

Monique dos Santos

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE SEMENTES  
DE FEIJÃO CRIOULO EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE POR  
FRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cileide M. M. Coelho Arruda de Souza.  
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin.

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

dos Santos, Monique  
QUALIDADE FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE SEMENTES DE FEIJÃO  
CRIOULO EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE POR FRIO / Monique dos  
Santos ; orientadora, Cileide M. M. Coelho Arruda de Souza  
; coorientador, Marcelo Maraschin. - Florianópolis, SC,  
2014.  
153 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Qualidade  
Fisiológica. 3. Feijão (*Phaseolus vulgaris*). 4. Sementes  
Crioulas. 5. Recursos Genéticos. I. , Cileide M. M. Coelho  
Arruda de Souza. II. Maraschin, Marcelo. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Monique dos Santos

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE SEMENTES  
DE FEIJÃO CRIOULO EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE POR  
FRIO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2014.

---

Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Cileide Maria Medeiros Coelho, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Marcelo Maraschin, Dr.  
Corientador  
Universidade Federal de Santa  
Catarina

---

Prof. Rubens Onofre Nodari,  
Dr.  
Universidade Federal de Santa  
Catarina

---

Prof. Haroldo Tavares Elias Dr.  
EPAGRI

---

Prof.<sup>a</sup> Fernanda Ramlov, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa  
Catarina



Este trabalho é dedicado aos meus pais Luiz Carlos dos Santos e Jacira R. dos Santos e ao meu namorado Felipe Steiner. Por todo amor, carinho, dedicação e apoio.



## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus, por me transmitir luz, garra e persistência pra concluir essa grande e importante fase de minha carreira profissional. Além disso, me permitir ter a oportunidade do aprendizado diário juntamente com professores de excelência e colegas de trabalho admiráveis.*

*Aos meus pais, Luiz C. dos Santos e Jacira R. dos Santos por sempre acreditarem em mim, demonstrando apoio incondicional através de conversas, amor e carinho. Vocês são primordiais em minha vida, obrigada por todo apoio, incentivo, torcida e confiança durante mais esses dois anos de especialização. Vocês são tudo pra mim, e não posso agradecer de outra forma, a não ser dizendo: Amo vocês incondicionalmente, obrigada.*

*Ao meu companheiro, Felipe Steiner, agradeço por cada segundo dedicado a mim, ajuda no laboratório durante finais de semanas e altos horários da noite, conversas de apoio, por transmitir confiança e energia positiva, me fazer acreditar a cada dia que todo esforço me tornaria uma profissional mais qualificada. Obrigada por aparecer na minha vida e tornar os meus dias mais leves, por tornar essa etapa mais fácil, por me fazer entender por que eu deveria permanecer em Florianópolis mais dois anos, obrigada por todo seu carinho. Te amo.*

*A equipe do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), ao qual tive o prazer de conviver durante o último ano do mestrado, aos profissionais incríveis: Eduardo da Costa Nunes, Bianca Coelho, Aline Pereira, Amélia Somensi Zeggio, Máira Tomazzoli, Beatriz Veleirinho, e em especial Rodolfo Moresco, Virgílio G. Uarrota, Claudia M. Bauer e Fernanda Ramlov, obrigada por toda a parceria e palavras de apoio durante todo o processo experimental.*

*Aos meus amigos que residem em outros estados: Juliana, Mariana, Cássia, Luana, Izabel, e Anne-Lise pelo carinho transmitido por mensagens e telefonemas, mesmo longe sempre presentes.*

*À minha grande amiga e irmã, Aline A. Fernandes, pela amizade e confiança, por todos os momentos de apoio, dedicação, risadas, conselhos e ajuda. Você é uma mulher incrível que transforma qualquer momento turbulento em dias de reflexão e avanço espiritual, cada dia você me ensina algo novo e mágico, eu te amo eternamente.*

*Agradeço à Eva Regina de Oliveira Rodrigues por todas as conversas, sobre vida pessoal e profissional, por atender telefonemas aos domingos enquanto eu estava no laboratório com alguma dúvida de*

*protocolo, ou de localização de reagentes, entre outras questões mais profundas. Muito obrigado por me permitir ter sua amizade. Te amo.*

*Às minhas lindas flores que me fizeram rir em vários momentos críticos de trabalho, principalmente durante os três longos meses de escrita do manuscrito, Tassiane T. Pinto e Lilian Machado, vocês são muito especiais pra mim.*

*À minha querida e indispensável amiga Caroline Luiz, por sempre estar ao meu lado, em todos os momentos da minha vida nos últimos 8 anos. Obrigada por tudo Carol, eu sei que ainda dividiremos muitos momentos juntas, você é e sempre será muito importante pra mim. I love you, baby.*

*Às minhas velhas e eternas amigas Maria Fernanda A. Bauer, Juliana Marzurkievicz, Paula Emanuela e Paula Sete pelo amor transmitido a cada abraço, pela confiança e oportunidade de fazer eu sentir, a cada dia, a amizade verdadeira. Vocês são inesquecíveis. Amo vocês.*

*Ao meu irmão de coração Dorival Almeida, por sempre estar ao meu lado, por ser um amigo incrível e por ser tão especial e único em minha vida.*

*A minha amiga mais alta e mais loira, Larissa Villar, por todas as conversas nos corredores do CCA, pelas ajudas em estatística, pelas marmitas levadas ao laboratório, por toda amizade e confiança. Je t'aime.*

*Aos amigos que findei mais laços durante a pós-graduação, obrigada pelas risadas e momentos de pura alegria e apoio, Morgana L., Daniela De Conti, divertidíssima peruana Diana Diaz(Gordinha), colombiana Zamira, André F. Lohn, Alex Z., Tiago Montagna, Gabriela Vanderlinde, Suzeli Simon, André Sezerino, Vivian Almeida, Marília Shibata e Daniele Nerling.*

*Aos amigos da família Santos, família Cunha; família Paoli, família Zuzzi, entre outros amigos que convivem frequentemente com a família, Obrigada pelo apoio.*

*Obrigada ao técnico de laboratório mais querido do Centro de Ciências Agrárias, Luiz Mamona, por todos os momentos descontraídos e de ajuda no laboratório de Sementes. Você é muito especial. Á animada e simpática técnica do LMBV, Maria Luisa Peixoto, por todos os chás tranquilizantes que me destes.*

*À Bernadete Ribas e toda a equipe do Programa de Pós-graduação de Recursos Genéticos e Vegetais/UFSC.*

*Ao co-orientador mais importante que já tive, Dr. Marcelo Maraschin, ao qual devo muito da minha formação profissional durante esse último ano de mestrado. Pelos dias de apoio, conversas, desabafos,*



*por acreditar em mim a cada dia, por cada sorriso que abristes por me ver trabalhando no laboratório, preocupação, pelo grande exemplo de pessoa e profissional completo, por toda sua generosidade comigo e por toda comunidade acadêmica. O professor foi imensamente importante pra mim.*

*À minha orientadora Cileide M. M. Coelho Arruda de Souza, pela oportunidade, pela confiança, pela paciência e amizade durante esses dois anos. Obrigada por tudo professora.*



Você não precisa ser o melhor, nem o mais rápido, nem o mais esperto, você só precisa dar o melhor de si.

(Autor desconhecido)



## RESUMO

Cultivares crioulas são guardiãs de efeitos combinados, tanto da seleção natural como da humana, representando características geneticamente dinâmicas e diversificadas que estão interligadas ao meio biótico e abiótico, traduzidas fenotipicamente tanto nas características da semente como da planta. A magnitude dessas características induz as sementes crioulas a se sobressair ao estresse tanto biótico como abiótico, visto que em sementes comerciais esses atributos são mais restritos. Estresse abiótico ocasionado por baixas temperaturas pode afetar o desenvolvimento da semente do feijoeiro, por gerar alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em seu metabolismo, conseqüentemente o estresse oxidativo. Santa Catarina apresenta características climáticas relativas ao clima temperado, refletindo em invernos rigorosos, possibilitando apenas duas épocas de cultivo para o feijoeiro, conhecida como época das águas e das secas. Por isso, a caracterização correta dos recursos genéticos vem a potencializar o uso desse material pelo agricultor e amplifica o conhecimento da variabilidade genética da espécie para auxiliar o avanço dos programas de melhoramento. O objetivo do trabalho foi avaliar mais detalhadamente a resposta de 22 genótipos crioulos, do BAF da UDESC, de duas safras consecutivas (2011/12[S1] e 2012/13[S2]), às condições de estresse por frio, além de observar as oscilações na produção de metabólitos não-enzimáticos. Foram realizados diferentes testes, em nível de laboratório, para tentar explicar o porquê das diferenças genéticas observadas previamente diante das temperaturas mais baixas. Para avaliar a qualidade fisiológica das sementes realizou-se o teste de germinação e vigor (comprimento de plântulas, condutividade elétrica), das amostras submetidas ao estresse por frio [F], e na ausência de estresse (testemunha [C]). Já para observar o perfil bioquímico dos genótipos foi realizada a quantificação de compostos fenólicos, ação antioxidantes (DPPH), teor de aminoácidos livres e peroxidação de lipídeos (TBARs). Para o estudo detalhado de cada genótipo, as médias foram analisadas pelo teste de Scoot-Knott, e com o propósito de ampliar os espectros dos resultados realizaram-se técnicas multivariadas. Observando as safras, pelos testes fisiológicos não foi possível averiguar diferenças significativas entre elas quanto a germinação, contudo a nível de vigor a safra S2 foi superior a S1. O conteúdo de fenólicos e a atividade antioxidante (DPPH) foram superiores na S2 se comparadas a S1, já o teor de prolina e de TBARs apresentaram valores maiores em S1 do que em S2, em ambos os tratamentos (C e F). Índices pluviométricos altos em S1 (327 mm) em relação a S2 (105 mm) durante o período de floração até matu-

ração da semente podem ter causado essas diferenças. Observando os tratamentos C e F, os valores de todas as variáveis bioquímicas analisadas também aumentaram em F, indicando que o estresse por baixas temperaturas causou aumento do conteúdo de metabólitos não-enzimáticos na semente, afim de proteger os danos da oxidação. Observando-se os genótipos individualmente, percebeu-se que os BAFs 81e 75 se destacaram diante dos demais, tanto nos testes fisiológicos como nos testes bioquímicos, em ambas as safras. Bioquimicamente notou-se a presença de Leucina nesses genótipos e uma produção mediana dos compostos não-enzimáticos analisados, fator que pode ser um indicio para explicar o por quê esses BAFs se sobressaíram aos estresse por frio, e foram indicados por esse estudo para a semeadura antecipada nas regiões produtoras do estado de Santa Catarina.

**Palavras-chave:** Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.); Recursos Genéticos; Sementes.

## ABSTRACT

Landraces are guardians of combined effects of both natural selection as the human, representing genetically diverse and dynamic characteristics that are linked to biotic and abiotic environment, both phenotypically translated in seed characteristics as the plant. The magnitude of these features induce native seeds to excel at both abiotic and biotic stress, whereas in commercial seed these attributes are more restricted. Abiotic stress caused by low temperatures can affect the development of bean seed, for generating physiological, biochemical and molecular changes in your metabolism, thus oxidative stress. Santa Catarina has characteristics of its climate temperate, reflecting harsh winters, allowing just two growing seasons for the bean, known as the rainy season and droughts. Therefore, the correct characterization of animal genetic resources is to maximize the use of this material by the farmer and amplifies the knowledge of genetic variability to assist the advancement of breeding programs. The objective of this study was to evaluate in more detail the response of 22 landraces genotypes, BAF/ UDESC in two consecutive crops (2011/12 [S1] and 2012/13 [S2]), the conditions of cold stress, in addition to observing fluctuations in the production of non-enzymatic metabolites. Different tests were performed in the laboratory level, to try to explain why the genetic differences observed previously on the lower temperature. To evaluate the physiological quality of seeds held the test of germination and vigor (seedling length, electrical conductivity), the samples subjected to cold stress [F], and in the absence of stress (control [C]). Have to observe the biochemical profile of genotypes quantification of phenolic compounds, antioxidant activity (DPPH), free amino acid content and lipid peroxidation (TBARS) was performed. For the detailed study of each genotype means were analyzed by Scoot - Knott test and in order to broaden the spectra of the results were performed multivariate techniques. Watching the seasons, by physiological tests was not possible to verify significant differences between them for germination, however the level of force the crop S2 was superior to S1. The phenolic content and antioxidant activity (DPPH) were higher compared to the S1 S2, whereas the proline content and TBARS were higher than in S1 to S2, in both treatments (C and F). Heavy rainfall in S1 (327 mm) compared to S2 (105 mm) during the period of flowering until seed maturation may have caused these differences. Observing the treatments C and F, the values of all the biochemical variables in F have also increased, indicating that the stress caused by low temperatures increase the content of non-enzymatic metabolites in seed in order to protect

from oxidative damage. Observing the individual genotypes, it was realized that the BAFs 81 and 75 stood out over the others, in many physiological tests such as biochemical tests, in both seasons. Biochemically noted the presence of leucine in these genotypes and a median output of non - enzymatic compounds analyzed, a factor that may be a clue to explain why these BAFs stood out to cold stress, and are indicated by this study for the sowing early in the producing regions of the state of Santa Catarina.

**Keywords:** Bean (*Phaseolus vulgaris* L.); Genetic Resources; Seeds.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO DO FEIJÃO COMUM ( <i>P. VULGARIS</i> ) NA AMÉRICA LATINA.....	37
FIGURA 2: CONCENTRAÇÃO DA PRODUÇÃO POR MICRORREGIÃO GEOGRÁFICA, SAFRA 2011/12, PRODUÇÃO DE 115,719 T.....	43

### CAPÍTULO II

FIGURA 3: GRÁFICOS DEMONSTRATIVOS DA ESTABILIZAÇÃO DOS 26 GENÓTIPOS EM HORAS EM S1 E S2, NO TRATAMENTO TESTEMUNHA (C).....	73
GRÁFICO 1: TEMPERATURAS (°C) MÁXIMA, MÉDIA E MÍNIMA DIÁRIAS E PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA (MM) REGISTRADAS PELO INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - IN-MET, EM CAMPOS NOVOS-SC, NO PERÍODO DA SEMEADURA ATÉ A MATURIDADE FISIOLÓGICA, NA SAFRA 2011/2012 (A) E (B) NA SAFRA 2012/2013.....	74
FIGURA 4: GRÁFICOS DEMONSTRATIVOS DA ESTABILIZAÇÃO DOS 26 GENÓTIPOS EM HORAS EM S1 E S2, NO TRATAMENTO TESTEMUNHA (C).....	76
FIGURA 5: GRÁFICOS DEMONSTRATIVOS DA ESTABILIZAÇÃO DOS 26 GENÓTIPOS EM HORAS EM S1 E S2, NO TRATAMENTO APÓS O ESTRESSE POR FRIO (F).....	78
FIGURA 6: DISPERSÃO GRÁFICA DOS GENÓTIPOS DE FEIJÃO EM RELAÇÃO AOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PC1 E PC2), CORRESPONDENDO ÀS TRÊS VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS ESTUDADAS. OS NÚMEROS CORRESPONDENTES AOS BAFS ESTÃO MAIS DETALHADOS NA TABELA 1.....	84
FIGURA 7: CONTRIBUIÇÃO RELATIVAS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE SINGH (1981), BASEADA NA DISTÂNCIA EUCLIDIANA. CP= COMPRIMENTO DE PLÂNTULAS; CE= CONDUTIVIDADE ELÉTRICA.....	85

### CAPÍTULO III

FIGURA 8: COMPOSTOS FENÓLICOS NOS GRÃOS DE VARIEDADES CRIOLAS DE FEIJÃO (A) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH (B) NAS SAFRAS DE 2011/12 E 2012/13, PARA SEMENTES CONTROLE (C) E APÓS O ESTRESSE	
---	--

TÉRMICO (F). OS VALORES SÃO EXPRESSOS EM MG/G DE MATÉRIA DE SECA PARA COMPOSTOS FENÓLICOS E EM PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO PARA DPPH E SÃO REFERENTES ÀS MÉDIAS $\pm$ DESVIO PADRÃO.....	108
FIGURA 9: TEOR DE PROLINA LIVRE (A) E PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS (B) DOS GRÃOS DE VARIEDADES CRIOULAS DE FEIJÃO DAS SAFRAS DE 2011/12 E 2012/13, PARA SEMENTES CONTROLE (C) E APÓS O ESTRESSE TÉRMICO (F). OS VALORES SÃO EXPRESSOS EM MMOL/G DE PARA PROLINA (DETERMINADA POR CURVA PADRÃO) E EM MM PARA LIPOPEROXIDAÇÃO (VALOR CORRIGIDO LEI DE LAMBERT-BEER) E SÃO REFERENTES ÀS MÉDIAS $\pm$ DESVIO PADRÃO.	111
FIGURE 10: (A) ANÁLISE HIERÁRQUICA DE CLUSTER REALIZADO ATRAVÉS DAS VARIÁVEIS: COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH), PROLINA E LIPOPEROXIDAÇÃO (TBARS) DA SAFRA 2011/12(S1), ANTES (S) E APÓS O ESTRESSE DE BAIXAS TEMPERATURAS (F) PARA OS 16 GENÓTIPOS DE FEIJÃO. FORMAÇÃO DE QUATRO GRUPOS CUJAS COLORAÇÕES DISTINTAS. ANÁLISE HIERÁRQUICA FOI OBTIDA PELA DISTÂNCIA EUCLIDIANA (UPGMA). (B) DISTRIBUIÇÃO FATORIAL, PC1 E PC2, PARA TODAS VARIÁVEIS ANALISADAS EM VIRTUDE DO ESTRESSE OXIDATIVO DOS 16 GENÓTIPOS DE FEIJÃO.....	114
FIGURE 11: (A) CORRELAÇÃO DE PEARSON PARA VARIÁVEIS AVALIADAS NA S1 EM VIRTUDE DO ESTRESSE OXIDATIVO. (B) DISTRIBUIÇÃO FATORIAL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS (JANELA ESPECTRAL DE 280 A 340NM) DE AMOSTRAS DOS 16 GENÓTIPOS CONTRASTANTES TRABALHADOS NA S1, ANTES (S) E APÓS O ESTRESSE DE BAIXAS TEMPERATURAS (F).....	115

#### CAPÍTULO IV

FIGURE' 1: SIGNS PATTERNS OF AMINO ACIDS OBTAINED THROUGH THE ONE-DIMENSIONAL (A) AND TWO-DIMENSIONAL ANALYSIS (B).....	134
FIGURE' 2: FACTORIAL DISTRIBUTION OF PRINCIPAL COMPONENTS, PC1 AND PC2 FOR THE PROFILES OF AMINO ACIDS ANALYZED IN SEEDS OF P. VULGARIS DURING CROP 2011/12 (S1).....	145
FIGURE' 3: CLUSTERS OBTAINED BASED ON THE AMINO ACID PROFILE DATA MATRIX USING MEASURES OF	

SIMILARITY (CORRELATION COEFFICIENT) BY HIERARCHICAL CLUSTERING METHOD SINGLE LINKAGE SEPARATING THE RESPECTIVE GROUPS. (A) CLUSTER ON THE CROP 2011/12, WHOSE COPHENETIC CORRELATION WAS $R = 0.92$ AND (B) ON THE CLUSTER CROP 2012/13, WHOSE COPHENETIC CORRELATION WAS $R = 0.71$ .....	146
FIGURE' 4: SPECTRA FT-IR (3000 - 600 CM-1) 8 GENOTYPES P. VULGARIS BEFORE (C) AND AFTER STRESS FOR LOW TEMPERATURES.....	147
FIGURE' 5:PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS SCORES SCATTER PLOT OF THE FTIR DATASET (3000 – 600 CM-1) OF SEEDS P. VULGARIS SAMPLES BEFORE (C) AND AFTER STRESS FOR LOW TEMPERATURES (F).....	148
FIGURE' 6: TEMPERATURES (° C) MAXIMUM, MEAN AND MINIMUM DAILY AND RAINFALL (MM) RECORDED AT THE NATIONAL INSTITUTE OF METEOROLOGY - IN-MET, IN CAMPOS NOVOS, SC, IN THE PERIOD FROM SOWING TO PHYSIOLOGICAL MATURITY IN 2011/2012 SEASON (THE ) AND (B) IN THE 2012/2013 HARVEST. * A SOWING IN THE 2011/2012 HARVEST HELD ON NOVEMBER 1, 2011, AND 2012/2013 CROP SOWING WAS HELD ON NOVEMBER 9, 2012, ACCORDING TO AGROCLIMATIC ZONING FOR THE AREA.....	149



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

TABELA 1: ESCALA FENOLÓGICA DO FEIJÃO COMUM.....	35
FONTE: GEPTS, 1998.....	37
TABELA 2: COMPOSIÇÃO BÁSICA DO FEIJÃO. ....	38
TABELA 3: PRODUÇÃO CATARINENSE DE FEIJÃO 2007/08 A 2012/13*.....	40
TABELA 4: FEIJÃO - ÁREA, PRODUÇÃO E RENDIMENTO POR MICRORREGIÃO GEOGRÁFICA - SANTA CATARINA - SAFRAS 2006/07-2009/10. ....	42
FONTE: EPAGRI/CEPA, 2013. ....	43

### CAPÍTULO II

TABELA 5: IDENTIFICAÇÃO, ORIGEM E NOME COMUM DOS GENÓTIPOS CRIoulos E COMERCIAIS DE FEIJÃO DO BANCO ATIVO DE FEIJÃO DO CAV-UDESC, SANTA CATARINA, BRASIL.....	66
TABELA 6: PERCENTUAL GERMINATIVO NO TRATAMENTO TESTEMUNHA (C) E APÓS O ESTRESSE COM FRIO (F), NOS DOIS ANOS DE CULTIVO (2011/2012 E 2012/2013).....	69
TABELA 7: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS CARACTERES ANALISADOS EM LABORATÓRIO DOS 26 GENÓTIPOS CRIoulos DO BAF/ CAV-UDESC, LAGES – SC, NOS DOIS ANOS DE CULTIVO (2011/2012 E 2012/2013).....	70
TABELA 8: PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO (TG%), COMPRIMENTO DE PLÂNTULA (CP) E CONDUTIVIDADE ELÉTRICA (CE) DOS 26 GENÓTIPOS DE SEMENTES DE FEIJÃO ANALISADOS DO BAF, PERTENCENTES À UDESC, NOS ANOS DE CULTIVO 2011/12 E 2012/13. ....	72
TABELA 9: PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO (TG%), COMPRIMENTO DE PLÂNTULA (CP) E CONDUTIVIDADE ELÉTRICA (CE) DE 26 GENÓTIPOS DE SEMENTE CRIOLA DE FEIJÃO, PRODUZIDAS NOS ANOS DE CULTIVO 2011/12 E 2012/13, APÓS O TESTE DE FRIO. ....	80

### CAPÍTULO III

TABELA 10: IDENTIFICAÇÃO, ORIGEM E NOME COMUM DOS GENÓTIPOS CRIoulos E COMERCIAIS DE FEIJÃO DO BANCO ATIVO DE FEIJÃO DO CAV-UDESC, SANTA CATARINA, BRASIL.....	100
--	-----

TABELA 11: IDENTIFICAÇÃO, GRUPO COMERCIAL E PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE FEIJÃO, APÓS O TESTE DE FRIO.....	102
TABELA 12: CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS GENÓTIPOS CONTRASTANTES, NOS DOIS ANOS DE CULTIVO (2011/2012 E 2012/2013).....	109
TABELA 13: TEOR MÉDIO DE PROLINA LIVRE ( $\mu\text{MOL/G}$ ) E LIPOPEROXIDAÇÃO (MM) GENÓTIPOS CRIoulos CONTRASTANTES DE FEIJOEIROS (P.VULGARIS), NAS SAFRAS 2011/2012 E 2012/2013.....	112

#### CAPÍTULO IV

TABLE' 1: IDENTIFICATION, ORIGIN AND COMMON NAME OF LANDRACE AND COMMERCIAL BEAN GENOTYPES FROM THE ACTIVE GERMLASM BANK OF BEANS, CAV-UDESC, SANTA CATARINA, BRAZIL.....	129
TABLE' 2: IDENTIFICATION, COMMERCIAL GROUP AND GERMINATION RATE OF CONTRASTING BEAN GENOTYPES AFTER COLD TEST.....	131
TABLE' 3: TWENTY STANDARD AMINO ACIDS WORKED, ABBREVIATION, TYPE, DENSITY, RETENTION FACTOR (RF) AND STAINING OBSERVED SILICA PLATE.....	132
TABLE' 4: CONTENT ( DENSITY IN PIXELS) OF PROFILE TOTAL AMINO ACIDS IDENTIFIED IN SAMPLE OF THE CROP 2011/12, IN BOTH TREATMENTS STUDIED (TREATMENT AFTER COLD STRESS = F, C = CONTROL TREATMENT).....	143
TABLE' 5: CONTENT (DENSITY IN PIXELS) OF PROFILE TOTAL AMINO ACIDS IDENTIFIED IN SAMPLE OF THE CROP 2012/13, IN BOTH TREATMENTS STUDIED (TREATMENT AFTER COLD STRESS = F, C = CONTROL TREATMENT).....	144

## SUMÁRIO

<b>ESTADO DA ARTE.....</b>	<b>27</b>
<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>27</b>
<b>2. HIPÓTESE .....</b>	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVO .....</b>	<b>32</b>
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
<b>CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>34</b>
<b>1. Feijão (<i>P. vulgaris</i>).....</b>	<b>34</b>
1.1 Classificação Botânica e Fenologia.....	34
1.2 Origem e domesticação .....	35
1.3 Sementes.....	37
1.4 Importância Econômica.....	39
1.5 Importância Alimentar do Feijão .....	43
1.6 Variedades Crioulas de Feijão e Recursos Genéticos Vegetais.....	44
<b>2. Agricultura Familiar e Produção Agroecológica de Feijão .....</b>	<b>46</b>
<b>3. Qualidade Fisiológica das Sementes de Feijão.....</b>	<b>47</b>
3.1 Importância do Controle da Qualidade e Testes.....	47
3.2 Testes para Avaliação do Potencial Fisiológico .....	48
<b>4. Estresse Oxidativo e Mecanismos de Tolerância .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO II: QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE FEIJÃO CRIOULO APÓS O ESTRESSE DE FRIO.....</b>	<b>63</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>
<b>CAPÍTULO III: ESTRESSE OXIDATIVO EM SEMENTES CRIULAS DE FEIJÃO SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR FRIO.....</b>	<b>96</b>
<b>ESTRESSE OXIDATIVO EM SEMENTES CRIULAS DE FEIJÃO SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR FRIO .....</b>	<b>96</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>99</b>
2.1 Obtenções das sementes de feijão .....	99
2.1.1 Triagem do material analisado .....	101
2.1.2 Preparação do Material.....	102
2.2 Análises bioquímicas.....	102

2.2.1 Espectrofotometria de varredura UV-visível .....	103
2.2.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais .....	103
2.1.3 Determinação da atividade antioxidante – inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).....	103
2.2.4 Determinação de prolina livre .....	104
2.2.5 Quantificação de lipoperoxidação.....	104
2.3 Análises Estatísticas .....	104
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>105</b>
3.1 Espectrofotometria de varredura Uv-visível e quimiometria. ....	105
3.2 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante .....	106
3.3 Prolina livre e lipoperoxidação .....	109
3.4 Grau de relação entre as variáveis.....	112
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>116</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>117</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>118</b>
<b>SOUZA, T. C. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS EM MILHO SAFRINHA. XII SEMINÁRIO NACIONAL. MILHO SAFRINHA. EMBRAPA, DOURADOS, MS.....</b>	<b>124</b>
<b>CAPÍTULO IV: CHANGES IN AMINO ACID PROFILE UNDER COLD STRESS IN LANDRACES SEED BEANS (PHASEOLUS VULGARIS L.) USING THIN LAYER CHROMATOGRAPH (TLC) AND FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY (FT-IR).....</b>	<b>126</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>127</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>129</b>
2.1 Collection of dry common bean seeds .....	129
<b>2.2 Selection of the analyzed material .....</b>	<b>130</b>
<b>2.3 Seeds Extratcts .....</b>	<b>132</b>
2.4 Thin-layer Chromatography (TLC).....	132
2.4.1 Standard .....	132
2.4.1 Sample.....	133
2.4.2 Preparation of plates and composition imersion reagente.....	134
2.4.3 Statistical Analysis.....	134
2.5 Fourier Transform mid infrared spectroscopy (FTIR) .....	135
<b>3. Results and Discution .....</b>	<b>135</b>
3.1 Thin ayer cromathography (TLC).....	135
3.1.1 Quantitavive and Qualitative Analysis.....	135
3.1.2 Analysis of Principal Components and Clusters.....	138
3.2 Fourier Transform mid infrared spectroscopy (FT-IR).....	140
<b>4. CONCLUSION .....</b>	<b>141</b>
<b>ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>141</b>



**BIBLIOGRAPHY ..... 150**



## ESTADO DA ARTE

### 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) está entre os alimentos mais antigos do mundo, pois se encontra presente nos primeiros registros da história da humanidade. Estudos arqueológicos apontam a existência de feijoeiros domesticados a cerca de 10.000 a.C. Apesar da sua longa história, a produção mundial resumiu-se de poucos países, sendo o Brasil, um dos destaques destes últimos, seguido apenas por Myanmar, Índia, China, Estados Unidos e México (ICEPA, 2011).

No âmbito catarinense, a cultura do feijão é tradicional fonte de renda, principalmente para pequenos produtores rurais do Estado. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), em 2010, Santa Catarina alcançou, aproximadamente, 5,2% da produção nacional do grão, ocupando a 6ª posição no cenário produtivo nacional (ICEPA, 2011).

Apesar da importância mundial e nacional, a cultura é sensível a variações climáticas que podem favorecer ou não sua produtividade. Segundo muitas pesquisas de profissionais da área, as temperaturas inferiores a 12°C reduzem significativamente a taxa e a velocidade de germinação das sementes de feijão, enquanto temperaturas próximas a 25°C favorecem o processo.

As mudanças climáticas são eventos cada vez mais intensos per-septíveis ano após ano. Secas, enchentes, ondas de calor e frio, tremores, tempestades fora de época, vêm afetando o planeta, causando perdas econômicas exuberantes e até mesmo colocando vidas em risco. Sabe-se que a agricultura é uma atividade econômica que depende diretamente dos fatores climáticos. Qualquer mudança no clima pode afetar o zoneamento agrícola, a produtividade das diversas culturas e as técnicas de manejo. Sendo assim, a análise dos possíveis efeitos das alterações climáticas sobre a dinâmica de sobrevivência das plantas, sendo elas: morfológica, fisiológica, bioquímica, entre outras é fundamental, para a adoção de medidas mitigadoras, com a finalidade de evitar prejuízos.

Estresses ambientais que eventualmente podem ocorrer durante desenvolvimento de uma determinada cultura podem reduzir o rendimento de sementes, porém os efeitos sobre a capacidade dessa semente adquirir a competência máxima de germinação e vigor têm recebido pouca atenção. Com esse tipo de informação produtores podem desenvolver um aglomerado de ferramentas que favoreçam a produção de

sementes adequadas e comercialmente aceitáveis tanto em ambiente normal como estressante. O efeito do estresse na qualidade e rendimento das sementes depende de muitos fatores, incluindo: a severidade, duração, estágio de desenvolvimento da planta ou da semente durante o estresse, entre outros.

A temperatura influencia na germinação das sementes e a emergência de plântulas, principalmente de espécies cultivadas. Temperaturas extremas, ou seja, tanto altas quanto baixas, costumam influenciar na germinação, positivamente quanto negativamente dependendo da situação. Sendo assim, o efeito de baixas ou altas temperaturas durante a germinação pode acarretar prejuízos permanentes e irreparáveis. O grau desses danos está normalmente correlacionado ao tempo de exposição ao estresse em questão, podendo, entre outros fatores, ocasionar baixo potencial germinativo, menor desenvolvimento da plântula e aumento na vulnerabilidade à patógenos em sementes. Portanto, oscilações na temperatura, podem causar reduções na germinação, tendo um reflexo em comum, a incapacidade das membranas de suportarem esse estresse, influenciando negativamente a velocidade de embebição e a lixiviação de eletrólitos no interior das células para o ambiente externo.

Santa Catarina, particularmente o Oeste e o Planalto Catarinense apresentam clima com invernos frios registrando frequentemente temperaturas negativas durante a estação. Na primavera, existe também a ocorrência de baixas temperaturas, principalmente até final de outubro. Dada essa característica regional, existem apenas duas épocas de cultivo para o feijoeiro, conhecida como época das águas e das secas. Contudo, as safras das secas são mais produtivas do que as safras das águas, sendo umas das causas, as inconstâncias térmicas. Diante do exposto, buscam-se alternativas para reduzir os riscos associado ao processo produtivo do feijão, através de condições proporcionadas por variedades crioulas de feijão.

É indiscutível a importância da caracterização correta dos recursos genéticos para proporcionar ganhos genéticos diferenciados no ramo do melhoramento, e paralelo a isso, potencializar o uso dos mesmos pelo próprio agricultor. A manipulação deste germoplasma admite acessos que constituem uma fonte de variabilidade de novos alelos, que conferem, entre outras peculiaridades, a estabilidade e adaptabilidade na produção de grãos na cultura do feijão frente a estresses bióticos e abióticos.

Trabalhos realizados por COELHO et al (2010a) demonstraram que sementes de feijão crioulo apresentam elevado potencial fisiológico em relação a cultivar comercial, por apresentar diferença no percentual

inicial de germinação, maior comprimento de raiz primária, valores baixos de liberação de solutos em água e elevada emergência a campo. Essas peculiaridades morfoagronômicas encontradas nessas sementes são explicadas pela ampla base genética dos genótipos crioulos, contudo as respostas na morfologia e nos caracteres do rendimento podem ser alterados por déficit hídrico, grandes oscilações na temperatura, luminosidade e umidade.

Como o foco deste trabalho foi caracterizar mais detalhadamente a resposta dos genótipos crioulos à condições de estresse por frio, foram realizados diferentes testes, em nível de laboratório, para tentar explicar o porquê das diferenças genéticas observadas previamente diante das temperaturas mais baixas. Sabe-se que o conhecimento da configuração da composição química, reações bioquímicas, e expressão de proteínas (envolvidas na defesa a estresses, por exemplo) de sementes podem explicar características diferenciadas conferidas em determinados genótipos, podendo gerar espécies melhoradas, com uma base genética apropriada a determinadas situações climáticas.

Dentro desse panorama, essa pesquisa pretendeu identificar, dentre 21 genótipos crioulos e 5 genótipos convencionais de feijão, aqueles que melhor suportam condições de estresse gerado por baixas temperaturas. Foi selecionado 16 genótipos contrastantes em nível fisiológico para explicar as peculiaridades adaptativas através do metabolismo, integridade celular, oscilações de metabólitos, em especial a prolina, como resposta ao estresse. Assim, os genótipos classificados como mais resistentes às estações mais frias, através dos testes fisiológicos, foram caracterizados mais detalhadamente, visando explicar bioquimicamente o porquê das diferenças.

Essa dissertação está estruturada em três capítulos em forma de artigos. O primeiro artigo discorre sobre a parte fisiológica das sementes de feijão, o segundo e o terceiro capítulos explanam os dados bioquímicos dos genótipos contrastantes.



## **2. HIPÓTESE**

O presente estudo baseia-se na hipótese de que existam genótipos crioulos de feijoeiro que são menos sensíveis ao estresse submetido a variáveis temperaturas, mantendo a taxa de vigor e a viabilidade, favorável ao desenvolvimento de uma planta. Essa resistência pode estar associada com a estruturação das proteínas, lipídeos e carboidratos, fato que influencia diretamente a taxa respiratória, e conseqüentemente, a germinação.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente estudo teve como objetivo avaliar o desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de genótipos crioulos de feijão sob condições de estresse por baixas temperaturas.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

a) Avaliar 26 genótipos crioulos de feijão quanto ao potencial fisiológico quando submetidos a condições de estresse à baixas temperaturas (7°C), em duas safras distintas (2011/12 e 2012/13);

b) Selecionar 8 genótipos mais vigorosos e 8 genótipos menos vigorosos (30%) para as safras em estudo, quanto a classificação de vigor, sendo estes contrastantes quanto ao desempenho fisiológico de suas sementes.

c) Analisar as possíveis alterações bioquímicas originadas pelo estresse oxidativo nas sementes (Ação antioxidante, Compostos Fenólicos, Peroxidação Lipídica) em função das condições de estresse por baixa temperatura e sua relação com o vigor e viabilidade dessas sementes;

d) Analisar as variações no perfil de aminoácidos, em especial, a prolina em função das condições de estresse por baixa temperatura.





# CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1. Feijão (*P. vulgaris*)

### 1.1 Classificação Botânica e Fenologia

O feijão comum, pertencente à família Leguminosae/Fabaceae, uma das maiores famílias das angiospermas, contida na classe Dicotyledoneae, subfamília Papilionoidae e gênero *Phaseolus* L. (GRAHAM & RANALLI, 1997). Estima-se que o gênero *Phaseolus* engloba, aproximadamente, 55-60 espécies das quais, apenas cinco foram domesticadas: *P. vulgaris*, *P. polyanthus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. lunatu* (BROUGHTON, 2003). A espécie *P. vulgaris*, vulgarmente designada por feijão comum, é a mais difundida e consumida em diversos países (SINGH, 1991; GEPTS & DEBOUCK, 1991).

Planta anual, pode ser herbácea, trepadeira, rasteira, e seu ciclo de vida pode variar de aproximadamente 70 a 120 dias, característicos de cada cultivar e das épocas de cultivo. Pode apresentar quatro tipos de hábito de crescimento, sendo um tipo chamado determinado (herbácea e porte da planta ereto) e os outros três definidos como indeterminados (herbácea [porte da planta ereto e caule pouco ramificado], trepadeira ou rasteira). As vagens são retas ou suavemente curvas, achatadas, arredondadas, e com bico reto ou curvado, em geral com 9 a 12 cm de comprimento, e com 3 a 7 sementes (GRAHAM & RANALLI, 1997).

*Phaseolus* é um gênero diploide, como a maioria das espécies, contendo  $2n = 2x = 22$  cromossomos (algumas espécies têm  $2n = 2x = 20$ ). O tamanho do genoma de *P. vulgaris*, em média é de 580 Mbp (genoma haploide). Entretanto, os níveis de duplicação e da quantidade de sequências altamente repetidas são normalmente baixos, e a maioria dos *locos* são cópias simples (GEPS, 2008).

A cor da flor é geneticamente independente da cor da semente, mas a associação entre particulares flor e semente de cores é comum. As flores podem ser brancas, rosa ou roxo (também vermelho em *P. coccineus*). A flor contém dez estames e um único ovário, que é predominantemente auto fertilizado. A germinação em *P. vulgaris* é epígea, e requer 5-7 dias a uma temperatura do solo de, no mínimo, 16 ° C. Já para a floração, cada cultivar tem suas características, interação, temperatura, fotoperíodo, e em média, essa fase inicia 28-42 dias após o cultivo (GRAHAM & RANALLI, 1997).

A fenologia da planta é complexa e envolve o conhecimento de todas as etapas do crescimento e desenvolvimento do vegetal, como por exemplo, a germinação, emergência, formação do aparato fotossintético, florescimento, fase reprodutiva, maturação dos frutos e sementes. De maneira geral, o feijão engloba duas fases distintas: vegetativa e a reprodutiva, e com esta base, usa-se uma escala baseada nas mudanças morfológicas e eventos fisiológicos que sucedem o ciclo de vida do feijoeiro baseada nos estudos de Gepts & Fernandez (1982) (NETO & FANCELLI, 2007) (Tabela 1).

Tabela 1: Escala fenológica do feijão comum.

Estágio	Descrição
<b>Fase Vegetativa</b>	
V <sub>0</sub>	Germinação e Emergência
V <sub>1</sub>	Cotilédones ao nível de solo
V <sub>2</sub>	Folhas Primárias
V <sub>3</sub>	Primeira folha trifoliolada
V <sub>4</sub>	Terceira folha trifoliolada
<b>Fase Reprodutiva</b>	
R <sub>5</sub>	Botões Florais
R <sub>6</sub>	Abertura da Primeira Flor
R <sub>7</sub>	Aparecimento das primeiras vagens
R <sub>8</sub>	Primeiras vagens cheias
R <sub>9</sub>	Modificação da cor das vagens (maturidade fisiológica)

Fonte: Neto & Fancelli, 2007

## 1.2 Origem e domesticação

A origem e evolução do gênero *Phaseolus* e sua diversificação primária ocorreu nas Américas. Em meados de 1950, Vavilov, apontou prováveis centros de origens de espécies do gênero nestes continentes, como por exemplo, o México e países da América central (VIEIRA, 1983; ARAUJO, 1986).

A aceitação da origem americana do feijão ocorreu no final do século XIX, baseado em observações feitas através de amostras arqueo-

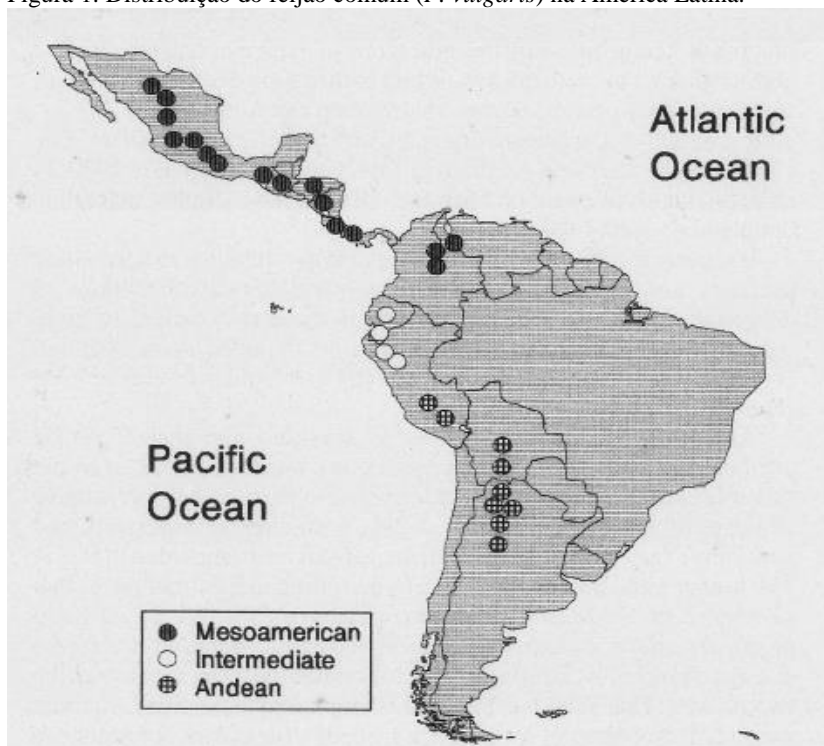
lógicas encontradas no Peru e no sudoeste dos Estados Unidos (EUA), o que vinha de encontro com teorias antes aceitas de uma origem Asiática, como proposto, por exemplo, por Linnaeus, em 1753 (GEPTS & DEBOUCK, 1991; FREITAS, 2006).

Além das observações feitas no Peru e nos EUA, estudos arqueológicos anteriores levaram a descoberta de feijões silvestres na Argentina, América Central e México, sendo esses parecidos com algumas espécies crioulas atualmente cultivadas por agricultores. Esse fato mostra a possibilidade do feijoeiro ter sido domesticado na Mesoamérica e espalhado pela América do Sul na posterioridade (Figura 1) (FREITAS, 2006).

Como já mencionado, a arqueologia encontrou materiais no Peru, o que poderia quebrar a possibilidade anterior, e indicar que o feijoeiro foi domesticado na América do Sul e, transportado para a América do Norte. Já no Brasil, ainda temos a carência de estudos, com a falta de amostras arqueológicas locais de feijão para a constituição da história nacional e regional desta espécie que, atualmente, é cultivada largamente no país por produtores agrícolas, que detém uma grande variedade de sementes crioulas desta espécie (FREITAS, 2006).

Sendo assim, dados expressos por Araujo *et al* (1986), existem dados de outros estudiosos, que afirmam a possibilidade três rotas para feijoeiro: a primeira para feijões pequenos originados no México e seguidos pela América latina até o Brasil; a segunda para feijões grandes, originário do Peru, contendo faseolina; e a terceira feijões europeus trazidos por imigrantes.

Figura 1: Distribuição do feijão comum (*P. vulgaris*) na América Latina.



Fonte: Gepts, 1998.

### 1.3 Sementes

A semente pode ser definida como um óvulo maduro e fecundado, contendo em seu interior uma planta embrionária, substâncias de reserva (às vezes ausentes), ambas protegidas por um ou dois envoltórios (casca). O tamanho, forma e cor variam conforme a espécie e suas variedades (ARAUJO, 1996). As sementes da família Fabaceae, são denominadas de exalbuminosas, pois não apresentam endosperma, como no caso do feijão, especialmente, as reservas são acumuladas em forma de amido nos cotilédones.

Sabe-se que a categorização do feijão é dividida por variedades, e que caminha juntamente a uma classificação de acordo com os testes e metodologias de descritores mínimos para cada cultivar. Para o feijão, os descritores propostos foram publicados no Diário Oficial da União, no decreto N° 2.366, de 05 de novembro que regulamentou a lei de Des-

critérios Mínimos Indicados para caracterizar Cultivares/ Variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

A semente do feijão pode apresentar diversas formas (arredondada, elíptica ou reniforme), com tamanhos variáveis e uma ampla variabilidade de cores (branca, creme, vermelha, preta, rosa, roxa, alaranjada entre outras), dependendo da cultivar.

O conhecimento da composição química da semente é de interesse direto para a tecnologia de sementes, pois tanto a germinação como o potencial de armazenamento, são influenciados pela presença e quantidade desses compostos presentes (NAKAGAWA, 1990). O feijão apresenta, entre 20-26% de proteínas, 62-67% de carboidratos, 3.8-4.5% de cinzas, 1-2 % de lipídeos e 3.8-5.7% de fibra bruta (Tabela 2) (ARAUJO, 1996; MARCOS FILHO, 2005). Essa composição é variável conforme fatores genéticos, entre espécies e entre variedades (COPELAND, 1976).

Tabela 2: Composição Básica do Feijão.

Espécie (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Carboidrato (%)	Estrutura
Algodão	39	33	15	Embrião
Amendoim	31	48	12	Embrião
Arroz	8	2	65	Endosperma
Cevada	12	3	76	Endosperma
Ervilha	25	6	52	Embrião
<b>Feijão</b>	<b>23</b>	<b>1</b>	<b>56</b>	<b>Embrião</b>

Fonte: ARAUJO et al, 1996.

Para o feijão, o carboidrato metabolicamente inativo é o amido, variando de 50-60% em teor. A quantidade de proteínas armazenadas em leguminosas também é maior em comparação a outras famílias (TOLEDO & MARCOS FILHO, 1977). Segundo Sawazak et al (1985), as proteínas presentes nas sementes são de dois tipos: metabólica, que pode ser enzimática, responsável pela atividade celular habitual, como por exemplo, a síntese; do segundo tipo, a estrutural ou de reserva. As proteínas de reserva, junto com os carboidratos ou/ e óleos, são sintetizadas durante o desenvolvimento da semente, funcionando após a germinação da mesma. Durante a germinação, entre outras reações, ocorre à hidrólise, para o fornecimento de nitrogênio, esqueletos de carbono e energia para o desenvolvimento das plântulas.

Os lipídeos são fontes de energia durante a germinação e podem ter, também, função de reserva e estrutural. Durante a germinação as lípases hidrolisam os triglicerídeos, formando glicerol e ácidos graxos. Apresentam em sua constituição átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. Além dos lipídeos de reserva, existem os fosfolipídios que constituem as membranas celulares, incluindo organelas (MARCOS FILHO, 2005). O mesmo autor dá ênfase para os compostos fenólicos, pois estes interferem em substâncias promotoras ou inibidoras durante a germinação.

Bonnet (2007) em sua pesquisa, relatou compostos químicos denominando-os como fator nutricional e anti nutricional. O primeiro aprofunda estudo proteínas, amido e fibras, o segundo em polifenóis, fitatos, inibidores de proteases e lectinas. Os autores explicam que um dos fatores que interferem na utilização do amido do feijão é a parede celular, que pode atuar como uma barreira física na ação, principalmente, de enzimas hidrolíticas. Já as fibras estão envolvidas na manutenção da estrutura celular. Ainda defendem que os polifenóis de leguminosas e cereais são predominantemente taninos de origem flavonóides, tendo efeito direto na coloração dessas sementes.

Os compostos polifenólicos presentes no tegumento da semente e seus teores, podem influenciar na capacidade de absorção de água durante a germinação (BONNET, 2007; ESTEVES, 2002). Logo, caso ocorrer a interferência no processo germinativo, todos os componentes químicos ou processos responsáveis pela sua hidrolização, foram de algum modo alterados.

## **1.4 Importância Econômica**

Estatísticas mostram que cerca de 2/3 da produção mundial de feijão tem origem apenas de seis países, se destacando o Brasil e a Índia. A partir de 2006, a Índia superou o Brasil, em termos de produção dessa leguminosa. Contudo em termos de produtividade por área, o Brasil supera a Índia, produzindo quase em equivalência em uma extensão de área pela metade (EPAGRI/CEPA, 2011).

De maneira geral, em termos de volume regional de produção de cereais, leguminosas e oleaginosas em 2012, destaca-se, no Brasil, a região Centro-Oeste produzindo 66,1 milhões de toneladas, seguida da região Sul e Sudeste com 57,0 e 18,6 milhões de toneladas, respectivamente (IBGE, 2012).

Pelo fato do feijão ser um típico produto da alimentação brasileira, a cultura é cultivada tanto por pequenos como por grandes produtores em todas as regiões brasileiras, sendo um fator de diferenciação a cultura de região para região. Os últimos dados expostos pelo MAPA demonstram o destaque para o estado do Paraná, que colheu 298 mil toneladas na safra 2009/2010, seguido por Minas Gerais, com a produção de 214 mil toneladas no mesmo período.

De acordo com estudo da Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura, a safra de feijão tem taxa anual de aumento, projetada em 1,77 %. Os dados também mostram crescimento no consumo, cerca de 1,22% ao ano, no período 2009/2010 a 2019/2020, passando de 3,7 milhões de toneladas para 4,31 milhões de toneladas. As projeções indicam, também, a possibilidade de importação de feijão nos próximos anos. Porém, essa projeção indica taxas equivalentes a 161,3 mil toneladas em 2019/2020, quantidade considerada pouco expressiva (MAPA).

Em território nacional, 63% do volume produzido da leguminosa são do denominado feijão-cores, enquanto 18% é de feijão-preto e 19% de caupi. O feijão carioca está distribuído de forma uniforme nas três safras anuais, já o feijão- preto concentra-se no Sul do País e aproximadamente 70% de sua produção originam-se da primeira safra (VIEIRA, 2011).

No Estado Catarinense, a melhor safra foi de 2007/2008, segundo dados do IBGE, decaindo até a última safra, como pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3: Produção Catarinense de Feijão 2007/08 a 2012/13\*

Ano	Área (ha)	Produção (t)	Rendimento Médio (kg/ha)
2007/08	107, 279	180,892	1,686
2008/09	129,113	178,525	1,383
2009/10	110,685	169,753	1,531
2010/11	105,661	156,744	1,483
2011/12	85,321	115,622	1,355
2012/13 <sup>(1)</sup>	79,903	150,326	1,881

Fonte: IBGE/GCEA, <sup>(1)</sup> Dados preliminares in ICEPA, 2013.



Em Santa Catarina, as microrregiões produtoras podem ser visualizadas na Tabela 4. A maior produção vem da região de Curitibanos, com 33 mil toneladas (24,1% do total produzido no Estado). Na sequência, encontram-se Campos de Lages (16 mil t), Xanxerê e Canoinhas, empatadas com 14 mil toneladas (EPAGRI/ICEPA, 2013) (Tabela 4 e Figura 2).

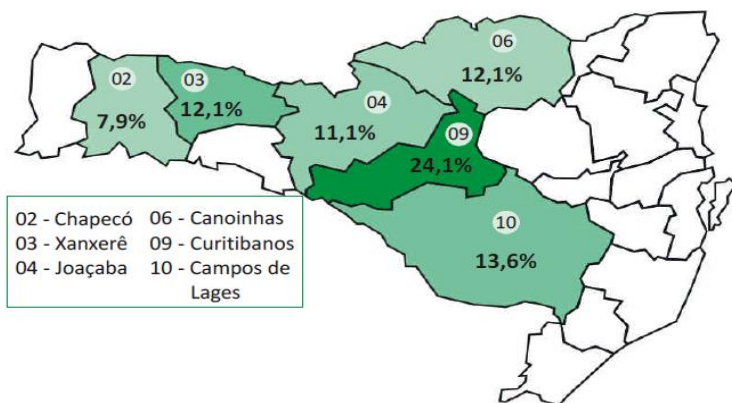
De acordo com CONAB (2011), o Estado Catarinense sofreu, na safra 2010-2011, uma redução da área plantada, causada pelos baixos preços praticados desde o início da colheita. Aliado a isto, a instabilidade climática prejudicou a qualidade dos grãos e baixou o preço de mercado na última temporada. Outros fatores como as boas cotações de outras culturas (milho, soja) favoreceu a dificuldade com o encontro à mão-de-obra para a colheita. Ciente de todas essas enunciações, fica evidente a necessidade de pesquisas que indiquem cultivares mais tolerantes as condições ambientais adversas.

Tabela 4: Feijão - Área, produção e rendimento por microrregião geográfica - Santa Catarina - Safras 2006/07-2009/10.

Microrregião Geográfica	Área plantada (ha)					Produção (t)					Rendimento médio (kg/ha)				
	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13 *	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13 *	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13 *
Araranguá	1.845	1.745	1.330	1.080	1.035	1.677	819	1.267	1.079	1.035	909	469	953	999	1.000
Blumenau	312	372	348	303	273	297	345	278	360	341	952	927	799	1.188	1.249
Campos de Lages	20.310	18.010	17.056	11.430	12.270	21.197	21.592	19.805	15.634	23.190	1.044	1.199	1.161	1.368	1.890
Canoinhas	16.460	11.140	9.835	9.460	9.490	23.982	17.524	12.368	14.910	17.376	1.457	1.573	1.258	1.576	1.831
Chapecó	12.013	10.184	8.888	6.550	6.027	12.580	13.364	12.452	8.762	9.254	1.047	1.312	1.401	1.338	1.535
Concórdia	1.305	1.092	851	612	662	1.268	1.381	1.128	992	886	972	1.265	1.325	1.621	1.338
Criciúma	6.301	5.441	3.584	3.472	3.337	5.757	4.698	3.832	3.782	4.530	914	863	1.069	1.089	1.358
Curitibanos	27.210	25.020	26.350	20.980	19.980	47.784	48.869	47.384	33.268	45.293	1.756	1.953	1.798	1.586	2.267
Florianópolis	231	273	231	166	145	186	276	212	147	185	805	1.011	918	886	1.276
Itajaí	81	44	46	21	15	79	37	38	29	23	975	841	826	1.381	1.533
Ituporanga	3.693	2.290	2.740	2.420	2.725	5.312	2.865	3.592	3.545	5.056	1.438	1.251	1.311	1.465	1.855
Joaçaba	10.094	7.870	9.136	6.440	5.927	17.987	17.577	15.166	12.892	10.410	1.782	2.233	1.660	2.002	1.756
Joinville	48	46	35	28	32	37	32	28	23	22	771	696	800	821	688
Rio do Sul	3.348	2.146	1.722	1.602	1.753	3.914	2.459	2.072	2.155	2.812	1.169	1.146	1.203	1.345	1.604
Sao Bento do Sul	2.205	2.205	2.205	1.190	810	3.552	2.692	3.686	1.892	1.476	1.611	1.221	1.672	1.590	1.822
Sao Miguel do Oeste	4.407	4.165	3.585	3.660	3.690	5.958	5.895	4.722	4.310	5.806	1.352	1.415	1.317	1.178	1.573
Tabuleiro	658	1.010	1.010	910	527	679	1.326	1.321	1.309	876	1.032	1.313	1.308	1.438	1.662
Tijucas	858	619	553	529	368	802	659	617	588	447	935	1.065	1.116	1.112	1.215
Tubarão	5.021	4.531	4.011	3.711	3.827	4.956	4.544	4.540	4.220	4.365	987	1.003	1.132	1.137	1.141
Xanxerê	12.673	12.482	12.145	9.785	12.315	20.511	22.499	22.236	14.496	23.186	1.618	1.803	1.831	1.481	1.883
<b>Santa Catarina</b>	<b>129.073</b>	<b>110.685</b>	<b>105.661</b>	<b>84.349</b>	<b>85.208</b>	<b>178.515</b>	<b>169.453</b>	<b>156.744</b>	<b>124.393</b>	<b>156.569</b>	<b>1.383</b>	<b>1.531</b>	<b>1.483</b>	<b>1.475</b>	<b>1.837</b>

Fonte: EPAGRI/CEPA, 2013.

Figura 2: Concentração da produção por microrregião geográfica, Safra 2011/12, produção de 115,719 t.



Fonte: EPAGRI/CEPA, 2013.

## 1.5 Importância Alimentar do Feijão

Há 10 000 anos, aproximadamente, a relação semente-plantasmente foi entendida pelos humanos, provocando uma mudança de hábito alimentar e de locomoção, tornando o homem a ter hábitos sedentários a fim de proteger as plantas multiplicadas através de sementes (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

As sementes, inicialmente, acomodam a função primordial de garantir a sobrevivência das espécies, por resistir a condições que podem ser fatais para algumas espécies e, mesmo após condições extremas ocorridas com a planta-mãe, elas podem se desenvolver e originar novas plantas, transformando-se em um dos principais veículos de reprodução de plantas no tempo e no espaço. Além disso, exerce a importância econômica como alimento (correspondendo 60-70% dos alimentos consumidos), e matéria-prima base para transformação, pela agroindústria, em inúmeros sub-produtos (VALTER, 2010).

As sementes de leguminosas e cereais compreendem cerca de 75% da alimentação humana, sendo que esse valor engloba o consumo direto e indireto. Salientando que o consumo indireto é conferido, de maneira geral, através da alimentação dos animais domésticos. Além disso, a propagação de uma espécie vegetal através da semente pode ser

consideravelmente mais rentável, mais segura e mais fácil, se for comparada a propagação por mudas (TOLEDO & MARCOS FILHO, 1977).

Ressalta-se ainda, que adicionado às diversas funções da semente para a vida na Terra (meio de sobrevivência a espécie, difusão da vida, meio para produção de alimentos em várias escalas e papel de insumo agrícola), está ainda pode ser um meio de disponibilizar ao agricultor as inovações da genética vegetal que, conseqüentemente, poderá elevar a produtividade através de tecnologias disponíveis (MARCOS FILHO, 2005).

## 1.6 Variedades Crioulas de Feijão e Recursos Genéticos Vegetais

Variabilidade genética é o alicerce para os programas de melhoramento, por isso o estudo da diversidade genética entre germoplasmas, pode vir a melhorar a eficiência na identificação de combinações parentais que gerem populações segregantes com máxima variabilidade genética para a seleção (FRANCO, 2001). As variedades crioulas desempenhou um papel fundamental na história das grandes culturas em todo o mundo, tanto no melhoramento de plantas como na produção agrícola, pois existem desde que originou a agricultura (VILLA, 2005).

As variedades crioulas, conhecidas também como *Landraces* ou locais, são normalmente mantidas por pequenos e médios agricultores. Segundo Loutte *et al* (1997), para uma variedade ser considerada crioula, ela jamais pode ter passado por seleção ou melhoramento formal. Bellon & Brush (1994) afirmaram que elas podem derivar de variedades melhoradas e que após várias gerações podem se combinar com variedades locais. Teshome *et al* (1997) complementa que essas variedades são adaptadas a condições climáticas e ambientais locais, e foram selecionadas por agricultores locais segundo suas necessidades.

Zeven (1998) defendeu que a melhor definição para espécies crioulas foi dada por Mansholt's, na qual afirma que uma variedade crioula é uma variedade local autóctone com capacidade diferenciada de tolerar estresses, tanto biótico como abiótico, possibilitando um diferencial de estabilidade produtiva sob condições de baixa tecnologia agrícola.

A lei que dispõe sobre o sistema nacional de sementes e mudas, cujo nº 10. 711/ 2003, define sementes crioulas como:

...variedade desenvolvida, adaptada ou produzida por agricultores familiares, assentados da reforma agrária ou indígenas, com características fenotípicas bem determinadas e reconhecidas pelas respectivas comunidades e que, a critério do MAPA,

considerados também os descritores socioculturais e ambientais, não se caracterizam como substancialmente semelhantes às cultivares comerciais (BRASIL, 2003).

Cultivares crioulas de feijão, e de diversas outras espécies, apresentam variabilidade genética inter e intra-populacional, que se pode traduzir fenotipicamente tanto nas características da semente como da planta. Esta variabilidade espelha uma adaptação destas populações aos distintos e diversos ambientes a que são submetidas (ANTUNES *et al*, 2007).

Em termos históricos, a reprodução massal e intensiva de várias culturas iniciou à 150 anos atrás. Isso significa que as cultivares crioulas tiveram que iniciar uma competição para permanecer existentes, por cultivares melhoradas, ao menos 140 anos. Mesmo existindo esse cenário, nem todas as espécies passaram pelo melhoramento genético através das mãos humanas, isso é exemplificado pelo cultivo de espécies crioulas de *P. vulgaris* nos Países Baixos durante muitos anos (ZEVEN, 1978).

Zeven (1978) ainda exemplifica autores que definem o cultivares crioulas de feijão comum como uma mistura genotípica de espécies predominantemente de endogâmicas que são cultivadas por um agricultor de subsistência em um local particular. Enquanto outros consideram que a mistura (de cor e outros tipos) que caracterizam as *landraces*.

Sendo assim, Ogliari (2004), define de maneira completa e sintética que as variedades crioulas são freqüentemente utilizadas e manejadas por pequenos agricultores, sendo produzidos por um foco de subsistência e transformando-se primordial em seus sistemas internos de cultivo, por exigir manejo prático e fácil. Esse tipo de material favorece a implementação de uma agricultura mais sustentável (TRINDADE, s/d), além de servirem de material vivo em programas de melhoramento genético, sendo um rico recurso genético vegetal (WOOD & LENNÉ, 1997).

Os recursos genéticos, de acordo com a Convenção da Diversidade Biológica (CDB), são a fração da biodiversidade que tem previsão de uso atual ou potencial. Os recursos genéticos são portadores de genes de grande significado para o melhoramento genético de espécies de plantas e, além disso, são estudados em várias etapas como: coleta ou introdução, multiplicação, preservação ou conservação, avaliação ou caracterização e uso (HAWKES, 1982).

No Brasil, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e a nível internacional o Bioversity International (antigo International Plant

Genetic Resources Institute-IPGRI), vem realizando a sistematização dos estudos dos Recursos Genéticos, promovendo consciência para a importância dos mesmos, a fim de que seja conservada e estuda uma grande quantidade de acessos de muitas espécies com uso potencial ou real (IBPGR, 1987; EMBRAPA).

Sendo assim, variedades crioulas são amplamente cultivadas em pequenas propriedades, e permanecendo viva através de pequenas trocas entre as comunidades dos municípios interioranos, contudo é um importante recurso vital para o melhoramento contemporânea de plantas e a chave para soluções de oscilações bióticas e abióticas causam nas plantas. Apesar de sua importância para agricultura, vem enfrentando constantes ameaças desde a substituição por cultivares melhorados ou convencionais, originando uma abundante erosão genética. Esse fato vem destacando a necessidade de uma ação de conservação urgente.

## **2. Agricultura Familiar e Produção Agroecológica de Feijão**

A agricultura familiar no estado de Santa Catarina é dominante, segundo a Lei nº 4.504 de 30/1964, define que “Propriedade Familiar” como imóvel rural que é explorado pelo agricultor e sua família, concentra toda força de trabalho, afim de garantir sua subsistência e progresso social e econômico, com área máxima regulamentada para cada região e tipo de exploração.

Sistema de produção de base agroecológica caracteriza-se pela utilização de técnicas que respeitam a natureza, a fim de alterar mínimo possível as condições de equilíbrio entre os organismos participantes da produção e o meio ambiente. Sendo assim, agroecologia e agricultura orgânica não devem ser vista como sinônimos, pois a agroecologia é uma ciência que busca uma agricultura que respeite as condições do ambiente, vinculando o desenvolvimento sócio-econômico, já agricultura orgânica é um sistema que segue as regras de certificação e mais focado no que o mercado exige (SOUZA, 2012).

Sendo assim, na agricultura orgânica, as demandas do consumidor influenciam diretamente na tecnologia de produção. Evidencia-se assim que há uma supervalorização do produto em detrimento da maneira que é produzido (ASSIS & ROMERO, 2002).

A agricultura orgânica priorizar a nutrição do solo e a manutenção dos microrganismos ali existentes, este sistema não deve basear-se apenas na substituição dos insumos agrícolas, porém sim em um conjunto de práticas, como por exemplo, a rotação de culturas, consórcios,

eliminação da utilização de defensivos agrícolas, cultivo mínimo, integração lavoura-pecuária, além de assegurar maior reciclagem de nutrientes no sistema. Com esse tipo de manejo, as plantas são, conseqüentemente, menos estressadas por fungicidas, inseticidas, herbicidas e adubos químicos (ARAÚJO, 2008).

As práticas agroecológicas se baseiam na pequena propriedade rural, substancialmente com mãos de obra familiar, em sistemas complexos de produção, adaptados às condições edafoclimaticais do local de produção, e alinhado a redes regionais e distribuição de alimentos (SOUZA, 2012).

Desta forma, pode-se considerar a agricultura agroecológico um sistema de produção agrícola baseado principalmente na preservação do ambiente, no respeito à saúde humana e na justiça econômica e social. (CHABOUSSOU, 1980). Alimentos orgânicos pode ser agroecológico ou orgânico, contudo esses não fazem uso de produtos químicos sintéticos, ou geneticamente modificados.

Em síntese, a Agricultura Orgânica tem raízes na ciência do solo, e a Agroecologia tem base na ecologia, privilegiando em primeiro momento dimensões agrônômicas e ecológicas (ABREU, 2012). Esse trabalho segue o viés agroecológico de produção de sementes de feijão.

No Brasil, o número de trabalhos científicos envolvendo sistema orgânico se sobressai aos trabalhos agroecológicos de produção, que por sua vez ainda são relativamente inferiores aos números de pesquisas do sistema convencional. De maneira geral, os alimentos orgânicos são tão produtivos quanto aos alimentos produzidos convencionalmente, evidenciado, por exemplo, pela pesquisa de Carvalho & Wanderley (2007), que avaliaram dez cultivares de feijão em sistema orgânico de produção, e revelaram que o feijão orgânico tem produtividade comparável ao feijão plantando no sistema convencional.

### **3. Qualidade Fisiológica das Sementes de Feijão**

#### **3.1 Importância do Controle da Qualidade e Testes**

A qualidade fisiológica da semente significa sua capacidade para desenvolver funções vitais, abrangendo germinação, vigor e longevidade. Este estado de qualidade de um lote depende do quadripé constituído pelos atributos: genético, fisiológico, sanitário e físico. A utilização de sementes de alta qualidade reflete no alto potencial de produzir plantas vigorosas, uniformes em um curto espaço de tempo (POPINIGIS, 1985).

Entre as metodologias disponíveis para avaliar a qualidade de um lote de sementes, ressalta-se os testes de viabilidade (germinação) e testes de vigor, no caso deste estudo, foram utilizados o teste de frio e comprimento de plântula.

Segundo Marcos Filho (1999) os testes de vigor conseguem avaliar ou detectar expressivas diferenças na qualidade de lotes com germinação semelhante, complementando neste caso, o teste de germinação. Além disso, pode auxiliar a distinguir ou classificar com segurança os lotes em diferentes níveis de vigor e, ainda, separar lotes de diferentes níveis de vigor quanto ao comportamento de emergência de plântulas, resistente ao transporte e potencial de armazenamento (MARCOS FILHO, 1999; KRZYZANOWSKI, 1999).

### **3.2 Testes para Avaliação do Potencial Fisiológico**

O teste de germinação é o parâmetro mais importante para base de instalação de uma cultura. O objetivo geral é dar informações sobre o potencial das sementes, comparando diferentes lotes e informar o grau de padronização (POPINIGIS, 1985).

O teste de frio se baseia na avaliação da qualidade de sementes sob condições adversas de temperatura, sendo bastante utilizado em diversas regiões de clima temperado, onde a época de semeadura pode coincidir com períodos chuvosos e de baixa temperatura. É, portanto, considerado um teste de resistência de uma determinada espécie a condições de estresse térmico, ou seja, o lote de sementes que melhor resistir às condições adversas é considerado mais vigoroso (CICERO & VIEIRA, 1994).

Teste de condutividade elétrica que tem o principio de estabelecer sementes menos vigorosas, pelo principio de velocidade do restabelecimento da integridade da membrana durante a embebição em água destilada, liberando solutos para o meio externo. Assim, o vigor é avaliado indiretamente, pois fatores como tipo de tegumento inter e intraspécies, influenciam no resultado (MARCOS FILHO, 2005).

Destaca-se ainda testes bioquímicos para avaliar o vigor das sementes podem ser divididos em três grupos segundo ROBERTS (1972): sementes que apresentam áreas com injúrias e consequentemente defeituosas; sementes que podem usar a resposta de uma enzima essencial como um índice de vitalidade geral; e sementes que podem acompanhar um processo vital mais complexo em estágios iniciais de germinação. O autor comenta de estudos realizados por Abdul-Baki que lista 4 categorias de testes que mostram modificações bioquímicas: testes que de-



monstram declínio de atividade e manifestações metabólicas (redução da respiração, baixa e lenta germinação); teste que demonstram o aumento ou atividade total de certas enzimas (fitases, proteases, fosfatases, etc); redução de outras atividades, principalmente, respiração pela ação de enzimas (catalase, peroxidase, desidrogenase, descarboxilase, entre outros); e aumento da permeabilidade da membrana após um maior vazamento de açúcares, aminoácidos, ácidos graxos livres e solutos orgânicos.

#### **4. Estresse Oxidativo e Mecanismos de Tolerância**

Efeitos de estresses se tornaram um dos principais fatores de preocupação de cientistas de plantas, pois são limitantes para a produtividade agrícola (HASANUZZAMAN, 2013). Como as plantas são organismos sésseis, estão mais susceptíveis às oscilações ambientais, nas quais podem causar estresses que alteram o seu metabolismo, crescimento, produtividade e até mesmo levar a morte (NOGUEIRA, 2004; BROWSE & XIN, 2001).

Para Larcher (2006), o estresse é uma irregularidade de boas condições de desenvolvimento, que pode ocasionar mudanças e respostas em um vegetal. Já Taiz & Zeiger (2006) afirmam que é um fator externo que exerce uma influência desvantajosa para a planta. Segundo Balasubramanian (2002), essas alterações externas são denominadas como físico-químicos, aonde interagem: a temperatura (alta e/ou baixa), a água (déficit e/ou excesso), a radiação (infravermelho, visível, ultravioleta e ionizante); com fatores químicos (sais ou íons, gases, herbicidas, pesticidas), além da ação do vento, da pressão, magnético, elétrico, entre outras.

A temperatura, é um dos fatores mais preocupantes para a produção agrícola, já que alterações climáticas são frequentes em todo o globo (HASANUZZAMAN, 2013). Estresses ocasionados por temperaturas podem ter efeitos devastadores em plantas e sementes, contudo a fim de tolerar o estresse oxidativo causado, as plantas tentam reajustar toda a sua biologia celular (POLLOCK & TOOLE, 1966).

Em sementes os efeitos causados por oscilações de temperaturas, ainda não são bem conhecidos. Os estudos de Kozlowski (1972) mencionam que baixas temperaturas têm no mínimo dois efeitos em sementes: primeiro pode retardar a germinação, favorecendo que a semente permaneça longos períodos no solo e conseqüentemente se torna um mate-

rial de fácil ataque e competição por microorganismos; e segundo causar lesões no material.

Para algumas espécies, estudos para lidar economicamente com essa situação de estresse ambiental já foram propostos e estão em constante avanço. A inclusão de genótipos mais adaptados já é recorrente, e projetos de melhoramento genético incluindo novas variedades vêm se tornando realidade (WANG & FREI, 2011).

Baixas temperaturas ou estresse causado pelo frio podem causar dois níveis de lesão, dependendo da temperatura envolvida: *chilling stress* (<20°C) podem produzir lesões sem formar cristais de gelo extracelular; e *freezing stress* (<0°C), caso ocorra o congelamento (HASANUZZAMAN, 2013; CHINNUSAMY, 2012). Por isso, considera-se que o dano de frio é distinto do dano por congelamento, pois não apresentante nucleação do gelo no meio celular (SESTARI, 2010).

O estresse pelo frio pode provocar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS-[O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>•</sup>OH]), que resulta na perturbação dos processos metabólicos, pela redução do oxigênio (O<sub>2</sub>), procedendo numa situação de estresse (ASHRAF, 2008). Em moderadas concentrações, os EROS podem ser benéficos para as células, estando envolvidos em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação do metabolismo (FERREIRA & ABREU, 2007). Na germinação, por exemplo, quantidades moderadas de EROS atuam como regulador positivo promovendo o enfraquecimento do endosperma, ativando a sinalização cascata através da regulação redox (BAILLY, 2008). Contudo, o equilíbrio entre a produção de EROS e as defesas antioxidantes pode ser destruído devido a uma produção excessiva dessas espécies, sinalizando uma situação de estresse oxidativo.

Como estratégia de sobrevivência contra o estresse, as plantas ativam mecanismos antioxidantes para remoção do EROS. Apesar de poucos estudos, o papel da defesa de antioxidantes de moléculas não-enzimáticas em sementes, como compostos fenólicos, diante de tensões ambientais, são de extrema importância para a sobrevivência do futuro indivíduo.

Um dos grupos mais abundantes de metabolitos secundários, são os compostos fenólicos que constituem uma classe extremamente diversa, incluindo: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonóides (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides), estilbenos, cumarinas e taninos. Eles possuem estruturas químicas com hidroxilas e anéis aromáticos, que os confere poder antioxidante, uma importante defesa primária contra os radicais livres gerados sob condições de estresse, tentando retardar e/ou

prevenir reações oxidativas (BROINIZI, 2007; FERREIRA & ABREU, 2007; BROKHINA, 2003). Segundo Neves (2009), as propriedades biológicas dos fenólicos podem estar relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre o meio, possuindo alta probabilidade de ocorrência de correlação entre eles (LÓPEZ-AMORÓS, 2006).

Segundo Lima & Abdalla (2001), o processo de peroxidação lipídica é uma cascata de eventos resultante à ação de EROS, sobre lipídeos insaturados das membranas celulares. Bioquimicamente, a peroxidação consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado para produzir um hidroperóxido lipídico como produto primário inicial. Um dos produtos secundários é malonaldeído (MDA), sua determinação é utilizada em muitos trabalhos para medição do grau de estresse oxidativo presente. Existem estudos que mostram a relação entre as grandes quantidades de ácidos graxos insaturados nas sementes e sua resistência ao frio (ROSKRUGE & SMITH, 1997), o que mostra ser uma característica que pode ser modificada de genótipo a genótipo. O grau de danos resultante a refrigeração depende do poder de cada genótipo sobre a reparação ao sistema de membrana (membrana plasmática e de organelas das células). No caso das sementes, a pouca elasticidade da membrana e o baixo nível metabólico, resultam num bloqueio de parâmetros que auxiliariam nessa reparação (ZHENG, 1991). Sendo assim, peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados leva à diminuição de fluidez das membranas, acarretando na perda do conteúdo celular e danos secundários às proteínas de membranas (HALLIWELL, 2006).

Existe uma gama de metabólitos produzidos diante de uma situação de estresse abiótico, sendo que os mesmos ainda estão sendo estudados pela engenharia genética. Dentre as alterações encontradas, foram identificados grupos de aminoácidos em plantas, sendo os mais frequentes: a prolina, glicina e poliaminas (VICONUR & ALTMAN, 2005). Naidu e colaboradores (1991) estudaram em plantas de trigo, alterações no perfil de aminoácidos durante o estresse de frio, sendo que o teor de glutamina, prolina, alanina, ácido aspártico, asparigina, glicina, valina, treonina, isoleucina aumentaram e ácido glutâmico diminuiu. Já Rozan (2001), realizou estudos em sementes secas de leguminosa, e encontrou pequenas quantidades de aminoácidos livres, entre eles destacam-se: asparigina, alanina, ácido aspártico e glutâmico (ROZAN, 2001). Esses estudos para sementes de feijão devem ser mais investigados, já que pesquisas não avançaram muito nesse sentido nos últimos anos.

Vale destacar, ainda, que as principais formas de alterações passadas pelas proteínas através dos radicais livres são: a oxidação de aminoácidos que possuem enxofre (cisteína e metionina) e carbonilação de

proteínas nas quais as oxidações resultam em grupos carbonila livre: arginina, histidina, lisina, prolina e tirosina (LEVINE, 1994);

A prolina é o metabolito considerado um osmorregulador e osmoprotetor dentro das células (CUSHMAN, 2001). Este aminoácido é acumulado em grandes quantidades em resposta a pressões ambientais, atuando como um soluto compatível, e tampões ditos redox, que são potenciais em células. Estudos indicam que índices de prolina estão interligados a diversos tipos de estresses como uma via alternativa para minimizar os seus efeitos. Além disso, atua como osmoprotetor de moléculas e membranas, formando paredes de hidratação sobre os fosfolípidos, reduzindo a ação dos radicais livres, produzindo moléculas quimicamente estáveis, tanto em sementes como em plantas (DELAUNEY, 1993; NETO, 2004). Estudos constataram que em sementes a síntese de prolina pode ser uma estratégia de adaptação para evitar a germinação em ambientes estressantes (THAKUR & SHARMA, 2005; BHAMBURDEKAR & CHAVAN, 2011).

## REFERÊNCIAS

- ABREU, L. S. et al. 2012. Relações entre agricultura orgânica e agroecologia: desafios atuais em torno dos princípios da agroecologia. *Revista Desenvolvimento e Meio Ambiente*, 26, 143-160.
- AFONSO, S.M.E. 2008. Caracterização Físico-Química e Actividade Antioxidante de Novas Variedades de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar.
- ANTUNES, I.F et at. 2007. Diversidade intra-populacional em Feijão Crioulo como Fonte de Cultivares para Nichos de Mercado Diferenciados. Resumos do II Congresso Brasileiro de Agroecologia. *Rev. Bras. Agroecologia*, v.2, n.1,.
- ARAUJO, J. C. 2008. Avaliação de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) para o sistema orgânico de produção. 2008. 83p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ARAUJO, R. S. 1996. Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: POTAFOS, 786p.
- ASHRAF, M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology advances*, 27(1), 84-93.
- BAILLY,C. et al. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C.R. Biol.* 331, 806–814.
- BALASUBRAMANIAN, P.M. 2002. Selection for chilling and freezing resistance in common bean. Thesis Submitted to the College of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in the Department of Plant Sciences. University of Saskatchewan Saskatoon. Department of Plant Science, Canada.
- BELLON, M.R & BRUSH,S.B. Keeps of maize in Chiapas. *Economic Botanic*,v.48,p.196-209,1994.

BHAMBURDEKAR S.B & CHAVAN P.D. 2011. Effect of Some Stresses on Free Proline Content During Pigeonpea (*Cajanas cajan*) Seed Germination. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. v. 7 (3).

BLOKNINA, O. et al. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* 91: 179-194.

BONETT, L. P. et al. 2007. Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama*, v. 11, n. 3, p. 235-246.

BRASIL, 1964. ESTATUTO DA TERRA. Lei Nº 4504, DE 30 DE NOVEMBRO DE 1964.

BROINIZI, P.R.B. et al. 2007. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudo-fruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 27(4): 902-908.

BROWSE, J. & XIN, Z. 2001. Temperature sensing and cold acclimation Current opinion in plant biology (*Physiology and metabolismo*), 4 (3), 241-246.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4. ed. rev. e ampl. Jaboticabal: FUNEP, 588p.

CARVALHO, W. D., & Wanderley, A. L. 2007. Avaliação de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) para o plantio em sistema orgânico no distrito federal. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(3), 605-611.

CHABOUSSOU, F. 1980. Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos: a teoria da trofobiose. Porto Alegre: Ed. LPM, 320p.

CHINNUSAMY, V., et al. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in plant science*, 12(10), 444-451.

CICERO, S.M. & VIEIRA, R.D. 1976. Teste de frio. In: VIEIRA, R.D. & CARVALHO, N.M. (ed.). *Testes de vigor em sementes*. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.151-164.

- COPELAND, L. O. Principles of seed science and technology. Minneapolis: Burges. 369 p.
- CUSHMAN, J.C. 2001. Osmoregulation in Plants: Implications for Agriculture. Department of Biochemistry, University of Nevada, Reno, Nevada. AMER. ZOOL., 41:758–769.
- DELAUNEY, A.J; VERMA, D.P.S. Proline biosynthesis and osmorregulation in plants. Departament of Biology, The University of the West Indies. USA. The Plant Journal, 215-223, 1993.
- EPAGRI/CEPA. 2011. Centro de Socioeconômica e Planejamento Agrícola. Informe Conjuntural/Feijão. < <http://cepa.epagri.sc.gov.br/>>. Acesso em 16.08.2012.
- EPAGRI/CEPA. 2009-2010. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – Epagri Centro de Socioeconômica e Planejamento Agrícola. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina. Periódico. Florianópolis, SC. 315p.
- EPAGRI/CEPA. 2012. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina-20012/2013. Florianópolis: Epagri/Cepa. Anual.
- ESTEVES et al. 2002. Comparação química e enzimática de seis linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* l.). Ciênc. agrotec., Lavras. V.26, n.5, p.999-1005.
- FERREIRA, I. C.F.R. & ABREU, R.M.V. 2007. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. Artigo de Revisã. Bioanálise / Ano IV. Nº 2 .
- FRANCO, M. C. et al. 2001. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 36(2), 381-385.
- FREITAS, F.O. 2006. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. EMBRAPA. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.41, n.7, p.1199-1203, jul. 2006.
- GEPTS, P. 1998. Origin and Evolution of Common Bean: Past Events and Recent Trends. HortScience, 33(7).

GEPTS, P. et al. 2008. Genomics of Phaseolus beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In *Genomics of tropical crop plants* (pp. 113-143). Springer New York.

GEPTS, P., & DEBOUCK, D. G. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Common beans: research for crop improvement*, 7-53.

GRAHAM, P.H. & RANALLI, P. 1997. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research* 53 (1997) 131-146.

GUO, J. et al. 2008. Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: a review. *African Journal of Biotechnology*, 7(25).

HALLIWELL, B.; & GUTTERIDGE, J. M. C. 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4 ed., Oxford: Clarendon Press.

HANH-DEINSTROP, E. 2007. *Applied thin-layer chromatography, best practice and avoidance of mistakes*. Wiley-VCH.

HASANUZZAMAN, M., et al. 2013. Extreme Temperature Responses, Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants. *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*. Chapter 6. <<http://dx.doi.org/10.5772/54833>>.

HAWKES, J. G. 1982. Germplasm collection, preservation, and use. In: FREY, K. J., ed. *Plant Breeding II*. Ludhiana: Kalyani Publishers. p. 57-83.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no ano Civil.

ICEPA - Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina. Disponível em: <[http://cepa.epagri.sc.gov.br/Informativos\\_agropecuarios/Alho/alho\\_03.03.2011.htm?option=com\\_content&view=article&id=1215:agropecuaria-catarinense-tem-cenario-positivo-para-2010&catid=34:noticias-epagri&Itemid=51](http://cepa.epagri.sc.gov.br/Informativos_agropecuarios/Alho/alho_03.03.2011.htm?option=com_content&view=article&id=1215:agropecuaria-catarinense-tem-cenario-positivo-para-2010&catid=34:noticias-epagri&Itemid=51)>. Acesso em: 05.08.2012.



KOZLOWSKI, T. Ta . Seed biology. Importance, Development and Germination. Vol I. New York: Academic Press, 1972. 416 p.

KOZLOWSKI, T. Tb. Seed biology. Germination Control, Metabolism and Pathology. Vol II. New York: Academic Press, 1972. 447 p.

LARCHER, W. 2006. Ecofisiologia Vegetal. Tradução: Prado, C. H. B. A. São Carlos: Rima. 531 p.

LEVINE, R. L.:et al. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v. 233, p. 346–357, 1994.

LIMA, E. S., & ABDALLA, D. S. P. 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3), 293-303.

LÓPEZ-AMORÓS, M. L. et al. 2006. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4), 277-283.

LOUETTE et al. In situ conservation of maize in México: genetic diversity and maize and seed management in traditional community. *Economy Botanic*, v.51, p.20-38, 1997.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Assessoria de Gestão Estratégica. *Brasil Projeções do Agronegócio, 2010/2011 a 2020/2021*.

MARCOS FILHO, J. 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ, 495p.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1.1-1.20.

NAKAGAWA, J.; NAKAGAWA, J.; IMAIZUMI, I.; ROSSETTO, C.A.V. 1990. Efeitos de algumas fontes de fósforo e da calagem na qualidade de sementes de amendoim. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 25(4):505- 512.

NETO, D.D & FANCELLI, A.L. 2007. Produção de Feijão. Ed. Livrerceres. Piracicaba: 386,p.

NETO,N.B.M et al. 2004. Proline: use as an indicator of temperature stress in bean seeds. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil .Crop Breeding and Applied Biotechnology 4:330-337.

NEVES, L. C. et al. 2009. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. VII BMCFB, 107-10.

NOGUEIRA, F.T.S. 2004. Identificação e caracterização de genes expressos em resposta ao estresse por baixas temperaturas em cana-de-açúcar. Campinas, Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

NOGUEIRA, F.T.S.; et al. 2003. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiol.*, v. 132, p. 1811-1824, 2003.

OGLIARI, J.B. Estratégias de Manejo de Monogenes de Resistência a Doenças de plantas In: Manejo Ecológico de Doenças de Plantas. 1 ed. Florianópolis: editora CCA/UFSC, 2004, v.1, p. 193-220.

POLLOCK, B. M., & TOOLE, V. K. 1966. Imbibition period as the critical temperature sensitive stage in germination of lima bean seeds. *Plant physiology*, 41(2), 221-229.

POPINIGIS, F. 1977. Fisiologia da semente. Ministério da Agricultura, AGIPAN, Brasília, Brasil, 289p.

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. 2.ed. Brasília: ABRATES, 1985. 289p.

ROBERTS, E.H. 1972. Viability of seeds. [S.l.]: Syracuse University Press. 448 p.

ROSKRUGE, C. L., & SMITH, M. T. 1997. Peroxidative changes associated with chilling injury in soybean seeds during imbibition. *Journal of plant physiology*, 151(5), 620-626.

ROZAN, P., et al. 2001. Amino acids in seeds and seedlings of the genus *Lens*. *Phytochemistry*, 58(2), 281-289.

SANTOS, N.C.B. 2011. Potencialidades de produção do feijão orgânico. *Pesquisa & tecnologia: informações tecnológicas*, 8(2).

SAWAZAK, H. E. et al. 1985. Modificações bioquímicas e físicas em grãos de feijão durante o armazenamento. *Bragantia*, v. 44, n. 01, p. 375-390.

SCHOONHOVEN, A.; & VOYSEST, O. III. Common Beans: research for crop improvement.1. Beans production. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 955.p.<  
[http://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=CvcbUopfa54C&oi=fnd&pg=PA7&dq=Phaseolus+vulgaris+botanica&ots=gfFCOGpUma&sig=8g3\\_yRWMQuSzcjgnOPBX6cE9Fr0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=CvcbUopfa54C&oi=fnd&pg=PA7&dq=Phaseolus+vulgaris+botanica&ots=gfFCOGpUma&sig=8g3_yRWMQuSzcjgnOPBX6cE9Fr0#v=onepage&q&f=false)>

SESTARI, I. 2010. Indução de tolerância de frutos às injúrias de frio: aspectos fisiológicos e bioquímicos. Tese de doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros”, Piracicaba, SP.

SILVA, H.T.; & COSTA, A.O. 2003. Caracterização Botânica de Espécies Silvestres do Gênero *Phaseolus* L. (Leguminosae). Documentos 156. Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão. <  
[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/doc\\_156IDE4XyDjZQO9.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/doc_156IDE4XyDjZQO9.pdf)>

SINGH, S. P., GEPTS, P., & DEBOUCK, D. G. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, 45(3), 379-396.

SPANGENBERG, B; et al. 2011. Quantitative thin-layer chromatography, a practical survey. Springer, 2011. <  
<http://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=DehdUDH1oycC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Quantitative+thinlayer+chromatography,+a+practical+survey&ots=dB0n4dTG4n&sig=Df47dIRH8NM-Nt2hmj9ROBkZavE#v=onepage&q=Quantitative%20thinlayer%20chromatography%2C%20a%20practical%20survey&f=false>>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Trad. Santarém, E.R[et al.]. 3.ed.

SOUZA, A.A. et al. 2012. Centro Colaborador em Alimentação e Nutrição do Escolar CECANE/UFOP. Cartilha de Agroecologia. Disponível < file:///C:/Users/Monique/Downloads/cartilha-agroecologia-CECANE-UFOP.pdf >.

TESHOME et al. Sorghum landrace variation and classification in North Shewa and South Welo, Ethiopia. *Euphyca*, v.97,p.255-263,1997.

THAKUR, M., & SHARMA, A. D. 2005. Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: Evidence suggesting a role of proline in seed germination. *Journal of arid environments*, 62(3), 517-523.

TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. 1977. Manual das sementes: tecnologia da produção. São Paulo: Agronomica Ceres, 224p.

TRINDADE, C.C. Sementes Crioulas e Transgênicos, uma reflexão sobre sua relação com as comunidades tradicionais. UEA, s/d. 15.p.

VALTES, S.T. 2010. O efeito de genótipos de feijão e das formas usuais de preparo sobre a atividade antioxidante e a composição nutricional. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito para obtenção do título de Mestre. Florianópolis, SC.

VIDAL, V. L. et al. 2003. Avaliação de genótipos de feijões especiais em sistema orgânico. Associação Brasileira de Horticultura (ABH).

VIEIRA, C. Cultura do feijão. 2. ed Viçosa: UFV, 1983. 146 p.

VIEIRA, L. M. 2011. Síntese anual da agricultura Santa Catarina 2009/2010. Florianópolis: Epagri - ICEPA.

VILLA, T. C. C., MAXTED, N., SCHOLTEN, M., & FORD-LLOYD, B. 2005. Defining and identifying crop landraces. *Plant genetic resources: characterization and utilization*, 3(03), 373-384.

WALL, P.E. 2005. Thin-layer chromatography, a modern practical approach. The Royal Society of Chemistry. <<http://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=gcCFiosKOLUC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Thinlayer+chromatography,+a+modern+practic>>

al+approach&ots=nLc4KkJMy6&sig=xdiRUXW9\_imJv5ntw\_os9\_LGesI#v=onepage&q=Thinlayer%20chromatography%2C%20a%20modern%20practical%20approach&f=false>.

WANG, Y., & FREI, M. 2011. Stressed food—The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 141(3), 271-286.

WOOD, D.; LENNÉ, J.M. 1997. The Conservation of agrobiodiversity on farm: questioning the emerging paradigm. *Biodiversity and Conservation*. Holanda: 6, p.109-129.

WORTMANN, C. S. 1998. Atlas of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production in Africa (No. 297). CIAT.

ZEVEN, A.C. 1998. Landraces: A review of definitions and classifications. The Netherlands. Agricultural University. *Euphytica* 104: 127–139; p.13.

ZHENG, G. H. (1991). Physiological, biochemical and ultrastructural aspects of imbibitional chilling injury in seeds: a review of work carried out at the Beijing Botanical Garden. *Seed Science Research*, 1(02), 127-134.



## **CAPÍTULO II: QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE FEIJÃO CRIOULO APÓS O ESTRESSE DE FRIO.**

### **QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES CRIOULAS DE FEIJÃO SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR FRIO**

Monique dos Santos<sup>1</sup>, Cileide M.M. Coelho Arruda de Souza<sup>2\*</sup>, Souza, C.A.<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Programa de pós-graduação em Recursos Genéticos e Vegetais, Laboratório de Sementes, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Rodovia Admar Gonzaga, Km 3, Florianópolis, SC, 88034-001, Brasil.

<sup>2</sup> Prof<sup>a</sup>. Dra. Adjunto I UDESC/ Lages, SC, Centro de Ciências Agroveterinárias, Prof<sup>a</sup>/Orientadora do PPG Recursos Genéticos Vegetais, UFSC, Florianópolis, Brasil.

<sup>3</sup> Prof. Dr. Adjunto UDESC/ Lages, SC, Centro de Ciências Agroveterinárias, Prof/Orientador do PPG Produção Vegetal, UDESC, Lages, Brasil.

Autor correspondente, e-mail: cileidecoelho@yahoo.com.br; cileide.coelho@pq.cnpq.br, tel: +55 49 2101 9172.

(Artigo a ser submetido à revista Revista Ciência Agrônômica (RCA))

**RESUMO:** Cultivares crioulas são guardiãs de efeitos combinados, tanto da seleção natural como da humana, representando características geneticamente dinâmicas e diversificadas que estão interligadas ao meio biótico e abiótico. A magnitude dessas características induz as sementes crioulas a se sobressair ao estresse, visto que em sementes comerciais esses atributos são mais restritos. O objetivo do trabalho foi avaliar 22 genótipos de sementes de feijão crioulo e comercial, do BAF da UDESC, ao estresse de baixas temperaturas. As sementes utilizadas neste trabalho foram provenientes do cultivo orgânico de duas safras consecutivas, 2011/12 e 2012/13, e em laboratório obteve-se amostra de trabalho, composta de 4 repetições para avaliar a qualidade fisiológica quanto a germinação e vigor (comprimento de plântulas, condutividade elétrica), das amostras submetidas ao estresse por frio, e na ausência de estresse (testemunha). Para o estudo detalhado de cada genótipo, as médias foram analisadas pelo teste de Scoot-Knott, e com o propósito de ampliar os espectros dos resultados realizou-se testes de correlação pelo método de Pearson. Observou-se que os BAF 81,75 e 110 se destacaram diante dos demais, expondo alto vigor após estresse por frio. Para a

variável comprimento de plântula destacaram-se os BAFs 81, 75, 84, 110, 55 e 03, apresentando os maiores percentuais. Por meio do teste de condutividade elétrica, averiguou-se que os BAF 03, 04, 44 e 68 apresentaram menor liberação de exsudatos para o meio aquoso. O estudo de correlação confirmou associação positiva entre porcentual germinativo e comprimento de plântula, em contrapartida observou-se correlação negativa entre as variáveis de condutividade elétrica em relação a germinação e comprimento de plântula, indicando que para a maioria dos genótipos o maior porcentual de germinação indicou maior comprimento de plântula, e conseqüentemente o maior vigor. Para as características analisadas, o teste de germinação, antes e após o estresse, apresentou maior contribuição na avaliação dos genótipos, seguido do comprimento de plântula, em ambos os anos de cultivo. Com base nisso, os BAFs 81, 75 e 110 se mostraram potencialmente mais vigorosos, por isso mais indicados para semeadura antecipada.

Palavras-chave: vigor, teste de frio, recursos genéticos, anos de cultivo.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é umas das leguminosas mais consumidas no mundo (BROUGHTON, 2003; MIKLAS, 2006; PAPANATHASIOU, 2010). No Brasil, o grão é considerado um componente essencial não só na dieta alimentar, mas também tem papel expressivo na economia do país (SEAB, 2012; SCHOONHOVEN & VOYSEST, 1991; BORÉM & CARNEIRO, 1998), alcançando a produção de 3 bilhões de toneladas em 2013 (IBGE, 2013). Em Santa Catarina, a leguminosa é cultivada tradicionalmente em pequenas propriedades, pois a produção esta relacionada à condição de subsistência (BLAIR, 2008; ELIAS, 2006), contudo por ser uma produção rentável em termos mercantis, apresenta um grande peso na renda anual dessas famílias (SAVIAN, 2011),

A cultura do feijoeiro é muito sensível diante das oscilações ambientais, e com isso respostas na morfologia e em caracteres de rendimento podem oscilar devido ao déficit hídrico, oscilações térmicas, luminosidade e umidade (COELHO, 2010b), contudo variedades crioulas possuem capacidade diferenciada, comparadas às convencionais de tolerar estresses, tanto biótico como abiótico, possibilitando um diferencial de estabilidade produtiva, até mesmo sob condições de baixa tecnologia agrícola (ZEVEN, 1998).



Trabalhos realizados por COELHO (2010a) demonstraram que sementes de feijão crioulo evidenciam elevado potencial fisiológico em relação a cultivares comerciais, por apresentar diferença no percentual inicial de germinação, maior comprimento de raiz primária, valores baixos de liberação de solutos em água e elevada emergência a campo. Essas características morfoagronômicas encontradas nestas sementes são explicadas pelos recursos oferecidos pela ampla base genética desses genótipos.

A utilização de sementes crioulas em monoculturas não é aconselhável, pois pode ocorrer desequilíbrio natural originado pela crescente presença de pragas e doenças (TRINDADE, 2006). Percebe-se que a utilização desse tipo de material, é mais interessante para a aplicação na agricultura orgânica (MEIRELLES, 2006). Este sistema tem como base minimizar os impactos ao meio-ambiente, pois preconiza a utilização de insumos orgânicos existentes na propriedade rural (ALVES, 2012) e mão de obra familiar, buscando manter conhecimentos tradicionais associados (TSUTSUMI, 2012); sustentabilidade econômica, ambiental, ética, (FONSECA, 2009).

Santa Catarina detém de características que contribuem para o avanço da agricultura orgânica, primeiramente por que sua agricultura ser predominantemente familiar, além de dispor de uma grande diversidade edafoclimática, territorial, social e cultural beneficiando a diversificação produtiva (ZOLDAN & MIOR, 2012). No caso do feijão produzido organicamente sua procura tem aumentado significativamente, mesmo com preços cerca de 30 a 40% superiores ao do feijão cultivado de forma convencional, evidenciando o destaque já que é um alimento consumido diariamente pelos brasileiros (SANTOS, 2011).

Sabe-se que o Meio Oeste de Santa Catarina possui características edafoclimáticas específicas, contendo características que restringe a semeadura do cultivo do feijoeiro. Temperaturas mais amenas, por exemplo, na época da semeadura da safra das águas pode dificultar a produção da leguminosa. Os cultivares com ciclo tardio e com estatura elevada, segundo dados da Epagri (2010), são os mais indicados para região. Contudo essa peculiaridade dificulta o início do período de semeadura, devido à ocorrência de geadas tardias, fato que impulsiona os agricultores a executar a semeadura tardia, mais precisamente em meados de outubro e até final de novembro.

Para avaliação fisiológica de sementes, o teste de germinação é o exigido e mais utilizado, contudo não demonstra o desempenho das sementes a campo, sob amplas condições climáticas. Em contrapartida, testes de vigor fornecem um conjunto de características para uma deter-

minada cultivar sobre condições adversas (COSTAS, 2010). Sendo assim, é fundamental ter o conhecimento de qual teste utilizar conforme o objetivo proposto. Para condições onde se deseja a resposta dos genótipos a condições de clima com temperaturas mais amenas na semeadura, indica-se o teste de frio. Este permite selecionar lotes e indicar genótipos mais tolerantes a esse tipo de estresse.

Devido à variabilidade genética dos cultivares crioulos de feijão e dos desafios da pesquisa (ANTUNES, 2007) em busca do aumento da eficiência dos genótipos crioulos no sistema de produção orgânica, este trabalho vem para caracterizar os genótipos crioulos produzidos no sistema orgânico quanto à tolerância ao frio, além de indicar os mais promissores para serem utilizados na condição de semeadura antecipada para viabilizar colheitas mais precoces na região do planalto Catarinense.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As sementes foram provenientes do cultivo agroecológico de duas safras agrícolas, dos anos de 200/12 e 2012/13. O trabalho foi realizado em laboratório com 26 cultivares de feijão, contendo 21 genótipos crioulos (BAF 03, BAF 04, BAF 07, BAF 013, BAF 023, BAF 036, BAF 042, BAF 044, BAF 046, BAF 047, BAF 050, BAF 055, BAF 057, BAF 060, BAF 068, BAF 075, BAF 81, BAF 84, BAF 97, BAF 102, BAF 108, BAF 120) e 4 genótipos comerciais: BAF 112 (IPR-88-Uirapurú), BAF 115 (BRS-Valente), BAF 121 (Iapar 81) e BAF 110 (Epagri) (Tabela 5), todos pertencentes do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão (BAF), da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), localizada em Lages, no Planalto Sul de Santa Catarina.

Tabela 5: Identificação, origem e nome comum dos genótipos crioulos e comerciais de feijão do Banco Ativo de feijão do CAV-UDESC, Santa Catarina, Brasil.

*BAF	Origem da coleção	Nome comum	Grupo comercial	Sementes
102	Goiânia CNPAF (GO)	México 309	preto	Crioulo
112	IAPAR (PR)	IPR-88-Uirapurú	preto	Comercial
115	EMBRAPA (GO)	BRS-Valente	preto	Comercial
120	Lages (SC)	Roxinho	cores	Crioulo

*BAF	Origem da coleção	Nome comum	Grupo comercial	Sementes
3	Palmitos (SC)	Manchinha	cores	Crioulo
4	Lages (SC)	Amendoim Lages	cores	Crioulo
7	Lages (SC)	Preto Lages	preto	Crioulo
13	Caxambú do Sul (SC)	Taquara	preto	Crioulo
23	Chapecó (SC)	Preto Chape-có	preto	Crioulo
108	Recife (PE)	Branco	cores	Crioulo
36	São José do Cer-rito (SC)	Rasga	preto	Crioulo
60	Lebon Régis (SC)	Mouro	preto	Crioulo
42	Capão Alto (SC)	Feijão Va-gem Branca	preto	Crioulo
44	Capão Alto (SC)	Vermelho	cores	Crioulo
46	Lages (SC)	(no name)	preto	Crioulo
47	Piratuba (SC)	Preto precoce	preto	Crioulo
50	Lebon Régis (SC)	Carioca Bri-lhante	carioca	Crioulo
55	Cunha Porã (SC)	Preto	preto	Crioulo
57	Cunha Porã (SC)	Preto	preto	Crioulo
68	Lagoa Vermelha (RS)	Vermelho	colors	Crioulo
75	Formigueiro (RS)	Serrano	preto	Crioulo
84	Pinheiro Machado (RS)	Carioca rosa-do	cores	Crioulo
97	Iraí (RS)	Charque	preto	Crioulo
110	Epagri (SC)	Guará	carioca	Comercial

\*BAF = número da coleção no banco de germoplasma do CAV-UDESC, Santa Catarina, Brasil.

BAFs: 110= Guará; 112= Uirapurú; 115= Valente; 121= Iapar 81 (genótipos comerciais)

Através da produção realizada na estação experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

(Epagri) obtiveram-se as sementes procedentes de duas safras (2011/2012 e 2012/213). A estação se localiza no município de Campos Novos, e toda a produção foi seguida conforme as normas da Lei Orgânica n.º 10.831 de 2003, do Decreto n.º 6.323 de 2007 e das Instruções Normativas n.º 64 de 2008 e 18 e 19 de 2009.

Após a colheita, obtiveram-se amostra de trabalho através da retirada de 2 kg de sementes das amostras representativas provenientes do campo de produção. Essa amostra foi homogeneizada e dividida em quatro subamostras, para obter as quatro repetições.

O teste de germinação foi realizado conforme as Regras para Análises de Sementes (Brasil, 2009). Utilizou-se um total de 200 sementes, com quatro repetições de 50 sementes. A distribuição foi realizada em 3 folhas de papel germitest umedecidas com água destilada, 2,5 vezes o valor da massa seca do papel. Duas folhas foram utilizadas como apoio para semente e outra para cobri-las. Em seguida, as folhas foram enroladas e colocadas verticalmente no germinador à temperatura (25°C) e umidade saturada e constante. As avaliações foram realizadas no quinto e nono dia, calculando-se o número de plântulas normais, seguindo as medições do comprimento plântula, apenas das consideradas normais. Os resultados foram expressos em porcentagem. Juntamente com a primeira contagem de plântulas normais, averiguou-se o comprimento das plântulas, com auxílio de régua, sendo os resultados expressos em centímetros.

As amostras de sementes foram submetidas à determinação do teor de água, utilizando-se o método da estufa a 105+3°C, durante 24 horas, de acordo com as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para a determinação da condutividade elétrica seguiu a metodologia adotada por Vieira & Krzyzanowski (1999), com adaptações. Utilizou-se quatro repetições contendo 5 gramas de cada genótipo, pesadas em balança com precisão de duas casas decimais. As sementes foram alocadas em erlenmeyer de 125 mL contendo 75 mL de água destilada, sendo mantidas em ambiente com a temperatura controlada a 25°C. As leituras de condutividade elétrica foram realizadas em 8 (oito) tempos distintos: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas e medidas com auxílio de condutímetro digital portátil modelo MB-11P-Marte. Os resultados foram corrigidos pela massa de sementes para  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}/\text{g}^{-1}$  de semente.

O teste de frio foi adaptado da metodologia de Miguel & Cicero (1999). Para este teste utilizou-se 4 repetições de 50 sementes por tratamento, sendo que a semeadura foi realizada em papel-toalha umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o valor da massa seca do

papel. As folhas enroladas foram envolvidas por sacos plásticos, fechados com auxílio de fita adesiva e mantidos em câmara de germinação (B.O.D) a 7°C por sete dias. Após sete dias, os rolos foram retirados dos sacos plásticos e mantidos em germinador a 25°C por nove dias, porém computou-se o número de plântulas normais no quarto e nono dia. Após esse procedimento foi realizado três testes: teste de germinação, teste de condutividade elétrica e comprimento de plântula. Para o teste de germinação, os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, como forma de expressão a porcentagem de vigor.

Para as análises estatísticas utilizaram-se modelos lineares de análise de variância univariada para todas as variáveis estudadas nas duas safras de obtenção das sementes. Utilizou-se o programa GENES (CRUZ, 1997) e Linguagem R (Development Core Team, 2008) para efetuar as análises dos dados. Através das médias de cada genótipo foi possível obter a comparação de cada genótipo pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade em cada ano de cultivo. Para associar as variáveis testadas utilizou-se a correlação de Pearson.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de germinação, não apresentou diferenças significativas entre as duas safras avaliadas (2011/12 [S1] e 2012/13 [S2]), cujas médias percentuais foram de 80 e 81%, respectivamente. Já para as variáveis respostas obtidas pelo comprimento de plântula (CP) e condutividade elétrica (CE) observaram-se diferenças significativas entre as safras, com exceção do tratamento após o estresse por frio (F), no teste de CE.

O estresse por frio foi evidente, em ambas as safras, visto que o percentual de germinação para tratamento testemunha (C) foi de 86% e após o estresse por frio (F) foi de 76%, ocorrendo um decréscimo de 10% no percentual dos genótipos (Tabela 6).

Tabela 6: Percentual germinativo no tratamento testemunha (C) e após o estresse com frio (F), nos dois anos de cultivo (2011/2012 e 2012/2013).

Tratamento	Germinação (G%)		Média
	2011/12	2012/13	
Testemunha	85	87	86
Estresse com frio	75	77	76

A análise de variância realizada nos genótipos demonstrou diferença significativa para todas as variáveis estudadas: germinação, teste de condutividade elétrica e comprimento de plântula, entre os tratamentos realizados antes (C) e após o estresse por frio (F), por isso fez-se necessário o desmembramento das médias (Tabela 7)

Tabela 7: Análise de variância dos caracteres analisados em laboratório dos 26 genótipos crioulos do BAF/ CAV-UDESC, Lages – SC, nos dois anos de cultivo (2011/2012 e 2012/2013).

FV	GL	Quadrado Médio					
		G(%)		CP (cm)		CE ( $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$ )	
		TG	Vigor	CP	Vigor	CE	Vigor
Genótipos	25	610,42**	437,77**	26,09**	9,93**	1029,57**	629,74**
Safras	1	13,04 <sup>NS</sup>	9,49 <sup>NS</sup>	6,69**	89,36**	9202,99*	38,36 <sup>NS</sup>
Genótipo X Safra	25	136,21**	264,54**	12,44**	11,37**	358,25**	690,90**

\* = Significativo no nível de 5 % de probabilidade; \*\* = Significativo no nível de 1 % de probabilidade. GL= graus de liberdade; FV= fontes de variáveis; %G= porcentagem de plântulas germinadas; CP= comprimento de plântula; CE= condutividade elétrica.

Para as amostras do tratamento testemunha se enquadrarem dentro dos parâmetros de comercialização de sementes de feijão do Estado de Santa Catarina, o percentual germinativo deve ser no mínimo de 80%. Através do teste de germinação, este trabalho aponta 19 genótipos que se enquadram dentro desse padrão: BAFs 81, 13, 55, 110, 75, 112, 84, 115, 36, 42, 121, 108, 50, 23, 97, 120, 44, 60 e 102 (Tabela 8). Contudo, pelo teste de Scott-Knoot, visualizaram-se 4 (quatro) classes distintas de médias, sendo que na primeira classe encontrou-se 13 genótipos, sendo eles: os BAFs 112, 115, 13, 55, 75, 81, 84 e 110, 108, 36, 121, 42, 50 com percentual de 90 a 100%. O destaque foram para os BAF 81, 75, 84, 110, 55, 13, 112 e 115 classificados na primeira classe de genótipos. Esse resultado corrobora com o resultado encontrado em 2010(a) por Coelho e Prezzi (2013), sendo que 5 dos 8 genótipos destacados (BAFs 81, 75, 84, 13 e 55), permaneceram em destaque, reforçando o conceito do alto potencial fisiológico desses cultivares crioulas de feijão crioulo.

Estudos com outras espécies crioulas como de milho e sorgo evidenciados por ROCHA et al (2009), mostraram também a qualidade fisiológica de algumas cultivares que se sobressaíram às variações ambientais e ataque de organismos que podem prejudicar o crescimento e desenvolvimento de futuras plantas.

Segundo VANZOLIN (2007), o teste comprimento de plântula, determina a qualidade fisiológica específica de cada genótipo, pois sua manifestação depende do vigor, além disso é considerado o teste mais sensíveis desta categoria por demonstrar diferenças sutis entre lotes, constituindo um fator fortemente influenciado pela genética e pelo ambiente de produção da planta (COPELAND, 1976). A especificidade do teste corrobora com resultados avaliados neste trabalho, pois observou-se diferença significativas entre as safras avaliadas (2011/12 e 2012/13), fato não evidenciado no teste de germinação para sementes do tratamento C e F.

Verificou-se pelo teste de Scott-Knoot, 5 classes distintas, para o comprimento de plântula, sendo que o BAF 84, com 17 cm, apresentou a maior média e significativamente diferente dos demais genótipos. Na sequência vieram em evidência os BAFs 55 e 112, ambos com médias 16 cm (Tabela 8).

Para o teste de condutividade elétrica, os genótipos também foram variáveis e apresentaram 4 classes distintas. Sabe-se que o princípio deste teste é de verificar o procedimento físico da passagem de lixiviados orgânicos e inorgânicos para uma determinada solução, que normalmente é a água (KRZYZANOWSKI, 1999), possibilitando assim, classificar o vigor das sementes como uma indicação da integridade da membrana plasmática (SILVA, 2009). Por isso, quanto menor o grau de deterioração das sementes, menor será a quantidade de lixiviados liberados para o meio. Neste estudo, os BAFs 04 ( $33\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}/\text{g}^{-1}$ ), 44 ( $25\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}/\text{g}^{-1}$ ) e 68 ( $23\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}/\text{g}^{-1}$ ), apresentaram o maior vigor para essa variável (Tabela 8).

Ressalta-se que apenas o BAF 68, diante dos citados acima, permaneceu estável comparando as safras, pois não se observou diferença significativa. Em contrapartida, os BAFs 44 e 04, ambos obtiveram valores menores de liberação de solutos na S2 do que em S1, decaindo em média  $19\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$ , de uma safra para outra.

Além dos valores de liberação de solutos em meio aquoso, deve-se observar o tempo de estabilização da liberação desses exsudatos, pois é sabido que cultivares mais vigorosas possuem elevada capacidade de reparação de danos, e conseqüentemente, menor tempo para estabiliza-

ção da liberação dos solutos. Na S1 o tempo de estabilização foi de 8 horas, já na S2 o tempo de estabilização foi de 6 horas (Figura 3).

A diferença no tempo de estabilização da liberação dos solutos pode ter sido influenciada pelas variações nas condições climáticas durante a maturação e dessecação das sementes, de uma safra para outra. Observaram-se diferenças nos índices pluviométricos em S1 (327 mm) em relação a S2 (105 mm) durante o período de floração até maturação da semente, confirmando uma maior precipitação em S1. Avaliando a influência da chuva durante a maturação, estudos evidenciam que o excesso de umidade durante esse período é prejudicial à qualidade fisiológica da semente do feijão (NUNES, 2007; AMARO, 2012) (Gráfico 1).

Além disso, a alta umidade nas sementes podem atrasar a colheita, e conseqüentemente as práticas de dessecação, já que as sementes são altamente higroscópicas, e absorvem facilmente a umidade do meio (DALTRO, 2010). O atraso da colheita pode ocasionar vários prejuízos às sementes, como o aumento das porcentagens de rachadura e enrugamento do tegumento, aumentando o processo de deterioração (BULOW, 2012). Esse fator pode originar lesões devido às dilatações e contrações do tegumento, influenciando diretamente na organização das membranas, no padrão de embebição no período pós-colheita, e conseqüentemente na qualidade fisiológica dessas sementes (COELHO, 2012).

Tabela 8: Percentual de germinação (TG%), comprimento de plântula (CP) e condutividade elétrica (CE) dos 26 genótipos de sementes de feijão analisados do BAF, pertencentes à UDESC, nos anos de cultivo 2011/12 e 2012/13.

BAFs	G (%) <sup>1</sup>		CP (cm)		CE (μS/cm/g)	
102	81	c	14	c	58,41	a
112	93	a	16	b	62,66	a
115	93	a	12	d	63,84	a
120	86	b	10	e	54,48	b
121	91	b	13	c	64,86	a
3	74	d	14	c	31,19	d
4	75	d	12	d	32,57	d
7	76	d	11	e	47,41	b
13	95	a	14	c	52,72	b
23	89	b	12	d	50,15	b
108	91	b	10	e	50,64	b

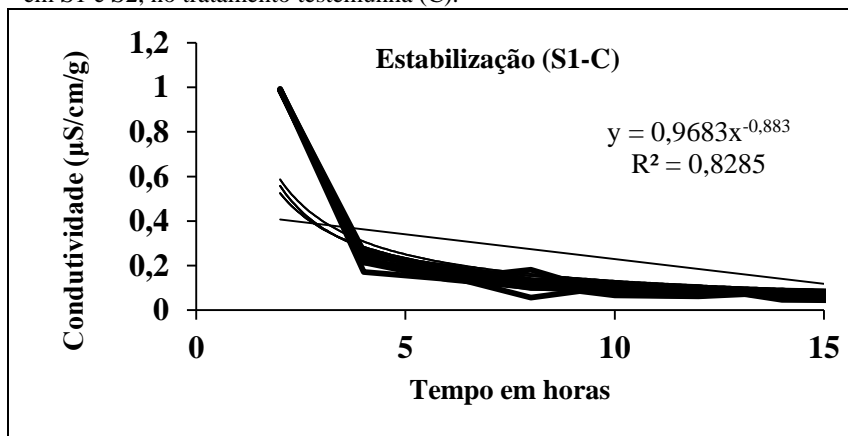


BAFs	G (%) <sup>1</sup>		CP (cm)		CE (μS/cm/g)	
36	91	b	11	e	59,36	a
60	82	c	14	c	53,29	b
42	91	b	15	c	53,87	b
44	83	c	13	d	24,65	d
46	74	d	14	c	42,93	c
47	74	d	11	e	46,55	b
50	91	b	13	d	37,6	c
55	95	a	16	b	59,09	a
57	79	c	12	d	41,23	c
68	80	c	11	e	23,06	d
75	94	a	14	c	44,61	b
81	96	a	14	c	52,98	b
84	93	a	17	a	48,74	b
97	89	b	13	d	40,24	c
110	95	a	13	c	49,34	b

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>- Dados originais, contudo foram transformados em arco-seno da raiz da proporção para análise estatística univariada.

Figura 3: Gráficos demonstrativos da estabilização dos 26 genótipos em horas em S1 e S2, no tratamento testemunha (C).



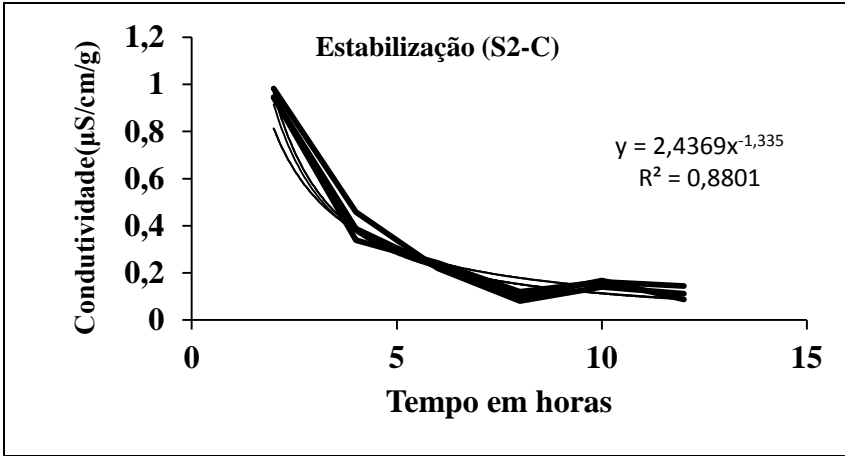
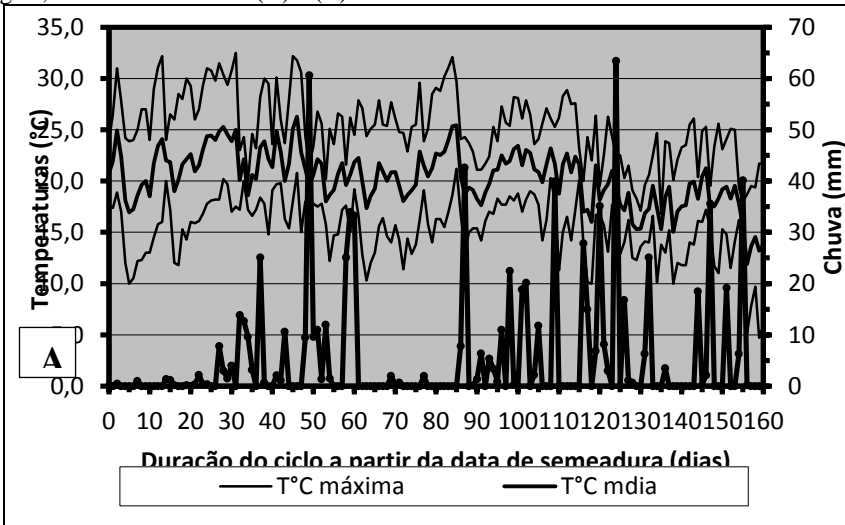
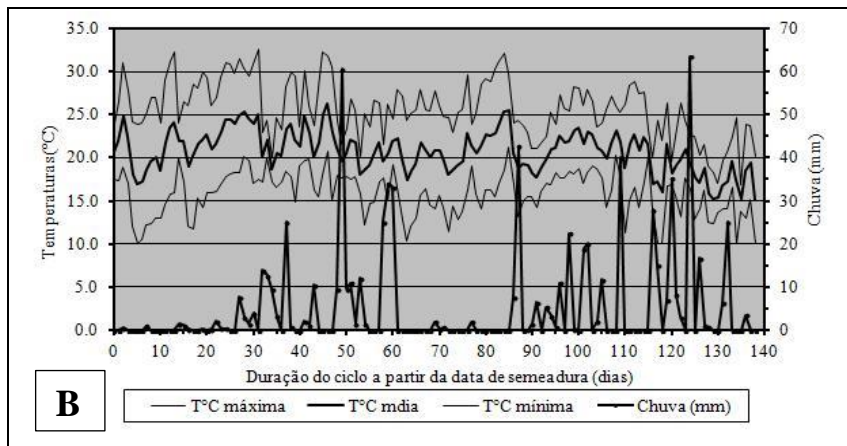


Gráfico 1: Temperaturas (°C) máxima, média e mínima diárias e precipitação pluviométrica (mm) registradas pelo Instituto Nacional de Meteorologia - INMET, em Campos Novos-SC, no período da semeadura até a maturidade fisiológica, na safra 2011/2012 (A) e (B) na safra 2012/2013.



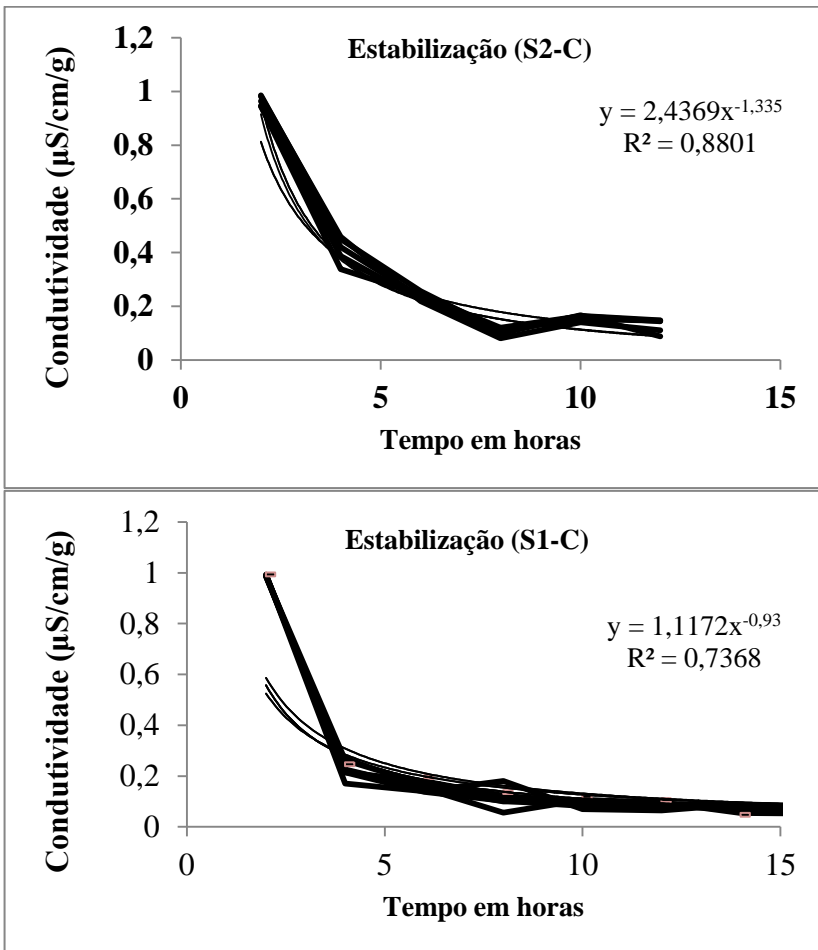


\* A semeadura do experimento na safra 2011/2012 realizada no dia 1º de novembro de 2011, e na safra 2012/2013 a semeadura foi realizada no dia 09 de novembro de 2012, de acordo com o zoneamento agroclimático para a região.

Após o estresse de frio observou-se diferenças negativas no percentual germinativo, comprimento de plântula e até mesmo na lixiviação de solutos das sementes. Segundo estudos de Mahajan & Tuteja (2005), baixas temperaturas induzem uma conjunto de alterações dos componentes do meio intra-celular, incluindo a dos ácidos insaturados, a composição do glicerolipídios, mutações protéicas, composição de carboidratos, a ativação de canais de íons, entre outros eventos que comprometem desenvolvimento do eixo embrionário da semente (POLLOCK & TOOLE, 1965), e conseqüentemente expressam anomalias em plântulas. Sendo assim, elucidada-se por que de maneira geral, as características fisiológicas após o teste de frio, se modificaram.

Nove genótipos dos 26 avaliados se encontraram entre a faixa de 80 a 92% de percentual germinativo, sendo eles os BAFs: 112 (85%), 115(83%), 42(83%), 50(83%), 57(80%), 75(88%), 81(92%), 84(81%) e 110(86%). Contudo, apenas os BAF 81(Preto 70 dias) e 75(Serrano) permaneceram na primeira classe, contemplando os maiores percentuais germinativos após o estresse, apresentando elevado vigor (Tabela 8).

Figura 4: Gráficos demonstrativos da estabilização dos 26 genótipos em horas em S1 e S2, no tratamento testemunha (C).



Alguns trabalhos como de Mertz e colaboradores (2007), observaram que o percentual de germinação de sementes de feijão após o estresse por frio (vigor), entre 25 à 76 %, já Zabot (2007) encontrou cultivares com 60 à 70% seu percentual de germinação. Para outras leguminosas, como a soja, por exemplo, Vanzolini e colaboradores (2007) encontraram percentuais germinativos similares ao do feijão, porém com valores um pouco mais baixos, como, de 50 a 60 %.

Sendo assim, os valores encontrados nesse trabalho, demonstram que as cultivares crioulas, possuem mecanismos genéticos mais amplos para superar o estresse por baixas temperaturas.

O comprimento de plântula e a quantidade de solutos liberados pela semente apresentaram decréscimo, após o teste de frio, para a maioria dos genótipos. O BAF 81, com média de 13 cm, foi o destaque para a variável comprimento de plântula, contudo o mesmo não diferiu estatisticamente dos BAFs 112, 115, 03, 108, 55, 75, 81, 84 e 110, pois todos estão na primeira classe de classificação (Tabela 8).

Já para o índice de lixiviação de solutos, observaram-se 4 classes, sendo que as menores médias foram para os BAFs 121, 03, 04 e 68, porém o destaque foi para o último genótipo que apresentou média de 23  $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$  (Tabela 8).

Observou-se que o tempo de estabilização de lixiviação de solutos das sementes, obtidas das duas diferentes safras diferiram significativamente, quando submetidas o estresse por frio, na 2011/12 a estabilização ocorreu 8 horas após a imersão das sementes em meio aquoso, e no ano de 2012/13 observou-se o tempo de 10 horas (Figura 5). O maior tempo de estabilização foi devido a desorganização das membranas induzida pelo frio, e supostamente, pode ter ocorrido uma associação com as condições climáticas durante a produção a campo, como já discutido anteriormente, sem a condição de estresse induzida pelo frio a nível de laboratório.

Figura 5: Gráficos demonstrativos da estabilização dos 26 genótipos em horas em S1 e S2, no tratamento após o estresse por frio (F).

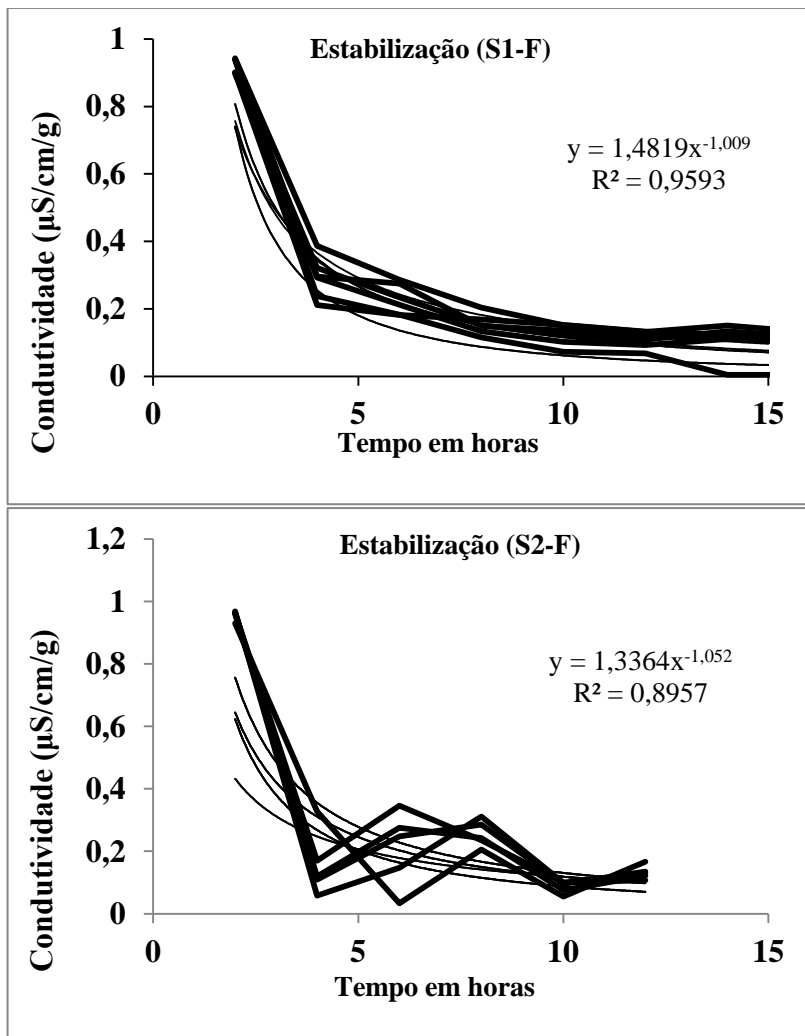


Tabela 9: Percentual de germinação (TG%), comprimento de plântula (CP) e condutividade elétrica (CE) de 26 genótipos de semente crioula de feijão, produzidas nos anos de cultivo 2011/12 e 2012/13, após o teste de frio.

BAFs	G (%) <sup>1</sup>		CP (cm)		CE (μS/cm/g)	
102	79	d	12	b	33,17	c
112	85	b	14	a	38,29	c
115	83	c	11	b	41,74	b
120	68	f	10	c	32,16	c
121	78	d	12	b	30,94	d
3	78	e	13	a	24,52	d
4	70	f	10	c	28,66	d
7	61	g	10	c	52,23	a
13	73	e	12	b	53,67	a
23	76	e	12	b	34,12	c
108	70	f	14	a	35,34	c
36	76	e	12	b	37,19	c
60	77	e	12	b	35,3	c
42	83	c	12	b	45,38	b
44	63	g	12	b	37,62	c
46	72	e	12	b	46,44	b
47	66	g	10	c	57,15	a
50	83	c	11	b	39,5	c
55	75	e	13	a	42,83	b
57	80	d	12	b	45,07	b
68	69	f	11	b	23,67	d
75	88	a	13	a	44,93	b
81	92	a	14	a	48,94	a
84	81	c	13	a	48,78	a
97	74	e	12	b	50,05	a
110	86	b	13	a	37,12	c

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>- Dados originais, contudo foram transformados em arco-seno da raiz da proporção para análise estatística univariada.

O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para averiguar o grau de associação entre as variáveis fisiológicas das sementes. O intervalo de confiança adotado foi de 95 %. Notou-se que significativas diferenças entre os tratamentos (controle e após estresse por frio), por isso fez-se a avaliação separadamente.

Para o tratamento C, a maior correlação foi observada entre as variáveis: germinação e comprimento de plântula, indicando que quanto maior o percentual de germinação, maior será o comprimento da plântula, em ao menos 43 % dos genótipos ( $r=43$ - correlação moderada-figura A). Analisando o tratamento após o estresse (F), essa correlação permaneceu moderada, com  $r= 38$ . Analisando-se a correlação entre a germinação com a condutividade elétrica, em ambos os tratamentos ocorreu à correlação fraca, praticamente nula. Por fim, a correlação entre a condutividade elétrica e comprimento de plântula, também foi fraca a nula, no tratamento C, diferindo do tratamento F, que teve correlação negativa, porém fraca, mantendo a mesmo comportamento. Este fato sugere que conforme aumentano percentual de germinação e comprimento da plântula, maior será a qualidade fisiológica da semente a nível de organização de suas membranas celulares. Esses resultados condizem com o resultado encontrado em 2010(a) por Coelho, pois houve correlação positiva (moderada-forte), entre germinação e comprimento de raiz primária, contudo teve-se correlação negativa entre condutividade elétrica e comprimento de raiz primária.

Esses resultados auxiliam a reafirmar estudos que determinam o vigor das sementes quando utilizam-se os testes de condutividade elétrica e comprimento de plântulas, uma vez que a integridade da membrana tem reflexos diretos na eficiência metabólica durante a embebição da semente, redução da germinação, e consequentemente na formação de um plântula saudável (BARBIERI, 2013). Quanto maior a capacidade de reorganização das membranas e reparação do dano durante a embebição, menor será a quantidade de lixiviados orgânicos e inorgânicos liberados, menor grau de deterioração, maior o potencial de germinação e consequentemente, maior será vigor da semente.

Realizou-se a análise de componentes principais, para melhor visualizar a linearidade entre as variáveis e observar as variações entre os



agrupamentos. O componente principal 1(PC1) e o componente 2 (PC2) explicam 79% das variações observadas após o estresse por frio. As variáveis, comprimento de plântula e germinação, permaneceram próximas, se enquadrando em PC1(-) e PC2(+), corroborando com resultados apresentados na correlação. Já a variável CE permaneceu em PC1(-) e PC2(-). A partir dessas variáveis formaram-se 6 grupos através da similaridade calculada pela distância euclidiana sobre as médias aritméticas (Figura 6). O grupo 1 formado pelos BAFs 81 e 75, permaneceram no terceiro quadrante, próximos a variável germinação, pois apresentaram os maiores percentuais germinativos; já o grupo 2, no segundo quadrante, abrangendo os BAFs 112, 108, 110, 36, 60, 102, 121 se encontram mais próximos ao comprimento de plântula, percentual germinativo de 75 a 85%, e com índices baixos de condutividade elétrica, perdendo apenas para o grupo 3, com os genótipos 03 e 68. Grupo 4 apresentou valores medianos para as três variáveis estudadas, com genótipos com baixo vigor. O grupo 5 e 6 apresentam valores de CE mais altos do que os demais, com valores que oscilam de 60 a 80 % no percentual de germinação. Dessa forma esse teste confirmou os resultados acima descrito, possibilitando uma melhor visualização no plano cartesiano (Figura 6).

Fatores genéticos intrínsecos nos BAFs 75 e 81 possibilitaram uma melhor adaptação ao estresse de baixas temperaturas, possibilitando sua classificação de alto vigor. O efeito do ambiente é um dos elementos de maior importância sobre o vigor das sementes (PREZZI, 2013), tanto durante sua formação quanto no desenvolvimento de uma nova plântula. Plantas de alto vigor, obtiveram índices altos de comprimento de plântula, correspondendo a um crescimento saudável, e baixos índices de lixiviação de solutos, já que essa característica está ligada ao grau de deterioração (BARBIERI, 2012). Os testes de vigor utilizados proporcionaram informações mais detalhadas quanto ao potencial fisiológico das sementes trabalhadas, em conjunto com teste de germinação corroborando com diversos trabalhos realizados, inclusive de outras leguminosas, (BATISTA 2012; MIRANDA, 2001). Por conseguinte, permite-se salientar a importância de considerar os testes de vigor na indicação de genótipos com melhores potenciais de estabelecimento inicial do estande a campo.

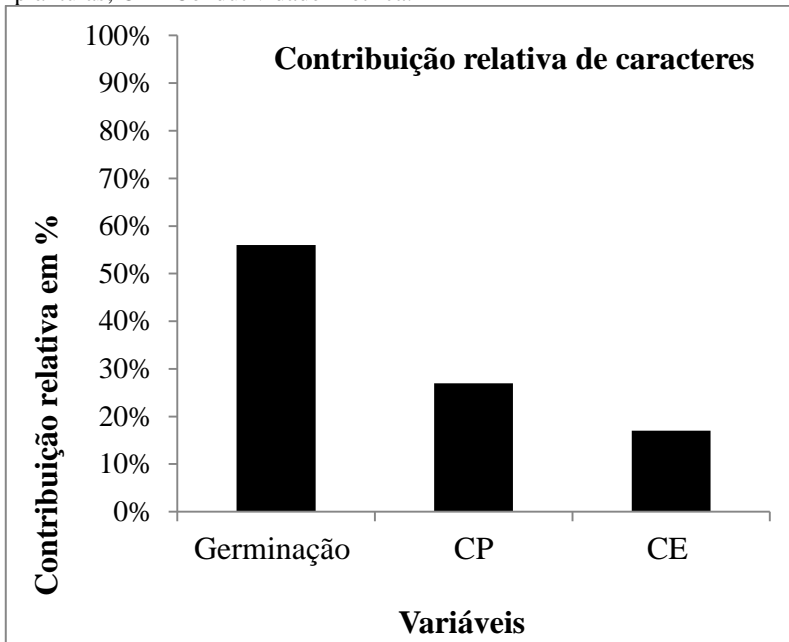
Com auxílio do método de Singh (1981), avaliou-se a importância relativa das variáveis estudadas, na conformidade genética dos resultados após o estresse de frio. A variável germinação apresentou uma contribuição de 56%, seguida de comprimento de plântula (28) e condutividade elétrica (16%). Reafirmando que os testes de vigor são com-

plementares ao teste de viabilidade, oferecendo um espectro maior na análise da qualidade fisiológica das sementes (Figura 7).

Figura 6: Dispersão gráfica dos genótipos de feijão em relação aos componentes principais (PC1 e PC2), correspondendo às três variáveis fisiológicas estudadas. Os números correspondentes aos BAFs estão mais detalhados na Tabela 1.



Figura 7: Contribuição relativas das variáveis estudadas através da metodologia de Singh (1981), baseada na distância euclidiana. CP= comprimento de plântulas; CE= Condutividade Elétrica.



#### 4. CONCLUSÃO

O percentual de germinação foi a variável fisiológica das sementes mais estável entre os genótipos crioulos avaliados, e menos dependente do ambiente. Os genótipos crioulos, produzidos sob cultivo orgânico, BAFs: 81 (Preto 70 dias), 75 (Serrano), 42(Vagem Branca), 50(Carioca Brilhante), 57(Preto), 84(Carioca Rosado); e comercial 110(Guará) apresentaram potencial fisiológico elevado quanto ao vigor, em função do estresse por frio, permitindo indicá-los como mais promissores à semeadura antecipada na região do planalto Catarinense.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela disponibilização do uso dos equipamentos e a Universidade Federal do Estado de Santa Catarina (UDESC) pelo apoio técnico na produção das sementes junto a Epagri-Campos Novos. Ao CNPQ/MDA, edital 58 Ao CNPq pelo apoio financeiro, através do edital 58, processo nº 563920/2010-6. E a Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – FAPESC, Termo de Outorga nº: 10.043/2012-9, processo 1877/2012, pelo suporte financeiro. E a bolsa de produtividade do segundo autor, correspondente, PQ2-CNPQ.

## REFERÊNCIAS

ALBAGLI, Sarita. 2001. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. Biodiversidade, Pesquisa e Desenvolvimento na Amazônia. Parcerias Estratégicas, número 12. [http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias\\_estrategicas/article/viewFile/175/169](http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias_estrategicas/article/viewFile/175/169) <Acesso em 22 de Jul.2013>.

ALCÁZAR, J.E. 2005. Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges. Science and Society. perspectives. *Nature Reviews / Genetics*. Volume 6.

ALTMANN, R.; MIOR, L.C.; Zoldan, P.2008. Perspectivas para o Sistema Agroalimentar e o Espaço Rural de Santa Catarina em 2015: Percepção de representantes de agroindústrias, cooperativas e organizações sociais. Epagri. Documentos. Florianópolis: Epagri. 144p.

ALTOÉ, M. 2007. *Comportamento de genótipos de feijoeiro sob cultivo orgânico*. p.64. (Tese de Doutorado)-Universidade Federal de Espírito Santo, Espírito Santo, Brasil.

ALVES et al. 2012. Agricultura orgânica no Brasil: sua trajetória para a certificação compulsória. *Revista Brasileira de Agroecologia*. 7(2): 19-27.

AMARO, H.T.R. 2012. Qualidade Fisiológica de sementes de feijão de cultivares de diferentes hábitos de crescimento, em função de densidades populacionais, no norte de Minas Gerais. P.60. (Dissertação de Mestrado)- Universidade Estadual de Montes Claros, MG, Brasil.

ANTUNES, I.F et al. 2007. Diversidade intrapopulacional em feijão crioulo como fonte de cultivares para nichos de mercado diferenciados. Revista Brasileira de Agroecologia, v.2, n.1.

ARAÚJO, A.V. 2011. *Desempenho agrônômico e análise energética de variedades crioulas e híbridos cultivados em diferentes sistemas tecnológicos de manejo*.p.101. (Dissertação de Mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.

BARBIERI, A. P. P., et al. 2013. Teste de condutividade elétrica individual em sementes de soja e a relação com emergência de plântulas a campo. Interciencia, 38(4), 310-315.

BARBIERI, A. P.P. et al. 2012, 'Teste de lixiviação de potássio para a avaliação do vigor de sementes de arroz. Revista Brasileira De Sementes, 34, 1, pp. 117-124.

BARETTA, D.R, et al. Banco de germoplasma e caracterização de cultivares crioulas de feijoeiro comum, com ênfase na prevenção a erosão genética.

BATISTA, N. A. S., et al. 2012. Evaluation of cowpea seed quality by electrical conductivity. Revista Ceres, 59(4), 550-554.

BERTOLDO, J.G. 2011. *Melhoramento de feijão (Phaseolus vulgaris L.) para condições de cultivo da serra catarinense com o uso de germoplasma promissores: ciclo de planta prolongado e elevada estatura*. p.165. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil.

BLAIR, M. W., Astudillo, C., Grusak, M. A., Graham, R., & Beebe, S. E. 2009. Inheritance of seed iron and zinc concentrations in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Molecular Breeding, 23(2), 197-207.

BONETT,L.P et al. 2006. Divergência genética em germoplasma de feijoeiro comum coletado no estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 27, n. 4, p. 547-560.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E. de S. A Cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. *Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais*. Viçosa: Editora UFV, 1998. p.13-17.

BRASIL. 2003. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Lei Nº 10831, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2003. Publicado no Diário Oficial da União de 24/12/2003, Seção 1, Página 8. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRASIL. 2007. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Decreto Nº 6.323, DE 27 DE DEZEMBRO DE 2007. Publicado no Diário Oficial da União, Brasília, 28 de dezembro de 2007. Seção 1, Páginas 2 a 8.

BRASIL. 2008. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 64 de 18/12/2008. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. Publicado no Diário Oficial de União, Brasília, 19 de dezembro de 2008. Seção 1, p. 21.

BRASIL. 2009a. Instrução Conjunta Normativa Nº 18, DE 28 DE MAIO DE 2009. Aprova o regulamento técnico para o processamento, armazenamento e transporte de produtos orgânicos. Diário Oficial da União, Brasília, 29 de maio de 2009. Seção 1, p. 15.

BRASIL. 2009b. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 19, DE 28 DE MAIO DE 2009. Aprova os mecanismos de controle e informação da qualidade orgânica. Diário oficial da União, Brasília, 29 de maio de 2009. Seção 1, p. 16 -26.

BRASIL. 2009c. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS. 399 p.

BROUGHTON, W. J., et al. 2003. "Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes." *Plant and soil* 252.1: 55-128.

BULOW, R.L. & CRUZ-SILVA, C.T.A. 2012. Dessecantes aplicados na pré-colheira na qualidade fisiológica de sementes de soja. *Journal of Agronomic Sciences*, Umuarama, v.1, n.1, p.67-75.

CAMPANHOLA, C & VALARINI, P. J. 2001. A agricultura orgânica e seu potencial para o pequeno agricultor. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v.18, n.3, p.69-101, set./dez.

CARVALHO, M.F et al. 2008. Caracterização da diversidade genética entre acessos crioulos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletados em Santa Catarina por marcadores RAP. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.6, p.1522-1528. <http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n6/a05v38n6.pdf><Acesso em: 18 de Ago.2013>.

CARVALHO, N.M.; Nakagawa, J. 2000. *Sementes: ciências, tecnologia e produção*. 4 ed. FUNEP, Jaboticabal, Brasil. 588 p.

CARVALHO, W. P. de & WANDERLEY, A. L. 2007. Avaliação de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) para o plantio em sistema orgânico no Distrito Federal. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n. 3, p. 605-611.

CHIORATO. A.F. *Divergência genética em acessos de feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) do banco de germoplasma do Instituto Agrônomo-IAC*. 202.85.p. (Dissertação). Instituto Agrônomo-IAC, São Paulo.

COELHO, C. M. M. et al.. 2012. Ação de dessecante na pré-colheita sobre a produtividade e a qualidade fisiológica de sementes crioulas de feijoeiro. *Semina: Ciências Agrárias*, 33, 2973-2980.

COELHO, C. M.M et al. 2010a. Potencial fisiológico em sementes de cultivares de feijão crioulo (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 32, nº 3 p.097-105.

COELHO, C. M.M et al. 2010b. Características morfo-agronômicas de cultivares crioulas de feijão comum em dois anos de cultivo. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, suplemento 1, p. 1177-1186.



COELHO, C.M.M. et al. 2007. Diversidade genética em acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciência Rural*, v.37, n.5, p.1241-1247, Santa Maria.

CONAB. 2013. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira. Grãos. Safra 2013/2013. Décimo Levantamento.

[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_07\\_09\\_09\\_04\\_53\\_boletim\\_graos\\_junho\\_\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_07_09_09_04_53_boletim_graos_junho__2013.pdf)<Acesso em 12 de Jul. 2013>.

COPELAND, L.O. 1976. Principles of seed science and technology. Mineapolis: Burgess Publishing, 369p.

COSTA, C.J et al. 2010. Escarificação mecânica e Reguladores Vegetais para Superação de Dormência de sementes de *Passiflora setacea* D.C. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 271. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF.

DALTRO, E., et al. 2010. Aplicação de dessecantes em pré-colheita: efeito na qualidade fisiológica de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, 32(1), 111-122.

ELIAS, H.T. 2006. Caracterização da Variabilidade Genética em Germoplasma Tradicional de *Phaseolus vulgaris* L. coletado em Santa Catarina. p.154. (Tese de Doutorado)-Universidade Estadual de Maringá, Santa Catarina, Brasil.

FONSECA, M.F.A.C. Colaboração de SOUZA, C et al. 2009. Agricultura orgânica: regulamentos técnicos para acesso aos mercados dos produtos orgânicos no Brasil. -- Niterói : PESAGRO-RIO.

GEPTS, P. et al. 2008. Genomics of Phaseolus beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In *Genomics of tropical crop plants* (pp. 113-143). Springer New York.

GRAHAM, P. H., & VANCE, C. P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131(3), 872-877.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. Quantitative genetics in maize breeding. 2.ed. Ames : Iowa State University, 1988. 468p. <http://books.google.com.br/books?hl=en&lr=&id=jJWw3C84e0YC&oi>

=fnd&pg=PR7&dq=quantitative+genetics+in+maize+breeding&ots=OUB-ELyN7m&sig=-M9mih4QKyqvIurbjVTMc2X2unI&redir\_esc=y#v=onepage&q=quantitative%20genetics%20in%20maize%20breeding&f=false. <Acesso em 25 de Jul.2013>.

IBGE. 2013. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística de Produção Agrícola. Indicadores IBGE. Setembro de 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. DGC-Coordenação de Geodésia. Relatório de Estação Geodésia. Relatório online gerado dia 20 de Jul. 2013.

KOOISTRA, E. 1971. Germinability of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) at low temperatures. *Euphytica*,20(2):208-13.

KRZYZANOWSKI et al. Vigor de sementes: Conceitos e Testes. Londrina, PR, Brasil. 1999.

MARCOS FILHO, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ. 495p.

MEIRELLES, L. R., et al. 2006. Biodiversidade: passado, presente e futuro da humanidade. Centro Ecológico.

MIGUEL, M. H. & CICERO, S. M. 1999. Teste de frio na avaliação do vigor de sementes de feijão. *Sci. agric.*, vol.56, n.4, p. 1233-1243.

MIRANDA, D. M, NOVENBRE, A.D.L.C & CHAMMA H.M.C.P. 2001. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de sorgo pelo teste de envelhecimento acelerado. *Revista Brasileira de Sementes*, 23:226-231.

NASS, L.L. et al. (Ed.). 2001. Recursos Genéticos e Melhoramento-Plantas. Rondonópolis: Fundação MT.

NUNES, U. R., et al. 2007. Qualidade fisiológica de sementes de feijão em plantio direto sobre diferentes coberturas de plantas em Diamantina, MG; Physiological quality seeds of bean in no-tillage system over different coverings of plants in Diamantina, MG. *Ciência agrotec.*,(Impr.), 31(6), 1737-1743.

OLIVEIRA, G.V et al. 2006. Adaptabilidade e estabilidade de linhagens de feijão comum em Minas Gerais. Pesquisa agropecuária brasileira, v.41, n.2, p.257-265, Brasília.

PANDOLFO, C. et al. 2002. Atlas climatológico digital do Estado de Santa Catarina. Florianópolis: Epagri.

PAPATHANASIOU, F. et al. 2010. Evaluation of local landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Under organic agriculture in Greece. Journal of International Research Publication: Ecology & Safety. Volume 5. European Union. <http://ecology-safety.ejournalnet.com>.

PEREIRA, H.S et al. 2008. Interação complexa em diferentes épocas de semeadura de feijoeiro comum no Paraná e Santa Catarina. Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, IAC, Campinas, 85.

PESSANHA, L. 2005. Transgênicos, Recursos Genéticos e Segurança Alimentar. Autores Associados. <http://books.google.com.br/books?id=yowjzEgAX9oC&pg=PP10&lpg=PP10&dq=transgenicos,+recursos+geneticos+e+seguran%C3%A7a+alimentar&source=bl&ots=ke8qsnx9Z8&sig=QgrXtiUQoL5eSKvIVVC99NuBi0s&hl=pt-BR&sa=X&ei=IOz7Ufv0CYrS8wSVx4GoCQ&ved=0CFAQ6AEwBQ#v=onepage&q=transgenicos%20recursos%20geneticos%20e%20seguran%C3%A7a%20alimentar&f=false> <Acesso em: 24 Jul.2013.

ROCHA et al. 2009. Qualidade Fisiológica de Sementes de Milho (*Zea Mays*) e Sorgo (*Sorghum Bicolor*) Crioulos Produzidas nos Campos de Sementes de Agricultores (as) Familiares de Porteirinha, Revista Brasileira de Agroecologia. Vol. 4 No. 2. Norte de Minas Gerais

SANTOS, N.C.B. 2011. Potencialidades de produção do feijão orgânico. Rev. Pesquisa & Tecnologia, vol. 8, n. 2.

SAVIAN, M. 2011. A sucessão geracional na agricultura familiar de Ponte Alta-SC. p.99. (Dissertação)- Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Centro de Filosofia e Ciências Humanas. Programa de Pós-Graduação em Geografia.

SCHOONHOVEN, A.V.; VOYSEST, O. 1991. Common beans: research for crop improvement. Cali: CIAT; CAB International, <<http://www.fao.org/docrep/018/t0646e/t0646e.pdf>> Acesso em 14 de Set. 2013>.

SILVA, C.D. 2009. Condutividade elétrica e composição mineral da solução de embebição de sementes de feijão armazenadas em duas temperaturas. p.15. (Dissertação)- Universidade Estadual do Estado de São Paulo (Unesp). Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergenci. The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding, v. 41, p. 237-245, 1981.

TRINDADE, C. C. 2006, Sementes crioulas e transgênicos. Uma reflexão sobre sua relação com as comunidades tradicionais. Trabalho apresentado no XV Congresso Nacional do Conpedi, 15-18 Nov, Manaus, Amazonas.

TSUTSUMI, C.Y. et al. 2012. Cultivares de feijão produzidos em sistema de cultivo orgânico. Revista Cultivando o Saber, Cascavel, v.5, n.3, p.123-131.

VANZOLIN et al. 2007. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. Revista Brasileira de Sementes, vol. 29, nº 2, p.90-96,

VIDAL, L.V. et al. 2007. Desempenho de feijão-vagem arbustivo, sob cultivo orgânico em duas épocas. Horticultura brasileira, v. 25, n. 1.

VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. 1999. *Teste de condutividade elétrica*. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRA- TES, cap.4, p.1-2.

ZABOT et al. R. 2008. Bras. Temperatura e qualidade fisiológica no crescimento de plântulas de feijoeiro. Revista *Agrociência*, Pelotas, v.14, n 4-4,p.60-64.

ZOLDAN, P.C.; MIOR, L.C. 2012. Produção orgânica na agricultura familiar de Santa Catarina. (Epagri. Documentos, 239). Florianópolis: Epagri. 94p.



## **CAPÍTULO III: ESTRESSE OXIDATIVO EM SEMENTES CRI- OULAS DE FEIJÃO SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR FRIO**

### **ESTRESSE OXIDATIVO EM SEMENTES CRIOULAS DE FEI- JÃO SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR FRIO**

Monique dos Santos<sup>1</sup>, Cileide M.M. Coelho Arruda de Souza<sup>2\*</sup>, Marcelo Maraschin<sup>3\*\*</sup>.

<sup>1</sup> Programa de pós-graduação em Recursos Genéticos e Vegetais, Laboratório de Sementes, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rodovia Admar Gonzaga, Km 3, Florianópolis, SC, 88034-001, Brasil.

<sup>2</sup> Prof<sup>a</sup>.Dra.Adjunto1 UDESC/ Lages, SC, Centro de Ciências Agroveterinárias,;Profa/Orientadora do PPG Recursos Genéticos Vegetais, UFSC, Florianópolis, Brasil.

<sup>3</sup> Prof<sup>o</sup>.Dr.Associado I da Universidade Federal de Santa Catarina,SC. Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, UFSC. 1346, Rodovia Admar Gonzaga, 476, 88034-000, Florianópolis–SC

\*Autor correspondente: e-mail: cileidecoelho@yahoo.com.br; cileide.coelho@pq.cnpq.br, tel: +55 49 2101 9172.

(Artigo a ser submetido à revista International Journal of Food, Agriculture and Environment)

**RESUMO:** O estresse oxidativo, ocasionado por estresse biótico e abiótico, é o resultado do desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes, conduzindo a danos em proteínas carboidratos, lipídeos e DNA. Estresse abiótico ocasionado por baixas temperaturas pode afetar o desenvolvimento da semente do feijoeiro, por gerar alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em seu metabolismo. As sementes podem suportar flutuações temporárias de temperatura ajustando sua biologia para aumentar a tolerância ao estresse oxidativo causado. O objetivo do trabalho foi observar as oscilações na produção de metabólitos não-enzimáticos de 16 genótipos de feijoeiro, classificados como vigorosos e pouco vigorosos (contrastantes) pelo teste padrão de germinação em sementes, antes e após estresse por frio. As sementes utilizadas neste trabalho foram provenientes do cultivo orgânico de duas safras consecutivas, 2011/12(S1) e 2012/13(S2). O perfil bioquímico dos genótipos em estudo foi determinado considerando a quantificação de compostos fenólicos, ação antioxidantes (DPPH), teor de prolina livre e peroxidação de lipídeos (TBARs), das amostras controle (C) e após estresse por frio (F). O conteúdo de fenólicos e a atividade antioxi-

dante (DPPH) foram superiores na S2 se comparadas a S1, já o teor de prolina e de TBARs apresentaram valores maiores em S1 do que em S2, em ambos os tratamentos (C e F). Índices pluviométricos altos em S1 (327 mm) em relação a S2 (105 mm) durante o período de floração até maturação da semente podem ter causado essas diferenças. Além disso, analisando os tratamentos C e F, os valores de todas as variáveis analisadas também aumentaram em F, indicando que o estresse por baixas temperaturas causou aumento do conteúdo de metabólitos não-enzimáticos na semente, afim de proteger os danos da oxidação. As técnicas multivariadas possibilitaram discriminar os genótipos, diante do estresse oxidativo, corroborando com resultados fisiológicos, demonstrando que em ambas as safras, o genótipo denominado como Preto 70 dias (BAF 81) apresentou um desempenho diferenciado diante ao estresse, sendo considerado o mais tolerante, e apresentando valores medianos de todas as variáveis analisadas.

Palavras-chaves: sementes, estresse oxidativo, baixas temperaturas, safras.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), um dos alimentos mais antigos do mundo (ALMEIDA, 1995; FREITAS, 2006), é considerado uma das principais fontes de nutrientes para a dieta humana, pois fornece proteínas, fibras, carboidratos complexos e vitaminas (GRAHAM & RANALLI, 1997; CARNEIRO, 2005; AFONSO, 2010). O Brasil é responsável por 15% da produção mundial de feijão, classificado como o segundo maior produtor do globo (ICEPA, 2011; CONAB, 2013), fator que leva a inquestionável importância socioeconômica da leguminosa no país (KASCHUK, 2006).

Em Santa Catarina, sul do Brasil, a cultura do feijão é tradicional fonte de renda, principalmente para pequenos produtores rurais (ZILIO, 2010), o estado é o quinto maior produtor de feijão a nível nacional (DERAL, 2013), produzindo na última safra (2012/13), aproximadamente, 120 mil toneladas do grão (CONAB, 2012). As microrregiões do oeste e o planalto sul catarinense possuem a produção mais expressiva da leguminosa, destacando-se o município de Curitibaanos, produzindo 28,8% do total no Estado (EPAGRI/CEPA, 2010).

Essas microrregiões são caracterizadas por condições de baixas temperaturas, fator abiótico que influencia o processo de germinação e



vigor das sementes (LOPEZ-AMORÓS, 2006), podendo restringindo a produção da leguminosa, levando os agricultores catarinenses a optarem por realizar práticas de semeadura tardia (BISOGNIN, 1997). Pelo fato das sementes de feijão serem muito sensíveis a esse tipo de estresse, a porcentagem de germinação pode decair em até 50% (KLAN, 1995), pois afeta diretamente o desenvolvimento embrionário, e consequentemente o crescimento e o vigor da plântula (POLLOCK & TOOLE, 1966, POLLOCK, 1969).

Sendo assim, as baixas temperaturas levam à redução dos rendimentos médios da cultura do feijoeiro, alongando seu ciclo, e podendo aumentar os custos de produção. Porém, existem variedades que expressam mecanismos de resistência ao frio, através de mudanças na expressão gênica (OTUBO, 1996; HUGHES & DUNN, 1995). Os genes que ativam esses mecanismos estão associados às funções de proteção e estabilização da integridade das membranas celulares, ao incremento da expressão de mecanismos antioxidantes, ao aumento intracelular dos níveis de açúcar, bem como ao acúmulo de compostos fenólicos e na composição dos aminoácidos, com destaque à prolina. Em seu conjunto, estas alterações bioquímicas conferem um fenótipo de maior resistências às baixas temperaturas, contribuindo à superação da desidratação celular associada ao estresse causado pelo frio (MAHAJAN & TUTEJA, 2005).

O efeito do estresse por frio em sementes de cultivares de feijão, bem como algumas modificações bioquímicas foram estudadas por alguns autores, por exemplo, em 1970, Kooistra, que observou a germinação de espécies do 280 variedades de *Phaseolus*, combinadas com baixas temperaturas em diferentes horas de exposição ao estresse, destacando-se *P. vulgaris* viz Comtesse de Chambord em temperaturas abaixo de 15°C. Já, Chinnusamy (2007) e Ishitan (1997), averiguou a função da família CBFs (C-repeat binding fator) em cultivares no controle do estresse de baixas temperaturas, em alguns casos codifica a sequencia LUC sobre o controle do gene RD29A. Otubo e colaboradores (1996) selecionaram alguns genótipos tolerantes ao frio, como SMALL WHITE, RIO VERMELHO E A-488, e realizaram cruzamentos cujos efeitos genéticos aditivos predominaram em F1. Outros pesquisadores observaram a ação antioxidante de algumas enzimas em sementes diante ao estresse salino e de temperaturas extremas, além de ressaltar as poucas pesquisas relacionadas ao estresse oxidativo em sementes (LEI, 2005); Badea em 2009 enfatizou as modificações na integridade lipídicas das membranas após estresse de baixas temperaturas, e outros autores que demonstraram a acumulação de prolina e outros aminoácidos em função

do estresse (NETO, 2004; RAI, 2002; HAIKO ENOK SAWAZAKI, 1981).

Devido aos problemas ocasionados pelas baixas temperaturas, tem-se buscado variedades crioulas com características resistentes ao frio que possam ser utilizadas em Santa Catarina para preconizar a colheita antecipada. Ao longo dos anos, estes genótipos têm sido cultivados por populações indígenas e produtores catarinenses, permitindo a formação de um banco de germoplasma de variedades crioulas, as quais acumularam modificações genéticas que contribuíram para adaptação aos microclimas e as regiões geográficas variadas (GUERRA, 1998).

Tendo em vista o exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar, em sementes de feijão crioulo e comercial, algumas oscilações na produção de metabólitos não-enzimáticos, perante ao estresse oxidativo causado pelas condições de baixas temperaturas, bem como a correlação de genótipos caracterizados como mais e menos tolerantes ao estresse por frio, de duas safras consecutivas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenções das sementes de feijão**

Amostras de sementes de feijão oriundas do cultivo orgânico das safras agrícolas 2011/12 e 2012/13 foram gentilmente cedidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). Os genótipos progenitores foram cultivados no município de Campos Novos, seguindo as normas da Lei Orgânica n.º 10.831 de 2003, do Decreto n.º 6.323 de 2007 e das Instruções Normativas n.º 64 de 2008 e 18 e 19 de 2009.

Vinte e dois genótipos crioulos (BAF 03, BAF 04, BAF 07, BAF 013, BAF 023, BAF 036, BAF 042, BAF 044, BAF 046, BAF 047, BAF 050, BAF 055, BAF 057, BAF 060, BAF 068, BAF 075, BAF 81, BAF 84, BAF 97, BAF 102, BAF 108, BAF 120) e 4 genótipos comerciais (BAF 112 [IPR-88-Uirapurú], BAF 115 [BRS-Valente], BAF 121 [Iapar 81] e BAF 110 [Epagri]) (Tabela 10), foram estudados. Esses genótipos pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma de Feijão (BAF), localizada no Centro de Ciência Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC- Lages, Planalto Sul de Santa Catarina).

Tabela 10: Identificação, origem e nome comum dos genótipos crioulos e comerciais de feijão do Banco Ativo de feijão do CAV-UDESC, Santa Catarina, Brasil.

*BAF	Origem da coleção	Nome comum	Grupo comercial	Sementes
102	Goiânia CNPAF (GO)	México 309	preto	Crioulo
112	IAPAR (PR)	IPR-88-Uirapurú	preto	Comercial
115	EMBRAPA (GO)	BRS-Valente	preto	Comercial
120	Lages (SC)	Roxinho	cores	Crioulo
121	IAPAR (PR)	Iapar 81	carioca	Comercial
3	Palmitos (SC)	Manchinha	cores	Crioulo
4	Lages (SC)	Amendoim Lages	cores	Crioulo
7	Lages (SC)	Preto Lages	preto	Crioulo
13	Caxambú do Sul (SC)	Taquara	preto	Crioulo
23	Chapecó (SC)	Preto Chape-có	preto	Crioulo
108	Recife (PE)	Branco	cores	Crioulo
36	São José do Cer-rito (SC)	Rasga	preto	Crioulo
60	Lebon Régis (SC)	Mouro	preto	Crioulo
42	Capão Alto (SC)	Feijão Va-gem Branca	preto	Crioulo
44	Capão Alto (SC)	Vermelho	cores	Crioulo
46	Lages (SC)	(no name)	preto	Crioulo
47	Piratuba (SC)	Preto precoce	preto	Crioulo
50	Lebon Régis (SC)	Carioca Bri-lhante	carioca	Crioulo
55	Cunha Porã (SC)	Preto	preto	Crioulo
57	Cunha Porã (SC)	Preto	preto	Crioulo
68	Lagoa Vermelha (RS)	Vermelho	colors	Crioulo
75	Formigueiro (RS)	Serrano	preto	Crioulo

*BAF	Origem da coleção	Nome comum	Grupo comercial	Sementes
84	Pinheiro Machado (RS)	Carioca rosado	cores	Crioulo
97	Iraí (RS)	Charque	preto	Crioulo
110	Epagri (SC)	Guará	carioca	Comercial

\*BAF = número da coleção no banco de germoplasma do CAV-UDESC, Santa Catarina, Brasil.

BAFs: 110= Guará; 112= Uirapurú; 115= Valente; 121= Iapar 81 (genótipos comerciais)

### 2.1.1 Triagem do material analisado

A fim de avaliar o vigor após o estresse por baixas temperaturas, realizou-se o teste de frio para os 26 cultivares de feijão, conforme Miguel & Cicero (1999), com adaptações. Foram utilizadas 200 sementes, sendo estas distribuídas em quatro repetições de 50 sementes, as quais foram dispostas em papel-toalha umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o valor da massa seca do papel. As folhas enroladas foram envolvidas por sacos plásticos, fechados com auxílio de fita adesiva e mantidos em câmara de germinação (B O D) à 7°C por sete dias. Após este período, realizou-se a avaliação da germinação (Brasil, 2009), sendo o material amostral retirado dos sacos plásticos e mantido em germinador à 25°C por nove dias, computando-se somente o número de plântulas consideradas normais no quarto e nono dia, conforme Brasil (2009). Por fim, após a análise do percentual de germinação após teste de frio, selecionaram-se 16 genótipos contrastantes, ou seja, 8 genótipos mais vigorosos (maiores percentuais de germinação) e 8 genótipos menos vigorosos (os menores percentuais de germinação) para as safras em estudo (Tabela 2), as quais foram utilizados nas análises bioquímicas detalhadas a seguir.

Tabela 11: Identificação, grupo comercial e percentual de germinação dos genótipos contrastantes de feijão, após o teste de frio.

SAFRA 2011/12			SAFRA 2012/13		
BAF	G (%)	Grupo Comercial	BAF	G (%)	Grupo Comercial
<b>Mais Vigorosos Após o Teste de Frio</b>					
75	98	preto	81	88	preto
81	95	preto	50	85	carioca
84	91	cores	97	84	preto
102	86	preto	42	83	preto
121	84	carioca	55	81	preto
42	83	preto	75	77	preto
36	83	preto	4	74	cores
50	81	carioca	102	74	preto
<b>Menos Vigorosos Após o Teste de Frio</b>					
55	69	preto	108	73	cores
47	69	preto	121	72	carioca
108	66	cores	84	71	cores
4	66	cores	120	70	cores
120	65	cores	7	69	preto
97	64	preto	36	69	preto
44	62	cores	44	64	cores
7	55	preto	47	62	preto

### 2.1.2 Preparação do Material

Previamente às análises bioquímicas e espectrofotométricas, os grãos foram triturados em moinho de café (Cadence MDR 301), com auxílio de nitrogênio líquido, padronizando-se a granulometria da farinha em 60 mesh. Na sequência o material foi transferido à estufa com circulação de ar à 40°C/4h. As amostras das farinhas secas foram acondicionadas em tubos Falcon (15 ml) em temperatura ambiente, até posterior análise.

### 2.2 Análises bioquímicas

As análises subsequentes utilizaram amostras controle(C) e submetidas ao estresse térmico(F), conforme previamente descrito.

### **2.2.1 Espectrofotometria de varredura UV-visível**

A análise espectrofotométrica de varredura foi utilizada para a obtenção de um perfil metabólico preliminar. Para tal, amostras de farinha (1: 3, m/v) foram adicionadas de 10 ml de solução clorofórmio: etanol (50: 50, v/v) e incubadas (30 min), seguido de centrifugação (4000 rpm, 10 min) e recuperação do extrato organosolvente. O perfil espectral de absorvâncias do extrato organosolvente (3ml) das amostras foi determinado em espectrofotômetro (BeL, SPECTRO LGS53), no intervalo de 200 a 800 nm, no número de 3 espectros/amostra.

### **2.2.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais**

Os extratos foram obtidos utilizando-se 1g (peso seco) de amostra (farinha), adicionada de 10 ml de metanol (80%) e incubada em banho-maria, à 55°C, por 30 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas (4000 rpm, 10 min), recuperando-se o sobrenadante para as análises posteriores. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por meio do reagente Folin Ciocalteu, utilizando-se uma curva padrão de ácido gálico, nas concentrações de 0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 e 1250 µl/ml ( $R^2 = 0,9969$ ) (RUMBAOA, 2009). Para tal, 200 µL do extrato metanólico foram adicionados a 1,4 mL de água destilada, 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, 30 µL de carbonato de sódio (20%, m/v). A mistura permaneceu em repouso por uma hora, seguido da determinação da absorvância em leitor de microplaca (TP-Reader, TP READER NM Thermo Plate) ( $\lambda = 765$  nm, HUANG. 2004).

### **2.1.3 Determinação da atividade antioxidante – inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)**

O potencial antioxidante dos extratos metanólicos foi determinado seguindo a metodologia de Kim et al., (2002). 10 µL do extrato foi adicionado 290 µL da solução metanólica do radical DPPH a 80 ppm (Sigma, 0,1 mM em metanol 80%). A absorvância do radical DPPH foi determinada através da leitura da absorvância ( $\lambda = 530$  nm) em leitor de microplacas, após 30 minutos de incubação.

## 2.2.4 Determinação de prolina livre

O teor de prolina livre nas amostras foi determinado segundo metodologia de Bates et al. (1973). Amostras de farinhas (0,5 g) foram adicionadas ao ácido sulfossalicílico (3%, m/v). O extrato foi centrifugado (4000 rpm, 5 min) recuperando-se o sobrenadante (2 ml) ao qual foram adicionados 2 mL de ninhidrina ácida e 2 mL de ácido acético glacial. O meio de reação foi incubado em banho-maria (100°C/1h), sendo a reação paralisada por imersão em banho de gelo. Após este procedimento, foram acrescentados 4 mL de tolueno, seguido de agitação vigorosa (20 s) e recuperação do sobrenadante aspirado da fase aquosa, para determinação da absorbância leitor de placa ( $\lambda = 520$  nm). A concentração de prolina foi determinada usando-se a curva padrão, preparada com concentrações de: 25, 50, 100 e 300 mg L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9863$ ).

## 2.2.5 Quantificação de lipoperoxidação

A quantificação foi realizada por meio da determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Heath & Packer (1968), com adaptações. Às amostras de farinhas (0,2 g) foram acrescido a 600  $\mu$ L de PvPP (20%) e homogeneizado em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). O homogeneizado foi sonicado (10 min), adicionado a 25  $\mu$ L hidroxitolueno butilado (BHT - 10mM) e centrifugado (5 000 rpm, 10 min). Houve novamente a recuperação do extrato sobrenadante (350  $\mu$ L), ao qual foi acrescido 700  $\mu$ L do meio de reação (0,25% (p/v) de ácido tiobarbitúrico [TBA] em HCL [0,25M] e TWEEN 20 [2%]), a mistura foi incubada em banho-maria (100°C/15 min) e levou-se ao banho de gelo por 5 minutos para a paralização da reação. O homogeneizado foi centrifugado (5000rpm, 5 min), recuperando-se o sobrenadante, seguido da leitura da absorbância ( $\lambda = 530$  nm). A concentração do complexo entre aldeído malônico/ácido tiobarbitúrico (MDA/TBA) foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 1,55 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (DEUNER et al, 2011).

## 2.3 Análises Estatísticas

Os dados foram, inicialmente, submetidos à análise de variância univariada, para avaliação da existência de variabilidade dos dados de cada variável bioquímica em relação aos genótipos estudados. A análise multivariada foi utilizada para analisar as relações entre os genótipos

caracterizados pelas quatro variáveis bioquímicas estudadas, a fim de avaliar e interpretar a variabilidade global existente, através dos métodos de componentes principais (PCAs) e análise hierárquica (clusters). Essas análises foram processadas implementando-se scripts em linguagem computacional R (Development Core Team, 2008) também com o auxílio do programa PAST (HAMMER et al. 2001). Os valores médios dos tratamentos foram comparados pelo teste de agrupamento de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade. Além disso, realizou-se a associação as variáveis testadas através do cálculo da correlação de Pearson.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Espectrofotometria de varredura Uv-visível e quimiometria.**

A análise espectrofotométrica de varredura UV-vis possibilitou detectar sinais típicos de compostos pigmentares nas amostras de farinhas de sementes dos genótipos em estudo. Os perfis demonstraram forte absorção na janela espectral de 280 a 480 nm, correspondendo à região de compostos fenólicos, com bandas de absorção de ultravioleta (280-340nm) e UV-visível (340-480nm). Para melhor detalhamento, os dados foram divididos conforme as absorbâncias descritas e, submetidos à determinação dos componentes principais para visualização da constituição metabólica aos compostos que absorvem ou não absorvem a luz UV. A região que demonstrou o resultado mais consistente abrangeu a faixa espectral 280 a 340 nm, em ambas as safras, por ser possível identificar picos frequentes à absorção de ultravioleta pelos compostos fenólicos, tendo uma descrição característica de cada genótipo antes e após o estresse por frio. O conjunto de dados referentes à banda de UV-visível permaneceram muito próximos a origem (região centróide), não demonstrando dados consistente, e por isso não relatados neste estudo.

Na S1, os componentes PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 96 % a variância presente na matriz de dados referentes aos compostos fenólicos obtidos a partir a faixa espectral 280 a 340 nm. Através da distribuição fatorial verificou-se que os genótipos se agruparam em cinco grupos distintos (Figura 4-B). De maneira geral, os genótipos classificados como menos vigorosos se encontravam em PC1(+) e PC2(+), abrangendo os grupos 1 e 2, PC1(-) e PC2 (+), onde se encontra o grupo 3. Em contrapartida os genótipos mais vigorosos cuja distribuição se condensou PC1(-) e PC2 (-), abrangeu os grupos 4 e 5 .



Na segunda safra (S2), notou-se diferença na distribuição, comparada com a safra anterior, pois se formaram grupos conforme o tratamento estudado (C e F) e não pela classificação de vigor. Os componentes PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 98% da variância dos dados da matriz. No, primeiro e no segundo quadrante observaram-se três grupos, todos contendo a maioria dos genótipos do tratamento após o estresse (F), já no terceiro e quarto quadrante, agruparam-se genótipos do tratamento controle (C), com exceção dos BAFs 112(F) e 81(F).

A espectrofotometria de varredura em UV-vis foi um instrumento eficaz para identificação de metabólitos secundários de interesse para o presente estudo, auxiliando para direcionamento das análises quantitativas dos compostos fenólicos e averiguação da ação oxidante das sementes dos genótipos classificados como contrastantes quanto ao vigor.

### **3.2 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante**

Através das análises de variância dos extratos, constataram-se diferenças significativas no conteúdo de compostos fenólicos, porcentagem de inibição-DPPH ( $p < 0,05$ ) entre as safras (2011/12 e 2012/13) e entre os tratamentos (C e F) (Tabela 12).

Percebe-se que a safra 2012/13 (S1) apresenta teores maiores de compostos fenólicos e DPPH comparadas com a safra 2011/12 (S2). Essa distinção pode ter sido influenciada por oscilações pluviométricas, de temperatura e umidade ocorridas entre os anos de cultivo, já que existe uma resposta direta entre planta-semente e sua interação com meio ambiente diversificando assim, a concentração dos compostos fotoquímicos produzidos (ZOBAYED, 2005). Sendo assim determinadas circunstâncias climáticas podem causar uma pequena disfunção de energia na planta, comprometendo o conteúdo de compostos fenólicos que seriam transmitidos para as sementes durante sua formação. Ressalta-se que durante a época de maturação das sementes de feijoeiro na S1 se comparadas à S2, houve um aumento no índice pluviométrico de aproximadamente 70%, evidenciando que alta disponibilidade de água durante essa fase de produção pode ter comprometido a quantidade de compostos transferidos para as sementes.

Os compostos fenólicos abrangem várias substâncias orgânicas, contemplando diferentes graus de polimerização, fato que contribui pela coloração das sementes, além de apresentarem atividades que sequestram radicais livres protegendo contra estresse oxidativo (YUJIM, 2000). Sendo assim, por esses compostos formarem um grupo extenso (ácidos fenólicos: ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos;

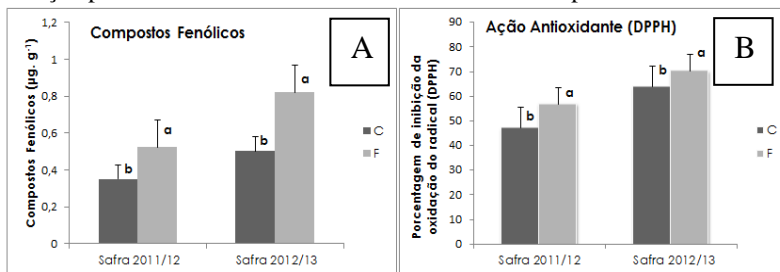
flavonoides: flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides), cada genótipo apresenta um perfil (FERREIRA & ABREU, 2007), que ainda pode se diferenciar diante de algum estresse biótico e/ou abiótico (LLORACH, 2008). Este fator pode ser mais um dos indícios que o perfil dos compostos fenólicos apresentou-se distinto de uma safra para outra.

Observando as médias dos tratamentos (C e F) tanto o conteúdo de compostos fenólicos como ação antioxidante, em ambas as safras, aumentaram após o estresse de baixas temperaturas(F). Segundo Neves (2009), as propriedades biológicas dos fenólicos podem estar relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre o meio, possuindo alta probabilidade de ocorrência de correlação entre eles (LÓPEZ-AMORÓS, 2006), e assim caracterizar o elevado potencial antioxidante dos fenólicos (BROINIZ, 2007) (Figura 8).

Todo o processo de formação da semente é complexo, e cada composto cedido da planta-mãe exerce funções distintas e acopladas entre si durante o crescimento da plântula, por isso condições ótimas de temperatura e umidade durante esse período é elementar. Estudos evidenciaram que durante a germinação, fase de intensa respiração, existe um aumento na eliminação de espécies reativas de oxigênio, sendo que grande parte pode ser neutralizada pelos compostos fenólicos (LÓPEZ-AMORÓS, 2006, MITTLER, 2002) já existentes nas sementes, característica que explica a produção desses compostos no tratamento controle (C).

O estresse por baixas temperaturas pode promover o aumento da produção excessiva de espécie reativas de oxigênio ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ , OH), representando o estresse oxidativo (GILL&TUTEJA, 2010), corroborando com os dados observados no tratamento após o estresse (F). Sobretudo, essas espécies reativas nem sempre são nocivas, se produzidas em concentrações moderadas induzem mecanismos de tolerância ao desequilíbrio causado (PRASAD et al., 1994; RHOADS et al., 2006; PASTORE et al., 2007; RUELLAND & ZACHOWSKI, 2010). Esse panorama de estresse na semente reflete na germinação e desenvolvimento das plantas, aumentando valor do papel da atividade antioxidante dos agentes não enzimáticos diante à tolerância ao estresse.

Figura 8: Compostos fenólicos nos grãos de variedades crioulas de feijão (A) e percentagem de inibição do radical DPPH (B) nas safras de 2011/12 e 2012/13, para sementes controle (C) e após o estresse térmico (F). Os valores são expressos em  $\mu\text{g/g}$  de matéria de seca para compostos fenólicos e em percentagem de inibição para DPPH e são referentes às médias  $\pm$  desvio padrão.



Observando os teores de fenólicos nos genótipos estudados percebeu-se grande oscilação, revelando valores de 0,11 a 0,89 mg/g na primeira safra (S1) e valores de 0,14 a 1,28 mg/g na última safra (S2). Piedade e colaboradores em suas pesquisas encontraram valores de até 2,59 mg/g de fenólicos em cultivares de feijoeiro utilizando a catequina como padrão, contudo Afonso (2010) e Silva (2009) encontraram valores mais próximos ao deste estudo, oscilando de 0,04 a 0,78 mg/g, mesmo utilizando como padrão ácido cafeico e catequina, respectivamente.

Os genótipos com os maiores teores na primeira safra foi BAF 102 e o 4, em contrapartida na S2 o destaque foi para os BAFs 84, 44 e 55. Para a atividade antioxidante notou-se oscilação de percentuais, de 35 a 81% na S1, destacando-se o BAFs 36 e 47; e de 59 a 89% na S2 destacando-se os BAFs 68 e 07, com maiores porcentagens (Tabela 12).

Tabela 12: Concentração média de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos genótipos contrastantes, nos dois anos de cultivo (2011/2012 e 2012/2013).

	BAFs	2011/12 crop		BAFs	2012/13 crop	
		*DPPH(%)	**Phenolic compounds (mg/g)		*DPPH (%)	**Phenolic compounds (µg/g)
Mais vigorosos	75	68 c	0.46 b	110	85 c	0.62 c
	81	59 d	0.57 b	112	69 f	0.49 c
	84	55 d	0.35 c	115	59 f	1.28 a
	102	71 b	0.87 a	81	84 c	1.08 b
	121	60 d	0.22 c	50	88 b	0.37 d
	42	68 c	0.22 c	97	82 c	0.63 c
	36	77 a	0.58 b	57	88 b	1.03 b
	50	69 c	0.53 b	42	86 c	0.35 d
Menos vigorosos	47	81 a	0.11 d	84	88 c	0.14 e
	55	58 d	0.46 b	120	84 c	1.26 a
	108	72 b	0.32 c	36	86 c	0.48 c
	4	58 d	0.79 a	7	87 a	0.42 c
	120	72 b	0.64 b	13	74 e	0.44 c
	97	35 e	0.53 b	68	89 a	0.50 c
	44	16 f	0.03 d	44	85 c	1.17 a
	7	66 c	0.32 c	47	87 b	0.33 d

\*= Dados originais, contudo foram transformados em arco-seno da raiz da proporção para análise estatística univariada; \*\* =Valor determinado pela curva de calibração com ácido gálico (r2= 0,99);\*\*\*= Significativo no nível de 5 % de probabilidade.

### 3.3 Prolina livre e lipoperoxidação

Por meio das análises de variância dos extratos das sementes, diferenças significativas no conteúdo do teor de prolina livre e grau de lipoperoxidação (TBARS) ( $p < 0,05$ ) entre as safras (2011/12 e 2012/13) e entre os tratamentos (C e F) foram observadas.

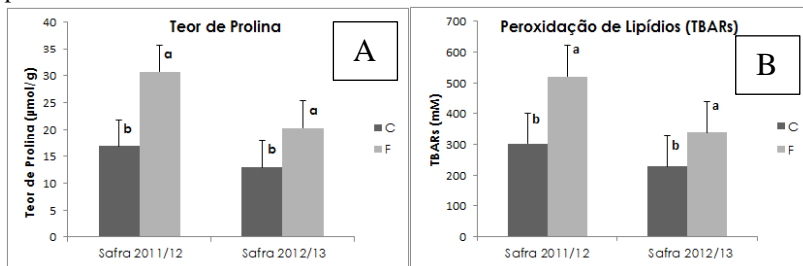
Analisando primeiramente as safras, percebe-se que o teor de prolina livre e o grau de peroxidação lipídica foram maiores em S1 do que em S2 (Figura 9). Como já explanado anteriormente, condições climáticas influenciam na composição de compostos da semente e toda sua organização celular.

Durante o período de produção da S2 ocorreram condições mais adequadas ao cultivo do feijão, evidenciando um equilíbrio maior da planta e conseqüentemente da semente formada. Provavelmente o alto índice pluviométrico em S1 estimulou maior acúmulo de prolina livre (osmólito), a fim de manter o equilíbrio osmótico e proteção das membranas (SOUZA, 2013) diante de um crescente estado de estresse hídrico. Alguns autores como Lazcano-Ferrat & Lovatt (1999) relataram o acúmulo de prolina por influência do estresse hídrico, corroborando com resultados do presente estudo. Esse osmólito auxilia na retenção de água no citosol, protegendo assim as membranas, complexos protéicos e estruturas celulares (ALI, 2013; MAHAJAN & TUTEJ, 2005), por isso qualquer situação que impeça a ação estável da água dentro da célula, pode ativar o acúmulo desse composto, situação que engloba, de maneira geral, qualquer tipo de estresse abiótico.

O grau de peroxidação lipídica também foi maior na S1. A lipoperoxidação evidencia o nível de estresse oxidativo nas sementes, processo advindo da oxidação de ácidos graxos (poli-insaturados), caracterizando a formação de malonaldeído (MDA) (Lima & Abdalla 2001). Entre outros reflexos dessas alterações nas membranas, destacam-se os transtornos referentes à permeabilidade, alterando o fluxo iônico e de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e saída de nutrientes, além de substâncias tóxicas nas células (MITTLER, 2002).

Diferente do comportamento dos compostos fenólicos e porcentagem de inibição do radical DPPH, os valores de prolina e lipoperoxidação seguiram um comportamento conforme a classificação dos genótipos, sendo que os classificados fisiologicamente mais vigorosos apresentaram, de maneira geral, teores maiores do que os menos vigorosos.

Figura 9: Teor de prolina livre (A) e peroxidação de lipídeos (B) dos grãos de variedades crioulas de feijão das safras de 2011/12 e 2012/13, para sementes controle (C) e após o estresse térmico (F). Os valores são expressos em  $\mu\text{mol/g}$  de para prolina (determinada por curva padrão) e em mM para lipoperoxidação (Valor Corrigido Lei de Lambert-beer) e são referentes às médias  $\pm$  desvio padrão.



Através do teste de Scoot-Knoot, observaram-se 7 classes distintas na S1 e S2 para prolina. Os valores encontrados oscilam de 12, 36 a 32, 46  $\mu\text{mol/g}$  em S1 e de 6,68 a 35, 08 em S2. Destaca-se em S1, com maior índice de prolina livre o BAF 36 com 32, 46  $\mu\text{mol/g}$ , contudo na S2, o BAF 110 que se destacou com 35, 08  $\mu\text{mol/g}$  (Tabela 13). Estudos em folhas de feijoeiro por Sawazaki e colaboradores (1981), mostraram valores de até 11  $\mu\text{mol/g}$  de prolina livre em 15 dias de estresse por frio, já em sementes foram encontrados por Neto (2004) valores medianos equivalentes a 38  $\mu\text{mol/g}$  após 48 horas de choque térmico a  $8^{\circ}\text{C}$ . Em outras espécies esse intervalo de valores é coincidente, em sementes de trigo, por exemplo, encontram-se 48  $\mu\text{mol/g}$  de prolina livre após 10 dias de exposição ao frio (NAIDU, 1991).

Para lipoperoxidação observaram-se 6 classes variadas em ambas as safras, observando-se o maior nível no BAF 81 (782,76 mM) na S1 e BAF 115 (450,94 mM) na S2. Deuner e colaboradores (2011) encontraram valores em torno de 200 mM em genótipos de feijão-miúdo, considerando essa taxa elevada e podendo causar danos irreversíveis, contudo sabe-se que cada espécie tem um comportamento, sobretudo genótipos crioulos que possuem comportamento diferenciado diante de condições de estresse, característica resultante de sua ampla base genética.

A fim de observar a distribuição espacial dos genótipos diante dos caracteres bioquímicos analisados realizou-se técnica multivariada dos componentes principais (PCA) em cada safra. Para a S1, os resultados evidenciaram que os teores de prolina, TBARs, compostos fenólicos e porcentagem de inibição de DPPH se alteram conforme o

grau do estresse oxidativo da semente, sendo que os dois primeiros componentes explicam 82% da variação desses componentes (PC1= 49,50% e PC2= 32, 49%).

Tabela 13: Teor médio de prolina livre ( $\mu\text{mol/g}$ ) e lipoperoxidação (mM) genótipos crioulos contrastantes de feijoeiros (*P.vulgaris*), nas safras 2011/2012 e 2012/2013.

	BAFs	Safrá 2011/12		BAFs	Safrá 2012/13	
		Prolina ( $\mu\text{mol/g}$ )	TBARs (mM)		Prolina ( $\mu\text{mol/g}$ )	TBARs (mM)
Mais Vigorosos	75	28.98 b	352.15 e	110	35.08 a	284. 95 d
	81	25.75 c	782.76 a	112	24.44 c	404. 40 b
	84	26.95 c	405. 41 d	115	25. 41 c	450.94 a
	102	26.28 c	439.18 d	81	31. 20 b	337.54 c
	121	28.66 b	470 26 d	50	13.17 e	231.35 e
	42	28.79 b	645. 66 b	97	10. 53 f	219.76 e
	36	32.46 a	471. 27 d	57	17.58 d	238. 41 e
	50	27.34 c	322. 41 e	42	30. 40 b	289. 48 d
Menos Vigorosos	47	24.88 d	271. 19 f	84	9. 52 f	260. 25 d
	55	12.36 g	276. 04 f	120	7. 50 g	178. 60 f
	108	18.72 f	334. 01 e	36	10.99 f	415. 49 b
	4	19.37 f	246.14 f	7	13.12 e	319. 39 d
	120	13. 60 g	447. 25 d	13	12. 47 e	273.86 d
	97	24.12 d	258.24 f	68	8. 91 f	286.46 d
	44	21.18 e	542.17 c	44	6. 68 g	358. 53 c
	7	21. 17 e	315. 70 e	47	9. 58 f	298. 38 d

### 3.4 Grau de relação entre as variáveis

Conforme os dados revelados pela PCA elaborada em S1, as variáveis teor de prolina e TBARs estão correlacionadas positivamente em PC1+, e as outras estão em PC2+. Esses resultados complementam com os resultados de correlação, uma vez que as variáveis DPPH e compostos fenólicos apresentaram forte correlação positiva ( $R=0,91$ , corrobo-

rando com a hipótese de que os compostos fenólicos possuem alto potencial antioxidante). Para prolina e TBARs encontrou-se uma correlação moderada ( $R=0,37$ ), fato que reafirma estudos iniciados em 1991 por Saradhi & Mohanty, demonstrando que prolina livre pode reduzir o aumento de MDA e conseqüentemente a peroxidação lipídica (Figura 3-B). Além disso, para essas duas variáveis os genótipos classificados como mais vigorosos, apresentam maiores valores, logo menor nível de estresse oxidativo.

Na S2, os dois primeiros componentes explicaram 78% ( $PC1=57,98\%$  e  $PC2= 20\%$ ) das variações causadas pelo estresse oxidativo gerado pelo frio. O comportamento das variáveis modificou em nível de quadrante, visto que as variáveis que representam os compostos fenólicos e DPPH ( $R= 0,78$ ) se encontraram em  $PC1(+)$  e  $PC2(-)$  e teor de prolina e TBARs ( $R= 0,32$ ) em  $PC1(+)$  e  $PC2(+)$ . Vale ressaltar que os genótipos mais vigorosos apresentaram respostas similares, ao teor de prolina e TBARs, ao da S1, mesmo não sendo todos os genótipos coincidentes.

A clusterização por hierarquia permitiu ainda, a separação dos genótipos de feijão diante dos tratamentos trabalhados, recém-colhidas (C) e após o estresse por baixas temperaturas (F). Os grupos foram formados através da similaridade calculada pela distância euclidiana sobre as médias aritméticas (UPGMA). Na S1 formaram-se 4 grupos por similaridade, destacando-se o BAF 81 após o estresse (F), localizado no primeiro grupo e sozinho, o segundo grupo abrange os genótipos, em maioria, mais vigorosos e após o estresse, o terceiro abrange os genótipos no tratamento controle (C) e , por fim , o ultimo grupo com genótipos menos vigorosos de ambos os tratamentos (C e F). Para S2, o cluster demonstrou 6 grupos, sendo que o destaque, novamente foi para BAF 81(F), no primeiro grupo e sozinho, os outros grupos se comportaram com similaridade a S1, sendo que os mais vigorosos se apresentaram nos primeiros grupos. Sobretudo a similaridade entre os tratamentos (C e F) aparecem mais próximas do que na safra anterior, ou seja, no mesmo grupo aparece o mesmo genótipo com ambos os tratamentos.



Figure 10: (A) Análise hierárquica de cluster realizado através das variáveis: compostos fenólicos, atividade antioxidante (DPPH), prolina e lipoperoxidação (TBARs) da safra 2011/12(S1), antes (S) e após o estresse de baixas temperaturas (F) para os 16 genótipos de feijão. Formação de quatro grupos cujas colorações distintas. Análise hierárquica foi obtida pela distância euclidiana (UPGMA). (B) Distribuição fatorial, PC1 e PC2, para todas variáveis analisadas em virtude do estresse oxidativo dos 16 genótipos de feijão.

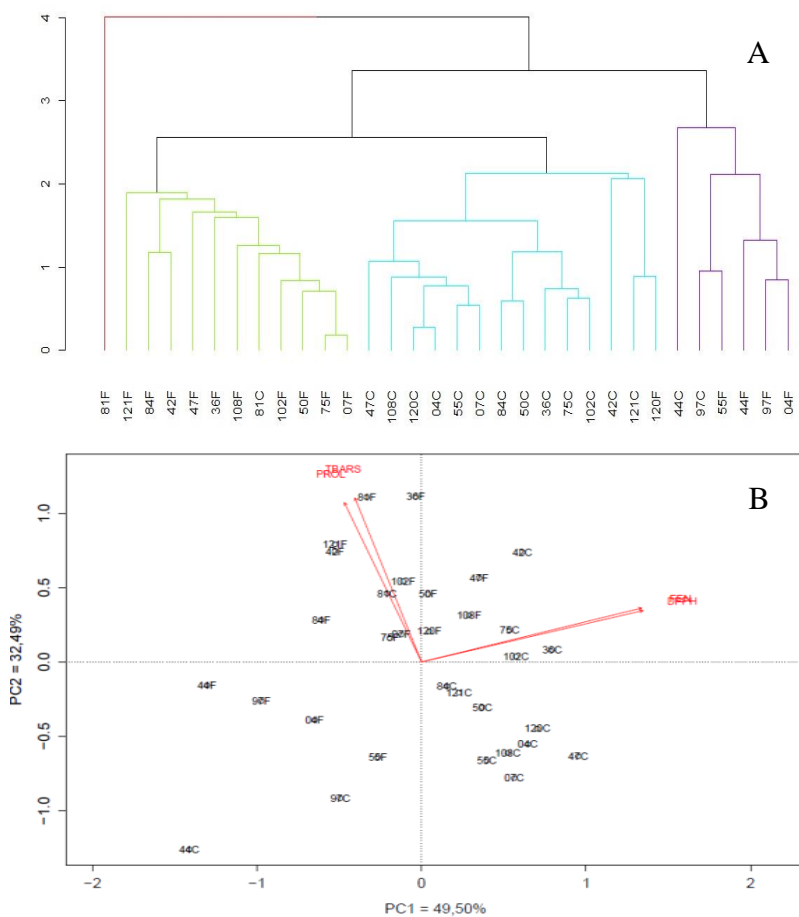
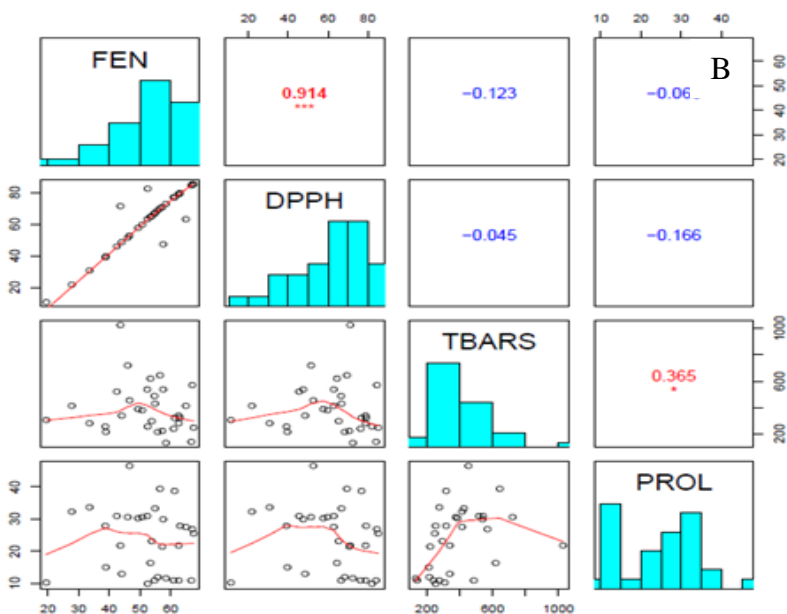
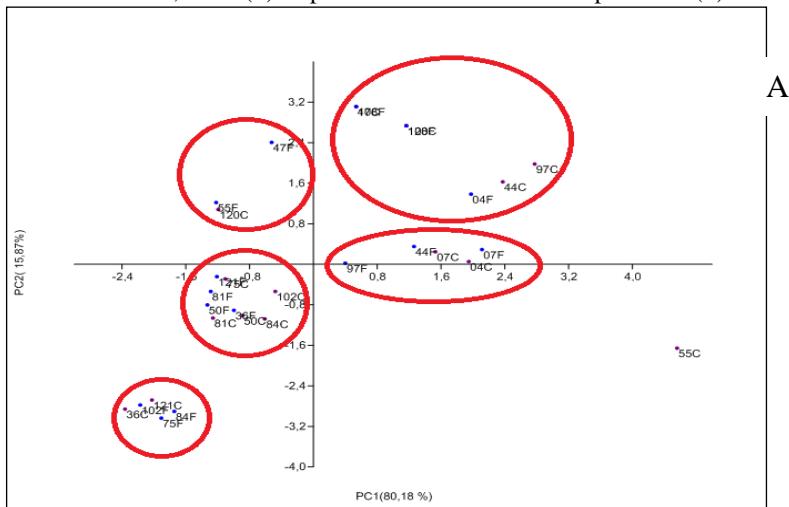


Figure 11: (A) Correlação de Pearson para variáveis avaliadas na S1 em virtude do estresse oxidativo. (B) Distribuição fatorial dos compostos fenólicos (janela espectral de 280 a 340nm) de amostras dos 16 genótipos contrastantes trabalhados na S1, antes (S) e após o estresse de baixas temperaturas (F).



## 4. CONCLUSÃO

Exposição de sementes ao estresse abiótico, como o frio, reflete na modulação de operações bioquímicas das mesmas em defesa de sua sobrevivência. Contudo essas operações, cujo objetivo principal seria superar tais estresses, são complexas e acabam prejudicando o desenvolvimento, crescimento e o vigor das sementes e futuras plântulas. Evidencia-se por isso investigar a indução de cada composto participante da defesa contra processos relacionados ao estresse oxidativo. Radicais tóxicos são produzidos em altas concentrações, as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROS), diante de situações de estresse, e agem diretamente com DNA, proteínas e lipídeos, alterando sua estrutura e conseqüentemente todo o metabolismo da semente. O nível e o tipo de EROS que determinará a resposta da planta e conseqüentemente a taxa dos compostos produzidos.

Compostos não enzimáticos estudados neste trabalho, são antioxidantes que conseguem diminuir o efeito danoso das EROS, de forma a degrada-las sem que sejam formadas outras. Portanto, dependendo da espécie e do tipo de quantidade de EROS produzido nas células, influenciará na quantidade de compostos formados. Esse fato foi observado neste estudo, pois cada genótipo produziu uma determinada quantidade de compostos não enzimáticos em defesa do estresse oxidativo.

De maneira geral, as sementes classificadas como mais vigorosas produziram um teor maior de compostos fenólicos e prolina do que as menos vigorosas, com exceções de alguns genótipos. Já a ação antioxidante, percebeu-se maior nas sementes menos vigorosas, por isso presume-se que outros compostos, como por exemplos enzimáticos, estariam agindo talvez de forma menos atuante já que o grau de deterioração era mais intenso nessas sementes. O grau de peroxidação lipídica não corroborou com o de alguns estudos (QUEZADA & CHERIAN, 2012), pois esperava-se que quanto maior conteúdo de compostos fenólicos, menor grau de peroxidação e não foi esse o observado. Dessa forma novos testes devem ser realizados para melhor entender essa ação em sementes.

Através da análise de componentes principais e clusters, percebeu que o genótipo Preto 70 dias (BAF 81), após o estresse, conseguiu se sobressair apesar do nível alto de peroxidação lipídica, acredita-se que pelo fato da produção mediana de todos compostos estudados possibilitou a ação de defesa mais equilibrada. Notou-se também a diferença de resposta entre safras, sendo que na S1 ficou visível a maior produção de

compostos não enzimáticos diante do estresse, contrapondo o resultado observado na S2, pois essa característica não ficou tão evidente, sendo particular de genótipo por genótipo. Na S2, por exemplo, o genótipo roxinho (BAF 120), foi mais sensível o frio, por isso supõe-se que seu grau de oxidação foi rápido e a semente não conseguiu produzir quantidade efetiva de compostos para sua defesa. Diferente do resultado da S1, o mesmo genótipo, diante do estresse, produziu grandes conteúdos de compostos antioxidantes, porém não favoreceu que a semente crescesse com alto vigor.

Diante desses resultados, percebeu-se que a condição climática durante a maturação das sementes afetou seu comportamento após sua maturidade fisiológica. Durante esse período é elementar que as condições sejam equilibradas em função da espécie trabalhada, pois ocorre a deposição de reservas e compostos responsável pela sua sobrevivência. Alguns genótipos coincidiram desempenhar a mesma classificação de vigor em S1 e em S2, fator que representou melhor visualização do efeito de safra sobre o desempenho das sementes. Percebe-se assim, resultados distintos após o estresse de frio diante das intempéries climáticas ocorridas durante da formação da semente.

## **AGRADECIMENTOS**

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) Ee ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal pela disponibilização do uso dos equipamentos e a Universidade Federal do Estado de Santa Catarina (UDESC) pelo apoio técnico na produção das sementes junto a Epagri-Campos Novos. Ao CNPQ/MDA, edital 58 Ao CNPq pelo apoio financeiro, através do edital 58, processo n° 563920/2010-6. E a Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – FAPESC, Termo de Outorga n°: 10.043/2012-9, processo 1877/2012, pelo suporte financeiro. E a bolsa de produtividade do segundo autor, correspondente, PQ2-CNPQ.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO, S.M.E. 2010. Caracterização físico-química e atividade antioxidante de novas variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). (Dissertação de Mestrado) Escola Superior Agrária de Bragança, São Paulo, Brasil.
- ALI,Q. et al. 2013. Ameliorating Effects of Exogenously Applied Proline on Seed Composition, Seed Oil Quality and Oil Antioxidant Activity of Maize (*Zea mays* L.) under Drought Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. (14), 818-835.
- ALMEIDA, M.L. Origem e Evolução de *Phaseolus*. Evolução de plantas cultivadas. Caderno Didático. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1995.
- BADEA, C., & BASU, S. K. 2009. The effect of low temperature on metabolism of membrane lipids in plants and associated gene expression. *Plant Omics Journal*, 2(2), 78-84.
- BATES, L. S.et al.1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.
- BISOGNIN, D. A. et al. 1997. Desempenho de cultivares de feijão em semeadura tardia no planalto catarinense; Performance of bean cultivars on later sowing in the santa catarina plateau. *Ciênc. rural*, 27(2), 193-199.
- BRASIL. 2003. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Lei Nº 10831, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2003. Publicado no Diário Oficial da União de 24/12/2003, Seção 1, Página 8. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- BRASIL. 2007. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Decreto Nº 6.323, DE 27 DE DEZEMBRO DE 2007. Publicado no Diário Oficial da União, Brasília, 28 de dezembro de 2007. Seção 1, Páginas 2 a 8.
- BRASIL. 2008. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 64 de 18/12/2008. Aprova

o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. Publicado no Diário Oficial de União, Brasília, 19 de dezembro de 2008. Seção 1, p. 21.

BRASIL. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS. 399 p.

CARNEIRO, H. S. 2005. Comida e sociedade: significados sociais na história da alimentação. *História Questões & Debates*, 42.

CHINNUSAMY, V., ZHU, J., & ZHU, J. K. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in plant science*, 12(10), 444-451.

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*, v. 32, n. 3, p. 491-499, 2010.

CONAB. 2012. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos segundo levantamento. Brasília: CONAB.

CONAB. 2013. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. – v. 1, n.2. Brasília : CONAB.

CORRALES, M. A. P., & VAN SCHOONHOVEN, A. (Eds.). 1987. Standard system for the evaluation of bean germplasm. *Ciat.* <<http://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=e7144M7teYcC&oi=fnd&pg=PA5&dq=Standard+system+for+the+evaluation+of+bean+germplasm&ots=gVkWererNZ&sig=ZXP9nNtzswzGdPP0XGUzOTZW8#v=onepage&q=Standard%20system%20for%20the%20evaluation%20of%20bean%20germplasm&f=false>>.

DERAL. Departamento de Economia Rural. 2013. Feijão - Análise da Conjuntura Agropecuária. <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/feijao\\_2013\\_14.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/feijao_2013_14.pdf)>.

- DEUNER, C. et al. 2011. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. *Revista Brasileira de Sementes*, 33(4).
- EPAGRI/CEPA. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – Epagri Centro de Socioeconômica e Planejamento Agrícola. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina, 2009-2010. Periódico. Florianópolis, SC. 315p.
- FERREIRA, I. C., & ABREU, R. 2007. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, Ano IV, N.º 2 .
- FREITAS, F.O. 2006. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. *Pesq. agropecuária brasileira*, Brasília, v.41, n.7, p.1199-1203.
- GILL, S. S., & TUTEJA, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- GRAHAM, P. H., & RANALLI, P. 1997. Common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Field Crops Research*, 53(1), 131-146.
- GUERRA et al. 1998. A Diversidade dos recursos genéticos vegetais e a nova pesquisa agrícola. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.28, n.3,p.521-528.
- HAIKO ENOK SAWAZAKI, J. P. F., & TEIXEIRA, L. D. (1981). Variação do teor de prolina em folhas de feijão em função da disponibilidade de água no solo. *Bragantia*, 40(1).
- HEATH, R. L., & PACKER, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.
- HUANG, D. J. et al. 2004. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] LamTainong 57') constituents. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45.
- ICEPA. 2011. Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina.  
<[http://cepa.epagri.sc.gov.br/Informativos\\_agropecuarios/Alho/alho\\_03.03.2011.htm?option=com\\_content&view=article&id=1215:agropecuaria](http://cepa.epagri.sc.gov.br/Informativos_agropecuarios/Alho/alho_03.03.2011.htm?option=com_content&view=article&id=1215:agropecuaria)

-catarinense-tem-cenario-positivo-para-2010&catid=34:noticias-epagri&Itemid=51>.

ISHITANI, M., Xiong, L., STEVENSON, B., & ZHU, J. K. 1997. Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *The Plant Cell Online*, 9(11), 1935-1949.

KASCHUK, G. et al. 2006. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. *Soil and Tillage Research*, Volume 87, Issue 2, June 2006, Pages 205-217.

KHAN, A. A., Ilyas, S., & PTASZNIK, W. 1995. Integrating low water potential seed hydration with other treatments to improve cold tolerance. *Annals of botany*, 75(1), 13-19.

KOOISTRA, E. 1971. Germinability of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) at low temperatures. *Euphytica*, 20(2), 208-213.

LAZCANO-FERRAT, I.; LOVATT, C. J. Relationship between relative water content, nitrogen pools, and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray during water deficit. *Crop Science*, Madison, v. 39, p. 467-475, 1999.

LEI, Y.-B.; SONG, S.-Q.; FU, J.-R. 2005. Possible involvement of anti oxidant enzymes in the cross tolerance of the germination/growth of wheat seeds to salinity and heat stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 47.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 1-11, 2001.

LLORACH, R. et al. 2008. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry*, 108(3), 1028-1038.

LÓPEZ-AMORÓS, M. L. et al. 2006. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4), 277-283.



- MAHAJAN, S., & TUTEJA, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>>.
- MIGUEL, M. H., & CICERO, S. M. 1999. Teste de frio na avaliação do vigor de sementes de feijão. *Scientia Agricola*, 56(4), 1233-1243.
- MITTLE, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends. Plant Science*, v. 7, n. 9, p. 405-410. n. 10, p. 1211-1219.
- NAIDU, B. P. et al. 1991. Amino acid and glycine betaine accumulation in cold-stressed wheat seedlings. *Phytochemistry*, 30(2), 407-409.
- NETO, N. B. M. et al. 2004. Proline: use as an indicator of temperature stress in bean seeds. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4, 330-337.
- NEVES, L. C. et al. 2009. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. VII BMCFB, 107-10.
- OTUBO, S. T. et al. 1996 "Genetic control of low temperature tolerance in germination of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)." *Euphytica* 89.3: 313-317.
- PALMA, J. M. et al. 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6), 521-530.
- PIEIDADE et al. 2011. Compostos fenólicos: capacidade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e biofortificado. IV Reunião de Biofortificação. Terezinha; Piauí.
- POLLOCK, B. M. 1969. Imbibition temperature sensitivity of lima bean seeds controlled by initial seed moisture. *Plant Physiology*, 44(6), 907-911.

POLLOCK, B. M., & TOOLE, V. K. 1966. Imbibition period as the critical temperature sensitive stage in germination of lima bean seeds. *Plant physiology*, 41(2), 221-229.

PRASAD, T.K.; ANDERSON, M.D.; MARTIN, B.A.; STEWART, C.R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, v. 6, p. 65-74, 1994.

QUEZADA, N.; CHERIAN, G. 2012. Lipid characterization and antioxidant status of the seeds and meals of *Camelina sativa* and flax. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(8), 974-982.

RAI, V. K. 2002. Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum*, 45(4), 481-487.

RHOADS, D.M.; UMBACH, A.L.; SUBBAIAH, C.C.; SIEDOW, J.N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol.*, v. 141, p. 357-366, 2006.

RUELLAND, E., & ZACHOWSKI, A. 2010. How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*, 69(3), 225-232.

RUMBAOA, R. G. O., CORNAGO, D. F., GERONIMO, I. M. 2009. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 22, p. 546-550.

SARADHI, A.P; & MOHANTY, P. 1991. Proline enhances primary photochemical activities in isolated thylakoid membranes of *Brassica juncea* by arresting photoinhibitory damage. *Biochem Biophys Res Commun* 181:1238-1244

SILVA, A.G.; ROCHA, L.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus Vulgaris L.*). *Alim. Nutr.*, Araraquara v.20, n.4, p. 591-598, out./dez. 2009. ISSN 0103-4235.

SOARES, A. M., & MACHADO, O. L. T. 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*, 1(1), 10.

SOUZA, T. C. Parâmetros fisiológicos em milho safrinha. XII Seminário Nacional. Milho Safrinha. EMBRAPA, Dourados, MS.

TOMMASI, F. et al. 2006. Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(5), 359-368.

YOUDIM, K. A. et al. 2000. Incorporation of elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* 2000, 29,51-60.

ZILIO, M. 2010. Potencial de uso de genótipos crioulos de feijão no Oeste e Planalto Sul Catarinense quanto ao desempenho agrônomo, qualidade tecnológica e nutricional dos grãos. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual de Santa Catarina, Lages.

ZOBAYED, S. M. A. et al. 2005. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in *St. John's wort*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(10), 977-984.



## **CAPÍTULO IV: Changes in amino acid profile under cold stress in landraces seed beans (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin layer chromatograph (TLC) and Fourier Transform infrared spectroscopy (FT-IR).**

### **Changes in amino acid profile under cold stress in landraces seed beans (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin layer chromatograph (TLC) and Fourier Transform infrared spectroscopy (FT-IR).**

Monique dos Santos<sup>1</sup>, Cileide M.M. Coelho Arruda de Souza<sup>2\*</sup>, Marcelo Maraschin<sup>2\*\*</sup>.

<sup>1</sup>Graduate Program in Plant Genetic Resources, Seed Laboratory, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga, Km 3, Florianópolis, SC, 88034-001, Brazil.

<sup>2</sup>Prof<sup>a</sup>.Dra.Adjunto1 UDESC/ Lages, SC, Centro de Ciências Agroveterinárias,;Profa/Orientadora do PPG Recursos Genéticos Vegetais, UFSC, Florianópolis, Brasil.

<sup>2</sup>Prof<sup>o</sup>.Dr.Associado I da Universidade Federal de Santa Catarina,SC. Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, UFSC. 1346, Rodovia Admar Gonzaga, 476, 88034-000, Florianópolis-SC

\*Corresponding author: e-mail: cileidecoelho@yahoo.com.br; cileide.coelho@pq.cnpq.br, tel: +55 49 2101 9172.

(Artigo a ser submetido à revista Amino Acid)

**ABSTRACT:** Believed that quantitative and qualitative changes in amino acid profile can be associated with difference tolerance to low temperature. The amino acids can play role in seed and plants including acting as regulatory and signalling molecules, like enzymes, gene expression and redox-homeostasis. Thus, the objective of this study was to observe the oscillation of the free amino acids, carbohydrates and lipids profile in landraces bean seeds on cold stress. This study aimed to examine the variations in profile of amino acids and primary/secondary metabolic compounds in common bean genotypes, rated as vigorous and less vigorous (contrasting) by standard testing of seeds germination before (C) and after cold stress (F). The seeds used in this work were collected from organic culture in two consecutive crops years, 2011/12 (S1) and 2012/13 (S2). The biochemical profile of the genotypes under study was determined by techniques of Thin Layer Chromatographic (TLC) and Fourier Transform mid infrared spectroscopy (FT-IR). In synthesis, amino acids appear non-uniform nor for S1,S2 or after cold stress, in

accordance to characteristics of each genotype and their ability to tolerate low temperatures stress. Therefore, each amino acid behaves differently according environmental conditions and the profile of lipids and carbohydrates were also modified after cold stress.

## 1. INTRODUCTION

The genus *Phaseolus* has around 200 species, which *P. vulgaris* (Fabaceae) is one of the four more cultivated species. Beans are one of the most consumed foods in the world, since they are composed of a range of proteins, vitamins and minerals beneficial to human health (VENORA, 2009). The annual production of beans exceeds 21 million tonnes, accounting for half of the world's production of legumes (MIKLAS, 2006). The production of beans is mainly characterized by small farmers in developing countries (BIROL, 2007; MIKLAS, 2006). The seeds used by farmers usually come from local varieties known as landraces. Landraces have characteristics that adapt to local conditions in the face of climatic oscillations, such as the occurrence of phenotypic adaptation via human selection leading to a broad base of these varieties (VIGOUROUX, 2011; BELLON, 2011; CAMACHO, 2005).

The cold stress is a major cause of decline in productivity and quality of many crops in the temperate zone. Crops of socio-economic importance, such as beans (*P. vulgaris*), are sensitive to this type of cooling and unable to survive in very cold temperatures (THAKUR, 2010). This environmental phenomenon may affect growth and development of the crop negatively compromising seed germination, vigor and quality of quality of the bean (WANG, 2012; MARINI, 2012). Low temperatures cause alteration in physical and biochemical restructuring of the cell, and induction of non-enzymatic proteins alter the freezing point of water. This mechanism adds the extracellular solutes to try to prevent the formation of ice. Accumulation of sugars reflects the destabilization of the membrane and the entire biochemical and physical organization of the seed (MAHAJAN & TUTEJA, 2005).

Water is an essential element for seed respiration, whose function favors biochemical and physiological processes. These processes are influenced by the structure and function of proteins, amino acids, and other cellular components that are essential for seedling development (TAIZ ZEIGER, 2004). Low non-freezing temperatures affect the distribution of water in seeds, resulting in its redistribution, since the extra cellular components suffer changes and cells lose water through osmo-

sis. These represents numerous changes in gene expression, an increase in the concentration of abscisic acid, changes in lipid membrane composition, changes in free amino acid and soluble sugars concentrations (DANQUAH, 2014; GRIMAUD, 2013; BROWSE, 2001; GUY, 1990).

Amino acids (AA) are defined as organic substances containing both amino and acid groups (WU, 2009). The AA are essential for cell survival, in addition to protein synthesis, they are active in primary and secondary metabolic processes in plant development and response to stress (TEGEDER, 2012; HUANG, 2012; GALILI, 2008). Some amino acids, such as methionine, proline, tryptophan, and arginine contribute to the tolerance against stresses acting in the formation of secondary products and hormones. Others amino acids like glutamine, asparagine, and glutamate support by balancing the carbon/nitrogen ratio (GALILI, 2008). However, the function and the quantity of amino acids produced during stress varies according to the species, genotype (ROZAN, 2001), duration, and intensity of stress.

In this study, thin-layer chromatography (TLC) was used for analysis and observation of free amino acids found in the seed extracts. The TLC technique has numerous applications, in agriculture it can be used to detect classes of amino acids, lipids, sugars, vitamins, and contaminants from various sources, for example, microorganisms or pesticides (SHERMA, 2000). There are many advantages when using the technique of TLC, for example, amino acids can be easily visualized through staining with dyes that bind specifically to characteristic functional groups, besides being a simple and inexpensive technique (FUCHS, 2011).

Studies in seeds can be improved by using more sensitive and rapid techniques for the metabolite detection, such as mid-infrared vibrational spectroscopy with Fourier transform (FTIR). This technique generates results that allow the qualitative/quantitative understanding of metabolite dynamics in maintaining the viability and longevity of seeds (GARCIA, 2012; KUHNEN ET AL. 2010).

The aim of the present study was investigate the oscillation of free amino acids and characterize the presence of primary and secondary metabolic compounds (starch, proteins, lipids and phenols) found in different genotypes of beans seeds when subjected to low non-freezing temperatures.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Collection of dry common bean seeds

Samples of common bean seeds from 2011/12 and 2012/13 organic crops were produced in agree with Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). The genotypes were cultivated in Campos Novos, SC, as specified in law nº 10.831/2003, decree nº 6.323 of 2007 and Normative Instructions nº. 64/2008 and 18 and 19/2009 to organic cultivate.

Twenty-two landrace or common genotypes (BAF 03, BAF 04, BAF 07, BAF 013, BAF 023, BAF 036, BAF 042, BAF 044, BAF 046, BAF 047, BAF 050, BAF 055, BAF 057, BAF 060, BAF 068, BAF 075, BAF 81, BAF 84, BAF 97, BAF 102, BAF 108, BAF 120) and four commercial genotypes (BAF 112 [IPR-88-Uirapurú], BAF 115 [BRS-Valente], BAF 121 [Iapar 81] and BAF 110 [Epagri]) (Table' 1: Identification, origin and common name of landrace and commercial bean genotypes from the Active Germplasm Bank of Beans, CAV-UDESC, Santa Catarina, Brazil.) were studied. Such genotypes belong to the Banco Ativo de Germoplasma de Feijão (BAF) (Active Germplasm Bank of Beans), located at the Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) (Center of Agricultural and Veterinary Sciences) of the State University of Santa Catarina (UDESC- Lages, Planalto Sul de Santa Catarina).

Table' 1: Identification, origin and common name of landrace and commercial bean genotypes from the Active Germplasm Bank of Beans, CAV-UDESC, Santa Catarina, Brazil.

*BAF	Origin of samples	Common name	Commercial group	Seed
102	Goiânia CNPAF (GO)	México 309	black	Landrace
112	IAPAR (PR)	IPR-88-Uirapurú	black	Commercial
115	EMBRAPA (GO)	BRS-Valente	black	Commercial
120	Lages (SC)	Roxinho	colors	Landrace
121	IAPAR (PR)	Iapar 81	<i>carioca</i>	Commercial
3	Palmitos (SC)	Manchinha	colors	Landrace
4	Lages (SC)	Amendoim Lages	colors	Landrace



*BAF	Origin of samples	Common name	Commercial group	Seed
13	Caxambú do Sul (SC)	Taquara	black	Landrace
23	Chapecó (SC)	Preto Chapecó	black	Landrace
108	Recife (PE)	Branco	colors	Landrace
36	São José do Cer- rito (SC)	Rasga	black	Landrace
60	Lebon Regis (SC)	Mouro	black	Landrace
42	Capão Alto (SC)	Feijão Vagem Branca	black	Landrace
44	Capão Alto (SC)	Vermelho	colors	Landrace
46	Lages (SC)	(no name)	black	Landrace
47	Piratuba (SC)	Preto precoce	black	Landrace
50	Lebon Régis (SC)	Carioca Bri- lhante	<i>carioca</i>	Landrace
55	Cunha Porã (SC)	Preto	black	Landrace
57	Cunha Porã (SC)	Preto	black	Landrace
68	Lagoa Vermelha (RS)	Vermelho	colors	Landrace
75	Formigueiro (RS)	Serrano	black	Landrace
81	Lebon Régis (SC)	Preto 70 dias	black	Landrace
84	Pinheiro Macha- do (RS)	Carioca rosado	colors	Landrace
97	Iraí (RS)	Charque	black	Landrace
110	Epagri (SC)	Guará	<i>carioca</i>	Commercial

\*BAF =number of the sample at the germplasm bank of CAV-UDESC, Santa Catarina, Brazil.

BAFs: 110= Guará; 112= Uirapurú; 115= Valente; 121= Iapar 81 (commercial genotypes)

## 2.2 Selection of the analyzed material

In order to assess vigor after cold stress, a cold test was performed with 26 beans cultivars, according to Miguel & Cicero (1999),

with adaptations. Two hundred seeds were used, distributed in four replicates of 50 seeds, which were spread on paper towel moistened with distilled water at a ratio of 2.5 times the value of the dried weight of the paper. The rolled sheets were enclosed in plastic bags sealed with adhesive tape and kept in a germination chamber (B.O.D type) at 7°C for seven days. After this period, germination was assessed (Brasil, 2009). The material was removed from the plastic bags and maintained in the germinator for nine days at 25°C. Only normal seedlings were counted at the fourth and ninth day, according to Brasil (2009). Finally, after analysis of the rate of germination after the cold test, 16 contrasting genotypes were selected, i.e., the 8 most vigorous genotypes (the highest rate of germination) and the eight least vigorous genotypes (the lowest rate of germination) for the crops under study (

Table' 2), which were used in the following biochemical analysis.

Table' 2: Identification, commercial group and germination rate of contrasting bean genotypes after cold test.

2011/12 CROP			2012/13 CROP		
BAF	G (%)	Commercial group	BAF	G (%)	Commercial group
Most vigorous seeds after cold test					
75	98	black	110	95	<i>carioca</i>
81	95	black	112	92	black
84	91	colors	115	88	black
102	86	black	81	88	black
121	84	<i>carioca</i>	50	85	<i>carioca</i>
42	83	black	97	84	black
36	83	black	57	83	black
50	81	<i>carioca</i>	42	83	black
Least vigorous seeds after cold test					
55	69	black	84	71	colors

47	69	black	120	70	colors
108	66	colors	36	69	black
4	66	colors	7	69	black
120	65	colors	13	68	black
97	64	black	68	64	colors
44	62	colors	44	64	colors
7	55	black	47	62	black

### 2.3 Seeds Extratcts

The seeds were ground in a coffee mil (Cadence MDR 301), with the help of liquid nitrogen, and the particle size of the ground matter was standardized as 60 mesh. Subsequently, the material was transferred to an air circulation oven at 40°C for four hours.

### 2.4 Thin-layer Chromatography (TLC)

The seeds were ground in a coffee mil (Cadence MDR 301), with the help of liquid nitrogen, and the particle size of the ground matter was standardized as 60 mesh. Subsequently, the material was transferred to an air circulation oven at 40°C for four hours.

#### 2.4.1 Standard

Standard stock solution was prepared in 0,1% HCL mixed 0,01g of amiino acids standard (Sigma) (10000 ppm). Working solution (100 ppm) was prepared by diluting stock solution in 0,1 % HCL, and all amino acid standards were stored at - 80 ° C. All the amino acids were pipetted in concentration of 20 µl in silica plate. The ratio of the distance moved by the amino acids to the distance moved by the solvente front the original spot on the paper was defined as the retention fator (Rf), on characteristic value for each amino acid (Table' 3).

Table' 3: Twenty standard amino acids worked, abbreviation, type, density, retention factor (Rf) and staining observed silica plate.

Amino acid	Abb	Color	Type	Rf	Density (2 µl)
Alanine	Ala	pink	Essencial	0,57	5,47 10 <sup>-7</sup>

Amino acid	Abb	Color	Type*	Rf	Density (2 $\mu$ l)
Asparigine	Asp	yellow	Non essencial	0,44	1,27 $10^{-6}$
Aspartic acid	Asp	purple	Nos essencial	0,53	1,14 $10^{-6}$
Cysteine	Cys	pink	Non essencial	0,28	1,26 $10^{-6}$
Glutamic acid	Glu	pink	Non essencial	0,59	1,48 $10^{-6}$
Glutamine	Glu	pink	Non essencial	0,45	1,24 $10^{-9}$
Glycine	Gly	orange	Non essencial	0,5	8,78 $10^{-7}$
Histidina	Hist	orange	Essencial	0,24	1,26 $10^{-6}$
Isoleucine	Ile	pink	Essencial	0,77	1,56 $10^{-6}$
Leucine	Leu	orange	Essencial	0,79	1,38 $10^{-6}$
Lysine	Lys	orange	Non essencial	0,43	1,50 $10^{-9}$
Methionine	Met	wine	Essencial	0,7	1,49 $10^{-9}$
Phenylalanine	Phe	yellow	Essencial	0,76	1,49 $10^{-6}$
Proline	Pro	yellow	Non essencial	0,41	9,43 $10^{-7}$
Serine	Ser	orange	Non essencial	0,53	8,29 $10^{-7}$
Threonine	Thr	orange	Essencial	0,57	8,34 $10^{-7}$
Tryptophan	Trp	yellow	Essencial	0,61	1,46 $10^{-6}$
Tyrosine	Tyr	orange	Non essencial	0,76	1,58 $10^{-6}$
Valine	Val	lilac	Essencial	0,69	6,37 $10^{-7}$

\* Classification according for humans requirements.

### 2.4.1 Sample

Brushan's (2008) methodology was followed, with some alterations. The seed extracts were macerated in a solution of 0.1N HCL in 95% ethanol, and were left for 30 minutes to rest under lights. The su-

pernatant was recovered and concentrated in a 63°C (80 rpm) water bath.

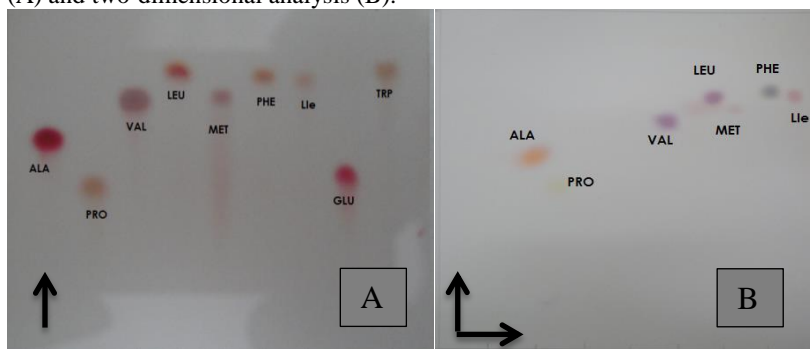
### 2.4.2 Preparation of plates and composition immersion reagent

The plates (Silica gel G, Merck) were cut into segments of 10 cm x 10 cm. They were placed in an incubator drying at 110°C for 20 minutes for activation. The plates were placed into glass bowls and adsorbed solvent at a distance of 1 cm from the top of the plate.

To perform one-dimensional TLC, plates were eluted in a solvent of butanol, glacial acetic acid and water (4:3:1). After eluent adsorption, the plate was removed and placed in an oven at 45° C for 5 minutes in order to develop in ninhydrin acid (0.3 g ninhydrin in n-butanol [100ml] acetic acid containing [3 ml]). The ninhydrin acid reacts with the amino acids to form colored products. To perform two-dimensional TLC, plates were eluted in a solvent of chloroform, glacial acetic acid and benzoic acid (1:1:1) (Brushan, 2008; Baron, 1963) (Figure' 1).

The bi-dimensional analyzes in this study were performed in order to visualize the existence of overlapping amino acids (Figure 1-B). However, some samples were tested and there was no overlap of these compounds, thus these results are not explained

Figure' 1: Signs patterns of amino acids obtained through the one-dimensional (A) and two-dimensional analysis (B).



### 2.4.3 Statistical Analysis

The quantitative analysis of the amino acids is by treatment of the image obtained from the photograph of the TLC plate using the Image J software (ImageJ 1.46r/ Java 1.6.0\_20[64 bits], Rasband, W.). The

software converts the initial colorimetric color photograph of a gray scale according to the intensity. By means of this scale yielded values of optical density measured in each section and values of the lines where the data was obtained graph for multivariate analysis of principal components (PCA).

## **2.5 Fourier Transform mid infrared spectroscopy (FTIR)**

Samples (dry weight) were analyzed by infrared spectrometer, Bruker IFS 55 model, equipped with a single reflection ATR (Golden Gate) system in potassium bromide matrix. 128 scans/sample were collected in the spectral window of 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ , with resolution of 4 waves  $\text{cm}^{-1}$ . The spectra were normalized and optimized of signal / noise (smoothing) and baseline corrected in the region of interest (3000 to 600  $\text{cm}^{-1}$ ), and processed with the aid of the OPUS software (Bruker Biospin, version 5.0). Analyses were performed in triplicate. The data set was processed spectra subjected to multivariate statistical analysis, by applying the methods of principal components (PCAs).

## **3. Results and Discussion**

### **3.1 Thin layer chromatography (TLC)**

#### **3.1.1 Quantitative and Qualitative Analysis**

Using thin layer chromatography the free amino acid profile of bean seed samples was analyzed, both qualitatively and quantitatively. Observing the data from the crop 2011/12 (S1) and crop 2012/13 (S2), there was no regular occurrence of amino acids between analyzed samples, nor for the control treatment (C) or stress treatment (F) (Table' 4 e 5). It is important to high light that some amino acids were not observed, however it does not mean they were not present in the seed, since the concentration may have been a limiting factor in the identification of these amino acids. This characteristic is associated with genotype, its relationship to the environment, and with the cultivation form (RIBEIRO, 2007). Some scientists claim that amino acids are regulators and molecular signals, and may modify their profile at cultivation and other various types of stress (RAI, 2002). However, the profiles organization is still not clear when faced with stress, one known genetic adaptation occurs when stressed with cold temperatures, resulting in the sequence

regulation of amino acids in protein formation, as well as active enzymes (GRAHAM & PATTERSON, 1982).

When observing the most vigorous genotypes compared with less vigorous genotypes in S1, note that just in BAFs 75 and 81 leucine was identified. The band densitometry where this amino acid occurs was 3.42 to 5.01  $10^{-5}$  pixels (Table' 4). Studies show that leucine is one of the brassinosteroid receptors, whose primary function in the seed is to transduce the signal into plant growth (MACHADO, 2006; RAO, 2002). This factor corroborates with obtained results, since both genotypes were distinguished physiologically, with higher percentages of germination after a cold test. In addition, half of the genotypes classified as vigorous after the cold test were identified the isoleucine, another amino acid identified as a precursor for growth. Presumably the fact that these genotypes present these amino acids before stress, may indicate that they play a role in the high vigor percentage, since one of its functions is the induction of cell division, through the production of nitric oxide aiming at plant growth (AARESTRUP, 2008).

Histidine is also highlighted, since it was identified in most of the vigorous genotypes in S1, however some genotypes classified as non-vigorous also exhibited this amino acid. Densitometric occurrence of histidine ranged from 1.25 to 4.10  $10^{-5}$  pixels. Aspartic acid was observed in both genotypes in all studied treatments (C and F), with a densitometric range from 1.04 to 6.39  $10^{-5}$  pixels (Table' 4). It is known that these amino acids together are present in the structure of phenolic compounds, which are part of a complex class of compounds found mainly in the maturation of seeds (SILVA & SILVA, 1999). Phenolic compounds in cereals and grains usually cause effects in color, flavor and nutritional quality (SILVA & SILVA, 1999), moreover, they are powerful antioxidants that help in the balance of reactive oxygen species (ROS), and are produced in large quantities during germination and in stressful situations. On the other hand, Aspartic acid is a precursor of polyamines and the enzyme glutathione (GSH). These molecules are directly involved in the protection against low temperature stress (KOCSY, 2011). Polyamines participate in cellular processes including gene expression, modulation of signals, stabilization of membranes, organogenesis, embryogenesis, and stress tolerance (GROPPIA, 2008).

Tryptophan was identified in some S1 samples, however not in homogeneous form, occurring more often in the control samples, of the detected genotypes, the density ranged from 2.03 to 7.77  $10^{-5}$  pixels. This aromatic amino acid acts in conjunction with the hormone IAA, whose function is to stimulate the elongation of the radicle (TAIZ &

ZEIGER, 2004; DUTRA, 2002). Another aromatic amino acid, tyrosine, was identified more frequently in the control treatment, where the density ranged from 2.85 to  $5.15 \cdot 10^{-5}$  pixels, and appeared more frequently in samples where tryptophan was not identified (Table' 4). This is due to the similarity of functions since these amino acids produce and/or act together with numerous secondary metabolites, such as anthocyanin, alkaloids, IAA hormones, and phytoalexins. When the radicle is elongated, the embryo becomes more exposed to the external environment, requiring production of compounds that assist in the protection of potential stresses (injuries, pathogens, climate, etc.) (KOVALEVA, 2013).

Methionine was seen more frequently in less vigorous genotypes in both treatments in S1, and had a densitometric range of 1.82 to  $8.83 \cdot 10^{-5}$  pixels (Table' 4). It is believed that oxidative stress caused this, since the hydrophobic amino acid serves as the primary precursor of polyamines and ethylene (HANAFY, 2013). Ethylene, during germination can act as growth regulator together with abscisic acid, for example, optimizing the synthesis of hydrolytic enzymes (amylases), responsible for the degradation of starch chains, providing power to the embryo during germination process (POMPELLI 2006 , TAIZ & ZEIGER, 2004; NASCIMENTO, 2000).

Alanine was identified only in the most vigorous genotypes in S1, and mostly in the control treatment, and had a density ranging from 2.35 to  $32 \cdot 10^{-5}$  pixels (Table' 4). Alanine in some species is a sign that the environment is favorable for seed germination, releasing a signal that peptidoglycan can be degraded and thus water uptake is facilitated to give sequence to the germination process (BROOKS, 2005). Proline was identified in most genotypes, in particular in the less vigorous, and had a densitometric range from 1.98 to  $8.06 \cdot 10^{-5}$  pixels. The function of this amino acid is already widely divulged and well studied, especially in regards to biotic and abiotic stress, and participates especially in the stabilization of proteins, membranes and subcellular structures, and the removal reactive oxygen species (GORDIN. 2012).

Valine was identified in a few samples in S1 with a densitometric range of 2.72 to  $8.18 \cdot 10^{-5}$  pixels. Some authors believe that their function is similar and adds to methionine, principally in regards to the action of the enzyme aspartate kinase (AK) in regulating calcium and calmodulin, depending on the species (LUGLI, 2000). Serine was also identified irregularly in a few genotypes with a range of 2.20 to  $2.85 \cdot 10^{-5}$  pixels (Table' 4 ). Its function in the seeds is mobilization of reserves during germination (PRAXEDES-GARCIA, 2012).



According to Ribeiro (2007), the levels of leucine, as well as isoleucine, histidine, valine, glycine and alanine are actually affected by the environment that the seed is implanted.

In S2, leucine was identified only in some of the most vigorous genotypes in both treatments (C and F), with a density range from  $1.55$  to  $2.14 \cdot 10^{-5}$  pixels. Whereas isoleucine was identified only in some less vigorous genotypes, however irregularly, with a density range from  $1.61$  to  $1.95 \cdot 10^{-5}$  pixels. As in S1, in S2 alanine was identified only in some more vigorous genotypes with a density range from  $1.59$  to  $2.00$ . Glycine, a hydrophobic amino acid, was identified in S2, different from S1, however just in a few more vigorous genotypes and after cold stress treatment, with a density range from  $1.71$  to  $2.00 \cdot 10^{-5}$  pixels. Researchers say that the expression of this amino acid is controlled by biotic and abiotic factors, such as stress caused by pathogenic organisms infection (ZOTTICH 2013). Arginine was identified only in the most vigorous genotypes in S2, with a spectral range of  $1.36$  to  $2 \cdot 10^{-5}$  pixels (Table 5).

Proline was identified in samples irregularly, however the frequency was higher in less vigorous genotypes, and the density range was from  $1.04$  to  $1.87 \cdot 10^{-5}$  pixels. Whereas aspartic acid was identified in all genotypes and both treatments (C and F), with a density range from  $1.04$  to  $1.80$  pixels  $10^{-5}$ .

In short, in S1, the free amino acids were not identified: arginine, phenylalanine, lysine, glutamic acid, alanine, glycine, asparagine, cysteine (Table 4). In S2, the following amino acids were not identified: phenylalanine, tyrosine, valine, tryptophan, lysine, histidine, cysteine, glutamine and asparagine (Table 5). In general, amino acids appear non-homogeneous, in accordance to characteristics of each genotype and their ability to tolerate low temperatures stress.

### 3.1.2 Analysis of Principal Components and Clusters

The principal component analysis applied to the data matrix obtained by gray scale according to amino acid intensity showed that the first two components explain approximately 90% of the data variation in S1 (PC1=81.34% and PC2= 8.64%), forming six groups. The corresponding genotypes for BAFs 04F, 07C and 07F are positively correlated with PC1 (+) and PC2 (+) forming the first group. In the second group are the BAFs 121F, 121C, 36F, 36C, 42F, 42C, which correlated to PC1 (-) and PC2 (+). In contrast the BAFs 44F, 44C are found in the third group, which correlated to PC1 (-) and PC2 (-). The fourth group was grouped corresponding to the BAF 47F, 47C, 84F, 84C, 102F, 81F,

81C, 97F, 97C, BAFs 04C, 55F, 120C, 120F, 50F, and are positively correlated with PC1 (+) and negatively correlated with PC2 (-), and the last group which included the BAFs 50C and 102F, correlated with PC1 (+) and PC2 (-). In general, the genotypes that were found grouped together are of the same level of vigor, i.e., the most vigorous genotypes were grouped and less vigorous were grouped together, with some exceptions. Moreover, it was observed that the amino acid profiles were modified, but not to the extent that they are not linked within the same group, with the exception of the BAFs 04, 55, 102 and 50, which were the most changed profiles after stress (Figure 2).

In S2, there is considerably less uniformity of amino acids when compared to S1. The first two components explain approximately 70% of the data variation (PC1= 54.13% and PC2= 14.85%). Five groups were formed, of which the first is positively correlated to PC1 (+) and PC2 (+), with the BAFs 115F, 36F, 36C, 13C and 120F. The second group correlates with PC1 (-) and PC2 (+), with the BAFs 112F, 112C, 07F, 07C, 97C, 13F. Group three, presents the BAFs 44F, 44C, 42C, 57F, 57C, 97F, 110F, 68C, 50C, 47F and are correlated negatively with the two components. Group four presents the BAFs 68F, 47C, 81F, 50F and is positively and negatively correlated to PC1 and PC2. Lastly group five includes BAFs 84F, 81C, 84C and 120C, which are correlated with PC1 (+) and PC2 (-). Within S2 a large number of genotypes changed their profile more significantly after exposed to cold stress, and they were the BAFs 115, 120, 97, 13, 42, 68, 50, 47 and 81.

The modification of crops from one to another can be explained by climatic variations. Differences were observed in rainfall when comparing S1 (327 mm) to S2 (105 mm) during the period of flowering until seed maturation, with greater rainfall occurring in S1. This characteristic may have led to alterations in genotypes amino acid profile during this period, and when they stressed with low temperatures, the seed was already characterized to overcome other stress. Whereas in S2, since there was no stress during the ripening season and harvest, the seeds did not change their amino acid profile before the low temperature stress.

The principal components analysis data using the matrices of amino acids, allowed for an acceptable separation of amino acid bean genotype profiles. Similarities were defined based on the correlation coefficient between samples using a clustering method to nearest neighbor. Genotypes with the highest similarity in amino acid profiles are represented by hierarchical cluster analysis. The cophenetic correlation (similarity between genotypes members of the same cluster) in S1 was 98% (Figure 3 -A), and S2 was 70% (Figure 3-B).

### 3.2 Fourier Transform mid infrared spectroscopy (FT-IR)

After the physiological observation of 26 bean seed genotypes after cold stress in both seasons (S1 and S2), the BAFs 81, 50 and 42 showed high percentage of germination being classified with high level of vigor. In contrast, the BAFs 120, 07, 44 and 47 had a low germination percentage in both seasons after stress, therefore being ranked as the least vigorous. Thus, these coincidental genotypes in both crops, were selected for further evaluation by FT-IR technique. Using the analysis of vibrational mid-infrared spectroscopy (FT-IR), we obtained the spectral profile of each sample, a fact that makes it possible to analyze the presence of certain metabolic classes, as well as a range of information on the samples' chemical composition.

An average of 13 peaks were observed in the region between 4000 to 6000 waves  $\text{cm}^{-1}$ , with a low signal intensity in the region 3000 to 2885 waves  $\text{cm}^{-1}$  for the spectra obtained using the whole grain flour. These peaks demonstrate the biochemical response of each sample after low temperature stress ( Figure' 4).

The protein constituents are identified in the range of 1650 to 1550 waves  $\text{cm}^{-1}$  (LAMBERT, 2001; SCHULZ; BARANSKA, 2007). The presence of these protein constituents were observed in bean seed samples at the band 1541  $\text{cm}^{-1}$ . Lipids can be detected in the bands 3000 to 2800 waves  $\text{cm}^{-1}$  (KUHNNEN et al., 2010; BARANSKA, 2007). The presence of fatty acids were observed in the studied samples in the bands 3000 and 2949  $\text{cm}^{-1}$  ( Figure' 4).

Absorbances relating to carbohydrates can be observed in the region between 1200 – 800 waves  $\text{cm}^{-1}$  and is named the fingerprint region of the primary metabolites (Cerná et al., 2003; Kuhnén et al., 2010). Absorption bands between 1076 – 800 waves  $\text{cm}^{-1}$  appeared in all spectra featuring the polymers amylose and amylopectin.

The phenolic compounds can be visualized in bands between 900 – 690 waves  $\text{cm}^{-1}$  (LAMBERT et al., 2001). These compounds were visualized in samples at bands 939 and 906  $\text{cm}^{-1}$ .

As discussed, the results of the samples spectral profiles demonstrate similarities in structures and arrays of high complexity. Thus, in order to maximize the information given by the FT-IR technique, the multivariate statistical tool principal component analysis (PCA) was used.

Using the PCA the 4000-600 waves  $\text{cm}^{-1}$  profile, it was observed that the variation of cold stress can be explained 90% by PC1 (79%) and PC2 (11%). There was a breakdown of samples into five groups. The first group is in the first quadrant (PC1[+] and PC2[+]), which included mostly samples after cold stress (BAF 47, BAF 50 and BAF 07). The second and third quadrant is groups together group two which included control samples of BAFs 47, 07, 50 and 42. The third group ordered genotypes after stress treatment, including the BAFs 81, 42, 120, and 44. Lastly, the fourth group ordered genotypes of the control treatment containing the BAFs 44, 50, 81 and 120 (Figure 5).

The chemometric analysis demonstrated that after cold stress different chemical constitutions occurred, changing the metabolic profile of the genotypes. This emphasizes differences not only in the amino acid profile shown in FT-IR by proteins (signals at  $1541 \text{ cm}^{-1}$ ), but also in spectral profiles for the classes: carbohydrates represented by starch (signals at  $1076 \text{ cm}^{-1}$ ), and lipids (signals at  $2949 \text{ cm}^{-1}$ ).

#### 4. CONCLUSION

The amino acid composition of the beans can be affected by environmental factors during the period of seed maturation, so it is considered that climate variables are explanatory variables for the amino acid profile on the stress of low temperature.

There were differences in the amino acids of a crop to another profile, caused by climatic oscillations.

Each amino acid behaves differently according environmental conditions.

In addition to the amino acid profile, the profile of lipids and carbohydrates was modified after cold stress.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support from CAPES (Coordination of Development of Higher Education Personnel), the technical input and support from the Laboratório de Sementes (Seeds Laboratory) of the Federal University of Santa Catarina (UFSC), and the Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) (Laboratory of Plant Morphogenesis and Biochemistry) for allowing the use of equipment and providing technical support in the seeds production at Epagri-Campos Novos, SC and Fundação de Amparo à Pesquisa

e Inovação do Estado de Santa Catarina –FAPESC, Grant Contract nº 10.043/2012-9, process 877/2012,CNPQ (Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support for corresponding author and CNPQ/MDA edital58, process nº 563920/2010-6.

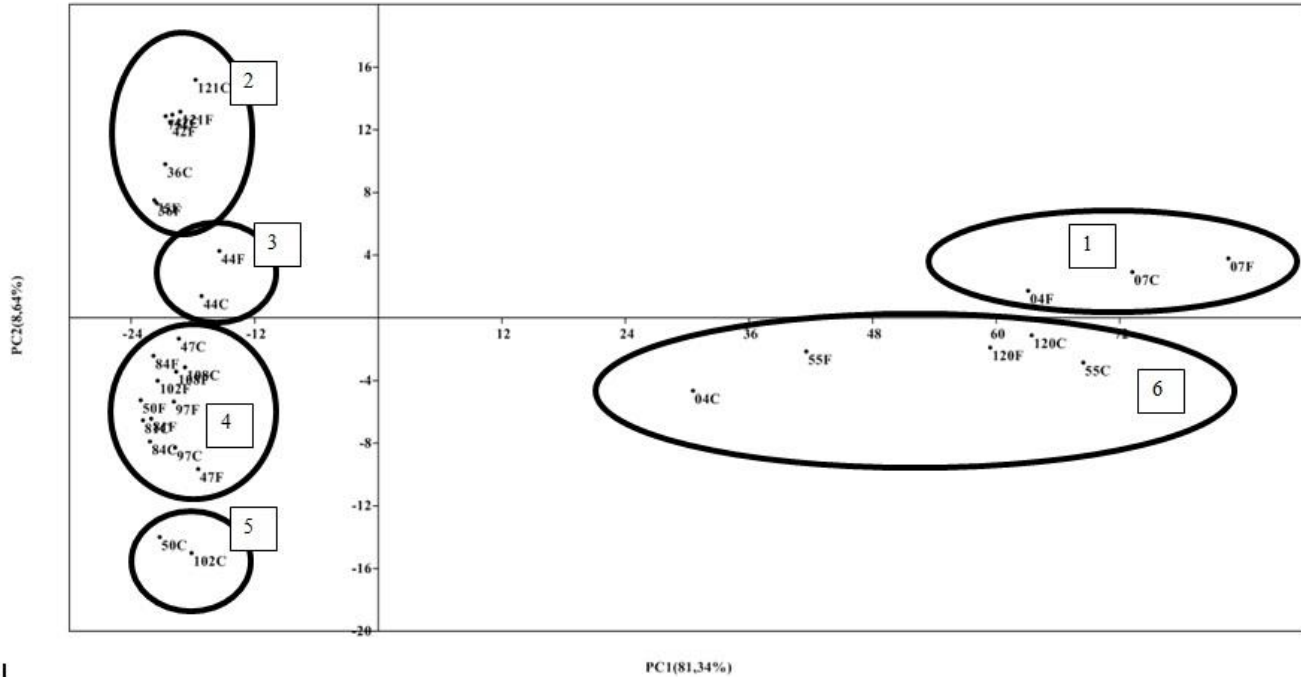
Table' 4: Content ( density in pixels) of profile total amino acids identified in sample of the crop 2011/12, in both treatments studied (treatment after cold stress = F, C = control treatment).

Amino acid	Sample (2011/12 CROP )															
	Density of Free Amino Acids (pixels. 10-5, 2µl sample)															
	Most vigorous seeds															
	75C	75F	81C	81F	84C	84F	102C	102F	121C	121F	42C	42F	36C	36F	50C	50F
Leucine	5,01	4,76	3,65	3,42	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni
Isoleucine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	2,96	3,02	3,82	2,62	2,96	3,02	ni	ni
Tyrosine	ni	ni	5,15	3,59	ni	ni	2,86	3,43	ni	ni	ni	ni	ni	ni	2,85	3,18
Methionine	2,4	ni	ni	ni	ni	2,53	nd	ni	ni	ni	2,2	2,69	ni	ni	ni	ni
Valine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	nd	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	2,72	3,31
Tryptophan	ni	ni	ni	3,32	3,15	ni	2,1	2,71	ni	ni	2,03	2,74	ni	ni	ni	ni
Threonine	1,81	ni	ni	ni	ni	ni	nd	ni	2,77	ni	ni	ni	2,77	ni	ni	ni
Alanine	ni	ni	2,59	ni	7,32	ni	nd	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	2,35	3,34
Aspartic acid	3,48	5,64	1,28	1,96	1,62	2,19	1,04	2,06	3,26	2,79	1,43	2,16	3,26	3,79	1,71	2,59
Serine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	2,2	2,85	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni
Proline	ni	4	ni	2	3,64	ni	ni	3,43	ni	ni	ni	ni	ni	ni	2,39	3,31
Histidine	2,14	3,81	3,49	4,05	4,1	ni	1,61	2,97	ni	ni	2,22	ni	ni	ni	2,32	3,46
	Least vigorous seeds															
	7C	7F	44C	44F	97C	97F	120C	120F	4C	4F	108C	108F	55C	55F	47C	47F
Tyrosine	ni	ni	ni	ni	3,77	3,54	ni	ni	ni	ni	3,5	4,37	ni	ni	ni	ni
Methionine	8,11	7,68	3,39	1,82	ni	ni	6,86	8,03	4	8,83	ni	ni	6,72	6,42	3,77	3,08
Valine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	7,79	8,18	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni
Tryptophan	7,77	ni	ni	ni	4,73	3,55	ni	ni	ni	ni	3,76	ni	7,61	ni	ni	ni
Threonine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	3,58	3,85
Aspartic acid	6,39	7,36	3,23	3,05	2,07	2,97	4	4,57	4,9	4,03	3,7	4,39	3,67	4,7	3,04	2,31
Serine	ni	5,42	ni	ni	ni	ni	3	6,89	ni	7,71	ni	ni	ni	ni	ni	ni
Glycine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	7,76	ni	ni	ni
Glutamine	ni	ni	ni	ni	3,04	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni
Proline	7,68	7,88	2,68	2,77	3,38	3,47	7,75	8,27	7,6	8,5	3,57	5,54	7,53	8,06	3,58	1,98
Histidine	1,25	ni	ni	ni	3,94	3,55	ni	ni	ni	ni	3,14	3,6	ni	ni	2,58	3,59

Table' 5: Content (density in pixels) of profile total amino acids identified in sample of the crop 2012/13, in both treatments studied (treatment after cold stress = F, C = control treatment).

Amino acid	Sample (2012/13 CROP)															
	Density of Free Amino Acids (pixels. 10-5, 2µl sample)															
	Most vigorous seeds															
	110C	110F	112C	112F	115C	115F	81C	81F	50C	50F	97C	97F	57C	57F	42C	42F
Leucine	ni	ni	2,08	2,14	1,8	1,73	1,55	1,61	ni	ni	ni	1,87	ni	ni	ni	ni
Isoleucine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni
Methionine	ni	1,71	1,5	2	1,75	1,75	ni	1,78	ni	ni	ni	1,77	ni	1,56	ni	ni
Threonine	ni	ni	1,91	1,92	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni
Alanine	1,68	ni	ni	ni	1,59	1,63	1,83	ni	ni	ni	2	1,69	1,83	1,83	ni	1,76
Aspartic acid	1,48	1,59	1,59	1,63	1,18	1,27	1,76	1,33	1,39	1,55	1,55	1,2	1,68	1,28	1,74	1,78
Glycine	ni	ni	ni	ni	ni	2	ni	1,71	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni
Arginine	2	1,36	1,99	1,91	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni
Proline	ni	ni	ni	ni	ni	ni	1,78	1,87	1,54	1,61	ni	1,63	ni	1,66	ni	1,6
Histidine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni
Amino acid	Least vigorous seeds															
	84F	84C	120C	120F	36C	36F	07C	07F	13C	13F	68C	68F	44C	44F	47C	47F
	Leucine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni
	Isoleucine	ni	ni	1,61	1,74	1,83	1,63	1,95	ni	1,86	1,93	ni	ni	ni	ni	ni
Methionine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	1,67	1,81	ni	ni	ni	ni	ni	
Glutamic acid	1,5	1,59	1,48	1,61	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	
Threonine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	1,94	1,43	1,6	ni	ni	ni	ni	ni	
Alanine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	
Aspartic acid	1,5	1,69	1,51	1,09	1,28	1,32	1,69	1,58	1,04	1,27	1,8	1,79	1,66	1,77	1,73	1,73
Serine	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	1,74	1,8	ni	ni	ni	ni
Proline	ni	ni	1,09	1,08	1,36	1,42	1,69	1,58	1,09	1,27	ni	ni	1,67	1,77	1,73	1,73

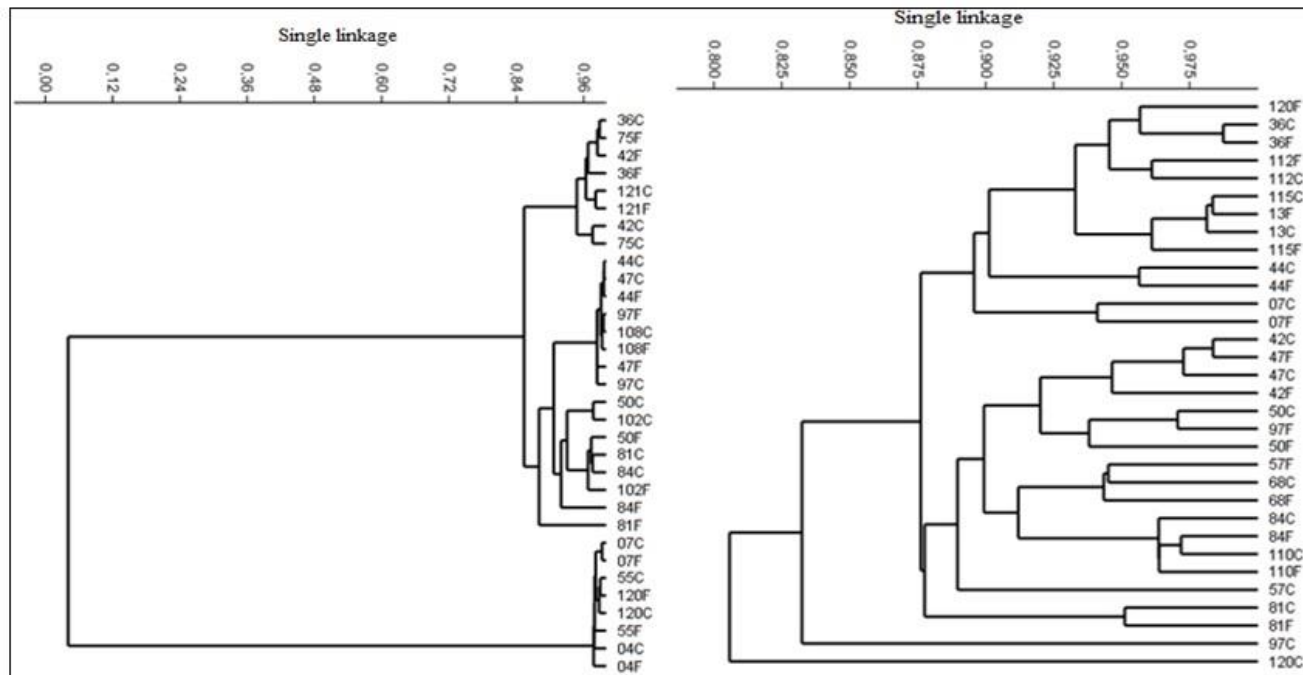
Figure' 2: Factorial distribution of principal components, PC1 and PC2 for the profiles of amino acids analyzed in seeds of *P. vulgaris* during crop 2011/12 (S1).

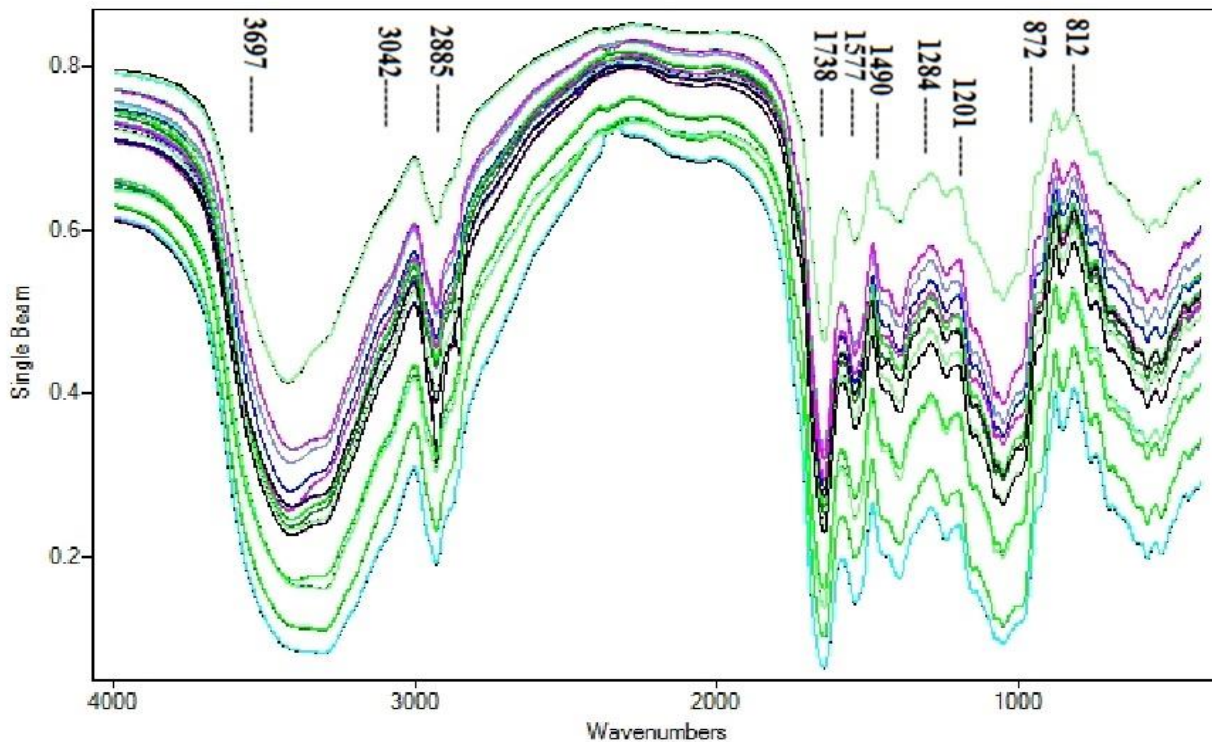


I

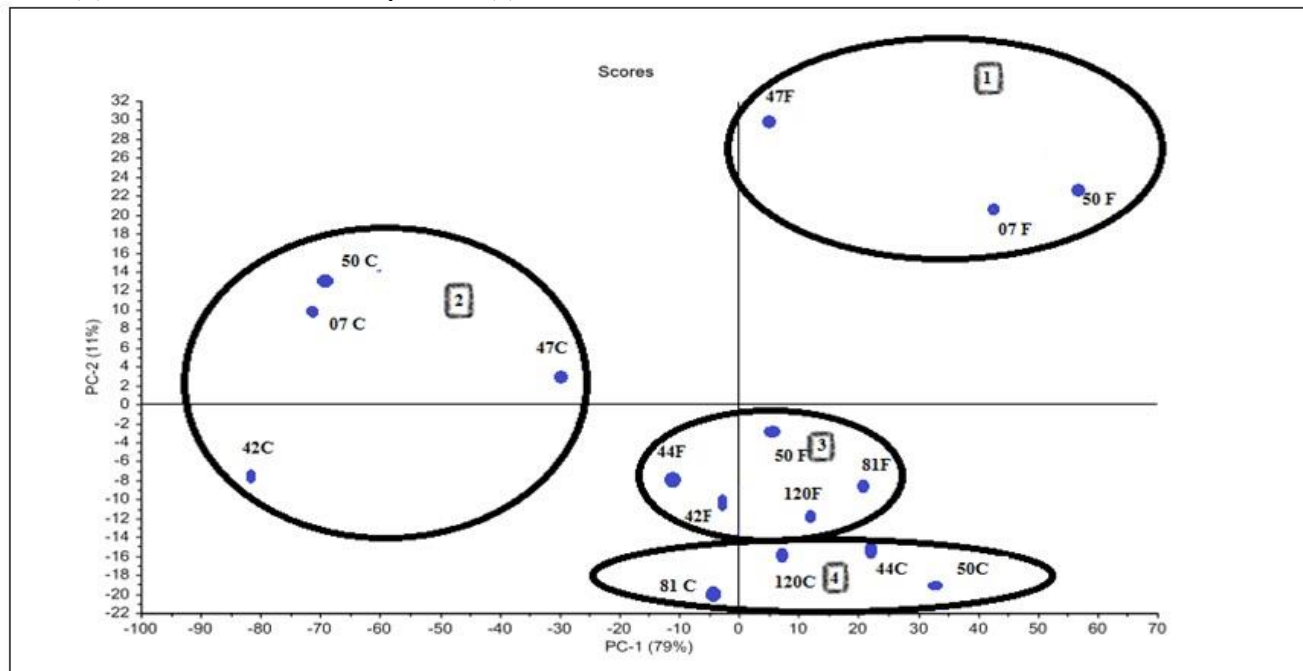


Figure' 3: Clusters obtained based on the amino acid profile data matrix using measures of similarity (correlation coefficient) by hierarchical clustering method single linkage separating the respective groups. (A) Cluster on the Crop 2011/12, whose cophenetic correlation was  $r = 0.92$  and (B) on the Cluster Crop 2012/13, whose cophenetic correlation was  $r = 0.71$ .

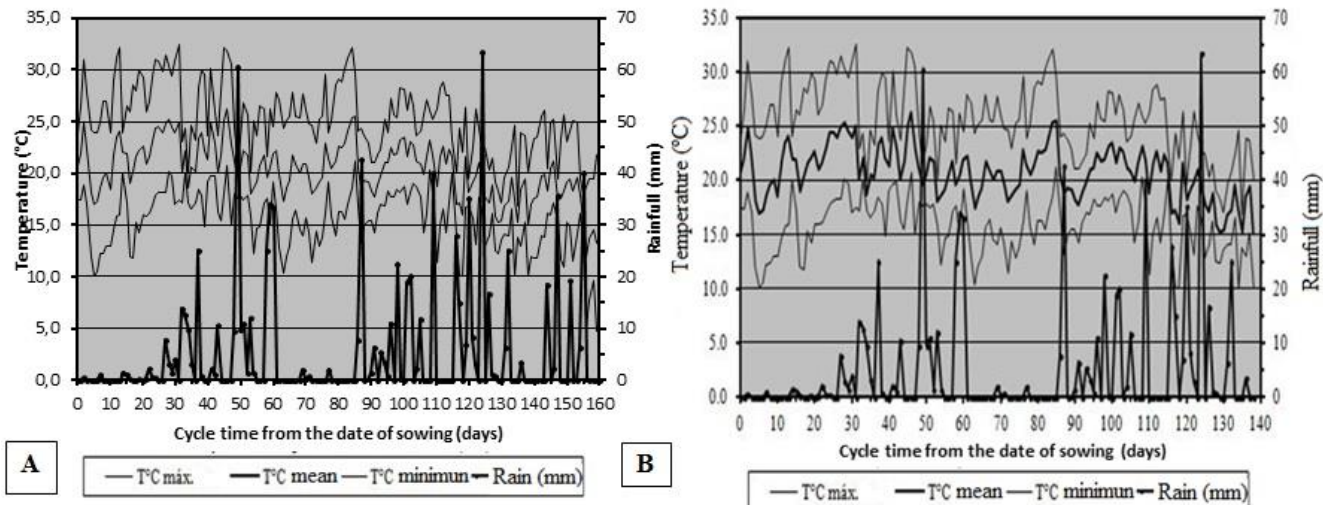


Figure' 4: Spectra FT-IR (3000 - 600 cm-1) 8 genotypes *P. vulgaris* before (C) and after stress for low temperatures.

Figure' 5:Principal component analysis scores scatter plot of the FTIR dataset (3000 – 600 cm-1) of seeds *P. vulgaris* samples before (C) and after stress for low temperatures (F).



Figure' 6: Temperatures ( $^{\circ}\text{C}$ ) maximum, mean and minimum daily and rainfall (mm) recorded at the National Institute of Meteorology - IN-MET, in Campos Novos, SC, in the period from sowing to physiological maturity in 2011/2012 season (The ) and (B) in the 2012/2013 harvest. \* A sowing in the 2011/2012 harvest held on November 1, 2011, and 2012/2013 crop sowing was held on November 9, 2012, according to agroclimatic zoning for the area.



## BIBLIOGRAPHY

AARESTRUP, J. R., et al. 2008. Análise da viabilidade de sementes de *Euphorbia heterophylla*. *Planta Daninha*, 26(3), 515-519.

BARON, D. N., & Economidis, J. 1963. Thin-layer chromatography for amino-acids and sugars. *Journal of clinical pathology*, 16(5), 484.

BELLON, M.R., & HELLIN, J. 2011. Planting hybrids, keeping landraces: agricultural modernization and tradition among small-scale maize farmers in Chiapas, Mexico. *World Dev.* 39, 1434–1443.

BIROL, E., VILLALBA, E. R., & Smale, M. 2009. Farmer preferences for milpa diversity and genetically modified maize in Mexico: a latent class approach. *Environment and Development Economics*, 14(4), 521.

BROOKS, G. F., et al. 2005. *Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. 25<sup>o</sup> ed. McGraw Hill Brasil. <<http://books.google.com.br/books?id=L6UKpgjDUUkC&pg=PA36&lpg=PA36&dq=alanina+e+germina%C3%A7%C3%A3o&source=bl&ots=yAQLYkuo6h&sig=2iM2r2NtZVF4Ur5a5fOR9Hij7Y&hl=pt-BR&sa=X&ei=CI7zUqCWNqecyQGw2IDYDg&ved=0CFcQ6AEwCA#v=onepage&q=alanina%20e%20germina%C3%A7%C3%A3o&f=false>>

BROWSE, J. & Xix, Z. 2001. Temperature sensing and cold acclimation. *Current opinion in plant biology*, 4(3), 241-246.

CAMACHO, T.C.V et al. 2005. Defining and identifying crop landraces. *Plant genetic resources: characterization and utilization*, 3(03), 373-384.

CERNÁ, M., et al. 2003. Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. *-Carbohydr. Polym.* 51: 383-389.

DANQUAH, A., et al. 2013. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology advances*.

DUTRA, L. F., KERSTEN, E., & FACHINELLO, J. C. 2002. Época de coleta, ácido indolbutírico e triptofano no enraizamento de estacas de pessegueiro. *Scientia Agrícola, Piracicaba*, 59(2), 327-333.

FUCHS, B., et al. 2011. Lipid analysis by thin-layer chromatography—a review of the current state. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2754-2774.

GALILI, S., AMIR, R., & GALILI, G. 2008. Genetic engineering of amino acid metabolism in plants. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 1, 49-80.

GARCIA, C. 2012. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *araucaria angustifolia* (bertoloni) otto kuntze sob condições controladas de armazenamento. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos e Vegetais) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GORDIN, C., et al. 2013. Estresse salino na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de niger (*Guizotia abyssinica* (LF) Cass.). *Acta Botanica Brasilica*, 26(4), 966-972.

GRAHAM, D., & Patterson, B. D. 1982. Responses of plants to low, nonfreezing temperatures: proteins, metabolism, and acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 33(1), 347-372.

GRIMAUD, F. et al. (2013). Exploring chloroplastic changes related to chilling and freezing tolerance during cold acclimation of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal Proteomics* ;80C:145–59.

GROPPIA, M.D. et al. 2008. Inhibition of root and polyamine metabolismo in sunflowers (*Helianthus annuus*) Seedling under cádmium and copper stress.

HANAFY, M. S., et al. 2012. Differential response of methionine metabolism in two grain legumes, soybean and azuki bean, expressing a mutated form of *Arabidopsis* cystathionine  $\gamma$ -synthase. *Journal of plant physiology* 170; 338-345.

Huang, T., Jander, G., & de Vos, M. (2011). Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: representative cases and oppor-

tunities for further functional analysis. *Phytochemistry*, 72(13), 1531-1537.

KOCSY, G., et al. 2011. Regulation of free amino acid and polyamine levels during cold acclimation in wheat. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(1), 91-93.

KOVALEVA, V., et al. 2013. Analysis of tyrosine phosphorylation and phosphotyrosine-binding proteins in germinating seeds from Scots pine. *Plant Physiology and Biochemistry*.

Kuhnen, S., et al. 2010. FTIR spectroscopy and chemometric analysis applied to discrimination of landrace maize flours produced in southern Brazil. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 45, p. 1673–1681.

LAMBERT, J.B., et al. 2001. *Organic Structural Spectroscopy*. - Prentice Hall, Upper Saddle River.

LUGLI, J. et al. 2000. Effects of calcium, S-adenosylmethionine, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine, methionine, valine and salt concentration on rice aspartate kinase isoenzymes. *Plant Science* 150, 51–58.

MACHADO, R. F., et al. 2006. Reflexos do mecanismo de ação de herbicidas na qualidade fisiológica de sementes e na atividade enzimática em plântulas de arroz. *R. Bras. Sementes*, 28(3), 151-160.

MAHAJAN, S., & TUTEJA, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.

NASCIMENTO, W.M. 2000. Envolvimento do etileno na germinação de sementes. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, V. 12, p.163-174.

POMPELLI, M. F. 2006. Germinação de *Dyckia encholirioides* var *encholirioides* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). *Floresta e Ambiente*, 13(1), 1-9.

PRAXEDES-Garcia, P., et al. 2012. Biochemical Aspects of a Serine Protease from *Caesalpinia echinata* Lam.(Brazilwood) Seeds: A Potential Tool to Access the Mobilization of Seed Storage Proteins. *The Scientific World Journal*.

RAO, S.S.R. et al. 2002. Brassinosteroids – A new class of phytohormones. *Current Science*, Bangalore, India, v. 82, n.10, p.1239-1245.

RASBAND, W. ImageJ 1.46r. National Institutes of Health. <<http://imageJ.nih.gov/ij>>.

Ribeiro, N. D. et al. 2007. Composição de aminoácidos de cultivares de feijão e aplicações para o melhoramento genético. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(10), 1393-1399.

RIBEIRO, N. D., et al. 2007. Composição de aminoácidos de cultivares de feijão e aplicações para o melhoramento genético. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(10), 1393-1399.

SCHULZ, H., & Baranska, M. 2007. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. - *Vib. Spectrosc.* **43**: 13-25.

Sherma, J. (2000). Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1), 129-147.

SILVA, M.R & Silva, M.A.A.P. 1999. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. Artigo de revisão. *Rev. Nutr.*, 12(1), 5-19.

TAIZ, L; & ZEIGUER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*, 3.e.d. Porto Alegre: Artmed.

Tegeder, M. 2012. Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Current opinion in plant biology*, 15(3), 315-321.

THAKUR, P., et al. 2010. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 67(3), 429-443.

VENORA, G., GRILLO, O., RAVALLI, C., & CREMONINI, R. 2009. Identification of Italian landraces of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an image analysis system. *Scientia Horticulturae*, 121(4), 410-418.

VIGOUROUX, Y. et al. 2011. Selection for earlier flowering crop associated with climatic variations in the Sahel. *PloS one*, 6(5), e19563.



WANG, L., et al. 2012. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. *Journal of proteomics*, 75(7), 2109-2127.

WU, G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*, 37(1), 1-17.

ZOTTICH, U. et al. 2013. An antifungal peptide from *Coffea canéfora* seeds with sequence homology to glycine-rich proteins exerts membrane permeabilization and nuclear localization in fungi. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830, 3509-3516.