

ANA CARLA RESENDE FRAIZ

**IMPORTÂNCIA DA RESPIRAÇÃO RADICULAR NA TOLERÂNCIA AO  
DÉFICIT HÍDRICO EM SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do Título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

F812i Fraiz, Ana Carla Resende, 1986-  
2015 Importância da respiração radicular na tolerância ao deficit  
hídrico em soja / Ana Carla Resende Fraiz. – Viçosa, MG, 2015.  
ix, 63f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Inclui apêndice.

Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.52-58.

1. Soja. 2. *Glycine max*. 3. Soja - Consumo hídrico.  
4. Plantas e água. 5. Raízes (Botânica) - Absorção de água .  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal.  
II. Título.

CDD 22. ed. 583.74

ANA CARLA RESENDE FRAIZ

**IMPORTÂNCIA DA RESPIRAÇÃO RADICULAR NA TOLERÂNCIA AO  
DÉFICIT HÍDRICO EM SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do Título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 16 de julho de 2015

---

Prof. Wagner L. Araújo  
Coorientador

---

Prof. Cleberson Ribeiro

---

Dr. Camilo Elber Vital

---

Prof<sup>a</sup>. Rosilene Oliveira Mesquita

---

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro  
Orientador

*À minha família, fonte de todo amor*  
Dedico

## AGRADECIMENTOS

Deus foi extremamente bondoso comigo ao permitir que eu encontrasse tantas pessoas especiais ao longo do caminho. Por isso agradeço imensamente à Ele por todas as graças colocadas em minha vida, em especial meus pais que tanto apoiaram meus estudos durante toda minha vida.

Ao João, Marcelo e Vanessa que torceram com todo amor por esse título.

À minha família que foi fundamental para a conquista deste doutorado.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal pela excelência dos estudos oferecidos.

À CAPES e CNPq pelo financiamento do doutorado.

Ao Núcleo de Biomoléculas pelas análises de perfil metabólico e perfil hormonal. Em especial a Nívea que através de sua alegria e competência tornou prazerosa as idas à casa 21.

À Epamig que cedeu o scanner e software para realização das análises da morfologia radicular.

Ao Camilo pela grande ajuda nas análises de morfologia de raiz e perfil hormonal. E à Andrea essencial para realização dos estudos de expressão gênica.

Aos professores e funcionários do curso de pós-graduação em Fisiologia Vegetal que participaram ativamente de todas as etapas para a obtenção desse título. Em especial ao professor Marcelo Loureiro pela orientação.

Aos meus muitos amigos de Viçosa que sou enormemente agradecida pela companhia, amizade e apoio: Amanda Ávila, Andrea, Antonio, Camila Pedrosa, Carla Bastos, Cris, Daniele Vidal, David, Diego, Fabiana, Franklin, Fernanda Sartor, Ibiá, Karla, Kelem, Larisse, Luana, Maiana, Marcelo, Marcela, Martielly, Mireli, Priscila Alves, Priscila Oliveira, Rafa, Samuca, Thiago, Tulio. Vocês farão muita falta.

Aos meus grandes amigos Giu, Henrique e Izabel que foram importantíssimos durante esses quatro anos, estando sempre presentes e acrescentando muito em minha vida.

À Rose, que pela sua generosidade e desprendimento permitiu que essa tese fosse realizada.

Às minhas queridas amigas Kássia, Bruna e Bruninha que me acolheram de forma tão carinhosa.

À Lorena e Ana Clara que foram minha família em Viçosa, minhas companheiras com quem dividi o dia a dia e que me trouxeram infinitas alegrias.

Enfim, foram quatro anos de superação e conquistas que muito contribuíram para minha formação pessoal e profissional, por isso agradeço a todos que participaram disso. Obrigada!

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	5
2.1 Material vegetal, condições de crescimento e aplicação dos tratamentos.....	5
2.2 Determinação de trocas gasosas.....	6
2.3 Teor relativo de água.....	6
2.4 Respiração radicular.....	7
2.5 Análise morfológica das raízes .....	7
2.6 Perfil metabólico .....	7
2.7 Atividade de antioxidantes.....	8
2.8 Atividade de enzimas da cadeia respiratória .....	11
2.9 Expressão gênica.....	11
2.10 Determinação de NAD/NADH/NAD(P)H.....	13
2.11 Perfil hormonal .....	13
3. RESULTADOS.....	15
3.1 Teor relativo de água.....	15
3.2 Taxa respiratória de raízes sob déficit hídrico .....	16
3.3 Metabolismo antioxidativo de raízes sob deficiência hídrica .....	16
3.4 Atividade de enzimas glicolíticas de raízes após imposição de deficiência hídrica.....	18
3.5 Expressão gênica de raízes após imposição de deficiência hídrica.....	20
3.6 Análise de nucleotídeos de raízes sob deficiência hídrica .....	22
3.7 Trocas gasosas de plantas de soja sob déficit hídrico em resposta à aplicação exógena de ABA e fluridona.....	25
3.8 Taxas respiratórias de raízes sob déficit hídrico em resposta a aplicação exógena de ABA e fluridona .....	28
3.9 Morfologia de raízes sob estresse hídrico em resposta às aplicações exógenas de ABA e fluridona.....	29
3.10 Perfil hormonal sob déficit hídrico em resposta às aplicações exógenas de ABA e fluridona.....	31
3.11 Perfil metabólico sob déficit hídrico em resposta às aplicações exógenas de ABA e fluridona.....	36
4 DISCUSSÃO .....	42
4.1 Cultivar tolerante retarda a desidratação foliar .....	42
4.2 Embrapa 48 e BR 16 não diferem quanto a morfologia radicular.....	42
4.3 Mecanismos antioxidativos radiculares contribuem para a tolerância à seca .....	43
4.4 As maiores taxas respiratórias na cultivar tolerante são associadas com alterações na expressão gênica e maior atividade de várias enzimas respiratórias.....	44

4.5 Déficit hídrico afeta diferentemente os hormônios radiculares entre as cultivares.....	45
4.6 O déficit hídrico promove maiores aumentos nos teores de ácidos orgânicos e aminoácidos nas raízes da cultivar tolerante. ....	46
4.7 Aplicação exógena de ABA reduz a fotossíntese e aumenta a respiração radicular em plantas sob estresse .....	48
4.8) Aplicação exógena de ABA afeta o perfil metabólico diferencialmente nos genótipos..	49
4.9) Aplicação exógena de fluridona tem efeitos no perfil metabólico, principalmente nos aminoácidos .....	49
5 CONCLUSÃO .....	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	59

## RESUMO

FRAIZ, Ana Carla Resende, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Importância da respiração radicular na tolerância ao déficit hídrico em soja.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Coorientadores: Dimas M. Ribeiro e Wagner L. Araújo

O objetivo deste trabalho foi melhor compreender os mecanismos radiculares que tornam a cultivar de soja Embrapa 48 mais tolerante à seca que a cultivar BR16, e testar a hipótese de que diferenças na respiração radicular entre estes genótipos contribuem para esta tolerância diferencial. Foram conduzidos dois experimentos, no primeiro as plantas foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) ou submetidas a déficit hídrico, imposto pela suspensão da irrigação, até alcançarem um potencial hídrico na antemanhã ( $\Psi_{am}$ ) de  $-1,0 \pm 0,1$  MPa e  $-1,5 \pm 0,1$  MPa, valores que caracterizam uma condição de estresse moderado e severo em soja, respectivamente. Além desses tratamentos, um quarto grupo foi mantido para serem reirrigadas após alcançarem o déficit severo. O segundo experimento foi realizado para avaliar o efeito do ácido abscísico (ABA) e de seu inibidor (fluridona) na tolerância à seca nas cultivares de soja Embrapa 48 e BR 16. O ensaio foi conduzido como descrito acima, com a diferença que o ABA ( $50\mu\text{M}$ ) ou a fluridona ( $50\mu\text{M}$ ) foram aspergidas nas folhas e na região do coleto a partir da imposição do estresse. A cultivar tolerante retardou a desidratação foliar apresentando maior fotossíntese líquida no estresse severo e após a reirrigação, além de maior eficiência do uso da água. A cultivar tolerante também possuiu maior respiração radicular mas não alterou sua arquitetura radicular sob estresse, excluindo um papel do sistema radicular como um mecanismo de escape ao estresse. Maior nível de mecanismos antioxidativos radiculares contribuem para a tolerância à seca, como aumento do teor de ascorbato e de antioxidantes enzimáticos como catalase, APX, SOD e GR. A maior respiração durante o estresse hídrico na cultivar tolerante foi associado com alterações na expressão gênica. Além disso, a cultivar Embrapa 48 obteve maior atividade de algumas enzimas respiratórias analisadas. O estresse hídrico afetou diferentemente vários hormônios radiculares, aumentando ABA e reduzindo AIA e MeJA. O estresse hídrico promoveu aumentos nos teores de ácidos orgânicos e aminoácidos nas raízes da cultivar tolerante, e menores níveis de  $\text{NAD}^+$  sob estresse severo e reirrigação. A aplicação exógena de ABA reduziu a fotossíntese e aumentou a respiração radicular sob estresse e afetou diferentemente o metabolismo de aminoácidos e açúcares entre

as cultivares com diferenças na resposta de tolerância estudados aqui. A fluridona reduziu a fotossíntese e respiração nos dois genótipos e afetou pouco os níveis de ABA nas raízes. Além disso, de forma geral, a aplicação de fluridona proporcionou aumentos nos teores de aminoácidos e ácidos orgânicos em ambas cultivares. A partir dos diferentes testes realizados para estudar o mecanismo diferencial de tolerância à deficiência hídrica entre as duas cultivares, verificou-se que para as raízes de soja as maiores taxas respiratórias e o eficiente metabolismo antioxidativo foram essenciais para maior tolerância da cultivar Embrapa 48.

## ABSTRACT

FRAIZ, Ana Carla Resende, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Importance of root respiration for water deficit tolerance in soybean.** Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-advisers: Dimas M. Ribeiro and Wagner L. Araújo

This study aimed to better understand the root mechanisms in soybean that render cultivar Embrapa 48 drought tolerance, in comparison with drought-sensitive BR16, and to test if root respiration is related to differential drought responses observed in both cultivars. Two experiments were conducted simultaneously. First, plants were evaluated under regular irrigation conditions (control), and under water deficit imposed by withholding irrigation until the pre-dawn leaf water potential reached ( $\Psi_{am}$ )  $-1.0 \pm 0.1$  MPa (moderate stress) or  $-1.5 \pm 0.1$  MPa (severe stress). Severe stressed plants from both cultivars were also evaluated after their complete rehydration. Second, effects of abscisic acid (ABA) and fluridone (ABA biosynthesis inhibitor) on drought tolerance were tested. ABA ( $50\mu\text{M}$ ) or fluridone ( $50\mu\text{M}$ ) were sprayed daily onto leaves and stems of both cultivars when moderate and severe drought stress imposition started. The drought tolerant cultivar presented a delay in leaf water dehydration, and higher values of net photosynthesis rate and water use efficiency under severe stress, and after rehydration. Drought tolerant cultivar also presented greater root respiration, but no changes in root architecture under stress were observed, excluding the importance of root system in drought avoidance. Higher levels of root antioxidant mechanism improve drought tolerance, as seen by the increase in ascorbate content and activities of antioxidative enzymes catalase, APX, SOD and GR. Under stress, the higher level of respiration observed in the drought tolerant cultivar was associated with changes in gene expression. Moreover, Embrapa 48 had greater activities of some respiratory enzymes evaluated. Water stress influenced differently plant hormone levels in roots, such as increase in ABA and decrease in IAA and MeJA. There was an increase of levels of organic acids and amino acids, and a decrease of  $\text{NAD}^+$  in roots of the tolerant cultivar, under severe stress and after rehydration. Exogenous application of ABA decreased photosynthesis and increased root respiration under stress, and differently affected amino acid and sugar metabolism in both cultivars. Fluridone decreased photosynthesis and root respiration of both cultivars, and little affected ABA levels in roots. In addition, fluridone led to an increase of amino acids and organic acids in roots of both cultivars. Altogether, our

data indicate that higher levels of root respiration and an efficient antioxidant metabolism were essential to provide soybean cultivar Embrapa 48 greater tolerance to dehydration.

## 1. INTRODUÇÃO

A deficiência hídrica tem efeito inibitório nas taxas fotossintéticas, porém o efeito na respiração pode ser variável. As taxas respiratórias podem diminuir, se manter, ou até aumentar diante do estresse hídrico. Essas respostas vão depender do órgão da planta e da espécie em questão. Nas raízes, o estresse hídrico quase sempre inibe a respiração, já em folhas maduras as respostas são variáveis. Esta diversidade no comportamento respiratório sob déficit hídrico pode ser resultado da atuação de diferentes mecanismos de tolerância (ATKIN; MACHEREL, 2009). Assim, em se tratando de raízes, a manutenção da respiração durante o estresse parece ter um papel decisivo na sobrevivência da planta, pois auxilia na ativação de mecanismos de respostas ao estresse.

A mitocôndria, organela fundamental das células eucariotas, é quem provê a energia necessária para as atividades celulares, sendo a respiração sua função primária (MILLAR et al., 2011). Além de prover energia para o metabolismo celular, a mitocôndria está associada a inúmeros processos celulares, tais como, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de lipídeos e de proteínas, metabolismo secundário, manutenção da homeostase redox e sinalização (ARAUJO et al., 2014; FERNIE et al., 2004; VAN DONGEN et al., 2011). A eficiência das taxas de fotossíntese e fotorrespiração também são dependentes destas vias respiratórias (SWEETLOVE et al., 2006). Assim, muitos estudos têm sugerido um importante papel da respiração na regulação da fotossíntese, podendo atuar, por exemplo, como fornecedor de ATP para a síntese de sacarose (NUNES-NESE et al., 2011; RAGHAVENDRA; PADMASREE, 2003) e como dissipador do excesso de poder redutor produzido nos cloroplastos (BARTOLI et al., 2005; TANIGUCHI; MIYAKE, 2012).

Além da rota convencional (que compreende a glicólise, o ciclo do ácido tricarboxílico e a cadeia transportadora de elétrons) as vias respiratórias possuem diversas rotas alternativas, o que as tornam um mecanismo flexível e essencial para diversas situações (FERNIE et al., 2004). Em resposta às alterações metabólicas na célula e à demanda energética, mudanças na morfologia e na capacidade respiratória das mitocôndrias são comumente observadas. Assim, essa organela é dinamicamente ajustada para atender de forma específica as necessidades energéticas dos diferentes tecidos (JACOBY et al., 2012). Logo, a grande adaptabilidade das mitocôndrias é importante na maneira como as células respondem a estímulos ambientais,

principalmente sob condições adversas. Essas condições sub-ótimas alteram o metabolismo, crescimento e desenvolvimento dos vegetais, e quando extremos, podem conduzir à morte. Sob condições sub ótimas, a mitocôndria se destaca como um importante mecanismo para auxiliar no sistema de defesa e de tolerância da planta (ARAÚJO et al., 2014). Assim, as taxas respiratórias são fatores determinantes para o crescimento sob uma gama de fatores estressantes, como temperatura, umidade e salinidade.

O estresse oxidativo celular acontece quando há um desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a de antioxidantes. O estresse oxidativo é um fator chave nos fenômenos de estresses abióticos e bióticos. A produção de EROS (por exemplo:  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ ) ocorrem, além de outros, em cloroplastos e mitocôndrias. Atualmente, muitos estudos têm investigado as mudanças presentes na mitocôndria durante estresses oxidativos, registrando-se assim o eficiente papel dessa organela na indução de antioxidantes e resistência ao estresse, desempenhando, portanto, a importante função de sensor de estresses ambientais (DUTILLEUL, 2003; HANQING et al., 2010; LEHMANN et al., 2012; NOCTOR et al., 2007).

A mitocôndria possui diferentes estratégias que estão associadas a uma defesa eficiente contra estresse oxidativo. A primeira linha de defesa é evitar a produção de EROS (espécies reativas de oxigênio), mantendo a cadeia de transporte de elétrons devidamente oxidada. A segunda e terceira defesas são, respectivamente, desintoxicação das EROS e o reparo das perdas geradas pelas EROS. Para realizar as duas últimas defesas são necessários os antioxidantes, tais como peroxidase do ascorbato, catalase e glutathione, cuja síntese pode ser controlada pela respiração (PAVENTI et al., 2006), e as vias alternativas da respiração como a oxidase alternativa (AOX), proteína desacopladora (UCP) e os canais de potássio (SWEETLOVE et al., 2006; VAN AKEN et al., 2009) .

As plantas apresentam, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, uma via não conservadora de energia. Assim, a respiração dependente da AOX não está associada com conservação de energia, proporcionando flexibilidade da cadeia de transporte de elétrons. Isto pode ampliar as condições metabólicas sob as quais a respiração pode funcionar efetivamente, permitindo a transição de um metabolismo catabólico para um anabólico (VANLERBERGHE et al., 2009). Nesse contexto, em alguns casos, a atividade da AOX pode ser necessária para: prover adequadamente

intermediários da respiração para biossíntese, consumir excesso de carboidratos, superar as limitações relacionadas à ADP/Pi durante o crescimento com P limitado e regular níveis de piruvato (VAN AKEN et al., 2009). Para avaliar o impacto da AOX na tolerância a estresse, muitos estudos têm lançado mão das técnicas de genética reversa e transgenia. De forma geral, os resultados apresentados indicam que ao inibir AOX a sensibilidade ao estresse aumenta (WANG; VANLERBERGHE, 2013). Considerando que a mitocôndria tem grande papel como sinalizador de estresse, (VANLERBERGHE et al., 2009) sugerem que a atividade da AOX define o quão forte será a sinalização do estresse.

O déficit hídrico afeta as funções metabólicas, fisiológicas e o crescimento da planta. Por ser o primeiro órgão a detectar as mudanças das condições do solo, a raiz é essencial nas respostas à seca. Sob condições normais, a raiz absorve água e nutrientes do solo que vão suplementar o corpo da planta, desempenhando assim um papel central na manutenção da homeostase celular (GHOSH; XU, 2014). No entanto, o sistema entra em desequilíbrio diante de um estresse, induzindo a raiz a adotar uma série de modificações estruturais e funcionais. Como exemplo dessas modificações incluem alterações moleculares, celulares, metabólicas e fenotípicas (PEREZ-ALFOCEA et al., 2011). Alterações essas que podem ser acompanhadas, dentre outras, por meio de proteômica.

Mudanças no perfil proteico do sistema radicular sob condições ambientais desfavoráveis têm sido analisadas em várias espécies, como soja (TOORCHI et al., 2009), trigo (DEMIREVSKA et al., 2008) e cana (JANGPROMMA et al., 2010). Nesse sentido, MESQUITA (2013) realizou trabalhos de déficit hídrico com duas cultivares de soja contrastantes quanto à tolerância à seca, sendo uma sensível (BR16) e outra tolerante (Embrapa 48). Análises de proteoma e metaboloma das raízes demonstraram que a expressão de proteínas e metabólitos respiratórios são maiores na cultivar tolerante, fornecendo evidências de que existe uma menor redução da respiração sob déficit hídrico, o que parece contribuir substancialmente para o mecanismo de tolerância à seca.

A raiz tem a capacidade de perceber rapidamente as mudanças abióticas que ocorrem no solo, como conteúdo de água, de oxigênio e de nutrientes. A sensibilidade da raiz às alterações hídricas é uma importante adaptação da planta ao déficit hídrico (SCHACHTMAN; GOODGER, 2008). Por meio do xilema, os sinais de seca são transmitidos à folha que desencadeia uma série de respostas, como redução da perda

de água e do crescimento (PEREZ-ALFOCEA et al., 2011). O ácido abscísico (ABA) é um exemplo de sinalizador de estresse da raiz para a parte aérea (ALBACETE et al., 2014).

A produção de ABA na raiz e o transporte para as folhas é um importante mecanismo para sinalizar o status hídrico do solo, induzindo fechamento estomático e por consequência diminuindo a transpiração (RIBEIRO et al., 2009). Além disso, a produção de ABA na raiz faz com que o crescimento radicular seja mantido, favorecendo a absorção de água no solo (WILKINSON et al., 2012). O ABA apresenta um importante papel na adaptação das plantas aos diferentes estresses ambientais, atuando na sinalização de tradução de compostos, na regulação de transcritos e genes relacionados à proteção da planta (LI et al., 2010), e, mais especificamente, na regulação das vias alternativas da respiração (AOX e UCP) (MILLAR et al., 2011). Um exemplo do ABA agindo em respostas a situações adversas é o trabalho de MESQUITA (2013). Nele, a autora encontrou maiores teores de ABA diante do estresse hídrico em plantas de soja, sendo os maiores teores registrados no genótipo tolerante. Os altos níveis de ABA foram associados a maior proteção ao estresse oxidativo e, potencialmente, na maior condutividade hidráulica.

Muitos mecanismos de tolerância à seca já foram estudados, no entanto, pouca atenção foi dada às respostas das raízes frente ao déficit hídrico, principalmente no que diz respeito a metabolismo respiratório e antioxidativos destes tecidos. Essa tese objetivou estudar o papel da respiração radicular e do ABA como mecanismo de tolerância a deficiência hídrica em dois genótipos contrastantes de soja quanto à tolerância à seca: Embrapa 48 (tolerante) e BR 16 (sensível).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal, condições de crescimento e aplicação dos tratamentos**

#### **2.1.1 Experimento 1**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com temperatura ambiente de  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $60 \pm 20\%$ . Sementes de soja das cultivares Embrapa 48 (cultivar tolerante ao déficit hídrico) e BR 16 (cultivar sensível ao déficit hídrico) foram colocadas para germinar em rolo de papel em BOD (Biochemical Oxygen Demand) a  $30^\circ\text{C}$  por uma semana. Em seguida, as plântulas foram transferidas para vasos de 10 litros contendo substrato comercial. Cada vaso haviam 3 plântulas.

Ao atingirem o estágio de desenvolvimento V4 (terceiro trifólio completamente expandido) (FEHR; CAVINESS, 1977), as plantas foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) ou submetidas a déficit hídrico, imposto pela suspensão da irrigação, até alcançar um potencial hídrico na antemanhã ( $\Psi_{am}$ ) de  $-1,0 \pm 0,1$  MPa e  $-1,5 \pm 0,1$  MPa, valores que caracterizam uma condição de estresse moderado e severo em soja, respectivamente, definidos em estudos preliminares com os mesmos genótipos (MESQUITA, 2013). Para avaliar a resposta à seca, um quarto grupo de plantas foi mantido para serem reirrigadas quando alcançaram o déficit severo. Após 5 dias de reirrigação as plantas foram avaliadas.

#### **2.1.2 Experimento 2**

Um segundo experimento foi realizado para avaliar o efeito da aplicação exógena de ABA e de seu inibidor (fluridona) na tolerância à seca nas cultivares de soja Embrapa 48 e BR 16. A fluridona atua como inibidor da biossíntese da ABA, nas rota de síntese de carotenoides. O ensaio foi conduzido como descrito acima, com a diferença que ABA ( $50\mu\text{M}$ ) ou fluridona ( $50\mu\text{M}$ ) foram aspergidas uma vez ao dia (às 9:00) em todas folhas e na região do coleto a partir da imposição do estresse. Durante a aplicação do ABA ou fluridona, as plantas dos demais tratamentos eram protegidas, de forma a garantir que não houvesse contaminação.

Por ocasião da coleta, as raízes de soja foram lavadas e condicionadas em envelopes de papel aluminizado, congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$ , até posterior análise.

O delineamento experimental utilizado foi blocos inteiramente casualizados (DIC), com 5 repetições. Os dados foram submetidos à um teste de médias, Tukey a 5 % de probabilidade.

## 2.2 Determinação de trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida do CO<sub>2</sub> (*A*), a condutância estomática ao vapor d'água (*g<sub>s</sub>*), a taxa transpiratória (*E*) e razão interna e externa de carbono (razão *C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>*) foram determinadas nas folhas mais jovens completamente expandidas a partir do ápice, por intermédio de um analisador de gases a infravermelho (IRGA; modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA). As medições aconteceram entre 08:00 e 11:00 a.m., em casa de vegetação, utilizando radiação fotossinteticamente ativa (*PAR*) constante (1000 μmol fótons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), e 400 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>, temperatura e umidade ambiente. A eficiência instantânea do uso da água foi calculada pela razão *A/E* e a eficiência de carboxilação pela razão *A/C<sub>i</sub>*.

## 2.3 Teor relativo de água

Para determinação do teor relativo de água (TRA) foram retirados 3 discos foliares (5 mm de diâmetro) de cada planta, e pesadas para obter valores da massa fresca. Os discos pesados foram transferidos para placas de Petri e permaneceram a temperatura ambiente submersos em água destilada por um período de 4 h. Após esse período, os discos foram dispostos em papel de filtro para retirar o excesso de água e em seguida pesados novamente para determinar a massa túrgida. Em seguida, os discos foram levados a estufa a 70 °C até obtenção da massa constante e posteriormente determinada a massa seca. Os resultados estão expressos em porcentagem, conforme fórmula de SLAVICK (1979) descrita abaixo:

$$\text{TRA (\%)} = \frac{\text{MF1} - \text{MS}}{\text{MF2} - \text{MS}} \times 100$$

TRA: teor relativo de água

MF1: matéria fresca

MF2: matéria turgida, após 4h de saturação em água destilada

MS: matéria seca, determinada após aproximadamente 24h em estufa

## **2.4 Respiração radicular**

Ao fim da aplicação dos tratamentos, fragmentos radiculares (~150 mg do ápice da raiz) foram coletados, lavados, pesados e levados imediatamente para quantificação da respiração. A respiração radicular foi inferida por meio de consumo de O<sub>2</sub> utilizando um eletrodo de oxigênio tipo Clark (Hansatech LD2/3 leaf disc electrode unit). A evolução do consumo de O<sub>2</sub> foi acompanhada durante 5 minutos. A taxa de consumo de oxigênio está expressa em nmol de O<sub>2</sub> consumido por grama de matéria fresca de raiz.

## **2.5 Análise morfológica das raízes**

As raízes foram lavadas em água e armazenadas em recipientes de plásticos de 300mL contendo álcool etílico 25 % e mantidas a temperatura ambiente. Diferentes parâmetros morfológicos foram determinados por análise de imagens obtidas através do programa WinRhizo (WinRhizo Pro, Régent Instruments, Québec, Canada). As imagens do sistema radicular foram capturadas através de um scanner (Image scanner III com imagem DPI 23,6 pixels.mm<sup>-1</sup>) que continha uma cuba de acrílico de 20 cm de largura por 30 cm de comprimento contendo água, onde as raízes foram dispostas. A utilização deste acessório permitiu a obtenção de imagens, evitando a sobreposição das raízes, caracterizando um método muito preciso. Foram determinados o comprimento, diâmetro, volume e área superficial.

## **2.6 Perfil metabólico**

Para a extração dos metabólitos, o material vegetal foi pulverizado em nitrogênio líquido, pesado (cerca de 200 mg) e acondicionado em microtubo (2,0 mL). Acrescentou-se 1,5 mL de solução extratora gelada (-20 °C) contendo água:metanol:clorofórmio (1:2,5:1), adicionando-se a cada amostra 60 µL de ribitol como padrão interno (0,2 mg.mL<sup>-1</sup> em água ultra pura), seguido por vortex e agitação por 15 min a 70 °C. Após, proceder uma centrifugação por 10 min a 14000 x g o

sobrenadante foi coletado em um novo microtubo. Com o sobrenadante foi realizado uma partição com 1500  $\mu\text{L}$  de água ultra pura, seguido de vortex e centrifugação por 15 min a 14000 x g, sendo coletada toda a fração superior (polar). Cerca de 500  $\mu\text{L}$  da fase superior da centrifugação, correspondente à fase polar da amostra, foi fracionada e transferida para tubos de reação de 1,5 mL em volumes menores, secando a amostra sob vácuo (speed vac) e depois armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

As amostras para serem analisadas no GC-MS passaram por derivatização. Esta etapa consistiu em adicionar às amostras 40  $\mu\text{L}$  de piridina contendo metoxiamina hidrocloreto a  $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  onde deixou sob agitação por 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após esse período foi adicionado 70  $\mu\text{L}$  da solução de MSTFA ( $20 \mu\text{L mL}^{-1}$  da mistura padrão do tempo de retenção) e aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Por fim, 100  $\mu\text{L}$  da alíquota foi transferida para recipientes de vidro tipo vial para análise subsequente.

As amostras foram analisadas utilizando um sistema GC-MS TruTOF GC-TOFM: GC Cromatógrafo Agilent, 7890A e Espectrômetro de massas TruTOF® HT TOFMS, Leco, equipado com uma coluna capilar de 30 m (MDN-35) de acordo com (LISEC et al., 2006). Um  $\mu\text{l}$  da amostra foi injetada no modo *splitless* a  $230^{\circ}\text{C}$  carregado pelo gás hélio (fluxo contínuo) de  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . A temperatura da coluna foi inicialmente mantida constante a  $80^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, aumentou-se  $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até alcançar  $330^{\circ}\text{C}$ , sendo essa temperatura mantida durante 5 minutos. Os dados foram processados no programa TargetSearch (CUADROS-INOSTROZA et al., 2009).

## 2.7 Atividade de antioxidantes

### 2.7.3 Antioxidantes de alto e baixo peso molecular

Com a finalidade de otimizar o estudo do metabolismo antioxidativo, a metodologia proposta por SALEH; PLIETH (2009) foi utilizada. Em seus trabalhos os autores propuseram um número mínimo de parâmetros, dos quais pudessem obter o maior número de informações possíveis. Para isso, dois ensaios de bioluminescência foram realizados. O primeiro avaliou a capacidade antioxidativa de baixo peso molecular (TAC) (SALEH; PLIETH, 2010b). No segundo, foram quantificados os antioxidantes de alto peso molecular (SOSA) (SALEH; PLIETH, 2010a).

Nas raízes, já maceradas (50 mg), foi adicionado o tampão gelado desgaseificado ( $100 \text{ mM TRIS/HCl pH } 8.6 + 2 \text{ mM CaCl}_2 + 1 \text{ mM Triton}^{\circledR} \text{ X-100}$ ) em volume 10 vezes maior que o volume da amostra. Em seguida os tubos foram

agitados em vortex por 2 min e filtrados em papel filtro a 0 °C. Este extrato foi aliquotado por membrana de filtração (TAC) ou por diálise (SOSA).

Para as análises dos antioxidantes de baixo peso molecular o extrato foi transferido por um tubo de 50 mL contendo uma membrana (MWCO = 10 kDa, VivaSpin 20, VivaScience, Germany, <http://www.vwr.de>) e centrifugado a 0°C, 12000 rpm, 20 min. As amostras foram diluídas em tampão constituído de Tris (1M, pH 8,6), CaCl<sub>2</sub> (2mM) e Triton-X-100 (1mM). Em seguida iniciou-se a leitura em um quimioluminômetro. A reação foi baseada na luminescência produzida pela reação das amostras com luminol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os antioxidantes de baixo peso molecular e compostos fenólicos podem interferir nas atividades enzimáticas dos antioxidantes de alto peso molecular. Esses compostos foram removidos por diálise do extrato bruto em tubos de membrana de diálise (MWCO = 10 kDa; Roth #E668.1). Para cada 100µl de extrato dialisado foram adicionados 2 mL de tampão gelado. Esse teste é baseado na inibição da quimioluminescência emitida pela coelenterazina (molécula emissora de luz) quando está oxidada por superóxidos.

Os resultados foram expressos em relação a massa fresca. Os ensaios de luminescência foram conduzidos com um quimioluminômetro (VICTOR™ X5 Multilabel Plate Reader | PerkinElmer).

### **2.7.2 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)**

A extração enzimática foi feita com 0,1 g de massa fresca de raiz maceradas em N<sub>2</sub> líquido, em seguida foi adicionado 2 mL de meio de extração constituído de tampão Fosfato (0,1 M pH 6,8), EDTA (0,1 mM) e PMSF (1 mM). Foi realizada centrifugação a 14000 rpm, 15 minutos a 4 °C e retirado o sobrenadante que foi utilizado como extrato enzimático.

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 20 µL do extrato enzimático bruto a 280 µL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM (HAVIR; MCHALE, 1987). Durante o primeiro minuto de reação, mantida a 25 °C, foi acompanhado o decréscimo na absorvância a 240 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (ANDERSON et al., 1995) e expressa em µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

### **2.7.3 Peroxidase do Ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)**

A atividade da APX foi determinada pela adição de 20  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 280  $\mu\text{L}$  de meio de reação constituído de ácido ascórbico 0,8 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,0 mM, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0. Foi observado o decréscimo na absorvância a 290 nm, à 25°C, durante o primeiro minuto de reação (NAKANO; ASADA, 1981). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

### **2.7.4 Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)**

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 20  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 280  $\mu\text{L}$  de meio de reação, constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75  $\mu\text{M}$ , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2  $\mu\text{M}$  (DEL LONGO et al., 1993). A reação foi conduzida a 25°C, numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel aluminizado. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi determinada pela medição da absorvância a 560 nm. O branco foi obtido nas mesmas condições, porém, sem a presença de luz (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

### **2.7.5 Glutathione Redutase (GR)**

Para estudos da atividade da glutathione redutase, o tampão usado continha 100 mM fosfato de potássio pH 7,4, 0,1 mM NADPH, 1 mM GSSG. A atividade da GR é baseada na absorção de luz pelo NADPH, o co-substrato da GR. A queda da absorção  $\lambda_{\text{ABS}} = 340 \text{ nm}$  foi registrada em espectrofotômetro depois de injetar amostras contendo GR. Foi calculada a decadência do sinal de NADPH (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A atividade enzimática foi estimada usando-se o coeficiente de extinção molar  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

## **2.8 Atividade de enzimas da cadeia respiratória**

Amostras de raízes foram utilizadas para aferir a atividade enzimática de algumas enzimas envolvidas na cadeia respiratória. Aproximadamente 50 mg de amostra, maceradas em nitrogênio líquido, foram colocadas em microtubos e agitadas em vórtex com o tampão de extração (GIBON et al., 2004). O tampão de extração foi composto por 10% (v/v) glicerol, 0.25% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 50 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM benzamidina, 1 mM ácido aminocapróico, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoride, 10 mM leupeptina, e 1 mM DTT. Fenilmetilsulfonil fluoride foi adicionado imediatamente antes da extração. Em seguida, foi centrifugado por 5 min a 14000 rpm à 4 °C. A atividade enzimática foi conduzida conforme (GIBON et al., 2004; NUNES-NESI et al., 2007)) para as seguintes enzimas: PGM: fosfoglicomutase; PFK: fosfofrutocinase; TPI: triose-fosfato isomerase; GaPDH NADH: gliceraldeído-3P desidrogenase dependente de NADH; PGK: fosfoglicerato cinase; MDH: malato desidrogenase dependente de NAD, aldolase e enolase.

## **2.9 Expressão gênica**

### **2.9.1 Extração de RNA**

Para cada tratamento, RNA total das amostras de raízes foi extraído pelo método trizol. O reagente Trizol foi preparado utilizando 38 % de fenol ácido pH 4,5, 0,8 M de tiocianato de guanidina; 0,4 M tiocianato de amônio; 0,1 M acetato de sódio pH 5,0; 5 % de glicerol e água livre de Rnases tratada com DEPC (dietil pirocarbonato). Ao tecido macerado acrescentou-se 1 mL do tampão de extração, o sobrenadante foi centrifugado com cloreto de sódio 5N e clorofórmio para a separação das fases. A fase aquosa contendo o RNA foi separada e precipitada com igual volume de isopropanol. Em seguida, as amostras foram lavadas com etanol 75 % por 2 vezes. Após ressuspensão em água miliQ DEPC, o RNA foi quantificado e tratado com Dnase (DnaseI – Fermentas) seguindo protocolo do fabricante. A integridade foi checada por eletroforese em gel de agarose a 1 %. A concentração e pureza do RNA determinada usando espectrofotômetro NanoDrop e Qubit.

### **2.9.2 Síntese de cDNA**

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA total das raízes de soja utilizando o Kit Improm-IITM Reverse Transcription System Promega, seguindo o protocolo do fabricante. Padronizando 1 µg de RNA, foram feitas as sínteses de cDNA. A reação de transcriptase reversa, para um volume final de 20 µL, foi realizada em termociclador e as amostras foram conservadas no freezer a -20° C até o uso.

### **2.9.3 Real time PCR**

A expressão dos genes foi avaliada por análise em RT PCR em tempo real através do StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems, pelo sistema de detecção SYBR Green I. Pares de primers foram desenhados no site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Quantprime ([www.quantprime.de](http://www.quantprime.de)). Foram utilizados primers (tabela 1) para genes responsivos a estresse hídrico e envolvidos na respiração e na atividade de antioxidantes. Para normalização dos dados de expressão gênica utilizou-se o gene de referência da ACT11 (cytoskeletal structural protein) (KULCHESKI et al., 2010; STOLF-MOREIRA et al., 2010).

Os ensaios de qPCR foram realizados em microtubos de 0,5 mL. Para a detecção das sequências foi usado EvaGreen® qPCR, segundo recomendações do fabricante. Para cada amostra, 25 ng de cDNA foram usados nas reações com volume final de 10 µl. Para cada combinação de primers, triplicatas técnicas e um controle sem os primers foram usadas. As reações foram incubadas por 12 min a 95 °C e ciclos de 40 ampliações de 15 s a 95 °C, 20 s a 60 °C e 20s a 72 °C. Ao final de 40 ciclos, a análise da curva melting foi realizada. Análise em gel de eletroforese a 1% foi realizada para confirmar presença apenas do produto amplificado. A eficiência do primer foi estimada para cada experimento usando curvas padrões. Além disso, os valores do threshold (Cq) foram convertidos pelo programa QBASE, dentro da quantidade relativa normalizada.

Tabela 1: Primers utilizados para análise de expressão gênica. ACO: aconitase; ACT: actina; AOX1: oxidase alternativa 1; AOX2b: oxidase alternativa 2b; MDC: malato desidrogenase citosólica; MDM: malato desidrogenase mitocondrial; OGD: oxoglutarato desidrogenase; PK: piruvato cinase; SCR:scarecrow.

Gene	Primer foward	Primer reverse	Amplicon (pb)
ACO	TGCAGAGAAATACAAGAG TGAAGGGC	GCTTTCACGCCAGTAGC ATTGG	117
ACT	TCTCTCAGCACTTTCCAAC AGATGTG	GAGGACGCTGTACCTAC ACCAAGC	123
AOX 1	TTCGAGGCCGAAGGTTGTG AGAG	ACTCTCCCACGGCATGAA GCAG	70
AOX 2b	CAATAGACGTGACCAAGC ATCATAACC	GCATGGCACCCATACCGT TCCTTG	149
MDC	GAAGGTATGGAGAGGAAG GATGTGATGAC	GCTGGGTTAGCAACAAC AAGAACCTTG	119
MDM	TCAATGGAGTCCCAGATGT TGTGGAG	CCATTCTTCCCAAGCCTC ACCTTG	109
OGD	ACCGTTTCTCCTCGATCCC ATATGTG	CTTGACACAAGGTGTGTG GATCCACCC	152
PK	CATTTGTTTCGTAAAGGCTC GGATCTTG	GACTCCCTCCTGATTCTC AACCTTTGAC	101
SCR	AGGAGGTTCTTGCAGACCT ATGGC	GCTCCTGCCAGCACATCA TAACC	80

## 2.10 Determinação de NAD/NADH/NAD(P)H

Para determinação dos nucleotídeos (NAD/NADH/NAD(P)H) foram utilizados aproximadamente 30 mg de tecido radicular macerados em nitrogênio líquido. O processo de extração e ensaios de NAD's (nicotinamida adenina dinucleotídeo) foi realizado de acordo com o método de SCHIPPERS et al. (2008).

## 2.11 Perfil hormonal

Os hormônios foram extraídos seguindo metodologia proposta por MULLER; MUNNE-BOSCH (2011) com modificações. Para a quantificação de fitohormônios, foi macerada cerca de 300 mg. O material vegetal foi colocado em microtubos de 2 mL e em seguida adicionado 600 µL da solução de extração (metanol:isopropanol:ác.acético – 20:79:1). Neste ponto, foi acrescentado ANA (ácido naftaleno acético) como padrão interno (50 ng/mL) de modo a corrigir variações e perdas durante a extração. Cada amostra foi agitada em vortex 4 vezes por 20 segundos e sonicada por 5 minutos. Após sonicção, foi mantida no gelo por 30 minutos, para

em seguida ser novamente sonicada e centrifugada a 13.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi pipetado ( $\cong 550 \mu\text{L}$ ) para novos tubos de 1,5 mL. Ao precipitado que se formou foi refeita a extração como descrita anteriormente. O último sobrenadante foi combinado ao da primeira extração e centrifugado a 20.000 g por 5 minutos. 600  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foi coletado para novos tubos de 1.5 mL para ser analisado no triploquadropolo (QQQ).

As amostras foram automaticamente injetadas (5  $\mu\text{L}$ ) em um sistema LC-MS/MS usando Agilent 1200 Infinity Series acoplado a um espectrômetro de massas tipo triploquadropolo (QqQ), modelo 6430 Agilent Technologies. A Separação cromatográfica foi realizada por uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 50mm) (Agilent) em série com uma coluna Zorbax SB-C18, 1.8  $\mu\text{m}$  (Agilent). Os solventes usados foram: ácido acético 0,02% em água e ácido acético 0,02% em acetonitrila em um gradiente de tempo /%B: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. A taxa de fluxo do solvente foi 0,3mL/min a temperatura de 30 °C. O método de ionização usado na espectrometria de massas foi ESI (Electrospray Ionization) nas seguintes condições: temperatura do gás a 300 °C, taxa de fluxo de nitrogênio de 10L.min<sup>-1</sup>, pressão nebulizador de 35 psi e voltagem da capilaridade de 4000V.

O equipamento foi operado no modo MRM (Monitoramento de Múltiplas Reações). A massa do ion/fragmento foi monitorada para cada molécula: citocininas (zeatina) (220/136), precursor do etileno, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) (102, 1/56,2), ABA (263/153), AIA (176/130), SA (137/93), JA (209/59). Citocininas, AIA e ACC foram scaneadas no modo positivo, os demais hormônios em modo negativo. A curva de calibração (0,1 ng a 200 ng) foi feita usando os respectivos padrões para cada hormônio. Os dados gerados foram analisados no software “MassHunter Workstation” onde foram obtidos as áreas dos picos. Os resultados foram expressos em ng/g de tecido fresco.

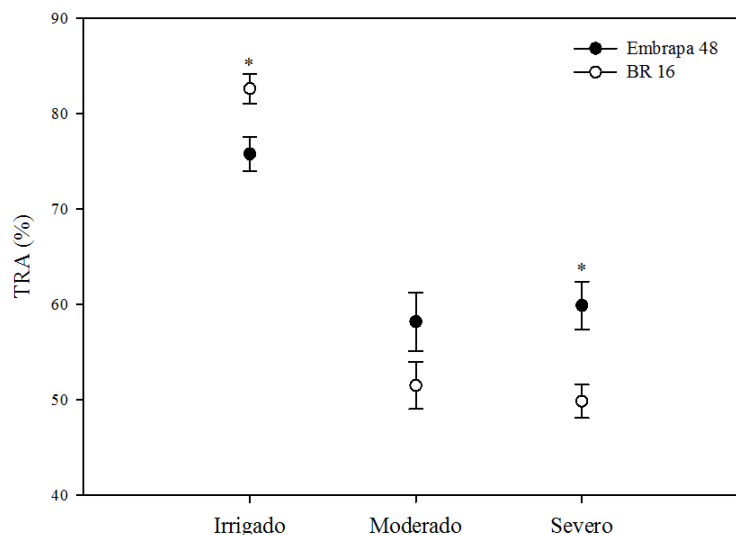
### 3. RESULTADOS

#### EXPERIMENTO 1

As duas cultivares levaram tempos diferentes para alcançarem os potenciais hídricos desejados, que correspondem ao estresse moderado (-1,0 MPa) e estresse severo (-1,5 MPa). A cultivar BR 16 atingiu o estresse moderado e severo em 10 e 12 dias, respectivamente. Já a Embrapa 48 alcançou esses mesmos potenciais hídricos em 12 (estresse moderado) e 14 dias (estresse severo). O tratamento reirrigado foi avaliado após 5 dias do reestabelecimento da irrigação.

#### 3.1 Teor relativo de água

Durante o experimento, o teor relativo de água (TRA) foi medido em situação de ausência de déficit hídrico (irrigado) e quando as plantas atingiram potenciais hídricos na antemãnhã no valor de -1,0MPa (estresse moderado) e -1,5MPa (estresse severo). O TRA (Figura 1) da cultivar Embrapa 48 foi menor no tratamento irrigado, porém, ao impor a deficiência hídrica foi a cultivar BR16 que obteve os menores teores relativos de água. Nas duas cultivares, o TRA decresceu com a suspensão da irrigação.

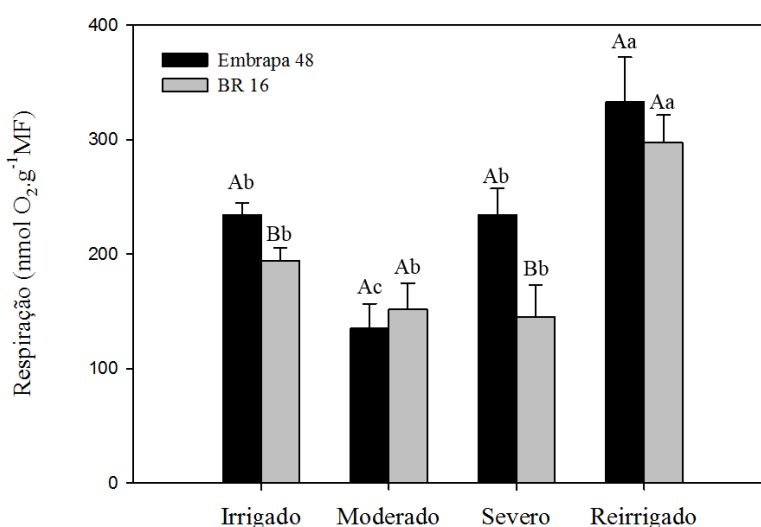


**Figura 1** Teor relativo de água (TRA) em cultivares de soja sob déficit hídrico. A barra representa erro padrão (n=5). O asterisco indica diferença significativa entre cultivares no mesmo tratamento pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3.2 Taxa respiratória de raízes sob déficit hídrico

Para melhor estudar a importância do metabolismo respiratório na tolerância à seca em cultivares de soja, o consumo de O<sub>2</sub> foi aferido em fragmentos radiculares frescos (Figura 2). A taxa respiratória das raízes da cultivar tolerante, comparadas à sensível, foi 20 % e 40 % maior quando estão em plena irrigação e sob estresse severo, respectivamente.

Outro fator interessante é a manutenção da respiração para cultivar Embrapa 48 em níveis severos de estresse, onde o consumo de O<sub>2</sub> é igual para plantas irrigadas. Ao passo que a respiração para BR 16 permanece reduzido.

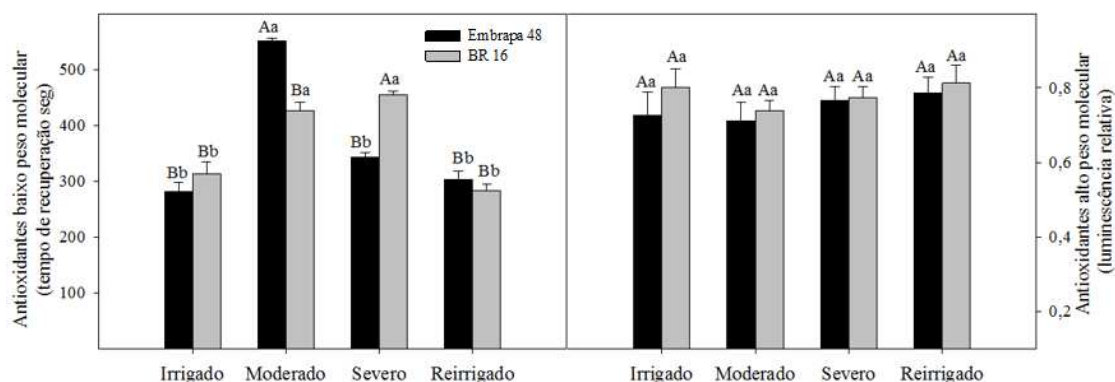


**Figura 2** Taxa respiratória de raízes em cultivares de soja sob déficit hídrico. Cultivar tolerante é Embrapa 48 (barras pretas) e a cultivar sensível é BR 16 (barras claras). Os diferentes grupos correspondem aos tratamentos. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento entre cultivares diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias dentro de uma mesma cultivar, (Tukey,  $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ).

### 3.3 Metabolismo antioxidativo de raízes sob deficiência hídrica

Uma forma de compreender o metabolismo de defesa a estresse é avaliando a capacidade antioxidativa das células. Análises conjuntas de antioxidantes de alto e de baixo peso molecular possibilitam uma visão do sinergismo de diferentes classes de antioxidantes celulares (Figura 3). Antioxidantes de baixo peso molecular (por exemplo, glutathiona, compostos fenólicos, ácido ascórbico, tocoferol, entre outros) foram superiores quando em estresse moderado para Embrapa 48. Já em estresse severo, foi maior para a cultivar BR 16. Na cultivar sensível à seca (BR 16), os níveis de antioxidantes durante o estresse foram maiores que o controle. Diferente da cultivar

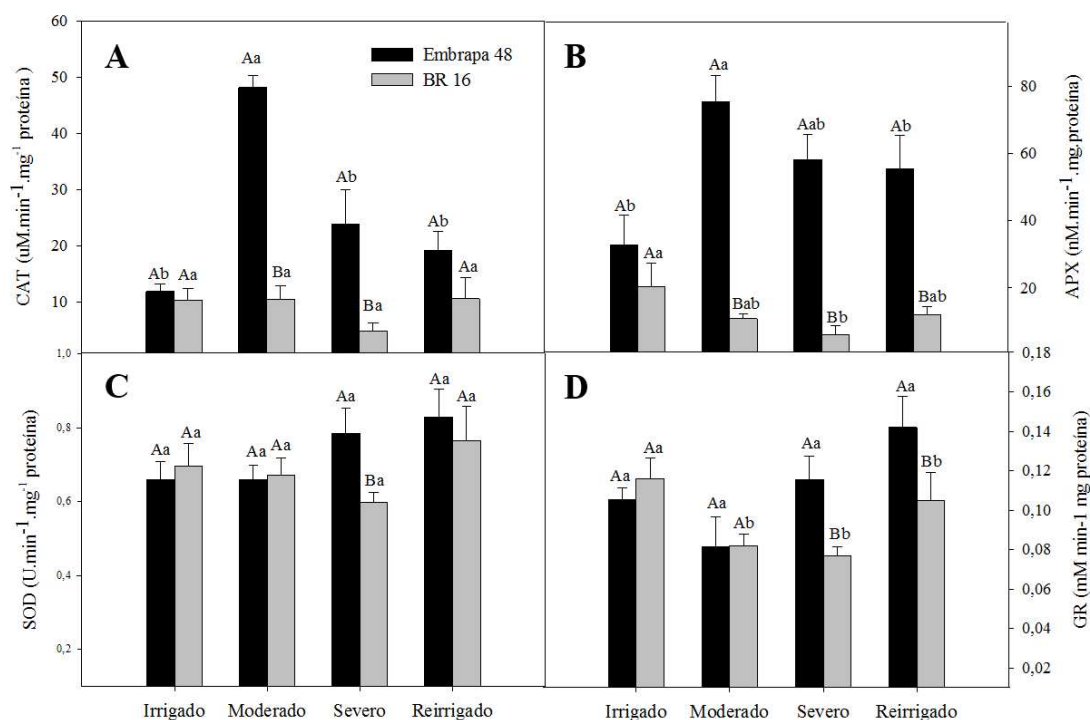
tolerante à seca (Embrapa 48), em que estes níveis são maiores somente no estresse moderado, sendo semelhantes nas plantas irrigadas e sob estresse severo. Quanto aos antioxidantes de alto peso molecular (como proteínas e polifenóis) não verificou-se diferenças para nenhum nível de estresse em ambas cultivares.



**Figura 3** Antioxidantes de baixo e alto peso molecular em raízes de cultivares de soja sob déficit hídrico. Cultivar tolerante é Embrapa 48 (barras pretas) e a cultivar sensível é BR 16 (barras claras). Os diferentes grupos correspondem aos tratamentos. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento entre cultivares diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias dentro de uma mesma cultivar, (Tukey,  $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ).

Após essas análises abrangentes, um estudo mais detalhado do mecanismo enzimático antioxidativo foi efetuado para melhor entender como são as respostas das raízes de soja à seca (Figura 4). Em geral, pode-se verificar que a cultivar Embrapa 48, tolerante à seca, possui maior atividade das enzimas antioxidativas aqui analisadas. Para a catalase e para a peroxidase do ascorbato, pode-se notar claramente que, para a cultivar Embrapa 48, a imposição do estresse aumentou a sua atividade, chegando a valores até 4 vezes maiores do que o genótipo sensível sob estresse moderado. Enquanto que na reirrigação não notou-se diferença entre os genótipos para a catalase, a peroxidase do ascorbato foi maior para Embrapa 48.

Para a SOD diferenças significativas entre os dois genótipos foram encontradas apenas no tratamento de estresse severo, sendo a atividade superior para Embrapa 48. A atividade da glutathiona redutase foi maior para a cultivar tolerante durante o estresse severo e também na reidratação.



**Figura 4** Atividade das enzimas catalase (A), peroxidase do ascorbato (B), dismutase do superóxido (C) e glutaciona redutase (D) em cultivares de soja sob déficit hídrico. Cultivar tolerante é Embrapa 48 (barras pretas) e a cultivar sensível é BR 16 (barras claras). Os diferentes grupos correspondem aos tratamentos. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento entre cultivares diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias dentro de uma mesma cultivar, (Tukey,  $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ).

### 3.4 Atividade de enzimas glicolíticas de raízes após imposição de deficiência hídrica

O ensaio de atividade enzimática é capaz de prover informações funcionais das proteínas, por isso, estudo de algumas enzimas glicolíticas foi conduzido para verificar como estas se comportam durante a imposição do estresse, e se haveria alguma diferença entre as duas cultivares. Foram medidas as atividades de 8 enzimas (Figura 5): fosfoglicomutase (PGM), fosfofrutocinase (PFK), triose-fosfato isomerase (TPI), gliceraldeído-3P desidrogenase dependente de NADH (GaPDH NADH), fosfoglicerato cinase (PGK), malato desidrogenase dependente de NAD (MDH), aldolase e enolase.

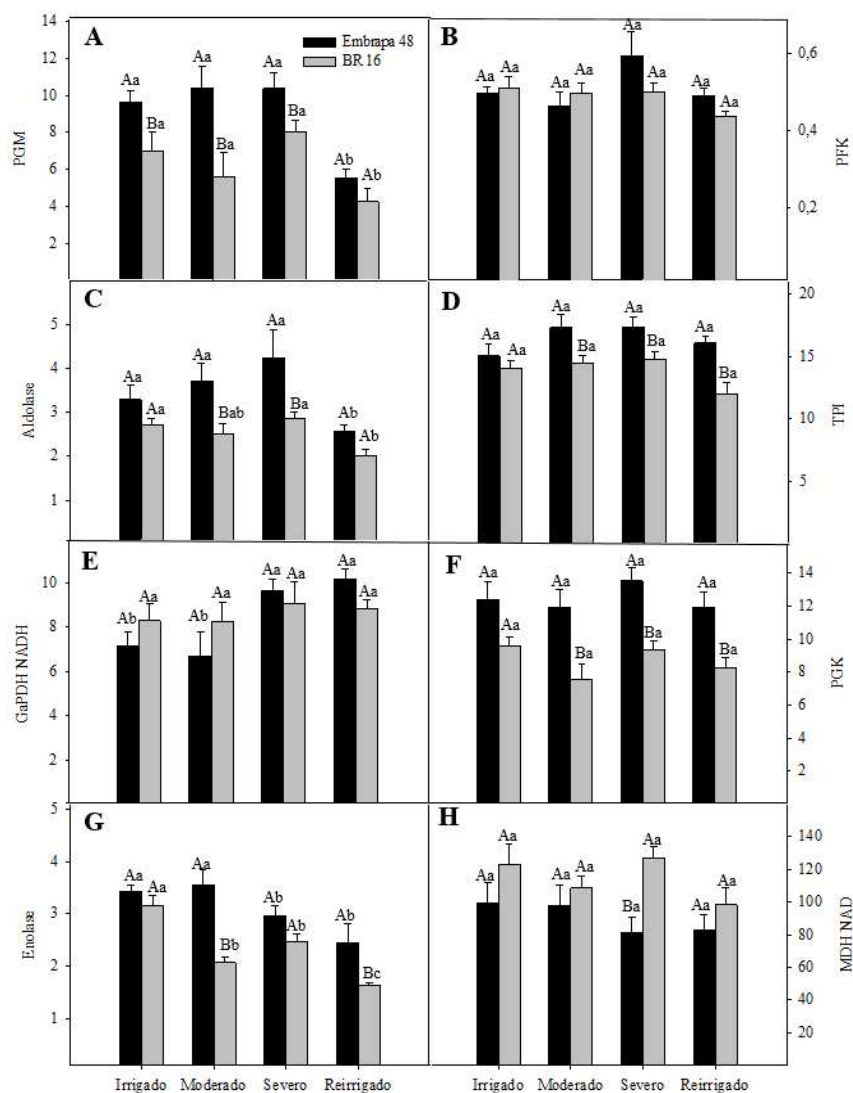
A cultivar tolerante apresentou, sob estresse moderado e severo, entre as 8 enzimas glicolíticas estudadas aqui, maiores níveis da atividade em 5 destas (PGM, Aldolase, TPI, PGK e Enolase).

A enzima PGM (Figura 5A) tem maior atividade na cultivar Embrapa 48 quando irrigada, e também nos dois níveis de estresse. Curiosamente, ambas cultivares apresentam uma redução sob reirrigação, e não diferem entre si nesta condição.

A atividade das enzimas aldolase, TPI e PGK são maiores na cultivar Embrapa 48 no estresse moderado (32%, 16% e 36%, respectivamente) e severo (32%, 14% e 31%, respectivamente), e sob a reirrigação, as enzimas TPI e PGK tem maior atividade nesta cultivar, enquanto a enzima aldolase não apresenta diferenças.

Para a enzima enolase (Figura 5G), só foi encontrada maior atividade para a cultivar Embrapa 48 sob estresse moderado e reirrigação. Para esta enzima é que foi observado a única redução da atividade de uma enzima glicolítica sob estresse moderado (na cultivar BR 16) e severo (nas duas cultivares). Assim como visto para a aldolase, a enolase também houve uma redução na atividade de ambas enzimas sob reirrigação.

Somente para duas enzimas PFK e GAPDH, entre as 8 estudadas, observou-se que não ocorreu nenhuma modificação na atividade, em ambos os genótipos, em todos os tratamentos. Embora isto também ocorra para a enzima MDH sob estresse moderado e reirrigação. No entanto, sob estresse severo, observamos o único caso onde a atividade de uma enzima (MDH) é maior na cultivar sensível à seca (BR16).

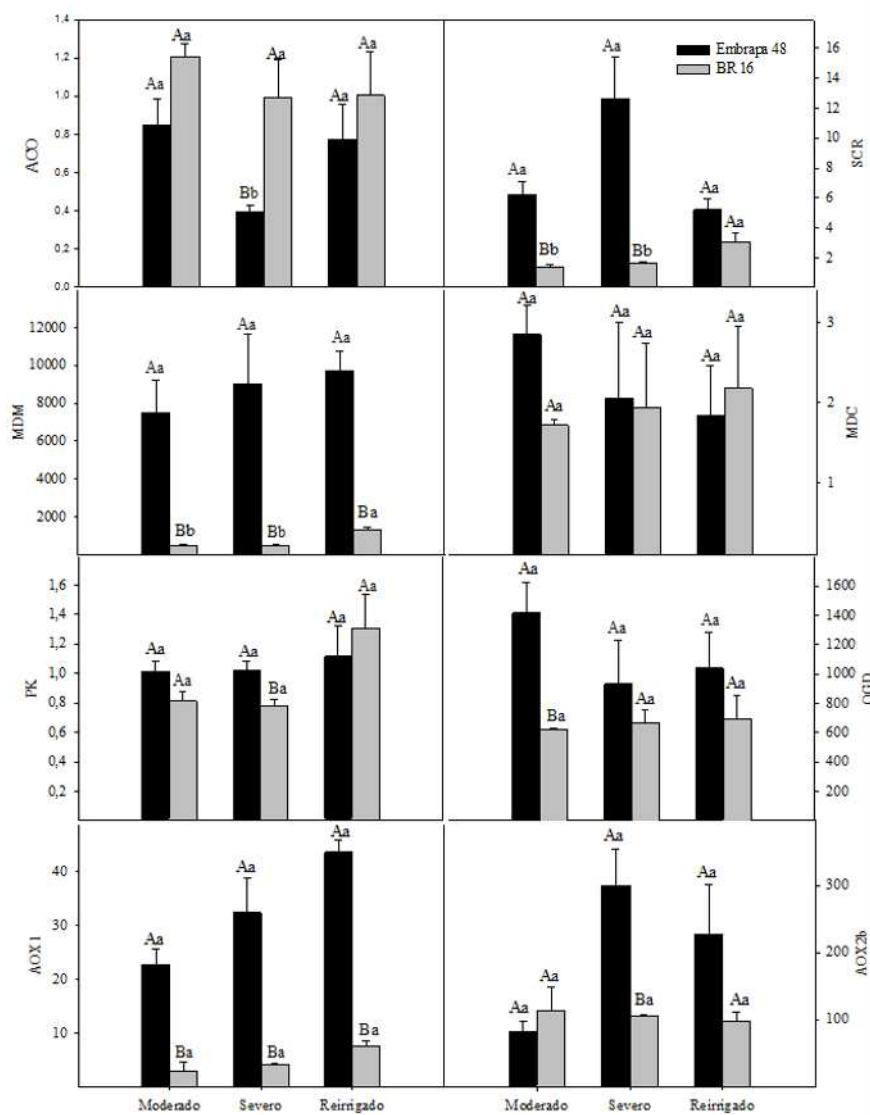


**Figura 5** Atividade enzimática em cultivares de soja sob déficit hídrico. Dados expressos em  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de matéria fresca. PGM: fosfoglicomutase; PFK: fosfofrutocinase; TPI: triose-fosfato isomerase; GaPDH NADH: gliceraldeído-3P desidrogenase dependente de NADH; PGK: fosfoglicerato cinase; MDH: malato desidrogenase dependente de NAD. Cultivar tolerante é Embrapa 48 (barras pretas) e a cultivar sensível é BR 16 (barras claras). Os diferentes grupos correspondem aos tratamentos. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento entre cultivares diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias dentro de uma mesma cultivar, (Tukey,  $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ).

### 3.5 Expressão gênica de raízes após imposição de deficiência hídrica

Os genes escolhidos para estudos de expressão relativa (Figura 6) são referentes a algumas enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico (cujas atividades enzimáticas não foram medidas), o fator transcricional Scarecrow que está envolvido na divisão celular em raízes e oxidase alternativa (AOX) da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

A expressão relativa foi calculada usando o cálculo do delta-CT, sendo então normalizada ao valor 1 para a expressão do gene no tratamento controle. Os dados do grupo controle não foram apresentados no gráfico pela sua obviedade (valor sempre 1 para o tratamento controle, em todos os genes) e a problemas de escala ligada a magnitude da diferença de expressão de vários genes.



**Figura 6** Expressão gênica relativa em raízes de cultivares de soja sob déficit hídrico. ACO: aconitase; SCR:scarecrow; MDM: malato desidrogenase mitocondrial; MDC: malato desidrogenase citosolica; PK: piruvato cinase; OGD: oxoglutarato desidrogenase; AOX1: oxidase alternativa 1; AOX2b: oxidase alternativa 2b. Cultivar tolerante é Embrapa 48 (barras pretas) e a cultivar sensível é BR 16 (barras claras). Cultivar tolerante é Embrapa 48 (barras pretas) e a cultivar sensível é BR 16 (barras claras). Os diferentes grupos correspondem aos tratamentos. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento entre cultivares diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias dentro de uma mesma cultivar, (Tukey,  $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ).

Quatro grupos de genes tiveram grandes aumentos na expressão em resposta ao déficit hídrico, sendo que, para pelo menos um dos níveis de estresse, foi maior na cultivar Embrapa 48 (tolerante). No primeiro grupo, representado aqui pelo gene malato desidrogenase mitocondrial (MDM), ocorreu o mais notável aumento da expressão sob estresse hídrico para ambos os genótipos. Este aumento chegou a ser cerca de 20 vezes maior sob estresse severo na cultivar tolerante se comparada a cultivar sensível. Sob reirrigação, ambas as cultivares permaneceram com altos níveis de expressão da MDM mas, novamente, muito superior na tolerante. O segundo grupo com maior aumento sob estresse, é representado pelo gene oxoglutarato desidrogenase (OGD). No estresse moderado o nível de mRNA deste gene teve aumento em torno de 1400 vezes em relação ao controle na cultivar tolerante, enquanto a metade deste aumento (700 vezes) foi observado para a cultivar BR 16. Sob estresse severo as cultivares não diferiram entre si, mas o acúmulo deste mRNA ficou entre 700 e 1000 vezes superiores ao nível do controle. O terceiro grupo de genes com maior aumento de sua expressão sob estresse, é representado pelos dois genes da AOX estudados aqui. Para o gene da AOX2b, estes níveis chegam a 300 vezes ao do controle para a cultivar tolerante sob estresse severo, valor 3 vezes superior ao observado para a sensível nas mesmas condições. Este gene, sob estresse moderado e sob reirrigação também foi altamente induzido (aproximadamente 100 vezes) não diferindo os genótipos entre si nestes tratamentos. Já os aumentos observados para o AOX1 foram menores que a AOX2b, sendo sempre maiores para a cultivar tolerante, o que foi em torno de 22, 33 e 44 vezes para os tratamentos moderado, severo e irrigado, respectivamente. Ao mesmo tempo, os aumentos para a cultivar BR16 foram apenas em torno de 4, 5 e 8 vezes. O quarto e último grupo é representado pelo fator transcricional Scarecrow que, na cultivar tolerante, foi cerca de 5, 13 e 5,8 vezes superior nos tratamentos de estresse moderado, severo e reirrigado, em relação as plantas irrigadas. Para a cultivar sensível, o aumento na expressão deste gene foi menor, ficando em torno de 1.6, 2 e 3.6 vezes para os estresses moderado e severo e reirrigação, quando comparados ao irrigado.

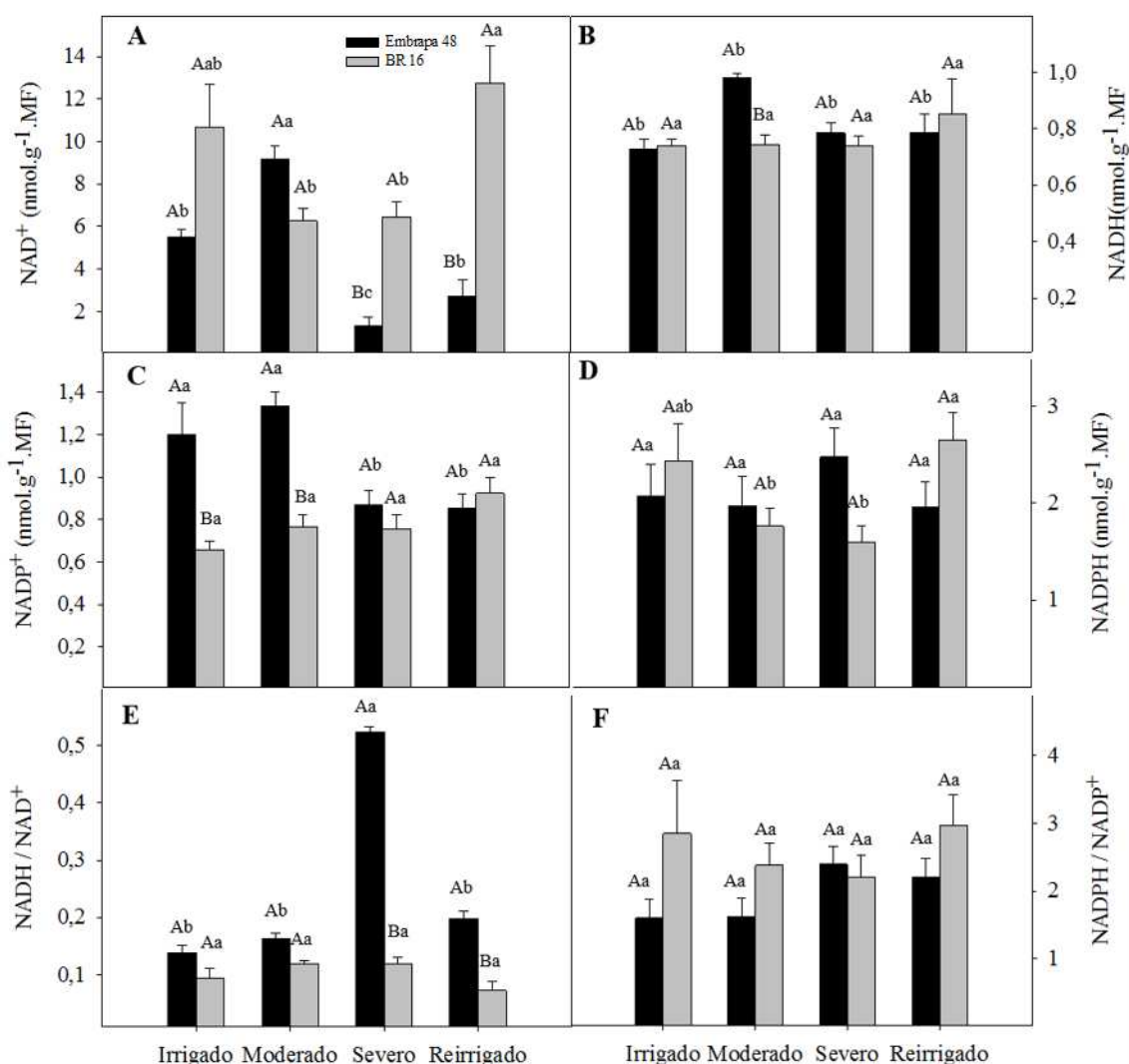
Contrário a estes quatro grupos, correspondente aos cinco genes citados anteriormente, temos o gene da aconitase, que foi o único a apresentar redução significativa para o genótipo tolerante, que foi menor durante o estresse severo. Para os outros tratamentos, não houve alteração em relação ao controle, nem diferiram os genótipos entre si.

Por fim, um terceiro comportamento foi observado para genes de piruvato cinase (PK) e malato desidrogenase citosólica (MDC). Nestes dois genes não foi registrado alterações em seus níveis de expressão durante a imposição dos tratamentos, que ficaram próximos aos valores do controle irrigado (expressão relativa de valor igual a 1), não havendo também diferenças entre os cultivares.

### **3.6 Análise de nucleotídeos de raízes sob deficiência hídrica**

Pelo fato de  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$  serem cofatores de três enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico e reguladores alostéricos de outras enzimas regulatórias, é aceitável assumir que esse balanço tenha importância neste fluxo. Enquanto o genótipo sensível sofre quedas durante os dois tratamentos de estresse para a concentração de  $\text{NAD}^+$ , a cultivar Embrapa 48 apresenta aumento durante o estresse moderado e redução ao seguir para o estresse severo. Ao longo dos tratamentos não houve mudanças para NADH nas plantas sensíveis à seca. E contraste, NADH foi superior para Embrapa 48 no estresse moderado. A relação  $\text{NADH} / \text{NAD}^+$  foi maior para o estresse severo na Embrapa 48 que também apresentou valores significativamente superiores durante a reidratação (Figura 7).

As plantas tolerantes (Embrapa 48) tiveram redução na concentração de  $\text{NADP}^+$  sob estresse severo e sob reirrigação. Na ausência de estresse e em estresse moderado, a concentração de  $\text{NADP}^+$  foi maior no cultivar tolerante. Análise do NADPH não diferiu entre tratamentos e entre as cultivares, assim como os valores encontrados para a razão  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ .



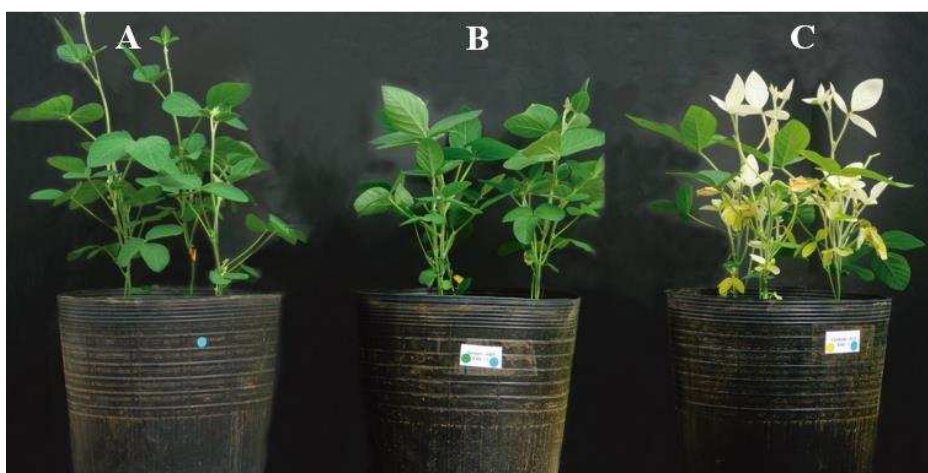
**Figura 7** Níveis de nucleotídeos em cultivares de soja sob estresse hídrico. Cultivar tolerante é Embrapa 48 (barras pretas) e a cultivar sensível é BR 16 (barras claras). Os diferentes grupos correspondem aos tratamentos. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento entre cultivares diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias dentro de uma mesma cultivar, (Tukey,  $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ).

## EXPERIMENTO 2

Uma das hipóteses iniciais do trabalho foi verificar o quão o ABA era essencial para as diferentes respostas encontradas para as duas cultivares durante exposição à deficiência hídrica. Por isso, foi aplicado de forma exógena o ABA e um inibidor de sua síntese, conhecido como fluridona. Foram avaliados os seguintes parâmetros: trocas gasosas, respiração radicular, perfil hormonal e perfil metabólico.

Em todos os gráficos apresentados a seguir a estatística representa apenas comparações entre as plantas que receberam aplicação exógena de ABA ou fluridona com aquelas que não foram tratadas com os mesmos (denominadas de controle). Essas análises foram feitas dentro da mesma cultivar. As análises estatísticas para verificar como as cultivares se comportaram ao longo do estresse estão em anexo, ao final da tese.

Na figura 8 observa-se o aspecto geral que as plantas irrigadas apresentaram quando receberam ABA (B) e fluridona (C). Nota-se claramente que a fluridona causou clorose nas folhas jovens, diminuindo a superfície foliar fotossinteticamente ativa.



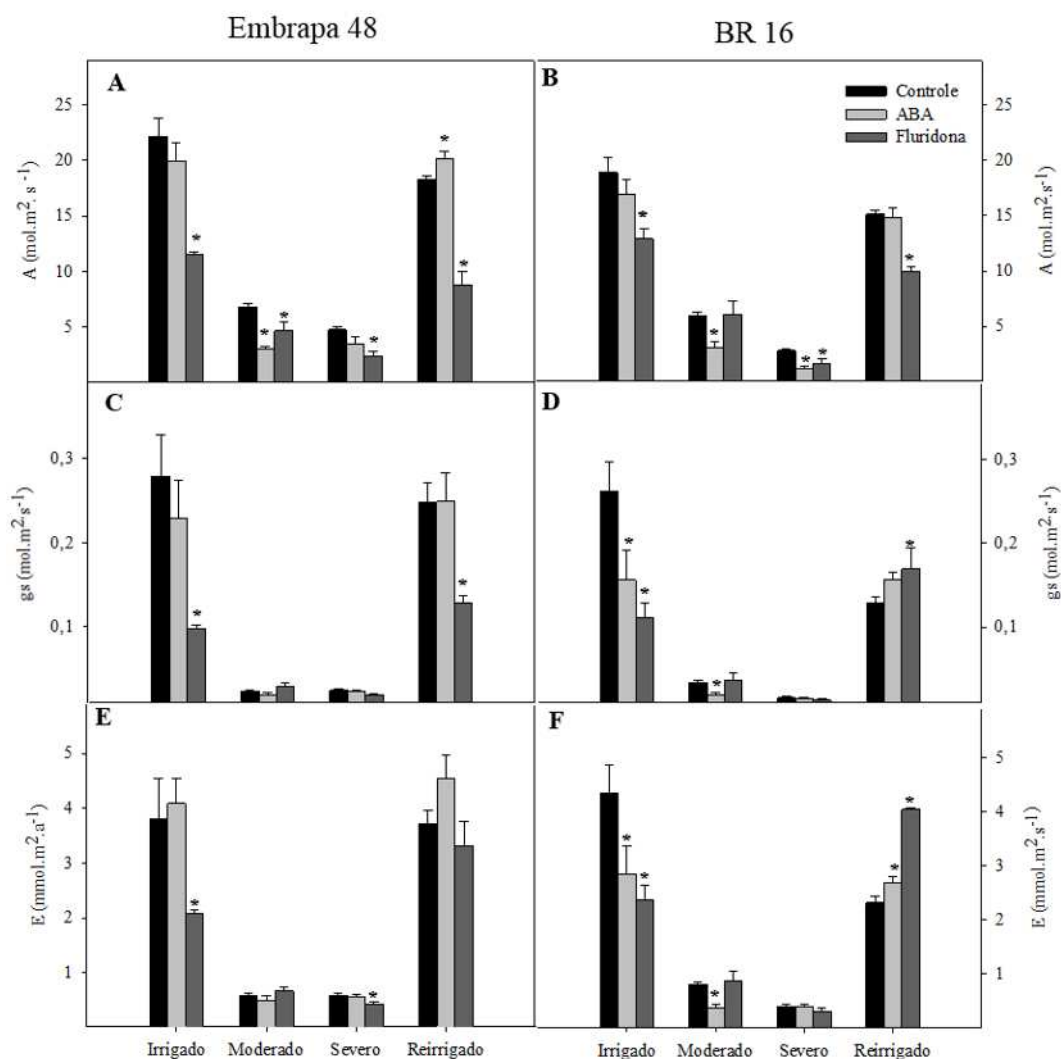
**Figura 8** Aspecto geral das plantas de soja após aspersão de ABA (B) e Fluridona (C). As plantas controle (A) são aquelas que não receberam nenhum hormônio.

### **3.7 Trocas gasosas de plantas de soja sob déficit hídrico em resposta à aplicação exógena de ABA e fluridona**

#### **Respostas à aplicação exógena de ABA**

A fotossíntese líquida foi menor durante o estresse para as duas cultivares (Figura 9). A aspersão de ABA produziu quedas da fotossíntese para as duas cultivares durante o estresse moderado e apenas para o genótipo sensível no estresse severo. Apenas o genótipo BR 16 registrou efeito do ABA na condutância estomática e transpiração (tratamentos irrigados e estresse moderado). A menor  $g_s$  em resposta ao ABA era esperado, porém apenas a cultivar sensível teve quedas em seus valores.

A aplicação de ABA não afetou a razão Ci/Ca na cultivar tolerante (Figura 10), enquanto que na cultivar sensível aumentou sob estresse severo e reirrigação. A eficiência de uso da água (EUA) da cultivar tolerante foi reduzida sob estresse moderado, e sob estresse severo e reirrigação na cultivar sensível. O ABA exógeno teve efeitos restritos na eficiência de carboxilação (A/Ci), diminuindo a mesma no estresse moderado na cultivar tolerante e no estresse severo para genótipo sensível.



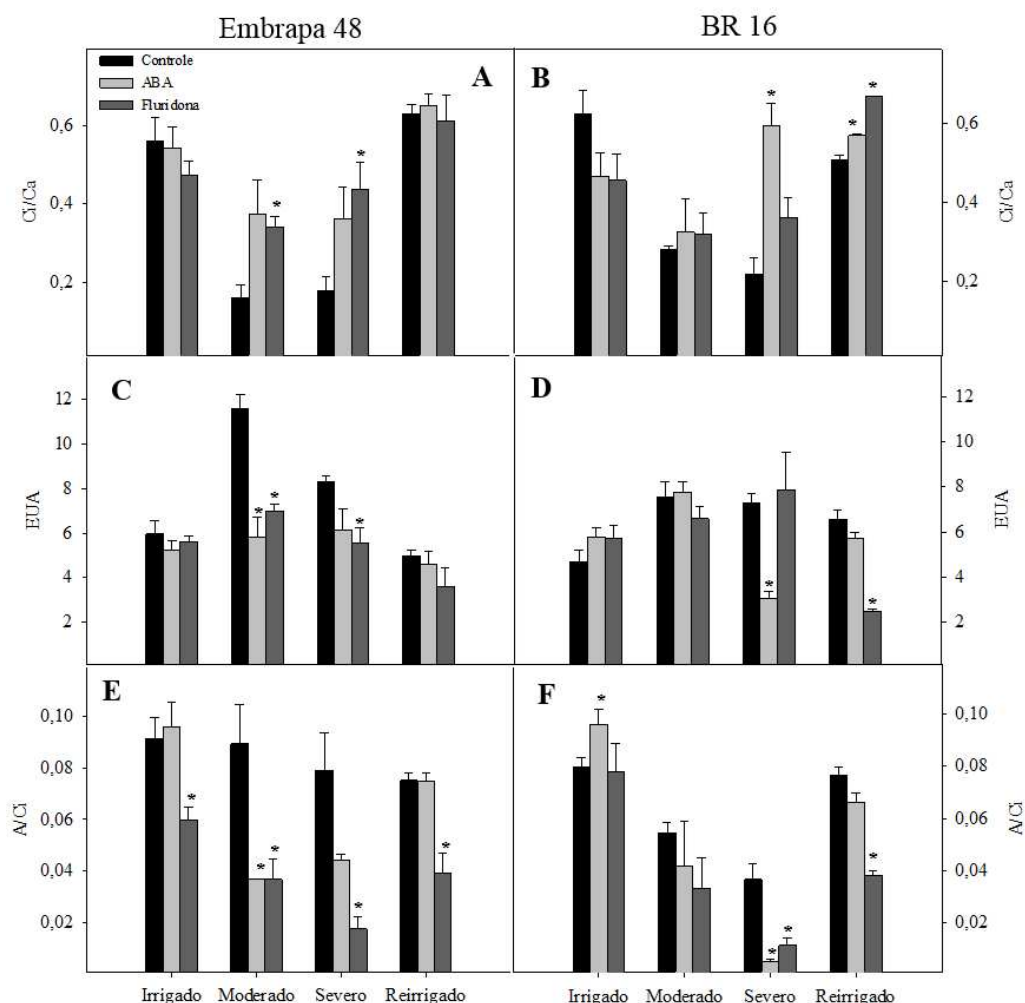
**Figura 9** Taxa fotossintética líquida (A) (B), condutância estomática (C) (D) e transpiração líquida (E) (F) em cultivares de soja sob déficit hídrico e após aplicação exógena de ABA e Fluridona. Cultivar Embrapa 48 estão representadas nos gráficos à esquerda (A), (C), (E) e cultivar BR16 estão nos gráfico à direita (B), (D), (F). O asterisco indica diferença significativa para aplicação de ABA e fluridona em relação ao controle (que não teve nenhuma aplicação de hormônio) na mesma cultivar e no mesmo tratamento, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **Respostas à aplicação exógena fluridona**

Na tentativa de verificar como as plantas se comportariam com menores concentrações do hormônio ácido abscísico, foi utilizado de forma exógena um composto inibidor de sua biossíntese: a fluridona.

A fluridona fez com que a fotossíntese (Figura 9) reduzisse em todos os tratamentos, exceto no estresse moderado na cultivar sensível BR 16. Para Embrapa 48, a condutância estomática não diferiu durante os estresses, mas foi menor nas plantas (que receberam fluridona) irrigadas e nas reirrigadas. A cultivar BR 16 também mostrou uma redução do  $g_s$  quando irrigado, mas ao contrário das plantas tolerantes, durante a reirrigação houve aumento da condutância. A redução da transpiração (E) é esperada devido ao decréscimo da condutância estomática, mas este paralelismo somente é observado no tratamento irrigado (diminuição para ambos genótipos), pois a reirrigação registrou aumento da transpiração.

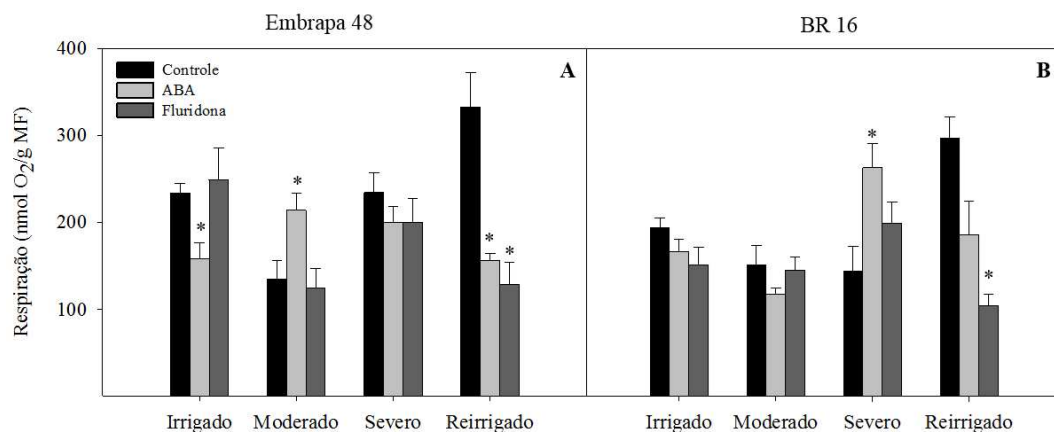
A redução da fotossíntese líquida em quase todos os tratamentos pela fluridona foi acompanhada de aumento da razão  $C_i/C_a$  (Figura 10) somente para os tratamentos de estresse da cultivar Embrapa 48 e na reirrigação da BR 16. Medidas instantâneas da eficiência do uso da água é dada pela razão fotossíntese e transpiração. Fluridona diminuiu esses valores para genótipo tolerante, não tendo efeitos sob cultivar sensível.



**Figura 10** Razão Ci/Ca (A) (B), Eficiência de uso da água (EUA) (C) (D) e eficiência de carboxilação A/Ci (E) (F) em cultivares de soja sob déficit hídrico e após aplicação exógena de ABA e Fluridona. Cultivar Embrapa 48 estão representadas nos gráficos à esquerda (A), (C), (E) e cultivar BR16 estão nos gráfico à direita (B), (D), (F). O asterisco indica diferença significativa para aplicação de ABA e fluridona em relação ao controle (que não teve nenhuma aplicação de hormônio) na mesma cultivar e no mesmo tratamento, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3.8 Taxas respiratórias de raízes sob déficit hídrico em resposta a aplicação exógena de ABA e fluridona

Na figura 11A para Embrapa 48, é possível ver o efeito da aplicação de ABA na redução da respiração radicular no tratamento irrigado e reirrigado. Em contraste a esta redução, observamos o aumento da respiração radicular durante estresse moderado. No genótipo sensível à seca (Figura 11B), o ABA exógeno aumentou a respiração radicular em estresse severo. Fluridona pouco influenciou na taxa respiratória das raízes nas duas cultivares. Apenas na reirrigação que este composto diminuiu as taxas respiratórias na BR 16 (Figura 11B).



**Figura 11** Taxa respiratória de raízes em cultivares de soja sob déficit hídrico e após a aplicação exógena de ABA e fluridona. Cultivar Embrapa 48 está representada no gráfico à esquerda (A) e cultivar BR16 está no gráfico à direita (B). O asterisco indica diferença significativa para aplicação de ABA e fluridona em relação ao controle (que não teve nenhuma aplicação de hormônio) na mesma cultivar e no mesmo tratamento, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3.9 Morfologia de raízes sob estresse hídrico em resposta às aplicações exógenas de ABA e fluridona

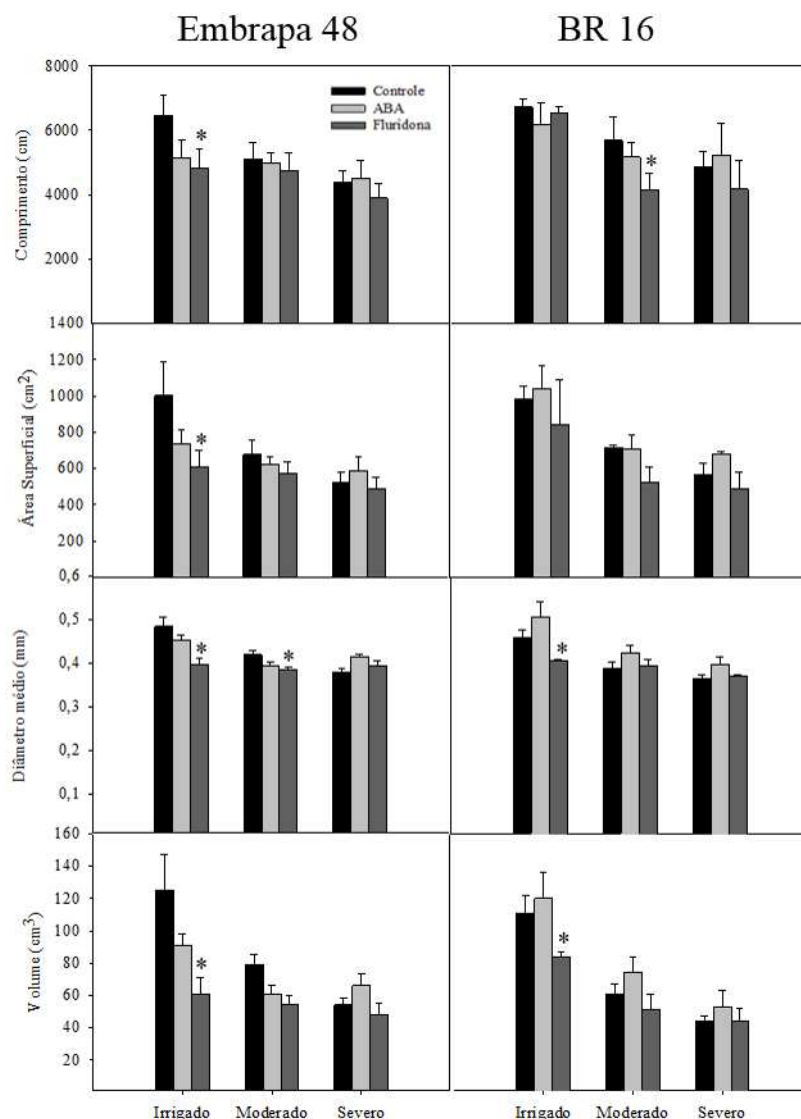
Uma das hipóteses iniciais do trabalho era a de que as raízes poderiam contribuir para a tolerância ao déficit hídrico através de um mecanismo de escape, alterando sua arquitetura e aumentando seu volume e profundidade radicular. Para verificar a contribuição deste mecanismo, estudamos em detalhe as modificações produzidas no sistema radicular entre duas cultivares contrastantes quanto a tolerância à seca (Figura 12). Após suspensão da irrigação, as plantas demoraram em média 11 e 13 dias para atingir o estresse moderado e severo, respectivamente. Durante a imposição do estresse, as plantas foram borrifadas com ABA e fluridona.

Todas plantas que não receberam ABA exógeno e fluridona tiveram quedas nos valores de comprimento, área superficial, diâmetro e volume durante o estresse hídrico (Tabela 1). Os genótipos diferiram entre si apenas no diâmetro das raízes durante o estresse moderado, sendo valor superior para Embrapa 48.

Tabela 1 Análise morfológica de raízes de soja sob déficit hídrico. Comprimento (cm), área superficial (cm<sup>2</sup>), volume (cm<sup>3</sup>) e diâmetro (mm). Letras correspondem ao teste de média para os tratamentos de estresse avaliados para uma mesma cultivar. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Asterisco indica diferença significativa entre as cultivares para mesmo tratamento também pelo teste de Tukey (P<0,05).

	<b>Embrapa 48</b>			<b>BR 16</b>		
	Irrigado	Moderado	Severo	Irrigado	Moderado	Severo
Comprimento	6459 a	5116 b	4397 b	6726 a	5672 a	4838 b
Área superficial	1004a	678 b	526 b	969 a	703 b	555 b
Volume	125 a	79 b	54b	111 a	61 b	44b
Diâmetro	0,48 a	0,41 b*	0,37 b	0,46 a	0,39 b	0,36 b

Dentro do mesmo nível de estresse, avaliando apenas o efeito da aplicação exógena de ABA e fluridona, somente fluridona interferiu de maneira significativa nos dados morfológicos (Figura 12). Para Embrapa 48 em plena irrigação a aspersão de fluridona fez diminuir valores de todos parâmetros avaliados (comprimento, área superficial, volume e diâmetro) e durante o estresse apenas o diâmetro diminuiu. A cultivar sensível também registrou quedas após aplicação de fluridona no comprimento (nos estresse moderado), volume (irrigado) e diâmetro (irrigado).



**Figura 12** Análise morfológica de raízes de soja sob déficit hídrico e após a aplicação exógena de ABA e fluridona. Cultivar Embrapa 48 está representada nos gráficos à esquerda e cultivar BR16 está nos gráficos à direita. O asterisco indica diferença significativa para aplicação de ABA e fluridona em relação ao controle (que não teve nenhuma aplicação de hormônio) na mesma cultivar e no mesmo tratamento (Tukey,  $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ).

### 3.10 Perfil hormonal sob déficit hídrico em resposta às aplicações exógenas de ABA e fluridona

Além da influência no crescimento e desenvolvimento das plantas, os hormônios vegetais têm papel importante mediação de respostas a estresses bióticos e abióticos. A análise de um perfil hormonal pode auxiliar na compreensão de como as plantas respondem à seca. Por isso, foram quantificados os seguintes hormônios das raízes de soja: ácido abscísico (ABA), etileno (ACC), auxina (AIA), ácido salicílico (AS), metil-jasmonato (Me-JA) e citocinina (zeatina).

Tabela 2 Perfil hormonal de raízes de soja sob déficit hídrico. Dados expressos em ng.g<sup>-1</sup> de ateria fresca. Letras correspondem ao teste de média para os tratamentos de estresse avaliados para uma mesma cultivar. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Asterisco indica diferença significativa entre as cultivares para mesmo tratamento também pelo teste de Tukey (P<0,05).

Hormônio	Embrapa 48				BR 16			
	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado
ABA	4,3 b	8,4 a*	7,1 a*	5,7 a	5,2 b	2,3 c	3,6 b	9,1 a
ACC	49,9 a*	52,8 a	56,8 a*	73,8 a	92,7 a	43,2 b	36,7 b	66,4 a
AIA	1,1 b*	1,7 a	1,3 b	3,0 a	2,5 a	1,4 b	1,0 c	3,1 a
AS	1,3 b*	2,6 b	1,5 b	6,0 a*	4,6 a	3,8 a	1,0 b	0,2 b
Me-JA	2,3 a	0,5 b*	0,4 b*	2,2 a	4,1 a	3,5 a	2,2 a	2,8 a
Zeatina	38,7 a*	3,2 b*	3,2 b	3,2 b*	2,1 b	8,9 a	3,6 b	11,4 a

### ABA

O estresse hídrico aumentou o nível de ABA radicular em ambos os tratamentos de estresse, mas somente na cultivar tolerante, retornando a concentrações próximas ao controle irrigado durante a reirrigação (Tabela 2). Um aumento de ABA foi observado tardiamente na cultivar sensível, durante a reirrigação.

Com a aplicação exógena do ABA (Figura 13), as plantas da cultivar tolerante exibiram a mesma concentração de ABA endógeno, exceto para as plantas irrigadas. Um resultado coerente, pois ABA é um hormônio responsivo ao estresse, e se este não existe, a concentração interna de ABA é baixa. O genótipo sensível à seca teve o comportamento diferente. Borrifar ABA nessas plantas aumentou a concentração celular desse hormônio, em todos tratamentos, chegando a ser 5 vezes maior que as plantas não borrifadas no estresse moderado.

Se a fluridona é um inibidor da síntese de ABA, esperava-se que este composto gerasse uma queda significativa na quantidade de ácido abscísico. Porém isto somente ocorreu no tratamento sob estresse severo na cultivar Embrapa 48. E completamente oposto ao esperado, houve aumento na concentração de ABA radicular no estresse moderado na cultivar BR 16.

### ACC

O ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) é um precursor da síntese de etileno. Estudando o comportamento dos níveis de ACC durante a imposição do estresse na cultivar Embrapa 48, pode-se notar que estes se mantêm semelhantes tanto

para plantas irrigadas quanto para aquelas que foram submetidas ao estresse hídrico (Tabela 2). Já a BR 16 mostrou quedas dos níveis de ACC durante o estresse.

A influência da aspersão de ABA (Figura 13) nas plantas tolerantes se resumiu em aumentar o ACC nas plantas hidratadas. Para as plantas sensíveis à déficit hídrico o ABA também aumentou ACC, mas durante a reidratação.

Fluridona diminuiu ACC durante a reidratação no genótipo tolerante (Figura 13). Porém, resultados evidentes foram observados para BR 16, onde todos tratamentos registraram decréscimos para ACC em resposta a fluridona.

### **AIA**

A concentração de ácido indol acético (AIA), uma auxina, aumentou durante o estresse moderado para cultivar tolerante (Tabela 2). Ao passo que foi reduzido na cultivar sensível durante os dois estresses (moderado e severo). O aumento de AIA na reirrigação ocorre somente para Embrapa 48.

O ABA exógeno afetou positivamente os níveis de auxina (AIA) apenas nas plantas irrigadas da Embrapa 48 (Figura 13). Porém a fluridona gerou maiores concentrações de auxina em plantas sob estresse e hidratadas. A cultivar BR 16 não apresentou qualquer alteração nos níveis de AIA em resposta ao ABA e a fluridona.

### **Ácido salicílico**

Em raízes da cultivar tolerante, o estresse não aumentou níveis de AS. Apenas na reirrigação houve acúmulo desse hormônio (Tabela 2). Em contraste, ao longo do estresse severo e reirrigação o AS diminuiu para o genótipo BR 16.

Outra diferença entre as cultivares aparece quando comparamos o efeito combinado do estresse e do ABA exógeno. No estresse moderado, após aplicação de ABA, houve acúmulo de AS para Embrapa 48, mas não para BR 16 (Figura 13).

A fluridona aumentou as taxas de AS durante o estresse moderado e severo para Embrapa 48 e no estresse moderado para BR 16.

### **Metil-Jasmonato**

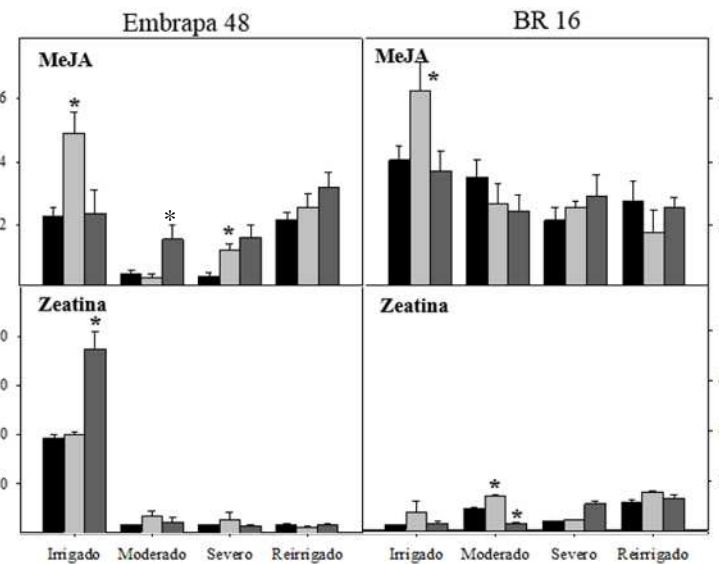
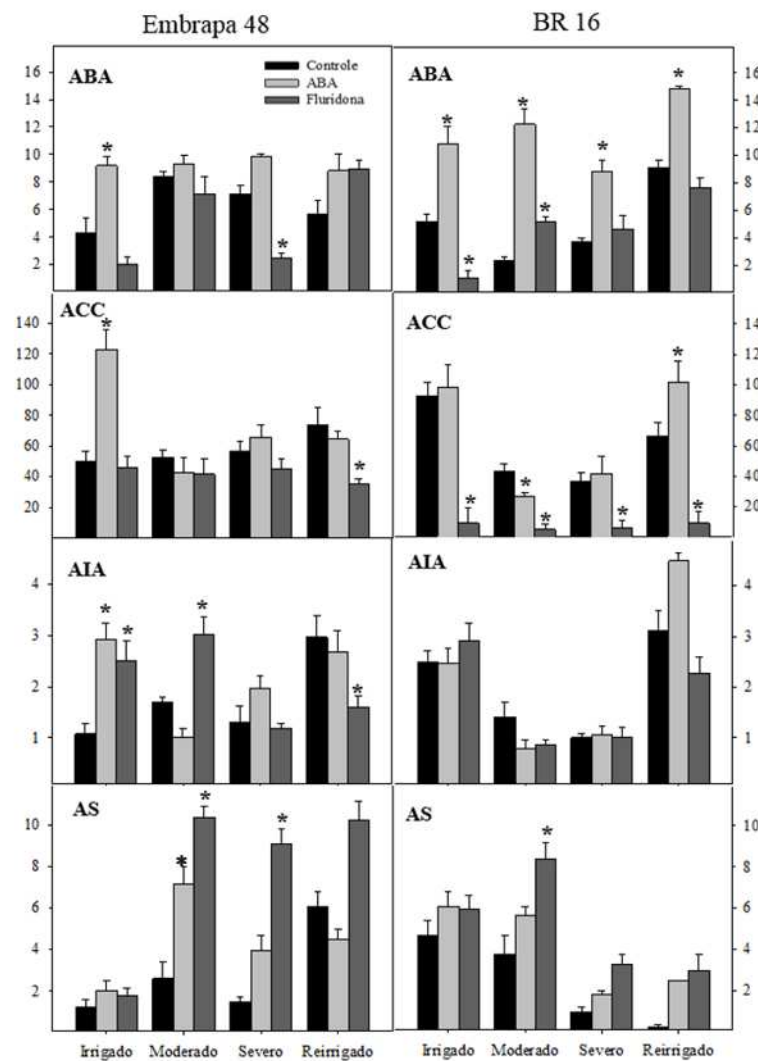
Nas plantas não tratadas com aplicações exógenas houve redução de Me-JA nos dois tratamentos de estresse apenas para a cultivar Embrapa 48.

Foi observado, na cultivar tolerante, maiores teores de Me-JA após aplicação de ABA para plantas irrigadas e sob estresse severo. As plantas sensíveis tiveram

aumento nos teores de metil-jasmonato apenas nas plantas hidratadas. O único efeito da fluridona foi aumentar os níveis de ME-JA durante estresse moderado para Embrapa 48.

### **Zeatina**

A zeatina representa a citocinina, e também foi quantificada. Um dado interessante foram os alto níveis encontrados para zeatina nas plantas irrigadas da Embrapa 48, chegando, em média, a 12 vezes maior que nos demais tratamentos (Tabela 2). A limitação hídrica produziu forte efeito na redução do teor de zeatina para genótipo tolerante, o que não foi observado para o genótipo sensível à seca. Para Embrapa 48, o ABA exógeno não surtiu efeito nos níveis de zeatina, adicionalmente a fluridona aumentou apenas no tratamento irrigado. O genótipo BR 16 teve os níveis de zeatina elevados no estresse moderado após aplicação de ABA (Figura 13).



**Figura 13** Perfil hormonal de raízes de soja sob déficit hídrico e após a aplicação exógena de ABA e fluridona. Cultivar Embrapa 48 está representada nos gráficos à esquerda e cultivar BR16 está nos gráficos à direita. O asterisco indica diferença significativa para aplicação de ABA e fluridona em relação ao controle (que não teve nenhuma aplicação de hormônio) na mesma cultivar e no mesmo tratamento, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

### **3.11 Perfil metabólico sob déficit hídrico em resposta às aplicações exógenas de ABA e fluridona**

São dois gráficos tipo heat map para representar o perfil metabólico. O primeiro (Figura 14) estão apenas os dados das cultivares em resposta ao déficit hídrico. Em um segundo gráfico (Figura 15) está o perfil metabólico sob estresse hídrico em resposta às aplicações exógenas de ABA e fluridona. Nas duas figuras, os dados foram divididos em ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares. Os valores são relativos em função do controle para cultivar BR 16 e os dados completos de estatística encontram-se ao final da tese.

#### **3.11.1 Efeito do déficit hídrico no perfil metabólico das raízes**

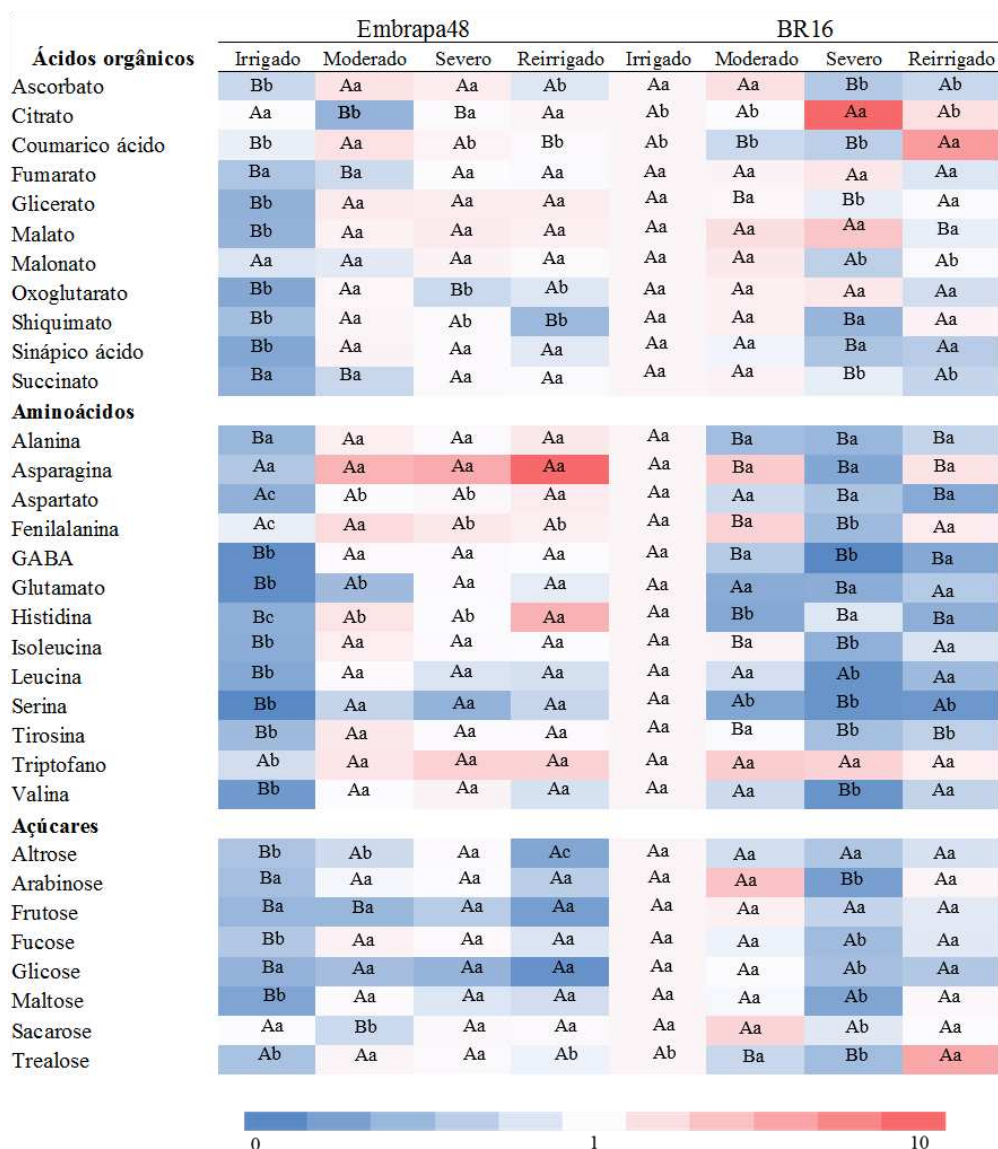
Primeiramente avaliando as variações dos ácidos orgânicos (Figura 14), nota-se que para cultivar tolerante, podemos observar aumentos, sob estresse moderado para 5 compostos, como o ácido coumárico, glicerato, malato, oxoglutarato, shiquimato e sináptico, enquanto nada é observado na cultivar sensível. Já no estresse severo, podemos ver aumento em ambas cultivares. No caso do tolerante, observamos aumentos para 4 ácidos orgânicos (ascorbato, glicerato, malato e sináptico), enquanto no sensível, houve aumento somente para o citrato. Na reirrigação, 3 ácidos mantiveram-se em maiores níveis na cultivar tolerante, como o glicerato, malato, sináptico, enquanto para a sensível, somente pode ser observado para o ácido coumárico. O contraste entre os genótipos pode ser melhor observado, sob a reirrigação, quando queda nos teores de dois ácidos (malonato e succinato) para cultivar sensível. Outro fato interessante é que a cultivar tolerante, no tratamento controle, entre os 11 ácidos orgânicos quantificados, possui menores níveis de 9 deles (ascórbico, coumárico, fumarato, glicerato, malato, oxoglutarato, shiquimato, sináptico e succínico). Esta situação inverte-se sobre estresse severo, possuindo a cultivar tolerante maiores níveis de 6 ácidos (ascorbato, coumárico, glicerato, shiquímico, sináptico e succínico), enquanto o sensível, possui maiores níveis em somente dois deles (citrato e fumarato). No estresse moderado, a diferença entre os dois em números é mínima: o tolerante tem maiores níveis para o coumárico, glicerato, enquanto o sensível tem maiores níveis para o citrato, fumarato, e succínico. Na reirrigação também a diferença entre os genótipos é mínima: para o tolerante, maiores níveis para o malato somente, enquanto para o sensível a concentração é maior para o coumárico e o oxoglutárico.

Fica evidente que alguns metabólitos do ciclo de Krebs estão em menores proporções para o genótipo tolerante tanto quando as plantas foram irrigadas, quanto durante pelo menos um nível de estresse hídrico. Podemos citar como exemplos o citrato, fumarato, oxoglutarato e succinato. O malato foi o único que não manteve essa tendência. Esses valores menores podem indicar maior consumo desses compostos, sugerindo maior respiração para raízes da Embrapa 48 (tolerante). Ácido coumárico, sinápico e shiquímico são importantes por participarem da biossíntese de lignina e parede celular secundária. Estes ácidos orgânicos comportaram-se de forma diferente para as duas cultivares ao longo da imposição do estresse, aumentando para Embrapa 48 e diminuindo para BR 16. O ascorbato, que está envolvido em mecanismos antioxidativos, também foi superior na planta tolerante ao longo do estresse, enquanto na cultivar tolerante há um decréscimo no estresse severo e reirrigação.

O estresse também teve efeito marcante no aumento de vários aminoácidos, principalmente no cultivar tolerante. Para Embrapa 48, o déficit hídrico moderado proporcionou aumento de 9 aminoácidos (aspartato, GABA, Histidina, isoleucina, leucina, serina, tirosina, triptofano, e valina). Este resultado contrasta fortemente com observado no genótipo sensível para este mesmo tratamento, onde não houve nenhum aumento, mas sim redução de 2 aminoácidos (histidina e serina). No déficit hídrico severo também há forte diferença entre os genótipos. Do total de 13 aminoácidos quantificados, registramos aumento geral em 11 aminoácidos na cultivar tolerante (aspartato, fenilalanina, GABA, glutamato, histidina, isoleucina, leucina, serina, tirosina, triptofano e valina), enquanto nenhum aumento foi observado na cultivar sensível. Nesta cultivar, ao contrário da tolerante, há redução em aminoácidos, como para a fenilalanina, GABA, isoleucina, leucina, tirosina e valina. Na reirrigação ainda continuamos a ver esta diferença, mas em menor grau que o estresse severo, pois são observados maiores níveis de 6 aminoácidos na tolerante (alanina, asparagina, aspartato, GABA, histidina, e tirosina).

O efeito dos estresses nos açúcares foi menos pronunciado do que para aminoácidos e ácidos orgânicos. Sob estresse moderado observamos aumento de 4 açúcares (altrose, fucose, maltose, e trealose) e redução em sacarose na cultivar tolerante, enquanto na sensível observamos apenas uma redução para a trealose. Sob estresse severo há somente um aumento em 4 açúcares (altrose, fucose, maltose e trealose) na cultivar tolerante, enquanto nenhum aumento pode ser observado na sensível. No caso da cultivar sensível, vemos o inverso, ou seja, uma redução em 75% dos açúcares analisados (em

seis deles, como arabinose, fucose, glicose, maltose, sacarose e trealose), enquanto nenhuma redução, neste tratamento, é visto para a tolerante. Ao compararmos as cultivares, dentro de um mesmo tratamento (irrigado, moderado, severo, reirrigado), os teores de 6 açúcares (todos, menos sacarose e trealose) são menores nas raízes do genótipo tolerante em plena irrigação.



**Figura 14** Perfil metabólico de raízes de soja sob estresse hídrico. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento entre cultivares diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias dentro de uma mesma cultivar, (Tukey,  $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ).

### 3.11.2 Efeito do déficit hídrico e da aplicação de ABA e fluridona no perfil metabólico de raízes

Para os ácidos orgânicos, o efeito do ABA na cultivar sensível aumenta ácido coumárico e ascorbato no estresse severo, não produzindo mesmos efeitos nas plantas tolerantes. Durante a reirrigação, 7 ácidos orgânicos da cultivar sensível reduziram na

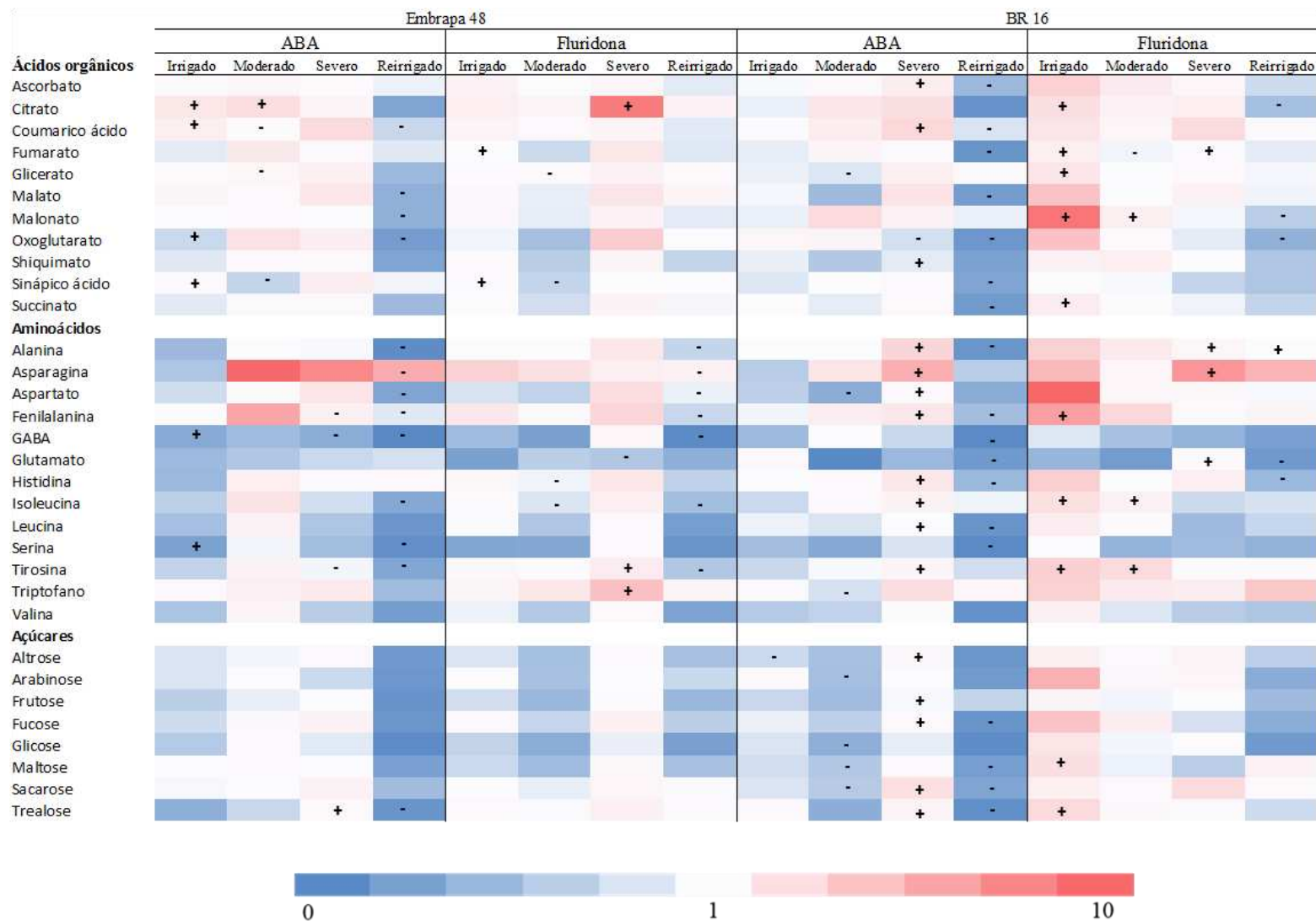
presença de ABA, como succinato, sináptico, oxoglutarato, malato, fumarato, coumárico e ascorbato. Enquanto a cultivar tolerante, neste mesmo tratamento (ABA e reirrigação), somente 4 ácidos reduziram, como o oxoglutárico, malônico, málico e coumárico.

Entre as três classes de compostos analisadas aqui, foi nos aminoácidos que observamos as maiores mudanças em resposta ao ABA exógeno. Durante o estresse severo, a aspersão de ABA gerou acúmulo em 8 aminoácidos na cultivar sensível, tais como alanina, asparagina, aspartato, fenilalanina, histidina, isoleucina e leucina. Em contraste, menores aumentos (apenas fenilalanina e tirosina) ocorreram para Embrapa 48 em respostas à aplicação de ABA. Durante o tratamento irrigado, a cultivar sensível teve reduções na concentração de 7 aminoácidos (alanina, fenilalanina, GABA, glutamato, histidina, leucina e serina) assim como a cultivar tolerante (alanina, aspartato, fenilalanina, GABA, isoleucina, leucina e tirosina).

Avaliando o efeito da aplicação exógeno de ABA nos metabólitos (Figura 15), é possível ver que houve forte interferência do ABA nos açúcares da cultivar sensível, com aumentos transitórios em estresse hídrico (altrose, arabinose, frutose, sacarose e trealose) e decréscimos no estresse moderado (arabinose, glicose, maltose e sacarose) e após a reirrigação (fucose, maltose, sacarose e trealose) onde induziu, de forma geral, decréscimos em suas concentrações. Bem menos influenciada pelo ABA exógeno, a cultivar tolerante a seca somente mostrou um aumento (trealose, sob estresse severo) e uma redução (trealose, sob estresse moderado).

A fluridona, como o ABA, afeta mais o metabolismo dos aminoácidos do que o metabolismo de ácidos orgânicos ou açúcares estudados aqui (Figura 15) Mas, em contraste com ABA, estes efeitos foram mais concentrados na cultivar tolerante. Durante a reirrigação, cultivar tolerante, a houve quedas nos teores de aspartato, fenilalanina, GABA, isoleucina e tirosina. Já sob estresse moderado, ainda para Embrapa 48, observamos um aumento para histidina e uma redução para isoleucina. O efeito da fluridona nos açúcares foi o menor efeito observado até agora. Somente resultou em aumento em dois açúcares na cultivar sensível (maltose e trealose, no tratamento irrigado), sem nenhum efeito em nenhum outro tratamento, tanto na sensível como na tolerante. A fluridona aplicada à BR 16 produziu aumento em 5 ácidos orgânicos (citrato, fumarato, glicerato, malonato e succinato) durante o tratamento irrigado, enquanto em estresse moderado elevou apenas 1 ácido (malonato). Para Embrapa 48 apenas 2 ácidos orgânicos aumentaram, um em estresse moderado (glicerato) e outro em estresse severo (citrato), e uma única diminuição, que foi no tratamento irrigado (fumarato).

A fluridona exógena gerou aparentemente respostas aleatórias, mostrando mais uma vez que é possível que este composto atue em inúmeras rotas metabólicas, não somente na biossíntese de ABA. De forma geral, o ABA mostrou-se mais efetivo para cultivar sensível, onde proporcionou durante o estresse acúmulos de alguns ácidos orgânicos e aminoácidos.



**Figura 15** Perfil metabólico de raízes de soja sob déficit hídrico e após a aplicação exógena de ABA e fluridona. Cultivar Embrapa 48 está representada nos gráficos à direita e cultivar BR16 está nos gráficos à esquerda. Os símbolos (= ou -) indicam diferença significativa para aplicação de ABA e fluridona em relação ao controle (que não teve nenhuma aplicação de hormônio) na mesma cultivar e no mesmo tratamento, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O sinal + indica aumento em relação ao controle e o símbolo - indica reduções também em relação ao controle. Dados controles estão representados na Figura 14.

## **4 DISCUSSÃO**

As plantas desenvolveram um sofisticado mecanismo de defesa para perceber e responder aos mais variados tipos de estresses abióticos, podendo assim lidar com as mais difíceis condições ambientais. Para elucidar os mecanismos de respostas aos estresses, inúmeros estudos foram realizados e muitas estratégias de tolerância à seca já foram identificadas (GOLLDACK et al., 2014). Fechamento estomático, acúmulo de solutos compatíveis para ajuste osmótico, aumento da síntese de ABA, produção de antioxidantes, maior desenvolvimento radicular são alguns exemplos de mecanismos comumente identificados como respostas ao déficit hídrico (OSAKABE et al., 2014). Obviamente, essas mudanças no metabolismo não necessariamente ocorrem de forma conjunta e da mesma maneira nas plantas, nem mesmo entre diferentes cultivares. Alguns genótipos tolerante podem diferir em sua maneira de lidar com estresse. O objetivo deste trabalho foi melhor compreender a importância do sistema radicular na tolerância à seca na cultivar Embrapa 48, em comparação com o genótipo sensível (BR16).

### **4.1 Cultivar tolerante retarda a desidratação foliar**

Primeiramente, ao avaliar a situação hídrica das plantas de soja por meio do teor relativo de água (TRA) fica claro como Embrapa 48 (genótipo tolerante) mantêm-se mais hidratada que BR 16 (genótipo sensível) durante o estresse hídrico severo (Figura 1). A maior hidratação (TRA) das folhas na cultivar tolerante culminou com maior fotossíntese líquida sob estresse severo e reirrigação nesta cultivar (estatística apresentado no anexo I). Dados de potencial hídrico para as mesmas cultivares (MESQUITA, 2013) mostraram que a tolerante posterga a seca, resistindo por mais tempo a deficiência hídrica.

### **4.2 Embrapa 48 e BR 16 não diferem quanto a morfologia radicular**

Um mecanismo importante para evitar o déficit hídrico são as alterações que uma planta faz na distribuição radicular explorando, assim, mais profundamente e em maior área o solo. No entanto, para soja, houveram reduções semelhantes no comprimento, volume, área superficial e diâmetro radicular em ambas cultivares (Tabela 1), fato também relatado por BENJAMIN; NIELSEN (2006) em soja. Estes resultados mostram que a alteração da arquitetura radicular não é fator que contribuiu para a diferença de tolerância entre os genótipos estudados.

Aparentemente, de forma contrastante ao encontrado nos resultados morfológicos, o gene para o fator de transcrição SCARECROW (SCR) foi altamente expresso nas cultivar tolerante (Figura 6). SCR é responsável pela manutenção das células meristemáticas das raízes, garantindo seu crescimento. Se houve reduções semelhantes nos parâmetros radiculares estudados, seria esperado que SCR apresentasse baixa expressão gênica em ambos genótipos. Porém existe alguns relatos (CUI et al., 2012; GOLLDACK et al., 2013) que mostram relação entre SCR e alguns genes responsivos ao estresse, como ABI4 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE4, um fator de transcrição), o que poderia justificar a expressão maior do fator de transcrição SCR para a cultivar tolerante.

O crescimento e diferenciação de raízes têm sido associado a alguns hormônios, principalmente auxina e citocinina que possuem ação antagonista no desenvolvimento radicular (WERNER; SCHMULLING, 2009). A superprodução de citocinina durante o estresse hídrico pode afetar a tolerância à seca de duas formas diferentes, aumentando a tolerância à seca por atrasar a senescência foliar (QIN et al., 2011), ou de forma negativa por prejudicar o desenvolvimento radicular (WERNER et al., 2010). Com foco apenas nas raízes, foram quantificados citocinina na forma de zeatina (Tabela 2). A zeatina da cultivar tolerante decresceu com a limitação hídrica. Porém na cultivar sensível houve aumento no índice da zeatina com imposição do estresse. Apesar da raiz da cultivar BR 16 possuir maior acúmulo de citocinina, a influência deste hormônio não foi detectada na morfologia radicular.

#### **4.3 Mecanismos antioxidativos radiculares contribuem para a tolerância à seca**

Ambos genótipos têm aumento no teor de antioxidantes de baixo peso molecular, para o genótipo tolerante este aumento é maior durante o estresse moderado, para o genótipo sensível é maior sob estresse severo. Entretanto, quando foi analisado o perfil metabólico, observou-se que somente as plantas tolerantes apresentam aumento do teor de ascorbato (Figura 14) em ambos níveis de estresse, sendo superior para cultivar tolerante se comparada a sensível.

A cultivar tolerante também teve a contribuição de mecanismos antioxidativos enzimáticos (Figura 4) como da CAT e APX nos dois níveis de estresse e no tratamento reirrigado e da SOD e GR sob estresse severo. A atuação dos antioxidantes pode ser observada nos resultados apresentados por MESQUITA, 2013 para peroxidação de lipídeos durante o estresse hídrico. Seria esperado que Embrapa 48, por mostrar maiores taxas respiratórias, sofresse mais com danos de membrana, porém, os níveis de

peroxidação de lipídeos foram semelhantes à cultivar sensível. Isso é aceitável se considerarmos que a rede antioxidativa da Embrapa 48 é mais ativa, protegendo suas células de maiores perdas.

É interessante também comparar o comportamento da SOD e GR com o das taxas respiratórias entre as duas cultivares. Nota-se que a atividade dessas duas enzimas somente se diferencia durante o estresse severo, sendo maior para Embrapa 48. A respiração também foi maior para Embrapa 48 durante a imposição do estresse severo. Sendo assim, surge mais uma evidência que é necessário maior operação do sistema de antioxidantes quando há altas taxas de respiração da raiz

#### **4.4 As maiores taxas respiratórias na cultivar tolerante são associadas com alterações na expressão gênica e maior atividade de várias enzimas respiratórias**

Na cultivar Embrapa 48, das 8 enzimas analisadas, apenas a enzima GAPDH (Figura 5E) apresentou aumento de atividade durante o estresse severo, as demais enzimas mantiveram a mesma atividade em todos tratamentos. Como observamos muitas reduções em atividade de várias enzimas na cultivar sensível, podemos sugerir que a menor redução da atividade de enzimas respiratórias na Embrapa 48 pode ter contribuído indiretamente para a sua maior taxa respiratória sob estresse.

Embora a atividade enzimática catalítica máxima pareça estar pouco associada com o aumento da respiração na Embrapa 48, observamos que a expressão de vários genes respiratórios é maior na cultivar tolerante, quando comparada com a cultivar sensível. Dos 8 genes analisados (Figura 6), observamos acúmulos de mRNA para 6 genes, notadamente para a MDH e OGD. Esses dois genes chegaram a níveis cerca de 14 e 2,5 vezes, respectivamente, maiores na cultivar tolerante em relação a sensível, e foram até cerca de 9000 e 1400 vezes mais induzidas sob estresse severo. Destas enzimas analisadas em nível de mRNA, somente quantificamos enzimaticamente a MDH que teve respostas diferentes entre os dois ensaios. A expressão gênica foi sempre superior para a cultivar tolerante, no entanto, a atividade enzimática mostrou-se superior para cultivar sensível durante o estresse severo. Esta discrepância entre atividade gênica e enzimática sugere que pode haver algum tipo de indução da expressão limitada a algum tecido radicular, onde essa isoforma estudada teria uma forte tecido especificidade, ao contrário da atividade enzimática, que mede a atividade total e máxima.

Outro fato notório foi o aumento em duas diferentes isoformas da oxidase alternativa (Figura 6) na cultivar tolerante. Esta enzima tem importante papel antioxidativo, eliminando o excesso de poder redutor nas membranas internas da

mitocôndria, reduzindo a formação de radicais livres. A cadeia de transporte de elétron mitocondrial é o principal sítio de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em tecido heterotróficos. ERO produzidos na mitocôndria são importantes mensageiros secundários na via de sinalização de ABA e na regulação do crescimento radicular (FOREMAN et al., 2003). A ideia de manter um metabolismo respiratório ativo durante o estresse pode implicar também em maior produção de ERO pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Uma forma de contornar essa situação seria por meio de oxidases alternativas (AOX), as quais otimizam fluxo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, prevenindo uma super redução da cadeia e a geração de ERO, além de manter um fluxo de carbono através da glicólise que é essencial para rotas metabólicas que necessitam dos intermediários do ciclo de Krebs. A importância da AOX durante o estresse já foi muito relatada (VANLERBERGHE, 2013; PU et al., 2015;) e os dados de expressão gênica aqui apresentados, onde dois genes para AOX são o mais expressos na cultivar Embrapa 48 (tolerante), somente reiteram o seu papel essencial também para soja. Além dos dissipadores alternativos de energia, a planta pode se proteger da produção de ERO por meio da biossíntese de antioxidantes.

Considerando o amplo efeito na expressão gênica na cultivar tolerante, sugerimos que o aumento da expressão das enzimas PGM, aldolase, TPI, PGK, PK e OGD tenham contribuído para maior taxa respiratória nas raízes das plantas tolerantes sob estresse severo, e de que a maior atividade da oxidase alternativa tenha sido uma importante contribuição para a tolerância ao estresse hídrico.

#### **4.5 Déficit hídrico afeta diferentemente os hormônios radiculares entre as cultivares**

Inicialmente podemos ver que o estresse hídrico aumenta o ABA no sistema radicular (Tabela 2) em ambos estresses na cultivar tolerante, o que é visto na sensível somente na reirrigação. Estes resultados contrastam com MESQUITA (2013) que mediu o ABA também em raízes de soja e observou que o estresse hídrico aumentou a concentração de ABA nas duas cultivares. Estas diferenças podem ser devidas ou à reciclagem do ABA produzido na folha e transportado até a raiz, ou a diferença nas taxas de imposição do déficit hídrico ou, ainda, na idade das plantas. Neste experimento o estresse moderado para BR 16 foi alcançado em 10 dias, enquanto MESQUITA (2013) alcançou o estresse moderado em 7 dias. Quanto ao estresse severo, aqui precisamos de 12 dias, enquanto no outro experimento citado foi preciso 9 dias.

Outro forte contraste entre os genótipos é que para cultivar sensível houve redução dos níveis de AIA nas raízes nos dois tratamentos de déficit hídrico (moderado e severo), porém, este efeito não foi visto na cultivar tolerante. Nossa hipótese é de que estes níveis normais de AIA podem ter sido importantes para os maiores níveis de respiração apresentados pela Embrapa 48. É provável que a auxina (por promover síntese de proteínas, RNA e DNA) tenha efeito positivo na respiração pela necessidade adicional de suplemento energético imposta pela ação deste hormônio (HACKETT; THIMANN, 1952; LEONOVA et al., 1985).

Outro efeito observado somente na cultivar tolerante foi a redução no teor de MeJA. Sugerimos que este fato seja o resultado de uma modificação na alocação de energia no metabolismo, o que poderia explicar a maior respiração radicular. O acúmulo de MeJA inibe a respiração (RUIZ-MAY et al., 2011), assim, reduzindo o teor de MeJA, haveria uma redução do metabolismo secundário, o que poderia ser necessário para um aumento da respiração para outros processos importantes para a tolerância à seca, como ajuste osmótico e síntese de compostos antioxidativos. Entretanto, o teor de SA é reduzido apenas na cultivar sensível. Estes contrastes, somados a ausência de literatura sobre um possível papel destes hormônios na tolerância à seca, ilustram que precisamos ainda melhor estudar uma possível modulação diferencial destes hormônios na resposta à seca.

Os altos teores de zeatina no tratamento irrigado para Embrapa 48 pode ser explicado pela isomerização da forma menos ativa (cis) para a forma mais ativa (trans). Plantas transgênicas produzindo maiores níveis de citocinina apresentaram maior tolerância à seca, mas nada é conhecido sobre o mecanismo envolvido (KUPPU et al., 2013; REGUERA et al., 2013). Entretanto, este papel positivo da citocinina é controverso, e outros autores têm encontrado resultados opostos (WERNER et al., 2010; MACKOVA et al., 2013; ). Outra hipótese possível para nosso trabalho seria de que o aumento em citocinina nas raízes da planta tolerante contribuiria para a menor redução da fotossíntese observada nesta cultivar, retardando a degradação dos complexos fotossintéticos sob estresse, como descrito para o tabaco (RIVERO et al., 2010). Uma evidência importante para suportar esta hipótese seria o maior teor de zeatina trans nas folhas das cultivares tolerantes, em relação ao sensível.

#### **4.6 O déficit hídrico promove maiores aumentos nos teores de ácidos orgânicos e aminoácidos nas raízes da cultivar tolerante.**

O estresse claramente resulta em respostas contrastantes no metabolismo radicular entre os genótipos. Por exemplo, somente a cultivar tolerante apresenta aumento em 5

ácidos orgânicos no estresse moderado e de 3 deles sob reirrigação. Também somente na sensível observamos redução em dois ácidos orgânicos. Apesar destas diferenças em aumentos e reduções, observamos efeito não correspondentes quanto comparamos os genótipos para os teores totais dos mesmos. A maior respiração radicular da cultivar tolerante no tratamento controle (irrigado) é associado com menores níveis de 82% dos ácidos orgânicos, e menores níveis de  $\text{NAD}^+$  sob estresse severo e reirrigação (Figura 7). Como a respiração foi maior no estresse severo, a redução dos ácidos orgânicos sem aumento em  $\text{NAD}^+$  nas raízes, indica que houve maior demanda metabólica nas raízes tolerantes, o que levou a estas modificações no metabolismo respiratório.

Esta demanda metabólica maior nas raízes da cultivar tolerante pode, em parte, ser explicada pelo aumento da síntese de aminoácidos neste genótipo. Somente nele verificamos, no estresse moderado, o aumento de 69% dos aminoácidos estudados, enquanto no genótipo sensível, há uma redução na síntese de dois deles. Mais forte ainda são as diferenças sob estresse severo onde 86% dos aminoácidos aumentam somente na Embrapa 48, paralelo ao aumento em  $\text{NAD}^+$  e respiração. Enquanto na cultivar sensível não há registro de nenhum aumento em aminoácidos sob estresse severo, nenhum aumento em  $\text{NAD}^+$ , e menor taxa respiratória. O aumento no teor de aminoácidos de forma mais proeminente em resposta à seca também foi observado por MESQUITA (2013) em raízes da cultivar Embrapa 48. Os aminoácidos podem contribuir para o ajuste osmótico da célula e alguns deles tem papel antioxidativo (SILVENTE et al., 2012; FANG; XIONG, 2015).

O efeito dos estresses nos açúcares foi menos pronunciado do que para aminoácidos e ácidos orgânicos. Um dos efeitos foi a redução em 75% dos açúcares na sensível sob estresse severo, destacando-se a redução em glicose e sacarose, os dois principais substratos respiratórios radiculares. Estes menores níveis de açúcares na sensível não podem ser explicados pela queda na fotossíntese, pois ambas cultivares tiveram reduções e possuem níveis semelhantes da mesma neste nível de estresse. Uma possível explicação para esta diferença em sacarose e glicose na raiz seria de que o cultivar sensível não seria tão capaz em mobilizar outras formas de carbono de reserva, e com isto, não permitir um aumento respiratório, e por consequência, um aumento no teor de aminoácidos.

Evidências de que o ciclo de Krebs é um importante modulador do metabolismo de aminoácidos já foi anteriormente produzidas (ARAUJO et al., 2014), e aqui podemos reafirmar essa informação. A cultivar tolerante, que possui altas taxas respiratórias,

acumulou mais aminoácidos durante o estresse, os quais são importantes para ajuste osmótico, estabilização de enzimas e proteção contra danos oxidativos (JORGE et al., 2015). Um importante mediador da biossíntese de aminoácidos é o 2-oxoglutarato, cuja expressão do gene oxoglutarato desidrogenase foi superior para o genótipo Embrapa 48.

Alguns compostos envolvidos na biossíntese de lignina foram detectados no perfil metabólico como ácido shiquímico, ácido coumárico e ácido sinápico. Esses metabólitos podem presumir o investimento, ou não, das plantas em estrutura secundária de parede celular. O aumento da produção de lignina constrói uma parede celular forte que protege a raiz do solo seco. Além disso, as modificações na parede são usadas para minimizar a perda de água e desidratação celular, auxiliando as plantas a resistir e recuperar da seca quando a água estiver disponível (GHOSH; XU, 2014). É provável que a cultivar tolerante tenha lançado mão desta estratégia, pois foi registrado menores valores para os metabólitos intermediários da síntese de lignina durante o estresse moderado, o que indicaria consumo para a biossíntese. Há fortes evidências de que a inibição da biossíntese de parede celular secundária está diretamente relacionada com a redução da atividade do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, por depender da energia produzida por ele (VAN DER MERWE et al., 2010), portanto, as altas taxas respiratórias da Embrapa 48 poderiam sustentar a biossíntese secundária de parede.

#### **4.7 Aplicação exógena de ABA reduz a fotossíntese e aumenta a respiração radicular em plantas sob estresse**

A aplicação exógena de ABA nas folhas aumentou o nível endógeno deste hormônio nas raízes em todos os tratamentos (irrigado, estresse moderado e severo e reirrigado) para a cultivar sensível. Para a cultivar tolerante, somente no tratamento irrigado foi registrado o aumento de ABA. Este efeito, na cultivar tolerante, pode ser devido ao maior nível de ABA nas folhas (MESQUITA, 2013), que poderia inibir o transporte do ABA foliar para as raízes.

O ABA exógeno reduziu a fotossíntese em ambas as cultivares. Provável que este efeito foi devido ao fechamento estomático associado ao aumento do ABA foliar, com consequente redução da transpiração. Mas um efeito bioquímico na fotossíntese não pode ser descartado, visto que observamos redução na eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ) no estresse moderado (para o genótipo tolerante) e no severo (genótipo sensível), e um aumento em  $C_i/C_a$  na cultivar sensível sob estresse hídrico.

Apesar destas reduções na fotossíntese, observamos um efeito do ABA em aumentar a respiração radicular sob estresse moderado (na cultivar tolerante) e severo (na

cultivar sensível). Isto é aparentemente contraditório, pois esperaríamos menor exportação de sacarose para as raízes, devido às quedas registradas na fotossíntese, e em consequência, menor respiração pela redução no teor de substrato respiratório das raízes. Este contraste sugere que o ABA teria um efeito específico na regulação da respiração radicular, mas nenhum efeito do ABA na arquitetura radicular.

A aplicação exógena de ABA reduziu ACC e aumentou zeatina no estresse moderado apenas para cultivar sensível. Como o hormônio etileno tem importante papel promotor da respiração (XU et al., 2012), podemos sugerir que a redução em ACC no estresse moderado explicaria porque esta cultivar sensível, em contraste com a tolerante, não apresentou aumento na respiração radicular.

#### **4.8) Aplicação exógena de ABA afeta o perfil metabólico diferencialmente nos genótipos**

Entre as três classes de compostos analisados no perfil metabólico foi nos aminoácidos que observamos as maiores mudanças em resposta ao ABA. Somente a cultivar sensível registrou aumentos nos teores ácidos orgânicos e aminoácidos sob estresse severo após aplicação de ABA. Este efeito específico na cultivar sensível poderia ser explicado devido ao aumento de ABA radicular apenas nesta cultivar, em resposta a aplicação foliar (Figura 13).

#### **4.9) Aplicação exógena de fluridona tem efeitos no perfil metabólico, principalmente nos aminoácidos**

A fluridona é um composto que inibe a biossíntese de ABA por interferir na síntese de carotenoides inibindo a enzima fitoeno desaturase (BARTELS; WATSON, 1978). Deste modo, esperava-se que este composto gerasse reduções significativas na quantidade de ácido abscísico. As respostas obtidas pela aspersão de fluridona nas plantas, independente da cultivar, não foram muito padronizadas. Duas explicações são possíveis, a primeira é que a aplicação de fluridona nas folhas e na região do colo não permitiu a sua atuação de forma plena nas raízes. Trabalhos que estudaram efeito da fluridona em raízes costumam usá-la no meio de crescimento, e não aspergindo em suas folhas (HAN et al., 2010). Outra possibilidade é que esse composto atue em mais rotas, que não apenas na biossíntese de ABA, sendo possível gerar “efeitos pleotrópicos”.

Nos oito tratamentos analisados (4 tratamentos para cada uma das duas cultivares), observamos que o esperado efeito da fluridona em reduzir ABA foi somente observado no tratamento Embrapa 48 sob estresse severo, e BR16 na ausência de estresse. Resultado oposto, em que a fluridona aumentou o ABA foi observado para a BR 16 sob estresse

moderado. Nos outros 5 tratamentos, a aplicação foliar não afetou a concentração de ABA radicular. Adicionado a este efeito inesperado, houve também a descoloração de várias folhas nas plantas tratadas (Figura 8). Mesmo analisando folhas sem nenhum fenótipo visível, observou-se que este inibidor da síntese de ABA produziu uma inibição da fotossíntese líquida em todos os tratamentos, provavelmente por reduzir a condutância estomática (em alguns tratamentos) e a eficiência de carboxilação (em vários tratamentos).

A fluridona reduziu a respiração em somente 3 tratamentos (dos oito analisados), e este efeito não foi nos mesmos 2 tratamentos em que a fluridona reduziu ABA. Isto pode ser atribuído, parcialmente, a fotossíntese, visto que nem todos os tratamentos onde fluridona diminuiu a fotossíntese apresentaram redução na respiração radicular. Outro fator que pode explicar parcialmente a redução na respiração radicular é sua atuação marcante na cultivar sensível em reduzir o teor de ACC. O segundo efeito da fluridona foi reduzir o teor de zeatina em dois tratamentos na cultivar sensível. Na literatura já foi descrito o efeito da fluridona em reduzir o etileno (SPOLLEN et al., 2000; TRIVELLINI et al., 2011).

A fluridona, como o ABA, afeta mais o metabolismo dos aminoácidos do que o metabolismo de ácidos orgânicos ou açúcares estudados aqui. Alguns efeitos da fluridona foram opostos a aplicação de ABA. Por exemplo, o efeito do ABA em reduzir os ácidos orgânicos e aminoácidos no tratamento reirrigado foi amenizado na presença da fluridona. O aumento de aminoácidos sob estresse severo após a aplicação de ABA na cultivar sensível também foi reduzido com a fluridona.

Apesar da fluridona afetar pouco os níveis de ABA nas raízes, é possível que tenha havido alguma redução no teor de ABA foliar, não medido aqui. Esta possível alteração poderia mediar um sinal que alteraria o efeito do ABA em alguns metabólitos radiculares. Os maiores efeitos da fluridona foram no tratamento reirrigado, exatamente onde fluridona reduziu a respiração em ambos os genótipos. Estes resultados reforçam que as mudanças respiratórias radiculares estão fortemente associadas a taxa de síntese de aminoácidos nas raízes

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados desta tese demonstram como a tolerância à seca é uma característica adquirida por meio da ação de diversos mecanismos. Aqui ficou registrado que a cultivar tolerante (Embrapa 48) consegue retardar a desidratação foliar apresentando maior fotossíntese líquida e maior eficiência do uso da água. Outro dado importante apresentado foi que a tolerância à seca diferencial entre as duas cultivares de soja parece estar relacionada a maior respiração radicular do genótipo Embrapa 48 (tolerante), que foi também comprovada pela análise de expressão gênica e atividade enzimática de enzimas glicolíticas. Considerando o amplo efeito na expressão gênica na cultivar tolerante, sugerimos que o aumento da expressão das enzimas PGM, aldolase, TPI, PGK, PK e OGD tenham contribuído para maior taxa respiratória nas raízes das plantas tolerantes sob estresse severo, e de que a maior atividade da oxidase alternativa tenha sido uma importante contribuição para a tolerância ao estresse hídrico. O ciclo de Krebs é um importante modulador do metabolismo de aminoácidos, e isso pode ser comprovado pelas respostas da cultivar tolerante que possui altas taxas respiratórias e acumulou mais aminoácidos durante o estresse, os quais são importantes para ajuste osmótico, estabilização de enzimas e proteção contra danos oxidativos. Além dos aspectos relacionados a metabolismo respiratório, a cultivar tolerante também mostrou-se eficiente na atividade de seu metabolismo antioxidativo. A aplicação exógena de ABA diminuiu a fotossíntese e afetou a concentração de outros hormônios, como ACC e zeatina. Somente a cultivar sensível, após aplicação de ABA exógeno, registrou aumento nos teores de ácidos orgânicos e aminoácidos. A fluridona reduziu a fotossíntese e respiração nos dois genótipos e afetou pouco os níveis de ABA nas raízes. Além disso, de forma geral, a aplicação de fluridona proporcionou aumentos nos teores de aminoácidos e ácidos orgânicos em ambas cultivares. Os resultados desta tese evidenciam que as mudanças respiratórias radiculares estão fortemente associadas a taxa de síntese de aminoácidos nas raízes, e que os mecanismos respiratórios e antioxidativos são de grande importância para a tolerância à seca na cultivar de soja Embrapa 48.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBACETE, A. A.; MARTINEZ-ANDUJAR, C.; PEREZ-ALFOCEA, F. Hormonal and metabolic regulation of source-sink relations under salinity and drought: from plant survival to crop yield stability. **Biotechnol Adv**, v. 32, n. 1, p. 12-30, 2014.

ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiol**, v. 109, n. 4, p. 1247-1257, 1995.

ARAUJO, W. L.; NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R. On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions. **Photosynth Res**, v. 119, n. 1-2, p. 141-56, Feb 2014.

ATKIN, O. K.; MACHEREL, D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. **Ann Bot**, v. 103, n. 4, p. 581-97, Feb 2009.

BARTOLI, C. G.; GOMEZ, F.; GERGOFF, G.; GUIAMET, J. J.; PUNTARULO, S. Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. **J Exp Bot**, v. 56, n. 415, p. 1269-76, May 2005.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem**, v. 44, n. 1, p. 276-87, Nov 1971.

BENJAMIN, J. G.; NIELSEN, D. C. Water deficit effects on root distribution of soybean, field pea and chickpea. **Field Crops Research**, v. 97, n. 2-3, p. 248-253, 6/1/ 2006.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-90, 1985.

CUADROS-INOSTROZA, A.; CALDANA, C.; REDESTIG, H.; KUSANO, M.; LISEC, J.; PENA-CORTES, H.; WILLMITZER, L.; HANNAH, M. A. TargetSearch--a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 428, 2009.

CUI, H.; HAO, Y.; KONG, D. SCARECROW Has a SHORT-ROOT-Independent Role in Modulating the Sugar Response(1). **Plant Physiol**, v. 158, n. 4, p. 1769-1778, 2006.

DEL LONGO, O. T.; GONZÁLEZ, C. A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant Defences under Hyperoxygenic and Hyperosmotic Conditions in Leaves of Two Lines of Maize with Differential Sensitivity to Drought. **Plant and Cell Physiol**, v. 34, n. 7, p. 1023-1028, October 1, 1993 1993.

DUTILLEUL, C. Leaf Mitochondria Modulate Whole Cell Redox Homeostasis, Set Antioxidant Capacity, and Determine Stress Resistance through Altered Signaling and Diurnal Regulation. **The Plant Cell Online**, v. 15, n. 5, p. 1212-1226, 2003.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 4, p. 673-89, Feb 2015.

FERNIE, A. R.; CARRARI, F.; SWEETLOVE, L. J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Curr Opin Plant Biol**, v. 7, n. 3, p. 254-61, Jun 2004.

FORCAT, S.; BENNETT, M. H.; MANSFIELD, J. W.; GRANT, M. R. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. **Plant Methods**, v. 4, p. 16, 2008.

FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J. H.; MYLONA, P.; MIEDEMA, H.; TORRES, M. A.; LINSTEAD, P.; COSTA, S.; BROWNLEE, C.; JONES, J. D.; DAVIES, J. M.; DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, v. 422, n. 6930, p. 442-6, Mar 27 2003.

GHOSH, D.; XU, J. Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. **Front Plant Sci**, v. 5, p. 6, 2014.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases: II. Purification and Quantitative Relationship with Water-soluble Protein in Seedlings. **Plant Physiol**, v. 59, n. 2, p. 315-318, 1977.

GIBON, Y.; BLAESING, O. E.; HANNEMANN, J.; CARILLO, P.; HOHNE, M.; HENDRIKS, J. H.; PALACIOS, N.; CROSS, J.; SELBIG, J.; STITT, M. A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3304-25, Dec 2004.

GOLLDACK, D.; LI, C.; MOHAN, H.; PROBST, N. Gibberellins and abscisic acid signal crosstalk: living and developing under unfavorable conditions. **Plant Cell Rep**, v. 32, n. 7, p. 1007-16, Jul 2013.

\_\_\_\_\_. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. **Front Plant Sci**, v. 5, p. 151, 2014.

HACKETT, D. P.; THIMANN, K. V. The Effect of Auxin on Growth and Respiration of Artichoke Tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 38, n. 9, p. 770-775, 1952.

HAN, W.; ZHANG, H.; WANG, M. H. Fluridone affects quiescent centre division in the Arabidopsis thaliana root stem cell niche. **BMB Rep**, v. 43, n. 12, p. 813-7, Dec 2010.

HANQING, F.; KUN, S. U. N.; MINGQUAN, L. I.; HONGYU, L. I.; XIN, L. I.; YAN, L. I.; YIFENG, W. The expression, function and regulation of mitochondrial alternative oxidase under biotic stresses. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 3, p. 429-440, 2010.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol**, v. 84, n. 2, p. 450-5, Jun 1987.

JACOBY, R. P.; LI, L.; HUANG, S.; PONG LEE, C.; MILLAR, A. H.; TAYLOR, N. L. Mitochondrial composition, function and stress response in plants. **J Integr Plant Biol**, v. 54, n. 11, p. 887-906, Nov 2012.

JORGE, T. F.; RODRIGUES, J. A.; CALDANA, C.; SCHMIDT, R.; VAN DONGEN, J. T.; THOMAS-OATES, J.; ANTONIO, C. Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. **Mass Spectrom Rev**, Jan 14 2015.

KULCHESKI, F. R.; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.; NEPOMUCENO, A. L.; ABDELNOOR, R. V.; MARGIS, R. The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean. **Anal Biochem**, v. 406, n. 2, p. 185-92, Nov 15 2010.

KUPPU, S.; MISHRA, N.; HU, R.; SUN, L.; ZHU, X.; SHEN, G.; BLUMWALD, E.; PAYTON, P.; ZHANG, H. Water-deficit inducible expression of a cytokinin biosynthetic gene IPT improves drought tolerance in cotton. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64190, 2013.

LEHMANN, M.; LAXA, M.; SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R.; OBATA, T. Metabolic recovery of Arabidopsis thaliana roots following cessation of oxidative stress. **Metabolomics**, v. 8, n. 1, p. 143-153, 2012.

LEONOVA, L. A.; GAMBURG, K. Z.; VOJNIKOV, V. K.; VARAKINA, N. N. Promotion of respiration by auxin in the induction of cell division in suspension culture. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 4, n. 1-4, p. 169-176, 1985.

LI, Z.; ZHAO, X.; SANDHU, A. K.; GU, L. Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities, and phytochemical contents of greenhouse grown lettuces. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 10, p. 6503-9, May 26 2010.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nat Protoc**, v. 1, n. 1, p. 387-96, 2006.

MACKOVA, H.; HRONKOVA, M.; DOBRA, J.; TURECKOVA, V.; NOVAK, O.; LUBOVSKA, Z.; MOTYKA, V.; HAISEL, D.; HAJEK, T.; PRASIL, I. T.; GAUDINOVA, A.; STORCHOVA, H.; GE, E.; WERNER, T.; SCHMULLING, T.; VANKOVA, R. Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. **J Exp Bot**, v. 64, n. 10, p. 2805-15, 2013.

MESQUITA, R. O. **Determinantes fisiológicos e moleculares da resposta diferencial à seca em soja**. Tese Universidade Federal de Viçosa. 2013.

MILLAR, A. H.; WHELAN, J.; SOOLE, K. L.; DAY, D. A. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. **Annu Rev Plant Biol**, v. 62, p. 79-104, 2011.

MULLER, M.; MUNNE-BOSCH, S. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Plant Methods**, v. 7, p. 37, 2011.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, August 1, 1981 1981.

NOCTOR, G.; DE PAEPE, R.; FOYER, C. H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. **Trends Plant Sci**, v. 12, n. 3, p. 125-34, Mar 2007.

NUNES-NESE, A.; ARAUJO, W. L.; FERNIE, A. R. Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. **Plant Physiol**, v. 155, n. 1, p. 101-7, Jan 2011.

NUNES-NESE, A.; CARRARI, F.; GIBON, Y.; SULPICE, R.; LYTOVCHENKO, A.; FISAHN, J.; GRAHAM, J.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R. Deficiency of mitochondrial fumarate hydratase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **Plant J**, v. 50, n. 6, p. 1093-106, 2007.

OSAKABE, Y.; OSAKABE, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN, L. S. Response of plants to water stress. **Front Plant Sci**, v. 5, p. 86, 2014.

PAVENTI, G.; PASTORE, D.; BOBBA, A.; PIZZUTO, R.; DI PEDE, S.; PASSARELLA, S. Plant uncoupling protein in mitochondria from aged-dehydrated slices of Jerusalem artichoke tubers becomes sensitive to superoxide and to hydrogen peroxide without increase in protein level. **Biochimie**, v. 88, n. 2, p. 179-88, Feb 2006.

PEREZ-ALFOCEA, F.; GHANEM, M. E.; GOMEZ-CADENAS, A.; DODD, I. C. Omics of root-to-shoot signaling under salt stress and water deficit. **OMICS**, v. 15, n. 12, p. 893-901, Dec 2011.

PU, X.; LV, X.; TAN, T.; FU, F.; QIN, G.; LIN, H. Roles of mitochondrial energy dissipation systems in plant development and acclimation to stress. **Ann Bot**, May 18 2015.

QIN, H.; GU, Q.; ZHANG, J.; SUN, L.; KUPPU, S.; ZHANG, Y.; BUROW, M.; PAYTON, P.; BLUMWALD, E.; ZHANG, H. Regulated expression of an isopentenyltransferase gene (IPT) in peanut significantly improves drought tolerance and increases yield under field conditions. **Plant Cell Physiol**, v. 52, n. 11, p. 1904-14, 2011.

RAGHAVENDRA, A. S.; PADMASREE, K. Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. **Trends Plant Sci**, v. 8, n. 11, p. 546-53, 2003.

REGUERA, M.; PELEG, Z.; ABDEL-TAWAB, Y. M.; TUMIMBANG, E. B.; DELATORRE, C. A.; BLUMWALD, E. Stress-induced cytokinin synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice. **Plant Physiol**, v. 163, n. 4, p. 1609-22, 2013.

RIBEIRO, D. M.; DESIKAN, R.; BRIGHT, J. O.; CONFRARIA, A. N. A.; HARRISON, J.; HANCOCK, J. T.; BARROS, R. S.; NEILL, S. J.; WILSON, I. D. Differential requirement for NO during ABA-induced stomatal closure in turgid and wilted leaves. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 1, p. 46-57, 2009.

RIVERO, R. M.; GIMENO, J.; VAN DEYNZE, A.; WALIA, H.; BLUMWALD, E. Enhanced cytokinin synthesis in tobacco plants expressing PSARK::IPT prevents the degradation of photosynthetic protein complexes during drought. **Plant Cell Physiol**, v. 51, n. 11, p. 1929-41, Nov 2010.

RUIZ-MAY, E.; DE-LA-PENA, C.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LEI, Z.; WATSON, B. S.; SUMNER, L. W.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Methyl jasmonate induces ATP biosynthesis deficiency and accumulation of proteins related to secondary metabolism in *Catharanthus roseus* (L.) G. hairy roots. **Plant Cell Physiol**, v. 52, n. 8, p. 1401-21, Aug 2011.

SALEH, L.; PLIETH, C. Fingerprinting antioxidative activities in plants. **Plant Methods**, v. 5, p. 2, 2009.

\_\_\_\_\_. A coelenterazine-based luminescence assay to quantify high-molecular-weight superoxide anion scavenger activities. **Nat Protoc**, v. 5, n. 10, p. 1635-41, Sep 2010a.

\_\_\_\_\_. Total low-molecular-weight antioxidants as a summary parameter, quantified in biological samples by a chemiluminescence inhibition assay. **Nat Protoc**, v. 5, n. 10, p. 1627-34, Sep 2010b.

SCHACHTMAN, D. P.; GOODGER, J. Q. D. Chemical root to shoot signaling under drought. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 6, p. 281-287, 2008.

SCHIPPERS, J. H.; NUNES-NESE, A.; APETREI, R.; HILLE, J.; FERNIE, A. R.; DIJKWEL, P. P. The Arabidopsis onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase affects nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. **Plant Cell**, v. 20, n. 10, p. 2909-25, Oct 2008.

SILVENTE, S.; SOBOLEV, A. P.; LARA, M. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38554, 2012.

SPOLEEN, W. G.; LENOBLE, M. E.; SAMUELS, T. D.; BERNSTEIN, N.; SHARP, R. E. Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. **Plant Physiol**, v. 122, n. 3, p. 967-76, Mar 2000.

STOLF-MOREIRA, R.; MEDRI, M. E.; NEUMAIER, N.; LEMOS, N. G.; PIMENTA, J. A.; TOBITA, S.; BROGIN, R. L.; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.; OLIVEIRA, M. C.; FARIAS, J. R.; ABDELNOOR, R. V.; NEPOMUCENO, A. L. Soybean physiology and gene expression during drought. **Genet Mol Res**, v. 9, n. 4, p. 1946-56, 2010.

SWEETLOVE, L. J.; LYTOVCHENKO, A.; MORGAN, M.; NUNES-NESI, A.; TAYLOR, N. L.; BAXTER, C. J.; EICKMEIER, I.; FERNIE, A. R. Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 51, p. 19587-92, Dec 19 2006.

TANIGUCHI, M.; MIYAKE, H. Redox-shuttling between chloroplast and cytosol: integration of intra-chloroplast and extra-chloroplast metabolism. **Curr Opin Plant Biol**, v. 15, n. 3, p. 252-60, Jun 2012.

TOORCHI, M.; YUKAWA, K.; NOURI, M. Z.; KOMATSU, S. Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. **Peptides**, v. 30, n. 12, p. 2108-17, Dec 2009.

TRIVELLINI, A.; FERRANTE, A.; VERNIERI, P.; SERRA, G. Effects of abscisic acid on ethylene biosynthesis and perception in *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower development. **J Exp Bot**, v. 62, n. 15, p. 5437-52, Nov 2011.

VAN AKEN, O.; GIRAUD, E.; CLIFTON, R.; WHELAN, J. Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. **Physiol Plant**, v. 137, n. 4, p. 354-61, Dec 2009.

VAN DER MERWE, M. J.; OSORIO, S.; ARAUJO, W. L.; BALBO, I.; NUNES-NESI, A.; MAXIMOVA, E.; CARRARI, F.; BUNIK, V. I.; PERSSON, S.; FERNIE, A. R. Tricarboxylic acid cycle activity regulates tomato root growth via effects on secondary cell wall production. **Plant Physiol**, v. 153, n. 2, p. 611-21, Jun 2010.

VAN DONGEN, J. T.; GUPTA, K. J.; RAMIREZ-AGUILAR, S. J.; ARAUJO, W. L.; NUNES-NESI, A.; FERNIE, A. R. Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. **J Plant Physiol**, v. 168, n. 12, p. 1434-43, Aug 15 2011.

VANLERBERGHE, G. C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 4, p. 6805-47, 2013.

VANLERBERGHE, G. C.; CVETKOVSKA, M.; WANG, J. Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? **Physiol Plant**, v. 137, n. 4, p. 392-406, Dec 2009.

WANG, J.; VANLERBERGHE, G. C. A lack of mitochondrial alternative oxidase compromises capacity to recover from severe drought stress. **Physiol Plant**, Apr 13 2013.

WERNER, T.; NEHNEVAJOVA, E.; KOLLMER, I.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; KRAMER, U.; SCHMULLING, T. Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in Arabidopsis and tobacco. **Plant Cell**, v. 22, n. 12, p. 3905-20, 2010.

WERNER, T.; SCHMULLING, T. Cytokinin action in plant development. **Curr Opin Plant Biol**, v. 12, n. 5, p. 527-38, Oct 2009.

WILKINSON, S.; KUDOYAROVA, G. R.; VESELOV, D. S.; ARKHIPOVA, T. N.; DAVIES, W. J. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. **J Exp Bot**, v. 63, n. 9, p. 3499-509, May 2012.

XU, F.; YUAN, S.; ZHANG, D. W.; LV, X.; LIN, H. H. The role of alternative oxidase in tomato fruit ripening and its regulatory interaction with ethylene. **J Exp Bot**, v. 63, n. 15, p. 5705-16, Sep 2012.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

### ANEXO I – Trocas gasosas

Tabela 1 Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs), transpiração líquida (E), Razão Ci/Ca, Eficiência de uso da água (EUA) e eficiência de carboxilação A/Ci em cultivares de soja sob déficit hídrico. Letras correspondem ao teste de média para os tratamentos de estresse avaliados para uma mesma cultivar. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Asterisco indica diferença significativa entre as cultivares para mesmo tratamento também pelo teste de Tukey (P<0,05).

	Embrapa 48				BR 16			
	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado
A	22,18a*	6,65b	4,77c*	18,26a*	18,92a	5,99b	2,80c	15,12a
gs	0,27a	0,02b*	0,02b*	0,24a*	0,26a	0,03c	0,01d	0,12b
E	3,20a	0,578*	0,57*	3,72a*	4,35a	0,80c	0,39d	2,32b
EUA	5,9c	11,61a*	8,29b	4,98c*	4,67b	7,54a	7,29a	6,57a
Ci/Ca	0,56a	0,15b*	0,17b	0,63a*	0,62a	0,27b	0,21b	0,50b
A/Ci	0,09a	0,08a*	0,07a*	0,07a	0,07a	0,05b	0,03b	0,07a

Tabela 2 Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs), transpiração líquida (E), Razão Ci/Ca, Eficiência de uso da água (EUA) e eficiência de carboxilação A/Ci em cultivares de soja sob déficit hídrico após a aplicação de **ABA**. Estatística conforme tabela 1

	Embrapa 48				BR 16			
	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado
A	19,96a	3,08b	3,53b*	20,20a*	16,97a	3,03b	1,17c	14,82a
gs	0,22b	0,01d	0,02c*	0,24a*	0,15a	0,01b	0,01b	0,15a
E	3,92a	0,56b	0,56b*	4,54a*	3,08a	0,43b	0,39b	2,60a
EUA	5,23a	5,83a	6,15a*	4,62a	5,77a	7,76a	3,01b	5,69a
Ci/Ca	0,54a	0,37b	0,36b*	0,65a*	0,46a	0,32a	0,59a	0,56a
A/Ci	0,09a	0,01b	0,04b	0,07a	0,09a	0,04b	0,005c	0,06a

Tabela 2 Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs), transpiração líquida (E), Razão Ci/Ca, Eficiência de uso da água (EUA) e eficiência de carboxilação A/Ci em cultivares de soja sob déficit hídrico após a aplicação de **Fluridona**. Estatística conforme tabela 1

	Embrapa 48				BR 16			
	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado
A	11,58a	4,68b	2,40c	8,80a	12,90a	6,11b	1,67c	9,95b
gs	0,09a	0,02b	0,01c	0,12a	0,11a	0,03b	0,01c	0,16a
E	2,07b	0,65c	0,42d*	3,30a	2,36b	0,86c	0,31d	4,04a
EUA	5,6a	6,9a	5,54a	3,61b	5,69a	6,60a	7,86a	2,45b
Ci/Ca	0,47b	0,34c	0,43b	0,61a*	0,45b	0,31b	0,36b	0,66a
A/Ci	0,05a	0,03b	0,01b	0,03b	0,07a	0,03b	0,01b	0,03b

## ANEXO II - Perfil hormonal

Tabela 1 Perfil hormonal de raízes de soja sob déficit hídrico após aplicação de **ABA** exógeno. Letras correspondem ao teste de média para os tratamentos de estresse avaliados para uma mesma cultivar. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Asterisco indica diferença significativa entre as cultivares para mesmo tratamento também pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Hormônio	Embrapa 48				BR 16			
	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado
ABA	9,2a	9,3 a*	9,9 a	8,8 a	10,8 a	12,3 a	8,9 a	14,8 a
ACC	123,2a*	42,7 b	65,7 b	64,5 b*	98,7 a	26,6 b	41,6 b	101,7 a
AIA	2,9 a	1,0 b	2,0 a*	2,7 a*	2,5 b	0,8 c	1,1c	4,5 a
AS	2,0 b*	7,2 a	4,0 b*	4,5 b*	6,1 a	5,6 a	1,8 b	2,5 b
Me-JA	4,9 a	0,3 b*	1,2 b*	2,6 a	6,2 a	2,7 a	2,6 a	1,8 a
Zeatina	40,0 a*	6,7 b*	5,3 b	2,5 b*	2,5 d	13,8 b	4,1 c	15,5 a
Zeatina2	0,8 c*	1,6 a*	2,1 a	0,9 b	1,1b	2,6a	2,3a	0,8b

Tabela 3 Perfil hormonal de raízes de soja sob déficit hídrico após aplicação de **Fluridona** exógeno. Estatística conforme tabela 1 do anexo II.

Hormônio	Embrapa 48				BR 16			
	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado
ABA	2,0 b	7,2 a	2,6 b	8,9 a	1,1 b	5,5 a	4,9 a	7,7 a
ACC	46,0 a	41,6 a*	45,1 a*	35,2 a*	64,8 a	9,6 b	11,6 b	12,3b
AIA	2,5 a	3,0 a*	1,2 c	1,6 b	2,9 a	0,9 c	1,0 bc	2,3 a
AS	1,8 b*	10,4 a*	9,1 a*	10,2 a*	6,0 a	8,4 a	3,3 b	3,0 b
Me-JA	2,4 a	1,6 a	1,6 a	3,2 a	3,7 a	2,5 a	2,9 a	2,6 a
Zeatina	74,9 a*	4,3 b	2,9 b*	3,5 b*	2,7 a	2,5 a	10,5 a	12,6 a
Zeatina2	0,7 a	1,7 a*	0,9 a*	0,6 a	0,6 b	0,8 b	3,2 a	0,4 b

### ANEXO III - Morfologia de raízes

Tabela 1 Análise morfológica de raízes de soja sob déficit hídrico após aplicação de **ABA** exógeno. Comprimento (cm), área superficial (cm<sup>2</sup>), volume (cm<sup>3</sup>) e diâmetro (mm). Letras correspondem ao teste de média para os tratamentos de estresse avaliados para uma mesma cultivar. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Asterisco indica diferença significativa entre as cultivares para mesmo tratamento também pelo teste de Tukey (P<0,05).

	<b>Embrapa 48</b>			<b>BR 16</b>		
	Irrigado	Moderado	Severo	Irrigado	Moderado	Severo
Comprimento	5161 a	4995 a	4507 a	6164 a	5170 a	5227 a
Área superficial	7349 a	6204 a	5892 b	1021 a	6941a	6672 a
Volume	91 a	61b	66 b	120 a	74 b	53 b
Diâmetro	0,45 a	0,39 b	0,41 b	0,50 a	0,42 ab	0,39 b

Tabela 2 Análise morfológica de raízes de soja sob déficit hídrico após aplicação de **fluridona**. Estatística conforme tabela 1 do anexo III.

	<b>Embrapa 48</b>			<b>BR 16</b>		
	Irrigado	Moderado	Severo	Irrigado	Moderado	Severo
Comprimento	4812 a	4744 a	3892 a	6542 a	4137 b	4165 b
Área superficial	6093 a	5717 a	4869 a	8313 a	5176 b	4818 b
Volume	61 a	54a	48 a	84 a	51 b	44 b
Diâmetro	0,39 a	0,38 a	0,39 a*	0,40 a	0,39 a	0,36 a

### ANEXO III - Análise de perfil metabólico

Tabela 1 Análise de perfil metabólico de raízes de soja sob déficit hídrico após a aplicação de ABA. Letras correspondem ao teste de média para os tratamentos de estresse avaliados para uma mesma cultivar. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Asterisco indica diferença significativa entre as duas cultivares para mesmo tratamento também pelo teste de Tukey (P<0,05).

Ácidos orgânicos	Embrapa 48				BR 16			
	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado
Ascorbato	0,97 a	1,14 a	0,87 a	0,68 a	0,74 a	1a	1,64 a	0,34 b
Citrato	2,13 a*	2,68 a*	1,31 a	0,22 c	0,69 a	2,07 a	2,44 a	0,12 b
Coumarico ácido	1,59 a	0,9 b	2,86 a	0,52 b	0,93 b	1,68 b	2,87 a	0,62 b
Fumarato	0,64 b	1,96 a	1,01 b	0,62 b*	0,68 b	1,27 a	0,91 a	0,12 b
Glicerato	0,9 a	1,17 a	1,53 a*	0,33 a	0,7 a	0,63 a	1,53 a	0,98 a
Malato	1,19 b	1,01 b*	2,06 a	0,28 b	0,73 b	0,36 b	2,19 a	0,17 b
Malonato	0,82 a	0,87 a	0,81 a	0,29 b	0,69 b	2,66 a	1,41 a	0,69 b
Oxoglutarato	0,52 b	2,41 a	1,72 a	0,16 b	1,12 a	1,21 a	0,58 a	0,14 b
Shiquimato	0,62 b	1,04 a	0,94 a*	0,21 b	0,69 a	0,44 b	0,66 a	0,2 b
Sinápico ácido	0,86 b	0,51 b	1,7 b	0,69 a*	0,63 a	0,85 a	0,95 a	0,22 a
Succinato	0,63 a	0,98 a	0,93 a	0,34 a	0,77 a	0,67 a	1,04 a	0,16 b
<b>Aminoácidos</b>								
Alanina	0,34 a	0,83 a*	0,72 a	0,07 a	0,84 b	0,81 b	2,00a	0,13 b
Asparagina	0,41 a	10,14 a*	8,14 a	5,92 a*	0,46 a	2,18 a	5,13 a	0,48 a
Aspartato	0,55 b	0,99 b	2,3 a	0,22 b	0,49 b	0,28 b	1a	0,27 b
Fenilalanina	0,75 b	6,26 a	1,54 b	0,63 b	0,73 a	1,63 a	1,96 a	0,38 b
GABA	0,25 a	0,35 a	0,26 a	0,05 b	0,35 a	0,83 a	0,54 a	0,06 b
Glutamato	0,34 a	0,42a*	0,53 a	0,58 a	1a	0,05 a	0,35 a	0,16 a
Histidina	0,33 b	1,64 a	1,05 a	1,01 a	0,86 a	0,88 a	1,94 a	0,34 a
Isoleucina	0,47 b	2,37 a	0,56 b	0,24 b	0,55 a	1,01 a	1,29 a	0,71 a
Leucina	0,38 b	1,43 a	0,41 a	0,13 b	0,7 a	0,61 a	0,81 a	0,12 a
Serina	0,2 a	0,7 a	0,36 a	0,09 b	0,38 a	0,24 a	0,61 a	0,06 b
Tirosina	0,49 a	1,4 a	0,7 a*	0,23 b	0,54 a	0,74 a	1,25 a	0,58 a
Triptofano	1,05 a	1,62 a	1,91 a	0,35 a	0,98 a	0,6 b	2,51 a	1,12 a
Valina	0,4 a	1,28 a	0,45 a	0,17 a	0,45 a	0,51 a	0,76 a	0,1 b
<b>Açúcares</b>								
Altrose	0,6 a	0,7 a	0,98 a	0,15 a	0,55 a	0,4 a	1,07 a	0,13 a
Arabinose	0,59 a	0,8 a	0,53 a	0,14 a	0,99 a	0,39 a	0,82 a	0,16 a
Frutose	0,47 a	0,66 a	0,78 a	0,12 a	0,54 a	0,37 b	0,74 a	0,52 a
Fucose	0,54 b	1,08 a	1,41 a	0,12 a	0,69 a	0,49 a	1,01 a	0,12 b
Glicose	0,44 a*	1,01 a	0,63 a	0,07 a	0,62 a	0,29 b	0,67 a	0,07 b
Maltose	0,75 a	0,9 a	0,74 a	0,19 b	0,58 a	0,44 a	0,97 a	0,18 b
Sacarose	0,72 a*	0,75 a*	1,41 a	0,36 a	0,61 a	0,46 a	2,42 a	0,23 a
Trealose	0,27 b	0,52 b	1,04 a*	0,12 a	1,04 a	0,28 b	1,25 a	0,09 c

Tabela 3 Análise de perfil metabólico de raízes de soja sob déficit hídrico após a aplicação de fluridona. Estatística conforme tabela 1 do anexo III.

Ácidos orgânicos	Embrapa 48				BR 16			
	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado	Irrigado	Moderado	Severo	Reirrigado
Ascorbato	1,43 a	0,86 a*	1,16 a	0,64 a	3,24 a	1,75 a	1,11 b	0,56 c
Citrato	1,64 b	1,19 b	8,91 a*	1,49 b*	2,47 a	1,41 b	1,58 b	0,39 b
Coumarico ácido	1,22 a	1,05 a	1,28 a*	0,63 a	2,13 a	1,14 b	2,7 a	1,03 b
Fumarato	0,78 b	0,54 b	2,13 a	0,62 b	1,51 a	0,72 a	0,76 a	0,66 a
Glicerato	0,86 a*	1,03 a	1,4 a	0,04 b	2,07 a	0,87 b	1,03 b	0,74 b
Malato	1,06 b	0,66 b	2,21 a	1,25 b	4,06 a	0,86 b	1,43 b	0,72 b
Malonato	1,11 a	0,65 a	1,43 a	0,64 a	8,54 a	1,53 b	0,74 c	0,48 c
Oxoglutarato	0,69 a	0,37 a	3,74 a	0,77 a	4,14 a	0,9 b	0,66 b	0,29 b
Shiquimato	0,88 a	0,46 a*	1,2 a	0,5 a	1,44 a	1,59 a	0,85 b	0,43 b
Sinápico ácido	0,86 a*	0,51 a	0,84 a	0,77 a*	0,79 a	0,75 a	0,52 a	0,42 a
Succinato	0,79 a	0,56 a	1,32 a	0,71 a	1,7 a	0,76 a	0,71 a	0,51 a
<b>Aminoácidos</b>								
Alanina	0,77 a*	0,8 a	2,07 a	0,51 a	3,22 a	1,84 a	1,12 a	0,78 b
Asparagina	3,48 a*	2,52 a	1,59 a	1,38 a	4,64 a	1,14 a	6,62 a	4,96 a
Aspartato	0,59 b	0,49 b	2,66 a	0,66 b	9,2 a	1,13 b	1,05 b	0,74 b
Fenilalanina	2,11 a	1,04 b	3,15 a*	0,52 b	6,11 a	2,88 b	0,97 c	1,21 c
GABA	0,35 a	0,19 a	1,15 a	0,06 b	0,64 a	0,4 a	0,32 a	0,2 a
Glutamato	0,19 a	0,47 a	0,42a*	0,28 a	0,33 b	0,17 b	0,93 a	0,16 b
Histidina	1,05 a	0,69 a	2,14 a	0,48 b*	3,36 a	0,79 a	1,61 a	0,34 a
Isoleucina	0,95 a*	0,6 a	1,68 a*	0,37 a	2,42 a	1,36 a	0,56 b	0,6 b
Leucina	0,73 a	0,42 a*	0,99 a	0,18 a	1,62 a	0,93 a	0,36 a	0,53 a
Serina	0,22 a*	0,23 aa	0,99 a	0,12 a	0,8 a	0,32 a	0,37 a	0,3 a
Tirosina	1,06 a*	0,91 a*	1,79 a*	0,42 b	3,32 a	2,68 a	0,93 b	0,9 b
Triptofano	1,2 b*	2,13 a	4,58 a*	1,19 b	3,28 a	1,78 a	1,66 a	3,8 a
Valina	0,67 b	0,43 b	1,01 a	0,2 b	1,48 a	0,63 b	0,47 b	0,43 b
<b>Açúcares</b>								
Altrose	0,6 a	0,38 a	0,93 a	0,38 a	1,5 a	0,96 a	1,27 a	0,49 a
Arabinose	0,77 a	0,39 a	0,74 a	0,52 a	5,07 a	1,05 b	1,13 b	0,27 b
Frutose	0,56 a	0,32 a	0,9 a	0,33 a	1,22 a	0,72 a	0,84 a	0,36 a
Fucose	1,04 a	0,51 a	1,52 a*	0,47 a	4,04 a	1,64 b	0,6 c	0,27 c
Glicose	0,49 a	0,26 a	0,66 a	0,19 a	2,16 a	0,73 b	0,8 a	0,15 b
Maltose	0,53 a*	0,36 a*	1,05 a	0,38 a	2,46 a	0,7 a	0,48 b	1,43 a
Sacarose	0,77 a	0,66 a*	1,18 a	0,92 a	1,49 a	1,05 a	2,67 a	0,9 a
Trealose	1a*	0,73 a	1,52 a	0,92 a	2,74 a	1,1 b	0,99 b	0,57 b