



## CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE GENÓTIPOS DE GIRASSOL COM TOLERÂNCIA DIFERENCIADA AO ESTRESSE HÍDRICO

Clemilton Lima da Paixão<sup>1</sup>, Daniel da Silva de Jesus<sup>2</sup> e André dias de Azevedo Neto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola - EBDA, Santo Amaro, Bahia, Brasil  
([cillemliton@hotmail.com](mailto:cillemliton@hotmail.com)).

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

<sup>3</sup>Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo identificar marcadores fisiológicos e bioquímicos que diferenciem genótipos de girassol tolerante e sensível ao estresse hídrico. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 genótipos (AG-967 e IAC-larama) x 2 níveis de umidade (100 % da capacidade de vaso - controle, 50% da capacidade de vaso - estresse), com quatro repetições. Com 1, 5, 10 e 15 dias de estresse, foram coletadas amostras de folhas e houve a determinação dos teores de carboidratos solúveis, prolina livre, aminoácidos livres e proteínas solúveis, percentual de integridade absoluta de membranas (PIA) e o teor relativo de água (TRA) e de pigmentos. Após 15 dias de estresse, determinou-se a massa de matéria seca foliar (MSF) e de parte aérea (MSPA) das plantas. Foram verificadas reduções na MSF e MSPA de ambos os genótipos durante a imposição do estresse. Entretanto o genótipo AG-967 foi menos afetado sugerindo maior susceptibilidade ao déficit hídrico. O PIA foi reduzido apenas no genótipo IAC-larama, enquanto no AG-967 não foram verificadas alterações. Os resultados de carboidratos solúveis e aminoácidos livres sugerem que a manutenção destes solutos pode ter um importante papel na tolerância do girassol ao estresse hídrico.

**PALAVRAS-CHAVE:** aminoácidos, carboidratos, carotenóides, clorofila, *Helianthus annuus* L.

### PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SUNFLOWER GENOTYPES WITH DIFFERENT TOLERANCE TO WATER STRESS

#### ABSTRACT

This study aimed to identify physiological and biochemical markers that differentiate sunflower genotypes tolerant and sensitive to water stress. Seeds of sunflower varieties AG-967 and IAC-larama were germinated on germitest paper. Control treatment was defined as the soil moisture to 100% of field capacity, water stress and treatment with 50% of field capacity. With 1, 5, 10 and 15 days of stress, leaf samples were collected and analyzed the contents of soluble carbohydrates, free proline, free amino acids and soluble proteins, absolute integrity of membrane

percent, membrane damage and the relative water content and pigment. After 15 of stress, plants were harvested and separated into stems and leaves for quantification of leaf (LDW) and shoot (SDW) dry weights. Reductions in the LDW and SDW of both genotypes were verified during the imposition of stress. However AG-967 genotype was less affected suggesting greater susceptibility to drought. Reductions in PIA were observed only in IAC-larama, while in AG-967 changes were not observed. The results of soluble carbohydrates and free amino acids suggest that the maintenance of these solutes may have an important role in the sunflower tolerance to water stress.

**KEYWORDS:** amino acids, carbohydrates, carotenoids, chlorophyll, *Helianthus annuus* L.

## INTRODUÇÃO

Dentre os estresses aos quais as plantas estão expostas, a seca é um dos mais importantes, sendo considerado um problema global e que causa perdas econômicas significativas à agricultura. A base dos mecanismos de tolerância à seca é complexa, uma vez que resulta da associação de diversas características nas plantas (RUFINO et al., 2012; RÖMER et al., 2012).

Uma das adaptações que resulta numa tolerância maior ao déficit hídrico é o ajuste osmótico, isto é, a redução do potencial osmótico celular pelo acúmulo de solutos compatíveis. Diversas moléculas estão associadas a este mecanismo incluindo vários tipos de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, além de alguns íons (GRANT, 2012). Portanto, o acúmulo de solutos compatíveis pode ser utilizado para o reconhecimento da tolerância ao estresse hídrico (LISAR et al., 2012).

Altas concentrações de osmólitos podem se refletir também no conteúdo relativo de água. No trigo as menores reduções no teor relativo de água (TRA) foram encontradas no genótipo mais tolerante ao déficit hídrico (HABUS JERCIC et al., 2011). Em cultivares de arroz diferindo no grau de tolerância foi verificada uma relação mais evidente entre a diminuição do conteúdo de água no solo e as reduções nos teores relativos de água (TRA) nas cultivares mais susceptíveis a seca (CHA-UM et al., 2010). Desta forma, tem sido sugerido que genótipos que conseguem manter o TRA sob deficiência hídrica podem apresentar melhor rendimento (KUMAR et al., 2011).

A seca também pode levar ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (JALEEL et al., 2009). As EROS causam extensivos danos nas membranas, desencadeados por processos oxidativos de lipídios e perdas de eletrólitos pela célula (LISAR et al., 2012). Além disso, podem ocorrer danos ao aparelho fotossintético com reflexo nos teores de pigmentos como clorofilas *a* e *b* e carotenoides. Dessa forma, a preservação da integridade estrutural das membranas celulares também é um fator determinante para a sobrevivência em condições de deficiência hídrica.

Existe grande variabilidade na tolerância à seca entre espécies e variedades sendo que a avaliação do desempenho dos diferentes materiais genéticos representa importância para a recomendação de cultivo (RUFINO et al., 2012). Desta maneira, o objetivo desse trabalho consistiu em avaliar variáveis fisiológicas e bioquímicas de genótipos de girassol contrastantes quanto a tolerância ao déficit hídrico, visando melhor compreensão dos mecanismos de tolerância desta espécie sob este tipo de estresse.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material vegetal, condições de crescimento e tratamentos*

Sementes dos genótipos de girassol AG-967 (híbrido simples) e IAC-Iarama (variedade) foram semeadas em vasos contendo 3,75 kg de solo. O solo utilizado foi de textura areno-argilosa, (0-20 cm) com as seguintes características químicas: pH (H<sub>2</sub>O) = 7,1; P(Mehlich<sup>-1</sup>) = 48 mg dm<sup>-3</sup>; K<sup>+</sup> = 68 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup> = 4,8 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup> = 2,5 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H + Al = 0,1 0,56 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; matéria orgânica = 19,0 g dm<sup>-3</sup>. A caracterização química foi realizada de acordo com os procedimentos padrões para análise de solo (EMBRAPA, 2011) e a capacidade de vaso (CV) foi determinada conforme CASAROLI & JONG VAN LIER (2008).

Estes genótipos foram caracterizados como tolerante e sensível ao estresse hídrico, respectivamente, com base em experimento preliminar com 27 diferentes genótipos de girassol. A irrigação (100% CV) foi realizada diariamente e aos cinco dias após a semeadura foram iniciados os tratamentos hídricos: controle (100% CV) ou estresse hídrico (50% CV). A reposição da água evapotranspirada foi feita diariamente, por meio da pesagem dos vasos, de forma a manter os níveis de umidade específicos de cada tratamento. O nível de 50% CV foi atingido aos dez dias após a semeadura. Foram realizadas quatro coletas, com 01, 05, 10 e 15 dias após ser atingido o nível de 50% CV. A massa de matéria seca foliar (MSF) e de parte aérea (MSPA) foi determinada somente após 15 dias de imposição do estresse.

### *Análise de solutos orgânicos*

Para as determinações de solutos orgânicos, o extrato bruto foi obtido macerando-se 1,0 g de tecidos liofilizados de folhas com 8 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo EDTA 0,1 mM. O homogeneizado foi filtrado em mesh e centrifugado a 12000 x g por 15 min. O sobrenadante foi armazenado em ultra freezer (-80 °C) e utilizado para as determinações de carboidratos solúveis, prolina livre, aminoácidos livres e proteínas solúveis. Todas as etapas para a obtenção do extrato bruto foram executadas a 4 °C.

A determinação de carboidratos solúveis foi realizada colorimetricamente (490 nm) em uma alíquota de 0,5 mL do extrato, pelo método do fenol-ácido sulfúrico, utilizando-se a D-(+)-glucose como padrão (DUBOIS et al., 1956). A prolina livre foi determinada colorimetricamente a 520 nm, em uma alíquota de 1,0 mL do extrato, utilizando-se a ninhidrina como reagente específico e a prolina pura como padrão (BATES et al., 1973). Os aminoácidos livres totais foram determinados colorimetricamente pelo método da ninhidrina (570 nm), em uma alíquota de 0,5 mL do extrato, utilizando-se a L-leucina pura como padrão (YEMM & COCKING, 1955). As proteínas solúveis foram determinadas colorimetricamente (595 nm) pelo método de ligação ao corante, em uma alíquota de 0,1 mL do extrato, utilizando-se a albumina de soro bovino pura como padrão (BRADFORD, 1976).

### *Danos membranares (DM), teor relativo de água (TRA) e pigmentos*

A determinação do teor relativo de água (TRA) foi realizada no par de folhas mais jovem e completamente expandido, por meio das determinações da massa de matéria fresca (MF), túrgida (MT) e seca (MS) de discos de folhas, por meio da seguinte fórmula:

$$\text{TRA} = (\text{MF} - \text{MS}) \times 100 / (\text{MT} - \text{MS}) \text{ (BARRS \& WATHERLEY, 1962).}$$

Nas mesmas folhas utilizadas para o estabelecimento do TRA foi determinada a porcentagem de integridade absoluta – PIA (estimativa de danos membranares), por meio de condutividade livre (CL) e condutividade total (CT), usando a fórmula:  $PIA = 100 - (CL \times 100/CT)$  (PIMENTEL et al., 2002).

O teor de clorofila a, clorofila b e de carotenóides (carotenos e xantofilas) foi determinado espectrofotometricamente em extrato etanólico a 95%, conforme metodologia descrita por LICHTENTHALER & BUSCHMANN (2001):

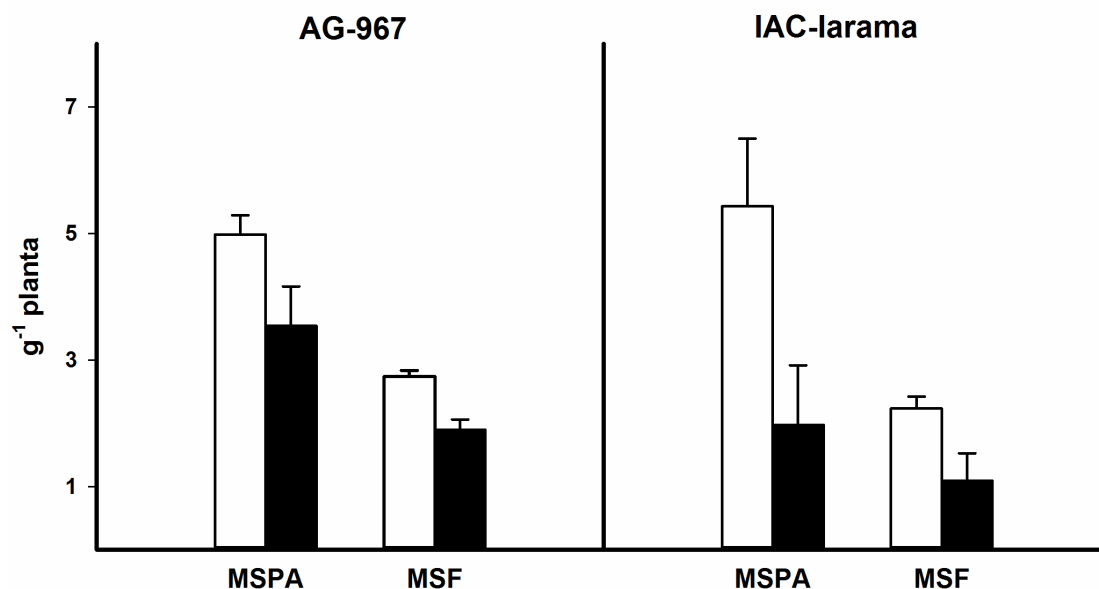
$$\begin{aligned}c_a (\mu\text{g/ml}) &= 13,36 A_{664,1} - 5,19 A_{648,6} \\c_b (\mu\text{g/ml}) &= 27,43 A_{648,6} - 8,12 A_{664,1} \\c_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) &= (1000 A_{470} - 2,13 c_a - 97,64 c_b)/209\end{aligned}$$

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 (genótipos)  $\times$  2 (níveis de umidade no solo), com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e comparados por meio de suas médias e respectivos desvios-padrões.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Crescimento*

Na figura 1, verifica-se as consequências negativas do déficit hídrico sobre a massa de matéria seca foliar (MSF) e de parte aérea (MSPA) nos dois genótipos. Segundo JALEEL et al. (2009), a limitação hídrica é considerada um dos mais importantes fatores de estresse que limitam o crescimento das plantas. Confrontando o efeito da deficiência hídrica sobre os genótipos foram percebidas diferenças quanto a intensidade das reduções. Em AG-967 foram verificadas reduções de 31 (MSF) e 29% (MSPA), enquanto, para IAC-Iarama os prejuízos foram maiores, em torno de 51 e 63% na MSF e na MSPA respectivamente. A avaliação do crescimento de plantas é um parâmetro normalmente utilizado para evidenciar a tolerância de espécies e variedades de plantas sob estresse (JESUS & AZEVEDO NETO, 2013). Desta maneira estes resultados sugerem que AG-967 apresenta melhor desempenho sob déficit hídrico do que IAC-Iarama.



**FIGURA 1.** Massa de matéria seca foliar (MSF) e de parte aérea (MSPA) de genótipos de girassol tolerante (AG-967) e sensível (IAC-larama) ao estresse hídrico, cultivadas sob condições controle - 100% da capacidade de vaso (□) ou de estresse - 50% da capacidade de vaso (■).

### *Solutos orgânicos*

O ajuste osmótico por meio do acúmulo de solutos orgânicos nas plantas é uma forma de assegurar a turgescência e o conteúdo de água nas células. Dessa forma, os teores de carboidratos, aminoácidos, prolina e proteínas solúveis são estudados com frequência por diversos pesquisadores, quando se pretende identificar marcadores fisiológicos e bioquímicos relacionados ao estresse hídrico em plantas (AZEVEDO NETO et al., 2004).

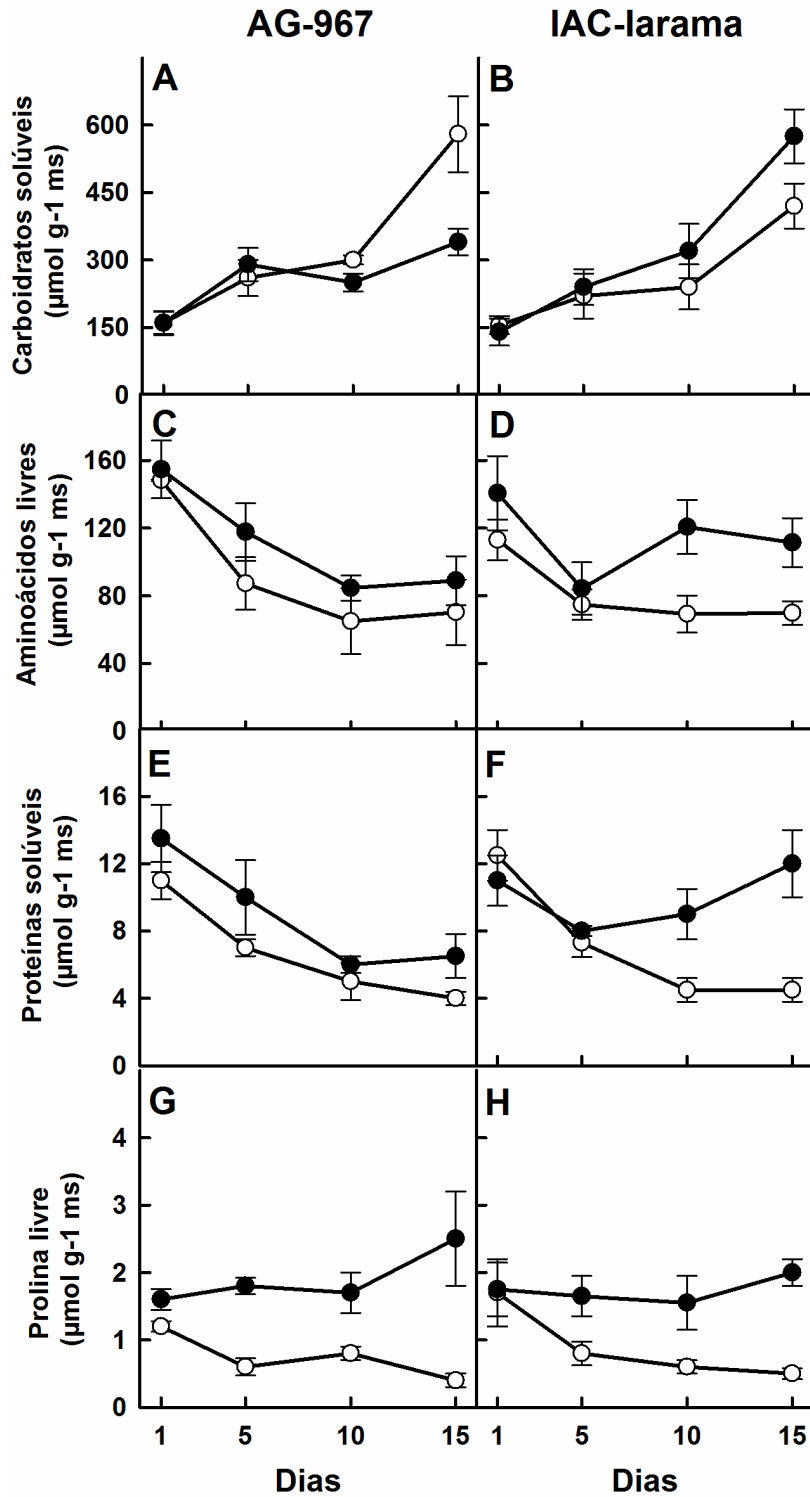
Na Figura 2 pode-se observar que o efeito do estresse hídrico sobre os teores de carboidratos solúveis nas folhas do genótipo tolerante (AG-967) foi diferente do observado no sensível (IAC-larama). Até o quinto dia de exposição ao estresse não houve variação nos teores de carboidratos solúveis entre os genótipos. Depois deste período, verificou-se que o estresse propiciou uma redução dos níveis de carboidratos no genótipo tolerante de 23,2% aos 10 dias e em 32% aos 15 dias de exposição (Figura 2A). No genótipo sensível foi verificado um acúmulo de 27% no teor de carboidratos aos 15 dias de estresse (Figura 2B). De maneira semelhante, os teores foliares de aminoácidos livres demonstram respostas diferenciadas dos genótipos ao estresse (Figura 2). No AG-967 não foram constatadas alterações nos níveis foliares de aminoácidos (Figura 2C). Entretanto, na IAC-larama ocorreu acúmulo de 93 e 83% no teor de aminoácidos, com 10 e 15 dias de estresse, respectivamente (Figura 2D).

Estes resultados sugerem que o genótipo sensível apresentou um custo energético mais elevado para a osmorregulação por meio da síntese de carboidratos e aminoácidos que o genótipo tolerante (AZEVEDO NETO et al., 2010). Alternativamente, a ocorrência de distúrbios induzidos pela seca pode ter afetado a

translocação de solutos orgânicos da parte aérea para a raiz, resultando em um maior acúmulo desses solutos nas folhas do genótipo sensível (AZEVEDO NETO et al., 2010). Uma terceira hipótese é que o maior acúmulo desses solutos nas folhas do genótipo sensível resultou de um efeito de concentração em virtude do menor crescimento em condições de estresse. Independentemente da causa, os resultados deste trabalho sugerem que o maior acúmulo de solutos orgânicos nas folhas pode, ao menos em parte, explicar a maior sensibilidade do IAC-larama ao estresse hídrico, quando comparada ao AG-967.

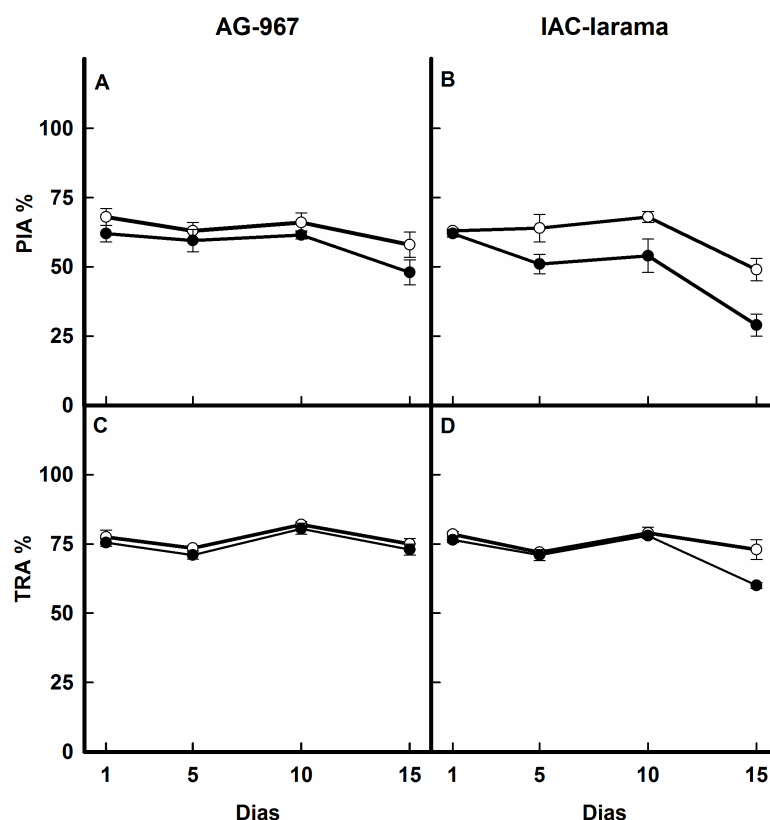
O nível de proteínas solúveis podem ser alterados em plantas crescendo sob estresse hídrico (DIN et al., 2011). Desta forma, ainda na Figura 2, verifica-se que os teores de proteínas solúveis foram afetados diferentemente pelo estresse nos genótipos avaliados. Nas folhas de AG-967 foram observados aumentos nos teores de proteínas solúveis aos 5 (30%) e 15 (39%) dias de estresse hídrico (Figura 2E). Em IAC-larama foi constatado incrementos nos teores de proteínas solúveis de 112 e 150% aos 10 e 15 dias de estresse hídrico, respectivamente (Figura 2F). LAZCANO & LOWATT (1999) encontraram nível variável de proteínas em diferentes cultivares de *Phaseolus* sob estresse hídrico. De acordo com estes autores, o efeito do estresse sobre os teores de proteínas depende do estágio de desenvolvimento da planta, da espécie e dos genótipos, bem como da intensidade e duração do estresse. Em adição, considerando que os incrementos dos teores de proteínas solúveis em ambos os genótipos ocorreram concomitantemente com os de aminoácidos livres, estes resultados sugerem que o aumento das proteínas solúveis induzido pela seca resultou do elevado conteúdo de aminoácidos (AZEVEDO NETO et al., 2010).

Os teores foliares de prolina livre foram modificados de maneira semelhante entre os genótipos (Figura 2). Com um dia de estresse hídrico nenhum dos genótipos apresentou alteração no teor deste soluto. Porém, a partir de cinco dias de estresse, os dois genótipos começaram a acumular prolina. Aos 5, 10 e 15 dias de estresse, respectivamente, foram verificados incrementos de 190, 125 e 471%, nos teores de prolina de AG-967 (Figura 2G) e de 95, 129 e 240% em IAC-larama (Figura 2H). A prolina tem sido considerada um útil marcador de estresse de plantas submetidas ao déficit hídrico, desde que nestas condições, normalmente, verifica-se seu acúmulo (SELMAR & KLEINWÄCHTER, 2013). Em consonância, neste trabalho, foi evidenciado um acúmulo de prolina nas folhas de ambos os genótipos de girassol, porém este efeito foi mais pronunciado no genótipo tolerante. Em plantas submetidas à seca, este aminoácido pode atuar na diminuição do potencial osmótico, na hidratação de macromoléculas, como fonte de energia utilizável e de armazenamento de nitrogênio (SZABADOS & SAVOURÉ, 2010).



**FIGURA 2.** Teor de carboidratos solúveis nas folhas (A e B) e (C e D) nos genótipos de girassol tolerante (AG-967) e sensível (IAC-larama) ao estresse hídrico, cultivadas sob condições controle 100% capacidade de vaso (○) ou de estresse - 50% da capacidade de vaso (●).

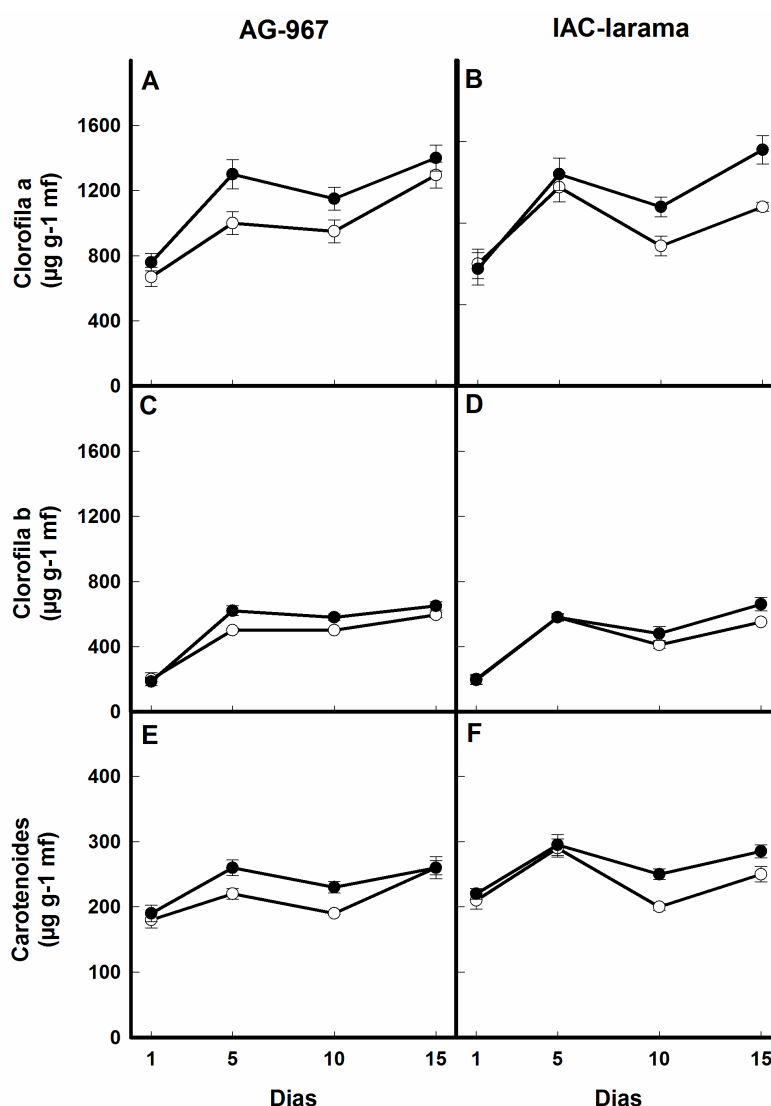
A Figura 3 mostra os efeitos do déficit hídrico no percentual de integridade absoluta das membranas (PIA) e teor relativo de água (TRA) dos dois genótipos de girassol avaliados. Verifica-se que apenas o genótipo sensível apresentou redução na PIA e TRA. Dessa forma, a integridade das membranas neste genótipo foi reduzida em 16, 21 e 39%, respectivamente, aos 5, 10 e 15 dias de estresse (Figura 3B) e a TRA foi reduzida em 18% no fim do período experimental (Figura 3D). Desta maneira, os resultados sugerem que avaliação da integridade das membranas nos genótipos de girassol com tolerância diferenciada ao estresse hídrico também permite a discriminação da tolerância à seca entre eles. A manutenção dos valores de PIA no genótipo tolerante reflete uma maior tolerância ao estresse, a qual pode ser associada à menor atividade de enzimas hidrolíticas protoplasmáticas e/ou à composição de lipídios de membranas (DE PAULA et al., 1990). Por outro lado, o teor relativo de água foi pouco afetado pelo estresse hídrico em ambos os genótipos de girassol. Assim, esta variável não é eficiente para discriminar genótipos em função de tolerância ou sensibilidade à seca.



**FIGURA 3.** Percentagem de integridade absoluta - PIA (A e B) e teor relativo de água - TRA (C e D) nos genótipos de girassol tolerante (AG-967) e sensível (IAC-larama) ao estresse hídrico, cultivadas sob condições controle - 100% de capacidade de vaso (○) ou de estresse - 50% de capacidade de vaso (●).



Na Figura 4, verifica-se que as alterações nos teores de pigmentos (clorofilas e carotenóides) foram semelhantes nos genótipos. No genótipo tolerante (AG-967) foram constatados aumentos nos teores de pigmentos aos 5 e 10 dias de estresse. Na IAC-larama, este aumento foi observado apenas aos 10 e 15 dias de estresse. Desta maneira, enquanto na variedade tolerante observou-se um aumento transitente para todos os pigmentos, na sensível os teores de pigmentos aumentaram progressivamente com o prolongamento do estresse. Incremento nos teores de pigmentos com o estresse hídrico implica em um aumento da capacidade para captação de luz (MAFAKHERI et al., 2010). No entanto, se há um excesso de absorção de energia pelo aparato fotossintético (fotossistemas e complexo antena) isso pode ocasionar fotoxidação, prejudicando a integridade das membranas, como pôde ser observado na Figura 4.



**FIGURA 4.** Teor de clorofila a (A e B) de clorofila b (C e D) e de carotenóides (E e F) dos genótipos de girassol tolerante (AG-967) e sensível (IAC-larama) ao estresse hídrico, cultivadas sob condições controle - 100% da capacidade de vaso (○) ou de estresse - 50% de capacidade de vaso (●).

## CONCLUSÕES

Os teores de carboidratos solúveis e aminoácidos livres são marcadores potenciais de genótipos tolerantes de girassol ao estresse hídrico.

## REFERÊNCIAS

AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; LACERDA, C. F. DE; SILVA, J. V.; COSTA, P. H. A. DA; GOMES-FILHO, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 1, p. 31-38, 2004.

AZEVEDO NETO, A. D.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Salinity and oxidative stress. In: Khan, N.A.; Singh, S. **Abiotic stress and plant responses**. New Delhi: I.K. International, 2008, p.57-82.

AZEVEDO NETO, A. D.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; MELO FILHO, P. A.; SANTOS, R. C. Physiological and biochemical responses of peanut genotypes to water deficit. **Journal of Plant Interaction**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2010.

BARRS, H. D.; WEATHERLEY, P. E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. **Australian Journal of Biological Science**, v. 15, p. 413-428, 1962.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 1, p. 205-207, 1973.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 246-254, 1976.

CASAROLI, D.; JONG VAN LIER, Q de. Critérios para determinação da capacidade de vaso. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, n. 1, p. 59-66, 2008.

CHA-UM, S.; NHUNG, N. T. H.; KIRDMANEE, C. Effect of mannitol and salt induced iso-osmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of rice cultivars (*Oryza sativa* L. spp *indica*). **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, p. 927-941, 2010.

JESUS D. S.; AZEVEDO NETO, A. D. Aluminum Tolerance in Sunflower Plants Is Associated with Phosphorus Content in the Roots. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 44 n. 22, p. 3423-3430, 2013.

DE PAULA, F. M.; PHAM THI, A. T.; VIEIRA DA SILVA, J.; JUSTIN, A. M.; DEMANDRE, C.; MAZLIAK, P. Effects of water stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. **Plant Science**, v. 66, n. 2, p.185-193, 1990.

DIN, J.; KHAN, S. U.; ALI, I.; GURMANI, A. R. Physiological and agronomic response of canola varieties to drought stress. **Journal Animal and Plant Science**, v. 21, p.

78-82, 2011.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 2011.

GRANT, O. M. Understanding and exploiting the impact of drought stress on plant physiology. In: Ahmad, P. and Prasad, M. N. V. (Ed.). **Abiotic Stress Responses in Plants**, Springer, New York, 2012. p. 89-104.

HABUS JERICIC, I., et al. Effects of water deficit on chlorophyll content, relative water content and grain yield of six Croatian winter wheat genotypes. **10<sup>th</sup> Alps-adria Science workshop**, v. 60, 2011.

JALEEL, C. A. MANIVANNAN, P.; WAHID, A.; FAROOQ, M.; AL-JUBURI, H. J.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 11, p. 100-105, 2009.

KUMAR, R. R.; KARAJOL, K.; NAIK, G. R. Effect of Polyethylene Glycol Induced Water Stress on Physiological and Biochemical Responses in Pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 148-152, 2011.

LAZCANO, F.; LOWATT, C. J. Relationship between water content, nitrogen pools, and growth of *Phaseolus Vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray during water deficit. **Crop Science**, v. 39, n. 2, p. 467-475, 1999.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 2001.F4.3.1 – F 4.3.8.

LISAR, S. Y. S.; MOTAFAKKERAZAD, R.; HOSSAIN, M. M.; RAHMAN, I. M. M. Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses. In: RAHMAN, I. MD. M.; HASEGAWA, H. (Ed.) **Water stress**, Intech, 2012. p. 1-14.

MAFAKHERI, A., SIOSEMARDEH, A.; BAHRAMNEJAD, B.; STRUIK, P. C.; SOHRABI, Y. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 8, p. 580-585, 2010.

PIMENTEL, C., SARR, B.; DIOUF, O.; ABBOUD, A. C. DE S.; ROY-MACAULEY, H. Tolerância Protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivadas em campo. **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 22, n. 1, p. 07-14, 2002.

RÖMER, C., WAHABZADA, M.; BALLVORA, A.; PINTO, F.; ROSSINI, M.; PANIGADA, C.; BEHMANN, J.; LÉON, J.; THURAU, C.; BAUCKHAGE, C.; KERSTING, K.; RASCHER, U.; PLÜMER, LUTZ. Early drought stress detection in cereals: simplex volume maximisation for hyperspectral image analysis. **Functional Plant Biology**, v. 39, n. 11, p. 878-890, 2012.

RUFINO C. A. TAVARES, L. C.; VIEIRA, J. F.; DÖRR, C. S.; VILLELA, F. A.; BARROS, A. C. S. A. Desempenho de genótipos de milho submetidos ao déficit hídrico no estágio vegetativo. **Magistra**, v. 24, n. 3, p. 217-225, 2012.

SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. Stress Enhances the Synthesis of Secondary Plant Products: The Impact of Stress-Related Over-Reduction on the Accumulation of Natural Products. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 6, p. 817-826, 2013.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.