

Indução de tolerância ao estresse hídrico na germinação de sementes de feijão-caupi

Bruno Agostini Colman^{1*}, Cássio Miranda Nunes², Gabrielle de Lima Masson³,

Rogério Hidalgo Barbosa⁴, Anísio da Silva Nunes³

¹Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil,

²Master Tecnologia, Dourados, MS Brasil

³Faculdade Anhanguera de Dourados, Dourados, MS, Brasil.

⁴Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

*Autor correspondente, e-mail: agostinicolman@hotmail.com

Resumo

Estudos com diversas espécies têm sido realizados sob condições de deficiência hídrica. Entretanto, no processo germinativo e em plântulas jovens, há poucos trabalhos visando o desenvolvimento de técnicas que buscam uma futura tolerância e aclimação das plantas ao estresse hídrico. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi simular a deficiência hídrica na germinação de sementes de feijão-caupi e avaliar se o choque térmico aplicado durante a embebição pode levar a cultura à adquirir tolerância ao estresse. As sementes foram submetidas ao processo de embebição e permaneceram em B.O.D. à 25°C por 24 horas. Posteriormente, parte foi mantida nessa temperatura e parte transferida para o choque térmico à 7°C por mais 24 horas. Tanto as parcelas que passaram pelo choque, quanto as demais, foram transferidas para substrato umedecido com soluções de manitol, nas concentrações: 0; 22,29; 44,58; 66,87 e 89,17g L⁻¹, simulando os potenciais osmóticos de 0; -0,3; -0,6; -0,9 e -1,2 Mpa em B.O.D. à 25°C. Foram avaliados: germinação, índice de velocidade de germinação, plântulas anormais, comprimento da parte aérea, comprimento de raiz primária, comprimento total de plântula e relação raiz/parte aérea. O melhor desempenho na germinação foi obtido pelas sementes que passaram pelo choque térmico à 7°C por 24 horas, o que permite afirmar que ocorreu uma indução de tolerância cruzada e que esta pode ser ativada no início do processo de embebição em sementes de feijão-caupi.

Palavras-chave: choque térmico, manitol, potencial osmótico, *Vigna unguiculata*

Induction of tolerance to water stress in the cowpea seed germination

Abstract

Studies in several species have been conducted under conditions of water stress. However, the germination and young seedlings, there are few studies aimed at developing techniques that seek a future tolerance and acclimation of plants to water stress. Given the above, the objective of this study was to simulate drought stress on seed germination of cowpea and evaluate the thermal shock applied during hydration can lead to culture to acquire stress tolerance. Seeds were subjected to the process of soaking and remained in BOD at 25°C for 24 hours. After this part has been kept at this temperature part and transferred to the thermal shock to 7°C for 24 hours. Both plots that have gone through shock, as the others were transferred to the substrate moistened with mannitol at concentrations of 0, 22.29, 44.58, 66.87 and 89.17 g L⁻¹, simulating the osmotic potential of 0, -0.3, -0.6, -0.9 and -1.2 MPa in BOD at 25°C. Were evaluated: germination, speed of germination, abnormal seedlings, shoot length, primary root length, total length and relative seedling root/shoot. The best performance in germination was obtained by the seeds that passed through the thermal shock to 7°C for 24 hours, which allows us to affirm that there was an induction of cross-tolerance and that this can be activated at the beginning of the imbibition in seeds of cowpea.

Keywords: mannitol, osmotic potential, termic shock, *Vigna unguiculata*

Recebido: 16 Outubro 2012
Aceito: 02 Abril 2014

Introdução

O feijão-caupi, ou feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., é uma leguminosa de alto conteúdo proteico e considerada a principal fonte de proteína vegetal para a população rural da Região Norte e Nordeste do Brasil (Beserra Jr et al., 2011; Moraes & Bleicher, 2007; Freire Filho et al., 2002; Castellón et al., 2003). Seu cultivo, nos últimos anos, vem adquirindo maior expressão econômica (Freire Filho et al. 2005) e ocupa uma área de mais de 12 milhões de hectares por todo mundo, abrangendo todas as regiões de clima tropical (Vijaykumar et al., 2010).

A cultura apresenta sensibilidade ao frio (Ehlers e Hall, 1977; Hall et al, 1997) e ampla adaptabilidade a condições de estiagem prolongada (Islam et al., 2008; Lobato et al., 2008), sendo, portanto, uma boa alternativa para o cultivo de grãos em regiões onde o risco climático para o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é significativo (Freire Filho et al., 2005).

Por outro lado, apesar da rusticidade do caupi, a deficiência hídrica é um dos fatores mais importantes que afetam a germinação, pois a água possui a capacidade de reativar o metabolismo das sementes e está envolvida direta e indiretamente em todas as demais etapas do processo germinativo (Marcos Filho, 2005). A baixa germinação de sementes submetidas ao estresse hídrico pode ser ocasionada, principalmente, pela expressiva redução da atividade enzimática, resultando em menor desenvolvimento meristemático (Popinigis, 1985).

O estresse, em geral, pode ser definido como um fator externo que exerce influência negativa sobre a planta. Este conceito está intimamente associado com o de tolerância ao estresse, que é a capacidade da planta em enfrentar condições e ambientes desfavoráveis. Se a tolerância aumenta como consequência da exposição anterior ao estresse, diz-se que a planta está aclimatada (Taiz & Zeiger, 2009).

Trabalhos com diversas espécies têm sido realizados sob condições de deficiência hídrica, com o objetivo de determinar a germinação e o vigor de sementes; para isso, diversas soluções osmóticas vêm sendo utilizadas: Manitol, NaCl (cloreto de sódio), PEG (polietileno glicol), CaCl₂

(cloreto de cálcio), MgCl₂ (cloreto de magnésio) e KCl (cloreto de potássio).

Moraes & Menezes (2003) relatam que o decréscimo nos potenciais osmóticos induzidos por PEG, NaCl, KCl e MgCl₂ afetam o vigor e a germinação de sementes de soja. Já Coelho et al. (2010), constatam o efeito do estresse hídrico por meio dos osmóticos Manitol, CaCl₂, MgCl₂ e NaCl no decréscimo dos parâmetros observados em plântulas de feijão.

Entretanto, no processo germinativo e em plântulas jovens, há poucos trabalhos visando o desenvolvimento de técnicas que buscam uma futura tolerância e aclimatação das culturas ao estresse hídrico, os quais abririam a possibilidade de utilização destas via tratamento de sementes ou por meio de outros métodos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi simular a deficiência hídrica na germinação de sementes de feijão-caupi e avaliar se o choque térmico aplicado durante a embebição pode levar a cultura à adquirir tolerância ao estresse.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Sementes da Faculdade Anhanguera de Dourados (FAD), entre os meses de abril e maio de 2011. Foram utilizadas sementes de feijão-caupi, cultivar BRS Marataoã, as quais passaram por testes em diferentes potenciais osmóticos, simulando-se situações de estresse hídrico.

As sementes foram submetidas ao processo de embebição com água destilada em substrato de papel umedecido (germitest), utilizando-se a proporção de 2,25 vezes o peso do substrato seco, permanecendo em B.O.D. na temperatura de 25°C por 24 horas. Após isso, parte foi mantida nessa temperatura e parte transferida para o choque térmico em geladeira à 7°C por 24 horas, sem troca de substrato. Tanto as sementes que passaram pelo choque, como as que não passaram, posteriormente foram transferidas para substrato umedecido com soluções de manitol para realização dos tratamentos osmóticos, também na proporção de 2,25 vezes o peso do substrato seco. As concentrações de manitol utilizadas foram de 0; 22,29; 44,58; 66,87 e 89,17g L⁻¹, simulando os

potenciais osmóticos de 0; -0,3; -0,6; -0,9 e -1,2 MPa, calculados por meio da fórmula de Van't Hoff (Braga et al., 1999). Após esses procedimentos, todas as parcelas foram para B.O.D. à uma temperatura de 25°C, permanecendo assim até o final do experimento.

O trabalho contou com um total de 40 parcelas, cada uma composta por 50 sementes dispostas em caixas de acrílico transparente (gerbox). A contagem das sementes germinadas foi realizada para a obtenção do índice de velocidade de germinação (IVG) (Maguire, 1962), a qual foi efetuada diariamente e encerrada aos nove dias após semeadura; foram computadas, também, as plântulas normais e anormais (Brasil, 2009), os resultados foram expressos em porcentagem. Para avaliação do desempenho das plântulas, utilizaram-se as plântulas normais obtidas no teste de germinação que, depois de selecionadas em parte aérea e raiz, foram medidas com o auxílio de uma régua graduada (cm) (Nakagawa, 1999).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos em arranjo fatorial com duas temperaturas e cinco níveis de potencial osmótico do substrato, com quatro repetições por tratamento. Os dados percentuais foram normalizados pela transformação de arco seno da raiz quadrada de $x \cdot 100^{-1}$. Aplicou-se o teste F para análise da variância e, quando significativo, utilizou-se regressão polinomial para análise dos níveis de potencial e determinação de equações significativas com menor grau do polinômio e com maior coeficiente de determinação (R^2). Para comparações entre as temperaturas estudadas, as médias foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados e Discussão

A germinação de feijão-caupi variou de 71 a 92,5%, considerando-se todos os tratamentos estudados (Figura 1A), não sendo influenciada pela redução do potencial osmótico do substrato; entretanto, houve diferença entre as temperaturas em quase todos os potenciais, com exceção de -1,2 MPa. A temperatura de 7°C apresentou médias significativamente superiores às encontradas no tratamento

controle (25°C), diferentemente do índice de velocidade de germinação (Figura 2), o qual apresentou diferença significativa somente em um potencial osmótico (-1,2 MPa). Corroborando com isso, Oliveira & Gomes Filho (2009) e Moterle et al. (2006) relatam que a redução do potencial osmótico da solução do substrato influenciou a germinação, tornando-a também mais lenta.

Em condições de déficit hídrico, as sementes geralmente têm água suficiente para iniciar o processo germinativo (Bradford, 1990), porém, esse tipo de estresse pode reduzir tanto a porcentagem quanto a velocidade de germinação, com uma grande variação de respostas entre as espécies, desde aquelas muito sensíveis até as mais resistentes (Bewley & Black, 1994).

As sementes que passaram pelo choque frio à 7°C apresentaram menor número de plântulas anormais que aquelas que não passaram, sobretudo nos potenciais mais negativos (Figura 1B). Este resultado se deve provavelmente à menor velocidade de germinação observada nas sementes tratadas à 7°C e nos potenciais osmóticos mais negativos (Figura 2). Moraes et al. (2005) obtiveram resultados semelhantes, onde o vigor das sementes diminuiu à medida que os potenciais decresceram, ou seja, ficaram mais negativos.

A velocidade da embebição é um fator importante na germinação, pois a rápida entrada de água pode causar danos às sementes (Ellis et al., 1990). Uma embebição mais lenta, por sua vez, possibilita maior tempo para a reorganização e/ou reparação das membranas celulares (Sung & Chang, 1993).

Os resultados encontrados para germinação e plântulas anormais (Figura 1) com o pré-tratamento de 7°C foram indicativos de tolerância cruzada, pois demonstram que as sementes que passaram pelo choque térmico melhoraram o nível de resposta ao estresse subsequente, os quais, neste estudo, foram representados pela deficiência de água.

Resultados semelhantes foram encontrados por Custódio et al. (2009b), onde a aplicação de choque térmico em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) permitiu que as futuras plântulas suportassem ao estresse hídrico

simulado. Song et al. (2005) relatam que o pré-tratamento de sementes de trigo à 33°C ou em solução de -0,8MPa (NaCl) aumentaram por diversos períodos a tolerância ao subsequente estresse hídrico ou térmico, determinado por porcentagem de germinação e massa seca de plântulas. Em guandu, Marin et al. (2004)

constataram que o alumínio associado à deficiência hídrica obteve efeito evidenciado até -0,9MPa na germinação de sementes, onde as baixas concentrações de alumínio promoveram o melhor desenvolvimento das plântulas em condições de estresse hídrico.

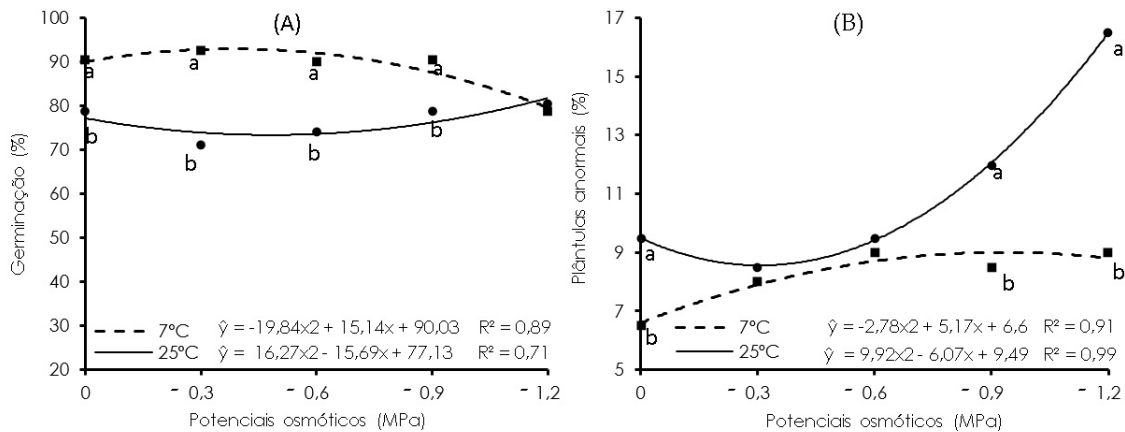


Figura 1. Porcentagem de germinação (A) e de plântulas anormais (B) de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em função do choque frio e diferentes potenciais osmóticos. Letras diferentes dentro de um mesmo potencial osmótico diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

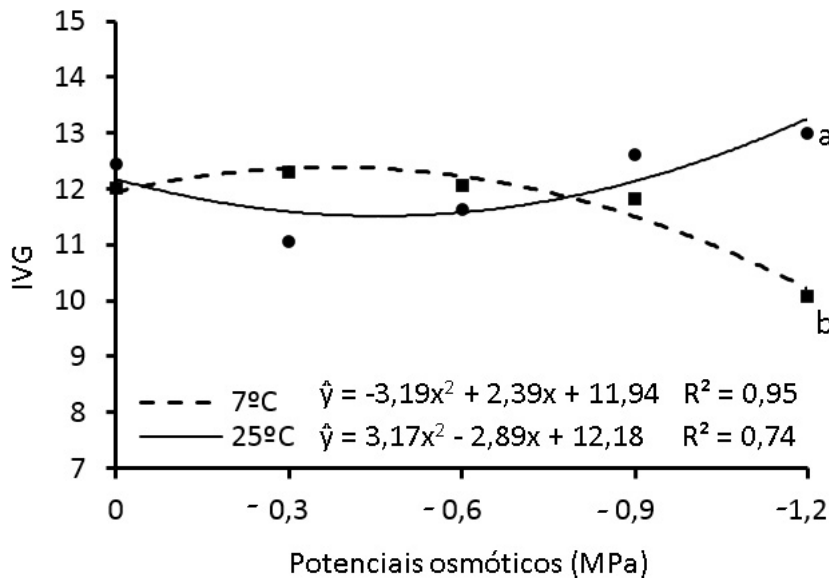


Figura 2. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em função do choque frio e diferentes potenciais osmóticos. Letras diferentes dentro de um mesmo potencial osmótico diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As sementes de feijão-caupi tratadas com o choque frio obtiveram maior comprimento de raiz primária, independentemente do potencial osmótico utilizado; ao contrário da parte aérea, em que as plântulas do tratamento controle (25°C) apresentaram melhor desenvolvimento (Tabela 1). Isto pode ser explicado pelos

mecanismos de sinalização e respostas aos estresses (Borisova et al., 2001) ou pelo alto grau de sobreposição entre os conjuntos de genes que determinam a tolerância a um estresse em particular (Rizhsky et al., 2002), os quais podem apresentar diferentes respostas entre as espécies vegetais.

Tabela 1. Comprimento de raiz primária, parte aérea e relação raiz primária/parte aérea (R/PA) de plântulas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em função de diferentes choques térmicos.

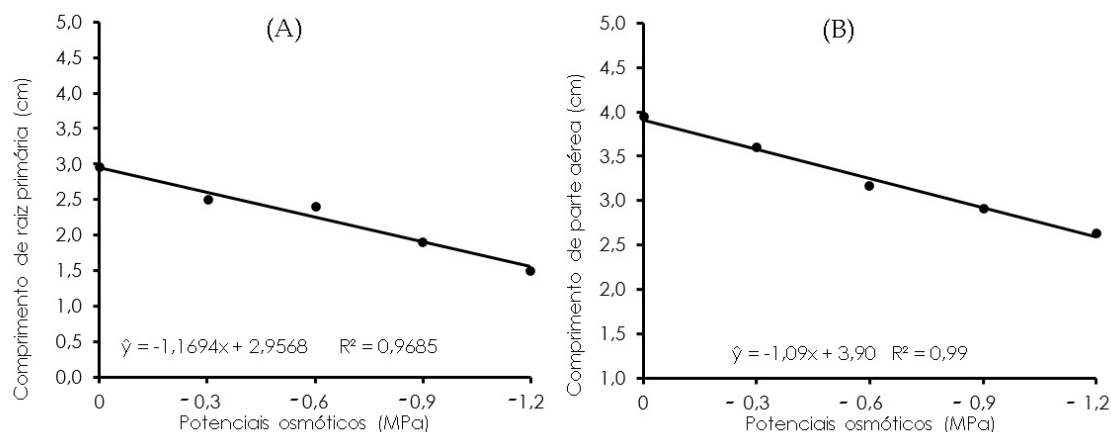
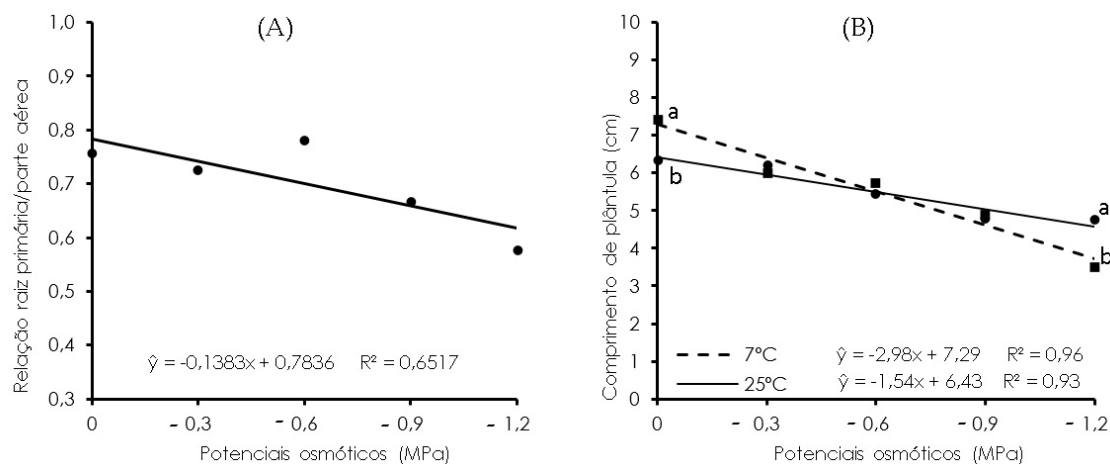
Temperaturas	Comprimento raiz primária (cm)	Comprimento parte aérea (cm)	Relação R/PA (g)
7°C	2,55 a	2,95 b	0,85 a
25°C	1,96 b	3,55 a	0,55 b
CV %	21,0	9,85	21,1

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se uma relação linear e negativa entre os potenciais osmóticos e o comprimento de raiz primária e parte aérea (Figura 3), ambas reduziram-se como em Machado Neto et al. (2006), Custódio et al. (2009a), Moraes et al. (2005), entre outros. Nestas circunstâncias, isto pode ter ocorrido pela redução do alongamento dos tecidos, uma vez que este é o processo de síntese de carboidratos são susceptíveis ao estresse hídrico (Wenkert et al., 1978).

Não houve interação entre as temperaturas e os potenciais na relação entre raiz primária e parte aérea, sendo que a média das

duas temperaturas diminuiu com o aumento da negatividade do potencial osmótico (Figura 4A). De acordo com o tamanho de plântulas, houve diferença significativa entre as temperaturas testadas somente nos potenciais de 0 e -1,2 MPa (Figura 4B), apresentando também uma relação linear e negativa com os osmóticos. Dentro desse contexto, é conveniente salientar que o primeiro efeito mensurável do estresse hídrico é uma diminuição no crescimento das plântulas, causada pela redução da expansão celular, a qual necessita de um potencial de turgor adequado para um desenvolvimento satisfatório (Taiz & Zeiger, 2009).

**Figura 3.** Comprimento de raiz primária (A) e parte aérea (B) de plântulas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em função de diferentes potenciais osmóticos.**Figura 4.** Relação raiz primária/parte aérea (A) e comprimento total de plântulas (B) de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em função do choque frio e diferentes potenciais osmóticos. Letras diferentes dentro de um mesmo potencial osmótico diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conclusões

O melhor desempenho na germinação foi obtido pelas sementes que passaram pelo choque térmico à 7°C por 24 horas, o que permite afirmar que ocorreu uma indução de tolerância cruzada e que esta pode ser ativada no início do processo de embebição em sementes de feijão-caupi.

De acordo com o comprimento de raiz primária, parte aérea, plântula inteira e relação raiz primária/parte aérea, o choque térmico apresentou distintas respostas, entretanto, observou-se uma relação linear e negativa com potenciais osmóticos estudados.

Referências

- Beserra Jr, J.E.A., Andrade, E.C., Camarço, R.F.R.A., Nascimento, A.K.Q., Lima, J.A.A. 2011. Sequence variability in the coat protein gene of Cowpea severe mosaic virus isolates from Northeastern Brazil. *Tropical Plant Pathology* 36: 121-124.
- Borisova, T.A., Bugaje, S.M., Meshkova, N.V., Vlasov, P.V. 2001. Heat shock increases the tolerance of Plants to UV-B radiation: 1. growth, development, and water supply to tissues. *Russian Journal of Plant Physiology* 48: 507-513.
- Braga, L.F., Sousa, M.P., Braga, J.F., Sá, M.E. 1999. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato na qualidade fisiológica de sementes de feijão. *Revista Brasileira de Sementes* 21: 95-102.
- Brasil, Ministério da Agricultura. 2009. *Regras para análises de sementes*. 365p.
- Castellón, R.E.R., Araújo, F.M.M.C., Ramos, M.V., Neto, M.A., Filho, F.R., Grangeiro, T.B., Cavada, B.S. 2003. Composição elementar e caracterização da fração lipídica de seis cultivares de caupi. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 7: 149-153.
- Coelho, D.L.M., Agostini, E.A.T., Guaberto, L.M., Machado Neto, N.B., Custódio, C. C. Estresse hídrico com diferentes osmóticos em sementes de feijão e expressão diferencial de proteínas durante a germinação. *Acta Scientiarum Agronomy* 32: 491-499.
- Custódio, C.C., Salomão, G.R., Machado Neto, N.B. 2009a. Estresse hídrico na germinação e vigor de sementes de feijão submetidas à diferentes soluções osmóticas. *Revista Ciência Agrônômica* 40: 617-623.
- Custódio, C.C., Vivan, M.R., Nunes, R.C.A., Agostini, E.A.T. 2009b. Tolerância cruzada induzida por choque térmico na germinação de semente de feijão. *Revista Brasileira de Sementes* 31: 131-143.
- Ehlers, D., Hall, A. 1997. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Res.*, 53: 187-204.
- Freire Filho, F.R.; Ribeiro, V.Q.; Barreto, P.D.; Santos, A.A. 2005. Melhoramento Genético. In: Freire Filho, F.R.; Lima, J.A.A.; Ribeiro, V.Q. (ed.) *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. Brasília: EMBRAPA. p. 487-497.
- Freire Filho, F.R., Ribeiro, V.Q., Rocha, M.M., Lopes, A.C.A. 2002. Adaptabilidade e estabilidade da produtividade de grãos de linhagens de caupi de porte enramador. *Revista Ceres* 49: 383-393.
- Hall, A., Singh, B., Ehlers, D. 1997. Cowpea Breeding. In: Janick, J. (ed.) *Plants Breeding Reviews*. Wiley and Sons Inc., New York. p. 215-274.
- Islam, S., Carvajal, R., Carmen, R., James Junior, O.G. 2008. Physiological and Biochemical variations in seed germination of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivars. *American J. Plant Physiol.*, 3: 16-24.
- Lobato, A.K.S., Oliveira Neto, C.F., Costa, R.C.L., Santos Filho, B.G., Cruz, F.J.R., Laughinghouse, H.D. 2008. Biochemical and physiological behavior of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Under water stress during the vegetative phase. *Asian J. Plant Sci.*, 7: 44-49.
- Machado Neto, N.B., Custódio, C.C., Costa, P.R., Doná, F.L. 2006. Deficiência hídrica induzida por diferentes agentes osmóticos na germinação e vigor de sementes de feijão. *Revista Brasileira de Sementes* 28: 142-148.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2: 176-177.
- Marcos Filho, J. 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ. 495p.
- Marin, A., Santos, D.M.M., Banzatto, D.A., Ferraudo, A.S. 2004. Germinação de sementes de guandu sob efeito da disponibilidade hídrica e de doses subletais de alumínio. *Bragantia* 63: 3-24.
- Moraes, G.A.F., Menezes, N.L. 2003. Desempenho de sementes de soja sob condições diferentes de potencial osmótico. *Ciência Rural* 33: 219-226.
- Moraes, G.A.F., Menezes, N.L., Pasqualli, L.L. 2005. Comportamento de sementes de feijão sob diferentes potenciais osmóticos. *Ciência Rural* 35: 776-780.
- Moraes, J.G.L., Bleicher, E. 2007. Preferência

do pulgão-preto, *Aphis craccivora* Koch, a diferentes genótipos de feijão-decorda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Ciência Rural* 37: 1554-1557.

Moterle, L.M., Lopes, P.C., Braccini, A.L., Scapim, C.A. 2006. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de cultivares de milho-pipoca submetidas ao estresse hídrico e salino. *Revista Brasileira de Sementes* 28: 169-176.

Nakagawa, J. 1999. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: Krzyzanoski, F.C.; Vieira, R.D.; França Neto, J.B. *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES. p. 2.1-2.24.

Oliveira, A.B., Gomes Filho, E. 2009. Germinação e vigor de sementes de sorgo forrageiro sob estresse hídrico e salino. *Revista Brasileira de Sementes* 31: 048-056.

Popinigis, F. 1985. *Fisiologia da semente*. Brasília, DF: AGIPLAN. 289p.

Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R. 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* 130: 1143-1151.

Song, S.Q., Lei, Y.B., Tian, X.R. 2005. Proline metabolism and cross-tolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seeds. *Russian Journal of Plant Physiology* 52: 897-904.

Taiz, L.; Zeiger, E. 2009. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 819p.

Vijaykumar, A., Saini, A., Jawali, N. 2010. Phylogenetic analysis of subgenus *Vigna* species using nuclear ribosomal RNA ITS: evidence of hybridization among *Vigna unguiculata* subspecies. *Journal of Heredity* 101: 177-188.

Wenkert, W., Lemon, E.R., Sinclair, T.R. 1978. Leaf elongation and turgor pressure in field; grown soybean. *Agronomy Journal* 70: 761-764.