,
 257 com destaque para a taxa de crescimento absoluto e o volume e massa fresca das
 258 raízes onde foram registrados os maiores decréscimos em resposta à salinidade

259 (Figura 1A, 1C e 1F). As plantas de feijão-mungo apresentam maior taxa de
 260 crescimento absoluto, enquanto as plantas de feijão-caupi exibiram maior volume das
 261 raízes, conteúdo relativo de água e massa fresca da parte aérea e raízes (Figura 1C,
 262 1D, 1E e 1F).

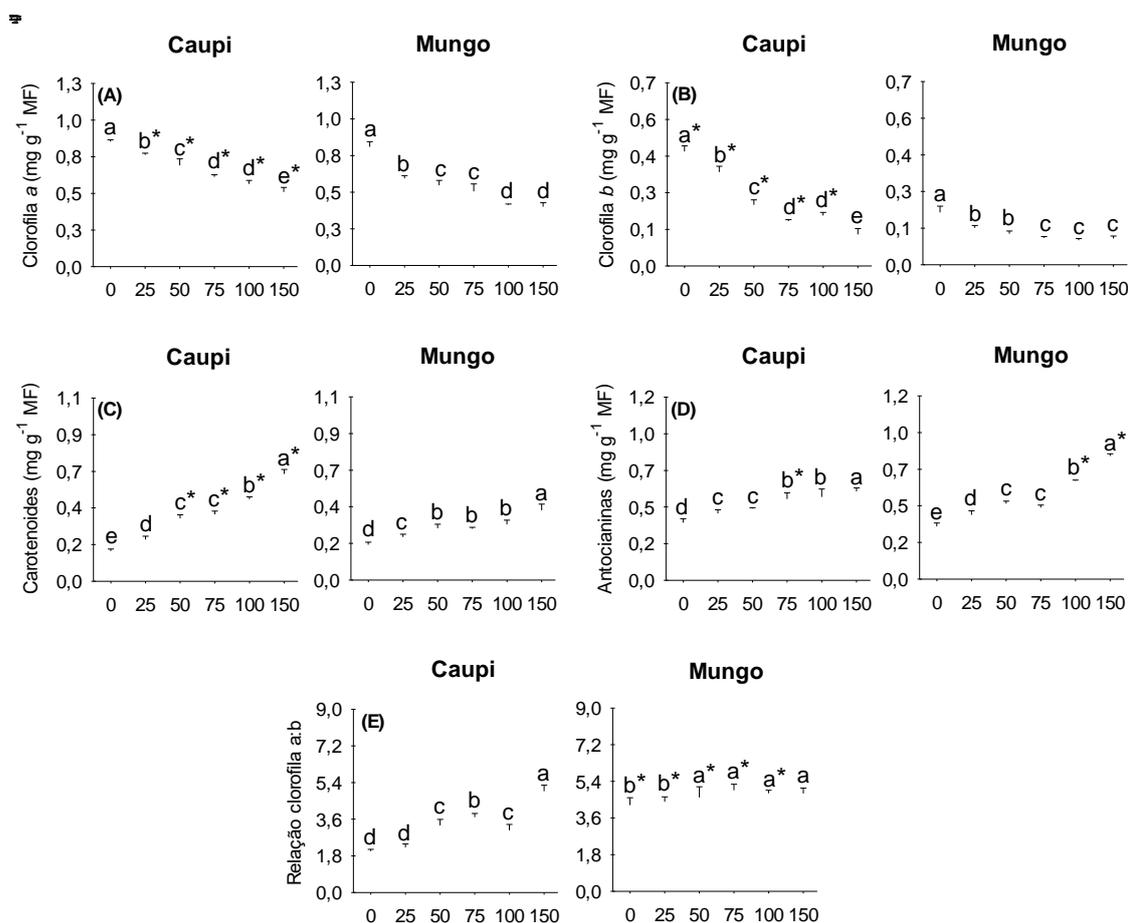


263

264 **Figura 1.** Taxa de crescimento absoluto (A), comprimento (B) e volume (C) das raízes, conteúdo
 265 relativo de água (D), massa fresca da parte aérea (E) e das raízes (F) de plantas de feijão-caupi e
 266 feijão-mungo expostas à salinidade (0 a 150 mM de NaCl). Letras minúsculas iguais indicam que não
 267 houve diferença significativa entre os níveis de salinidade, enquanto o asterisco (*) indica que houve
 268 diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de salinidade (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$).

269 Foram registradas alterações significativas nos pigmentos fotossintéticos de
 270 plantas de feijão-caupi e feijão-mungo em resposta à salinidade (Figura 2). Enquanto
 271 os níveis de clorofilas *a* e *b* foram reduzidos com a exposição das plantas à salinidade,
 272 a concentração de carotenoides e antocianinas foram incrementadas em resposta ao
 273 estresse salino (Figura 2A, 2B, 2C e 2D). A concentração de clorofilas *a* foi reduzida
 274 em 45% nas duas espécies quando estas foram expostas à 150 mM de NaCl (Figura
 275 2A). Em contrapartida, o nível de carotenoides nas plantas de feijão-caupi e feijão-
 276 mungo expostas à 150 mM de NaCl foi 72% e 98% superior ao controle,
 277 respectivamente (Figura 2C). Nas plantas de feijão-mungo expostas à 150 mM de

278 NaCl, registrou-se aumento de 135% no nível de antocianinas em relação ao controle
 279 (Figura 2D). A relação clorofila *a:b* aumentou em resposta à salinidade, sendo este
 280 aumento mais acentuado no feijão-caupi. Quando expostas à 150 mM de NaCl, as
 281 plantas de feijão-caupi e feijão-mungo exibiram valores estatisticamente similares da
 282 relação clorofila *a:b* (Figura 2E).



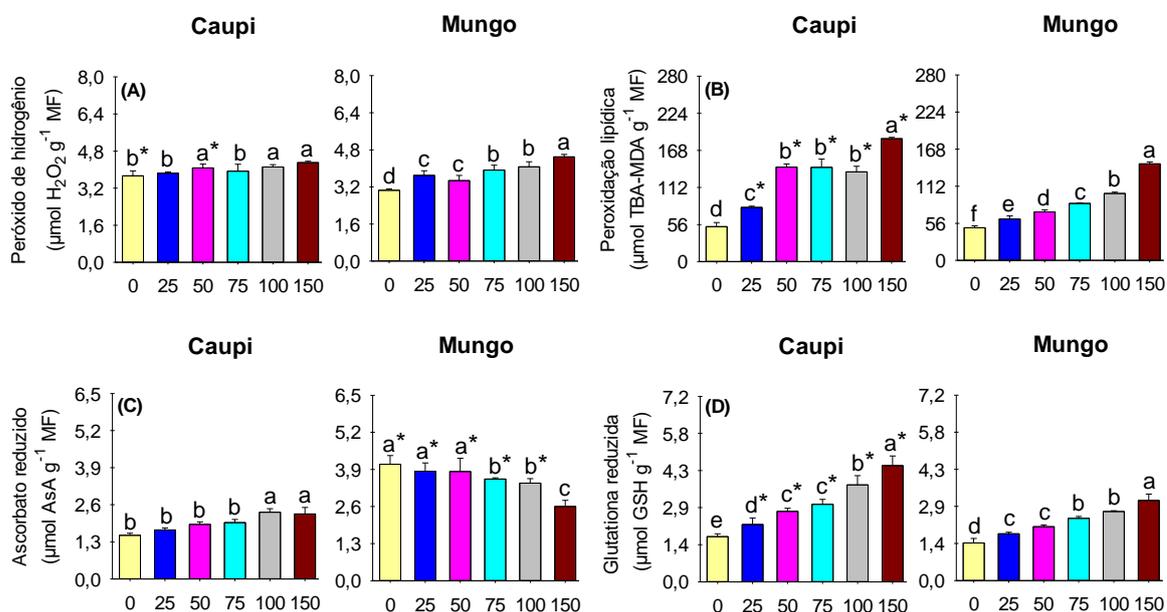
283

284 **Figura 2.** Teores de clorofila *a* (A) e *b* (B), carotenoides (C), antocianinas (D) e relação clorofila *a:b* (E)
 285 de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas à salinidade (0 a 150 mM de NaCl). Letras
 286 minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de salinidade, enquanto
 287 o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de salinidade
 288 (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$).
 289

290 3.3 Respostas do sistema redox

291 Houve aumento linear e significativo na concentração de H₂O₂ e na peroxidação
 292 lipídica nas duas espécies vegetais em resposta aos níveis crescentes de salinidade
 293 (Figura 3A e 3B). Em relação ao controle, as plantas de feijão-caupi e feijão-mungo
 294 apresentaram aumento de 15% e 47% na concentração de H₂O₂ quando expostas à
 295 150 mM de NaCl, respectivamente. As plantas de feijão-caupi e feijão-mungo diferiram
 296 entre si para a concentração de H₂O₂ apenas no controle e quando expostas à 50 mM

297 de NaCl (Figura 3A). A peroxidação lipídica foi maior nas plantas de feijão-caupi que
 298 no feijão-mungo, principalmente quando estas foram expostas à 50 mM de NaCl (49%
 299 de diferença entre as duas espécies vegetais) (Figura 3B).



300

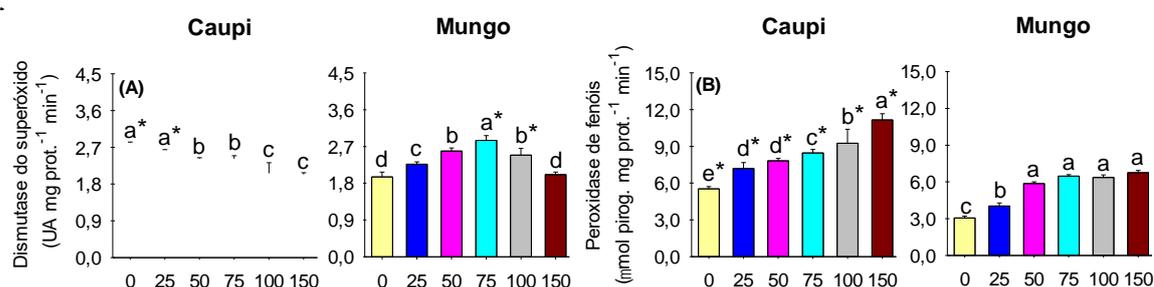
301 **Figura 3.** Teores de peróxido de hidrogênio (A), peroxidação lipídica (B), ascorbato (C) e glutatona (D)
 302 reduzidos de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas à salinidade (0 a 150 mM de NaCl). Letras
 303 minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de salinidade, enquanto
 304 o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de salinidade
 305 (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$).

306

307 O ascorbato reduzido foi aumentado nas plantas de feijão-caupi e os valores
 308 máximos foram observados nas plantas expostas a 100 mM de NaCl (Figura 3C). Já
 309 as plantas de feijão-mungo, exibiram decréscimo linear nos níveis de ascorbato
 310 reduzido, sendo registrada redução máxima de 36% nas plantas expostas a 150 mM
 311 NaCl (Figura 3C). As plantas de feijão-mungo apresentaram concentração de
 312 ascorbato reduzido superior ao feijão-caupi em todos os níveis de salinidade, exceto
 313 quando estas foram expostas a 150 mM de NaCl. A glutatona reduzida aumentou
 314 significativamente em plantas de feijão-caupi e feijão-mungo em resposta ao estresse
 315 salino, sendo este aumento registrado já a partir de 25 mM de NaCl (28 a 140% em
 316 relação ao controle) (Figura 3D). Exceto no controle, os valores de glutatona reduzida
 317 registrados nas plantas de feijão-caupi foram maiores que o feijão-mungo (Figura 3D).

318 A atividade da enzima SOD foi diferentemente alterada em resposta à
 319 salinidade nas duas espécies vegetais (Figura 4A). Houve redução entre 6 a 27% na
 320 atividade da SOD nas plantas de feijão-caupi em resposta à salinidade. Em
 321 contrapartida, a atividade da SOD foi aumentada significativamente nas plantas de

322 feijão-mungo quando estas foram submetidas à salinidade até 75 mM de NaCl, sendo
 323 então reduzida com a exposição a 100 e 150 mM NaCl. As plantas de feijão-mungo
 324 apresentaram atividade de SOD superior ao feijão-caupi quando expostas a 75 e 100
 325 mM de NaCl (Figura 4A). Nota-se aumento na atividade da enzima POX nas duas
 326 espécies vegetais com a exposição à salinidade, sendo os maiores valores registrados
 327 nas plantas de feijão-caupi (Figura 4B). A atividade de POX foi aumentada em 101%
 328 e 121% nas plantas de feijão-caupi e feijão-mungo, respectivamente, quando
 329 expostas à 150 mM de NaCl em relação ao controle (Figura 4B).



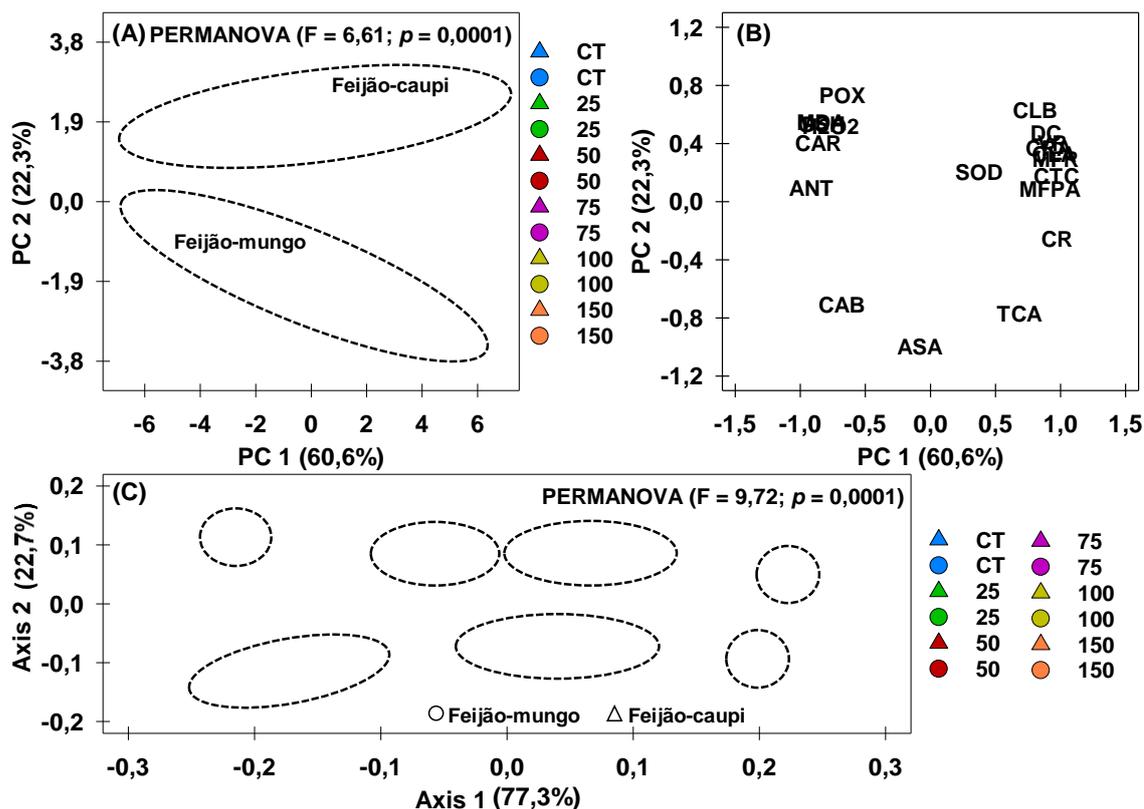
330

331 **Figura 4.** Atividades de dismutase de superóxido (A) e peroxidase de fenóis (B) de plantas de feijão-
 332 caupi e feijão-mungo expostas à salinidade (0 a 150 mM de NaCl). Letras minúsculas iguais indicam
 333 que não houve diferença significativa entre os níveis de salinidade, enquanto o asterisco (*) indica que
 334 houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de salinidade (Teste Scott-Knott; p <
 335 0,05).

336

337 3.4 Análise Multivariada

338 Os dados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) e ao
 339 escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) visando identificar as
 340 similaridades e dissimilaridades entre os tratamentos empregados. A PCA gerou dois
 341 componentes principais que explicaram 82,9% da variância total dos dados e foi capaz
 342 de separar as duas espécies vegetais – mesmo havendo uma aproximação das
 343 elipses no estresse severo a 150 mM NaCl (Figura 5A). O primeiro e segundo
 344 componentes (PC1 e PC2) da PCA representaram 60,6% e 22,3% da variação dos
 345 dados, respectivamente (Figura 5B). A PC1 foi caracterizada positivamente pelas
 346 variáveis de crescimento (conteúdo relativo de água, comprimento e volume das
 347 raízes e massa fresca da parte aérea e raízes) e clorofilas *a* e *b* (*loadings* > 0,76) e
 348 negativamente pela peroxidação lipídica e os níveis dos carotenoides, antocianinas e
 349 glutathiona reduzida (*loadings* > -0,79) (Figura 5B). No PC2, nota-se maior influência
 350 da taxa de crescimento absoluto (*loading* = -0,73), ascorbato reduzido (*loading* = -
 351 0,96) e peroxidase de fenóis (*loading* = 0,69).



352
353
354
355
356

Figura 5. Análise de componentes principais (A e B) e escalonamento multidimensional não-métrico (C) dos dados obtidos após a exposição de plantas de feijão-caupi (\triangle) e feijão-mungo (\circ) à salinidade (0 a 150 mM de NaCl). As elipses mostram os grupos formados e confirmados pela análise multivariada permutacional de variância (PERMANOVA).

357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367

Analisando o NMDS, nota-se que as duas espécies vegetais apresentaram diferença na resposta aos tratamentos aplicados (Figura 5C). Nota-se a formação de três agrupamentos para os dados das plantas de feijão-caupi, sendo controle e plantas expostas a 25 mM de NaCl no grupo 1, plantas expostas a 50, 75 e 100 mM de NaCl no grupo 2 e plantas expostas a 150 de NaCl no grupo 3. Já para o feijão-mungo, os tratamentos foram separados em quatro grupos: grupo 1 formado pelo controle; grupo 2 com plantas expostas a 25 e 50 mM de NaCl; grupo 3 com plantas expostas a 75 e 100 mM NaCl; e o quarto grupo formado pelas plantas expostas a 150 mM NaCl. De modo geral, a exposição das plantas a 150 mM NaCl induziu respostas diferentes dos demais tratamentos nas duas espécies vegetais, sendo considerado como estresse severo uma vez que causou mais danos as plantas que os demais tratamentos.

368 4. DISCUSSÃO

369
370
371

As plantas de feijão-caupi e feijão-mungo apresentaram redução linear e significativa no crescimento, conteúdo relativo de água e biomassa em resposta aos níveis crescentes de salinidade. A perda de água em resposta à salinidade é

372 possivelmente resultado da alteração nos potenciais osmótico e hídrico e do
373 fechamento estomático visando a redução na transpiração (ORLOVSKY et al., 2016).
374 Estas respostas ajudam a prevenir a entrada de íons sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-) para
375 os tecidos vegetais e, portanto, evitam os estresses iônico, osmótico e oxidativo
376 (MUNNS et al., 2020). O decréscimo na biomassa, tanto nas raízes como na parte
377 aérea, é reflexo da redução da capacidade de absorção de nutrientes e água,
378 produção de fotoassimilados e aporte de carbono, que afetará posteriormente a
379 capacidade produtiva das culturas (ABDELGAWAD et al., 2016; RADY et al., 2019).

380 Respostas similares ao presente estudo foram registrados por Rady et al.
381 (2019) e Talaat (2019) em plantas de feijão-comum expostas à salinidade em
382 diferentes níveis e, portanto, corroboram com a redução de crescimento encontrada
383 neste trabalho. Enquanto Rady et al. (2019) registraram redução dos parâmetros
384 fisiológicos e de crescimento em plantas de feijão-comum expostas ao estresse salino
385 severo, Talaat (2019) registrou redução gradual nas concentrações de pigmentos
386 fotossintéticos e nos parâmetros de crescimento e rendimento de plantas de feijão-
387 comum submetidas à níveis crescentes de salinidade.

388 As clorofilas (a e b) são pigmentos presentes no complexo antena e centro de
389 reação e responsáveis pela etapa fotoquímica da fotossíntese. A redução na
390 concentração destes pigmentos provocada pela salinidade resulta, principalmente, da
391 degradação causada pela presença em excesso de íons tóxicos Na^+ e Cl^- e isto afeta
392 diretamente a fotossíntese e, portanto, a fixação de carbono (FLOWERS et al., 2015;
393 LI et al., 2015). A redução dos teores de clorofila *a* e *b* achados neste estudo são
394 corroborados por Talaat (2019) e Adhikari et al. (2020) quando avaliaram plantas de
395 feijão-comum e soja, respectivamente, sob salinidade.

396 Além das clorofilas, considerados os principais pigmentos fotossintéticos, os
397 níveis dos pigmentos acessórios (carotenoides e antocianinas) também foram
398 mensurados. O aumento na concentração de carotenoides e antocianinas registrado
399 neste estudo, possivelmente, relaciona-se com suas funções nas células vegetais
400 uma vez que estes atuam como dissipadores de energia na forma de calor em
401 situações de estresses abióticos (VERHOEVEN et al., 2018). Vale ressaltar que as
402 variações na clorofila *b* estão relacionadas com os níveis de carotenoides nas plantas
403 de feijão-caupi sob estresse salino. Pois as plantas buscam compensação e equilíbrio
404 entre os pigmentos devido ao papel desenvolvido por esses pigmentos no processo
405 fotossintético na absorção de fótons e perda ou dissipação de energia na forma de

406 calor durante a transferência para que os centros de reação não sejam afetados
407 (BLANKENSHIP, 2017).

408 Já as antocianinas agem como antioxidantes contra os danos causados pelas
409 EROs e como filtros da luz visível e ultravioleta visando inibir a fotoinibição e fotodano
410 ao aparato fotossintético (TRUONG et al., 2018). Apesar da diferença genética, os
411 resultados acerca da concentração de carotenoides e antocianinas expressam o
412 comportamento das duas espécies na modulação dos mecanismos metabólicos frente
413 ao estresse salino que desencadeia um desequilíbrio entre a produção e inativação
414 das EROs (MITTLER, 2017b). De fato, neste estudo observa-se o aumento na
415 concentração de H_2O_2 juntamente com o incremento na peroxidação lipídica. Estas
416 respostas indicam que as EROS foram produzidas e causaram degradação oxidativa
417 das membranas lipídicas e de biomoléculas (NOCTOR; FOYER, 2017). No geral, o
418 feijão-mungo mostrou-se menos sensível à salinidade uma vez que a variação na
419 peroxidação lipídica foi menor em comparação ao registrado no feijão-caupi.

420 Foi observado que enquanto o ascorbato reduzido é aumentado no feijão-caupi,
421 no feijão-mungo o valor deste antioxidante decresce. Este resultado evidencia que
422 houve diferença metabólica entre as duas espécies no enfrentamento ao estresse
423 salino. A redução nas concentrações de ascorbato reduzido indicam que as plantas
424 de feijão-mungo estão desintoxicando as EROs por meio do ciclo ascorbato-
425 glutathione, onde o ascorbato ao ser consumido cede elétrons para manutenção da
426 atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX), a qual converte o H_2O_2 em H_2O
427 e O_2 (HASANUZZAMAN et al., 2019).

428 A concentração da glutathione reduzida é aumentada nos feijão-caupi e feijão-
429 mungo, indicando que houve um estímulo na produção deste antioxidante como forma
430 de defesa dos efeitos negativos do estresse salino. Porém os maiores acréscimos
431 foram registrados para o feijão-mungo reforçando que a glutathione, assim como o
432 ascorbato, além de atuarem durante o ciclo ascorbato-glutathione na inativação da
433 EROS, agem de forma isolada na inativação de compostos xenobióticos e controle da
434 homeostase celular, onde a alteração desta condição é indicativo de condição de
435 estresse nas plantas (RADY et al., 2018). Em plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum*
436 L.) observou-se que este antioxidante tem papel importante no enfrentamento do
437 estresse salino e atua na desintoxicação dos sais em excesso (SHANKAR et al.,
438 2016). O aumento os teores da glutathione reduzida e oxidada em plantas de feijão-
439 mungo sob estresse salino severo também é relatado por Nahar et al. (2015).

440 Além dos antioxidantes hidrossolúveis, o sistema de defesa antioxidante
441 engloba diferentes enzimas. A SOD, uma enzima da primeira linha de defesa do
442 sistema antioxidante dos vegetais, atua na dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (GUPTA et
443 al., 2016). Neste estudo, nota-se que as plantas de feijão-caupi e feijão-mungo
444 expostas à salinidade apresentaram comportamentos distintos acerca da atividade da
445 SOD. Houve redução linear na atividade de SOD nas plantas de feijão-caupi,
446 enquanto que a atividade de SOD nas plantas de feijão-mungo aumentou até 100 mM
447 de NaCl e caiu aos níveis do controle na presença de 150 mM de NaCl. Segundo
448 Adhikari et al. (2020), a atividade das enzimas antioxidantes varia entre espécies,
449 assim como, entre cultivares da mesma espécie sob condições de estresse salino.

450 É possível que tenha havido inativação da atividade de SOD pelo alto nível de
451 salinidade (150 mM de NaCl) ou pelo aumento significativo dos níveis de H_2O_2 . De
452 acordo com Ma et al. (2017), as isoformas de SOD que usam ferro ou manganês como
453 cofatores são sensíveis ao H_2O_2 e é possível distingui-las de acordo com sua
454 sensibilidade a esta ERO. É possível que, a partir de 100 mM de NaCl, a SOD tenha
455 sofrido danos ou inativação pelas EROs que reduziram sua atividade (ATTIA et al.,
456 2008). Em plantas de feijão-comum sob estresse salino registrou-se aumento na
457 atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante, em especial da catalase nas
458 raízes e da SOD nas folhas (KESHAVARZ; MOGHADAM, 2017).

459 O aumento na atividade da POX registrado nas plantas de feijão-caupi e feijão-
460 mungo sugere que houve tentativa de detoxificação do H_2O_2 dentro da célula através
461 da oxidação de substratos fenólicos, tais como pirogalol e/ou guaiacol, na busca de
462 um novo equilíbrio do metabolismo vegetal (MAIA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2018).
463 O H_2O_2 tem papel dualístico no metabolismo vegetal (BONIFACIO et al., 2016), sendo
464 visto como ERO que desestabiliza membranas celulares e também como regulador
465 da biossíntese de lignina (LIU et al., 2015). Passardi et al. (2004) relatam que a
466 atividade de POX pode limitar o crescimento das células uma vez que estas enzimas
467 utilizam o H_2O_2 . Os níveis de H_2O_2 induzem acúmulo de lignina, um composto da
468 parede celular dos vegetais, que resulta em raízes mais grossas e curtas (menor
469 comprimento) tal como relatado neste trabalho para as plantas de feijão-caupi e feijão-
470 mungo.

471

472 5. CONCLUSÃO

473 A salinidade induz incremento na produção de EROs que afetam
 474 negativamente o crescimento, a produção de biomassa e os níveis de clorofila.
 475 Embora os danos ocasionados pela salinidade tenham sido identificados nas duas
 476 espécies, diferenças metabólicas foram identificadas. As plantas de feijão-caupi
 477 acumularam as formas reduzidas do ascorbato e glutatona e exibiram redução na
 478 atividade de SOD, enquanto as plantas de feijão-mungo consumiram o ascorbato
 479 reduzido e induziram a atividade de SOD. Baseado nas maiores variações na
 480 peroxidação lipídica as plantas de feijão-mungo são mais sensíveis ao estresse salino
 481 resultando em maiores danos bioquímicos, celulares e no crescimento.

482

483 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 484 ABDELGAWAD, H.; ZINTA, G.; HEGAB, M.M.; PANDEY, R.; ASARD, H.; ABUELSOUD, W. High
 485 salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs.
 486 **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1, p. 276, 2016.
- 487 ADHIKARI, B.; DHUNGANA, S.K.; KIM, I.D.; SHIN, D.H. Effect of foliar application of potassium
 488 fertilizers on soybean plants under salinity stress. **Journal of the Saudi Society of Agricultural
 489 Sciences**, v. 19, n. 4, p. 261-269, 2020.
- 490 ARAÚJO, R.F.; ABUD, H.F.; SILVA, L.J.; ARAUJO, E.F.; PINTO, C.M.F.; SILVA, F.W.S. Alterações
 491 fisiológicas e atividade de enzimas antioxidantes em sementes de pimentas *Capsicum chinense* Jacq
 492 e *Capsicum frutescens* L. durante o processo de maturação. **Revista Ceres**, v. 65, p. 534-545, 2018.
- 493 ATTIA, H.; ARNAUD, N.; KARRAY, N.; LACHAËL, M. Long-term effects of mild salt stress on growth,
 494 ion accumulation and superoxide dismutase expression of Arabidopsis rosette leaves. **Physiologia
 495 Plantarum**, v. 63, n.1, p. 293-205, 2008.
- 496 BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to
 497 acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- 498 BENICASA, M. M. P. **Análise de Crescimento de Plantas**: noções básicas. Jaboticabal: FUNEP,
 499 2004. 42p.
- 500 BLANKENSHIP, R. Fotossíntese: reações luminosas, In: TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY,
 501 A. (Org.). **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 761-791.
- 502 BONIFACIO, A.; CARVALHO, F.E.; MARTINS, M.O.; LIMA NETO, M.C.; CUNHA, J.R.; RIBEIRO, C.W.;
 503 MARGIS-PINHEIRO, M.; SILVEIRA, J.A.G. Silenced rice in both cytosolic ascorbate peroxidases
 504 displays pre-acclimation to cope with oxidative stress induced by 3-aminotriazole-inhibited catalase.
 505 **Journal of Plant Physiology**, v. 201, n.1, p. 17-27, 2016.
- 506 BRENNAN, T.; FRENKEL, C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear.
 507 **Plant Physiology**, v. 59, n. 3, p. 411-416, 1977.
- 508 CHICONATO, D. A.; SOUSA JUNIOR, G. D.; SANTOS, D. M. M.; MUNNS, R. Adaptation of sugarcane
 509 plants to saline soil. **Environmental and Experimental Botany**, v. 162, n. 1, p. 201-211, 2019.
- 510 DIAZ-BAENA, M., GALVEZ-VALDIVIESO, G., DELGADO-GARCIA, E., PINEDA, M., PIEDRAS, P.
 511 Nuclease and ribonuclease activities in response to salt stress: Identification of PvRNS3, a T2/S-like
 512 ribonuclease induced in common bean radicles by salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.
 513 147, n. 1, p.235-241, 2019.

- 514 FAO. **Pulses and climate change**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome,
515 2016.
- 516 FLOWERS, T.J.; MUNNS, R.; COLMER, T.D. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt
517 tolerance in halophytes. **Annals of Botany**, v. 115, n. 3, p. 419-431, 2015.
- 518 GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant**
519 **Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- 520 GITELSON, A.A.; MERZLYAK, M.N.; CHIVKUNOVA, O.B. Optical properties and nondestructive
521 estimation of anthocyanin content in plant leaves. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n.1, p.
522 28-45, 2001.
- 523 GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and
524 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 207-212, 1980.
- 525 GUPTA, K.; SENGUPTA, A.; CHAKRARTY, M.; GUPTA, B. Hydrogen peroxide and polyamines act as
526 double edged swords in plant abiotic stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1343, 2016.
- 527 HASANUZZAMAN, M.; BHUYAN, M.H.M.; ANEE, T.I.; PARVIN, K.; NAHAR, K.; MAHMUD, J.A.;
528 FUJITA, M. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under
529 abiotic stress. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 384, 2019.
- 530 HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of
531 fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.
- 532 HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soils**.
533 Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347 p.
- 534 JAVALOYES, P.; O'BROIN, S.; BRUQUE, R.; PUZZILLI, F.; UМЕНА, M.; DOUGHERTY, S.; CALLES,
535 T.; DELIGIA, C.; TAYYIB, S.; CASTALDI, L.; BRIVIO, R. **Pulses. Nutritious seeds for sustainable**
536 **future**. FAO (Food and Agriculture Organization) International Year of Pulses. 2016, 196p.
- 537 KAMPFENKEL, K.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, R. Extraction and determination of ascorbate and
538 dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, v. 225, n. 1, p. 165-167, 1995.
- 539 KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf
540 senescence. **Plant Physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.
- 541 KESHAVARZ, H.; MOGHADAM, R.S.G. Seed priming with cobalamin (vitamin B12) provides significant
542 protection against salinity stress in the common bean. **Rhizosphere**, v. 3, p. 143-149, 2017.
- 543 LI, J.; HU, L.; ZHANG, L.; PAN, X.; HU, X. Exogenous spermidine is enhancing tomato tolerance to
544 salinity–alkalinity stress by regulating chloroplast antioxidant system and chlorophyll metabolism. **BMC**
545 **Plant Biology**, v. 15, n.1, p. 303, 2015.
- 546 LICHTENTHALER, H.K.; WELLBURN, A. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and
547 b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, p. 591-592, 1983.
- 548 LIU, Q.; ZHENG, L.; HE, F.; ZHAO, F.J.; SHEN, Z.; ZHENG, L. Transcriptional and physiological
549 analyses identify a regulatory role for hydrogen peroxide in the lignin biosynthesis of copper-stressed
550 rice roots. **Plant and Soil**, v. 387, n. 1-2, p. 323-336, 2015.
- 551 MA, X.; DENG, D.; CHEN, W. Inhibitors and Activators of SOD, GSH-Px, and CAT. In: SENTURK, M.
552 (ed). **Enzyme inhibitors and activators**. InTechOpen, 2017. Cap. 9, pp. 207-224.
- 553 MAIA, J.M.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VOIGT, E.L.; MACÊDO, C.E.C.; PONTE, L.F.A.; SILVEIRA, J.A.G.
554 Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes
555 níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 342-349, 2012.
- 556 MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017b.
- 557 MUNNS, R.; GILLIHAM, M. Salinity tolerance of crops—what is the cost? **New Phytologist**, v. 208, n. 3,
558 p. 668-673, 2015.
- 559 MUNNS, R.; DAY, D. A.; FRICKE, W.; WATT, M.; ARSOVA, B.; BARKLA, B. J.; BOSE, J.; BYRT, C.
560 S.; CHEN, Z.; FOSTER, K. J.; GILLIHAM, M.; HENDERSON, S. W.; JENKINS, C. L. D.; KRONZUCKER,

- 561 S. J.; MIKLAVCIC, S. J.; PLETT, D.; ROY, S. J.; SHABALA, S.; SHELDEN, M. C.; SOOLE, K. L.;
562 TAYLOR, N. L.; TESTER, M.; WEGE, S.; WEGNER, L. H.; TYERMAN, S. D. Energy costs of salt
563 tolerance in crop plants. **New Phytologist**, v. 225, n.3, P.1072-1090, 2020.
- 564 NAHAR, K.; HASANUZZAMAN, M.; ALAM, M.M.; FUJITA, M. Roles of exogenous glutathione in
565 antioxidant defense system and methylglyoxal detoxification during salt stress in mung bean. **Biologia**
566 **Plantarum**, v. 59, n. 4, p. 745-756, 2015.
- 567 NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Update on redox compartmentation intracellular redox compartmentation
568 and ROS-related communication in regulation and signaling. **Plant Physiology**, v. 171, n. 1, p. 1581-
569 1592, 2017.
- 570 ORLOVSKY, N.; JAPAKOVA, U.; ZHANG, H.; VOLIS, S. Effect of salinity on seed germination, growth
571 and ion content in dimorphic seeds of *Salicornia europaea* L.. **Plant Diversity**, v. 38, p. 183-189, 2016.
- 572 PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the
573 cell wall. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 11, p. 534-540, 2004.
- 574 PEDROTTI, A.; CHAGAS, R.M.; RAMOS, V.C.; PRATA, A.D.N.; LUCAS, A.A.T.; SANTOS, P.D. Causas
575 e consequências do processo de salinização dos solos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e**
576 **Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 1308-1324, 2015.
- 577 PEREIRA NETO, J.A.; BONIFACIO, A. Crescimento, teor de pigmentos fotossintéticos e concentração
578 de solutos orgânicos em nódulos de feijão-caupi co-inoculado com rizóbio e *Trichoderma* e submetido
579 ao estresse salino. In: I Seminário Integrado da UFPI e XXVIII Seminário de Iniciação Científica, 2019,
580 Teresina-PI. I Seminário Integrado da UFPI e XXVIII Seminário de Iniciação Científica. Teresina-PI:
581 EDUFPI, 2019.
- 582 RADY, M.M.; ELRYS, A.S.; EL-MAATI, M.F.A.; DESOKY, E.S.M. Interplaying roles of silicon and proline
583 effectively improve salt and cadmium stress tolerance in *Phaseolus vulgaris* plant. **Plant Physiology**
584 **and Biochemistry**, v. 139, n. 1, p. 558-568, 2019.
- 585 RADY, M.M.; DESOKY, E.S.M.; ELRYS, A.S.; BOGHADY, M.S. Can licorice root extract be used as
586 an effective natural biostimulant for salt-stressed common bean plants? **South African Journal of**
587 **Botany**, v. 121, n. 1, p. 294-305, 2019.
- 588 RADY, M.; TAHA, S.; KUSVUN, S. Integrative application of cyanobacteria and antioxidants improves
589 common bean performance under saline conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 61-69, 2018.
- 590 SHANKAR, V.; KUMAR, D.; AGRAWAL, V. Assessment of antioxidant enzyme activity and mineral
591 nutrients in response to NaCl stress and its amelioration through glutathione in chickpea. **Applied**
592 **Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 267-284, 2016.
- 593 TALAAT, N.B. Effective microorganisms: An innovative tool for inducing common bean (*Phaseolus*
594 *vulgaris* L.) salt-tolerance by regulating photosynthetic rate and endogenous phytohormones production.
595 **Scientia Horticulturae**, v. 250, p. 254-265, 2019.
- 596 TRUONG, H.A.; LEE, W.J.; JEONG, C.Y.; TRINH, C.S., LEE, S.; KANG, C.S.; CHEONG, Y.K.; HONG,
597 S.W.; LEE, H. Enhanced anthocyanin accumulation confers increased growth performance in plants
598 under low nitrate and high salt stress conditions owing to active modulation of nitrate
599 metabolism. **Journal of Plant Physiology**, v. 231, n. 1, p. 41-48, 2018.
- 600 VERHOEVEN, A.; GARCÍA-PLAZAOLA, J.I.; FERNÁNDEZ-MARÍN, B. Shared mechanisms of
601 photoprotection in photosynthetic organisms tolerant to desiccation or to low temperature.
602 **Environmental and Experimental Botany**, v. 154, n. 1, p. 66-79, 2018.

CAPÍTULO II

1

2

3 **O estresse por alumínio afeta diferentemente a performance fisiológica e as**
4 **respostas bioquímicas em duas espécies de feijão**

5

6 (Aluminum stress differentially affects physiological performance and biochemical
7 responses in two bean species)

8

RESUMO

9

10

11 O alumínio é o elemento metálico mais prevalente no solo e pode se apresentar em
12 formas tóxicas, sendo bastante presente em solos ácidos que são um entrave para
13 produção agrícola mundial. O alumínio causa efeitos na morfologia, funções celulares,
14 moleculares e fisiológicas das plantas. O presente estudo teve por objetivo
15 compreender as respostas biométricas e bioquímicas de plantas de feijão-caupi e
16 feijão-mungo expostas aos níveis crescentes de alumínio. O delineamento
17 experimental utilizado foi 6 x 2, sendo seis níveis de alumínio (0, 20, 40, 60, 80 e
18 100 μM de AlCl_3) e duas espécies vegetais (feijão-caupi e feijão-mungo). Os
19 parâmetros de crescimento (taxa de crescimento absoluto, biomassa fresca da parte
20 aérea e raízes, comprimento e volume de raízes) foram reduzidos pelo estresse por
21 alumínio e houve influência deste estresse no *status* hídrico foliar das duas culturas.
22 O feijão-caupi e o feijão-mungo apresentarem tendências opostas na concentração
23 dos pigmentos fotossintéticos e suas relações, até mesmo nos pigmentos de
24 dissipação de energia. Os danos causados pelo H_2O_2 foram aumentados nas duas
25 culturas. No sistema antioxidante a atividade das enzimas dismutase do superóxido e
26 peroxidase de fenóis distinguiram entre as espécies, assim como a glutatona
27 reduzida. O feijão-caupi e feijão-mungo tiveram o crescimento afetado pelas
28 condições estresse por alumínio, porém pela diferença genética entre espécies,
29 tiveram comportamentos distintos a fim mitigar os efeitos danosos do metal. Conforme
30 as respostas encontradas nas menores perdas nos parâmetros de crescimento e
31 principalmente nos incrementos de pigmentos fotossintéticos e menores variação na
32 peroxidação lipídica em relação as plantas não-estressadas, as plantas de feijão-
33 mungo são menos sensíveis que o feijão-caupi aos níveis elevados de alumínio.

34

35 **Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*, *Vigna radiata*, estresse oxidativo.

ABSTRACT

36

37

38 Aluminum is the most prevalent metallic element in mineral soil and because of this it
39 can be present in toxic forms, quite present in acidic soils, which represents an
40 obstacle to global agricultural production. There are several deleterious effects of
41 aluminum on plant morphology, cellular, molecular and physiological functions. Plant
42 species have physiological and biochemical responses to reduce these damages,
43 survive and close the cycle. The present study aimed to understand the biometric and
44 biochemical responses of cowpea and mung bean plants exposed to increasing levels
45 of aluminum. The experimental design used was 6 x 2, six levels of aluminum (0, 20,
46 40, 60, 80 and 100 $\mu\text{M AlCl}_3$) and two cultures (cowpea and mung bean). The growth
47 parameters (absolute growth rate, fresh biomass of the aerial part and roots, length
48 and volume of roots) were reduced by aluminum stress, there is an influence on the
49 water status for both cultures. However, cowpea and mung bean have opposite trends
50 in the concentrations of photosynthetic pigments and their relationships, even in
51 energy-dissipating pigments. The damage caused by hydrogen peroxide was
52 increased in both cultures. In the antioxidant system, the activity of the superoxide
53 dismutase and phenol peroxidase enzymes distinguished between species, as well as
54 reduced glutathione. The cowpea and mung bean growth was affected by the stress
55 conditions caused by aluminum, but due to the genetic difference between species,
56 they had different behaviors in order to mitigate the harmful effects of the metal.
57 According to the responses found in the lower losses in growth parameters and mainly
58 in the increments of photosynthetic pigments and smaller variation in lipid peroxidation
59 in relation to non-stressed plants, mung bean plants are less sensitive than cowpea to
60 high levels of aluminum.

61

62 **Keywords:** *Vigna unguiculata*, *Vigna radiata*, oxidative stress.

63 1. INTRODUÇÃO

64 Após o oxigênio e silício, o alumínio é o elemento metálico mais prevalente do
65 solo mineral e representa 7% dos constituintes presentes na crosta terrestre, sendo
66 integrante na composição dos minerais de aluminossilicatos (SCHMITT et al., 2016).
67 Dependendo do pH do meio, o alumínio pode ser encontrado nas formas não tóxicas
68 (precipitados) e tóxicas (Al(OH)_2^{2+} , Al(OH)_2^+ , Al(OH)_3 , Al(OH)_4^- e Al^{3+} , sendo o último
69 mais tóxico). A toxicidade ao alumínio é bastante frequente em solos ácidos ($\text{pH} < 5,0$)
70 e isto representa um entrave para produção agrícola de 50% das terras agricultáveis
71 em todo mundo (AYENI et al., 2014). Há ocorrência de solos ácidos no norte da
72 Europa e Eurásia, sul e leste da América do Norte e do Sul, África Central e do Sul e
73 no sudeste da Ásia (FAO; ITPS, 2015). Na América do Sul, os solos ácidos ($\text{pH} < 3,5$)
74 predominam em áreas desmatadas e de acentuada atividade agrícola (FAO; ITPS,
75 2015).

76 As concentrações tóxicas de alumínio afetam a morfologia bem como as
77 funções celulares, moleculares e fisiológicas das espécies vegetais. Visualmente, as
78 raízes são o primeiro órgão a ser afetado pelos níveis tóxicos de alumínio uma vez
79 que este elemento ocasiona redução no crescimento radicular. Segundo He et al.
80 (2019), o alumínio tóxico suprime a divisão celular, o alongamento das raízes e,
81 portanto, limita a captação de água e nutrientes, como Ca, Mg, P, Fe, Mn e S, bem
82 como a produção de biomassa. Sob o ponto de vista microscópico, ocorre modificação
83 na estrutura da parede celular e na organização, dinâmica, propriedades físicas,
84 polarização e permeabilidade da membrana plasmática (SINGH et al., 2017). Segundo
85 estes autores, as concentrações tóxicas de alumínio afetam a fotossíntese, induzem
86 decréscimo na concentração de pigmentos (clorofila e carotenoides) e produção
87 descontrolada de espécies reativas de oxigênio (EROs) que leva a danos oxidativos
88 aos lipídios e outras biomoléculas.

89 Os efeitos do alumínio em plantas de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.)
90 foram relatados por Vasconcelos et al. (2020). Houve aumento dos teores de alumínio
91 nas folhas, causando desequilíbrio dos nutrientes com o decréscimo do fósforo,
92 potássio e magnésio, bem como, a redução da eficiência do uso destes íons. O
93 alumínio limitou os processos fotossintéticos requerendo maior dissipação de energia
94 por conta do estresse. Além de afetar a morfoanatomia das folhas e o crescimento
95 das plantas. Nahar et al. (2017) em uma abordagem do estresse por alumínio em
96 plantas de feijão-mungo apontam que além dos danos aos parâmetros fisiológicos e

97 de crescimento houve acréscimo no conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e
98 superóxido que acarretou em maiores danos com aumento da peroxidação lipídica.

99 As espécies vegetais possuem um sistema antioxidante, composto por enzimas
100 antioxidantes, como catalase, dismutase do superóxido, peroxidase do ascorbato, da
101 glutationa e de fenóis, e de compostos não enzimáticos (ascorbato, glutationa, α-
102 tocoferóis e carotenoides), sendo uma resposta bioquímica frequentemente induzida
103 nas situações de estresse visando mitigar a produção descontrolada de EROs e
104 também seus danos subsequentes (GÜNEŞ et al., 2019). Embora sejam conhecidos,
105 as modulações do sistema antioxidante frente ao estresse por alumínio nas plantas,
106 particularmente no feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijão-mungo (*V.*
107 *radiata* (L.) Wilczek), são pouco estudados. Desta forma, o presente estudo teve por
108 objetivo compreender as respostas biométricas e bioquímicas de plantas de feijão-
109 caupi e feijão-mungo expostas aos níveis crescentes de alumínio.

110

111 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

112 **2.1 Instalação, delineamento e condução experimental**

113 O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de
114 Biologia localizada no Centro de Ciências da Natureza (UFPI; Teresina/PI). O
115 delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 x 2,
116 sendo seis tratamentos (0; 20; 40; 60; 80; e 100 µM de cloreto de alumínio (AlCl₃))
117 baseado em trabalhos (SILVA; BONIFACIO, 2019) e duas espécies vegetais (feijão-
118 caupi e feijão-mungo), com três repetições. A unidade experimental foi constituída de
119 duas plantas por vaso. Sementes de feijão-caupi e feijão-mungo, cedidas pela
120 Embrapa Meio-Norte (Teresina/PI), foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a
121 1,0% (60 s), seguidas de tríplex lavagem, e semeadas em vasos contendo 3,5 kg de
122 areia lavada.

123 Após a germinação, as plantas foram regadas de forma alternada com água
124 destilada e solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) diluída (1/2). Após a emissão
125 do primeiro trifólio definitivo, aplicou-se a solução nutritiva concentrada até a
126 diferenciação dos tratamentos. Na diferenciação dos tratamentos, as plantas (que
127 apresentavam o terceiro trifólio) passaram a ser regadas com AlCl₃ (em água destilada
128 ou na solução nutritiva, de forma alternada diariamente) na concentração
129 correspondente a cada tratamento até a coleta. A coleta (40 dias após a semeadura),

130 procedeu-se após as plantas apresentarem sintomas visuais de estresse por alumínio
131 (perda de turgor foliar e arroxamento das bordas foliares).

132

133 **2.2 Análises biométricas e conteúdo relativo de água**

134 Antes da exposição ao estresse e na ocasião da coleta mediu-se a altura das
135 plantas com o auxílio de régua e estas medidas foram utilizadas para o cálculo da taxa
136 de crescimento absoluto. O comprimento e volume das raízes foram mensuradas com
137 uso da régua e proveta graduada, respectivamente. A massa fresca da parte aérea e
138 das raízes foi obtida após a pesagem em balança de precisão. As análises biométricas
139 foram realizadas conforme descrito por Benincasa (2003). Para quantificar o conteúdo
140 relativo de água utilizou-se a metodologia de Barrs e Weatherley (1962). Para cada
141 amostra foram retirados 20 discos foliares (1,0 cm) e pesados em balança analítica
142 de precisão para obtenção da massa fresca (M_f). Posteriormente, os discos foram
143 imersos em água destilada por 24 h. Após a retirada do excesso de água, os discos
144 foram pesados para obter a massa túrgida (M_t). Ao final, os discos foliares foram secos
145 em estufa de aeração forçada (65 °C), até atingir o peso constante, para obtenção da
146 massa seca (M_s). O conteúdo relativo de água (CRA) foi calculado com a seguinte
147 fórmula: $CRA (\%) = [(M_f - M_s) / (M_t - M_s)] \times 100$.

148

149 **2.3 Determinações bioquímicas**

150 Amostras foliares frescas (terceiro trifólio) foram coletadas e armazenadas em
151 freezer -20 °C até o momento da determinação da concentração de pigmentos
152 fotossintéticos (clorofilas, carotenoides e antocianinas) e de compostos e enzimas do
153 sistema redox (H_2O_2 , peroxidação lipídica, ascorbato e glutathiona reduzidos,
154 dismutase do superóxido e peroxidase de fenóis) conforme descrito a seguir.

155

156 **2.3.1 Pigmentos fotossintéticos**

157 Para determinação da concentração de clorofilas (*a*, *b* e total) e carotenoides,
158 amostras foliares foram homogeneizadas com etanol 95% e mantidas *overnight* em
159 ambiente escuro. Posteriormente, os extratos foram lidos em espectrofotômetro nos
160 comprimentos de onda de 649, 663 e 470 nm. Para o cálculo da concentração de
161 clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides utilizou-se as fórmulas propostas por Lichtenthale e
162 Wellburn (1983) e os dados foram expressos em $mg\ g^{-1}$ MF (massa fresca). Para
163 mensurar a concentração de antocianinas (GITELSON et al., 2001), amostra foliares

164 foram misturadas com metanol em HCl 0,1% e, após 24 horas no escuro, lidas em
165 espectrofotômetro a 530 nm. Para o cálculo da concentração, utilizou-se o coeficiente
166 de extinção molar de $26,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a antocianina a 530 nm e os dados foram
167 expressos em $\text{mg g}^{-1} \text{ MF}$.

168

169 **2.3.2 Indicadores oxidativos e antioxidantes não-enzimáticos**

170 Para a determinação da concentração de H_2O_2 , da peroxidação lipídica e das
171 formas reduzidas do ascorbato e da glutatona, amostras foliares foram maceradas na
172 presença de TCA 5% e então centrifugadas a 10.000 g (5 min; 4 °C) para obtenção
173 do extrato. A concentração de H_2O_2 foi mensurada utilizando a metodologia de
174 Brennan e Frenkell (1977). Alíquotas do extrato foram misturadas com FeSO_4 100 μM ,
175 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250 μM , H_2SO_4 25 mM e, após agitação em vórtex, com alaranjado de
176 xilenol 100 μM e sorbitol 99 mM. Após 30 min a temperatura ambiente (25 °C), a
177 mistura foi lida a 560 nm em espectrofotômetro. A concentração de H_2O_2 foi calculada
178 com base na curva padrão e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

179 Para mensurar a peroxidação lipídica, utilizou-se a metodologia proposta por
180 Heath e Packer (1968) com modificações. Alíquotas do extrato foram misturadas com
181 solução TCA-TBA (TCA 20% e TBA 0,5%) e então transferidas para banho-maria a
182 100 °C por 60 min. Após atingir temperatura ambiente, a mistura foi lida a 532 e 660
183 nm em espectrofotômetro. A peroxidação lipídica foi calculada com base no
184 coeficiente de extinção molar de $155,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o complexo TBA-MDA
185 (malonaldeído) e expressos em $\eta\text{mol TBA-MDA g}^{-1} \text{ MF}$.

186 Para quantificar a concentração do ASA (KAMPFENKEL et al., 1995), alíquotas
187 do extrato foram misturadas ao tampão fosfato de potássio a 200 mM (pH 7,4), TCA
188 10%, Bpiridil 4%, FeCl_3 3% e H_2PO_4 45% e então levadas ao banho-maria a 42 °C
189 (15 min). Em seguida, as amostras foram lidas a 525 nm. A concentração de ASA foi
190 calculada com base na curva-padrão e expressa em $\mu\text{mol ASA g}^{-1} \text{ MF}$. Para quantificar
191 a concentração de GSH (GRIFFITH, 1980) com modificações, alíquotas do extrato
192 foram misturadas com tampão fosfato de potássio 150 mM (pH 7,6) e DTNB 6,0 mM
193 e, após agitação em vórtex, levadas ao banho-maria 30 °C (10 min). Em seguida, as
194 amostras foram mantidas em temperatura ambiente para estabilização da
195 temperatura. Posteriormente, procedeu-se a leitura das amostras a 412 nm. A
196 concentração de GSH foi calculada com base na curva-padrão e expressa em μmol
197 $\text{GSH g}^{-1} \text{ MF}$.

198 **2.3.4 Enzimas antioxidativas**

199 O extrato enzimático foi preparado macerando-se amostras foliares frescas na
200 presença de tampão fosfato de potássio a 100 mM (pH 7,0) adicionado de EDTA
201 1,0 mM e ácido ascórbico 1,0 mM com auxílio do almofariz e pistilo. O homogenato foi
202 centrifugado por 15 min a 13.000 g (4 °C) e então o sobrenadante foi recolhido e
203 utilizado na mensuração da atividade das enzimas peroxidase de fenóis (POX; EC
204 1.11.1.7) e dismutase do superóxido (SOD; EC 1.15.1.1). Para determinar a atividade
205 de POX (KAR; MISHRA, 1976). Alíquotas do extrato enzimático foram misturadas ao
206 tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) e H₂O₂ 20 mM (início da reação). Após
207 dois minutos, a reação foi paralisada com a adição de H₂SO₄ 5%. A mistura foi lida a
208 420 nm em espectrofotômetro. Os valores da atividade de POX foram calculados e
209 expressos em $\mu\text{mol pirogalol mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

210 Para mensurar a atividade da SOD (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971),
211 alíquotas do extrato enzimático foram transferidas para tubos protegidos da luz e
212 então adicionou-se tampão de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0),
213 EDTA 0,1 mM e metionina 13 mM), NBT 750 μM e riboflavina 1,0 mM. Posteriormente,
214 os tubos foram expostos à luz por cinco minutos com uso de uma lâmpada de 30 watts
215 e, em seguida, procedeu-se a leitura das amostras a 560 nm. Com base nas leituras
216 e considerando que uma unidade de atividade (UA) corresponde à 50% de redução
217 do NBT (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), os dados foram calculados e a atividade de
218 SOD foi expressa em UA $\text{mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

219

220 **2.4 Análise estatística**

221 Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) precedido pelo
222 teste F, ambos a 5% de probabilidade. O teste *t* de Student a 5% foi utilizado para
223 testar a diferença entre os níveis de AlCl₃ dentro da mesma espécie vegetal e também
224 para comparar as duas espécies na mesma concentração de AlCl₃. Após
225 transformados, os dados foram submetidos a análise de componentes principais e ao
226 escalonamento multidimensional não-métrico. Para validação dos agrupamentos, os
227 dados foram submetidos a análise multivariada permutacional de variância
228 (PERMANOVA). As análises estatísticas univariadas foram realizadas utilizando o
229 software R Studio 1.2.5 com o pacote easyanova, enquanto que as análises
230 estatísticas multivariadas foram realizadas no software Past 4.3.

231 3. RESULTADOS

232 3.1 Análise geral dos dados

233 De acordo com a ANOVA, houve influência significativa dos níveis crescentes
 234 de AlCl_3 nos dados analisados – exceto para a clorofila *a* (Tabela 1). Analisando o
 235 fator ‘espécie’, nota-se que não houve diferença significativa para a massa fresca da
 236 parte aérea e clorofila *a*. Ao observar a interação entre os fatores, observou-se que
 237 não houve efeito significativo para taxa de crescimento absoluto, comprimento das
 238 raízes e massa fresca das raízes. No geral, o coeficiente de variação dos dados ficou
 239 entre 3,3% e 11,8%.

240

241 **Tabela 1.** Análise de variância (quadrado médio) das variáveis analisadas após a
 242 exposição das espécies de feijão ao alumínio.

Varáveis analisadas	Fonte de Variação (Quadrado médio)			
	Alumínio (A)	Espécies (E)	A x E	CV (%)
Taxa de Crescimento Absoluto	2230 *	15545 *	64,46 ^{ns}	5,85
Conteúdo relativo de água	1035 *	85,97 *	49,03 *	3,24
Comprimento das raízes	117,3 *	11,90 *	4,18 ^{ns}	3,63
Volume das raízes	730,3 *	7338 *	38,17 *	6,50
Massa fresca da parte aérea	121,9 *	0,01 ^{ns}	2,50 ^{ns}	4,81
Massa fresca das raízes	2,88 *	23,81 *	0,11 *	6,01
Clorofila <i>a</i>	0,005 ^{ns}	0,0008 ^{ns}	0,06 *	8,19
Clorofila <i>b</i>	0,004 *	0,05 *	0,03 *	7,70
Carotenoides	0,02 *	0,20 *	0,05 *	6,81
Antocianinas	0,05 *	0,03 *	0,07 *	7,68
Relação clorofila <i>a</i> : <i>b</i>	0,81 *	12,47 *	1,92 *	11,78
Peróxido de hidrogênio	12,26 *	19,05 *	2,04 *	3,29
Peroxidação lipídica	325,5 *	105,5 *	19,67 *	7,22
Ascorbato reduzido	1,43 *	14,55 *	0,20 *	5,36
Glutationa reduzida	0,10 *	2,92 *	1,93 *	6,49
Dismutase do superóxido	0,34 *	4,47 *	0,36 *	5,18
Peroxidase de fenóis	2,38 *	1,05 *	9,59 *	7,62
Graus de liberdade	5	1	5	-

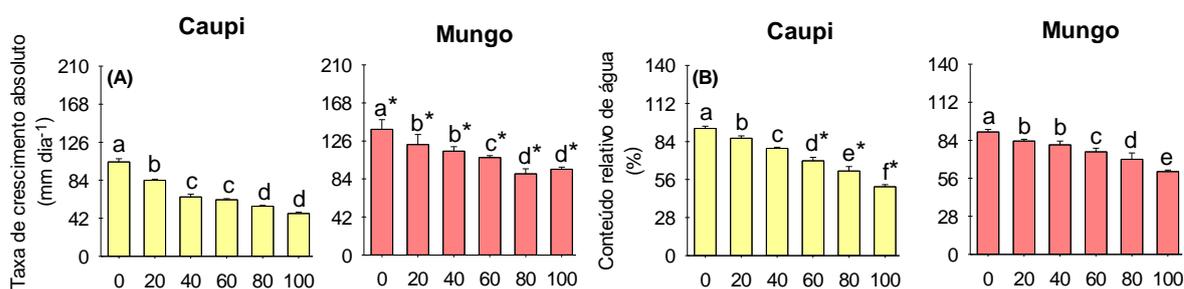
243 * = significativo a 5%; ns = não significativo; CV = coeficiente de variação.

244

245 3.2 Crescimento e pigmentos fotossintéticos

246 As plantas de feijão-caupi e feijão-mungo exibiram redução significativa na taxa
 247 de crescimento absoluto (TCA), conteúdo relativo de água (CRA), comprimento e
 248 volume das raízes e na produção de biomassa (parte aérea e raízes) em resposta aos
 249 níveis crescentes de alumínio (Figura 1). Quando expostas à 100 μM de AlCl_3 , as

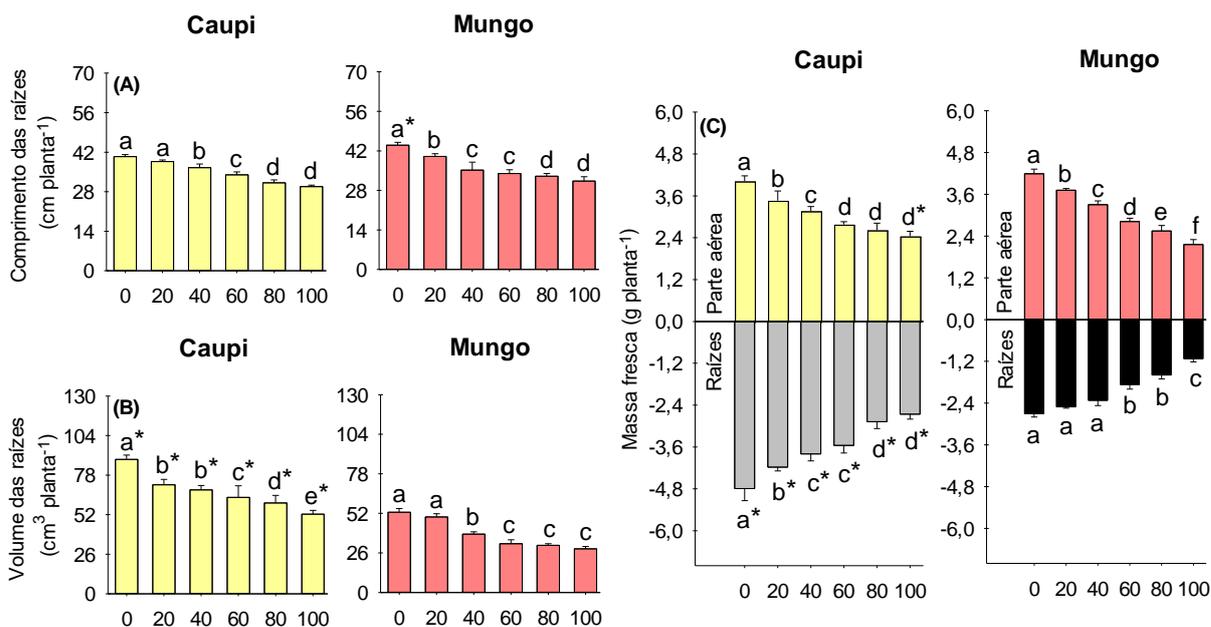
250 plantas de feijão-caupi e feijão-mungo apresentaram redução de 54% e 35% na TCA
 251 em comparação ao controle, respectivamente (Figura 1A). O CRA decresceu nas duas
 252 espécies em resposta ao alumínio, tendo sido registrado redução entre 7% e 45% no
 253 feijão-caupi e entre 7 e 32% no feijão-mungo – todos em relação aos seus respectivos
 254 controles (Figura 1B). Enquanto que o feijão-mungo apresentou maior TCA em todos
 255 os níveis de alumínio, as plantas de feijão-caupi apresentaram maior CRA quando
 256 cultivada nos níveis 60, 80 e 100 μM de AlCl_3 .
 257



258

259 **Figura 1.** Taxa de crescimento absoluto (A) e conteúdo relativo de água (B) de plantas de feijão-caupi
 260 e feijão-mungo expostas ao alumínio (0 a 100 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não
 261 houve diferença significativa entre os níveis de alumínio, enquanto o asterisco (*) indica que houve
 262 diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de alumínio (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$).
 263

264 O comprimento das raízes também foi reduzido significativamente com o
 265 aumento nos níveis de alumínio e notou-se redução de 26% e 28% no feijão-caupi e
 266 feijão-mungo, respectivamente (Figura 2A). As espécies não diferem entre si para o
 267 comprimento das raízes, exceto no controle. O volume das raízes foi afetado pelo
 268 estresse por alumínio nas duas espécies, sendo registrado redução de 40% e 45% no
 269 feijão-caupi e feijão-mungo, respectivamente, quando estas foram expostas à 100 μM
 270 de AlCl_3 em relação ao controle (Figura 2B). As plantas de feijão-caupi apresentaram
 271 maior volume de raízes que o feijão-mungo, independentemente do nível de alumínio
 272 aplicado. A massa fresca na parte aérea e das raízes das duas espécies vegetais foi
 273 reduzida em resposta ao alumínio, sendo o feijão-mungo mais afetado que o feijão-
 274 caupi. A massa fresca das raízes foi reduzida em mais de 40% nas plantas expostas
 275 à 100 μM de AlCl_3 em relação ao controle, respectivamente (Figura 2C).



276

277

278 **Figura 2.** Comprimento (A) e volume (B) das raízes, massa fresca da parte aérea e das raízes (C) de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas ao alumínio (0 a 100 μM de AlCl₃). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de alumínio, enquanto o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de alumínio (Teste Scott-Knott; p < 0,05).

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

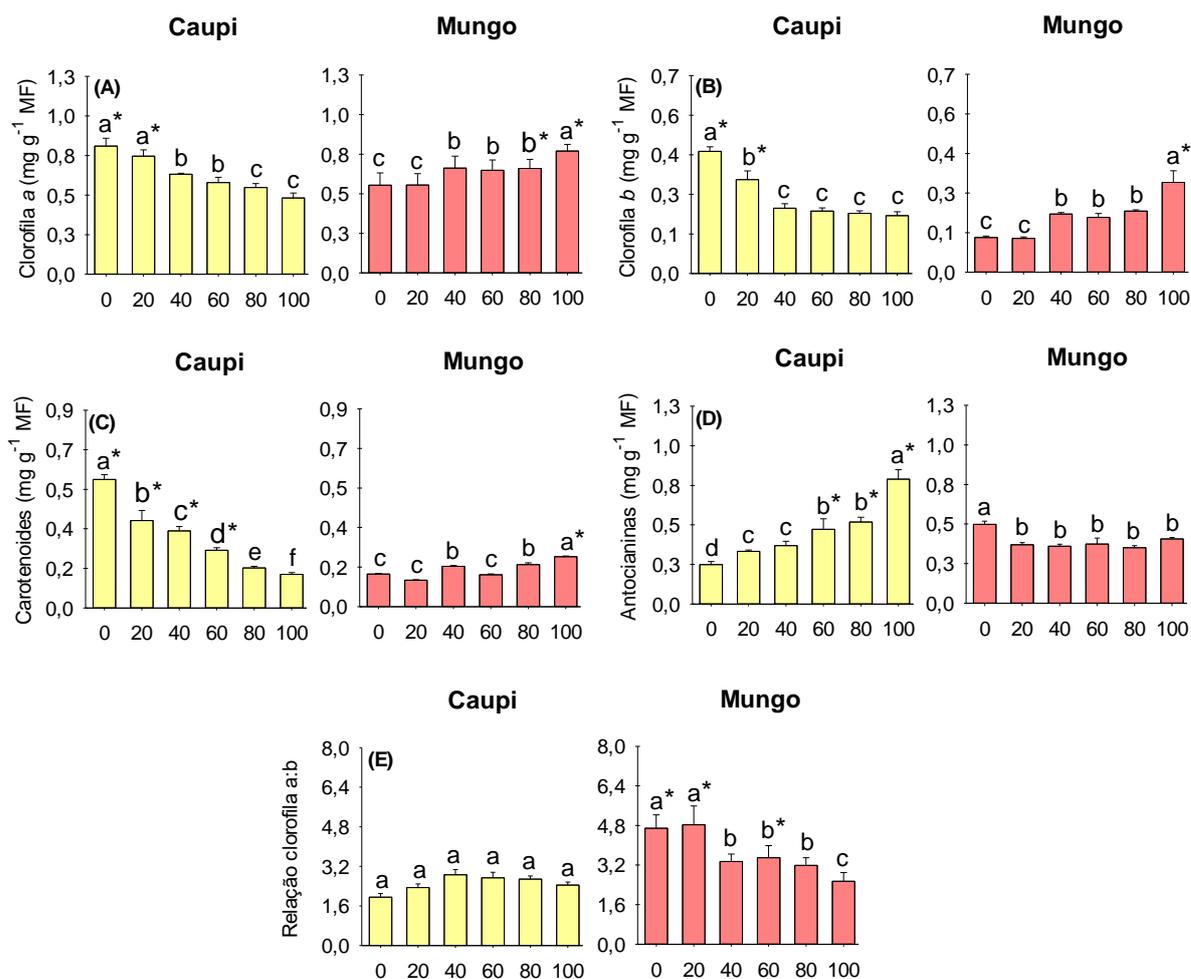
295

296

297

298

Nota-se efeito significativo dos níveis de alumínio na concentração dos pigmentos fotossintéticos das duas espécies vegetais. Enquanto as plantas de feijão-caupi exibiram redução nos níveis de clorofilas *a* e *b* e carotenoides, as plantas de feijão-mungo exibiram aumento nas concentrações de clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides em resposta ao alumínio (Figura 3). No feijão-caupi exposto à 100 μM de AlCl₃, os níveis de clorofila *a* e *b* e carotenoides foram reduzidos em 37%, 50% e 74%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 3A, 3B e 3C). Em contrapartida, as plantas de feijão-mungo exibiram aumento de 38%, 158% e 53% nas concentrações de clorofilas *a* e *b* e carotenoides, respectivamente, em resposta ao alumínio. Os teores de antocianinas aumentaram gradativamente nas plantas de feijão-caupi (até 215% em relação ao controle), enquanto o feijão-mungo exibiu decréscimo nos níveis destes compostos (Figura 3D). Nos níveis de 60, 80 e 100 μM de AlCl₃, as plantas de feijão-caupi apresentaram maiores teores de antocianinas que o feijão-mungo. A relação clorofila *a*:*b* foi aumentada até 40 μM de AlCl₃ nas plantas de feijão-caupi, enquanto que no feijão-mungo houve diminuição deste parâmetro em resposta ao alumínio (Figura 3E).



299

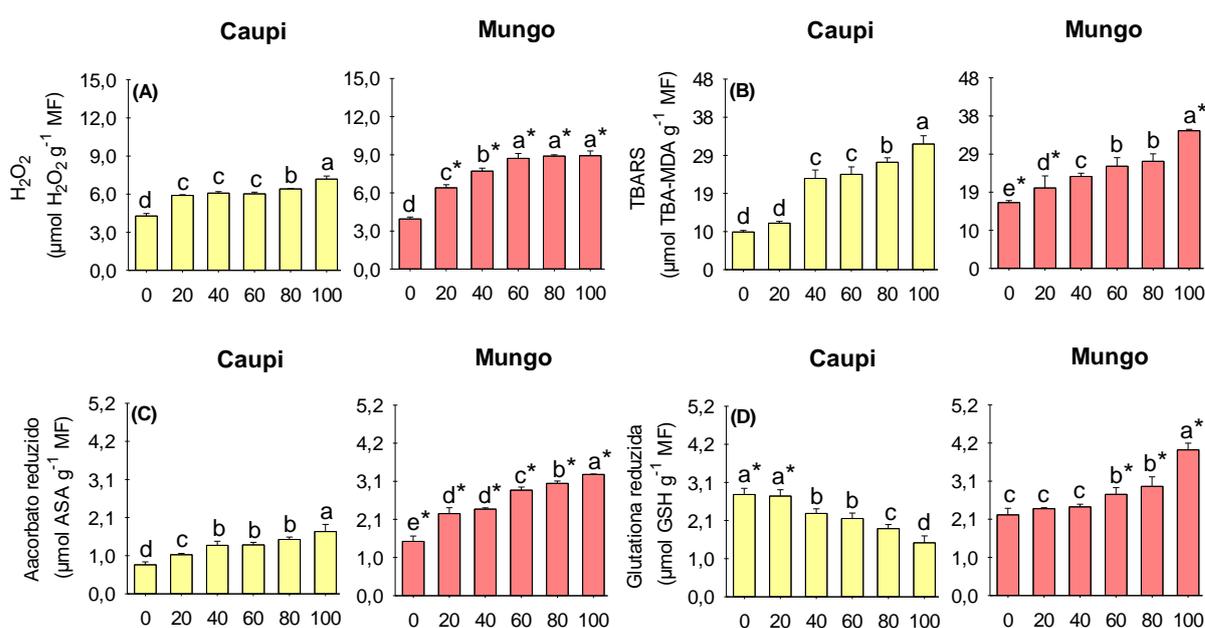
300 **Figura 3.** Conteúdo de clorofila *a* (A) e *b* (B), carotenoides (C), antocianina (D) e relação clorofila *a*:*b*
 301 (E) de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas ao alumínio (0 a 100 μM de AlCl₃). Letras
 302 minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de alumínio, enquanto
 303 o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de alumínio
 304 (Teste Scott-Knott; p < 0,05).
 305

306 3.3 Respostas do sistema redox

307 Houve incremento significativo nos níveis de H₂O₂, na peroxidação lipídica e na
 308 concentração de ascorbato reduzido nas plantas de feijão-caupi e feijão-mungo em
 309 resposta ao alumínio (Figura 4). De modo geral, o feijão-mungo apresentou níveis de
 310 H₂O₂, peroxidação lipídica e ascorbato reduzido estatisticamente superiores ao feijão-
 311 caupi. A concentração de H₂O₂ e ascorbato reduzido e a peroxidação lipídica foram
 312 aumentadas em 68%, 115% e 234% nas plantas de feijão-caupi quando expostas à
 313 100 μM de AlCl₃ – em relação ao controle (Figura 4A, 4B e 4C). Já nas plantas de
 314 feijão-mungo, os níveis de H₂O₂ e ascorbato reduzido e a peroxidação lipídica nas
 315 plantas expostas à 100 μM de AlCl₃ foram 126%, 123% e 109% superiores ao controle.

316 As duas espécies apresentaram comportamentos distintos em relação a
 317 glutatona reduzida, sendo registrado queda nos níveis destes compostos nas plantas

318 de feijão-caupi e incremento nas plantas de feijão-mungo (Figura 4D). Com exceção
 319 do observado nas plantas cultivadas com 40 μM de AlCl_3 , as duas espécies vegetais
 320 apresentaram diferença significativa na concentração de glutathiona reduzida. Quando
 321 expostas à 100 μM de AlCl_3 , as plantas de feijão-caupi exibiram redução de 47% na
 322 glutathiona reduzida e o feijão-mungo exibiram aumento de 81% na concentração deste
 323 composto em relação ao controle (Figura 4D).
 324

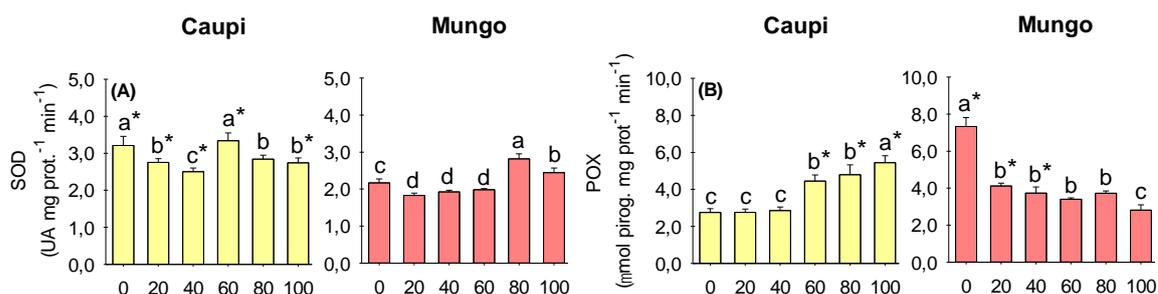


325

326 **Figura 4.** Conteúdo de peróxido de hidrogênio (A), peroxidação lipídica (B), ascorbato (C) e glutathiona
 327 (D) reduzidos de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas ao alumínio (0 a 100 μM de AlCl_3).
 328 Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de alumínio,
 329 enquanto o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de
 330 alumínio (Teste Scott-Knott; $p < 0,05$).
 331

332 Nas duas espécies vegetais, a atividade de SOD e POX exibiram
 333 comportamentos opostos em resposta ao alumínio (Figura 5). Houve redução na
 334 atividade de SOD (com exceção em 60 μM de AlCl_3) e aumento (80 e 100 μM de AlCl_3)
 335 na atividade de POX em resposta ao alumínio nas plantas de feijão-caupi, enquanto
 336 que o comportamento destas enzimas foi oposto no feijão-mungo, aumento no feijão-
 337 caupi e decréscimo no feijão-mungo. A atividade da SOD foi reduzida em 20% no
 338 feijão-caupi no tratamento 40 μM de AlCl_3 e incrementada em 30% no feijão-mungo
 339 quando expostas a 80 μM de AlCl_3 (Figura 5A). Já a atividade da POX na presença
 340 de 100 μM de AlCl_3 , registrou-se aumento de 98% no feijão-caupi e redução de 40%
 341 no feijão-mungo (Figura 5B).
 342

342



343

344

345

346

347

348

Figura 5. Atividades da dismutase do superóxido (A) e peroxidase de fenóis (B) de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas ao alumínio (0 a 100 µM de AlCl₃). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre os níveis de alumínio, enquanto o asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada nível de alumínio (Teste Scott-Knott; p < 0,05).

349

3.4 Análise multivariada

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

A análise de componentes principais (PCA) separou parcialmente as duas espécies vegetais, sendo possível notar que houve similaridade entre estas espécies quando expostas à 100 µM de AlCl₃ (Figura 6A). A PCA explicou mais 70% da variância dos dados e foram observados a formação de dois componentes principais. O primeiro componente, responsável por 43,3% da variação aos dados, foi influenciado positivamente pelos parâmetros de crescimento (com exceção da taxa de crescimento absoluto) e carotenoides (*loadings* > 0,70) e negativamente pela peroxidação lipídica (*loading* = -0,91) e pelos níveis de H₂O₂ (*loading* = -0,82) e ascorbato reduzido (*loading* = -0,81) (Figura 1B). O segundo componente, responsável por 27,6% da variação aos dados, foi caracterizado pela taxa de crescimento absoluto (*loading* = -0,81), relação clorofila *a*:*b* (*loading* = -0,91) e SOD (*loading* = 0,77) (Figuras 6A e 6B).

362

363

364

365

366

367

368

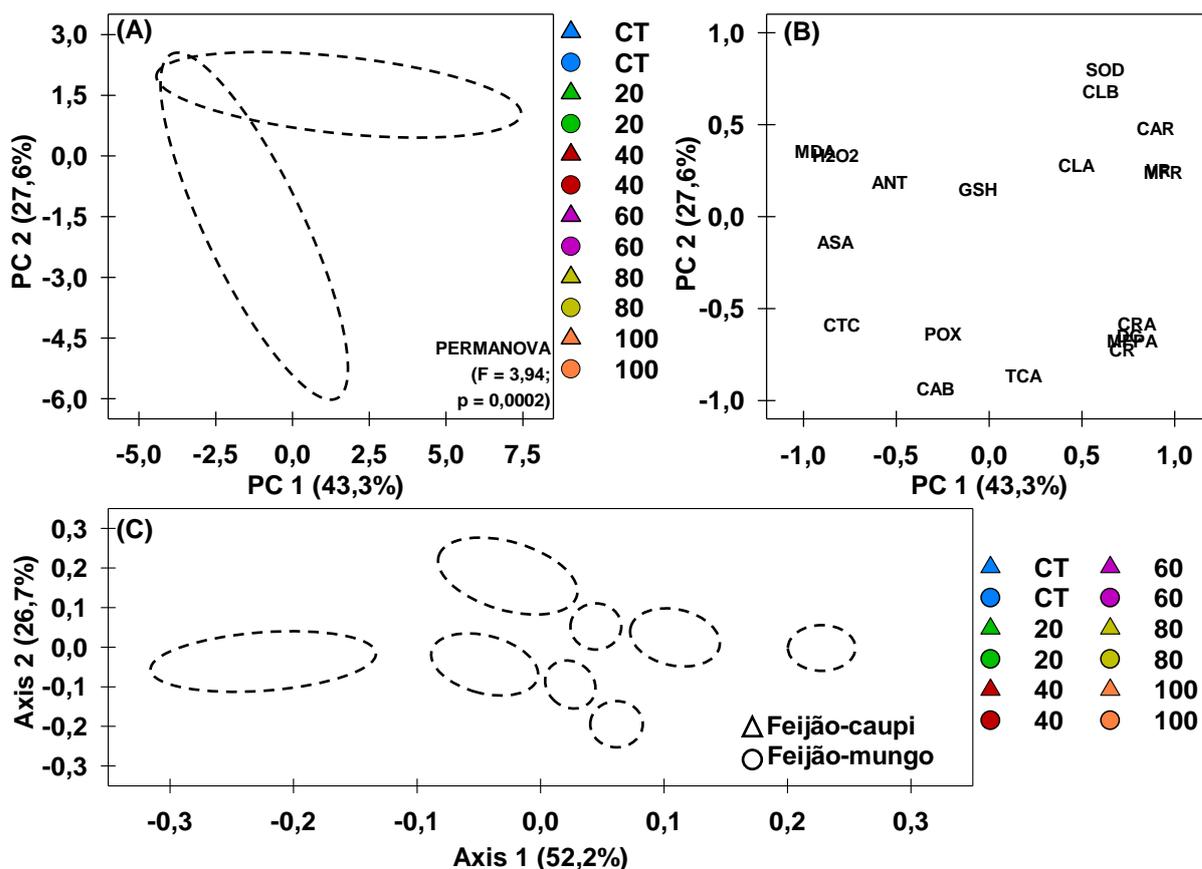
369

370

371

372

Ao analisar o escalonamento multidimensional não-métrico, notou que as plantas de feijão-caupi e feijão-mungo responderam diferentemente aos níveis crescentes de alumínio e foram identificados quatro grupos (Figura 6C). O grupo 1 das duas espécies vegetais, agrupou as plantas não estressadas (controle) e as que foram expostas a 20 µM de AlCl₃. O grupo 2 nas plantas de feijão-caupi foi formado pelas plantas expostas a 40 e 60 µM de AlCl₃, enquanto que no feijão-mungo o grupo 2 correspondeu as plantas expostas a 40 µM de AlCl₃. O grupo 3 foi composto pelas plantas expostas a 80 µM de AlCl₃ no feijão-caupi e pelas plantas expostas a 60 e 80 µM de AlCl₃ no feijão-mungo. Finalmente, o grupo 4 foi formado pelas plantas submetidas a 100 µM de AlCl₃ tanto para o feijão-caupi como para o feijão-mungo.



373
374
375
376
377

Figura 6. Análise de componentes principais (A e B) e escalonamento multidimensional não-métrico (C) dos dados obtidos após a exposição de plantas de feijão-caupi (Δ) e feijão-mungo (\circ) ao estresse por alumínio (0 a 100 μM de AlCl_3). As elipses mostram os grupos formados e confirmados pela análise multivariada permutacional de variância (PERMANOVA).

378

379 4. DISCUSSÃO

380 No presente estudo, registrou-se efeito negativo do alumínio no crescimento
381 das plantas de feijão-caupi e feijão-mungo, sendo as menores variações registradas
382 no feijão-mungo indicando que estas plantas foram mais eficientes no aporte de
383 carbono e mobilização de fotoassimilados para seu crescimento e desenvolvimento
384 (MOLERO et al., 2019). Os parâmetros de avaliação radicular (comprimento, volume
385 e massa) apontam diferenças genéticas entre as duas espécies. O feijão-caupi exibe
386 maior biomassa e distribuição radial das raízes que resultam em maior abrangência e
387 eficiência na absorção de água e nutrientes, enquanto o feijão-mungo mobiliza os
388 nutrientes absorvidos para a produção de folhas e ramos, beneficiando também, o
389 processo fotossintético (SINGH et al., 2020). É importante salientar que a redução nas
390 raízes reflete a toxicidade do alumínio que limita o alongamento radicular e a emissão
391 de novos pelos radiculares (KOPITKE et al., 2015) e pode reduzir a translocação de
392 água e nutrientes para o metabolismo das folhas (FREITAS et al., 2015).

393 Além do crescimento, o CRA foi reduzido em resposta ao incremento nos níveis
394 de alumínio. O CRA indica a quantidade de água no tecido vegetal que seja ideal para
395 o funcionamento e equilíbrio de processos bioquímicos e relações hídricas, sendo os
396 valores ótimos em torno de 90% (KATUWAL et al., 2020). O decréscimo no CRA das
397 plantas estudadas indica limitação na captação de água do solo possivelmente devido
398 ao fechamento estomático, redução da transpiração e aumento da lignificação das
399 raízes que, conseqüentemente, limita a disponibilidade de água para os processos
400 metabólicos (SINGH et al., 2017).

401 As alterações nos níveis dos pigmentos relacionados a fotossíntese, clorofilas
402 *a* e *b* e carotenoides, em resposta ao alumínio evidenciam as diferenças entre as
403 plantas de feijão-caupi e feijão-mungo em condições de estresse. Os maiores teores
404 de pigmentos fotossintéticos no feijão-mungo podem justificar a maior TCA, pois as
405 clorofilas *a* e *b* atuam diretamente na fotossíntese. Estes pigmentos participam dos
406 processos de transferência de energia para produção de ATP e NADPH que serão
407 utilizados na fixação de CO₂ e produção de carboidratos que serão, posteriormente,
408 utilizados para o crescimento vegetal (REA et al., 2019). A redução das clorofilas (*a* e
409 *b*) no feijão-caupi se dá possivelmente pelo aumento de EROs que degradam estes
410 pigmentos (CÁRCAMO et al., 2018). Já no feijão-mungo, apesar de níveis crescentes
411 de H₂O₂, houveram diferentes modulações do sistema antioxidante proporcionando
412 proteção as células e seus componentes (ZANDALINAS et al., 2017).

413 Os níveis de carotenoides e antocianinas (pigmentos acessórios) foram
414 diferentemente modulados nas duas espécies em resposta ao alumínio. Os níveis de
415 carotenoides foram reduzidos apenas no feijão-caupi e isto possivelmente é devido as
416 diferenças genéticas entre as duas espécies (LI et al., 2017; NAZIR et al., 2020). Os
417 carotenoides são pigmentos que atuam na dissipação de energia e na ausência
418 destes as plantas passam a utilizar outros meios para inibir os efeitos tóxicos do
419 alumínio, tais como as antocianinas que aumentaram neste estudo em planta de
420 feijão-caupi (DORNELES et al., 2019). Diferentemente do observado no presente
421 estudo, Ali (2017) registrou declínio nos níveis de carotenoides em plantas de feijão-
422 mungo sob estresse severo por alumínio (10,0 mM). A pequena variação nos
423 carotenoides indica que as concentrações de alumínio induzem outros meios para a
424 dissipação de energia, tais como o aumento nos níveis de clorofila *b* (ALI, 2017;
425 VASCONCELOS et al., 2020).

426 Os estresses abióticos induzem a elevação de compostos tóxicos, sendo mais
427 comum as EROs, a exemplo do H₂O₂, que resulta em estresse oxidativo nas células
428 e danos aos componentes celulares (FAROOQ et al., 2019). No presente estudo,
429 houve aumento na concentração de H₂O₂ e na peroxidação lipídica nas plantas de
430 feijão-caupi e o feijão-mungo. Além disso, a concentração do ascorbato reduzido em
431 plantas de feijão-caupi e feijão-mungo foi aumentada em resposta ao alumínio. O
432 ascorbato é substrato da enzima peroxidase do ascorbato que detoxifica o H₂O₂ e
433 também atua na manutenção do estado reduzido das metaloproteínas e enzimas do
434 sistema de defesa antioxidante (HASANUZZAMAN et al., 2019). Ascorbato atua
435 juntamente com a glutathione no ciclo ascorbato-glutathione e são antioxidantes
436 importantes a nível celular.

437 No presente estudo, registrou-se redução linear nos níveis de glutathione
438 reduzida nas plantas de feijão-caupi. Em contrapartida, houve aumento neste
439 antioxidante no feijão-mungo em resposta aos níveis crescentes de alumínio. Estas
440 respostas indicam que cada espécie estabelece um equilíbrio redox diferente.
441 Juntamente com o ascorbato, a glutathione atua na inativação de xenobióticos, na
442 manutenção da homeostase redox e na morte celular programada de células além de
443 mitigar o estresse oxidativo induzido pelas condições adversas dos estresses
444 abióticos (HASANUZZAMAN et al., 2019). Sob estresse por metal, especificamente o
445 cádmio, plantas de feijão-mungo mantem níveis aumentados de glutathione a fim de
446 mitigar o estresse oxidativo (NAHAR et al., 2016).

447 Além do ciclo ascorbato-glutathione, a glutathione reduzida atua em vários
448 processos metabólicos relacionados direta ou indiretamente com o crescimento das
449 espécies vegetais, tais como a assimilação de enxofre, a síntese de fitoquelatinas e a
450 manutenção das redutases que utilizam NADPH e NADH produzidos no processo
451 fotossintético e respiratório em folhas (MITTLER, 2017; RADY et al., 2018). É possível
452 que a redução nos níveis de glutathione reduzida esteja relacionado com o declínio do
453 processo fotossintético e respiratório, juntamente com a redução na concentração de
454 clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides, que influenciam na produção dos doadores de
455 elétrons necessários para as reações da fotossíntese (MITTLER, 2017).

456 Para lidar com o estresse oxidativo, as plantas desenvolveram várias
457 estratégias e uma destas é o sistema enzimático de defesa antioxidante, que inclui
458 várias enzimas, com destaque para SOD, CAT, APX e POX (NOCTOR; FOYER,
459 2017). No feijão-caupi, a presença do alumínio induziu redução na atividade de SOD

460 e aumento na atividade de POX em alguns níveis de alumínio. Já nas plantas de feijão-
461 mungo, houve aumento na atividade da SOD e redução na atividade de POX. É
462 possível que o alumínio tenha induzido aumento nos níveis do $O_2^{\bullet-}$, uma ERO que
463 induz risco as células e que é substrato da SOD. O $O_2^{\bullet-}$ pode ser produzido através
464 da fotorredução do O_2 nos tilacoides ou da reação de Mehler como forma de
465 dissipação energética visando reduzir a sobrecarga nos fotossistemas induzida pelo
466 excesso de elétrons (CZARNOCKA; KARPIŃSKI, 2018).

467 A POX atua na inativação do H_2O_2 , uma molécula que atua como sinalizadora
468 intracelular em baixos níveis e como ERO em níveis elevados, sendo acumulado em
469 cloroplastos e mitocôndrias como resposta ao estresse (VAN DOORN; KETSA, 2014;
470 CARVALHO; SILVEIRA, 2020). Wang et al. (2010) registraram aumento da atividade
471 das enzimas antioxidantes CAT, SOD, APX e POD em consequência do incremento
472 nos níveis de EROs, principalmente o radical superóxido e peróxido de hidrogênio,
473 que levou as plantas de feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris*) ao estresse oxidativo em
474 decorrência do alumínio. Resposta similares foram observadas em plantas de feijão-
475 caupi na presença do alumínio, com aumento significativo das enzimas antioxidativas,
476 porém as EROs acarretaram em maiores danos as membranas celulares e
477 vazamentos do conteúdo celular (JESUS et al., 2017).

478

479 5. CONCLUSÃO

480 Os níveis elevados de alumínio interferem negativamente no crescimento e no
481 status hídrico do feijão-caupi e feijão-mungo. As plantas de feijão-mungo possuem
482 melhor habilidade em lidar com níveis elevados de alumínio e exibem incremento nas
483 concentrações dos pigmentos fotossintéticos e nas formas reduzidas do ascorbato e
484 glutathione. Conforme as respostas encontradas nas menores perdas nos parâmetros
485 de crescimento e principalmente nos incrementos de pigmentos fotossintéticos e
486 menores variação na peroxidação lipídica em relação as plantas não-estressadas, as
487 plantas de feijão-mungo são menos sensíveis que o feijão-caupi aos níveis elevados
488 de alumínio.

489

490 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

491 ALI, B. Salicylic acid induced antioxidant system enhances the tolerance to aluminium in mung bean
492 (*Vigna radiata* L. Wilczek) plants. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 178-189, 2017.

- 493 AYENI, O.; KAMBIZI, L.; LAUBSCHER, C.; FATOKI, O.; OLATUNJI, O. Risk assessment of wetland
494 under aluminium and iron toxicities: a review. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 17, n. 2,
495 p. 122-128, 2014.
- 496 BARRS, H.D.; WEATHERLEY, P.E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating
497 water deficits in leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 3, p. 413-428, 1962.
- 498 BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to
499 acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- 500 BENICASA, M. M. P. **Análise de Crescimento de Plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP,
501 2004. 42p.
- 502 BRENNAN, T.; FRENKEL, C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear.
503 **Plant Physiology**, v. 59, n. 3, p. 411-416, 1977.
- 504 CÁRCAMO, M.P.; REYES-DÍAZ, M.; RENGEL, Z.; ALBERDI, M.; OMENA-GARCIA, R.P.; NUNES-
505 NESI, A.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C. Aluminum stress differentially affects physiological
506 performance and metabolic compounds in cultivars of highbush blueberry. **Scientific Reports**, v. 9, n.
507 1, p. 1-13, 2019.
- 508 CARVALHO, F.E.L.; SILVEIRA, J.A.G. H₂O₂-retrograde signaling as a pivotal mechanism to understand
509 priming and cross stress tolerance in plants. In: HOSSAIN, M.A.; LIU, F.; BURRITT, D.J.; FUJITA, M.;
510 HUANG, B. (Ed.). **Priming-mediated stress and cross-stress tolerance in crop plants**. Academic
511 Press, 2020. p. 57-78.
- 512 CZARNOCKA, W.; KARPIŃSKI, S. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and
513 signaling in plant response to environmental stresses. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 122, n.
514 1, p. 4-20, 2018.
- 515 JESUS, L.R.; BATISTA, B.L.; LOBATO, A.K.S. Silicon reduces aluminum accumulation and mitigates
516 toxic effects in cowpea plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 6, p. 138, 2017.
- 517 DORNELES, A.O.S.; PEREIRA, A.S.; SASSO, V.M.; POSSEBOM, G.; TAROUÇO, C.P.; SCHORR,
518 M.R.W.; ROSSATO, L.; FERREIRA, P.A.A.; TABALDI, L.A. Aluminum stress tolerance in potato
519 genotypes grown with silicon. **Bragantia**, v. 78, n. 1, p. 12-25, 2019.
- 520 EMBRAPA. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) declara 2016**
521 **como o “Ano Internacional dos Pulses”**. 2015. Disponível em: [https://www.embrapa.br/busca-de-](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/7127460/organizacao-das-nacoes-unidas-para-alimentacao-e-agricultura-fao-declara-2016-como-o-ano-internacional-dos-pulses)
522 [noticias/-/noticia/7127460/organizacao-das-nacoes-unidas-para-alimentacao-e-agricultura-fao-](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/7127460/organizacao-das-nacoes-unidas-para-alimentacao-e-agricultura-fao-declara-2016-como-o-ano-internacional-dos-pulses)
523 [declara-2016-como-o-ano-internacional-dos-pulses](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/7127460/organizacao-das-nacoes-unidas-para-alimentacao-e-agricultura-fao-declara-2016-como-o-ano-internacional-dos-pulses) Acesso: 15/08/2019
- 524 FAO; ITPS. **Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Main Report**. Food and Agriculture
525 Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy, 2015.
- 526 FAROOQ, M.A.; NIAZI, A.K.; AKHTAR, J.; FAROOQ, M.; SOURI, Z.; KARIMI, N.; RENGEL, Z. Acquiring
527 control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress
528 responses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 141, n. 1, p. 353-369, 2019.
- 529 FREITAS, L.B.; FERNANDES, D.M.; MAIA, S.C. M. Silício na nutrição mineral e acúmulo de alumínio
530 em plantas de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 4, p. 440-448, 2015.
- 531 GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant**
532 **Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- 533 GITELSON, A.A.; MERZLYAK, M.; CHIVKUNOVA, O. Optical properties and nondestructive estimation
534 of anthocyanin content in plant leaves. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n.1, p. 28-45, 2001.
- 535 GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and
536 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 207-212, 1980.
- 537 GÜNEŞ, A.; KORDALI, Ş.; TURAN, M.; BOZHÜYÜK, A.U. Determination of antioxidant enzyme activity
538 and phenolic contents of some species of the Asteraceae family from medicinal plants. **Industrial Crops**
539 **and Products**, v. 137, n. 1, p. 208-213, 2019.

- 540 HASANUZZAMAN, M.; BHUYAN, M.H.M.; ANEE, T.I.; PARVIN, K.; NAHAR, K.; MAHMUD, J.A.;
541 FUJITA, M. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under
542 abiotic stress. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 384, 2019.
- 543 HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of
544 catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- 545 HE, H.; LI, Y.; HE, L.F. Aluminum toxicity and tolerance in Solanaceae plants. **South African Journal**
546 **of Botany**, v. 123, n. 1, p. 23-29, 2019.
- 547 HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of
548 fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.
- 549 HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soils**.
550 Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347 p.
- 551 KAMPFENKEL, K.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, R. Extraction and determination of ascorbate and
552 dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, v. 225, n. 1, p. 165-167, 1995.
- 553 KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf
554 senescence. **Plant Physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.
- 555 KATUWAL, K.B.; XIAO, B.; JESPERSEN, D. Physiological responses and tolerance mechanisms of
556 seashore *Paspalum* and *Centipede* grass exposed to osmotic and iso-osmotic salt stresses. **Journal of**
557 **Plant Physiology**, 153154, 2020.
- 558 KOPITTKKE, P.M.; MOORE, K.L.; LOMBI, E.; GIANONCELLI, A.; FERGUSON, B.J.; BLAMEY, F.P.C.;
559 MENZIES, N.W.; NICHOLSON, T.M.; MCKENNA, B.A.; WANG, P.; GRESSHOFF, P.M.;
560 KOUROUSIAS, G.; WEBB, R.I.; GREEN, K.; TOLLENAERE, A. Identification of the primary lesion of
561 toxic aluminum in plant roots. **Plant Physiology**, v. 167, n. 4, p. 1402-1411, 2015.
- 562 LI, Z.; XU, J.; GAO, Y.; WANG, C.; GUO, G.; LUO, Y.; HU, W.; SHETEIWY, M.S.; GUAN, Y.; HU, J. The
563 synergistic priming effect of exogenous salicylic acid and H₂O₂ on chilling tolerance enhancement during
564 maize (*Zea mays* L.) seed germination. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n.1, p. 1153, 2017.
- 565 MITTLER, R. Estresse abiótico. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. (Org.).
566 **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 761-791.
- 567 MOLERO, G.; TCHERKEZ, G.; ROCA, R.; MAUVE, C.; CABRERA-BOSQUET, L.; ARAUS, J.L.;
568 NOGUÉS, S.; ARANJUELO, I. Do metabolic changes underpin physiological responses to water
569 limitation in alfalfa (*Medicago sativa*) plants during a regrowth period? **Agricultural Water**
570 **Management**, v. 212, n. 1, p. 1-11, 2019.
- 571 NAHAR, K.; HASANUZZAMAN, M.; ALAM, M.M.; RAHMAN, A.; SUZUKI, T.; FUJITA, M. Polyamine
572 and nitric oxide crosstalk: antagonistic effects on cadmium toxicity in mung bean plants through
573 upregulating the metal detoxification, antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems.
574 **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, n. 1, p. 245-255, 2016.
- 575 NAHAR, K.; HASANUZZAMAN, M.; SUZUKI, T.; FUJITA, M. Polyamines-induced aluminum tolerance
576 in mung bean: A study on antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems.
577 **Ecotoxicology**, v. 26, p. 1, p. 58-73, 2017.
- 578 NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach
579 chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- 580 NAZIR, F.; FARIDUDDIN, Q.; KHAN, T.A. Hydrogen peroxide as a signaling molecule in plants and its
581 crosstalk with other plant growth regulators under heavy metal stress. **Chemosphere**, 126486, 2020.
- 582 RADY, M.; TAHA, S.; KUSVUR, S. Integrative application of cyanobacteria and antioxidants improves
583 common bean performance under saline conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 61-69, 2018.
- 584 REA, G.; ANTONACCI, A.; LAMBREVA, M.D.; MATTOO, A.K. Features of cues and processes during
585 chloroplast-mediated retrograde signaling in the alga *Chlamydomonas*. **Plant Science**, v. 272, n. 1, p.
586 193-206, 2018.

- 587 SCHMITT, M.; WATANABE, T.; JANSEN, S. The effects of aluminium on plant growth in a temperate
588 and deciduous aluminium accumulating species. **AoB Plants**, v. 8, n.1, p., 2016.
- 589 SILVA, M.E.C.; BONIFACIO, A. Proteção oxidativa em plantas de feijão-caupi co-inoculadas com
590 rizóbio e *Trichoderma* em resposta ao estresse por alumínio. In: I Seminário Integrado da UFPI e XXVIII
591 Seminário de Iniciação Científica, 2019, Teresina-PI. I Seminário Integrado da UFPI e XXVIII Seminário
592 de Iniciação Científica. Teresina: EDUFPI, 2019.
- 593 SINGH, S.; TRIPATHI, D.K.; SINGH, S.; SHARMA, S.; DUBEY, N.K.; CHAUHAN, D.K.; VACULÍK, M.
594 Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. **Environmental and**
595 **Experimental Botany**, v. 137, n. 1, p. 177-193, 2017.
- 596 SINGH, R.K.; DESHMUKH, R.; MUTHAMILARASAN, M.; RANI, R.; PRASAD, M. Versatile roles of
597 aquaporin in physiological processes and stress tolerance in plants. **Plant Physiology and**
598 **Biochemistry**, v. 149, n.1, p. 178-189, 2020.
- 599 VAN DOORN, W.G.; KETSA, S. Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol)
600 peroxidase. **Postharvest Biology and Technology**, v. 95, n. 1, p. 64-69, 2014.
- 601 VASCONCELOS, C.V.; COSTA, A.C.; MÜLLER, C.; CASTOLDI, G.; COSTA, A.M.; BARBOSA, K.P.;
602 RODRIGUES, A.A.; SILVA, A.A. Potential of calcium nitrate to mitigate the aluminum toxicity in
603 *Phaseolus vulgaris*: effects on morphoanatomical traits, mineral nutrition and photosynthesis.
604 **Ecotoxicology**, v. 29, n. 2, p. 203-216, 2020.
- 605 WANG, H.H.; HUANG, J.J.; BI, Y.R. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in
606 aluminum tolerance in red kidney bean roots, **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 281-288, 2010.
- 607 ZANDALINAS, S.I.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A. Modulation of antioxidant
608 defense system is associated with combined drought and heat stress tolerance in citrus. **Frontiers in**
609 **Plant Science**, v. 8, n.1, p. 953, 2017.

CAPÍTULO III

1

2

3 **Respostas oxidativas em leguminosas submetidas aos estresses de salinidade**
4 **ou alumínio isolados e em combinação com sombreamento**

5

6 (Oxidative responses in legumes submitted to salinity or aluminum isolated and in
7 combination with lower irradiance)

8

9

RESUMO

10

11

12 As mudanças climáticas, escassez de recursos naturais e crescimento da população
13 mundial, tem colocado as leguminosas em papel de destaque no cenário mundial,
14 principalmente pelas características positivas que estas possuem. Porém estas, bem
15 como outras espécies vegetais, são frequentemente expostas a uma gama de
16 estresses abióticos afetando a produção e produtividade agrícola. Estas condições
17 adversas podem ocorrer de forma isolada ou combinada (em pares ou de forma
18 múltipla) e estes atuam sinergicamente ou antagonicamente provocando alterações
19 no metabolismo vegetal, mudanças estas que devem ser abordadas separadamente
20 pela diferença entre as respostas bioquímicas de defesa do estresse individual e
21 estresses combinados. Este trabalho teve por objetivo analisar a ação do sistema de
22 defesa antioxidante de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo quando estas foram
23 submetidas aos estresses com ou sem sombreamento isolados e combinados com
24 alumínio ou salinidade. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em
25 esquema fatorial 6 x 2, sendo seis tratamentos resultantes da combinação de estresse
26 salino (0 e 100 mM de NaCl) ou por alumínio (0 e 80 μ M de AlCl₃) e com ou sem
27 sombreamento e duas espécies vegetais (feijão-caupi e feijão-mungo). Há reduções
28 do H₂O₂ em sombreamento para o feijão-caupi e aumento em condições de luz
29 ambiente combinada ao alumínio ou salinidade para ambas as espécies. Há reduções
30 nos danos as membranas lipídicas em ambas espécies em condições de luz ambiente
31 com alumínio e co-estresse sombreamento e alumínio ou sal. As enzimas CAT, SOD,
32 APX e POX são estimuladas em condições sem sombreamento combinados ao
33 alumínio e ou salinidade. As espécies de feijão-caupi e feijão-mungo apresentaram
34 variações geração de EROs, nos danos celulares e na atividade das enzimas
35 antioxidantes em condições com ou sem sombreamento isolados e combinados ao
36 alumínio ou a salinidade, inferindo que não se pode estimar os efeitos de estresses
37 abióticos combinados a partir de estresses aplicados isoladamente. A ação
38 coordenada do sistema antioxidante vegetal e menores danos celulares sugerem
39 tolerância das espécies a estresse abióticos combinados

40

41 **Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*, *Vigna radiata*, co-estresse, sistema antioxidante.

ABSTRACT

42

43

44 Climate change, scarcity of natural resources and growth of the world population, has
45 put legumes in a prominent role on the world stage, mainly due to their positive
46 characteristics. However, these, as well as other plant species, are often exposed to a
47 range of abiotic stresses affecting agricultural production and productivity. These
48 adverse conditions can occur in isolation or in combination (in pairs or multiple) and
49 they act synergistically or antagonistically causing changes in plant metabolism,
50 changes that must be addressed separately by the difference between the biochemical
51 responses of defense of individual stress and stresses combined. This work aimed to
52 analyze the action of the antioxidant defense system of cowpea and mung bean plants
53 when they were subjected to stresses with or without isolated shading and combined
54 with aluminum or salinity. The experimental design was completely randomized in a 6
55 x 2 factorial scheme, with six treatments resulting from the combination of salt stress
56 (0 and 100 mM NaCl) or by aluminum (0 and 80 μ M AlCl₃) and with or without shading
57 and two plant species (cowpea and mung beans).

58 There are reductions in H₂O₂ in shading for cowpea and an increase in ambient light
59 conditions combined with aluminum or salinity for both species. There are reductions
60 in damage to lipid membranes in both species under ambient light conditions with
61 aluminum and shading and aluminum or salt co-stress. The enzymes CAT, SOD, APX
62 and POX are stimulated in conditions without shading combined with aluminum and or
63 salinity. The species of cowpea and mung bean showed variations in ROS generation,
64 cell damage and antioxidant enzyme activity in conditions with or without shading
65 isolated and combined with aluminum or salinity, inferring that stress effects cannot be
66 estimated abiotically combined from stresses applied alone. The coordinated action of
67 the plant antioxidant system and less cellular damage suggest species tolerance to
68 combined abiotic stress.

69

70 **Keywords:** *Vigna unguiculata*, *Vigna radiata*, co-stresses, antioxidant system.

71 1. INTRODUÇÃO

72 As mudanças climáticas, escassez de recursos naturais e crescimento da
73 população mundial, tem colocado as leguminosas em papel de destaque no cenário
74 mundial. Estas plantas são bastante utilizadas na agricultura de subsistência gerando
75 emprego e renda para muitas famílias de baixa renda e, portanto, possuem importante
76 papel socioeconômico no continente asiático, africano e americano (PANDEY et al.,
77 2016). Além dos seus efeitos positivos na segurança alimentar, principalmente devido
78 à elevada carga nutricional em vitaminas, minerais (cálcio, zinco, ferro e magnésio),
79 lipídios e proteínas, as leguminosas tornam o ecossistema mais eficiente uma vez que
80 são capazes de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio
81 atmosférico aumentando o aporte de nitrogênio para o ambiente natural (AFZAL et al.,
82 2019; VANLAUWE et al., 2019).

83 As leguminosas, bem como outras espécies vegetais, são frequentemente
84 expostas a uma gama de adversidades ambientais ou estresses abióticos, com
85 destaque para alta e baixa luminosidade, seca, temperatura alta e baixa, déficit
86 nutricional, inundação, salinidade e metais pesados, sendo processos naturais ou por
87 ações antrópicas (NOCTOR; FOYER, 2016). Estas condições afetam de forma
88 relevante a produção agrícola, produtividade, qualidade da produção e segurança
89 alimentar tornando-se, portanto, um desafio em todo o mundo (ZANDALINAS et al.,
90 2018). Em condições naturais, os estresses abióticos podem ocorrer de forma isolada
91 ou combinada (em pares ou de forma múltipla) e estes atuam sinergicamente ou
92 antagonicamente provocando alterações na homeostase vegetal. Segundo Feng et al.
93 (2020), é possível que as mudanças metabólicas provocadas pelo estresse individual
94 sejam diferentes do que é observado nos estresses combinados.

95 Os estresses abióticos, isolados ou combinados, podem resultar em estresse
96 oxidativo e este afeta as plantas no nível celular, fisiológico, bioquímico e molecular.
97 O estresse oxidativo se caracteriza pelo desequilíbrio e superprodução de espécies
98 reativas de oxigênio (EROs), com destaque para peróxido de hidrogênio (H_2O_2),
99 superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e oxigênio “singleto” (1O_2). As EROs são produzidas durante os
100 processos de dissipação de energia no citosol e em organelas celulares (cloroplasto,
101 peroxissomos e mitocôndrias) e são úteis na sinalização e regulação dos processos
102 redox (FOYER, 2018). Apesar dos seus efeitos positivos, as EROs causam danos que
103 vão desde a peroxidação das membranas lipídicas da célula, oxidação de pigmentos

104 e ácidos nucleicos, desnaturaçãõ de proteínas, inativaçãõ de enzimas até a induçãõ
105 da morte celular programada (MARTINEZ et al., 2018).

106 As espécies vegetais possuem enzimas desintoxicantes específicas para cada
107 tipo de EROs. Enquanto a enzima dismutase do superóxido atua na oxidaçãõ/reduçãõ
108 do $O_2^{\bullet-}$ produzido no fotossistema II, a enzima catalase atua conversãõ de H_2O_2 em
109 O_2 e água (NOCTOR et al., 2014). Adicionalmente, as enzimas peroxidase do
110 ascorbato e da glutathione atuam diretamente na inativaçãõ do H_2O_2 utilizando os
111 antioxidantes hidrofílicos ascorbato e a glutathione em uma serie de reações
112 coordenadas que fazem parte do ciclo ascorbato-glutathione (KAPOOR et al., 2019;
113 GUPTA et al., 2016). Outras enzimas e antioxidantes sãõ relatados como auxiliares
114 no processo de balanço redox e mitigaçãõ do estresse oxidativo, tais como as enzimas
115 glutathione redutase, monodesidroascorbato redutase, glutathione S-transferase,
116 peroxirredoxina, guaiacol peroxidase e deidroascorbato redutase e os antioxidantes
117 α -tocoferóis e carotenoides (NOCTOR et al., 2016; CHOUDHURY et al., 2017).

118 Embora seja sabido que as enzimas e os compostos nãõ enzimáticos que
119 fazem parte do sistema antioxidante de plantas sejam importantes e exerçam grande
120 influênciã nas mudançãs metabólicas provocadas pelos estresses abióticos,
121 informações sobre como as plantas respondem e adquirem uma nova homeostase
122 frente aos estresses abióticos múltiplos sãõ escassos. É importante salientar que as
123 respostas observadas em plantas submetidas aos estresses abióticos individualmente
124 nãõ podem ser extrapoladas para quando estes estresses sãõ combinados. Assim,
125 este trabalho teve por objetivo analisar a açãõ do sistema de defesa antioxidante de
126 plantas de feijãõ-caupi e feijãõ-mungo quando estas foram submetidas aos estresses
127 de com ou sem sombreamento isolados e combinadas com alumínio ou salinidade.

128

129 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

130 **2.1 Delineamento experimental e tratamentos utilizados**

131 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial
132 6×2 , sendo seis tratamentos resultantes da combinaçãõ de estresse salino (0 e 100
133 mM de NaCl) ou por alumínio (0 e 80 μ M de $AlCl_3$) com ou sem sombreamento (400
134 e 1600 μ mol $m^{-2} s^{-1}$ de intensidade de fluxo de fótons, respectivamente) e duas
135 espécies vegetais (feijãõ-caupi e feijãõ-mungo), com três repetições. Os tratamentos
136 foram: (1) controle (luz ambiente); (2) estresse por alumínio (80 μ M de $AlCl_3$); (3)

137 estresse salino (100 mM de NaCl); (4) sombreamento; (5) estresse por alumínio com
138 sombreamento; e (6) estresse salino com sombreamento. O sombreamento foi
139 estabelecido com auxílio de uma cobertura feita de sombrite de 75% e instalada dentro
140 da casa de vegetação (Apêndice 1).

141

142 **2.2 Instalação e condução do experimento**

143 O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de
144 Biologia localizada no Centro de Ciências da Natureza (UFPI; Teresina/PI). Sementes
145 de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e feijão-mungo (*V. radiata*) foram cedidas pela
146 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Meio-Norte (Teresina/PI.
147 Antes do plantio, as sementes foram selecionadas e desinfestadas com NaClO 1%
148 (60 s) e, posteriormente, semeadas em vasos de 3,5 kg preenchidos com areia
149 lavada. Cada unidade experimental foi composta por duas plantas por vaso. Desde o
150 plantio e após a emissão do primeiro trifólio, as plantas foram regadas com água
151 destilada em alternância com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950). Com a
152 emissão do terceiro trifólio, realizou-se a diferenciação dos tratamentos e as plantas
153 passaram a ser irrigadas com solução nutritiva adicionada de AlCl₃ ou NaCl (conforme
154 tratamento). Concomitantemente, as plantas foram separadamente expostas à 400 ou
155 1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante o experimento, a luminosidade do ambiente foi mensurada
156 com auxílio de um luxímetro portátil Smart Sensor AS803. A coleta se deu aos 40 dias
157 após a semeadura, momento em que as plantas apresentaram perda de turgor foliar
158 e clorose. Na ocasião da coleta, amostras foliares frescas foram acondicionadas em
159 freezer a -20 °C para serem utilizadas nas análises bioquímicas. Após as análises
160 bioquímicas, a massa seca da parte aérea e raízes foi quantificada após secagem em
161 estufa de aeração forçada (65 °C) até peso constante.

162

163 **2.3 Análises bioquímicas**

164 **2.3.1 Indicadores de estresse e compostos antioxidantes**

165 Para determinação do H₂O₂, da peroxidação lipídica e das formas reduzidas de
166 ascorbato e glutathiona, amostras foliares foram maceradas em TCA 5% (3 min) e
167 centrifugadas a 10.000 g (4°C) por 5 min. Em seguida, o sobrenadante (extrato) foi
168 recolhido. Para mensurar a concentração de H₂O₂ (BRENNAN; FRENKELL, 1977),
169 alíquotas do extrato foram misturadas com FeSO₄ 100 μM , (NH₄)₂SO₄ 250 μM , H₂SO₄
170 25 mM, alaranjado de xilenol 100 μM e sorbitol 99 mM. Após 30 min a temperatura

171 ambiente (25 °C), a mistura foi lida a 560 nm em espectrofotômetro. A concentração
172 de H₂O₂ foi calculada e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$. Para a peroxidação lipídica
173 (HEATH; PACKER, 1968), alíquotas do extrato foram misturadas com solução ácida
174 de TBA (TCA 20% e TBA 0,5%; p/v) e levadas ao banho-maria a 100°C (1 h). Em
175 seguida, a mistura foi resfriada e então lidas em espectrofotômetro a 532 e 660 nm. A
176 peroxidação lipídica foi quantificada por meio do coeficiente de extinção molar de
177 $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e valores foram expressos em $\eta\text{mol TBA-MDA (malonaldeído)} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

178 Quantificou-se a concentração do ascorbato reduzido (ASA) utilizando a
179 metodologia proposta por Kampfenkel et al. (1995). Alíquotas do extrato foram
180 misturadas com tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,4), TCA 10%, ácido
181 fosfórico 45%, biperidil 4% e FeCl₃ 3%. Em seguida, a mistura foi lida a 525 nm. Com
182 base na curva-padrão, calculou-se a concentração do ASA que foi expressa em μmol
183 ASA $\text{g}^{-1} \text{ MF}$. A glutathiona reduzida (GSH) foi mensurada conforme metodologia de
184 Griffith (1980). Alíquotas do extrato foram misturados com tampão fosfato de potássio
185 150 mM (pH 7,6) e 5,5-ditio-bis-2-ácido nitobenzóico (DTNB) 6,0 mM e mantido a
186 30 °C por 10 min. Em seguida, procedeu-se a leitura das amostras a 412 nm. Após os
187 cálculos, os dados foram expressos em $\mu\text{mol GSH g}^{-1} \text{ MF}$.

188

189 **2.3.2 Enzimas antioxidativas**

190 Para a determinação da atividade das enzimas CAT (EC 1.11.1.6), SOD (EC
191 1.15.1.1), APX (EC 1.11.1.1) e POX (EC 1.11.1.7), preparou-se o extrato enzimático
192 utilizando amostras foliares frescas. As amostras vegetais foram maceradas em
193 almofariz e pistilo na presença de tampão fosfato de potássio 100 mM contendo EDTA
194 1,0 mM e ascorbato 1,0 mM. Após centrifugação a 14.000 g (4 °C) por 25 min, o
195 sobrenadante foi coletado e utilizado na determinação das atividades enzimáticas.

196 Para determinação da atividade de CAT, alíquotas do extrato enzimático foram
197 misturadas com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo H₂O₂ 20 mM (a
198 30°C). O decaimento da absorbância foi acompanhado em espectrofotômetro a 240
199 nm por 300 segundos. A atividade de CAT foi calculada utilizando o coeficiente de
200 extinção molar do H₂O₂ ($36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$ (HAVIR;
201 MCHALE, 1987). Para determinar a atividade de SOD, alíquotas do extrato enzimático
202 foram misturadas com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, L-
203 metionina 13 mM e NBT 75 μM em tubos de ensaio protegidos da luz. A reação foi
204 iniciada com adição de riboflavina 2,0 μM e mantidos na presença de luz durante cinco

205 minutos. Em seguida, a leitura a 560 nm foi realizada (BEAUCHAMP; FRIDOVICH,
206 1971). A quantidade de enzima necessária para atuar na inibição de 50% da NBT foi
207 definida como uma unidade de atividade (UA) e a atividade de SOD foi expressa por
208 UA g⁻¹ MF min⁻¹ (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

209 Para a atividade de APX, alíquotas do extrato enzimático foram misturados ao
210 tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0) contendo ascorbato 0,5 mM e H₂O₂
211 30 mM. Após a mistura, o decaimento da absorbância a 290 nm foi acompanhado no
212 espectrofotômetro durante 300 s. O cálculo da atividade de APX foi realizado com
213 base no coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ do ascorbato (ASA) e os dados
214 expressos em μmol ASA g⁻¹ MF min⁻¹ (NAKANO; ASADA, 1981). Para determinação
215 da atividade da POX (KAR; MISHRA 1976), alíquotas do extrato enzimático foram
216 misturadas com tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), ácido pirogálico 20 mM
217 e H₂O₂ 20 mM. Após incubadas por 1 min a temperatura ambiente, a reação foi
218 interrompida com adição de H₂SO₄ 0,5%. Em seguida, a mistura foi lida a 420 nm. A
219 atividade de POX foi calculada com base no coeficiente de extinção molar do pirogalol
220 (2,47 mM⁻¹ cm⁻¹) e expressa em ηmol pirogalol g⁻¹ MF min⁻¹.

221

222 **2.4 Análise estatística**

223 Os dados foram submetidos a análise de variância, precedidos pelo teste F a
224 5% de probabilidade, e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de
225 probabilidade, utilizando o pacote easyanova no software R Studio 1.2.5. Após
226 transformados, os dados de cada espécie vegetal foram submetidos a análise de
227 componentes principais (PCA) visando avaliar o efeito dos tratamentos empregados.
228 Para validação dos agrupamentos formados, os dados foram submetidos a análise
229 multivariada permutacional de variância (PERMANOVA). As análises de PCA e
230 PERMANOVA foram realizadas utilizando o software Past 4.3.

231

232 **3. RESULTADOS**

233 **3.1 Análise geral dos dados**

234 A análise de variância indicou que houve diferença significativa da exposição
235 das duas espécies de feijão as condições com ou sem sombreamento isolado e
236 combinados com alumínio ou salinidade nos parâmetros analisados (Tabela 3).

237

238 **Tabela 1.** Análise de variância (quadrado médio) das variáveis analisadas após a
 239 exposição das espécies de feijão ao sombreamento (com ou sem) isolado e
 240 combinado com alumínio ou salinidade.

Varáveis analisadas	Fonte de Variação (Quadrado médio)			
	Tratamentos (T)	Espécies (E)	T x E	CV (%)
Massa seca da parte aérea	0,30 *	2,04 *	0,26 *	7,57
Massa seca das raízes	0,32 *	0,49 *	0,02 *	9,47
Peróxido de hidrogênio	1,08 *	0,07 ^{ns}	0,18 *	6,37
Peroxidação lipídica	5422 *	2407 *	411,6 *	6,33
Ascorbato reduzido	0,18 *	0,79 *	0,23 *	6,82
Glutathiona reduzida	6,38 *	11,95 *	9,83 *	8,89
Catalase	103824 *	13201 *	125120 *	8,36
Dismutase do superóxido	66,81 *	410,1 *	10,33 *	5,20
Peroxidase do ascorbato	9,62 *	15,79 *	0,90 *	8,31
Peroxidase de fenóis	2768 *	700,3 *	88,92 *	5,54
Graus de liberdade	5	1	5	-

241 * = significativo a 5%; ns = não significativo; CV = coeficiente de variação.

242

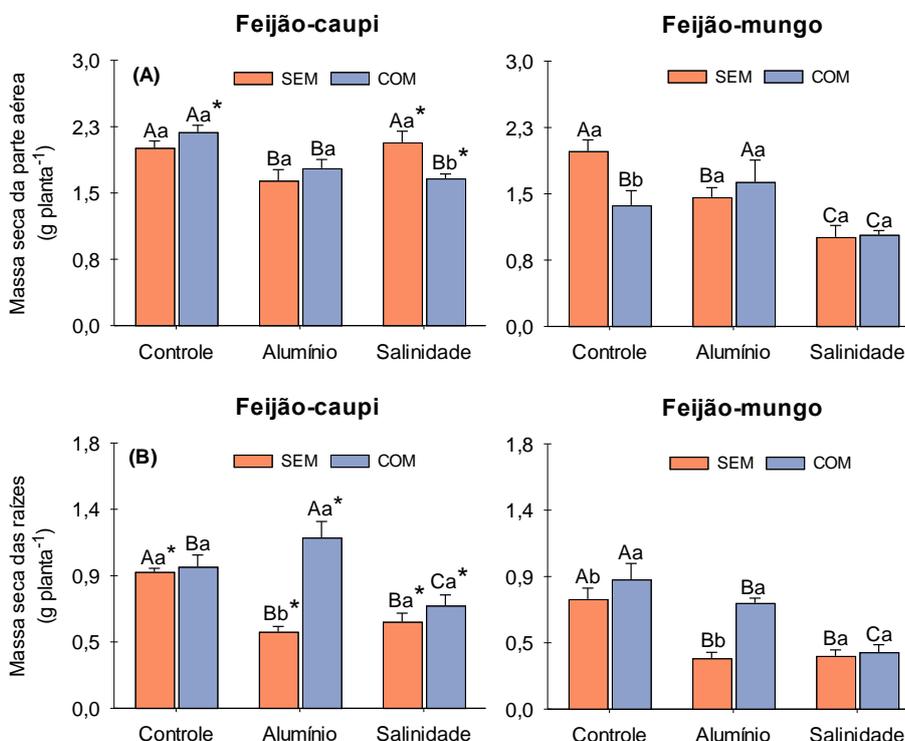
243 3.2 Efeito dos estresses combinados nas respostas de crescimento

244 As plantas de feijão-caupi e feijão-mungo apresentaram variação nas respostas
 245 no crescimento quando submetidas aos estresses isolados de alumínio, salinidade e
 246 com sombreamento e aos estresses de salinidade ou alumínio combinados com
 247 sombreamento (Figura 1). Quando as plantas de feijão-caupi foram expostas a
 248 salinidade (sem sombreamento) não houve efeito significativo sobre a massa seca da
 249 parte aérea. Em contrapartida, houve redução na massa seca da parte aérea das
 250 plantas de feijão-caupi e feijão-mungo quando estas plantas foram cultivadas na
 251 presença de alumínio e com o co-estresse de salinidade ou alumínio e com
 252 sombreamento (Figura 1A).

253 Quanto a massa seca das raízes em plantas de feijão-caupi e feijão-mungo,
 254 notou-se diferentes respostas aos tratamentos isolados e combinados de alumínio,
 255 salinidade e com sombreamento (Figura 2B). O sombreamento isolado não
 256 apresentou diferença em relação ao sem sombreamento no feijão-caupi,
 257 diferentemente do feijão-mungo com incremento de cerca de 20% na massa das
 258 raízes (Figura 1B). No co-estresse de sombreamento e alumínio é perceptível o
 259 incremento significativo da massa das raízes no feijão-caupi em relação aos demais
 260 tratamentos. Enquanto que no feijão-mungo exposto ao alumínio no sombreamento,
 261 há redução em relação ao sem sombreamento isolado, porém quando compara-se ao
 262 estresse com o mesmo metal e sem sombreamento observa-se um incremento de

263 111%. Quando o alumínio e a salinidade são combinados ao sem sombreamento há
 264 efeitos deletérios na massa seca das raízes tanto do feijão-caupi quanto para o feijão-
 265 mungo.

266



267

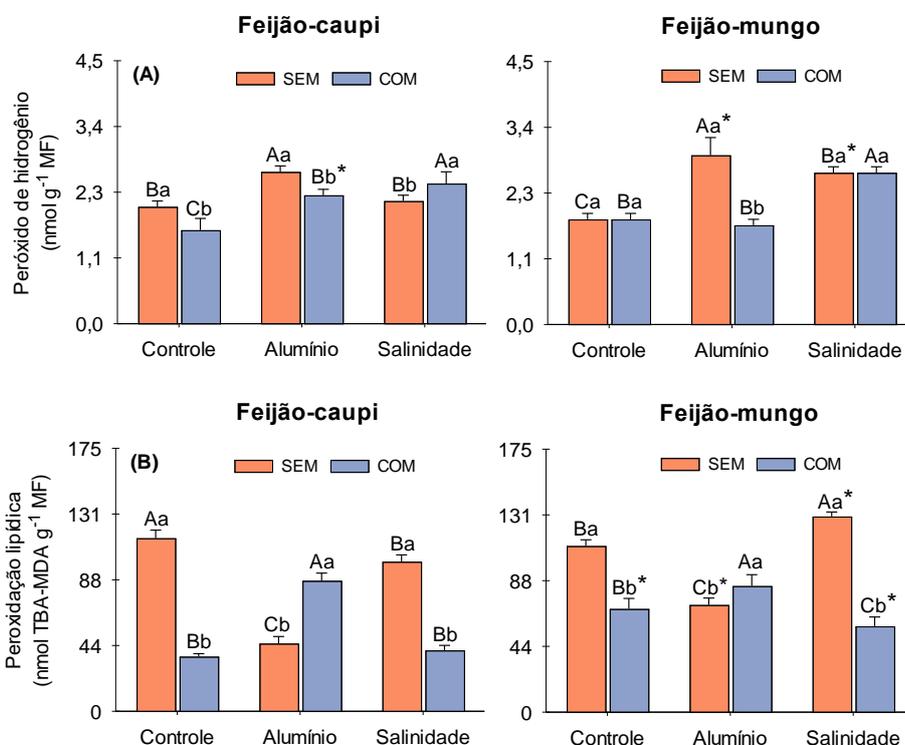
268 **Figura 1.** Massa seca da parte aérea (A) e das raízes (B) em plantas de feijão-caupi e feijão-mungo
 269 expostas aos estresses isolados de salinidade e alumínio e a combinação destes com ou sem
 270 sombreamento. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os tratamentos,
 271 enquanto as letras minúsculas iguais indicam que não houve efeito do sombreamento naquele
 272 tratamento (Duncan; $p < 0,05$). O asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies
 273 vegetais em cada tratamento (Duncan; $p < 0,05$).
 274

274

275 3.3 Efeito dos estresses combinados nos indicadores de estresse oxidativo

276 Plantas de feijão-caupi e feijão-mungo apresentaram diferentes respostas
 277 oxidativas quando submetidas aos estresses isolados de alumínio ou salinidade e a
 278 combinação destes com sombreamento (Figura 2). Houve redução na concentração
 279 de H_2O_2 quando as plantas de feijão-caupi foram submetidas isoladamente ao
 280 sombreamento. Quando as plantas de feijão-caupi e feijão-mungo foram expostas ao
 281 estresse por alumínio sob luz ambiente, nota-se aumento de 30% e 61% na
 282 concentração de H_2O_2 , respectivamente, em relação às plantas não estressadas.
 283 Observa-se que as plantas de feijão-caupi expostas ao estresse por alumínio sob
 284 sombreamento apresentaram aumento de 37% nos níveis de H_2O_2 , enquanto nas

285 plantas de feijão-mungo houve redução de 5% - ambos em relação ao registrado para
 286 estas plantas quando expostas isoladamente ao sombreamento (Figura 2A).
 287



288

289 **Figura 2.** Peróxido de hidrogênio (A) e peroxidação lipídica (B) em plantas de feijão-caupi e feijão-
 290 mungo expostas aos estresses isolados de salinidade e alumínio e a combinação destes com ou sem
 291 sombreamento. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os tratamentos,
 292 enquanto as letras minúsculas iguais indicam que não houve efeito do sombreamento naquele
 293 tratamento (Duncan; p < 0,05). O asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies
 294 vegetais em cada tratamento (Duncan; p < 0,05).

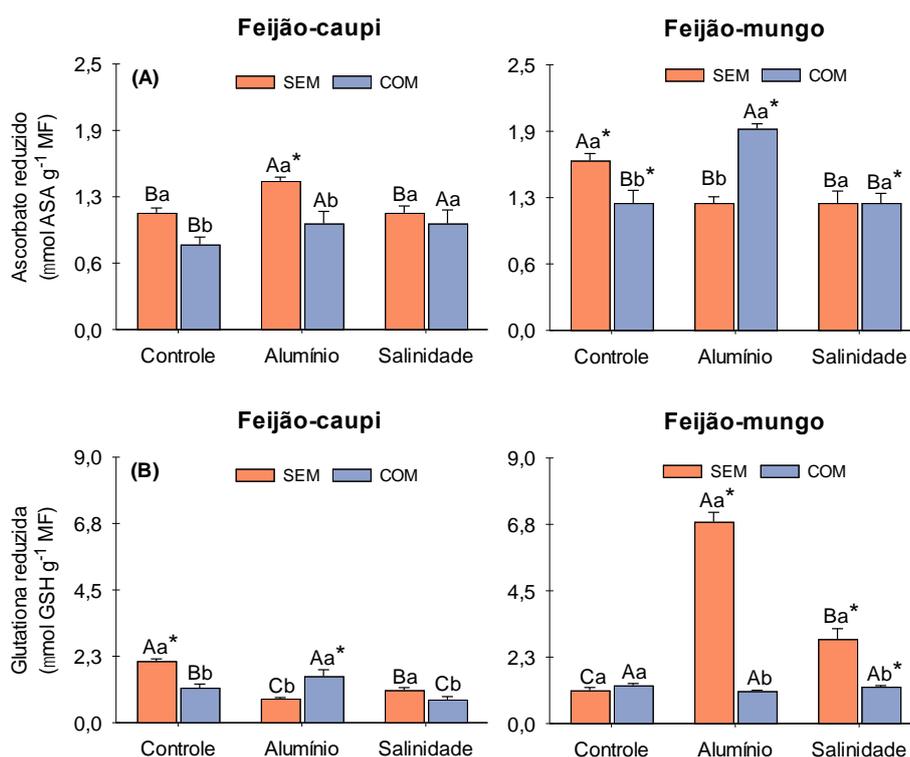
295

As duas espécies vegetais exibiram aumento no conteúdo de H₂O₂ quando
 296 expostas à salinidade combinada com sombreamento em relação ao controle. Não
 297 houve efeito do sombreamento nos níveis de H₂O₂ das plantas de feijão-mungo. A
 298 peroxidação lipídica nas plantas de feijão-caupi e feijão-mungo foi reduzida em
 299 condições de sombreamento e nas plantas expostas a salinidade combinada ao
 300 sombreamento (Figura 2B). Em contrapartida, a exposição ao alumínio combinado
 301 com sombreamento induziu aumento de 138 e 22%, respectivamente, na peroxidação
 302 lipídica das plantas de feijão-caupi e feijão-mungo. A exposição de forma isolada ao
 303 alumínio induziu redução na peroxidação lipídica das duas espécies, enquanto que a
 304 peroxidação lipídica foi significativamente aumentada nas plantas de feijão-mungo
 305 expostas à salinidade.

306

3.4 Efeito dos estresses combinados nos antioxidantes hidrofílicos

Em condições de sombreamento, houve redução significativa na concentração de ascorbato reduzido para as duas espécies, sendo esta redução de 27% no feijão-caupi e de 25% no feijão-mungo – ambas em comparação ao controle (com sombreamento). Houve aumento do ascorbato reduzido nas plantas submetidas isoladamente ao alumínio e a combinação de alumínio e sombreamento induziu redução neste parâmetro nas plantas de feijão-caupi (Figura 3A). Já nas plantas de feijão-mungo, a exposição combinada de alumínio e sombreamento induziu aumento nos níveis de ascorbato reduzido – em relação aos estresses isolados. Na salinidade, a concentração do ascorbato reduzido foi similar ao controle nas plantas de feijão-caupi. Para o feijão-mungo, não houve efeito do sombreamento na salinidade em relação aos níveis de ascorbato reduzido.



320

Figura 3. Formas reduzidas do ascorbato (A) e glutaciona (B) em plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas aos estresses isolados de salinidade e alumínio e a combinação destes com ou sem sombreamento. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas iguais indicam que não houve efeito do sombreamento naquele tratamento (Duncan; $p < 0,05$). O asterisco (*) indica que houve diferença entre as duas espécies vegetais em cada tratamento (Duncan; $p < 0,05$).

327

Na determinação da glutaciona reduzida, registrou-se redução significativa de 43% dos valores observados em condições de sombreamento para o feijão-caupi e

328

329 no feijão-mungo não houve diferença entre com e sem sombreamento (Figura 3B). O
330 estresse isolado de alumínio ou salinidade, induziu redução de 60 e 47%,
331 respectivamente, no conteúdo de glutathione reduzida nas plantas de feijão-caupi. No
332 feijão-mungo notou-se acréscimo de 500% e 150% na glutathione reduzida quando
333 estas plantas foram expostas isoladamente ao alumínio e salinidade. Quando o
334 sombreamento foi combinado com o alumínio ou salinidade houve redução
335 significativa no conteúdo de glutathione reduzida para as plantas de feijão-mungo.

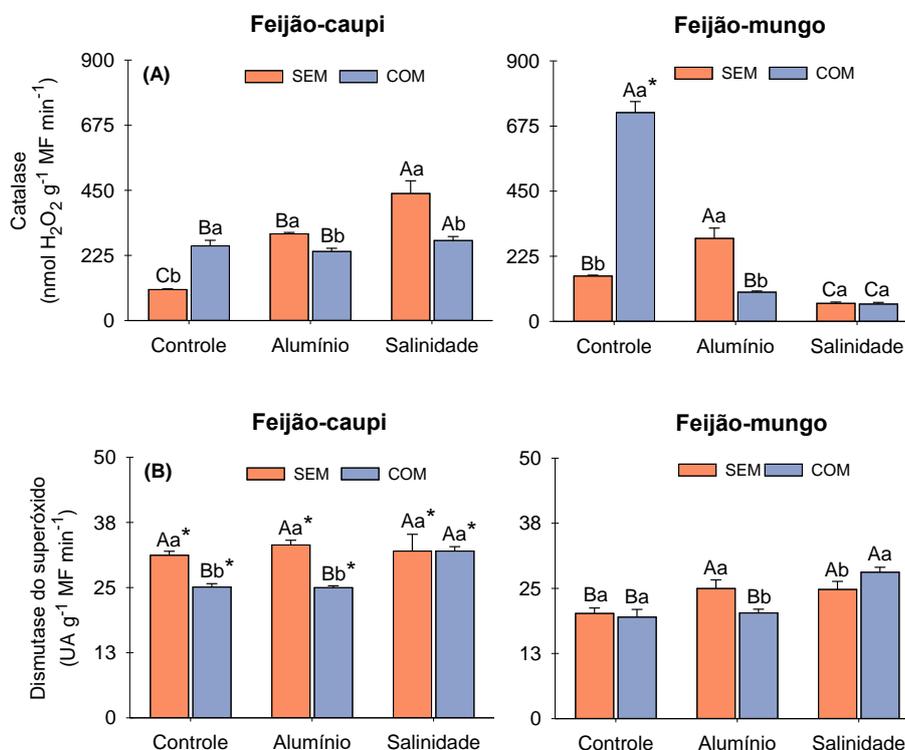
336

337 **3.5 Efeito da combinação dos estresses na atividade das enzimas antioxidantes**

338 Os efeitos das condições dos sombreamentos isolados e combinadas com
339 alumínio e salinidade na atividade da catalase e dismutase do superóxido em folhas
340 de plantas de feijão-caupi e feijão-mungo estão expressos na Figura 4. Em condições
341 de estresse por sombreamento isolado notou aumento da atividade da catalase nas
342 duas leguminosas, em 140% no tecido foliar do feijão-caupi e de 359% no feijão-
343 mungo (Figura 4A). Em condições de estresse com sombreamento combinado com
344 alumínio, percebeu aumento significativo de da atividade da catalase no feijão-caupi,
345 sendo similar na presença da combinação com a salinidade. Em plantas de feijão-
346 mungo que foram expostas a salinidade ou alumínio combinados ao sombreamento
347 tiveram redução média na atividade enzimática de 88% em comparação ao estresse
348 único com sombreamento (Figura 4A). As plantas de feijão-caupi e feijão-mungo sob
349 estresse por alumínio teve a atividade da catalase aumentada e reduzida sob
350 salinidade no feijão-mungo.

351 A atividade enzimática da dismutase do superóxido (SOD) em folhas
352 apresentou redução significativa de 19% em plantas de feijão-caupi em condições de
353 sombreamento isolado contrastando das respostas observadas em plantas de feijão-
354 mungo que se manteve similar em relação a condição de luz ambiente (Figura 4B).
355 Comportamento similar na duas leguminosa para a atividade da SOD também foi
356 observado em condições de combinação com ou sem sombreamento com alumínio.
357 Não há diferença significativa na atividade da SOD quando condições com ou sem
358 sombreamento isolados e combinados com salinidade e alumínio, e sombreamento
359 isolado e combinada com salinidade em plantas de feijão-caupi (Figura 4B). Destaca-
360 se, porém, o aumento da atividade da dismutase do superóxido em folhas do feijão
361 quando a luz ambiente se combinava com salinidade ou alumínio, em média 22%,
362 comparado aos tratamentos com e sem sombreamento combinados a salinidade com

363 44% a mais, em relação ao sombreamento isolado. Em cada condição de estresse,
 364 houveram diferença significativa entre as leguminosas.
 365



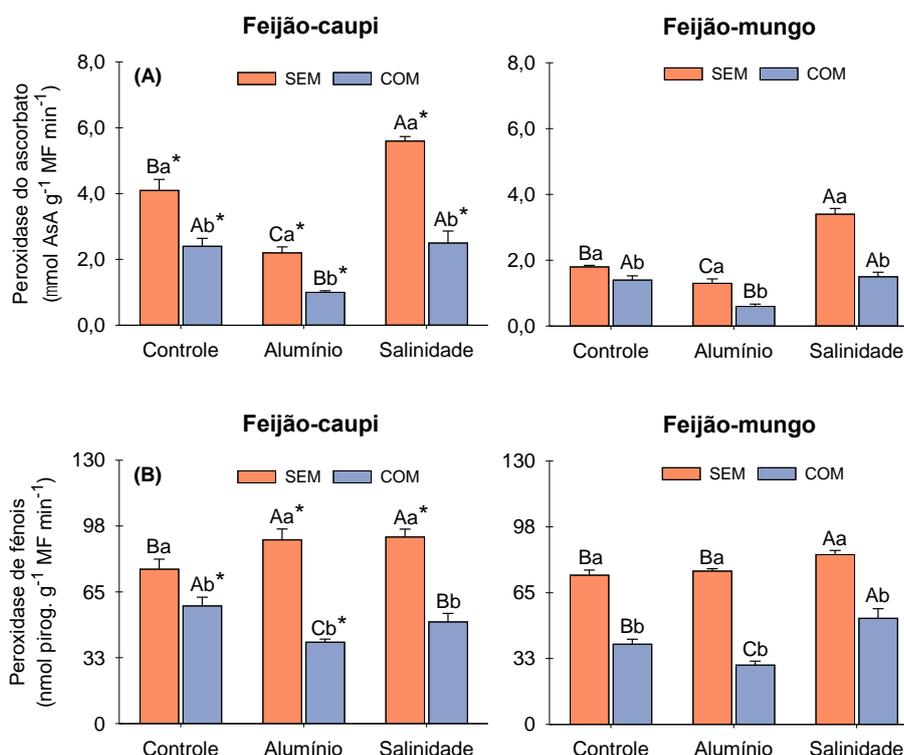
366

367 **Figura 4.** Atividade das enzimas catalase (A) e dismutase do superóxido (B) em folhas de plantas de
 368 feijão-caupi e feijão-mungo expostas ou não aos estresses isolados e combinados de salinidade,
 369 alumínio e com ou sem sombreamento. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença
 370 entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas iguais indicam que não houve efeito do
 371 sombreamento naquele tratamento (Duncan; $p < 0,05$). O asterisco (*) indica que houve diferença entre
 372 as duas espécies vegetais em cada tratamento (Duncan; $p < 0,05$).

373

Houve redução de 41 e 22% na atividade da enzima APX de plantas de feijão-
 374 caupi e feijão-mungo, respectivamente, quando estas foram expostas ao
 375 sombreamento (Figura 5A). Observa-se que o estresse por alumínio provoca redução
 376 na atividade da APX na duas leguminosas, assim como, no tratamento em que o
 377 sombreamento foi combinado com alumínio e salinidade. Houve aumento da atividade
 378 da APX somente nas plantas expostas isoladamente à salinidade, sendo de 36% nas
 379 plantas de feijão-caupi e de 88% nas plantas de feijão-mungo. A atividade da POX foi
 380 reduzida em 23% no feijão-caupi e 46% no feijão-mungo quando expostas ao
 381 sombreamento. A presença de alumínio ou salinidade induziu redução de 22% na
 382 atividade de POX em plantas de feijão-caupi, enquanto que a combinação com
 383 sombreamento e alumínio provocou redução de 46% nas plantas de feijão-mungo.
 384 Houve aumento em torno de 20% na atividade da POX nas duas leguminosas em

385 resposta à salinidade em relação ao controle. Registrou-se maior atividade das
 386 enzimas APX e POX em plantas de feijão-caupi que nas plantas de feijão-mungo
 387 quando estas foram expostas ao estresse por alumínio ou salinidade combinado ou
 388 não com sombreamento.
 389

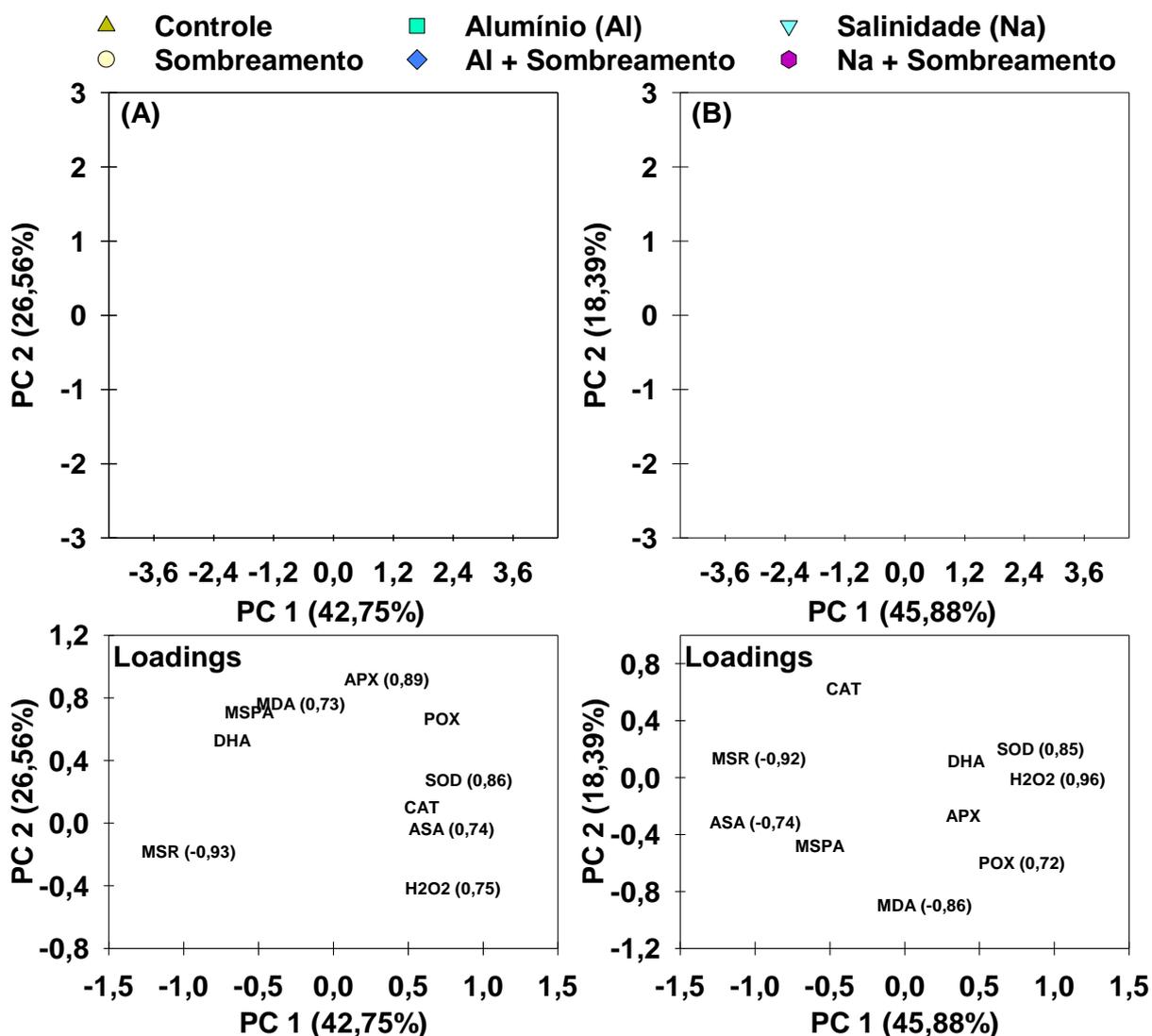


390

391 **Figura 5.** Atividade das enzimas peroxidase do ascorbato (A) e peroxidase de fenóis (B) em folhas de
 392 plantas de feijão-caupi e feijão-mungo expostas ou não aos estresses isolados e combinados de
 393 salinidade, alumínio e com ou sem sombreamento. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve
 394 diferença entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas iguais indicam que não houve efeito
 395 sombreamento naquele tratamento (Duncan; $p < 0,05$). O asterisco (*) indica que houve diferença entre
 396 as duas espécies vegetais em cada tratamento (Duncan; $p < 0,05$).

397 3.6 Análise de componentes principais (PCA)

398 A PCA dos dados obtidos com o feijão-caupi e feijão-mungo explica cerca de
 399 60% da variância total nas duas espécies, sendo formado dois componentes principais
 400 (PC1 e PC2). Na PCA dos dados de feijão-caupi, o PC1 (responsável por 42,8% da
 401 variação dos dados) foi caracterizado negativamente pela massa seca das raízes e
 402 positivamente pelos níveis de H_2O_2 , ascorbato reduzido e atividade de SOD. Já o PC2
 403 (26,6%) caracterizado positivamente pela peroxidação lipídica e atividade de APX
 404 (Figura 6). Em relação ao feijão-mungo, o PC1 foi caracterizado negativamente pela
 405 massa seca das raízes e dos níveis de ascorbato reduzido e positivamente pelos
 406 níveis de H_2O_2 e atividade de SOD e POX.



407
408 **Figura 6.** Análise de componentes principais dos dados obtidos após a exposição de plantas de feijão-
409 caupi (A) e feijão-mungo (B) aos estresses isolados de salinidade e alumínio e a combinação destes
410 com sombreamento. As elipses mostram os grupos formados e confirmados pela análise multivariada
411 permutacional de variância (PERMANOVA). Setas azuis e vermelhas indicam os *loadings* mais
412 significativos na PC1 e PC2, respectivamente.
413

414 Em relação à formação de agrupamentos, nota-se a formação de quatro
415 diferentes grupos para as duas espécies. Para o feijão-caupi, as plantas não
416 estressadas (sem sombreamento) e as expostas a salinidade foram agrupadas
417 separadamente e distinguiram-se dos demais tratamentos. Adicionalmente, as plantas
418 de feijão-caupi expostas ao sombreamento e aquelas cultivadas na presença de
419 alumínio combinado com sombreamento formaram um terceiro grupo. Finalmente, o
420 quarto grupo foi formado pelas plantas cultivadas na salinidade combinada com
421 sombreamento e daquelas cultivadas na presença de alumínio (Figura 6A). Em
422 relação ao mungo, o controle, as plantas cultivadas na presença do sombreamento e
423 as expostas ao alumínio e sombreamento de forma combinada formaram grupos

424 distintos dos demais tratamentos. Já as plantas cultivadas na presença de alumínio
425 ou salinidade e aquelas expostas de forma combinada a salinidade e sombreamento
426 formaram um único grupo (Figura 6B).

427

428 **4. DISCUSSÃO**

429 Foram registradas diferentes respostas de crescimento e no sistema redox das
430 plantas de feijão-caupi e feijão-mungo sobre os estresses isolados de salinidade,
431 alumínio e sombreamento e ao co-estresse de alumínio ou salinidade com
432 sombreamento. No geral, houve alteração na produção de biomassa das plantas em
433 resposta aos estresses aplicados, principalmente na massa seca das raízes. O co-
434 estresse de alumínio e sombreamento induz incremento da massa seca das raízes
435 nas duas espécies estudadas. Em baixa luz, as plantas reduzem a velocidade dos
436 processos metabólicos, tais como a transpiração e fotossíntese (ASSAHA et al.,
437 2017). Na presença do alumínio na forma tóxica, as plantas expandem suas raízes
438 para longe do metal tóxico. Em contrapartida, o alumínio (em menores concentrações)
439 participa no processo de alongamento das raízes interagindo com as membranas
440 celulares (SHARMA et al., 2019a). É possível que a presença do alumínio tenha
441 estimulado o crescimento radicular, mesmo que radialmente, e os fotoassimilados
442 tenham sido deslocados para a manutenção do crescimento deste órgão.

443 O co-estresse de alumínio ou salinidade e sombreamento induziu alterações
444 significativas na concentração de H_2O_2 nas plantas de feijão-caupi e no feijão-mungo,
445 sendo os níveis deste composto reduzidos no co-estresse de alumínio e
446 sombreamento. A produção de EROs, tais como H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$, se dá em várias
447 organelas subcelulares com destaque para os cloroplastos, onde ocorre o processo
448 fotoquímico da fotossíntese que é dependente do fluxo de fótons da luz
449 (BLANKENSHIP, 2017). A exposição ao sombreamento diminui o fluxo de fótons e
450 consequentemente reduz a produção de EROs, principalmente o H_2O_2 . De fato, a
451 redução na produção de EROs induz menor peroxidação lipídica – tal como observado
452 nas plantas de feijão-caupi e feijão-mungo cultivadas em sombreamento e no co-
453 estresse de salinidade e sombreamento. Na presença de salinidade, a redução da
454 peroxidação lipídica se deve também a exclusão ou compartimentalização dos íons
455 tóxicos absorvidos pelas raízes que podem ser utilizados na manutenção do potencial
456 osmótico e hídrico celular (MUNNS et al., 2020).

457 Observou-se que o sombreamento de forma isolada ou combinada com
458 alumínio induziu decréscimo na concentração do ascorbato reduzido em plantas de
459 feijão-caupi e incremento neste composto nas plantas de feijão-mungo. É possível que
460 a redução nos níveis de ascorbato reduzido nas plantas de feijão-caupi tenha sido
461 devido a sua reação com H_2O_2 . O ascorbato reduzido é um importante antioxidante
462 hidrofílico que atua no ciclo ascorbato-glutationa e que pode sequestrar ou degradar
463 as EROs prevenindo a ocorrência de danos às células vegetais (HASANUZZAMAN et
464 al., 2019). Em contrapartida, o aumento na concentração do ascorbato reduzido
465 observado nas plantas de feijão-mungo pode ser atribuído ao acúmulo deste
466 composto tendo em vista a menor atividade da APX que utiliza o ascorbato reduzido
467 como doador de elétrons para converter H_2O_2 em água (MITTLER, 2017).

468 Juntamente com o ascorbato reduzido, a glutaciona reduzida atua no ciclo
469 ascorbato-glutationa. No presente estudo, a concentração da glutaciona reduzida
470 decresceu nas plantas expostas aos estresses por alumínio em combinação com o
471 sombreamento. A glutaciona reduzida fornece elétrons para a recuperação do
472 ascorbato reduzido que é oxidado ao reagir com o H_2O_2 (BONIFACIO et al., 2016) e
473 pode estar envolvida em outras funções metabólicas, tais como a regulação da
474 expressão de genes que respondem a estresses, diferenciação e morte celular,
475 detoxificação de xenobióticos, senescência e entre outros (AHANGER et al., 2017).
476 As respostas do sistema de defesa são diferentes em situação de estresse isolado em
477 comparação a combinação de estresse devendo ser analisados separadamente
478 (MAHALINGAM, 2015; MITTLER, 2017).

479 Além dos antioxidantes ascorbato e glutaciona, o sistema de defesa redox é
480 formado por enzimas antioxidantes e destas destacam-se CAT, SOD, APX e POX. No
481 presente estudo, observou-se aumento na atividade da CAT quando as plantas foram
482 expostas isoladamente ao sombreamento, principalmente nas plantas de feijão-
483 mungo. No co-estresse de alumínio e sombreamento, a atividade de CAT foi reduzida
484 em relação ao observado nas plantas expostas isoladamente ao alumínio. A CAT é
485 uma enzima do peroxissomo que atua na conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 , sendo sua
486 atividade importante quando as plantas passam a fotorrespirar em resposta ao
487 fechamento estomático sob condição de estresse (BONIFACIO et al., 2016). É
488 possível que o aumento na atividade da CAT com o sombreamento esteja relacionado
489 com a manutenção dos baixos níveis de H_2O_2 . Em contrapartida, a redução na

490 atividade da CAT induz aumento nos níveis de H_2O_2 – tal como observado nas plantas
491 estressadas avaliadas neste estudo.

492 A luz tem importante papel nas plantas, sendo vital para a fotossíntese, e em
493 níveis elevados pode ser dissipada com a geração das EROs, em especial $O_2^{\bullet-}$ e 1O_2
494 (GAO et al., 2019). A dismutação do $O_2^{\bullet-}$ é um processo executado pela SOD e
495 considerada a primeira linha de defesa contra as EROs e o estresse oxidativo nos
496 tecidos vegetais (MITTLER, 2017). A SOD participa da modulação dos níveis de H_2O_2
497 em cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e citosol (NOCTOR; FOYER, 2016).
498 Neste estudo, nota-se que a atividade da SOD foi reduzida no co-estresse de alumínio
499 e sombreamento. Esta redução pode explicar o aumento na peroxidação lipídica nas
500 plantas expostas a este co-estresse uma vez que os ânions $O_2^{\bullet-}$ são danosos aos
501 lipídios de membrana e também podem ser convertidos em OH^{\bullet} – uma ERO que
502 possui meia-vida muito curta e alta reatividade e que pode causar danos a proteínas
503 e lipídios de membrana.

504 Na busca da manutenção dos níveis intracelulares adequados de H_2O_2 , as
505 plantas exibem as enzimas CAT, APX, POX e outras importantes peroxidases. As
506 enzimas APX e POX atuam na eliminação do H_2O_2 reduzindo ascorbato e compostos
507 fenólicos, respectivamente, e suas isoformas estão distribuídas nos cloroplastos,
508 mitocôndrias, peroxissomos e outros compartimentos subcelulares (MITTLER, 2017).
509 No presente estudo, nota-se que as condições com ou sem sombreamento (isolado
510 ou combinado com salinidade ou alumínio) reduziu a atividade das enzimas APX e
511 POX nas duas espécies vegetais. Já no estresse isolado, registrou-se incremento na
512 atividade das enzimas APX e POX em resposta a salinidade nas duas espécies
513 vegetais. A atividade da APX e POX são induzidas pela geração de EROs,
514 especificamente H_2O_2 (FOYER, 2018). É possível que o sombreamento provoque
515 menor acúmulo de EROs e com isso a atividade das enzimas APX e POX são menos
516 induzidas. Já na salinidade, este comportamento não é observado uma vez que os
517 níveis de EROs, resultantes da elevada toxicidade dos íons em excesso, são
518 aumentados (SHARMA et al., 2019b).

519

520 **5. CONCLUSÃO**

521 As plantas de feijão-caupi e feijão-mungo apresentaram variações geração de
522 EROs, nos danos celulares e na atividade das enzimas antioxidantes em condições
523 de sombreamento isolado ou combinado com alumínio ou salinidade. Nota-se

524 reduções nos níveis de peróxido de hidrogênio e conseqüentemente nos danos
 525 celulares nas plantas de feijão-caupi e feijão-mungo em condições de salinidade e
 526 sombreamento, diferentemente de quando havia alumínio tóxico. Porém mesmo com
 527 aumento na peroxidação lipídica em co-estresse com sombreamento e alumínio, as
 528 plantas de feijão-caupi e feijão-mungo tiveram repostas positivas quanto a sua
 529 biomassa em especial nas raízes. Os resultados reforçam que não se pode estimar
 530 os efeitos de estresses abióticos combinados a partir de estresses aplicados
 531 isoladamente. A ação coordenada do sistema antioxidante vegetal e menores danos
 532 celulares sugerem vias de defesa específicas que são acionadas na combinação dos
 533 estresses abióticos.

534

535 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 536 AFZAL, M.; ALGHAMDI, S.S.; MIGDADI, H.H.; KHAN, M.A.; MIRZA, S.B.; EL-HARTY, E. Legume
 537 genomics and transcriptomics: From classic breeding to modern technologies. **Saudi Journal of**
 538 **Biological Sciences**, v. 21, n.1, p. 543-555, 2019.
- 539 AHANGER, M.A.; TOMAR, N.S.; TITTAL, M.; ARGAL, S.; AGARWAL, R.M. Plant growth under
 540 water/salt stress: ROS production; antioxidants and significance of added potassium under such
 541 conditions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 4, p. 731-744, 2017.
- 542 ASSAHA, D.V.; UEDA, A.; SANEOKA, H.; AL-YAHYAI, R.; YAISH, M.W. The role of Na⁺ and K⁺
 543 transporters in salt stress adaptation in glycophytes. **Frontiers in Physiology**, n. 8, v.1, p. 509, 2017.
- 544 BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to
 545 acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- 546 BLANKENSHIP, R.E. Fotossíntese: reações luminosas In: TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.;
 547 MURPHY, A. (Org.). **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 761-
 548 791.
- 549 BONIFACIO, A.; CARVALHO, F.E.; MARTINS, M.O.; LIMA NETO, M.C.; CUNHA, J.R.; RIBEIRO, C.W.;
 550 MARGIS-PINHEIRO, M.; SILVEIRA, J.A.G. Silenced rice in both cytosolic ascorbate peroxidases
 551 displays pre-acclimation to cope with oxidative stress induced by 3-aminotriazole-inhibited catalase.
 552 **Journal of Plant Physiology**, v. 201, n.1, p. 17-27, 2016.
- 553 BRENNAN, T.; FRENKEL, C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear.
 554 **Plant Physiology**, v. 59, n. 3, p. 411-416, 1977.
- 555 CHOUDHURY, F.K.; RIVERO, R.M.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Reactive oxygen species, abiotic
 556 stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856-867, 2017.
- 557 FENG, Z.; DING, C.; LI, W.; WANG, D.; CUI, D. Applications of metabolomics in the research of soybean
 558 plant under abiotic stress. **Food Chemistry**, v. 310, n. 1, 125914, 2020.
- 559 FOYER, C.H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis.
 560 **Environmental and Experimental Botany**, v. 154, n. 1, p. 134-142, 2018.
- 561 GAO, Y.B.; ZHENG, W.W.; ZHANG, C.; ZHANG, L.L.; XU, K. High temperature and high light intensity
 562 induced photoinhibition of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) by disruption of D1 turnover in
 563 photosystem II. **Scientia Horticulturae**, v. 248, n. 1, p. 132-137, 2019.
- 564 GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant**
 565 **Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

- 566 GUPTA, K.; SENGUPTA, A.; CHAKRABORTY, M.; GUPTA, B. Hydrogen peroxide and polyamines act
567 as double edged swords in plant abiotic stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n.1, p.
568 1343, 2016.
- 569 GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and
570 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 207-212, 1980.
- 571 HASANUZZAMAN, M.; BHUYAN, M.H.M.; ANEE, T.I.; PARVIN, K.; NAHAR, K.; MAHMUD, J.A.;
572 FUJITA, M. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under
573 abiotic stress. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 384, 2019.
- 574 HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of
575 catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- 576 HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of
577 fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.
- 578 HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soils**.
579 Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347 p.
- 580 KAMPFENKEL, K.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, R. Extraction and determination of ascorbate and
581 dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, v. 225, n. 1, p. 165-167, 1995.
- 582 KAPOOR, D.; SINGH, S.; KUMAR, V.; ROMERO, R.; PRASAD, R.; SINGH, J. Antioxidant enzymes
583 regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS).
584 **Plant Gene**, v. 19, n. 1, 100182, 2019.
- 585 KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf
586 senescence. **Plant Physiology**. v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.
- 587 MAHALINGAM, R. Consideration of combined stress: a crucial paradigm for improving multiple stress
588 tolerance in plants. In: MAHALINGAM, R. (Ed.). **Combined stresses in plants**. Switzerland: Springer
589 International Publishing, 2015. p. 1-25.
- 590 MARTINEZ, V.; NIEVES-CORDONES, M.; LOPEZ-DELACALLE, M.; RODENAS, R.; MESTRE, T.C.;
591 GARCIA-SANCHEZ, F.; RUBIO, F.; NORTES, P.A.; MITTLER, R.; RIVERO, R.M. Tolerance to stress
592 combination in tomato plants: new insights in the protective role of melatonin. **Molecules**, v. 23, n. 3, p.
593 535, 2018.
- 594 MITTLER, R. Estresse abiótico. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. (Org.).
595 **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 761-791.
- 596 MUNNS, R.; DAY, D.A.; FRICKE, W.; WATT, M.; ARSOVA, B.; BARKLA, B.J.; BOSE, J.; BYRT, C.S.;
597 CHEN, Z.; FOSTER, K.J.; GILLIHAM, M.; HENDERSON, S.W.; JENKINS, C.L.D.; KRONZUCKER, S.J.;
598 MIKLAVCIC, S.J.; PLETT, D.; ROY, S.J.; SHABALA, S.; SHELDEN, M.C.; SOOLE, K.L.; TAYLOR, N.L.;
599 TESTER, M.; WEGE, S.; WEGNER, L.H.; TYERMAN, S.D. Energy costs of salt tolerance in crop plants.
600 **New Phytologist**, v. 225, n.3, P.1072-1090, 2020.
- 601 NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach
602 chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- 603 NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in
604 regulation and signaling. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 1581-1592, 2016.
- 605 NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C.H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so
606 cut and dried. **Plant Physiology**, v. 164, n. 1, p. 1636-1648, 2014.
- 607 NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C.H. Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for
608 successful data collection and interpretation. **Plant, Cell & Environment**, v. 39, n. 5, p. 1140-1160,
609 2016.
- 610 PANDEY, M.K.; ROORKIWAL, M.; SINGH, V.K.; RAMALINGAM, A.; KUDAPA, H.; THUDI, M.;
611 CHITIKINEN, A.; RATHORE, A.; VARSHNEY, R.K. Emerging genomic tools for legume breeding:
612 current status and future prospects. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n.1, p. 455, 2016.

- 613 SHARMA, A.; KUMAR, V.; SHAHZAD, B.; RAMAKRISHNAN, M.; SIDHU, G.P.S.; BALI, A.S.; HANDA,
614 N; KAPOOR, D.; YADAV, P.; KHANNA, K.; BAKSHI, P.; REHMAN, A.; KOHLI, S.K.; KHAN, E.A.;
615 PARIHAR, R.D.; YUAN, H.; THUKRAL, A.K.; BHARDWAJ, R.; ZHENG, B. Photosynthetic response of
616 plants under different abiotic stresses: a review. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 1, p.
617 509-531, 2019a.
- 618 SHARMA, A.; SHAHZAD, B.; REHMAN, A.; BHARDWAJ, R.; LANDI, M.; ZHENG, B. Response of
619 phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. **Molecules**, v. 24,
620 n. 13, p. 2452, 2019b.
- 621 VANLAUWE, B.; HUNGRIA, M.; KANAMPIU, F.; GILLER, K.E. The role of legumes in the sustainable
622 intensification of African smallholder agriculture: Lessons learnt and challenges for the future.
623 **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 284, n. 1, 106583, 2019.
- 624 ZANDALINAS, S.I.; MITTLER, R.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A. Plant
625 adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 162, n.
626 1, p. 2-12, 2018.
- 627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

APÊNDICES

644 **Apêndice 1.** Visão geral da estrutura utilizada no experimento com estresses isolados
645 e combinados de sombreamento, alumínio e salinidade. A cobertura feita de sombrite
646 de 75% e as plantas foram mantidas dentro da casa durante todo período
647 experimental.



648

649