

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA VEGETAL)**

---

**Ação de Gaba e Acetilcolina como bioreguladores na fisiologia de soja sob  
deficiência hídrica.**

**Dra. Inaê Braga**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Março - 2018

Ação de Gaba e Acetilcolina como bioreguladores na fisiologia de soja sob deficiência hídrica

Dra. Inaê Braga

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Maia Souza

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Esteves Gonzaga Vieira

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Março- 2018

581.1 Braga, Inaê  
B813a Ação de Gaba e Acetilcolina como biorreguladores na fisiologia de soja sob deficiência hídrica / Inaê Braga. - Rio Claro, 2018  
132 f. : il., figs., gráfs., tabs. + 8 tabelas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Gustavo Maia Souza  
Coorientador: Luiz Esteves Gonzaga Vieira

1. Fisiologia vegetal. 2. Glycine max. 3. Acetilcolina. 4. Gaba. 5. Déficit hídrico. I. Título.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Ação de neurotransmissores como bioreguladores no metabolismo de soja sob deficiência hídrica.

**AUTORA: INAE BRAGA**

**ORIENTADOR: GUSTAVO MAIA SOUZA**

**COORIENTADOR: LUIZ GONZAGA ESTEVES VIEIRA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. GUSTAVO MAIA SOUZA  
Instituto de Biologia / Universidade Federal de Pelotas

  
Prof. Dr. GUSTAVO HABERMANN  
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

  
Prof. Dr. DOUGLAS SILVA DOMINGUES  
Departamento de Botânica / IB Rio Claro

  
Prof. Dr. PAULO MAZZAFERA  
Departamento de Biologia Vegetal / Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas

  
Prof. Dr. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA  
Dep Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP

Rio Claro, 06 de março de 2018

## **Dedicatória**

***Dedico este trabalho a Deus primeiramente, por sua graça, misericórdia e pelo cumprimento de suas promessas em minha vida. Decido a Deus pai, Deus filho e ao Espírito Santo de Deus.***

***Decido também aos meus pais, Wilson e Sueli, aos meus irmãos, Junior e Wellington, e ao meu marido, Juliano, por todo amor e incentivo.***

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus por abrir portas em minha vida e me capacitar para que eu pudesse desenvolver essa pesquisa

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP e, em especial, ao Departamento de Botânica e a Seção Técnica de Pós-graduação do Instituto de Biociências da UNESP – campus Rio Claro

À Empresa Multinacional Stoller do Brasil, pelo apoio e auxílio financeiro para a execução da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Doutorado.

Ao Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista (CEVOP) – Unoeste pela infraestrutura para a realização deste estudo.

Aos amigos de laboratório Dra. Adriana Moro, Dra. Suzana Chiari Bertolli, Ma. Viviane Cacefo, Ma. Kezia Guidorizi, Dr. Alexandrius de Moraes, Me. Rafael Rebes Zilliani, Me. Willyam Vieira, Me. Gustavo Saraiva, Me. Gabriel Ricardo Aguilera de Toletto, Me. Hilton Fabrício, e ao Biólogo Daniel Moreira Neris por todo apoio e ajuda, e claro, pela amizade construída ao longo dos anos.

A todos integrantes do Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista (CEVOP), que formam uma equipe unida, e que tem sido meu segundo lar todos esses anos.

A Bióloga Maria Dolores Pissolato, que esteve comigo desde o início dessa pesquisa, agradeço por sua amizade, disposição e auxílio na execução deste trabalho, sua ajuda foi essencial.

Ao Dr. Willian Takata, por toda a sua boa vontade e paciência em me ajudar. Agradeço de coração.

A Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas, que tanto colaborou com a execução desta pesquisa, agradeço por sua ajuda, disposição, paciência, confiança e amizade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira (Santista) pela orientação e dedicação, por sempre estar disposto a me ajudar, por inúmeras vezes ter contribuído com as idéias e produção desta pesquisa, e pela oportunidade de

conhecer e conviver, para que assim pudesse adquirir um pouco do seu conhecimento. Manifesto aqui meus sinceros agradecimentos e minha admiração.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Maia Souza por ter me dado a oportunidade e depositado sua confiança em mim, para que eu pudesse desenvolver esse trabalho, por ter aceitado a me orientar, por todos os ensinamentos, paciência e claro sempre disposto a me ajudar mediante às dificuldades. Agradeço de coração, pois apesar da distância nos últimos anos, sempre agiu de forma muito presente. Deixo aqui minha admiração, não somente profissional, mais também, pessoal, pois sempre demonstrou preocupação com o bem-estar do próximo.

A todos familiares que sempre me apoiaram. Aos meus avós paternos Sebastião e Clarisse Braga, e aos maternos Salvador e Maria Delanhese (In Memoriam). A todos os meus tios e primos. Ao meu sogro José Reis (In Memoriam) e minha sogra Ivone Reis.

Agradeço aos meus pais, Wilson e Sueli, pelos conselhos, por sempre estarem ao meu lado me apoiando, incentivando, por todo o amor e estrutura familiar. Por seus esforços e lutas diárias para garantir meu futuro. E por me deixarem a herança mais preciosa que poderiam: os estudos.

Aos meus irmãos Júnior e Wellington, pelo exemplo de pessoas e profissionais, por todo conselho e incentivo. Às minhas cunhadas, Karina e Eliana por todo apoio. E ao meu sobrinho, Levi, que com seu sorriso inocente me ensinou uma forma pura de amar.

Ao meu marido, Juliano Reis, pela dedicação, cumplicidade, carinho, e suporte ao longo dessa jornada. Por sua disposição em sempre me ajudar, por apoiar minhas decisões, por me encorajar nas futuras conquistas. E por dividir sua vida e amor comigo.

Aos membros desta banca avaliadora, que disponibilizaram algumas das suas preciosas horas na leitura e avaliação deste estudo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, pois as conquistas nunca são individuais...

A todos meus sinceros e humildes agradecimentos.

“Quanto mais me aprofundo na Ciência, mas me aproximo de Deus.”

Albert Einstein

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1 Resposta das plantas à Seca.....	22
1.2 Sinalização de Fosfolipídios independentes de ABA.....	26
1.3 Vias de sinalização envolvidas na resposta ao déficit hídrico.....	27
1.4 Biossíntese do ABA.....	30
1.5 GABA no metabolismo vegetal.....	31
1.6 Acetilcolina no metabolismo vegetal.....	34
1.7 Ação de GABA e Acetilcolina como bioreguladores.....	37
<b>2. Objetivo e Hipótese</b> .....	38
2.1 Objetivos específicos.....	39
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	40
3.1 Experimento 1. Aplicação de GABA e Ach na germinação de soja sob estresse osmótico.....	40
3.2 Experimento 2. Aplicações de GABA e Ach em diferentes estágios de desenvolvimento de soja sob Déficit Hídrico.....	42
3.3 Experimento 3. Aplicação de GABA e Ach em evento de suspensão e retomada da irrigação.....	43
3.3.1 Coleta de Material Vegetal .....	44
3.4 Parâmetros de Avaliação.....	44
3.5 Parâmetros Biométricos .....	45
3.6 Análises bioquímicas.....	45
3.7 Análises Moleculares.....	47
3.8 Análise de Dados.....	53
<b>4. RESULTADOS</b> .....	54
4.1 Aplicações de GABA e Ach na germinação de soja sob estresse osmótico.....	54
4.2 Análises de componentes principais.....	62
4.3 Análises morfológicas de Raiz .....	64
4.4 Análises de Trocas Gasosas de soja com aplicação de GABA e Ach sob déficit hídrico.....	66
4.5 Análises de Trocas Gasosas de soja com aplicação de GABA e Ach sob ciclo de suspensão.....	70
4.6 Análises da expressão gênica por RT-Qpcr.....	79

4.7 Atividades enzimáticas .....	82
4.8 Conteúdo de Prolina na folha.....	86
4.9 Rendimentos de Biomassa.....	88
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>104</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>
ANEXOS.....	123
ANEXO A. Tabela 2. Resultados do ensaio 1 do experimento 1: combinações das diferentes concentrações de GABA (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob controle e -1,0 MPa induzidas com manitol.....	124
ANEXO B. Tabela 3. Resultados do ensaio 2 do experimento 1: combinações das diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob controle e -1,0 MPa induzidas com manito.....	125
ANEXO C. Tabela 4. Combinações das doses de GABA a 0,5 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontencial osmótico de 0MPa, e -1,0MPa induzido por manitol (M1) comparados ao tratamento Controle.....	126
ANEXO D. Tabela 5. Combinações das doses de GABA a 0,5 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontencial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Manitol a -1,0MPa.....	127
ANEXO F. Tabela 6. Combinações das doses de GABA a 1,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontencial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Controle a 0MPa.....	128
ANEXO G. Tabela 7. Combinações das doses de GABA a 1,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontencial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Manitol a -1,0MPa.....	129
ANEXO H. Tabela 8. Combinações das doses de GABA a 2,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontencial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Controle a 0MPa.....	132
ANEXO I. Tabela 9. Combinações das doses de GABA a 2,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontencial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Manitol a -1,0MPa.....	130

## Resumo

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), uma das principais culturas oleaginosas, é muito sensível a fatores ambientais, sendo a deficiência hídrica um fator particularmente limitante para seu desenvolvimento e produção. Algumas substâncias podem ser utilizadas para minimizar os efeitos danosos do estresse hídrico. Bioreguladores, tais como ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e Acetilcolina (Ach) atuam na defesa de plantas em respostas ao estresse, desempenhando um papel osmoprotetor e na regulação do movimento estomático, respectivamente. O objetivo deste estudo foi de analisar diferentes modos de aplicação exógena desses dois bioreguladores (isoladamente ou em combinação) e estudar o seu efeito na regulação dos processos de resposta de soja ao déficit hídrico. Para tanto, foi realizada a aplicação combinada dos dois bioreguladores na dose de 2,0 mM em plantas de soja cv. Intacta sob diferentes regimes hídricos. Os fatores estudados foram: 1) da aplicação dos bioreguladores (i) nas sementes- S (ii) via foliar F; (iii) nas semente e via foliar - SF; (iv) controle sem aplicação - C; e 2) regimes hídricos: (i) 100% da capacidade de campo (CC) e (ii) suspensão da irrigação (SI). Foram realizadas análises de trocas gasosas foliares e biomassa para caracterização fisiológica das plantas, das atividades das enzimas anti-oxidantes (CAT e APX) e das alterações nas respostas transcricionais dos genes induzidos por deficiência hídrica, *P5CS*, *LEA* e *ABA2*. Para os tratamentos de déficit hídrico, foi observada uma queda de 93% da capacidade fotossintética (PN) no sexto dia após a suspensão da irrigação, assim como diminuição da biomassa, além de apresentar maior expressão dos genes induzidos por deficiência hídrica. O tratamento da combinação das substâncias GABA e Ach aplicados na semente e na folha sob déficit hídrico, destacou-se por apresentar menor queda da fotossíntese, assim como, aumento para condutância estomática e biomassa. Para as análises transcricionais a aplicação da combinação de GABA e Ach em semente e folha apresentaram menor expressão dos genes *P5CS*, *LEA* e *ABA2* e maior atividade das enzimas SOD, CAT e APX, em relação ao tratamento controle. Em nosso estudo foi possível observar que a aplicação combinada das substâncias GABA e Ach na semente e folha a 2,0 mM promoveu uma melhora do desempenho das plantas por meio da ação de Ach promovendo um aumento sobre a condutância estomática e um efeito osmoprotetor de GABA sobre as plantas em situação de estresse.

**Palavras-chave:** *Glycine max*, Acetilcolina, GABA, déficit hídrico

## Abstract

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), a major oil crop, is very sensitive to environmental factors, and water deficiency is a particularly limiting factor for its development and production. Some substances can be used to minimize the harmful effects of water stress. Bioregulators, such as  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and Acetylcholine (Ach) act in the defense of plants in response to stress, playing an osmoprotective role and regulating stomatal movement, respectively. The objective of this study was to analyze different modes of exogenous application of these two bioregulators (alone or in combination) and to study their effect on the regulation of soybean response processes to the water deficit. Therefore, it was used in combination of two bioregulator dose of 2.0 mM in soybean plants cv. Intact under different water regimes. The factors studied were: 1) the application of bioregulators (i) in seeds- S (ii) in leaf L ; (iii) in the seed and leaf - SL; (iv) control without application - C; and 2) water regimes: (i) 100% of field capacity (CC) and (ii) suspension of irrigation (SI). Leaf gas exchange and biomass analyzes were performed for the physiological characterization of plants, the activities of the antioxidant enzymes (CAT and APX) and the changes in the transcriptional responses of genes induced by water deficiency, P5CS, LEA and ABA2. For water deficit treatments, a 93% decrease in the photosynthetic capacity (PN) was observed on the sixth day after the suspension of irrigation, as well as a decrease in biomass, in addition to a greater expression of genes induced by water deficiency. The treatment of the combination of the GABA and Ach substances applied to the seed and the leaf under water deficit was highlighted by lower photosynthesis decrease, as well as an increase in stomatal conductance and biomass. For the transcriptional analysis the application of GABA and Ach in seed and leaf showed lower expression of the genes P5CS, LEA and ABA2 and greater activity of the SOD, CAT and APX enzymes, in relation to the control treatment. In our study it was possible to observe that the combined application of the GABA and Ach substances in the seed and leaf at 2.0 mM promoted an improvement of the performance of the plants through the action of Ach promoting an increase on the stomatal conductance and an osmoprotective effect of GABA on plants in a situation of stress.

**Keywords:** Glycine max, Acetylcholine, GABA, water deficit

## LISTA DE SIGLAS

ABRE	- ABA Binding Responsive Element
ABA	- Ácido abiscísico
ABA2	- desidrogenase/redutase de cadeia curta
Ach	- Acetilcolina
AchE	- acetilcolinesterase
AF	- Área foliar total por planta
Al <sup>3+</sup>	- Alumínio
ALT	- Altura das plantas
APX	- Peroxidase
AREB/ABF	- ABA Responsive Element Binding – elemento de ligação de resposta ao ABA
Bzip	- Basic Leucine Zipper – zíper de leucina básico
Ca <sup>2+</sup>	- Cálcio
CAT	- Catalase
CBF	- C-repeat Binding Factor – Fator de ligação à repetições C
cm	- Centímetros
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de carbono
Ci	- concentração intercelular de CO <sub>2</sub>
CPA	- Comprimento da Parte Aérea
Cq-	- Quantification cycle (Ciclo de quantificação)
CR	- Comprimento da Raiz
CT	- Comprimento Total
DAG	- Diacilglicerol
DAG-PP	- Diacilglicerol pirofosfato
DEPC	- Diethyl pyrocarbonate (Dicarbonato de dietila)
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DNAse	- Desoxirribonuclease
DREB	- Dehydration Responsive Element - DRE
E	- Transpiração foliar
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESTs	- Expressed sequence tags (Etiquetas de sequências expressas)
EUA	- Eficiência do uso da água
FFAs	- ácidos graxos livres
g	- gramas
g	- Gravidade
GABA	- Ácido γ-aminobutírico
GAD -	- glutamato descarboxilase
GABA -T	- GABA transaminase
GHB	- g-hidroxitirato
GHBDH	- g-hidroxitirato desidrogenase
Gs	- Condutâncias estomática

h	- horas
H <sub>2</sub> O	- Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de Hidrogênio
ICDH	- isocitrato desidrogenase
IVG	- Índice de velocidade de germinação
IP	- inositol polifosfatos
LEA	- Late Embryogenesis Abundant protein
mAChR	- Receptores muscarínicos de Acetilcolina
M	- Molar
m	- Metros
m <sup>2</sup>	- Metros quadrados
mg	- Miligramas
min	- Minutos
mL	- Mililitros
mM	- Milimolar
mmol	- Milimol
mM	- Milimolar
mL	- Mililitros
MPa	- Mega Pascal
mRNAs	- Ácido ribonucleico mensageiro
MSC	- Massa seca do caule
MS	- Massa de sementes
MSPA	- Massa seca da parte aérea
MSR	- Massa seca da raiz
MST	- Massa seca total
MYB	- Myeloblastosis oncogene
MYC	- Myelocytomatosis oncogene
M100G	- Massa de 100 grãos
NAC	- NAM, ATAF 1,2 e CUC
nAChR	- Receptores nicotínicos de Acetilcolina
NAD(P) <sup>+</sup>	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAD(P)H	- nicotinamida adenine dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NBT	- Azul de nitrotetrazólio cloreto
NCED	- 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase
NPFR	- Número de plantas fracas
NPFT	- Número de plantas fortes
Ns	- Número de sementes
Nv	- Número de vagens
PA	- ácido fosfatídico
PCA	- Análise multivariada por componentes principais
PLC	- Fosfolipase C
PLD	- Fosfolipase D
PN	- índice de assimilação de CO <sub>2</sub> (Pn, μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )

PYR	- <i>Pyrabactin Resistance</i>
PP2Cs	- proteína fosfatase tipo 2Cs
P5CS	- δ-1-pirrolina-5-carboxilato sintetase
P5C	- em 5-carboxilato de pirrolina
P5CR	- δ-1-pirrolina-5-carboxilato redutase
RCAR	- componentes reguladores de receptores ABA
RNase	- Ribonuclease
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
R/PA	- Massa seca da raiz por massa seca da parte aérea
RT-Qpcr	- PCR quantitativo em tempo real
s	- Segundos
SLAC1	- Associação lenta de canais de ânion
SnRK2	- proteína quinase 2 relacionada com SNF1
SSA	- semi-aldeído succínico
SSADH	- desidrogenase do semi-aldeído succínico
SSAR	- redutase de SSA
SOD	- Superóxido dismutase
2- OGDH	- 2-oxoglutarato desidrogenase
TBE	- Tris / Ácido bórico / EDTA
TCA	- Ciclo Tricarboxílico
Tris-HCl	- Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreídrico
Triton	- 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol
U	- Unidade de enzima
ΔE	- Variação de absorção
°C	- grau Celsius
%G	- porcentagem de germinação
$\psi_f$	- Potencial de água foliar
μg	- Microgramas
μL	- Microlitros
μM	- Micromolar
μmol	- Micromol

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Funções dos genes em resposta ao déficit hídrico induzindo tolerância ao estresse.....	24
FIGURA 2- Moléculas de sinalização de lipídeos atuando como mensageiros secundários.....	27
FIGURA 3 – Redes reguladoras de transcrição e transdução de sinal existente em deficiência hídrica: dependentes de ABA e independentes de ABA.....	28
FIGURA 4- A sinalização no núcleo de ABA.....	29
FIGURA 5- Metabolismo de ABA no citoplasma vegetal.....	31
FIGURA 6 – Composição química do ácido-gama-aminobutírico (GABA).....	31
FIGURA 6.1- Metabolismo do glutamato prosseguindo com a via do ácido-gama-aminobutírico (GABA), Ciclo de Krebs ou g-hidroxibutarato (GHB).....	32
FIGURA 7- Composição química de Acetilcolina (Ach).....	35
FIGURA 7.1- Síntese e degradação Acetilcolina.....	35
FIGURA 8- Índice de variação normalizada de diferentes concentrações de GABA sob diferentes condições osmóticas, 0 MPa e -1,0MPa.....	53
FIGURA 9 – Índice de variação normalizada de diferentes concentrações de Ach sob diferentes condições osmóticas, 0 MPa e -1,0MPa.....	55
FIGURA 10 – Índice de variação normalizada das combinações das doses de GABA a 0,5 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob diferentes condições osmóticas, 0 MPa e -1,0MPa.....	57
FIGURA 11 – Índice de variação normalizada das combinações das doses de GABA a 1,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob diferentes condições osmóticas, 0 MPa e -1,0MPa.....	59
FIGURA 12 – Índice de variação normalizada das combinações das doses de GABA a 2,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM), sob diferentes condições osmóticas, 0 MPa e -1,0MPa.....	61
FIGURA 13 – Gráfico de ordenação gerado pela análise de componentes principais da aplicação isolada e combinada de GABA e Ach em sementes de soja sob diferentes condições osmóticas, 0 MPa e -1,0MPa.....	63
FIGURA 14 – Gráfico de ordenação gerado pela análise de componentes principais com diferentes modos de aplicação de GABA e Ach sob irrigação de 100% da capacidade de campo e 30% da capacidade de campo.....	67

FIGURA 15 – Valores médios de índice de assimilação de CO<sub>2</sub> (Pn, μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) em plantas de *Glycine max* (L.) Merrill, no estágio V4 submetidas à diferentes modos de aplicação de GABA e Ach na dose de 2,0mM, nas sementes (AGs), nas sementes e folha (AGsf), e folha (AGf), e controle (C) onde 100 indica potencial hídrico de 0,3MPa (plantas irrigadas) e 0 indica potencial hídrico de -1,0MPa (plantas sob déficit hídrico).....71

FIGURA 16 - Valores médios para do potencial de água foliar (Ψ<sub>f</sub>) das plantas de soja cv. Intacta com aplicação simultânea das substâncias GABA e Acetilcolina (AG) nas doses de 2,0mM com diferentes modos de aplicação, nas sementes (s), nas sementes e folhas (sf), e folhas (f), em função de dois regimes hídricos, Controle e Suspensão.....72

FIGURA 17 - Valores médios de condutância estomática (g<sub>s</sub>, μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), em plantas de *Glycine max* (L.) Merrill, submetidas à diferentes modos de aplicação de GABA e Ach na dose de 2,0mM, nas sementes (AGs), nas sementes e folha (AGsf), e folha (AGf), e controle (C) onde 100 indica potencial hídrico de 0,3MPa (plantas irrigadas) e 0 indica potencial hídrico de -1,0MPa (plantas sob déficit hídrico).....73

FIGURA 18 – Valores médios para concentração intercelular de CO<sub>2</sub>(C<sub>i</sub>, ppm), em plantas de *Glycine max* (L.) Merrill, no estágio V4 submetidas à diferentes modos de aplicação de GABA e Ach na dose de 2,0mM, nas sementes (AGS), nas sementes e folha (AGSF), e folha (AGF), e controle (C) onde 100 indica potencial hídrico de 0,3MPa (plantas irrigadas) e 0 indica potencial hídrico de -1,0MPa (plantas sob déficit hídrico).....75

FIGURA 19 – Valores médios para Transpiração (E, mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), em plantas de *Glycine max* (L.) Merrill, submetidas à diferentes modos de aplicação de GABA e Ach na dose de 2,0mM, nas sementes (AGS), nas sementes e folha (AGSF), e folha (AGF), e controle (C) onde 100 indica potencial hídrico de 0,3MPa (plantas irrigadas) e 0 indica potencial hídrico de -1,0MPa (plantas sob déficit hídrico).....76

FIGURA 20 – Valores médios para Eficiência do Uso da água (EUA, μmol CO<sub>2</sub>μmol<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O), submetidas à diferentes modos de aplicação de GABA e Ach na dose de 2,0mM, nas sementes (AGS), nas sementes e folha (AGSF), e folha (AGF), e controle (C) onde 100 indica potencial hídrico de 0,3MPa

(plantas irrigadas) e 0 indica potencial hídrico de -1,0MPa (plantas sob déficit hídrico).....	77
FIGURA 21 – Valores médios para do potencial de água foliar ( $\Psi_f$ ) das plantas de soja cv. Intacta com aplicação simultânea das substâncias GABA e Acetilcolina (AG) nas doses de 2,0mM com diferentes modos de aplicação, nas sementes (S), nas sementes e folhas (SF), e folhas (F), em função de dois regimes hídricos, Controle e Recuperado.....	78
FIGURA 22 – Heatmap do nível transcricional dos genes <i>GmLEA3</i> , <i>GmABA2</i> e <i>GmP5CS1</i> sob regime hídrico de 100% da capacidade de campo (Irigados) ( <b>A</b> ) 24 h após aplicação foliar dos bioreguladores AG a 2,0 mM em sementes (AGS), sementes e folha (AGSF), e folha (AGF) e controle (C) sem aplicação. ( <b>B</b> ) Sob déficit hídrico, seis dias após a suspensão da irrigação, e ( <b>C</b> ) recuperação dos tratamentos que estavam sob suspensão da irrigação (Recuperado).....	81
FIGURA 23 – Atividade de enzimas antioxidantes SOD (A), CATALASE (B) e APX (C) em folhas de soja cv. Intacta sob regime hídrico de 100% da capacidade de campo 24 h após aplicação foliar dos bioreguladores AG a 2,0mM em sementes (S), sementes e folha (SF) e folha (F), e, controle (C) sem aplicação.....	83
FIGURA 24 – Atividade de enzimas antioxidantes SOD (A), CATALASE (B) e APX (C) sob diferentes regimes de irrigação, 100% da capacidade de campo e sob déficit hídrico, seis dias após a suspensão da irrigação. Com aplicação de bio-reguladores AG a 2,0mM em sementes (S), sementes e folha (SF) e folha (F), e, controle (C) sem aplicação.....	84
FIGURA 25 – Atividade de enzimas antioxidantes SOD (A), CATALASE (B) e APX (C) sob regime hídrico de 100% da capacidade de campo e recuperação dos tratamentos que estavam sob suspensão da irrigação. Com aplicação de bio-reguladores AG a 2,0mM em sementes (S), sementes e folha (SF) e folha (F), e, controle (C) sem aplicação.....	85
FIGURA 26 - Conteúdo de Prolina na folha ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em folhas de soja cv. Intacta sob regime hídrico de 100% da capacidade de campo, 24 h após aplicação dos bioreguladores (a), Déficit hídrico, seis dias após a suspensão da irrigação (b), e Recuperação, re-hidratação dos tratamentos que tiveram a irrigação suspensa (C). Com aplicação de bio-reguladores AG a 2,0mM em sementes	

(S), sementes e folha (SF) e folha (F), e, controle (C) sem aplicação, e controle sem aplicação.....87

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Sequência dos iniciadores dos genes. Sequência dos primers utilizados na RT-qPCR para os genes escolhidos P5CS, LEA, ABA2 e o normalizador Actina.....	50
TABELA 2. Resultados do ensaio 1 do experimento 1: combinações das diferentes concentrações de GABA (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob controle e -1,0 MPa induzidas com manitol.....	126
TABELA 3. Resultados do ensaio 2 do experimento 1: combinações das diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob controle e -1,0 MPa induzidas com manito.....	127
TABELA 4. Combinações das doses de GABA a 0,5 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontecial osmótico de 0MPa, e -1,0MPa induzido por manitol (M1) comparados ao tratamento Controle.....	128
TABELA 5. Combinações das doses de GABA a 0,5 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontecial osmótico de 0MPa, e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Manitol a -1,0MPa.....	129
TABELA 6. Combinações das doses de GABA a 1,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontecial osmótico de 0MPa, e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Controle a 0MPa.....	130
TABELA 7. Combinações das doses de GABA a 1,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontecial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Manitol a -1,0MPa.....	131
TABELA 8. Combinações das doses de GABA a 2,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontecial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Controle a 0MPa.....	132
TABELA 9. Combinações das doses de GABA a 2,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontecial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Manitol a -1,0MPa.....	133

TABELA 10 - Parâmetros morfológicos de raiz. Com as doses de Acetilcolina (A) a 0,5Mm, GABA (G) a 0,5, e a combinação de Acetilcolina e GABA (AG) na dose de 2,0Mm, também, Controle (C) sem aplicação dos bio-reguladores. Sob potencial de água a 0MPa, indicando situação sem estresse – irrigado, e sob - 1,0MPa, estresse osmótico induzido por Manitol. Parâmetros Avaliados: Comprimento radicular (CR), Volume, área e diâmetro radicular.....	65
TABELA 11 - Parâmetros Fisiológicos de Trocas Gasosas em plantas de soja em função de duas lâminas de irrigação, 100% e 30% da capacidade de campo, e tratamentos com substâncias, GABA (G a 0,5mM) e Acetilcolina (A a 0,5mM), e a combinação das duas substâncias (AG a 2,0mM), com diferentes modos de aplicação, nas sementes (S), nas sementes e folhas (SF), e folhas (F).....	69
TABELA 12 – Parâmetros Fisiológicos de trocas gasosas em plantas de soja cv. Intacta com aplicação simultânea das substâncias GABA e Acetilcolina (AG) nas doses de 2,0mM com diferentes modos de aplicação, nas sementes (S), nas sementes e folhas (SF), e folhas (F), em função de dois regimes hídricos, Controle e Déficit Hídrico.....	74
TABELA 13 – Parâmetros Biométricos de crescimento das plantas de soja cv. Intacta com aplicação simultânea das substâncias GABA e Acetilcolina (AG) nas doses de 2,0mM com diferentes modos de aplicação, nas sementes (S), nas sementes e folhas (SF), e folhas (F), em função de dois regimes hídricos, Controle e Suspensão.....	88
TABELA 14 – Parâmetros Biométricos das plantas de soja cv. Intacta com aplicação simultânea das substâncias GABA e Acetilcolina (AG) nas doses de 2,0mM com diferentes modos de aplicação, nas sementes (S), nas sementes e folhas (SF), e folhas (F), em função de dois regimes hídricos, Controle e Suspensão. Parâmetros Avaliados: Número de vagem por planta (Nv), Número de sementes por planta (Ns), Massa de cem grãos (M <sub>100G</sub> ), Massa semente por planta (M <sub>sementes</sub> ).....	89

## 1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é originária da China e pertence à família *Fabaceae* (*Leguminosae*) (SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009). Além de representar uma fonte essencial de proteínas, óleos e micronutrientes na dieta humana e animal, também é uma espécie importante para a produção de biodiesel (PIMENTEL et al., 2004).

A soja é a principal cultura oleaginosa produzida e consumida mundialmente. Por ser uma importante fonte de proteínas na alimentação humana e de grande parte dos animais que produzem carne, leite e ovos, a soja oferece hoje uma variedade de produtos, formando uma cadeia produtiva bastante abrangente (SILVA et al., 2011). Por exemplo, animais criados com rações produzidas a partir do farelo de soja oferecem outros subprodutos que vão afiançar outras áreas da economia, como o setor de couro, o de fertilizantes orgânicos e outros (ROESSING, SANCHES, MICHELLON, 2005). Desta forma, a cultura da soja envolve uma cadeia produtiva, que abrange desde a produção interna voltada para a exportação, até a transformação do produto voltado para a indústria processadora de derivados para a exportação ou para consumo interno (SILVA et al., 2011).

O cultivo da soja, como outras culturas, é afetado por fatores bióticos e abióticos, sendo a seca o principal fator de estresse abiótico, podendo diminuir o rendimento médio em mais de 50% (BRAY, 2002). As freqüentes estiagens que ocorrem no Brasil, sendo a maior incidência no período de verão, causam grandes prejuízos à agricultura, afetando culturas de grande importância econômica (TAVARES et al., 2013).

A deficiência hídrica é induzida quando a taxa transpiratória excede a taxa de absorção de água, gerando um desbalanço hídrico na planta. Os danos causados dependem da intensidade, período de exposição e estágio de desenvolvimento, podendo ser mais ou menos intensos em função da combinação destes fatores (TAVARES et al., 2013). Entre as respostas fisiológicas ao déficit hídrico, a redução da abertura de estômatos, diminuindo as perdas de água por transpiração, é um dos primeiros efeitos mensuráveis. Por outro lado, a redução da abertura estomática também diminui a absorção de CO<sub>2</sub>, reduzindo a taxa fotossintética (SOUZA et al., 2013; TERRA et al., 2013). Assim a manutenção da eficiência no uso de água, i.e. a

relação entre a taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> e perda de água por transpiração foliar, é de grande importância para a sobrevivência em condições de baixa disponibilidade hídrica (FANG et al., 2015). Deste modo, compreender como as plantas respondem ao déficit hídrico e a identificação dos mecanismos de tolerância à seca é fundamental para prever os impactos na produção das culturas (ATKIN; MACHEREL, 2009).

A capacidade da planta para manter suas atividades metabólicas sob déficit hídrico é mediada por respostas celulares que incluem mudanças no seu ciclo, no sistema de endomembranas e vacuolização, bem como alterações na arquitetura da parede celular (MENESES et al., 2006), além de modificações morfofisiológicas, como a habilidade das raízes explorarem camadas mais profundas do solo, e maior relação entre raiz e parte aérea (TERRA et al., 2013). Ainda, as plantas alteram o seu metabolismo de diferentes maneiras para acomodarem-se à deficiência hídrica como, por exemplo, aumentando a produção de fitohormônios, metabólitos e enzimas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo, e de osmólitos compatíveis, promovendo ajustamento osmótico (SOUZA et al., 2013; VIEIRA et al., 2013). Vários metabólitos são acumulados que podem atuar como osmólitos para a manutenção do equilíbrio hídrico celular, entre eles estão açúcares (oligosacarídeos da família da rafinose, sacarose, trehalose e sorbitol), açúcares-álcool (manitol), aminoácidos (prolina), proteínas (chaperonas) e aminas (HASANUZZAMAN et al. 2012<sup>a</sup>; MAHMUD et al., 2017). Além disto, vários compostos que possuem papel de sinalização nas plantas podem desempenhar funções para minimizar os efeitos danosos da seca, tais como o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e a acetilcolina (Ach) (SHELP, 2012).

## **1.1 RESPOSTA DAS PLANTAS À SECA**

Fatores ambientais como a deficiência hídrica afeta severamente tanto o crescimento como a produtividade das plantas. (SHAO et al., 2009). A deficiência hídrica é um fator importante na limitação da produtividade das culturas e na incapacidade de atingir o potencial de produção total, por meio da desidratação celular afetando adversamente muitos processos fisiológicos básicos (BOYER, 1982;

TAIZ; ZEIGER, 2017; SEEVE et al., 2017). Nas plantas o déficit hídrico promove uma complexa via de respostas a partir da percepção do estresse por meio das raízes, desencadeando assim uma cascata de eventos em níveis bioquímico, fisiológico, celular e molecular (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI 2007), sendo os processos fisiológicos e metabólicos reprogramados durante a seca (PARK et al., 2012; GEORGE et al., 2017).

Essas respostas incluem manutenção do teor relativo de água, utilizando menos água disponível por meio do fechamento estomático reduzindo a perda de água por transpiração, embora diminuindo a entrada de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese.

Assim, as plantas evitam a falta de água aumentando o teor relativo de água, utilizando menos água disponível, mantendo uma baixa condutância da epiderme e ainda diminuindo as trocas gasosas (MANAVALAN et al., 2009).

Catuchi et al. (2012) analisaram as respostas de biomassa e área foliar de duas cultivares de soja, BR 48 e EMBRAPA 16, que são consideradas tolerantes e suscetíveis à restrição hídrica, respectivamente, cultivadas sob déficit hídrico. Foram observados uma redução de todos os parâmetros analisados em ambas as cultivares devido ao déficit de água imposto no estágio reprodutivo das cultivares, com exceção da massa seca da raiz para a Embrapa 48, que permaneceu inalterada, mesmo em condições de déficit hídrico. Esse fenômeno ocorre porque a seca pode promover a expansão do sistema radicular para alcançar zonas de umidade mais profundas no perfil do solo, um processo que começa gradualmente após a secagem da superfície do solo (SANTOS & CARLESSO, 1998; SOUZA et al., 2012). No entanto, as reduções dos demais parâmetros da biomassa em condições de déficit hídrico estão relacionadas à diminuição das taxas fotosintéticas, os quais a translocação para os grãos e a acumulação de biomassa são conseqüentemente prejudicados (NEUMAIER et al., 2000).

A resposta ao déficit hídrico também acontece por meio da acumulação de proteínas específicas e do acúmulo de osmólitos compatíveis (SHINOZAKI et al., 2006). Os elementos osmoregulatórios produzidos em resposta à desidratação têm a função de manter a atividade metabólica, melhorando o ajuste osmótico celular (PANG et al., 2011). Por exemplo, o aumento de níveis de açúcares durante a desidratação das folhas parece ser o resultado da regulação coordenada de síntese e translocação de sacarose, contribuindo para o ajuste osmótico e possibilitando

manutenção de turgor em regiões meristemáticas. Essas respostas podem eventualmente levar à restauração da homeostase celular, aumentando assim a sobrevivência das plantas sob o estresse (CHAVES et al., 2009; SOUZA et al., 2012).

Genes envolvidos na tolerância à seca são induzidos ou reprimidos durante o estresse hídrico (SHINOZAKI et al., 2003, YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI 2005, BARTELS e SUNKARS, 2005). Análises transcricionais em plantas sob déficit hídrico têm identificado e classificado genes em dois grupos: 1) proteínas funcionais e 2) proteínas reguladoras (Figura 1.) Os genes funcionais incluem os que codificam para chaperonas, proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant protein), enzimas desintoxicantes, enzimas envolvidas nas biossínteses de osmólitos e osmoprotetores, além de proteases que protegem diretamente a célula contra o estresse (BRAY 2002).



Figura 1. Funções dos genes em resposta ao déficit hídrico induzindo tolerância ao estresse. Os produtos de genes são classificados em dois grupos. O primeiro grupo inclui proteínas que provavelmente funcionam na tolerância ao estresse (proteínas funcionais) e o segundo grupo contém fatores de proteínas regulatórias que estão envolvidos na regulação da transdução de sinais e expressão gênica. (Adaptado de SHINOZAKI et al., 2007).

Genes que codificam as proteínas LEA estão associados à tolerância à desidratação e à resistência da planta à deficiência hídrica, salinidade e estresse por frio (CHO e HONG, 2006). Os genes LEA são induzidos por ABA ou através do estresse ambiental, tais como deficiência hídrica, tensão osmótica e baixa temperatura. Sugeriu-se que tais proteínas atuem na retenção de água no sequestro de íons e têm a capacidade de estabilização de membranas e proteínas (WANG et al., 2003; AMARA et al., 2014). Além disso, estão envolvidas na desintoxicação e alívio do dano celular (UMEZAWA et al., 2006). Nas plantas, a maioria das proteínas LEA e seus mRNAs se acumulam em semente, nos tecidos embrionários durante os últimos estágios de desenvolvimento quando ocorre dessecação e também em tecidos vegetativos (INGRAM et al., 1996; HAND et al., 2011; AMARA et al., 2014). Sairam e Tyagi (2004) relataram o papel protetor da proteína LEA do Grupo 1 durante a desidratação, fornecendo um ambiente aquoso protetor para os componentes celulares. Ensaio fisiológicos em tratamento de deficiência hídrica e salinidade revelaram que proteínas LEA conferem maior tolerância à seca e a salinidade em plantas transgênicas de *Arabidopsis* (LIANG et al., 2013; AMARA et al., 2014).

A deficiência hídrica também induz a regulação de genes envolvidos na formação de osmoprotetores, tais como o amino ácido prolina. A prolina desempenha vários papéis na bioquímica e fisiologia das plantas como um aminoácido livre, osmólito compatível, chaperona molecular e removedor de radicais livres (HANDA et al., 1986; SMIRNOFF e CUMBEs, 1989; NANJO et al., 1999), funções que estão todas associadas aos mecanismos de tolerância a estresses abióticos em plantas (LUTTS et al., 1999; SZABADOS e SAVOURÉ, 2010; OH et al., 2017). A acumulação de prolina é modulada pelo equilíbrio entre síntese e catabolismo. Como a principal enzima limitante, a  $\delta$ -1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) converte espontaneamente glutamato em 5-carboxilato de pirrolina (P5C). Este produto de reação é então reduzido a prolina por meio da enzima P5C redutase (P5CR) (VERBRUGGEN e HERMANS 2008; ÇELIK et al., 2011). A enzima P5CS representa um passo de limitação de taxa nesta via e é controlado por inibição de feedback e regulação transcricional (HONG et al. 2000). Em *Arabidopsis thaliana*, *Opuntia ficus*, *Brassica napus*, a expressão do gene P5CS é relacionado à acumulação de prolina sob estresse osmótico (KUBALA et al.,

2015). Kishor (1995), Zhu (1998), De Ronde (2004) e Vendruscolo et al. (2007) mostraram que a superexpressão de *P5CS*, em plantas transgênicas de tabaco, arroz, soja e trigo resultaram em um aumento da osmoproteção resultando em tolerância a estresse.

No segundo grupo de genes associados às respostas à deficiência, estão os genes reguladores que irão regular a expressão de outros genes em resposta ao estresse. Nesse grupo, estão, por exemplo, fatores de transcrição, e genes que codificam proteínas fosfatases, quinases (como as quinases ativadas por mitogênio - MAPKs) e também proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) (XIONG et al. 2002), e enzimas envolvidas no metabolismo dos fosfolípidos, e outras moléculas de sinalização, tais como a calmodulina (ALI et al., 2017; GEORGE et al., 2017).

Os mecanismos de sinalização subjacentes às mudanças na expressão gênica permitem respostas das plantas ao estresse por deficiência hídrica. As redes de sinalização de estresse para as respostas de deficiência hídrica são compostas por sistemas de sinalização intracelular, complexos regulatórios de transcrição e sistemas de comunicação intercelular. Fatores de sinalização e fatores de transcrição são regulados transcricionalmente e / ou pós-tradução (por exemplo, fosforilação ou proteólise). Até o momento, foram descritas diversas vias de transdução de sinais envolvidas na resposta da planta ao déficit hídrico: vias ABA dependentes e as ABA não dependentes (SEKI et al., 2002; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2005; UMEZAWA et al., 2010).

## **1.2 SINALIZAÇÃO DE FOSFOLÍPIDOS INDEPENDENTES DE ABA**

A sinalização de fosfolípidos é classificada nas bases das fosfolipases que são envolvidos na produção de lipídios e outros mensageiros (TESTERINK e MUNNIK 2011; ALI et al., 2017). Os lipídios modificados produzem diferentes tipos de mensageiros de sinalização tais como diacilglicerol (DAG), DAG-pirofosfato (DAG-PP), lisofosfolípidos, ácidos graxos livres (FFAs), oxilipinas, fosfoinositídeos, inositol polifosfatos (IP), fosfolipase D (PLD) e ácido fosfatídico (PA), (CHO e HONG 2006). PA está envolvido no fechamento de estômatos interagindo na sinalização de ABA (Figura 2) (ZHANG et al., 2003). Estudos recentes indicam que PLD e PA desempenham papéis importantes e complexos em tolerância ao estresse salino e à

deficiência hídrica das plantas (TAIZ, ZEIGER, 2017; HONG et al., 2010; HONG et al., 2016). Desta forma, algumas substâncias podem interferir na rota de sinalização e modificar a via de resposta de sinalização de fosfolipídios. WANG (2003) propôs que a acetilcolina (Ach) pode induzir à regulação a sinalização de lipídios por meio de moléculas de inositol (IP<sub>3</sub>), alterando a resposta fisiológica da planta, promovendo a abertura estomática mediada por Ca<sup>2+</sup>. (MENG et al., 2004)

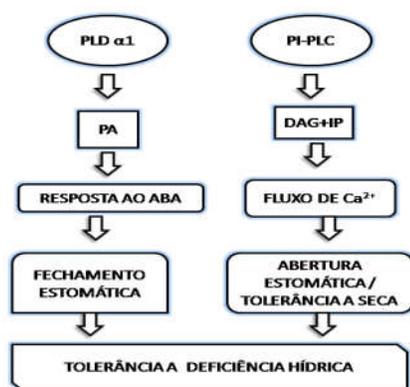


Figura 2. Moléculas de sinalização de lipídeos atuando como mensageiros secundários. A fosforilação de fosfolipídios conduz tolerância à deficiência hídrica. (Adaptado de ALI et al., 2017).

### 1.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO

As redes de sinalização e transdução de sinais para as respostas de deficiência hídrica são compostas por sistemas de sinalização intracelular, complexos regulatórios de transcrição e sistemas de comunicação intercelular. Fatores de sinalização e fatores de transcrição são regulados transcricionalmente e/ou pós-tradução (por exemplo, fosforilação ou proteólise) em resposta ao estresse por deficiência hídrica. Até o momento foram descritas diversas vias de transdução de sinais envolvidas na resposta da planta ao déficit hídrico: vias ABA dependentes e

as ABA não dependentes (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000; SEKI et al., 2007; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005; UMEZAWA et al., 2010).

O ácido abscísico (ABA) é uma fitohormônio chave, e a sinalização de ABA é uma parte importante das redes reguladoras de resposta à deficiência hídrica. A complexidade e a conversação cruzada entre vias ABA-dependentes e independentes de ABA em redes de sinalização de estresse por seca foram amplamente analisadas no nível celular, mas não no nível intercelular (Figura 3) (ROSSDEUTSCH et al., 2016). A expressão de genes que são responsivos a ABA (ABA-dependente) são regulados por fatores de transcrição que reconhecem e se ligam à cis-elementos específicos presentes nas regiões promotoras à montante dos seus genes-alvos (Figura 3). A expressão dos genes mediada por ABA é ainda controlada pelos receptores, mensageiros secundários, cascatas de proteínas quinases, proteínas fosfatases e fatores de remodelação (FUJITA et al., 2011).

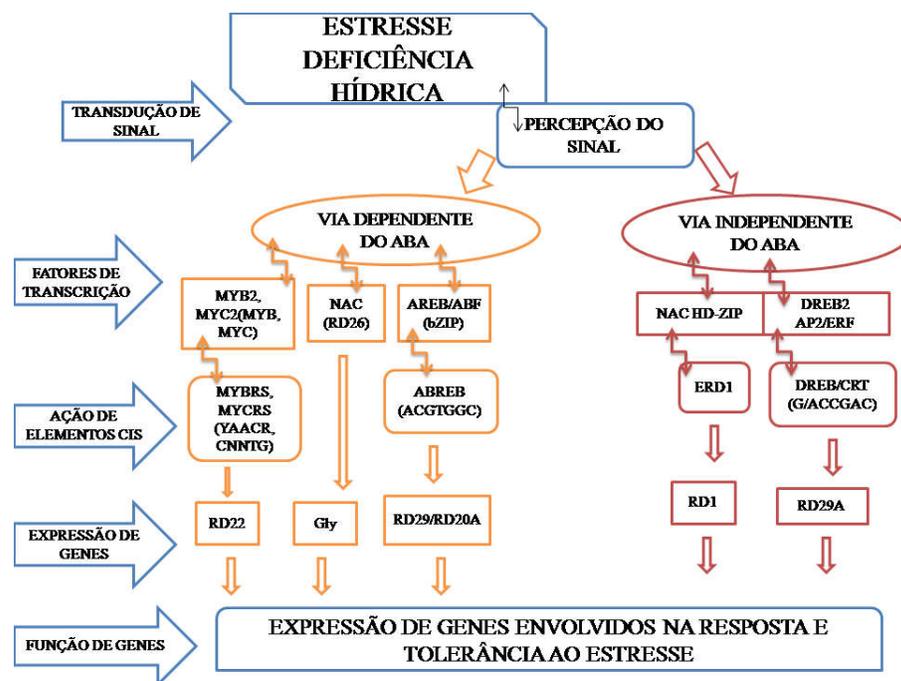


Figura 3. Redes reguladoras de transcrição e transdução de sinal existente em deficiência hídrica: dependentes de ABA e independentes de ABA. Na via dependente da ABA, o ABRE funciona como um importante elemento responsivo ao ABA. AREB / ABFs são fatores de transcrição envolvidos neste processo. Função MYB2 e MYC2 são induzidos por ABA-dependente, expressando o gene RD22. Em uma das vias independentes da ABA, o DREB está envolvido principalmente na

regulação de genes por deficiência hídrica. DREB2s são importantes fatores de transcrição responsivos a desidratação. O NAC e HD-ZIP são fatores de transcrição estão envolvidos na expressão do gene ERD1. (Adaptado de SHINOZAKI 2007).

A sinalização do ABA em células vegetais tem sido dividida em diferentes etapas: metabolismo e transporte de ABA, percepção e transdução de sinais e sinalização de resposta e modulação. Os componentes de sinalização que geram a percepção e transdução de sinais incluem três componentes principais do receptor ABA: receptores PYR (*Pyrabactin Resistance*), componentes reguladores de receptores ABA (RCAR) (MA et al., 2009), uma proteína fosfatase tipo 2Cs (PP2Cs) (SCHWEIGHOFER et al., 2004), além de uma proteína quinase 2 relacionada com SNF1 (SnRK2) (UMEZAWA et al., 2004; 2009). Na presença de ABA, a formação do complexo PYR/RCAR/PP2C sequestra a fosfatase, desligando-a das quinases, permitindo assim a ativação de SnRK2s, que têm como alvo canais iônicos (Associação lenta de canais de ânion- SLAC1), NADPH-oxidases e fatores de transcrição como ABF/AREB (Figura 4) (SATO et al., 2009; SINGH et al., 2017).

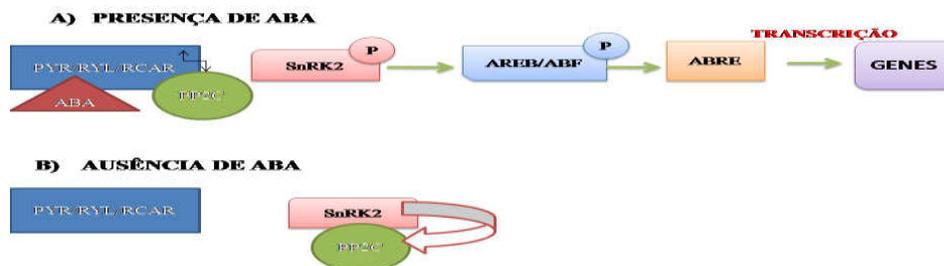


Figura 4. A sinalização no núcleo de ABA compreende dois componentes principais. (A) Na presença de ABA, a família de proteínas PYR / PIL / RCAR dos receptores ABA se ligam a ABA e, por sua vez, inibem a atividade PP2C, permitindo a ativação de SnRK2s através da autofosforilação. A ativação de SnRK2s gera a fosforilação de seus alvos a jusante, como os fatores de transcrição AREB / ABF, que se ligam ao Cis- elemento ABRE e modulam a expressão gênica. (B) Na ausência de ABA, os receptores de ABA são inativados e proteína fosfatase (PP2C) inibem a autofosforilação da família das proteínas Kinases tipo 2, SnRK2. (Adaptado de DE ZELICOURT 2016.)

#### 1.4 BIOSÍNTESE DO ABA

O ABA é sintetizado em brotos, raízes e também em células-guarda (BOURSIAC et al., 2013) e desempenha um papel importante em vários processos fisiológicos, como o desenvolvimento e a regulamentação da função estomática em resposta a estresses abióticos (SINGH et al., 2017).

A biossíntese do ABA pode ocorrer através de duas vias, a via direta e a indireta. Na via direta, o farnesilpirofosfato dá origem ao ABA diretamente e, na via indireta, o ABA é sintetizado a partir do composto intermediário xantoxina, tendo como precursora a zeaxantina (FIGURA 5). A enzima zeaxantina epoxidase (ZEP) cataliza a conversão de zeaxantina em trans-violaxantina, sendo esta enzima a primeira a ser identificada na biossíntese do ABA (MARIN et al., 1996). Trans-violaxantina é então convertida em trans-neoxantina, que por sua vez é convertida em xantoxina por meio da enzima 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED) (Figura 5).

Luchi (2001) demonstrou que a superexpressão do gene que codifica NCED melhorou a tolerância ao estresse por deficiência hídrica em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*. A conversão da xantoxina para ABA é catalizada pela proteína ABA2 da família SDR (desidrogenase/reductase de cadeia curta). Mutantes deficientes em ABA, como *Arabidopsis thaliana* aba1 e *Nicotiana plumbaginifolia* aba2, têm a via da biossíntese de ABA por meio da enzima ZEP prejudicada (MARIN et al., 1996). Estudos utilizando mutantes deficientes ou sensíveis ao ABA indicam que a via indireta é a mais importante nas plantas (SEO;KOSHIBA, 2002).

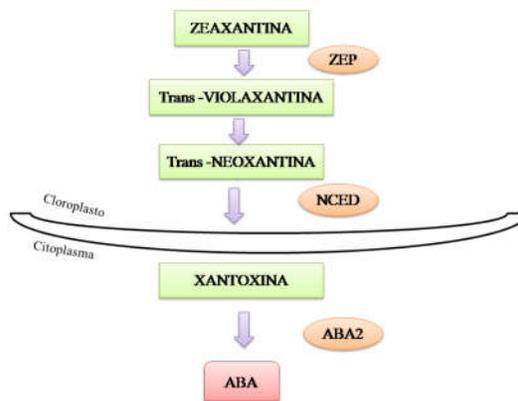
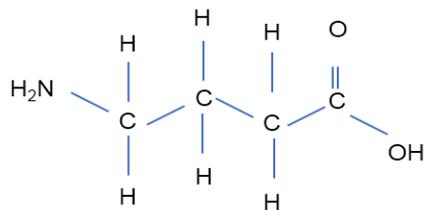


Figura 5. Metabolismo de ABA no citoplasma vegetal. A conversão inicia-se no cloroplasto, onde ocorre a conversão da Zeaxantina em trans- Violaxantina e em trans-Neoxantina. Em seguida, a enzima NCED converte estas moléculas em Xantoxina. No citoplasma, a Xantoxina é convertida em ABA por meio da enzima ABA2. (Adaptado de MIRET et al., 2017).

## 1.5 GABA NO METABOLISMO VEGETAL

O ácido-gama-aminobultírico (GABA) é um aminoácido não-protéico encontrado em procaríotos e eucariotos (Figura 6).



Ácido – gama- aminobultírico (GABA)

Figura 6. Composição química do ácido-gama-aminobultírico (GABA)

É sintetizado a partir da descarboxilação do glutamato por meio da enzima glutamato descarboxilase (GAD) (SHELP, 1999; DELEU, 2013), a qual é ativada pelo

complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (SHELP et al., 1999). Para a sua degradação, o GABA é transaminado na mitocôndria pela GABA transaminase (GABA-T) formando semi-aldeído succínico (SSA), que por sua vez é transformado em ácido succínico pela enzima desidrogenase do semi-aldeído succínico (SSADH) ou, alternativamente, pela redução a g-hidroxiubutirato (GHB) através da enzima redutase de SSA (SSAR) (TAKAHASHI et al., 2013) (Figura 6.1).

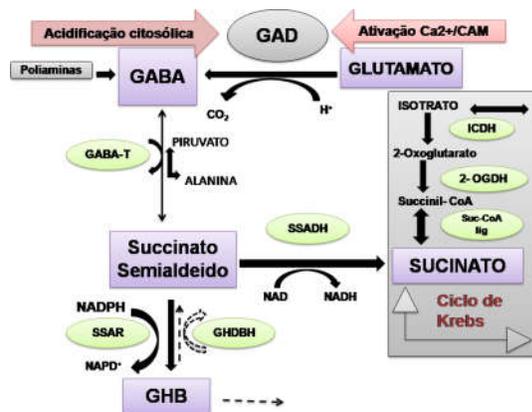


Figura 6.1. Metabolismo do glutamato prosseguindo com a via do ácido-gama-aminobutírico (GABA), Ciclo de Krebs ou g-hidroxiubutarato (GHB). Enzimas são indicadas por balões redondos ou retangulares, e setas tracejadas indicam etapas enzimáticas que ainda não foram demonstradas em plantas. GABA pode derivado do glutamato via a glutamato descarboxilase (GAD), envolvendo a acidificação citosólica e (ou) a ativação mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaM), ou ser derivado de poliaminas. Outras abreviaturas incluem: GABA-T, g-aminobutirato transaminase; GHB, G-hidroxiubutarato; GHBDH, g-hidroxiubutarato desidrogenase; ICDH, isocitrato desidrogenase; 2-OGDH, 2-oxoglutarato desidrogenase; NAD(P)<sup>+</sup>, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NAD(P)H, nicotinamida adenine dinucleotídeo fosfato (forma reduzida); SSA, semi-aldeído succínico; SSADH, desidrogenase do semi-aldeído succínico; SSAR, redutase do semi-aldeído succínico; Suc-CoA lig, succinil-Coenzima A ligase (Adaptado de SHELP et al., 2012).

Tem sido observado que a exposição de plantas a diversas situações de perturbação ambiental gera um aumento na concentração de GABA (UENO et al.,

2011). Sua acumulação nas plantas dá-se em resposta a estresses bióticos, como também abióticos tais como déficit hídrico, deficiência de oxigênio, estimulação mecânica e baixa temperatura. (FAIT et al., 2008; SHI et al., 2010, SONG et al., 2014; LI et al., 2016).

Embora o papel de GABA em mamíferos esteja claramente definido como um neurotransmissor ou neuromodulador no sistema nervoso central (FAIT et al., 2006; SHELP et al., 2009), a sua função em plantas ainda é vaga. Todavia, alguns estudos sobre suas funções e importância no desenvolvimento da planta e na resposta a estresses têm sido realizados, sugerindo o seu envolvimento em diferentes aspectos do metabolismo vegetal. Alguns estudos foram realizados nos últimos anos sobre a possibilidade de GABA estar envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta (ISLAM et al., 2010; SULIEMAN et al., 2011), na reprodução (PALANIVELU et al., 2003), na fertilização (SWANSON et al., 2004), e na regulação da absorção de nitrato pelo aumento da expressão de transportadores de nitrato (SULIEMAN et al., 2011).

Outro papel funcional do GABA que também tem sido sugerido é a relação de seu metabolismo com espécies reativas de oxigênio. Em levedura, observou-se que o GABA promove a proteção contra estresse oxidativo (BOUCHÉ, FROMM, 2004). Estudos com a via metabólica de GABA, com mutantes de SSDH em *A. thaliana*, mostraram um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), sugerindo uma estreita relação entre o metabolismo de GABA e ROS (FAIT et al., 2006, SHI et al., 2010). Liu et al. (2011) estudaram a acumulação de GABA e prolina sob deficiência hídrica em tabaco, e uma possível eliminação de radicais livres. Os autores observaram um maior acúmulo de GABA que demonstrou maior capacidade de eliminação de radicais livres em relação à prolina. Desta forma, o GABA pode atuar como um osmólito compatível eficaz para reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio sob deficiência hídrica. Song et al. (2010) utilizaram a aplicação de GABA exógeno como mecanismo de defesa contra a toxicidade de  $Al^{3+}$  em cevada, demonstrando que o GABA pode diminuir o dano oxidativo causado por  $H^+$  e  $Al^{3+}$  por ativar respostas de defesa antioxidante e redução dos níveis de ROS.

Em soja, Silvente et al. (2012) estudaram duas cultivares, sendo uma tolerante e outra sensível à seca, a fim de elucidar os ajustes de metabólitos em relação às respostas fisiológicas na limitação de água, e observaram que o nível de

GABA diminuiu apenas na cultivar tolerante. Neste mesmo estudo foi observada uma maior quantidade de GABA em nódulos de plantas expostas à hipóxia, mas nenhuma alteração em resposta ao tratamento de PEG. Serraj et al (1998) expôs nódulos de soja à hipóxia e ao déficit hídrico, observando um acúmulo na concentração de GABA. Em relação ao estresse de calor, observou-se um acúmulo de GABA durante a germinação de sementes de soja (XU et al., 2013).

## 1.6 ACETILCOLINA NO METABOLISMO VEGETAL

A Acetilcolina (Ach) é um éster de ácido acético e colina (Figura 7)(KURCHII, 2009), tendo sido isolada pela primeira vez por Ewins (1914) em *Claviceps purpúrea*. A Ach é conhecida como um importante neurotransmissor de animais, porém sua atividade também é encontrada em células não neurais (HORIUCHI et al., 2003). No reino vegetal, esta molécula foi descoberta por Emmelin e Feldber (1947) em tricomas e folhas de *Urtica urens*, sendo posteriormente encontrada em 65 espécies de plantas de 33 famílias diferentes (ROSHCHINA, 2001, HORIUCHI et al., 2003).

Nas plantas, o teor de Ach depende da fase de desenvolvimento e das condições ambientais, sendo que a síntese predominante de Ach é realizada em folhas jovens. No entanto, pode ser encontrada em todos os órgãos vegetais e em qualquer estágio de desenvolvimento (sementes, plântula ou planta madura) (MIURA et al., 1984). Em culturas de importância agrônômica, a detecção de Ach já foi relatada em rabanete e pepino (MOMONOKI; MOMONOKI, 1991), abóbora, feijão, ervilha e girassol (HARTMANN; KILBINGER, 1974); aveia (TRETYN; TRETYN, 1988); trigo (TRETYN;SLESÁK; ANDERSZ, 1985); e milho (ROSHCHINA, 1991), entre outras.

Seu metabolismo inicia-se com a acetil-CoA, que é sintetizada a partir do acetato pela enzima acetil-CoA-sintase, ou do piruvato pelo complexo da piruvato desidrogenase. A colina é formada de duas formas, a partir do aminoácido serina e/ou de fosfatidilcolina de membranas. Por fim, a enzima colina acetiltransferase catalisa a reação de colina com acetil-CoA. A hidrólise da acetilcolina em seus respectivos derivados metabólicos, colina e acetato, é feita pela enzima acetilcolinesterase (AchE) (Figura 7.1) (BLUSZTAJN et al., 1987).



plantas, como em aveia (EVANS, 1972), soja (MUKHERJEE, 1980), bambu (HORIUCHI, 2003) e *Plantago lanceolata* (TRETYN et al., 1988), o que reforça a relação entre Ach e fitohormônios, pois estes últimos são fundamentais naqueles processos fisiológicos.

Adicionalmente, foi sugerido que a Ach pode desempenhar um papel importante na regulação do movimento estomático (LOU, 1998). Madhavan et al. (1995) aplicaram uma concentração exógena de Ach de 1 mM em *V. faba*, resultando em indução de 80% de fechamento estomático na epiderme abaxial. Em oposição, outros estudos observaram que Ach promoveu a abertura estomática (WANG et al., 1999), sendo que tal diferença pode estar relacionada com a concentração de Ach utilizada. Segundo Leng et al. (2000) altas quantidades de Ach podem causar a dessensibilização de seus receptores e induzir o fechamento dos poros estomáticos. Por outro lado, baixas concentrações exógenas de Ach podem estimular a abertura dos estômatos. Foi constatado que o  $Ca^{2+}$  está envolvido com receptores na transdução de sinais nas células estomáticas, e que em interação com a calmodulina tem influência sobre a resposta estomática à Ach (MENG et al., 2004). Wang et al. (2003) observaram um decréscimo do conteúdo de Ach nas extremidades radiculares de *V. faba* sob estresse osmótico, indicando que o conteúdo de Ach nas raízes é capaz de refletir o grau de estresse. Assim, trabalhos são necessários para verificar se a concentração de Ach na raiz é capaz de indicar o potencial de água ao redor das raízes, tendo como consequência o seu envolvimento na sinalização para controle do comportamento estomático.

Yamamoto et al. (2011) observaram que a atividade da AchE na endoderme de plântulas de milho foi aumentada durante estresse térmico. Da mesma forma, a alta expressão do gene AchE de milho em plantas de tabaco transgênicas aumentou a tolerância ao calor em relação às plantas não transgênicas, sugerindo que a AchE age positivamente, em sistemas heterólogos (YAMAMOTO; SAKAMOTO; MOMONOKI, 2011). Da mesma maneira, Yamamoto et al. (2012) observaram que a atividade da AchE em coleóptilo de milho é aumentada em resposta ao estresse térmico através de modificação pós-transducional, sugerindo um papel importante na tolerância ao calor. Como a AchE é encontrada em espaços extracelulares de folhas e caules, propõe-se que esta enzima atue nos espaços extracelulares em vegetais, assim como em animais (ROTUNDO, 2003).

## 1.7 AÇÃO DE GABA E ACETILCOLINA COMO BIOREGULADORES

O uso de bioreguladores é uma abordagem emergente que pode modificar a fisiologia da planta, por meio de alterações a níveis de DNA, RNA, enzimas e, finalmente, seus produtos, como proteínas, carboidratos, lipídios, ocasionando um possível aumento de rendimento em culturas alimentares (KUMAR et al., 2014), podendo desempenhar um papel crucial na regulação do crescimento das plantas (RATNAKUMAR et al., 2016). Por isso, eles, muitas vezes são usados para aumentar tanto o crescimento, como o rendimento das plantas (VLOT et al., 2009; RIVAS-SAN VICENTE et al., 2011), além de poder promover uma possível atenuação a estresse (RATNAKUMAR et al., 2016).

Diversos bioreguladores de plantas têm sido estudados recentemente por conferir tolerância a déficit hídrica em diversas culturas (SRIVASTAVA et al., 2016; WAKCHAURE et al., 2016). Quando as plantas se encontram em estado de estresse, o equilíbrio entre a geração e a utilização de espécies reativas de oxigênio (EROS) é interrompido, levando à toxicidade. O aumento do nível de EROS nas plantas causa danos oxidativos a biomoléculas como lipídios, pm roteínas e ácidos nucléicos, alterando assim a homeostase redox (GILLE et al., 1995; SRIVASTAVA et al., 2016).

Quando aplicado exogenamente em concentrações adequadas, bioreguladores, como o GABA, podem agir na sinalização e aumentar a eficiência do sistema antioxidante, na regulação de osmólitos e expressão de genes responsivos ao estresse em plantas (SRIVASTAVA et al., 2016). A ação do GABA sobre o aumento da eficiência de enzimas antioxidantes foi já foi observado em diversas espécies, como em *Capsicum annuum* L. sob baixa luminosidade (LI et al., 2017), em frutos de pêssigo sob estresse por baixas temperaturas (YANG et al., 2011), mudas de tomate sob estresse por frio (MALEKZADEH et al., 2014). Além de seu acúmulo promover proteção mediante situação de estresse, como observado em arroz sob estresse de hipóxia (DING et al., 2016).

Bioreguladores também podem agir sobre desenvolvimento das plantas, acelerando o crescimento da raiz e da parte aérea, e estabelecendo mais frutos (PASALA et al., 2017). A ação da Ach em promover o crescimento do sistema radicular já foi observado em diversas espécies plantas como em *Raphanus sativis*

(SUGIYAMA et al., 2011), coleótilos de aveia (EVANS et al., 1972), e em tomates foi observado a interação de Ach com auxina sobre o acúmulo do nível de LeEXPA2, transcritos de expansina. Além da sua ação sobre o movimento estomático (WANG et al., 2000).

Plantas de *Solanum lycopersicum* tratadas com metabólitos secundários isolados dos fungos Trichoderma, apresentaram um acúmulo de GABA e Ach, resultando em uma melhora no crescimento e desenvolvimento. Desta forma, Mazzei (2016) observou que, os efeitos benéficos obtidos diretos ou indiretos sobre as plantas são comumente atribuídos ao excesso de GABA e dos metabólitos de Ach nas células das plantas (WOJTASZEK et al., 2001; AKIHIRO et al., 2008)

Devido a atuação de GABA e Ach e seu acúmulo ser considerado benéfico para diversas espécies de plantas, essas substâncias apresentam-se como bioreguladores em potencial.

## **2. OBJETIVOS e HIPÓTESES**

O objetivo geral deste trabalho foi analisar os potenciais efeitos da aplicação exógena de GABA e Ach em diferentes estádios de desenvolvimento de plantas soja sob condições de déficit hídrico.

Além de testar os efeitos isolados de cada substância em diferentes condições de disponibilidade hídrica, este estudo investigará um possível efeito combinado das duas moléculas (sinérgico ou antagônico) na regulação dos processos de resposta de soja ao déficit hídrico.

Em virtude de seus possíveis efeitos isolados (GABA – osmoprotetor e atividade anti-oxidante; e Ach – regulação estomática e crescimento radicular), foi testada a hipótese de que uma dada combinação das duas substâncias pode contribuir para minimizar os efeitos da deficiência hídrica em soja

### **2.1 Objetivos específicos:**

- Verificar efeito da aplicação das substâncias GABA e Ach, na capacidade fotossintética de plantas de soja sob condições normais e de déficit hídrico.

- Examinar o potencial de ajustamento osmótico da planta após a aplicação de GABA e Ach.
- Verificar se a aplicação foliar de Ach proporciona melhoria na condutância estomática, assimilação de CO<sub>2</sub> e transpiração de plantas de soja.
- Verificar as atividades das enzimas anti-oxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e ascorbato peroxidase (APX).
- Verificar se aplicação de GABA e Ach promove a modulação de genes das vias que são ativadas por meio da indução da deficiência hídrica, por exemplo P5CS, LEA e ABA.
- Examinar se aplicação simultânea de GABA e Ach proporciona uma melhor resposta da planta sob condição de déficit hídrico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido nas dependências do Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista (CEVOP), situado na Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), em Presidente Prudente – SP, Brasil. Os experimentos foram realizados com plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cv Intacta. Estão propostos três experimentos voltados aos testes da hipótese levantada no projeto.

#### 3.1 Experimento 1. Aplicação de GABA e Ach na germinação de soja sob estresse osmótico

Para avaliar a aplicação exógena dos bioreguladores, GABA e Ach em sementes de soja sob estresse osmótico, foram realizados ensaios divididos em duas etapas para seleção de doses das substâncias isoladas (Primeira Etapa) e combinadas (Segunda Etapa), observando se haveria um crescimento mais vigoroso

das plântulas durante a germinação. Desta forma foram realizados testes de germinação, avaliação de massa seca, e análise morfológica da raiz. Mediante os resultados obtidos foram selecionadas as melhores doses para a realização dos demais experimentos.

Sementes de soja foram lavadas com água destilada e tratadas com o fungicida sistêmico Vitavax (0,5 mL para 200 g de sementes). Foram utilizadas duzentas sementes por tratamento separadas em quatro repetições, com cinquenta sementes por repetição, dispostas entre três folhas de papel toalha (germitest), envoltas em saco plástico transparente. Posteriormente, as sementes foram submetidas a diferentes tratamentos com soluções contendo GABA e/ou Ach nas seguintes concentrações: 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mM, resultando em 4 doses. Cada dose foi aplicada em sementes submetidas a dois potenciais osmóticos, 0,0 para controle e -1,0 MPa) induzido com solução de manitol a  $74,3 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Desta forma, foram definidos cinco ensaios divididos em duas etapas, primeira etapa dividida em dois ensaios, e, a segunda etapa dividida em 3 ensaios, para a realização do experimento como segue:

Primeira etapa : Aplicação isolada de GABA e Ach em sementes de soja: 1 Ensaio: Aplicação de GABA : Diferentes concentrações de GABA (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0mM) com as diferentes condições osmóticas (0,0 e -1,0 MPa); 2 Ensaio: Aplicação de Ach: Diferentes concentrações de Ach (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0mM) com as diferentes condições osmóticas (0,0 e -1,0 MPa) Para os ensaios da primeira etapa foi utilizado o delineamento inteiramente causalizado no esquema fatorial 4 (doses) x 2 (condições osmóticas).

Segunda etapa: Aplicação combinada de GABA e Ach em sementes de soja: 3 Ensaio: Aplicação de AG0,5: concentração de GABA a 0,5 mM combinado com diferentes concentrações de Ach (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0mM) e condições osmóticas; 4 Ensaio: Aplicação de AG1,0: concentração de GABA a 1,0 mM combinado com diferentes concentrações de Ach (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0mM) e condições osmóticas; e 5 Ensaio: Aplicação de AG2,0: concentração de GABA a 2,0 mM combinado com diferentes concentrações de Ach (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0mM) e condições osmóticas; e controle utilizando água destilada. Para a segunda etapa foi utilizado o delineamento inteiramente causalizado no esquema fatorial 4 (doses) x 2 (condições osmóticas) + 2 (controle).

O experimento foi realizado em germinadora do tipo Mangelsdorf (ELETROLAB, São Paulo, BR) com fotoperíodo de 12 h e regime de temperatura de 28 e 25°C dia/noite.

### ***Parâmetros de avaliação do Experimento 1***

#### ***Teste de Germinação***

O teste de germinação foi realizado segundo as Regras para Análise de Sementes Brasil (2009). Foi realizada a leitura da germinação no quinto e oitavo dia. No quinto dia de embebição das sementes, as mudas foram classificadas em plântulas normais fortes (NPFT, morfologicamente perfeito), normais fracas (NPFR), anormais (PA, com pequenos defeitos) e mortas (BRASIL, 2009). A germinação foi considerada como a soma das porcentagens de plântulas normais fortes e fracas (% G). O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo Maguire (1962). Para classificação de vigor foi considerada apenas a porcentagem de plântulas normais fortes (NAKAGAWA, 1999). Após o 12º dia foram avaliados os comprimentos da raiz (CR), parte aérea (CPA) e total (CT = CR + CPA), e as massas secas da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e massa seca total (MST = MSPA + MSR), calculando-se a relação entre raiz e parte aérea (R/PA). A avaliação de massa seca foi realizada por meio de secagem em estufa sob temperatura de 100°C por 48h (NAKAGAWA, 1999).

#### ***Análise morfológica de raiz***

Para a realização das medidas de área radicular, volume, comprimento total e diâmetro médio de raiz, as raízes foram coradas em azul de metileno (solução 1%) por 15s e em seguida escaneadas. As imagens foram então analisadas pelo software Safira®.

### **3.2 Experimento 2. *Aplicações de GABA e Ach em diferentes estágios de desenvolvimento de soja sob Déficit Hídrico.***

Para avaliar o efeito de GABA e Ach em plantas de soja foram avaliados diferentes formas de aplicação em plantas de soja submetidas a dois regimes hídricos. Foi observado o melhor estágio a ser aplicado GABA e Ach, e se haveria modificação da capacidade fotossintética das plantas sob condições normais e de déficit hídrico. Para este experimento foram realizadas análises diárias de torcas gasosas.

Os regimes hídricos avaliados foram 100% e 30% em relação à capacidade de campo, sendo a reposição diária realizada de acordo com a pesagem diária dos vasos e reposição da água evapotranspirada. Realizada a partir do estágio V4 e três substâncias foram aplicadas, GABA e Ach na dose de 0,5mM e a combinação dos bio reguladores GABA e Ach (AG) na dose de 2,0mM. As doses apresentaram quatro modos de aplicação: (i) Aplicação na semente- S (ii) Aplicação na semente e via foliar - SF; (iii) Aplicação via foliar F; (iv) Controle sem aplicação dos biorreguladores. Para este experimento foram utilizados 6 repetições para cada tratamento. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial triplo 4 x 3 x 2 ( 4 modos de aplicação x 3 substâncias, GABA, Ach e AG, 2 regimer hídricos).

Para o tratamento de sementes, foi utilizado papel germitest contendo uma solução de GABA, e outra solução contendo Ach, para a concentração de 0,5 mM, e uma combinação destas substâncias nas doses de 2,0mM. Essas concentrações foram definidas a partir dos resultados obtidos no experimento 1. de germinação que apresentaram melhores respostas de osmoproteção. Após 24 horas de embebição foi realizado o plantio das sementes em condições de casa de vegetação em vasos contendo 8 kg de uma mistura 1:1 (v / v) de um solo Ultissolo vermelho-amarelo com um substrato orgânico.

As aplicações de GABA e Ach foram realizadas por meio de pulverização foliar de plantas em estágio V4 de desenvolvimento (quarto trifólio expandido), para isso, foi utilizado um pulverizador pressurizado com CO<sub>2</sub>, a fim de promover um melhor recobrimento e distribuição do produto entre as folhas. No dia seguinte, as plantas de soja foram submetidas ao tratamento de deficiência hídrica.

### **3.3 Experimento 3. *Aplicação de GABA e Ach em evento de suspensão e rotomada da irrigação***

Para avaliar a aplicação foliar simultânea de GABA e Ach em plantas de soja sob regime de suspensão da irrigação e retomada da irrigação. Foi observado se haveria uma melhor resposta da planta sob condição de déficit hídrico e se os bioreguladores proporcionariam diferenças para o período de recuperação das plantas. Foram realizadas análises diárias de trocas gasosas, área foliar e análises de biomassa. O material vegetal coletado foi armazenado no ultrafreezer – 80°C para a realização das análises bioquímicas de enzimas anti-oxidantes, teor de prolina na folha, e análises de genes das vias que são ativadas por meio da indução da deficiência hídrica.

Foi realizada a aplicação foliar simultânea de dois bioreguladores, GABA e Ach (AG), na dose de 2,0mM, respectivamente, em diferentes regimes hídricos. Os fatores estudados foram: tratamentos da aplicação das substâncias bioreguladoras: (i) Aplicação na semente- S (ii) Aplicação na semente e via foliar - SF; (iii) Aplicação via foliar F; (iv) Tratamento sem aplicação das substâncias - C; e regimes hídricos: (i) 100% da capacidade de campo, (ii) suspensão da irrigação. Para este experimento, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4x2, (4 modos de aplicação x 2 regimes hídricos) com seis repetições por tratamento.

*Suspensão de Irrigação:* As plantas foram mantidas em capacidade de campo até o estágio V4, nesse estágio, as plantas receberam a aplicação de bioreguladores, seguida da suspensão de irrigação. Após a suspensão da irrigação foi realizado o monitoramento diário das trocas gasosas foliares, as plantas que tiveram sua irrigação suspensa, foram reidratadas quando o potencial de água atingiu -1,0MPa. Foi dada continuidade no monitoramento diário das trocas gasosas foliares até o momento em que as plantas apresentaram potencial hídrico próximo a 0,3MPa, ou seja, valores próximos das plantas a 100% da capacidade de campo, avaliando o grau de recuperação da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (PN), e condutância estomática (Gs), em relação às plantas bem irrigadas.

### 3.3.1 Coleta de Material Vegetal do Experimento 3

No momento em que as plantas atingiram o estágio V4, quarto trifólio totalmente expandido, foi realizada a aplicação foliar dos bioreguladores, vinte e

quatro horas após a aplicação, foi realizada a primeira coleta do material vegetal, quando todas as plantas apresentavam estado hídrico de 100% da capacidade de campo. Ao quinto dia da suspensão a segunda coleta foi realizada, quando o potencial de água da folha do tratamento controle (sem aplicação de bioreguladores), alcançou -1,0MPa. Após a reidratação das plantas, a terceira coleta foi realizada quando o potencial de água da folha dos tratamentos, que haviam sido suspensos, equiparou-se a -0,3MPa, e houve a recuperação da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (PN), e condutância estomática (Gs), em relação às plantas bem irrigadas. Foram utilizadas três repetições por tratamento. Todas as coletas do material vegetal foram realizadas sempre no mesmo horário do dia (13:00 às 15:00 h) e com luminosidade similar. As amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento das análises moleculares e bioquímicas.

### ***3.4 Parâmetros de Avaliação do Experimento***

#### ***Medidas de trocas gasosas instantâneas***

Medidas instantâneas de trocas gasosas, foram obtidas utilizando um analisador de gases por infra-vermelho (Li-6400XTR, LiCor, EUA) com o fluorômetro de luz modulada (LI-6400-40) acoplado à câmara de amostragem do Li-6400XTR.

Todas as medidas foram realizadas em folhas saudáveis e completamente expandidas, sob irradiância saturante de 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com uma concentração de CO<sub>2</sub> na câmara de amostragem de 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  de ar. Nessas condições, foram mensurados os seguintes parâmetros de trocas gasosas: assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (Pn), condutância estomática (gs), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (Ci), e transpiração (E). A partir dessas medidas foram calculadas a eficiência do uso da água (EUA = A/E).

### ***3.5 Parâmetros Biométricos (Experimento 3)***

No final do experimento o rendimento será avaliado considerando:

-Área foliar da planta (AF): analisando com um medidor portátil de área foliar (modelo LI-300A, Li-Cor, USA).

-Avaliação biométrica: após a secagem das plantas em estufa a 65°C até a obtenção do peso constante (g), serão analisados os seguintes parâmetros biométricos: Massa seca das folhas (MSf), Massa seca da raiz (MSR), Massa seca do caule (MSC), massa de sementes (Ms), número de vagens (Nv), Massa seca total por planta (MST), relação entre massa seca da raiz e massa seca da parte aérea (R/PA), área foliar total por planta (AF) e altura das plantas (ALT), massa de 100 grãos ( $M_{100G}$ ), massa de sementes ( $M_{sementes}$ ) (BENINCASA,2003).

### **3.6 Análises bioquímicas (Experimento 3)**

Análises de parâmetros bioquímicos ocorrerão por meio de uma série de enzimas que possuem um mecanismo de inativação de ROS, antioxidante enzimático (SOD, CAT, APX)

Atividade da Superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da Superóxido dismutase (SOD) considera a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT (Azul de nitrotetrazólio cloreto). A atividade será determinada pela adição de 50 µL de extrato bruto a uma solução contendo 13 mM de metionina, 75 µM de NBT, 100 nM de EDTA e 2 µM de riboflavina em 3,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7.8

A reação será iniciada pela iluminação dos tubos, em câmara composta por tubos fluorescentes (15 W), a 25 °C. Após 5 min de incubação, o final da catálise foi determinado pela interrupção da luz (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). O composto azul formado pela fotorredução do NBT, determinado pelo incremento na absorção a 560 nm. Os tubos considerados brancos para a análise receberão os mesmos reagentes, porém serão mantidos cobertos com papel alumínio. Uma unidade de SOD será definida como a quantidade de enzima necessária para a inibição de 50% da fotorredução do NBT. Para o cálculo da atividade específica da

enzima, considera-se a percentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra ( $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ).

#### Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase (CAT) será determinada por medição em aparelho espectrofotômetro a 240 nm pelo monitoramento da variação da absorção do peróxido de hidrogênio, conforme Peixoto et al. (1999). Para o teste, será adicionado 50  $\mu\text{L}$  de extrato bruto a 950  $\mu\text{L}$  de um tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 suplementado com peróxido de hidrogênio a uma concentração final de 12,5 mM. A variação de absorção ( $\Delta E$ ) será calculada em um intervalo de 80 s, sendo a atividade da enzima calculada utilizando-se um coeficiente de extinção molar  $\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A atividade específica ( $\mu\text{Kat } \mu\text{g}^{\text{Prot-1}}$ ) da catalase leva-se em consideração a concentração de proteína solúvel no teste.

#### Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase (APX)

A enzima Ascorbato Peroxidase (APX) será determinada inicialmente preparando-se uma solução de trabalho contendo uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de extrato bruto com 2,9 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0 (volume final de 3,0 mL). A esta solução acrescenta-se ascorbato e peróxido de hidrogênio, em concentração final de 0,8 e 1,0 mM, respectivamente. A determinação da variação da extinção (-) é efetuada a 290 nm, sendo que a atividade específica da enzima ( $\mu\text{Kat } \mu\text{g}^{\text{Prot-1}}$ ) deve ser calculada a partir de um coeficiente de extinção molar de 2,8  $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (KOSHIBA, 1993).

#### *Teor de Prolina nas Folhas*

A quantificação do teor de prolina foi feita baseada em metodologia descrita por Bates (1973), com algumas modificações. Aproximadamente 500mg de tecido foliar congelado foram homogenizados em 10mL de solução de ácido sulfossalicílico (3% em água). Após centrifugação a 4000 x g por 5 min, 2 mL do

sobrenadante foi coletado e adicionado a 2 ml de solução ácida de ninidrina (1,25 g de ninidrina; 30 ml de ácido acético glacial; 20 ml de ácido fosfórico 6M) e 2 ml de ácido acético glacial, em tubos de vidro com tampas rosqueáveis. As amostras foram incubadas em banho-maria a 100 °C por 1 h e em seguida colocadas em banho de gelo para paralisar a reação. Depois foram adicionados 4 ml de tolueno seguido de agitação em vortex por 20 x para a completa extração da prolina. O extrato foi utilizado para a leitura em espectrofotômetro a 520 nm e as absortâncias comparadas à curva-padrão de prolina (0 a 50 µg ml<sup>-1</sup>). As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados obtidos expressos em micrograma de prolina por grama de peso fresco.

### 3.7 Análises Moleculares (Experimento 3)

#### Seleção de genes candidatos envolvidos no déficit hídrico

Os perfis transcricionais dos genes das enzimas ABA2 (SDR, desidrogenase / redutase de cadeia curta – ABA2), P5CS1 (D 1 -pirrolina-5-carboxilato sintase) e LEA3 (late embryogenesis abundant protein) foram avaliados. Estes genes foram escolhidos fundamentalmente por seu papel em vias que são induzidas em condições de deficiência hídrica com base nas informações reportadas por TRIPATHI et al. (2016) e KIDO et al. (2013). As sequências da região codificante de cada gene foram buscadas no banco de dados de ESTs de soja (<http://www.phytozome.org/> e no NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências de cada gene de *Glycine max* (L.) Merrill foram comparadas via ferramenta BLAST, utilizando o banco de dados de seqüenciamento genômico e ESTs de soja (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e também por ([www.soykb.org](http://www.soykb.org)).

#### Desenho dos primers

Para o desenho dos *primers* para cada gene foi utilizado o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (UNTERGASSER et al., 2007). Buscou-se escolher *primers* com comprimento de 20

a 23 pares de bases, conteúdo GC de 40 a 80%, temperatura de anelamento de 57 a 60°C e gerando *amplicons* de 80 a 120 pares de bases. A especificidade dos primers, foi confirmado por meio do programa Primer Blast por BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Também, para evitar a formação de dímeros e de *hairpins*, os *primers* foram avaliados utilizando o programa Multiple Primer Analyzer (ThermoFisher) (<https://www.thermofisher.com/multiple-primer-analyzer.html>).

### *Extração de RNA*

O RNA total foi extraído de 100 mg de tecido foliar macerado com nitrogênio líquido em cadinho com auxílio de pistilo, utilizando o reagente Pure Link Plant RNA Reagent (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. Adicionou-se 0,5 mL do reagente (4°C) em um microtubo com o macerado e a amostra foi agitada incubando-se por 5 min a temperatura ambiente. Centrifugou-se a amostra por 15 min a 12000 g em temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Em seguida, acrescentou-se 0,1 mL de 5 M NaCl e 0,3 mL de clorofórmio ao extrato, misturando por inversão. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 12000 g a 4°C para separar as fases, sendo que a fase superior (aquosa) foi transferida para outro microtubo logo após a centrifugação e adicionou-se igual volume de álcool isopropílico. A mistura foi mantida em repouso por dez min a temperatura ambiente, sendo realizada uma nova centrifugação seguindo as mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 75%. Centrifugou-se a temperatura ambiente por 1 min a 12000 g e retirou-se o líquido com auxílio da micropipeta. Adicionou-se 20 µL de água tratada com DEPC (0,1%) para ressuspender o RNA total extraído.

As amostras foram tratadas com a enzima Turbo DNase (Ambion) para eliminar contaminação com DNA genômico. Para isto, adicionou-se em cada amostra 2 µL do 10X Turbo DNase Buffer e 1 µL da enzima Turbo DNase (2U), incubando a 37°C por 30 min. Para inativação da enzima, acrescentou-se 3 µL de EDTA (15 mM), incubando a 75°C por 10 min. Após a quantificação, foi analisada a qualidade (integridade) do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v).

Para verificar possível contaminação da amostra com DNA, estas foram utilizadas para amplificação por PCR com iniciadores do gene normalizador *Gmβ-Actina* (Tabela 3). Para a reação de PCR seguiu-se o protocolo do Kit PCR SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizando 15 µL do mix (22 U/mL *Taq* DNA Polimerase, 22 mM Tris-HCl (pH 8,4), 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl<sub>2</sub>, 220 µM de cada dNTP e estabilizantes), 0,4 µL do primer senso (5 µM), 0,4 µL do primer antisenso (5 µM), 250 ng de RNA, completando o volume final com água Milli-Q autoclavada para 20 µL. Em seguida, a reação seguiu as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 60°C por 30 s, extensão a 72°C por 30 s e extensão final a 72°C por 2 min. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) contendo tampão TBE 0,5X, 4 µL de brometo de etídio (1 mg/mL) para verificar presença de bandas indicativas de contaminação das amostras por DNA.

#### *Síntese de cDNA*

A síntese de cDNA foi realizada seguindo o protocolo do Kit SuperScript IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction (Invitrogen) com 2 µg de RNA total extraído das folhas, utilizando 1 µL de *primeroligo* d(T) (50 mM), 1 µL de dNTP mix (10 mM), completando o volume final de cada amostra com água DEPC para 10 µL. Os componentes foram misturados brevemente com o auxílio do vortex e incubados a 65°C por 5 min, seguindo de uma incubação em gelo por 1 min. Em seguida, preparou-se a mistura para reação de transcrição 4 µL de 5X SuperScript IV Buffer, 1 µL de DTT (100 mM), 1 µL de RNase OUT, 1 µL de SuperScript IV (200 U/µL) completando o volume final com água DEPC para 10 µL por amostra e centrifugou-se brevemente. A mistura foi adicionada às amostras que continham o RNA, incubando logo após a 55°C por 10 min. Após isto, foi realizada uma nova incubação a 80°C por 10 min para inativação da enzima, sendo então adicionado 1 µL de RNase H por amostra. Em seguida, a amostra foi incubada a 37°C por 20 min para a degradação do RNA presente no final do processo.

#### *PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)*

## Eficiência dos Primers

As reações de RT-qPCR foram realizadas em placas utilizando 5 µL de SYBR Green, 0,4 µL dos primers senso e primers antisenso (5 µM cada) (TABELA 2), 1 µL do *pool* de cDNA, completando o volume final para 10 µL com água Milli-Q autoclavada. O *pool* de cDNA foi feito com seis amostras do tratamento controle. Incluiu-se também uma amostra de controle negativo (sem cDNA). Cada reação foi montada em triplicata. As placas foram centrifugadas brevemente e analisadas no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), seguindo as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 2 min, anelamento a 95°C por 30 s e extensão a 60°C por 30 s, ciclo este repetido 40 vezes. Ao término da reação, a curva de *melting* foi determinada para cada par de iniciadores visando verificar a presença de somente um pico gene-específico (ANEXO B). Os dados foram exportados para o Excel e a eficiência de amplificação individual de cada par de iniciadores (Tabela 3) foi calculada utilizando o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003).

## *Análise da expressão gênica*

Os perfis transcricionais dos genes selecionados foram analisados com o equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando 5 µL de SYBR Green, 0,4 µL dos primers senso e primers antisenso (5 µM cada), 1 µL do cDNA 1:5 (v/v), completando o volume final para 10 µL com água Milli-Q autoclavada. Os iniciadores específicos para cada gene estão representados na Tabela 3. Para cada amostra, as reações foram montadas em triplicata para cada uma das três repetições biológicas. A amplificação foi conduzida seguindo as seguintes condições: 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 2 min, anelamento a 95°C por 30 s e extensão a 60°C por 30 s. A quantificação relativa da expressão de cada gene seguiu o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Em todas as análises, os níveis de transcrição dos genes alvo foram normalizados contra o perfil transcricional do gene *Gmβ-Actina*. De acordo com Stolf-Moreira (2007), *Gmβ-Actina* foi identificado como gene de referência para avaliar a expressão gênica em soja sob déficit hídrico. Para cada tratamento, detectou-se o

valor de Ct para ambos, genes alvos e normalizador (*Gmβ-Actina*). Para normalizar a reação, o valor de Ct do gene alvo foi subtraído do valor de Ct do controle endógeno, obtendo-se o valor de  $\Delta Ct$ . Em seguida, o valor de  $\Delta Ct$  dos tratamentos foi subtraído do valor do  $\Delta Ct$  da amostra calibradora, resultando no valor de  $\Delta\Delta Ct$ , o qual foi utilizado na fórmula,  $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ , (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Neste estudo, foi utilizado como calibrador o tratamento com irrigação a 100% da capacidade de campo para cada modo de aplicação dos bioreguladores

TABELA 1 – Sequência dos iniciadores dos genes. Sequência dos primers utilizados na RT-qPCR para os genes escolhidos P5CS, LEA, ABA2 e o normalizador Actina.

Nome do gene	Descrição	Genes <i>Glycine Max</i> L.	Iniciador senso (5'-3')	Iniciador antisenso (5'-3')	Amplicon (pb)	Eficiência (%)	GenBank
<i>Gmβ actina</i>	Normalizador <sup>1</sup>	Glyma15g0557	GAGCTATGAATTGCCTGATGG	CGTTTCATGAATTCCAGTAGC	85	99,0	GMU60500
<i>P5CS1</i>	D 1 -pirrolina-5- carboxilato sintase <sup>2</sup>	Glyma02g41850	GCGGATCCTTCTCGGACTTT	CGACAGCTAACCTTCCCTCC	97	100	AY492005.1
<i>LEA3</i>	late embryogenesis abundant <sup>3</sup>	Glyma 10g07410	AACAAGGCCGCAGAGGTAAG	CCTGTGCGGTTTTCTGCTTC	103	100	XM003535208.2
<i>ABA2</i>	(ABA deficient2) <sup>3</sup>	Glyma11g18570	TGGCAGGTGATGAGTCAAAG	CAGACTGCCCAAACACAGAA	99	95,0	AY082344.1

(STOLF et al., 2007)<sup>1</sup>; (KIDO et al., 2013)<sup>2</sup>; (TRIPATHI et al., 2016)<sup>3</sup>; Genbank ESTs.

Fonte: Autor

### 3.8 Análise de Dados

Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA). A média dos valores foi comparada pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) com o programa estatístico SISVAR (5.1, Universidade Federal de Lavras). Além disso, para os dados fisiológicos foram realizadas uma análise multivariada por componentes principais (PCA) com o programa estatística PC-Ord.

Adicionalmente, as médias dos valores da aplicação combinada dos bioreguladores (Experimento 1) foram analisadas pelo teste Dunnett ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico SISVAR.

O índice de variação normalizado (NVI) foi calculado a partir da seguinte equação proposta por Tattini et al. (2006):

$$\text{“IVN} = (X_{\text{tratamento}} - X_{\text{Controle}}) / (X_{\text{tratamento}} + X_{\text{Controle}})\text{”},$$

onde os valores de  $X_{\text{tratamento}}$  são as concentrações de Ach e GABA combinadas entre si (0,5, 1,0 e 2,0 mM) e  $X_{\text{controle}}$  é o tratamento sem o fornecimento dos bioreguladores. Estes cálculos foram realizados separadamente considerando 1- tratamentos com diferentes concentrações dos bioreguladores combinadas e com água destilada, e 2- tratamentos abaixo de -1 MPa com diferentes concentrações dos bioreguladores combinados entre si. O IVN é um índice padronizado de plasticidade fenotípica, permitindo visualizar o efeito real do tratamento nos parâmetros analisados, tomando valores positivos ou negativos em relação ao tratamento controle.

## 4. RESULTADOS

### *4.1 Aplicações de GABA e Ach na germinação de soja sob estresse osmótico*

Os resultados a seguir são referentes aos cinco ensaios realizados em duas etapas do experimento 1, com aplicação de GABA e Ach na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de soja sob estresse osmótico.

No ensaio 1 (combinações das diferentes concentrações de GABA com as diferentes condições osmóticas) não foram observados efeitos significativos das aplicações de GABA no desenvolvimento das sementes sem estresse osmótico, exceto por uma redução da relação entre raiz e parte aérea. Para os tratamentos com o potencial de água de -1,0 MPa houve redução significativa em todos os parâmetros analisados (Tabela 2 em anexo).

Nos tratamentos realizados para testar o possível efeito mitigador do GABA sobre os efeitos do estresse osmótico severo (-1,0 MPa) os resultados mostraram que a concentração de 0,5 mM apresentou resultados positivos nos parâmetros IVG, CT e MST, os quais foram significativamente maiores que o tratamento com manitol a -1,0 MPa sem aplicação de GABA. Além disso, pode ser observada uma tendência de aumento na percentagem de germinação e no número de plantas fortes de 34% e 58%, respectivamente, em relação ao tratamento com estresse osmótico. As demais concentrações de GABA não apresentaram resultados que evidenciassem um efeito mitigador do estresse osmótico sobre a germinação e/ou o desenvolvimento das plântulas (Tabela 2 em anexo).

Para as análises de IVN com as diferentes concentrações de GABA sem estresse osmótico foram observados que, para todas as doses, as médias apresentaram-se menores em relação ao controle (sem adição de GABA) para todos os parâmetros avaliados, germinação, crescimento e massa seca, respectivamente (Figura 8A). No entanto, os resultados de IVN para os tratamentos à -1,0 MPa mostraram um aumento positivo em todos os parâmetros analisados de germinação, crescimento e peso seco, para as três concentrações de GABA (0,5; 1,0 e 2,0mM) em relação ao controle a -1,0 MPa. Com destaque para a concentração de 0,5mM de GABA, a qual apresentou valores de IVN mais elevados para os parâmetros de CR, CPA, MSR e MSPA (0,3769; 0,7046; 06000; e 0,4286, respectivamente) (Figura 8B).

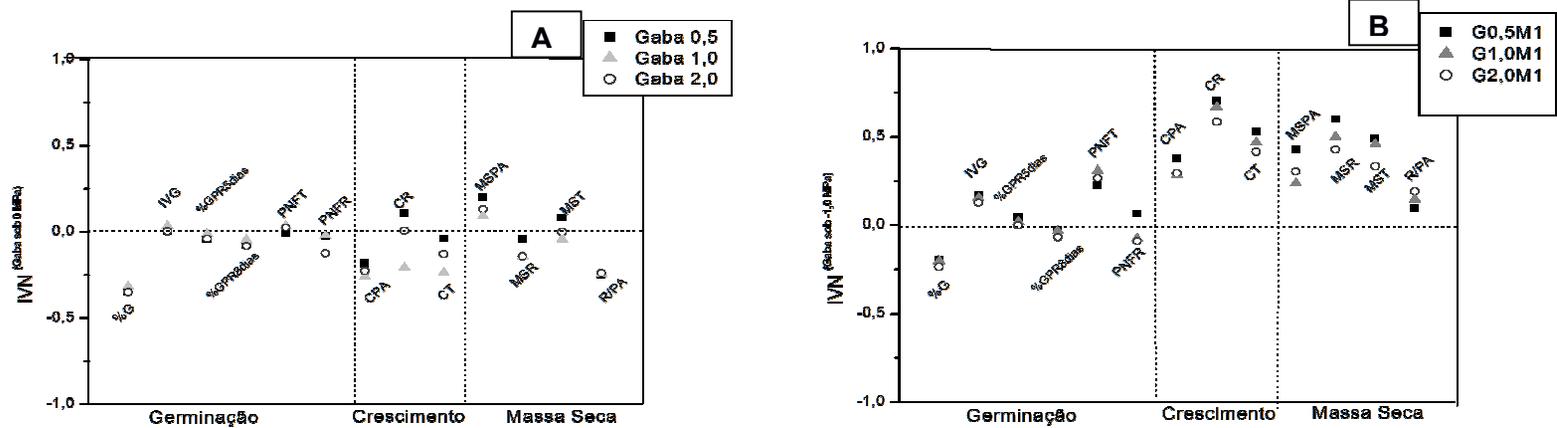


Figura 8. Índice de variação normalizada dos Parâmetros avaliados: porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5dia), porcentagem de germinação de raiz ao 8 dia (%GPR8dia), número de plântulas normais fortes (NPFT), número de plântulas normais fracas (PNFR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT), relação entre raiz e parte aérea (R/PA), analisados durante o processo de germinação *Glycine max* (L.) Merrill sob Ach 0 MPa e condições osmóticas (A), e sob potencial osmótico de -1.0MPa (induzido pelo manitol) (B). A linha horizontal pontilhada mostra os valores normalizados do tratamento sem a aplicação de GABA.

No ensaio 2 (combinações das diferentes concentrações de Ach com as diferentes condições osmóticas) os resultados mostraram que a concentração de 1,0 mM apresentou maior valor para o parâmetro MST comparado ao tratamento controle sem estresse osmótico. Porém ocorreu uma diminuição da relação entre raiz e parte aérea para todas as doses analisadas. Para os demais parâmetros avaliados não houve efeitos significativos. Nos tratamentos com o potencial de água de -1,0 MPa houve redução significativa em todos os parâmetros analisados (Tabela 3 em anexo).

Nos tratamentos realizados para testar a eficácia de Ach sobre a mitigação dos efeitos do estresse osmótico severo (-1,0 MPa) os resultados mostraram que a concentração de 0,5 mM exibiu resultados positivos nos parâmetros NPFT, MSPA, MSR, MST, os quais foram significativamente maiores que o tratamento com -1,0 MPa sem aplicação de Ach. A concentração de 1,0 mM apresentou aumento significativo para o parâmetro R/PA em relação ao tratamento com -1,0 MPa. A dose de 2,0 mM exibiu um aumento na %G comparado ao tratamento com -1,0 MPa (Tabela 3).

As análises de IVN com as diferentes concentrações de Ach sem estresse osmótico não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos em relação aos parâmetros de germinação. Por outro lado, em relação aos parâmetros de crescimento, o tratamento com 2,0 mM de Ach apresentou um aumento de IVN para CR e CT (0.3612 e 0.1464, respectivamente). Nos valores de CPA foram observados uma diminuição sutil de -0.1973 na concentração de 0,5 mM. No entanto, os parâmetros de massa seca, a concentração de 1,0 mM, mostraram um aumento nos valores IVN para MSPA (0,6154), MSR (0,3846) e MST (0,5054). Além disso, observou-se uma diminuição no IVN para a relação R / PA para todas as concentrações Ach analisadas (Figura 9A).

Os resultados do IVN em sementes sob o estresse osmótico a -1,0 MPa mostraram um aumento positivo em todos os parâmetros analisados de germinação, crescimento e massa seca, para as três concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM). A concentração de 0,5 mM apresentou valores de IVN mais elevados nos parâmetros de CR (0,4127), CT (0,5066), MSPA (0,6667), MSR (0,8333) e MST (0,7222). Os maiores valores em IVN foram observados em R / PA (0.6498) para o tratamento com 1,0 mM de Ach (Figura 9B).

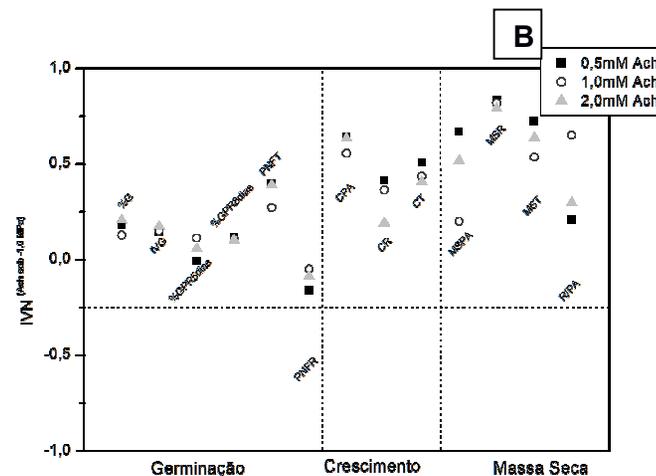
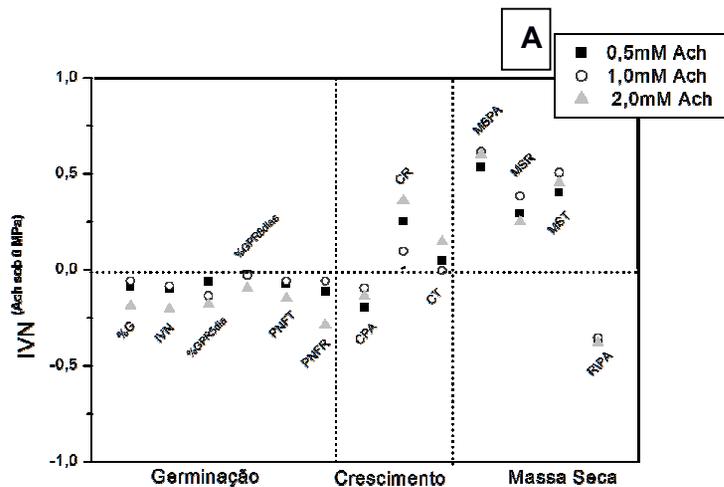


Figura 9. Ensaio 2, experimento 1. Índice de variação normalizada dos *Parâmetros avaliados*: porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5dia), porcentagem de germinação de raiz ao 8 dia (%GPR8dia), número de plântulas normais fortes (NPFT), número de plântulas normais fracas (PNFR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT), relação entre raiz e parte aérea (R/PA), analisados durante o processo de germinação *Glycine max* (L.) Merrill sob Ach 0 MPa e condições osmóticas (A), e sob potencial osmótico de -1.0MPa (induzido pelo manitol) (B). A linha horizontal pontilhada mostra os valores normalizados do tratamento sem a aplicação de Ach.

No ensaio 3 realizado na segunda etapa do experimento 1 (concentração fixa de GABA a 0,5 mM combinado com as diversas concentrações de Ach e com as diferentes condições osmóticas) não foram observados efeitos significativos dos tratamentos com GABA e/ou Ach em relação ao tratamento controle, exceto a combinação de GABA com a concentração de 2,0 mM de Ach que apresentou aumento significativo da MST (MSPA e MSR) em condições não estressantes (Tabela 4 em anexo).

Foi observada uma redução significativa em todos os parâmetros analisados para o tratamento com o potencial osmótico de -1,0 MPa. Nos tratamentos realizados para testar o possível efeito mitigador da combinação de GABA e Ach sobre os efeitos do estresse osmótico severo (-1,0 MPa, M1), os resultados mostraram que a combinação do GABA com 1,0 mM de Ach exibiu resultados favoráveis ( $p < 0,05$ , Dunnett) para os parâmetros % G, IVG e NPFT. A concentração de 2,0 mM de Ach apresentou aumentos significativos para os parâmetros CT, MSPA, MSR, MST em relação ao tratamento controle a -1,0 MPa (Tabela 5 em anexo).

Em relação às análises de IVN, tanto para o controle da condição osmótica, como para -1,0MPa, a concentração de GABA a 0,5 combinado a Ach a 2,0mM (A2G,05) apresentaram um aumento nos valores de IVN para todos os parâmetros de crescimento e massa seca (Figura 10A, 10B).

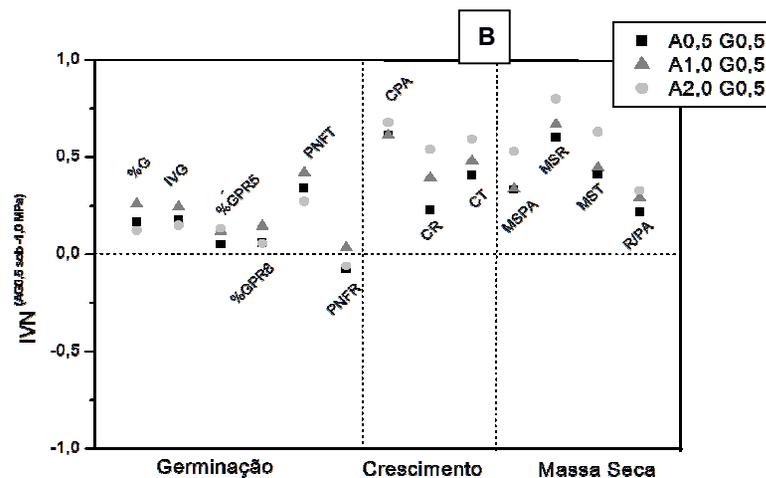
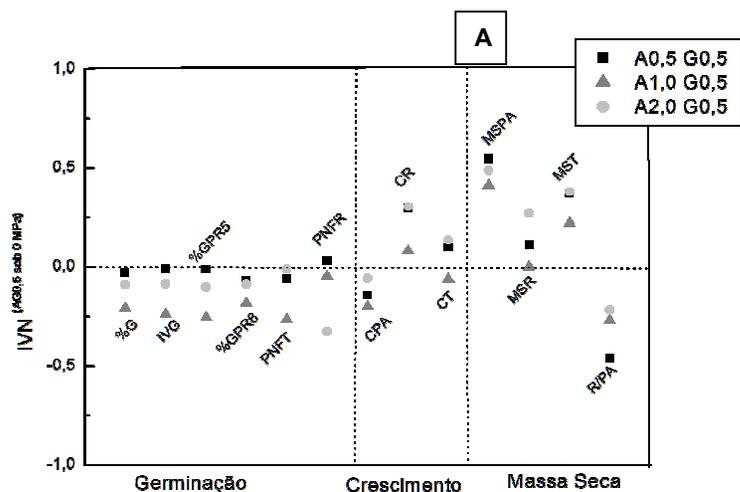


Figura 10. Ensaio 3, experimento 1. Combinações das doses de GABA a 0,5 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob diferentes condições osmóticas, 0 MPa (A) e -1,0MPa (B). Índice de variação normalizada dos *Parâmetros avaliados*: porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5dia), porcentagem de germinação de raiz ao 8 dia (%GPR8dia), número de plântulas normais fortes (NPFT), número de plântulas normais fracas (PNFR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT), relação entre raiz e parte aérea (R/PA), analisados durante o processo de germinação *Glycine max* (L.) Merrill 0 MPa (A), e sob potencial osmótico de -1.0MPa (induzido pelo manitol) (B). A linha horizontal pontilhada mostra os valores normalizados do tratamento sem a aplicação de GABA e Ach.

No ensaio 4 (concentração GABA a 1,0 mM combinado com as diferentes concentrações de Ach e sob as diferentes condições osmóticas) foram observados aumentos significativos com a dose de 2,0 mM de Ach para os parâmetros CPA, MSR e MSPA comparados ao controle osmótico (Tabela 6 em anexo). Com relação aos efeitos do estresse osmótico, apenas o potencial de -1,0 MPa induziu reduções significativas nos parâmetros de germinação e desenvolvimento inicial das plântulas (Tabela 7 em anexo).

Nos tratamentos realizados para testar o possível efeito minizador da combinação das substâncias sobre os efeitos do estresse osmótico a -1,0 MPa os resultados mostraram que o tratamento com a concentração de 2,0 mM de Ach apresentou resultados positivos nos parâmetros % G, IVG, CR e MSR, os quais foram significativamente maiores que o tratamento controle à -1,0 MPa (Tabela 6). Desta forma, a concentração de GABA a 0,5 mM combinada com Ach a 2,0 mM apresentou valores significativos e médias superiores tanto para o controle osmótico como para o potencial de água de -1,0 MPa (Tabela 6 e 7 em anexo).

Para as análises de IVN as concentrações de Ach combinadas ao GABA a 1,0 mM apresentaram valores inferiores para os parâmetros de germinação em relação ao controle osmótico (Figura 11A). No entanto, a concentração de Ach a 2,0 apresentou médias de IVN maiores que o controle para os parâmetros de CPA e MSPA (0,126; 0,354, respectivamente) (Figura 11A).

Para os valores de IVN sob -1,0 MPa a concentração de Ach a 1,0 mM apresentou valores superiores para todos os parâmetros de massa seca em relação ao controle a -1,0 MPa. Com maiores médias de IVN para MSPA e MSR (0,111; 0,818), respectivamente (Figura 11B).

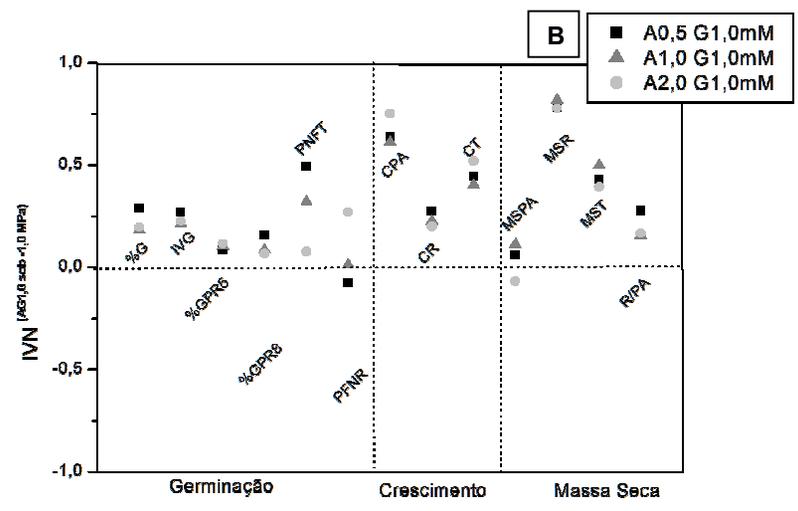
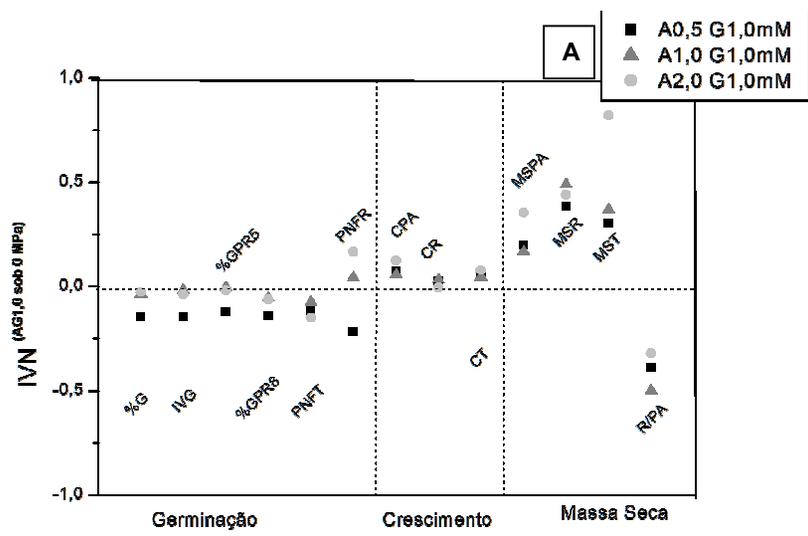


Figura 11. Resultados do ensaio 4 do experimento 1: combinações das doses de GABA a 1,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob diferentes condições osmóticas, 0 MPa (A) e -1,0MPa (B). Índice de variação normalizada dos *Parâmetros avaliados*: *porcentagem de germinação (%G)*, *índice de velocidade de germinação (IVG)*, *porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5dia)*, *porcentagem de germinação de raiz ao 8 dia (%GPR8dia)*, *número de plântulas normais fortes (NPFT)*, *número de plântulas normais fracas (PNFR)*, *comprimento da parte aérea (CPA)*, *comprimento da raiz (CR)*, *comprimento total (CT)*, *massa seca da parte aérea (MSPA)*, *massa seca da raiz (MSR)*, *massa seca total (MT)*, *relação entre raiz e parte aérea (R/PA)*, analisados durante o processo de germinação *Glycine max (L.) Merrill* 0 MPa (A), e sob potencial osmótico de -1.0MPa (induzido pelo manitol) (B). A linha horizontal pontilhada mostra os valores normalizados do tratamento sem a aplicação de GABA e Ach.

No ensaio 5 (concentração de GABA a 2,0 mM combinado com as diferentes concentrações de Ach e com as diferentes condições osmóticas) foi observado uma diferença significativa para CR, CPA e MSPA, para todas as concentrações de Ach sem estresse osmótico em relação às plantas não suplementadas com Ach. Na concentração de 1,0 mM de Ach houve aumento significativo nos valores de MSPA e MST, em comparação ao tratamento controle (sem estresse osmótico) (Tabela 8 em anexo). Apenas o tratamento osmótico com -1,0 MPa promoveu reduções significativas em todos os parâmetros avaliados em comparação com o tratamento sem a suplementação de GABA e Ach (Tabela 9 em anexo).

Os tratamentos realizados para analisar o potencial efeito mitigador da combinação das substâncias no potencial osmótico a -1,0 MPa mostraram que a concentração de 2,0 mM de Ach e GABA, aumentou significativamente os parâmetros % G, IVG, NPFT, MSR e MST em relação ao tratamento sem os bio reguladores. Além disso, pode ser observada um aumento significativo para o CR e CPA de 2,4 e 1,4 vezes, respectivamente, em relação ao tratamento com controle a -1,0 MPa (Tabela 9).

Para as análises de IVN a concentração de 0,5 mM de Ach com 2,0 mM de GABA apresentou maiores médias de IVN para CR e MSR (0,243 e 0,314, respectivamente) em relação ao controle sem estresse osmótico (Figura 12 A).

Para os valores de IVN sob -1,0 MPa a concentração de 2,0 mM de Ach com 2,0 mM de GABA apresentaram, em geral, valores superiores de IVN para todos os parâmetros analisados de germinação, crescimento e massa seca em relação aos demais tratamentos. As maiores médias de IVN foram observadas para os parâmetros de %G, CR, MSR e MSPA (0,310; 0,421; 0,692; 0,377, respectivamente) em relação ao controle a -1,0 MPa (Figura 12 B).

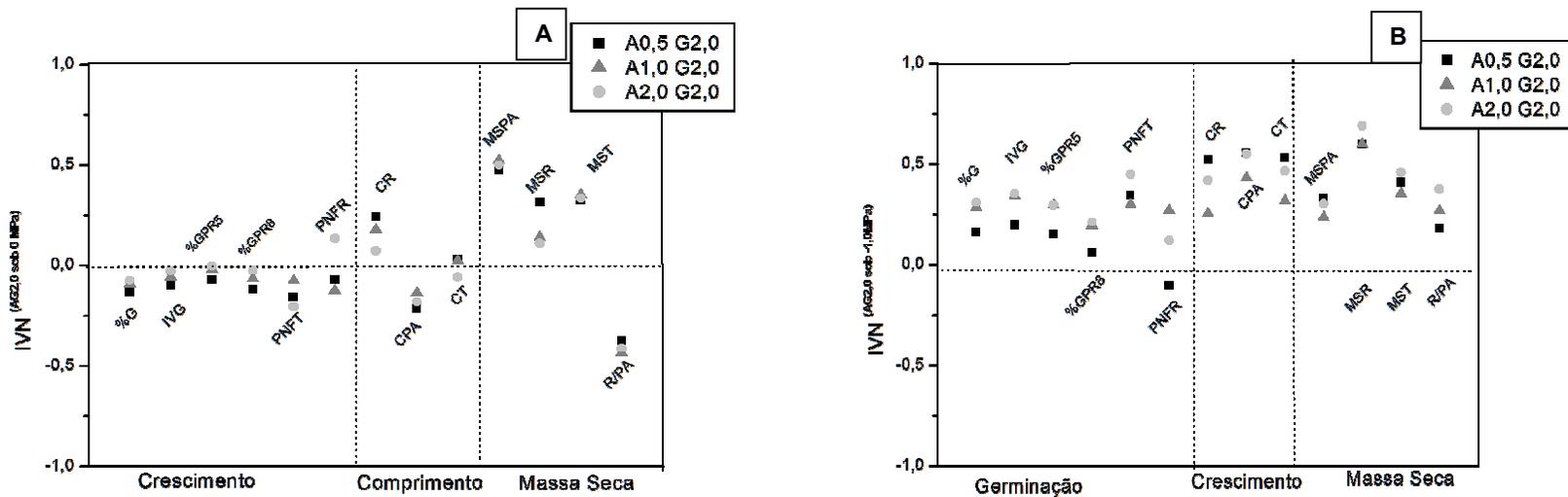


Figura 12 . Ensaio 5 do experimento 1: combinações das doses de GABA a 2,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob diferentes condições osmóticas, 0 MPa (A) e -1,0MPa (B). Índice de variação normalizada dos *Parâmetros avaliados*: porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5dia), porcentagem de germinação de raiz ao 8 dia (%GPR8dia), número de plântulas normais fortes (NPFT), número de plântulas normais fracas (PNFR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT), relação entre raiz e parte aérea (R/PA), analisados durante o processo de germinação *Glycine max* (L.) Merrill 0 MPa (A), e sob potencial osmótico de -1.0MPa (induzido pelo manitol) (B). A linha horizontal pontilhada mostra os valores normalizados do tratamento sem a aplicação de GABA e Ach.

#### *4.2 Análises de componentes principais*

Uma análise multivariada por componentes principais foi realizada com todos os parâmetros analisados no experimento 1 (Figura 13). Considerando dois componentes principais (PC1 e PC2), a PCA explicou 60,2% da variação total dos dados, permitindo a observação de dois grupos, 1- controle (sem estresse) e aplicação das substâncias neurotransmissoras, e 2- tratamentos submetidos ao estresse osmótico e aplicação de neurotransmissores.

O PC1 explicou 34,9% da variação total dos dados originais, de forma que as variáveis que mais contribuíram para a separação dos grupos foram: %G (0,437), IVG (0,239), %PC (0,385). Já o PC2 explicou 25,3% da variação total dos dados, e as variáveis que mais contribuíram para a formação dos grupos foram: CPA (0,200), CR (0,142), CT (0,209), MSPA (0,049), MSR (0,143).

Apesar de ter havido a formação de dois grupos, controle e estresse osmótico, alguns tratamentos com estresse osmótico estavam próximo ao controle como, por exemplo, quatro repetições do tratamento com a concentração de 2,0 mM Ach com 2,0 mM de GABA sob estresse osmótico (Figura 13).

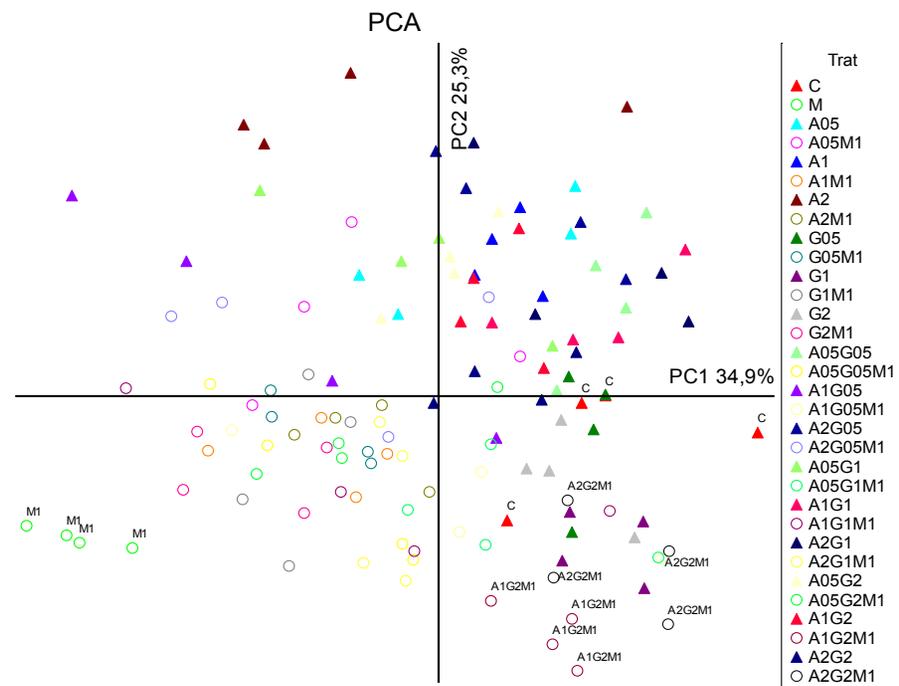


Figura 13. Gráfico de ordenação gerado pela análise de componentes principais usando todos os parâmetros do experimento com *aplicações de GABA e Ach na germinação de soja sob estresse osmótico*. A porcentagem de variação explicada por cada componente (PC1 e PC2) foi mostrada. O primeiro componente principal explicou 34,9% da variância total dos dados, enquanto o segundo componente explicou os 25,3% restantes. ▲ Representam tratamentos sem estresse osmótico 0MPa, ○ representam tratamentos submetidos a estresse osmótico por meio da solução de manitol com -1,0 MPa.

### *4.3 Análise morfológica de Raiz*

A partir dos resultados obtidos por meio da análise multivariada por componentes principais, foram selecionados para análise da morfologia de raiz alguns tratamentos que apresentaram melhores valores nos parâmetros de germinação e crescimento de plântulas, dentre eles: Aplicação de Ach e GABA isolados na dose de 0,5 mM e combinados na dose de 2,0 mM, sob dois potenciais osmóticos, controle e -1,0 MPa.

A aplicação exógena de Ach e GABA nas plântulas de soja demonstraram que nos tratamentos sob potencial osmótico de -1,0 MPa, tanto GABA e Ach isolados na dose de 0,5 mM, quanto GABA e Ach (AG) combinados na dose de 2,0 mM, apresentaram efeitos significativos para os parâmetros morfológicos de raiz quando comparados ao controle sob potencial osmótico a -1,0 MPa, porém, com destaque para o tratamento da combinação das doses AG a 2mM, que aumentou significativamente os parâmetros de comprimento total da raiz (CR), volume, aérea e diâmetro radicular comparados ao controle (sem aplicação de bioreguladores) a -1,0 MPa (Tabela 10). Nos tratamentos sem estresse osmótico não foi observado diferenças significativas para os parâmetros morfológicos de raiz analisados (Tabela 10).

Tabela 10. Parâmetros morfológicos de raiz com as doses de Acetilcolina (A) a 0,5 Mm, GABA (G) a 0,5, e a combinação de Acetilcolina e GABA (AG) na dose de 2,0 mM, e Controle (C) sem aplicação dos bioreguladores, submetidos a estresse osmótico (-1,0 MPa) e sem estresse. Parâmetros avaliados: comprimento radicular (CR), volume, área e diâmetro radicular.

POTENCIAL OSMÓTICO	Controle				- 1,0 MPa Manitol			
TRATAMENTOS	C	A 0,5mM	G 0,5mM	AG 2,0mM	C	A 0,5mM	G 0,5mM	AG 2,0mM
Comprimento Raiz (mm)	521,6 Aa	418,6 Aa	401,2 Aa	658,5 Aa	32,74 Bb	304,4 Aab	210,2 Aab	436,0 Aa
Volume (mm <sup>3</sup> )	842,7 Aa	592,9 Aa	665,8 Aa	773,6 Aa	117,3 Bb	380,2 Aab	340,6 Aab	587,7 Aa
Área (mm <sup>2</sup> )	1947 Aa	1508 Aa	1521 Aa	2111 Aa	194 Bb	1022 Aab	793 Aab	1518 Aa
Diâmetro (mm)	0,84 Aa	0,78 Aa	0,89 Aa	0,78 Aa	1,95 Ba	1,09 Ab	1,32 Ab	0,88 Ab

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre as condições osmóticas (Controle e Manitol), letras minúsculas indicam diferença entre as doses (C, A, G, AG.)

#### **4.4 Análises de Trocas Gasosas de soja com aplicação de GABA e Ach sob déficit hídrico**

Os resultados a seguir são referentes ao experimento 2, com aplicação foliar de GABA e Ach nas plantas de soja no estágio V4, sob déficit hídrico, no qual, foram utilizadas as melhores doses obtidas experimento 1.

Uma análise multivariada por componentes principais foi realizada com todos os parâmetros de trocas gasosas analisados no experimento 2 (Figura 9). Nesta análise, obtiveram-se dois padrões de resposta ocorrendo a formação de dois grupos, 1- controle (Irrigação de 100% da capacidade de vaso) e aplicação das substâncias GABA (G) e Ach (A), e 2- tratamentos de déficit hídrico (30% da capacidade de vaso) e aplicação de GABA e Ach. Considerando dois componentes principais (PC1 e PC2), a PCA explicou 80% da variação total dos dados (Figura 14).

Apesar de ter havido a formação de dois grupos, controle (Irrigação de 100% da capacidade de vaso) e déficit hídrico (30% da capacidade de vaso), alguns tratamentos do déficit hídrico a 30% com aplicação da substância GABA e Ach, agruparam-se ao grupo do controle a 100%, por exemplo: GABA aplicado na semente (GS), Ach aplicado na semente e na folha (ASF), GABA e Ach aplicados na semente e na folha (AGSF), e GABA e Ach aplicados na folha (AGF) (Figura 14).

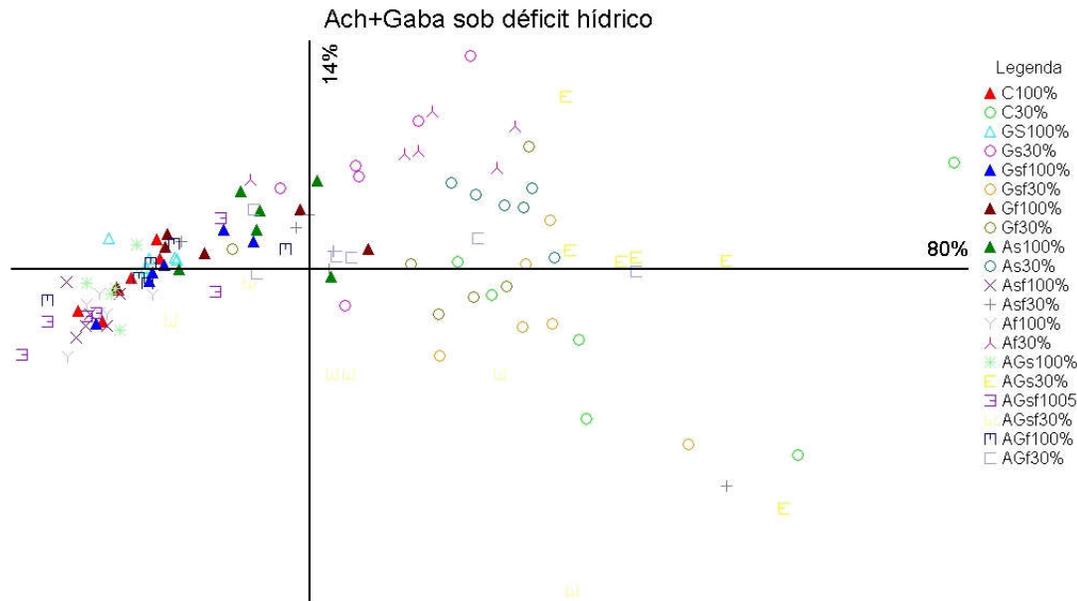


Figura 14. Gráfico de ordenação gerado pela análise de componentes principais usando todos os parâmetros do experimento, com aplicação de GABA e Ach em plantas de soja sob déficit hídrico. A porcentagem de variação explicada por cada componente (PC1 e PC2) foi mostrada. O primeiro componente principal explicou 80% da variância total dos dados, enquanto o segundo componente explicou os 14% restantes. Tratamentos com aplicação de GABA a 0,5mM (G), Acetilcolina a 0,5mM (A), e a combinação das duas substâncias a 2,0Mm (AG), com diferentes modos de aplicação, nas sementes (S), nas sementes e folhas (SF), e folhas (F). ▲ Representam tratamentos controle, sem aplicação das substâncias, (C) com 100% da capacidade de vaso, ○ representam tratamentos controle, sem aplicação das substâncias, (C) com 30% da capacidade de campo.

Uma pré-seleção dos tratamentos foi realizada por meio da análise multivariada por componentes principais, a partir do padrão de resposta obtido por meio da figura 10, alguns tratamentos foram selecionados, e efetuou-se uma segunda análise dos dados por meio da análise de variância (ANOVA). A média dos valores foi comparada pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados mostram que a aplicação exógena das substâncias GABA e Ach (Tabela 11), apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Para plantas que estavam em condições de irrigação a 100% da capacidade de vaso, o tratamento de GABA e Ach (AG) aplicados na semente e na folha (*sf*), apresentou um aumento de 1,1 vezes da condutância estomática (*Gs*) em comparação ao controle irrigado (sem aplicação das substâncias).

Para as plantas de soja que estavam sob déficit hídrico, à aplicação exógena das substâncias GABA e Ach promoveu um aumento tanto da capacidade fotossintética (*Pn*), como também da condutância estomática (*Gs*), principalmente para o tratamento da aplicação simultânea de GABA e Ach (AG) a 2,0 mM aplicados nas sementes e posteriormente nas folhas no estágio V4 (AGSF) (Tabela 11), que apresentou um aumento de 1,2 vezes para *Pn* e 1,08 vezes para *Gs* em relação ao controle, respectivamente.

A transpiração (*E*) apresentou uma tendência de aumento para todos os tratamentos com a utilização das substâncias neurotransmissoras em plantas sob déficit hídrico, independente do modo de aplicação.

Foram escolhidas as variáveis fotossíntese (*Pn*) e condutância estomática (*Gs*) para selecionar um tratamento e método de aplicação, para a realização de um experimento com ciclos de suspensão de irrigação. Considerando os resultados preliminares, o tratamento com a concentração de 2,0 mM Ach com 2,0 mM de GABA aplicados na semente e também na folha (AGSF) mostrou-se mais promissor (Tabela 11).

Tabela 11. Parâmetros Fisiológicos de Trocas Gasosas em plantas de soja (estádio V4) em função de duas lâminas de irrigação e tratamentos com substâncias, GABA (G a 0,5mM) e Acetilcolina (A a 0,5 mM), e a combinação das duas substâncias (AG a 2,0 mM), com diferentes modos de aplicação, nas sementes (S), nas sementes e folhas (SF), e folhas (F).

TRATAMENTOS DOSES	100%					30%				
	<b>C</b>	<b>G S</b>	<b>A SF</b>	<b>AG SF</b>	<b>AG F</b>	<b>C</b>	<b>G S</b>	<b>A SF</b>	<b>AG SF</b>	<b>AG F</b>
Pn	20,2Aa	17,6Aab	21,12Aa	20,8Aa	18,1Aa	7,1Bb	9,4Bb	11,9Bab	16Ba	11,7Bab
Gs	1,72Aab	1,31Ab	3,19Aa	3,47Aa	2Aab	0,25Ba	0,24Ba	0,41Ba	0,52Ba	0,40Ba
Ci	331Aa	336Aa	320Aa	322Aa	320Aa	172Bc	309Ba	262Bab	215Bbc	272Bab
E	7,1Aa	6,8Aa	7,6Aa	6,9Aa	6,6Aa	1,71Bb	4,03Ba	4,43Ba	3,9Ba	3,4Bab

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100% e 30%), letras minúsculas indicam diferença entre as doses (C, G, A, AG).

#### **4.5 Análises de Trocas Gasosas de soja com aplicação de GABA e Ach sob ciclo de suspensão**

Nessa sessão são apresentados os resultados referentes ao experimento 3, com aplicação exógena de GABA e Ach, os quais foram testados os modos de aplicação em plantas de soja no estágio V4, sob ciclo de suspensão, a partir dos resultados obtidos no experimento 2.

A partir da análise de dados obtidos das trocas gasosas 24 horas após a aplicação das substâncias GABA e Ach, foi possível observar um aumento dos valores fotossintéticos ( $P_n$ ) em comparação ao controle (sem aplicação das substâncias), dentro dos dois regimes hídricos, 100% da capacidade de vaso e déficit hídrico, respectivamente (Figura 15).

Para os tratamentos de déficit hídrico, foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos. Em relação à  $P_n$ , para o tratamento controle, foi observada uma diminuição contínua desde o início da imposição do déficit hídrico, apresentando valores menores em relação aos tratamentos com aplicação de GABA e Ach (Figura 15).

Para os tratamentos de déficit hídrico, ao sexto dia de suspensão da irrigação o controle (sem os bioreguladores) atingiu  $-1,0$  MPa (Figura 16), observando-se uma queda de 93% da capacidade fotossintética ( $P_n$ ) em relação ao controle com 100% da capacidade de vaso. O tratamento AGSF sob déficit hídrico atingiu um potencial de água foliar de  $-0,8$  MPa, apresentando uma queda de 48% da  $P_n$  em relação ao tratamento AGSF com 100% da capacidade de vaso (Figura 16).

Desta forma, para os tratamentos com déficit hídrico, o tempo da queda dos valores fotossintéticos e do potencial hídrico do controle foi mais rápido em relação ao tratamento AGSF (Figura 15).

Ao sétimo dia de déficit hídrico, o tratamento AGSF exibiu potencial da água de  $-1,0$  MPa, e uma queda de 70% da capacidade fotossintética ( $P_n$ ) em relação ao dia anterior (Figura 15).

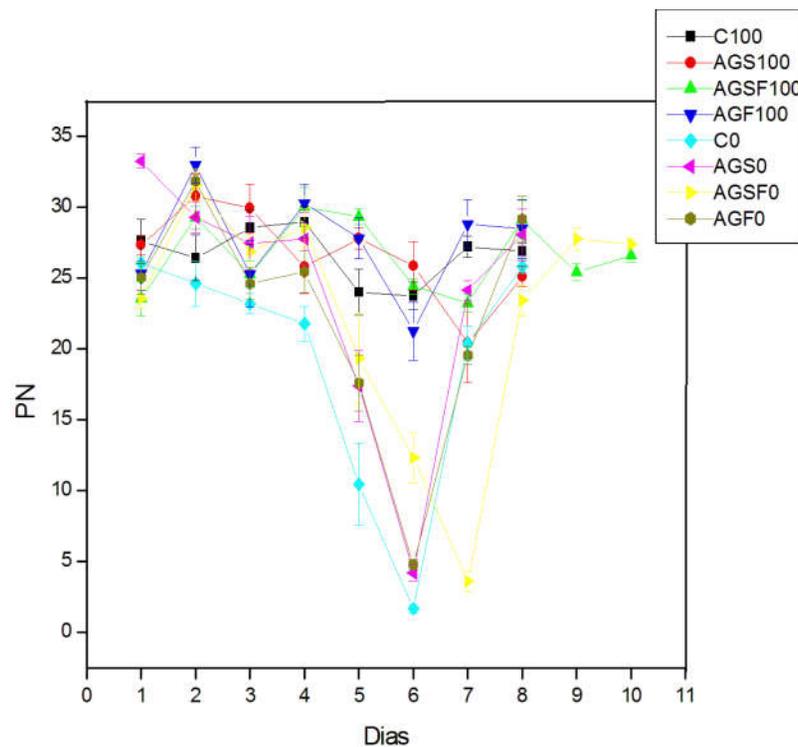


Figura 15. Valores médios de índice de assimilação de CO<sub>2</sub> (Pn, µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) em plantas de *Glycine max* (L.) Merrill, no estágio V4 (quarto trifólio totalmente expandido), submetidas a aplicação foliar de água para controle (C), a aplicação foliar de GABA e Ach a dose de 2,0 mM, nas sementes (AGS), nas sementes e folha (AGSF), e folha (AGF), onde 100 indica potencial da água de -0,3 MPa (plantas irrigadas) e 0 indica potencial da água de -1,0 MPa (plantas sob déficit hídrico).

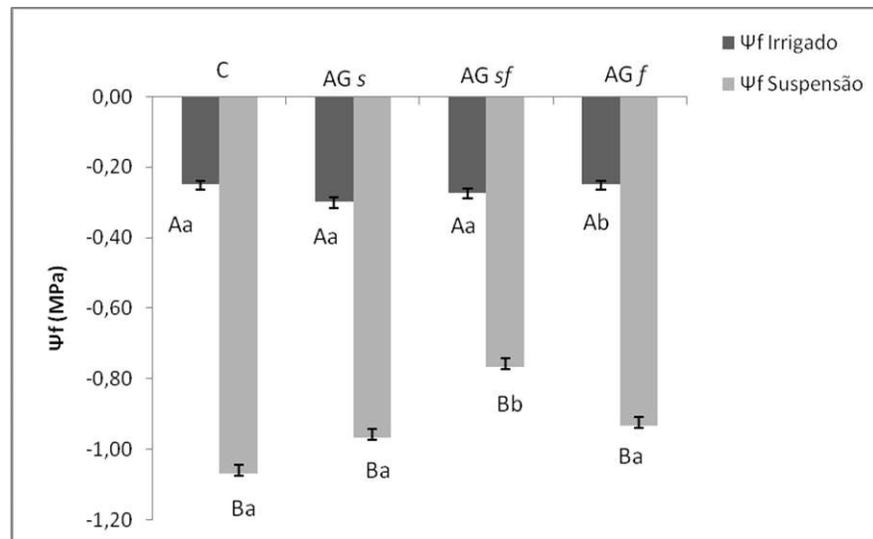


Figura 16. Valores médios para do potencial da água foliar ( $\Psi_f$ ) das plantas de soja cv. Intacta com aplicação simultânea das substâncias GABA e Acetilcolina (AG) nas doses de 2,0 mM com diferentes modos de aplicação, nas sementes (S), nas sementes e folhas (SF), e folhas (F), em função de dois regimes hídricos, Controle e Suspensão. Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (Controle e Suspensão). Letras minúsculas indicam diferença estatística entre as aplicações (S, SF, F). Teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para a condutância estomática ( $G_s$ ), os tratamentos com a aplicação de GABA e Ach (AGS, AGSF, AGF) apresentaram valores maiores em relação ao controle para os dois regimes hídricos (100% da capacidade de vaso e déficit hídrico) (Figura 17). Ao sexto dia de déficit hídrico, os tratamentos AGS e AGSF exibiram valores de  $G_s$  de 1,0 vezes e 5 vezes maiores que em relação ao controle sob déficit hídrico, respectivamente. (Tabela 12).

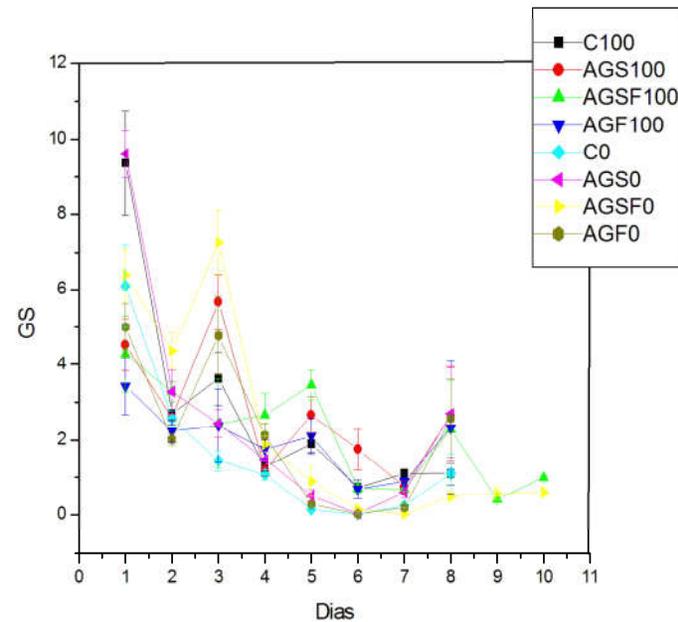


Figura 17. Valores médios de condutância estomática ( $g_s$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), em plantas de *Glycine max* (L.) Merrill, no estágio V4 (quarto trifólio totalmente expandido), submetidas a aplicação foliar de água para controle (C), a aplicação foliar de GABA e Ach a dose de 2,0 mM, nas sementes (AGS), nas sementes e folha (AGSF), e folha (AGF), onde 100 indica potencial da água de -0,3 MPa (plantas irrigadas) e 0 indica potencial da água de -1,0 MPa (plantas sob déficit hídrico).

Tabela 12. Parâmetros fisiológicos de trocas gasosas em plantas de soja cv. Intacta com aplicação simultânea das substâncias GABA e Acetilcolina (AG) nas doses de 2,0 mM com diferentes modos de aplicação, nas sementes (S), nas sementes e folhas (SF), e folhas (F), em função de dois regimes hídricos, Controle e Suspensão.

Tratamento	Controle				Suspensão			
	C	AG S	AG SF	AG F	C	AG S	AG SF	AG F
PN	23,7 Aa	24,8 Aa	23,6 Aa	21,2 Aa	1,6 Bb	4,1 Bb	12,3 Ba	4,7 Bb
GS	0,6 Aa	0,7 Aa	0,6 Aa	0,5 Aa	0,02 Ba	0,04 Ba	0,13 Ba	0,03Ba
Ci	304 Aa	298 Aa	280 Aa	259 Aa	120 Bb	257 Ba	270 Ba	201 Ba
E	6,1 Aa	6,2 Aa	5,2 Aa	5,3 Aa	1,4 Ba	1,1 Ba	2,1 Ba	1,1 Ba
EUA	3,8 Aab	4,0 Aa	4,5 Aa	4,03 Aa	1 Ab	3,7Aa	6,16 Aa	5,2 Aa

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (Controle e Suspensão). Letras minúsculas indicam diferença estatística entre as aplicações (S, SF, F). Teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

A concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (Ci) foi maior para todos os tratamentos com GABA e Ach ao primeiro dia em relação ao controle, para os dois regimes hídricos (Figura 18).

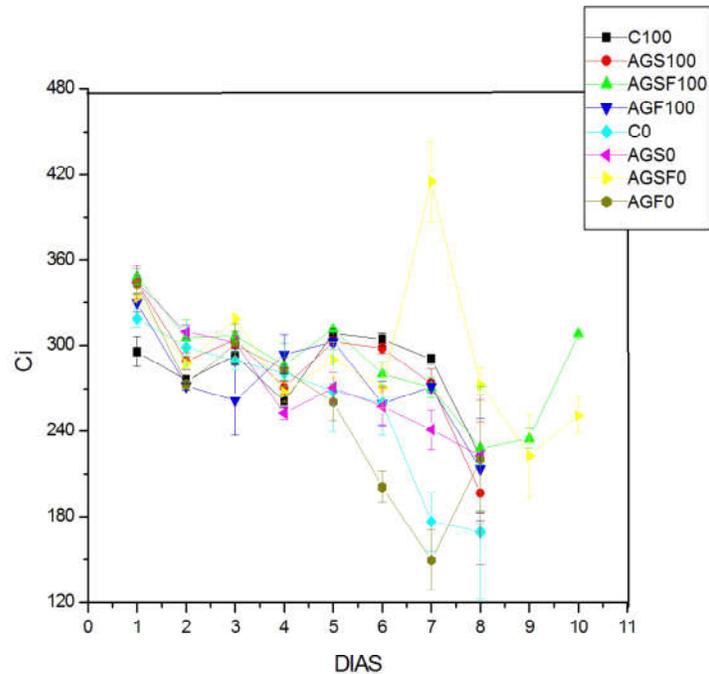


Figura 18. Valores médios para concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (Ci, ppm), em plantas de *Glycine max* (L.) Merrill, no estádio V4 (quarto trifólio totalmente expandido), submetidas a aplicação foliar de água para controle (C), a aplicação foliar de GABA e Ach a dose de 2,0 mM, nas sementes (AGS), nas sementes e folha (AGSF), e folha (AGF), onde 100 indica potencial da água de -0,3 MPa (plantas irrigadas) e 0 indica potencial da água de -1,0 MPa (plantas sob déficit hídrico).

A transpiração (E) demonstrou uma diminuição para o tratamento controle desde o início da suspensão da irrigação (Figura 19). Ao sexto dia de déficit hídrico, o tratamento AGSF exibiu um valor de 50% maior em relação ao controle (sem aplicação dos bio reguladores) sob déficit hídrico (Tabela 12).

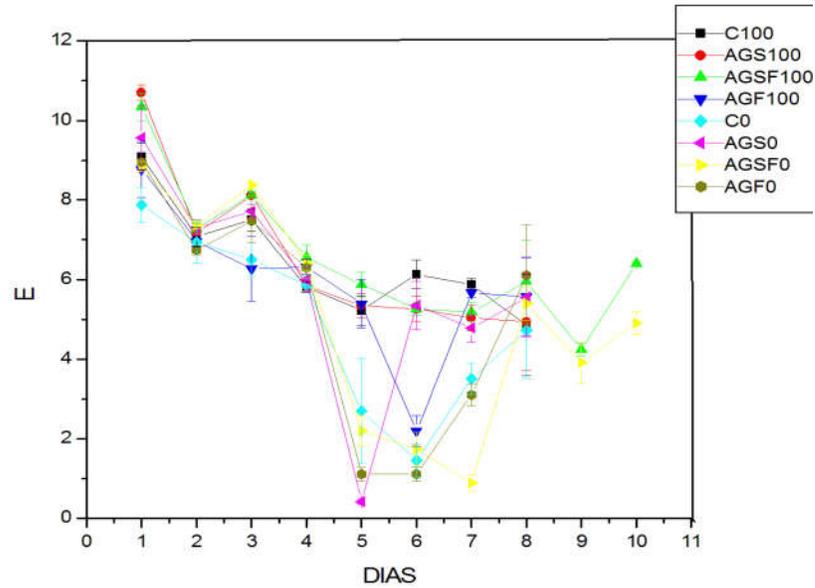


Figura 19. Valores médios para Transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), em plantas de *Glycine max* (L.) Merrill, no estágio V4 (quarto trifólio totalmente expandido), submetidas a aplicação foliar de água para controle (C), a aplicação foliar de GABA e Ach a dose de 2,0 mM, nas sementes (AGS), nas sementes e folha (AGSF), e folha (AGF), onde 100 indica potencial da água de -0,3 MPa (plantas irrigadas) e 0 indica potencial da água de -1,0 MPa (plantas sob déficit hídrico).

Para a eficiência do uso da água (EUA), ao sexto dia de análises de trocas gasosas, os tratamentos AGS, AGSF, AGF, com irrigação a 100% da capacidade de vaso, apresentaram uma tendência de aumento da EUA em relação ao controle (sem aplicação de bioreguladores) irrigado (Figura 20).

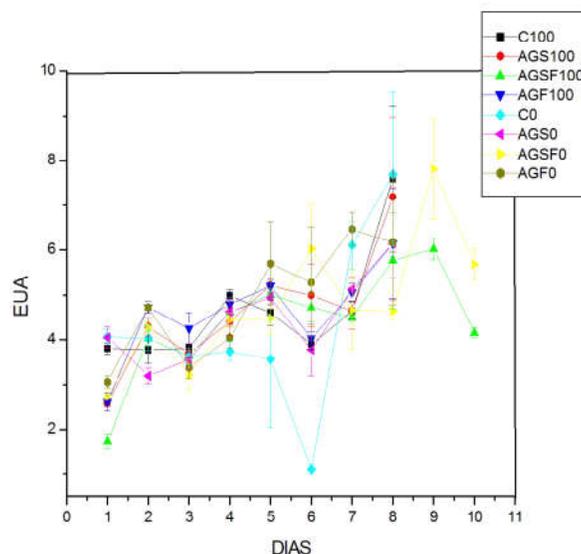


Figura 20. Valores médios para eficiência do uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ), em plantas de *Glycine max* (L.) Merrill, no estágio V4 (quarto trifólio totalmente expandido), submetidas a aplicação foliar de água para controle (C), a aplicação foliar de GABA e Ach a dose de 2,0 mM, nas sementes (AGS), nas sementes e folha (AGSF), e folha (AGF), onde 100 indica potencial hídrico da água -0,3 MPa (plantas irrigadas) e 0 indica potencial da água de -1,0 MPa (plantas sob déficit hídrico).

Ao quarto dia, houve um aumento da EUA para todos os tratamentos com GABA e Ach (AGS, AGSF, AGF) em relação ao controle (sem aplicação de bioreguladores) em ambos os regimes hídricos (Figura 20). Da mesma forma, ao sexto dia, foi observada uma diferença significativa para todos os tratamentos com GABA e Ach em comparação ao controle sob déficit hídrico. Sendo que, AGS, AGSF, AGF, apresentaram um aumento da EUA de 2,7; 5,1 e 4,2 vezes em relação ao controle (sem aplicação de bioreguladores) sob déficit hídrico, respectivamente. (Tabela 12).

Após a reidratação, todos os tratamentos que estavam sob déficit hídrico estabilizaram os valores para todas as variáveis analisadas, equiparando-se com sua condição inicial. Da mesma forma, valores de potencial da água ( $\Psi_a$ ) foram equivalentes aos dos tratamentos com irrigação a 100% da capacidade de vaso (Figura 21).

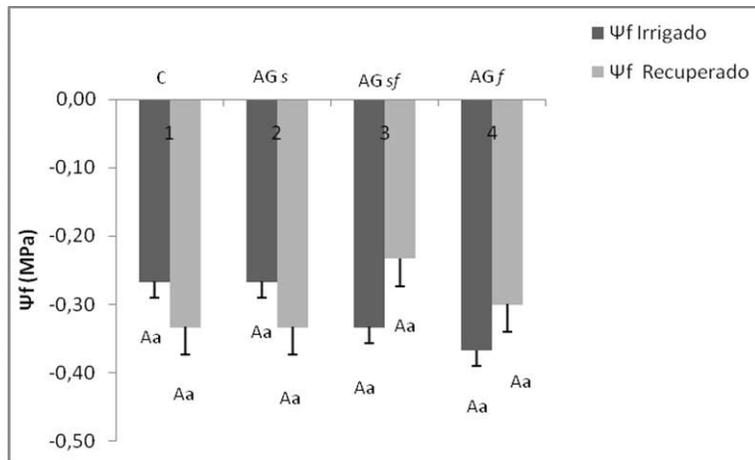


Figura 21. Valores médios para do potencial de água foliar ( $\Psi_f$ ) das plantas de soja cv. Intacta com aplicação simultânea das substâncias GABA e Acetilcolina (AG) nas doses de 2,0 mM com diferentes modos de aplicação, nas sementes (S), nas sementes e folhas (SF), e folhas (F), em função de dois regimes hídricos, Controle e Recuperado.

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (Controle e Recuperado). Letras minúsculas indicam diferença estatística entre as aplicações (S, SF, F). Teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Para verificar a resposta das plantas em cada tratamento, foram analisados a expressão de três genes por RT-qPCR, *GmABA2*, *GmP5CS1* e *GmLEA3* induzidos em condições de deficiência hídrica.

Na primeira coleta, 24 h após a aplicação foliar dos bioreguladores (AG) e quando as plantas estavam em regime hídrico de 100% da capacidade de vaso, o gene *GmP5CS* apresentou expressão similar em todos os tratamentos, com e sem aplicação dos bioreguladores. Por outro lado, o heatmap mostrou que, o gene *GmLEA3* exibiu uma forte supressão transcricional em todos os tratamentos que receberam a aplicação de AG ( $\text{Log}_2 = S - 5,5$  ; SF e F - 5,1) comparativamente ao tratamento controle. Do mesmo modo, houve uma diminuição do número de transcritos do gene *ABA2* para os tratamentos com aplicação de AG em relação ao controle (Figura 22A).

A segunda coleta, seis dias após a suspensão da irrigação, foi realizada quando as plantas estavam sob deficiência hídrica e o tratamento controle (sem adição de bioreguladores) atingiu potencial de água de -1,0 MPa. Para os tratamentos que estavam sob regime de suspensão da irrigação, o *P5CS1* exibiu maior expressão para o tratamento controle ( $\text{Log}_2 = 2.5$ ). Para os tratamentos com aplicação de AG (SF e F), o número de transcritos foi semelhante para ambos,  $\text{Log}_2 = -0.6$  e  $-0.2$ , como observado no heatmap (Figura 22B). Além disso, o gene *ABA2* exibiu maior expressão para o tratamento controle ( $\text{Log}_2 = 3.59$ ), em relação ao controle com 100% da capacidade de vaso. Foi observado um baixo nível transcricional deste gene para todos os tratamentos com aplicação de AG (S, SF e F),  $\text{Log}_2 = 1.6$ ,  $0.8$  e  $1.8$ , em relação ao tratamento controle, como observado no heatmap (Figura 22B).

O gene *LEA3* exibiu maior número de transcritos nos tratamentos sob déficit hídrico para o tratamento sem aplicação de bioreguladores em comparação aos demais tratamentos, tendo apresentado um valor de  $\text{Log}_2 = 5.9$ , um aumento de aproximadamente 5 vezes no número de transcritos comparado ao tratamento controle com 100% da capacidade de vaso. Em relação à aplicação de AG, foi observado que os tratamentos com aplicação foliar (SF e F) exibiram uma diminuição da expressão gênica,  $\text{Log}_2 = 1.7$  e  $2.6$ ,

em comparação ao controle sob déficit hídrico, como observado no heatmap (Figura 22B).

Na terceira coleta (reidratação dos tratamentos sob suspensão da irrigação), o perfil transcricional dos genes *P5CS1*, *ABA2* e *LEA3* mostraram-se semelhantes ao dos tratamentos que foram mantidos irrigados constantemente (Figura 22C).



#### 4.7 Atividades enzimáticas

Como as plantas protegem suas células pela ativação de sistemas antioxidantes, as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e ascorbato peroxidase (APX) foram analisadas nas plantas de soja submetidas aos diferentes tratamentos usados neste estudo. As plantas em condições normais de irrigação não apresentaram diferenças estatísticas para os valores de SOD em todos os tratamentos com os bioreguladores GABA e Ach (AG). No entanto, as enzimas CAT e APX apresentaram algumas diferenças em suas atividades para os tratamentos com aplicação de AG nas sementes e folhas (SF), e somente em folha (F) em relação ao controle sem aplicação de AG (Figura 23).

Também, foram analisadas as atividades das enzimas antioxidantes em plantas de soja sob deficiência hídrica com e sem aplicação dos bioreguladores (Figura 24). A atividade da SOD aumentou em 6% para o tratamento AG-SF em relação ao controle (plantas sob déficit hídrico e sem aplicação de bioreguladores). A atividade da CAT aumentou significativamente para todos os tratamentos com aplicação dos bioreguladores em relação ao controle, sendo que os tratamentos AG-S e AG-SF apresentaram um aumento de 1,4 e 1,07 vezes, respectivamente. A enzima APX apresentou um aumento significativo para os tratamentos AG-SF e AG-F (2,6 e 1,1 vezes, respectivamente) em relação ao tratamento controle (Figura 24).

Quando as plantas foram re-hidratadas, os valores de SOD mantiveram-se altos para os tratamentos que foram submetidos à deficiência hídrica com aplicação dos bioreguladores (S, SF, F) (Figura 25). A atividade da catalase aumentou de 0,84 e 2,4 vezes para os tratamentos recuperados de AG-SF e AG-F, respectivamente, em relação ao tratamento com deficiência hídrica (Figura 25). Para APX, o tratamento controle re-hidratado foi 70% menor em relação às plantas sob deficiência hídrica. Os tratamentos com bioreguladores AG-SF e AG-F mantiveram-se altos mesmo após a re-hidratação das plantas em relação aos demais tratamentos (Figura 25).

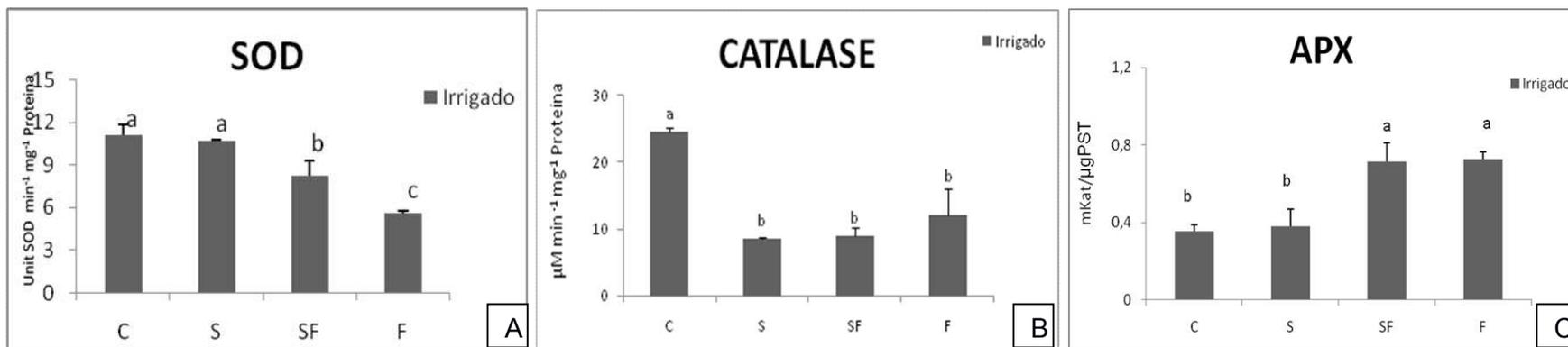


Figura 23. Atividades das enzimas antioxidantes SOD (A), CATALASE (B) e APX (C) em folhas de soja cv. Intacta sob regime hídrico de 100% da capacidade de vaso 24 h após aplicação foliar dos bioreguladores AG (ACh e GABA) a 2,0 mM em sementes (S), em sementes e folha (SF), em folhas (F) e no controle sem aplicação (C).

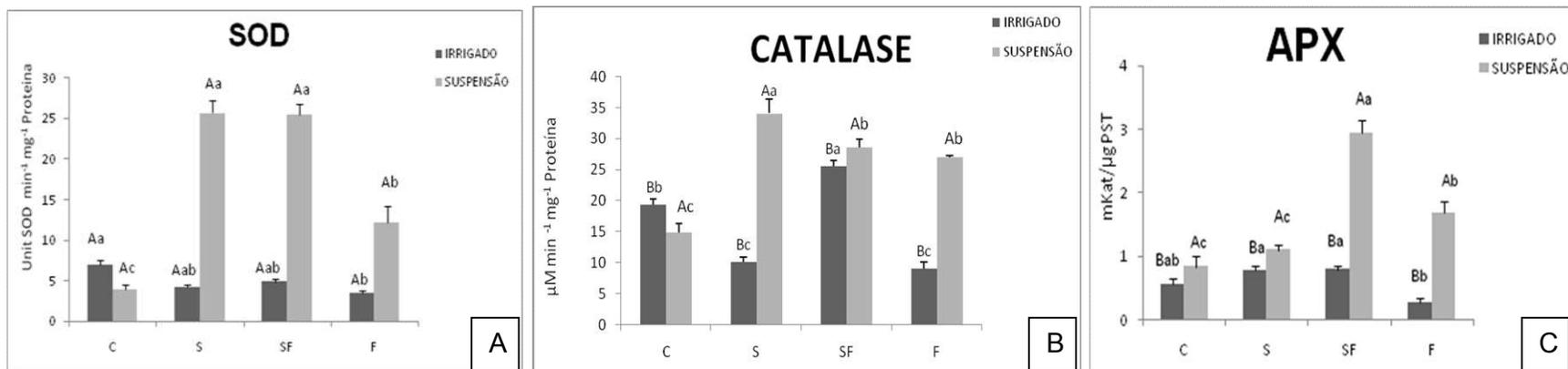


Figura 24. Atividades das enzimas antioxidantes SOD (A), CATALASE (B) e APX (C) em folhas de soja cv. Intacta sob diferentes regimes de irrigação, 100% da capacidade de vaso e sob déficit hídrico, seis dias após a suspensão da irrigação, submetidas à aplicação de bioreguladores AG (Ach e GABA) a 2,0 mM em sementes (S), em sementes e folhas (SF), em folhas (F) e controle sem aplicação (C).

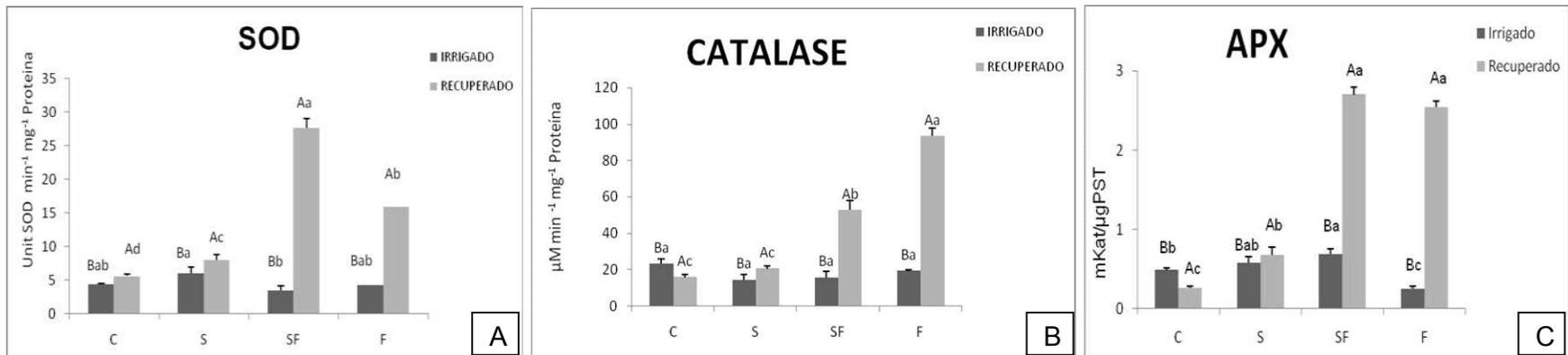


Figura 25. Atividades das enzimas antioxidantes SOD (A), CATALASE (B) e APX (C) em folhas de soja cv. Intacta sob regime hídrico de 100% da capacidade de vaso e após recuperação do déficit hídrico submetidas à aplicação de bio-eguladores AG (Ach e GABA) a 2,0 mM em sementes (S), sementes e folhas (SF), folhas (F) e controle sem aplicação (C).

#### 4.8 Conteúdo de prolina na folhas.

Como a prolina é um composto que pode atuar como osmoprotetor no sistema de defesa da planta, quando há deficiência hídrica, foi analisada em plantas de soja submetidas aos diferentes tratamentos usados neste estudo. Os níveis de prolina 24 h após a aplicação dos bioreguladores apresentaram valores semelhantes para todos os tratamentos, com e sem aplicação dos bioreguladores nas plantas de soja (Figura 26A).

Para os tratamentos sob deficiência hídrica em plantas de soja com e sem aplicação dos bioreguladores, o conteúdo de prolina diminuiu significativamente para todos os tratamentos que receberam aplicação dos bioreguladores AG-S, AG-SF e AG-F (60%, 84% e 83%, respectivamente), em relação ao controle sob déficit hídrico e sem aplicação de AG (Figura 26B).

Quando as plantas tiveram sua irrigação retomada após o estresse, o tratamento controle (plantas re-hidratadas sem aplicação de AG), foi observada uma diminuição de 75% do conteúdo de prolina em relação ao valor apresentado quando as plantas estavam sob déficit hídrico (Figura 26C). Semelhantemente, os tratamentos que receberam aplicação de AG também apresentaram menor conteúdo de prolina nas folhas em relação às plantas sob déficit hídrico. Os tratamentos com bioreguladores AG-S, AG-SF e AG-F mostraram um menor acúmulo de prolina (49%, 17% e 48%, respectivamente) após a retomada da irrigação (Figura 26C). Desta forma, todos os tratamentos apresentaram menores conteúdos de prolina nas folhas quando as plantas foram re-hidratadas.

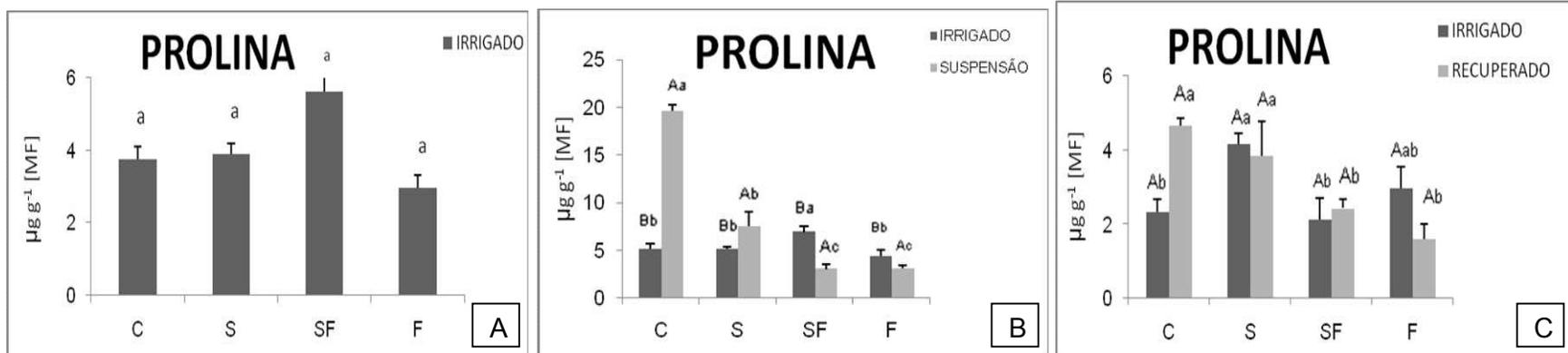


FIGURA 26. Conteúdo de prolina em folhas de soja cv. Intacta sob regime hídrico de 100% da capacidade de vaso, 24 h após aplicação dos bioreguladores (A), déficit hídrico, seis dias após a suspensão da irrigação (B) e recuperação (re-hidratação dos tratamentos do déficit hídrico (C), com aplicação de bioreguladores a 2,0mM em sementes (S), sementes e folha (SF) e folha (F), e, controle sem aplicação(C), e controle sem aplicação.

#### 4.9 Rendimento de Biomassa

Em plantas com 100% da reposição diária de água, os tratamentos com aplicação de AG independente do modo de aplicação, (S, SF E F) influenciaram em todos os parâmetros de crescimento, em destaque para o tratamento com AG-SF que promoveu um aumento para MS<sub>R</sub>, MS<sub>F</sub> e AF de 64%, 31% e 57%, respectivamente, comparado as plantas controle, irrigado sem aplicação dos bioreguladores (Tabela 13 e 14).

Tabela 13. Parâmetros biométricos de crescimento das plantas de soja cv. Intacta com aplicação simultânea das substâncias GABA e Acetilcolina (AG) nas doses de 2,0 mM com diferentes modos de aplicação, nas sementes (S), nas sementes e folhas (SF), e folhas (F), em função de dois regimes hídricos, com e sem déficit hídrico.

Regime de Irrigação	CONTROLE				SUSPENSÃO			
	C	AG S	AG SF	AG F	C	AG S	AG SF	AG F
MS <sub>R</sub> (g)	59Ab	84Aa	97Aa	54Ab	32,9Bb	62Ba	70Ba	64Ba
MS <sub>F</sub> (g)	13,5Ab	12,5Ab	17,8Aa	12,0Ab	8,5Bc	12,5Bb	15,8Ba	14,3Bab
MS <sub>C</sub> (g)	15,3Aa	16,8Aa	16,7Aa	13,8Aa	14,0Aa	17,0Aa	17,8Aa	18,3Aa
MS <sub>PA</sub> (g)	41,1Ab	46,5Aab	50,0Aa	44,7Aab	33,1Ab	42,5Aa	49,1Aa	48,0Aa
MS <sub>T</sub> (g)	100Ab	130Aa	147Aa	98,7Ab	66Bb	105Ba	116Ba	117Ba
MS <sub>R</sub> /MS <sub>PA</sub>	1,4Abc	1,8Aab	1,9Aa	1,2Ac	1Bb	1,4Ba	1,3Bab	1,4Ba
ALTURA CAULE(cm)	63,5Ab	64,5Aa	64,1Aa	66Aa	48,8Ab	72,8Aa	69Aa	74,6Aa
AF(cm <sup>2</sup> )	1824Ab	2749Aa	2870Aa	2478Aa	1539Ab	2469Aa	2860Aa	2681Aa

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (Controle e Suspensão). Letras minúsculas indicam diferença estatística entre as aplicações (S, SF, F). Teste Tukey (p<0,05).

Referente aos parâmetros de produção, a aplicação de AG em plantas com 100% da capacidade de vaso, independente do modo de aplicação, exibiram um aumento para todos os parâmetros, destacando-se AG-SF com maiores aumentos para Nv, Ns, M<sub>100G</sub> de 23%, 29% e 28%, respectivamente, em relação às plantas controle, irrigado sem aplicação dos bioreguladores (Tabela 13).

Tabela 14. Parâmetros biométricos das plantas de soja cv. Intacta com aplicação simultânea das substâncias GABA e Acetilcolina (AG) nas doses de 2,0mM com diferentes modos de aplicação, nas sementes (S), nas sementes e folhas (SF), e folhas (F), em função de dois regimes hídricos, Controle e Suspensão. Parâmetros Avaliados: Número de vagem por planta (Nv), Número de sementes por planta (Ns), Massa de cem grãos (M<sub>100G</sub>), Massa semente por planta (M<sub>sementes</sub>).

Regime de Irrigação	CONTROLE				SUSPENSÃO				
	Tratamentos	C	AG S	AG SF	AG F	C	AG S	AG SF	AG F
Nv		63Ab	62Ab	78Aa	76Aab	46Ab	83Aa	77Aa	73Aa
Ns		148Ab	162Aab	191Aa	172Aab	106Ab	187Aa	164Aa	165Aa
M <sub>100G</sub> (g)		12,3Ab	17Aa	15,8Aab	18,6Aa	10Bb	12,0Bab	15Ba	15,4Ba
M <sub>sementes</sub>		18,2Ab	28,0Aa	29,5Aa	32,0Aa	10,9Bb	23,0Ba	24,5Ba	25,8Ba

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (Controle e Suspensão). Letras minúsculas indicam diferença estatística entre as aplicações (S, SF, F). Teste Tukey (p<0,05).

De acordo com os dados de crescimento, a deficiência hídrica reduziu não só o desenvolvimento como também o acúmulo de massa seca das plantas como um todo para o tratamento controle (sem aplicação dos bioreguladores) sob déficit hídrico. Foram observadas reduções significativas para  $MS_R$ ,  $MS_F$  e  $AF$  de 44%, 37% e 15%, respectivamente, comparado ao controle irrigado sem aplicação de AG (Tabela 13). Assim a deficiência hídrica imposta por suspensão de irrigação afetou significativamente os parâmetros de crescimento, o que ocasionou uma queda para o rendimento de biomassa para o tratamento controle sob déficit hídrico. Para os tratamentos controle, que não receberam aplicação de AG, sob as diferentes condições hídricas, o controle sob déficit hídrico apresentou uma redução para  $N_V$ ,  $N_S$ ,  $M_{100G}$  de 27%, 28% e, 18%, respectivamente, em relação ao controle com 100% da capacidade de vaso. Porém apresentou maior redução para o parâmetro de massa de semente por planta, cerca de 40% menor comparado ao controle irrigado (Tabela 14).

Por outro lado, sob deficiência hídrica os tratamentos que receberam a suplementação de AG com diferentes modos de aplicações (*S*, *SF*, e *F*) caracterizaram-se por apresentarem, em geral, aumentos para os parâmetros de crescimento, assim como, acúmulo de massa seca. Porém o tratamento de AG na semente e também na folha (*SF*) destacou-se por apresentar maiores valores, principalmente para os parâmetros de  $MS_R$ ,  $MS_F$ ,  $MS_R/MS_{PA}$  e,  $AF$  com 1,1vezes, 85%, 30% e 85%, respectivamente, em comparação ao tratamento controle sob déficit hídrico e sem aplicação dos bioreguladores (Tabela 13). O número de vagens e o número de sementes expressaram diferenças significativas independente do modo de aplicação entre os tratamentos, sendo que os valores observados no tratamento AG-S para essas variáveis foram 80% e 76% maiores em relação ao controle. A massa de cem grãos ( $M_{100g}$ ) para os tratamentos AG-SF e AG-F foram maiores que 50% em comparação ao controle, refletindo em maiores valores de massa de semente por planta, para AG-S, AG-SF, AG-F, com 1,1; 1,2 e 1,3 vezes respectivamente, em relação ao tratamento controle sob déficit hídrico e sem aplicação de AG. (Tabela 14).

## DISCUSSÃO

### **Aplicações de GABA e Acetilcolina em sementes de soja (Experimento 1).**

As aplicações dos biorreguladores mostraram, em geral, uma tendência positiva sobre os parâmetros de germinação e desenvolvimento das plântulas de soja em condições livre de estresse osmótico. Além disso, foi constatado um efeito mitigador marcante sobre os potenciais danos causados pelo estresse osmótico imposto (-1,0 MPa), em particular de algumas combinações de GABA com Ach.

A deficiência hídrica afetou significativamente as variáveis analisadas como germinação e desenvolvimento das plântulas, notadamente nas que não foram suplementadas com os bioreguladores (Tabela 2). Estes resultados são decorrentes da modificação do potencial de água na planta causado por meio do manitol aplicado no papel Germitest, o que dificulta a utilização de água pela semente, promovendo a diminuição da atividade enzimática gerando menor desenvolvimento meristemático reduzindo, desta forma, a velocidade e a taxa de germinação (POPINIGIS, 1985; ÁVILA et al., 2007).

Para os tratamentos realizados para análise do efeito mitigador da solução de GABA sob estresse osmótico a -1,0 MPa a dose de 0,5 mM apresentou melhores resultados nos parâmetros analisados. As plântulas obtiveram maior comprimento de raiz e parte aérea, proporcionando também maior acúmulo de massa seca. Houve uma diminuição da relação entre raiz e parte aérea, porém as plântulas se mantiveram com boa qualidade (Tabela 2). Em plantas, o GABA atua tanto na defesa em respostas ao estresse, quanto no desenvolvimento vegetal, como sinalizador de processos fisiológicos (BOOZ, 2007). Desta forma, o GABA apresenta-se como um protetor do embrião de soja no início do desenvolvimento (GUO et al., 2012), minimizando assim os efeitos do estresse sobre a semente (YIN et al., 2014).

Os tratamentos utilizando Ach induziram um maior crescimento de raiz nas plântulas de soja com a dose de 2 mM, em condições sem estresse (Tabela 3). Nossos estudos apoiam as observações iniciais de Kostir (1965),

sugerindo que a aplicação exógena de Ach influencia a germinação e o estágio inicial de desenvolvimento e crescimento de plantas. Os efeitos da Ach sobre as raízes também foram analisados por Sugiyama (2011) que observou, em rabanete, cultivados com e sem Ach a uma concentração de 1 nM, o crescimento (surgimento e alongamento) de raízes laterais em plântulas. Experimentos realizados em tomate demonstraram que Ach induz enraizamento em explantes foliares cultivados *in vitro*, podendo ser também *in vivo*. Desta forma, há um corpo de evidências mostrando que Ach pode agir como um hormônio de crescimento *per se*, ou em uma possível interação com auxina e outros hormônios (BAMEL et al., 2007).

Para as sementes submetidas ao tratamento osmótico de -1,0 MPa, a concentração de Ach que manteve o mesmo efeito sobre o crescimento das raízes foi de 0,5 mM, proporcionando também um maior acúmulo de MST (Tabelas 3 e 10). De acordo com Kostir (1965) a aplicação exógena de Ach influencia a germinação e o estágio inicial de desenvolvimento e crescimento das plantas. O aumento da espessura das paredes celulares e do crescimento dá-se pelo fato da Ach ser sintetizada nos caules, folhas, nós e raízes em resposta a estresses (MURCH, 2006).

A aplicação de todas as doses combinadas das substâncias de GABA e Ach na germinação de soja sob o estresse osmótico induziu um aumento da relação entre R/PA. O maior aumento da raiz pode estar relacionado à melhor qualidade das plântulas (maiores valores de NPFT) destes tratamentos comparando-se ao tratamento com -1,0 MPa sem suplementação dos bio-reguladores, uma vez que o estresse osmótico diminuiu a relação entre R/PA, bem como a qualidade das plântulas. Como observado por meio das análises das raízes, a combinação das substâncias AG promoveu um aumento para comprimento da raiz, volume, área e diâmetro em relação ao controle sem aplicação dos bio-reguladores nas plântulas sob estresse (Tabela 10). Provavelmente, a Ach promoveu a translocação de carboidratos tais como açúcares e amido dos cotilédones para as raízes e, assim, induzindo um aumento da biomassa da raiz. Isso sugere que a Ach parece participar das atividades do metabolismo do carbono e da translocação de carboidratos entre os cotilédones e raízes (SUGIYAMA et al., 2011). Como observado em mudas de *Raphanus sativus* aplicação exógena de Ach promoveu, aumento da

atividade das enzimas da via glicolítica no citosol, do ciclo TCA, além do sistema de transporte de elétrons nas mitocôndrias (SUGIYAMA et al., 2011).

Como o enraizamento (*in vivo* ou *in vitro*) é principalmente afetado pela auxina, a eficácia de Ach na promoção de raízes sugere uma possibilidade interessante no mecanismo de ação de Ach e seu envolvimento com auxina (BALUSKA et al., 2005).

Alguns estudos mostraram que Ach combinada com auxina aumenta a expressão do gene LeEXPA2 de expansina em hipocótilos de tomate, quando comparado aos tratamentos de auxina e Ach separadamente (DI-SANSEBASTIANO et al., 2014). Os expansores são conhecidos por estarem envolvidos no alongamento celular, sendo codificados por uma família multigênica, onde o LeEXPA2 está incluído, que são regulados por auxina nas regiões em crescimento de hipocótilo jovem de tomate (CADERAS et al., 2000). Di-Sansebastiano (2014) analisou a expressão do gene da expansina LeEXPA2 em hipocótilos de tomateiro para investigar o efeito da auxina e Ach no alongamento celular. Observou-se um baixo nível de transcrição de LeEXPA2 no tratamento apenas com Ach, mas houve um aumento significativo na transcrição de expansinas nos tratamentos Ach combinados com auxina. Parsaeimehr (2015) observou que uma aplicação exógena de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ach em *Chlorella sorokiniana* tem um papel estimulador no crescimento e acumulação de lipídios.

A concentração de 2,0 mM de ambas as substâncias combinadas nas plantas submetidas a estresse osmótico a -1,0 MPa também proporcionou maior %G em relação a todos os tratamentos realizados (Tabela 6, Figura 12). Este fato pode ser atribuído ao papel do GABA que, atuando como osmoprotetor, conferiu proteção ao estresse osmótico para as sementes de soja. Em plantas, o GABA tem sido extensivamente estudado como uma molécula de efeito osmótico, respondendo a uma variedade de sinais ambientais, tais como a hipoxia, estresse mecânico e estresse de temperatura (SHELP et al, 1999; BOUCHE E FROMM 2004). Sob estresse osmótico, alguns estudos demonstraram a ação do GABA para a formação de osmólitos a fim de proteger as células de danos decorrentes da redução da disponibilidade de água (SHELP et al, 1999; SILVA-ORTEGA et al. 2008).

De forma geral, nossos resultados indicam que os tratamentos que apresentaram uma melhor resposta das plântulas mediante a situação de estresse osmótico a -1,0 MPa foram as combinações entre 2,0 mM de GABA com 2,0 mM de Ach. A ação das substâncias combinadas potencializou o crescimento e desenvolvimento das plântulas de soja, sugerindo uma ação combinada de tal forma que o GABA atuaria como um osmoprotetor do metabolismo nas sementes de soja, enquanto que a Ach induziria a translocação de carboidratos dos cotilédones para as raízes. Desta forma, as substâncias GABA e Ach apresentaram efeitos mitigadores em sementes de soja sob estresse osmótico.

### **Aplicação foliar de GABA e Ach em plantas de soja sob déficit hídrico**

Como esperado, o déficit hídrico causou uma queda dos valores de todos os parâmetros de trocas gasosas nas plantas controle (sem aplicação de GABA e Ach) em comparação aos demais tratamentos para os dois regimes hídricos impostos, 30% da capacidade de vaso (Tabela 11, experimento 2), e suspensão de irrigação (Tabela 12, experimento 3).

O nível de severidade da deficiência hídrica foi suficiente para reduzir os valores do potencial da água foliar, alcançando valores entre -0,8 e -1,0 MPa seis dias após a suspensão hídrica. Para o tratamento controle, o potencial da água de -1,0 MPa foi suficiente para diminuir os valores de biomassa ao final do ciclo de crescimento das plantas. Os efeitos do estresse hídrico sobre as taxas fotossintéticas de folhas de soja são facilmente detectáveis já em níveis de -1,0 a -1,2 MPa, podendo se tornar irreversíveis uma vez que o potencial da água caia abaixo de -1,6 MPa (RAPER & KRAMER, 1987; SOUZA et al., 2012).

As respostas mais evidentes das plantas ao déficit hídrico em termos de processos morfológicos são diminuições na área foliar e aceleração da senescência e a abscisão das folhas assim como diminuição da condutância estomática, mecanismo de defesa para evitar perdas excessivas de água (SOUZA et al., 2012). A ocorrência de déficit hídrico durante o crescimento vegetativo pode reduzir os índices de área foliar e da interceptação da radiação

fotossinteticamente ativa pela área foliar total para níveis insuficientes para a taxa ótima de crescimento e rendimento (RAPER & KRAMER, 1987).

Neste trabalho, o déficit hídrico aplicado nas plantas afetou significativamente o a produção de grãos por plantas, resultante do menor acúmulo de matéria seca e também da massa seca da raiz em relação à massa seca da parte aérea (Tabela 13). O estresse hídrico diminuiu drasticamente o alongamento da raiz e expansão da área foliar em soja, embora estes dois processos não foram igualmente afetados, porque a expansão da folha geralmente é reduzida em uma proporção maior do que o crescimento das raízes (AKYNCCI & LOSEL, 2012). Inman-Bamber et al. (2008) apontam que a primeira resposta da planta ao déficit hídrico é a redução em seu desenvolvimento. Todas as modificações morfológicas da soja resultantes do déficit hídrico aplicado no presente trabalho promoveram reduções no crescimento e desenvolvimento, os quais afetaram diretamente o rendimento da planta, assim como o número de vagens, sementes e gramas de sementes (Tabela 14).

A cultura da soja, apesar de ser tolerante a curtos períodos de deficiência hídrica, possui queda significativa nos rendimentos perante deficiência hídrica de longa duração. No presente trabalho o déficit hídrico afetou significativamente altura do caule das plantas, área foliar, massa seca da raiz e folha, assim como número de sementes, e massa de sementes por planta (Tabelas 13 e 14). Secas severas na fase vegetativa reduzem o crescimento da planta, diminuem a área foliar e o rendimento de grãos (DO VALE et al., 2017). O déficit hídrico reduz a capacidade de armazenamento de água no solo, sendo um dos responsáveis pelas variações das perdas na cultura da soja; por sua vez, a falta de água dificulta o desenvolvimento radicular da planta (CÂMARA, 2015), fato observado nas plantas que estavam sob déficit hídrico. Assim as reduções dos parâmetros da biomassa às condições de déficit de hídrico estão relacionadas à diminuição das taxas fotossintéticas e da condutância estomática, levando a menor perda de água por transpiração, porém menor assimilação de CO<sub>2</sub> e, desta forma, menor acúmulo de biomassa, pois, a acumulação e a translocação de carboidratos para os grãos são conseqüentemente prejudicadas (NEUMAIER et al., 2000).

A produção das plantas é determinada principalmente pela fotossíntese ( $P_n$ ), esta por sua vez, é governada principalmente por estômatos, por meio das trocas gasosas e atividade fotossintética em células do mesófilo (FANG et al., 2015). Neste trabalho foi observada uma diminuição de  $P_n$  para o tratamento controle, o qual atingiu valores próximos a 0 durante a suspensão de irrigação quando o potencial da água chegou a -1,0 MPa (Figura 15). O déficit hídrico afetou não apenas as reações no aparato fotoquímico, mais também a eficiência de assimilação das reações bioquímicas, reduzindo assim o conteúdo dos produtos fotossintéticos. A diminuição da difusão de  $CO_2$  pela atmosfera até o local de carboxilação de Rubisco (ribulosebifosfato carboxilase/oxigenase) é geralmente considerada como a principal causa da redução da fotossíntese sob condições de déficit de água (GRASSI & MAGNANI, 2005, CHAVES et al., 2009, PINHEIRO & CHAVES, 2011).

À medida que o solo seca, o fluxo de ácido abscísico (ABA) das raízes para a parte aérea aumenta e, dentro das folhas, o ABA conjugado com glicose armazenado dentro do vacúolo é convertido em ABA livre (SEILER et al., 2011). À medida que ocorre o aumento de ABA, ocorre também uma mudança no potencial osmótico nas células-guarda, resultando no fechamento estomático para diminuir a perda de água por transpiração (PINHEIRO e CHAVES, 2011; SOUZA et al., 2013; HAWORTH et al., 2016b). No presente estudo sob condição de déficit hídrico, foi observada uma diminuição dos valores de  $G_s$  para o controle em relação aos demais tratamentos, indicando a ativação da biossíntese de ABA para promover o fechamento estomático, fato provavelmente associado a maior expressão do gene *ABA2* que está envolvido na via biossintética do ABA (Tabela 12, Figura 23). O movimento estomático é controlado por modificações do potencial osmótico nas células-guarda, especialmente promovido pelo  $K^+$  (HOSY et al., 2003; FANG et al., 2015). Assim, a diminuição do  $G_s$  e a condutância mesofílica (TARDIEU E DAVIES, 1992; SORRENTINO et al., 2016) associadas a maior concentração de ABA reduz a disponibilidade de  $CO_2$  no local de carboxilação, resultando em uma redução nas taxas de  $P_n$ , como observado no presente estudo (Figura 15).

Diante das evidências sobre a ação de uma nova classe de bioreguladores para promover maior osmoproteção (GABA) e regulação do movimento estomático (Ach) (BOUCHÉ e FROMM, 2004; JIA et al., 2008), foi

realizada a aplicação desses compostos em plantas de soja sob diferentes regimes de irrigação.

A aplicação via foliar combinada (AG) dos biorreguladores Ach e GABA em plantas de soja cv. Intacta sob condições de irrigação constante aumentou as taxas fotossintéticas e a condutância estomática, principalmente 48 horas após a aplicação, o que pode ser visto pelo aumento dos parâmetros de rendimento independente do modo de aplicação, principalmente para o tratamento em sementes e folha (AG-SF) (TABELA 14). Quanto às plantas de soja sob déficit hídrico, a aplicação dos biorreguladores combinados em diferentes tecidos (S, SF e F) proporcionou um maior crescimento e desenvolvimento, refletindo no aumento de biomassa. Isto, possivelmente, deveu-se aos maiores valores encontrados nos parâmetros de trocas gasosas, principalmente nas taxas fotossintéticas (TABELA 12).

Tratamentos com aplicações de aminoácidos podem melhorar significativamente os parâmetros de crescimento da parte aérea, peso fresco, assim como o rendimento em soja (SAEED et al. 2005). A acumulação de aminoácidos foi sugerida para auxiliar a tolerância ao estresse nas plantas, através do ajuste osmótico, desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e por regulação intracelular do pH (DE RONDE et al., 2000; ALIA et al., 2001). O GABA é um importante aminoácido, o qual possui diferentes funções no metabolismo primário de plantas e também na resposta a estresses (LUDEWIG et al. 2008). Neste trabalho, a aplicação foliar de GABA tanto para a dose de 0,5 mM (Tabela 11), como para a dose de 2,0 mM, combinado com Ach (Tabela 12), promoveu um aumento dos valores de Pn, Ci, E e EUA, quando as plantas se encontravam sob déficit hídrico, promovendo assim maior tolerância a condições de estresse. A aplicação exógena de GABA também promoveu tolerância ao déficit hídrico em algumas espécies de plantas, como *Lolium perenne*, *Simarouba glauca*, *Piper nigrum*, devido ao aumento do potencial osmótico, ativação de enzimas antioxidantes e, modelador do balanço do C:N, que é possível através da detecção e regulação de níveis internos de açúcares e / ou compostos contendo nitrogênio (KRISHNAN et al. 2013, VIJAYAKUMARI et al., 2016). O GABA aplicado de forma exógena também promoveu maior crescimento e rendimento em *Stellaria longipes* (KATHIRESAN et al. 1998) e *Benincasa hispida* (ALI et al. 2010). Islam et al. (2010) observaram que a

produção de vagem em plantas de soja com aplicação foliar de GABA foi significativamente maior em relação ao controle sem aplicação foliar de GABA.

O aumento de Pn em plantas tratadas com GABA observado no presente estudo pode estar relacionado com o conteúdo de clorofila (Figura 15). Os aumentos no conteúdo de clorofila e Pn com a aplicação de GABA submetida à hipóxia foram observados em mudas de melão (XIA et al., 2011). Tratamentos com GABA em *Piper nigrum* resultou em um aumento do teor de clorofila, das atividades do fotossistema I e II e também no teor total de açúcar (VIJAYAKUMARI et al., 2016). A conversão de Glutamato e GABA é uma parte importante do metabolismo do GABA, conhecido como GABA “shunt”, e, ambos servem como uma fonte de nitrogênio para as plantas (BOUCHÉ e FROMM, 2004). Além disso, o glutamato está intimamente relacionado com a biossíntese da clorofila (BEALE et al., 1975, VON WETTSTEIN et al. 1995).

Sob condições de estresse nas plantas, ocorre o aumento no conteúdo de aminoácidos livres emitido pela proteólise, que tende a desencadear um aumento no conteúdo de Glutamato, produzindo por sua vez GABA, sendo transaminado pelo GABA-T, fornecendo succinato para a respiração mitocondrial. Em folhas jovens de *Brassica napus* sob déficit hídrico, a expressão do gene GABA-T, enzima responsável pela degradação de GABA, aumentou, fornecendo succinato para o ciclo TCA, manutenção da homeostase do glutamato, e também a produção de ATP. Desta forma, a via GABA “shunt”, está relacionada com a diminuição de espécies reativas de oxigênio para melhorar a tolerância ao estresse hídrico (FAES et al., 2015).

O acúmulo de prolina é reconhecidamente relacionado com a resposta de plantas a diferentes estresses, principalmente à deficiência hídrica, sendo que seu conteúdo varia com a gravidade do estresse e com o nível de tolerância das espécies (CHAKRABORTY et al., 2005; VERBRUGGEN et al., 2008; TODAKA et al., 2017). O efeito mitigador do GABA em relação aos danos causados pelo déficit hídrico pode ser observado também por meio da quantificação relativa do gene *GmP5CS1*, que sintetiza a prolina, um amino ácido osmoprotetor indicativo de estresse (LIU et al., 2017). Os dados de quantificação gênica relativa mostraram os baixos níveis de expressão do *GmP5CS1* para as plantas que receberam a aplicação dos bioreguladores (Figura 23). Em consequência, houve um menor acúmulo de prolina nas folhas

das plantas sob deficiência hídrica com aplicação de AG (Figura 26b), indicando que essas plantas estavam menos estressadas em relação às plantas controle sem aplicação deste bioregulador (Figura 26b). Em *Agrotis stolonifera*, a aplicação exógena de GABA também promoveu uma diminuição do acúmulo de prolina sob estresse de altas temperaturas (LI et al., 2016). Uma diminuição do conteúdo de prolina com a aplicação de GABA também foi observada em mudas de tomateiro submetidas a baixas temperaturas (MALEKZADEH et al. 2014).

Mediante os dados obtidos no presente trabalho, é possível sugerir que o Glutamato tenha sido direcionado para a síntese de GABA, ao invés da síntese de prolina. Desta forma, o aumento dos níveis de GABA pode ser fornecido para piruvato e succinato semialdeído para alimentar o ciclo TCA, ao invés de ir para o metabolismo de prolina (LI et al., 2017). Ou seja, a conversão por meio da enzima glutamato descarboxilase (GAD), de Glutamato em GABA pode ser transformada em ácido succínico através da catálise de  $\gamma$ -aminobutirato transaminase (GABA-T) e succinato semialdeído desidrogenase (SSADH). Então o ácido succínico está envolvido no ciclo TCA para manter o ciclo carbono-nitrogênio em plantas, que é conhecido como o GABA Shunt (BOUCHE e FROMM 2004; SHELP et al., 1999, LI et al., 2017).

Também plantas submetidas a estresses abióticos ativam mecanismos de defesa relacionados à proteção contra os efeitos de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs influenciam a absorção de carbono da fotossíntese por meio da inativação enzimática de proteínas nos cloroplastos, gerando mais  $O_2$  nas células, resultando em dano oxidativo ao fotossistema I (PSI). Geralmente, as células das plantas têm equilíbrio intracelular entre a produção de EROs e sua eliminação através das ações de diferentes enzimas antioxidantes (GILL et al., 2010; SONG et al., 2010; HASANUZZAMAN et al., 2012a). Entre estas, a SOD é considerada uma das principais enzimas que fornece defesa de primeira linha contra EROs por que catalisa o processo de dismutação de  $O_2$  para  $H_2O_2$  (HASANUZZAMAN et al., 2012a; GILL et al., 2015). A CAT e a APX, em seguida, retiram  $H_2O_2$  convertendo-o em  $O_2$  e  $H_2O$  (MILLER et al., 2008). Neste trabalho as plantas de soja tratadas com os bioreguladores combinados (AG) apresentaram um aumento da atividade das enzimas SOD, CATALASE e APX, quando as plantas foram submetidas à

deficiência hídrica (Figura 24), indicando que possivelmente o GABA promoveu a indução desta defesa antioxidante para remover EROs produzidas em resultado da deficiência hídrica. Também, foi observado aumento, principalmente das enzimas CAT e APX nos tratamentos com aplicação dos bioreguladores sob déficit hídrico e após a re-hidratação, principalmente para os tratamentos AG-SF e AG-F. A função de GABA tem sido mostrada em diversas espécies de plantas sob diferentes tipos de estresses, aumentando a atividade de diferentes enzimas antioxidantes (MALEKZADEH et al., 2012, 2014; NAYYAR et al. 2014; LI et al., 2016; MAHMUD et al., 2017). Também, a tolerância ao estresse induzida por GABA pode estar relacionada ao aumento das atividades de enzimas antioxidantes, indicando seu papel protetor na remoção de EROS, reduzindo os danos oxidativos, promovendo a homeostase redox (SONG et al., 2010; YANG et al., 2011; LI et al., 2016).

Ach é considerada como um hormônio natural, o qual apresenta um papel como regulador natural da morfogênese vegetal (BAMEL et al., 2016). Desta forma, Ach pode ter funções relacionadas ao crescimento da planta, acumulação de lipídios e biomassa (PARSAEIMEHR et al, 2015). Neste trabalho, a aplicação exógena de Ach em plantas de soja pode ter sido responsável pelo aumento da massa seca da raiz observado em ambos os regimes hídricos, independente do modo de aplicação (*S*, *SF* e *F*). No entanto, em plantas sob irrigação constante a aplicação dos bioreguladores em sementes e folhas (*AG-SF*) apresentou um aumento da massa seca da raiz de 2 vezes e sob suspensão da irrigação de 1,1 vezes comparado ao controle sob déficit hídrico e sem aplicação de AG, respectivamente (Experimento 3). Isto corrobora os dados obtidos no primeiro experimento realizado com sementes (Experimento 1), no qual foi observado um aumento do comprimento e massa seca da raiz nas plântulas sob estresse osmótico de -1,0 MPa (Tabela 3).

Dependendo da concentração, Ach pode promover a alongação ou inibição do crescimento de raízes (MURATA et al., 2015). Em nosso caso, o uso de 2,0 mM promoveu maior crescimento, e acúmulo de massa seca para as raízes (Tabela 14). Este fenômeno é dependente da atividade metabólica resultante da indução ou inibição de reguladores da atividade enzimática no crescimento da planta. Assim, Ach pode ativar alguns sistemas metabólicos que participam no aumento da quantidade de Dinucleotídeo de nicotinamida e

adenina (NAD), ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas, assim como a via glicolítica no citoplasma e o sistema de transporte de elétrons (SUGIYAMA et al., 2011). Ainda, foi observado que a concentração intracelular de Ach em arroz elevou os níveis de Acetil-CoA, acelerando a conversão de oxalacetato em citrato no ciclo TCA (MAHDAVI et al., 2016). Em sementes de rabanete, a aplicação exógena de Ach promoveu um aumento sobre o peso das raízes (SUGIYAMA et al., 2011).

Nas membranas das células-guarda são encontradas diversas proteínas específicas, tais como proteínas de ligação ao ABA, receptores de Ach, proteína G de ligação a GTP (guanosina trifosfato ativa) e receptores de luz e canais iônicos no citoplasma de células-guarda envolvidas no controle do movimento estomático (COUSSON et al., 1998; YAMAZAKI et al., 2003). A Ach foi reportada como antagonista da ação de ABA sobre os estômatos, sendo capaz de atuar na sinalização a longa distância para regular movimento estomático e apresentando um papel importante na modulação da sensibilidade estomática à deficiência hídrica (JIA et al., 2008). Há evidências de que receptores muscarínicos (mAChR) e nicotínicos (nAChR) estão presentes nas células-guarda e que medeiam à abertura estomática regulada por Ach (WANG et al., 2000; MENG et al., 2001). Ach apresenta um papel regulatório em canais específicos de entrada de  $K^+$  em celular-guarda de *V. faba* (LENG et al., 2000). Também, estudos mostram que o  $Ca^{2+}$  e a calmodulina estão envolvidos na resposta de células-guarda à Ach e que o sinal de  $Ca^{2+}$  pode estar acoplado a mAChR na transdução de sinais nas células estomáticas (MENG et al., 2004). Em nosso caso, a Ach aplicada em sementes e folhas (*SF*) de soja, isolada ou combinada com GABA, nas doses de 0,5 e 2,0 mM, respectivamente, com irrigação a 100% da capacidade de vaso, promoveu um aumento dos valores de condutância estomática (Tabela 2), confirmando os resultado de outros autores que mostram que a Ach desempenha um papel importante na regulação do movimento estomático (WANG et al., 2000), tendo efeito estimulatório na abertura dos estômatos (LOU,1998). Nas plantas de soja sob as condições de déficit hídrico proporcionada com uma lâmina de 30% da irrigação plena, foi observado que os tratamentos que continham a aplicação exógena de Ach promoveram um aumento na condutância estomática e transpiração (Tabela 11).

A Ach está envolvida na regulação da homeostase da água (WESSLER et al., 2001) e pode induzir a despolarização da membrana e um aumento da permeabilidade ao  $K^+$  (ROSCHINA et al., 2001). Em *Macroptilium atropurpureum* submetido a estresse por calor, a aplicação exógena de Ach juntamente com  $K^+$  ou  $Ca^{2+}$  melhorou notavelmente a recuperação foliar após o processo de murcha (MOMONOKI et al., 1992), o que sugere que a Ach pode controlar o fluxo de íons ou hormônios regulando a abertura de canais iônicos em células (WESSLER et al., 2016), participando da regulação de canais iônicos e, conseqüentemente, da homeostase hídrica da planta (MOMONOKI et al., 1991, MAHDAVI et al., 2016). Em nossos resultados foi possível observar uma ação clara da Ach sobre a condutância estomática (Figura 17), promovendo uma maior abertura dos estômatos, mesmo em situação de estresse. Desta forma, essas plantas mantiveram sua absorção e transpiração de forma contínua, ocasionando um melhor desenvolvimento das plantas por meio da manutenção das taxas fotossintéticas que proporcionaram melhores parâmetros de crescimento de biomassa, aumentando assim a produção da planta (Tabela 14).

O ABA é sintetizado em resposta ao déficit hídrico, o qual desencadeia uma cascata de sinalização ativada por  $Ca^{2+}$  nas células de proteção que resulta no fechamento estomático (SCHROEDER et al., 2001; GONZALES-GUZMNA et al., 2002). No processo de sinalização do ABA, ocorre a ativação de moléculas de sinalização de lipídios, a fosfolipase D (PLD), que por sua vez produz ácido fosfatídico (PA), este irá ativar proteínas quinases da família MAPK, iniciando a cascata de sinalização promovendo a ativação de genes responsáveis pela biossíntese do ABA, a partir do composto intermediário xantoxina (Figura 4) (SEO; KOSHIBA, 2002; COLCOMBET, HIRT 2008). Porém o  $Ca^{2+}$  citosólico também responde ao sinal de Ach, pois este induz o aumento de  $Ca^{2+}$  em células guarda, sendo intermediado por mAChR (MENG et al., 2004). Na presença de Ach, a transdução do sinal é determinada por elementos estruturais do mAChR que permitem que ele se ligue seletivamente em Ach e a uma proteína G apropriada, que está envolvida na transdução de sinais celulares. Os receptores mAChR acoplados à proteína G estimulam a sinalização de moléculas de lipídios por meio da ativação da fosfolipase C (PLC), que hidrolisa a ligação glicerofosfato produzindo diacilglicerol (DAG),

resultando na liberação de mensageiros secundários, inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), CAM, regulando assim o fluxo de Ca<sup>2+</sup> intracelular, regulando processos fisiológicos como abertura estomática, não havendo ativação de genes da via do ABA (WANG et al., 2003).

Em razão de que a enzima codificada pelo gene *GmABA2* catalisa a conversão de xantoxina em aldeído abscísico, sendo o último convertido em ABA, a expressão do gene *GmABA2* também pode ser usada como indicativo para estudos de respostas à seca em soja. Nossos dados do nível transcricional do gene *GmABA2* mostraram que sua transcrição foi maior em folhas das plantas controle submetida ao déficit hídrico quando comparados com as que tiveram a aplicação de AG (Figura 23). A maior expressão de *GmABA2* em plantas sem suplementação de bioreguladores que estavam sob potencial da água de -1,0 MPa, provavelmente, está relacionada com a diminuição da condutância estomática, sendo que nas plantas com aplicação de AG, mesmo sob déficit hídrico, foi observada uma menor expressão de *GmABA2* (Figura 23), o que resultou em maiores valores de condutância estomática (Tabela 12). Possivelmente à aplicação exógena de Ach interferiu na via de biossíntese de ABA, resultando em uma diminuição dos níveis de expressão de *GmABA2* e, em consequência, menores níveis do conteúdo de ABA nas células.

Desta forma, a diferença do nível transcricional de *GmABA2* na ausência e na presença de Ach em plantas de soja sob déficit hídrico (Figura 23) sugere que, no presente trabalho, a Ach desempenhou um papel na regulação da sinalização, diminuindo a sinalização e ativação de genes responsáveis pela biossíntese de ABA.

Além disso, as proteínas LEA são acumuladas em tecidos vegetais expostas a deficiência hídrica, estresse osmótico e baixa temperatura em soja (BIES-ETHEVE et al., 2008; HUNDERTMARK et al., 2008; AMARA et al., 2014) e, desta forma, podem indicar o nível de estresse presente nas plantas tratadas e não tratadas com AG. Houve pouca mudança no número de transcritos do gene *GmLEA3* para os tratamentos com a aplicação de ambos bioreguladores (AG) nas sementes e folhas (*SF*) e apenas nas folhas (*F*), diferentemente do tratamento controle, sem aplicação de AG, o qual apresentou uma super-expressão sob condição de deficiência hídrica (Figura 23). Assim, os resultados

obtidos com a análise do nível transcricional dos genes *GmABA2* e *GmLEA3* confirmam que as plantas que foram tratadas com aplicação exógena dos bioreguladores em sementes e folhas (AGSF) e em folhas (AGF) apresentaram maior capacidade de tolerância ao déficit hídrico.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de GABA e Ach, de forma isolada e/ou combinada, nas sementes e em folhas no estágio V4, induziram modificações tanto na fisiologia como na morfologia de plantas de soja. Foi possível observar que aplicação destes bioreguladores promoveu uma melhora do desempenho das plantas de soja sob déficit hídrico, sendo que o melhor tratamento foi a aplicação simultânea de 2,0 mM de GABA e Ach, na semente e folhas (AG-SF). Essas substâncias atuaram diretamente na Pn, Gs, E e EUA, alterando as respostas fisiológicas da soja ao déficit hídrico e promovendo o aumento da abertura estomática, permitindo a absorção de CO<sub>2</sub> e a manutenção das taxas fotossintéticas, o que foi determinante para a maior tolerância às condições de baixa disponibilidade hídrica, como pode ser observado pelo acúmulo de massa seca, aumento do número de sementes/planta e massa de sementes.

As análises transcricionais mostraram que plantas do tratamento AG apresentaram uma menor expressão dos genes *ABA2*, *P5CS1* e *LEA3*, indicando um menor efeito do estresse osmótico. Em parte, esse aumento de tolerância pode ter sido promovido por estes bioreguladores que induziram um aumento do sistema de defesa contra espécies reativas de oxigênio por meio do aumento da atividade de enzimas antioxidantes SOD, CAT, e APX.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, sugerimos que aplicação exógena combinada dos bioreguladores GABA e Ach atuaram de forma sinérgica nas plantas de soja cv. Intacta, promovendo uma maior tolerância aos efeitos deletérios causados em plantas sob condições de déficit hídrico, além de promover um maior crescimento em geral, independentemente das condições ambientais testadas. Isso indica o potencial uso desses bioreguladores para a agricultura.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AKIHIRO, T., KOIKE, S., TANI, R., TOMINAGA, T. S., WATANABE, T., IJIMA, Y., AOKI, K., SHIBATA, D., ASHIHARA, H., MATSUKURA, C., AKAMA, K., FUJIMURA, T., EZURA, H. Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato. *Plant Cell Physiol*, v.49, p.1378–1389, 2008.

AKYNCI, S. & LÖSEL, D. M. Plant Water-Stress Response Mechanisms. In: Rahman, I. M. M. and Hasegawa, H. *Water Stress*, InTech, Croatia, p. 15-42, 2012.

ALI, M. M., ASHRAFUZZAMAN, M., ISMAIL, M. R., SHAHIDULLAH, S. M., PRODHAN, A. K. M. A. Influence of foliar applied GABA on growth and yield contributing characters of white gourd (*Benincasa hispida*). *International Journal of Agriculture and Biology*, v.12, n.3, p.373-376, 2010.

ALI, F., BANO, A., FAZAL, A. Recent methods of drought stress tolerance in plants. *Plant Growth Regulation*, v.82, p.363-375, 2017.

ALIA, M.P., MATYSIK, J. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*, v. 21, p. 191–203, 2001.

AMARA, I., ZAIDI, I., MASMOUDI, K., LUDEVID, M.D., PAGÈS, M., GODAY, A., BRINI, F. Insights into Late Embryogenesis Abundant (LEA) Proteins in Plants: From Structure to the Functions. *American Journal of Plant Sciences*, v. 5, p. 3440-3455, 2014.

ATKIN, O. K.; MACHEREL, D., The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany*, Oxford, v. 103, n. 4, p. 581-597. 2009.

ÁVILA, M.R., LUCCA, A., BRACCINI, E., SCAPIM, C.A., FAGLIARI, J.R., SANTOS, J.L. *Revista Brasileira de Sementes*. v. 29, n. 1, p.98-106, 2007.

BALUŠKA, F., VOLKMANN, D. AND MENZEL, D. Plant synapses: actin-based domains for cell-to-cell communication. *Trends in plant science*, v.10, n.3, p.106-111, 2005.

BAMEL, K., GUPTA, S.C., GUPTA, R. Acetylcholine causes rooting in leaf explants of in vitro raised tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller) seedlings. *Life Science*. v.80, p.2393-2396, 2007.

BAMEL, K., GUPTA, R. AND GUPTA, S.C. Acetylcholine suppresses shoot formation and callusing in leaf explants of in vitro raised seedlings of tomato, *Lycopersicon esculentum* Miller var. Pusa Ruby. *Plant signaling & behavior*, v.11, n.6, p.1187355, 2016.

BARTELS, D.; SUNKARS, R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science*, v.24, p. 23–58, 2005.

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

BEALE, S.I., GOUGH, S.P., GRANICK, S. Biosynthesis of alpha-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 2719–2723, 1975.

BENINCASA, M. M. P. *Análise de crescimento de plantas*. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 2003.

BIES-ETHEVE, N., GAUBIER-COMELLA, P., DEBURES, A., LASSERRE, E., JOBET, E., RAYNAL, M., COOKE, R. AND DELSENY, M. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, v.67, n.1-2, p.107-124, 2008.

BITA, C.E., GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in plant science*, v. 4, 2013.

BLUSZTAJN, J.K., LISCOVITCH, M., RICHARDSON, U.I., WURTMAN, R.J. Phosphatidylcholine as a precursor of choline for acetylcholine synthesis. In: DAWDALL, M.J., HAWTHORNE, J.N. (Ed). *Cellular and molecular basis of cholinergic function*.p.341-346, 1987

BOUCHÉ, N., FROMM, H. GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci*. v.9, n.3, p. 110–115, 2004.

BOYER, J.S. *Plant Productivity and Environment*. *Science*, v. 218,p. 443-448, 1982.

BRAY, E.A. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant, cell & environment*, v. 25, p. 153-161, 2002.

BOOZ, M. R.; PESCADOR, R. Efeito do Ácido g-aminobutírico (GABA) na Embriogênese Somática de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, n. S2, p. 198-200, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.

BOURSIAC, Y., LÉLAN, S., CORRATGÉ-FAILLIE, C., GOJON, A., KROUK, G. AND LACOMBE, B. ABA transport and transporters. *Trends in plant science*, v.18, n.6, p.325-333, 2013.

CADERAS, D., MUSTER, M., VOGLER, H., MANDEL, T., ROSE, J.K.C., MCQUENN-MASON, S., KUHLEMEIER, C. Limited correlation between expansin

gene expression and elongation growth rate. *Plant Physiology*, v.123, p.1399–1414, 2000.

CÂMARA, G. M. Preparo do solo e plantio. In. SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. (Org.). *Soja do plantio à colheita*. Viçosa: Editora UFV, 2015.

CATUCHI, T.A., GUIDORIZZI, F.V.C., GUIDORIZI, K.A., DE MORAES BARBOSA, A. AND SOUZA, G.M. Respostas fisiológicas de cultivares de soja à adubação potássica sob diferentes regimes hídricos. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.47, n.4, p.519-527, 2012.

CHAKRABORTY, U., TONGDEN, C. Evaluation of heat acclimation and salicylic acid treatments as potent inducers of thermotolerance in *Cicer arietinum* L. *Curr. Sci. Bangalore*, v.89, p.84,2005.

CHAVES, M. M., FLEXAS, J., PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. v. 103, p. 551–560, 2009.

CHO, E.K., HONG, C.B. Over-expression of tobacco NtHSP70 contributes to drought-stress tolerance in plants. *Plant Cell Re*, v.25, n.4, p.349–358, 2006.

ÇELİK Ö, ATAK Ç. Evaluation of Proline Accumulation and  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate Synthetase (P5CS) Gene Expression during Salinity Stress in Two Soybean (*Glycine max* L. Merr.) Varieties. *Polish Journal of Environmental Studies*, v.1, n.21, p.3, 2012.

COUSSON, A., VAVASSEUR, A. Putative involvement of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and GTP binding proteins in cyclic-GMP-mediated induction of stomatal opening by auxin in *Commelina communis* L., *Planta*, v.206, p.308–314, 1998.

COLCOMBET, J., HIRT, H. Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal*, v.413, n.2, p.217-226, 2008.

DANELUZZI, G.S. Uma abordagem neurofisiológica de acetilcolina em plantas de milho hidratadas e sob condições de estresse hídrico. *Dissertação (Mestrado em Ciências: Fisiologia e Bioquímica das Plantas) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2012.*

DELEU, C., FAES, P., NIGRET, M.F., BOUCHEREAU, A. Effects of the inhibitor of the  $\alpha$ -aminobutyrate-transaminase, vinyl-gaminobutyrate, on development and nitrogen metabolism in *Brassica napus* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. n. 64, p.60-69, 2013.

DE RONDE, J.A., VAN DER MESCHT, A., STEYN, H.S.F. Proline accumulation in response to drought and heat stress in cotton. *Afr Crop Sci J*, v.8, p. 85–92, 2000.

DE RONDE, J. A., W. A. CRESS, G. H. J. KRÜGER, R. J. STRASSER, AND J. VAN STADEN. "Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an

Arabidopsis P5CR gene, during heat and drought stress." *Journal of plant physiology* , v.161, n. 11, p.1211-1224, 2004.

DE ZELICOURT, A., COLCOMBET, J. AND HIRT, H. The role of MAPK modules and ABA during abiotic stress signaling. *Trends in plant science*, v.21, n.8, p.677-685, 2016.

DI-SANSEBASTIANO, G.P., FORNACIARI, S., BAROZZI, F., PIRO, G., ARRU, L. .New insights on plant cell elongation: A role for acetylcholine. *International journal of molecular sciences*, v. 15, p. 4565-4582, 2014.

DING, J., YANG, T., FENG, H., DONG, M., SLAVIN, M., XIONG, S. AND ZHAO, S. Enhancing contents of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and other micronutrients in dehulled rice during germination under normoxic and hypoxic conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.64, n.5, p.1094-1102, 2016.

DO VALE , N. K.A. TRAJETÓRIA DA PRODUTIVIDADE DA SOJA EM FUNÇÃO DA VARIABILIDADE DAS CHUVAS NO ESTADO DE GOIÁS. Dissertação (Mestrado em Agronegócio) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

EMMELIN, N., FELDBERG, W.The mechanism of the sting of the common nettle(*Urticaurens*). *The Journal of Physiology*.v.106, n.4, p. 440-455, 1947.

EVANS, M.L. Promotion of cell elongation in *Avena* coleoptiles by acetylcholine. *Plant Physiology*.v.50, n.3, p. 414-416, 1972.

EWINS, A.J. Acetylcholine, a new active principle of ergot. *The Biochemical Journal*. v.8, n.1,p.44-49, 1914.

FAES, P., NIOGRET, M.F., MONTES, E., CAHÉREC, F.L., BOUCHEREAU, A., DELEU, C. Transcriptional profiling of genes encoding GABA-transaminases in *Brassica napus* reveals their regulation by water deficit. *Environ. Exp. Bot.* v,116, p. 20–31, 2015.

FAIT, A., YELLIN, A., FROMM, H. GABA and GHB neurotransmitters in plants and animals.In *Communication in plants*.Edited by F. Bakuska, S. Mancuso, and D. Volkmann. Springer-Verlag, Berlin. p.170–185, 2006.

FAIT, A., FROMM, H., WALTER, D., GALILI, G., FERNIE, A. R. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in plant science*, v.13, n.1, p.14-19, 2008.

FANG, Y., XIONG, F. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell. Mol. Life Science*, v. 72, p.673–689, 2015.

FUJITA, Y., FUJITA, M., SHINOZAKI, K. AND YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of plant research*, v.124, n.4, p.509-525, 2011.

GEORGE, K.J.,MALIK, N., KUMAR, I.P.V., KRISHNAMURTHY, K.S. Gene expression analysis in drought tolerant and susceptible black pepper (*Piper nigrum* L.) in response to water deficit stress. *Acta Physiology Plantae.*, v.39, p.104, 2017.

GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K. Superoxide Dismutases II. PURIFICATION AND QUANTITATIVE RELATIONSHIP WITH WATER-SOLUBLE PROTEIN IN SEEDLINGS". *Plant Physiologu*, n.59, p.315-318, 1977.

GILL, S.S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, v, 48, p.909–930. 2010.

GILL, S.S., ANJUM, N.A., GILL, R., YADAV, S., HASANUZZAMAN, M., FUJITA, M., MISHRA, P., SABAT, S.C., TUTEJA, N. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environ Sci Pollut Res*, v. 22, p.10375–10394, 2015.

GILLE, G., SINGLER, K. Oxidative stress in living cells. *Folia Microbiol.* v.2, p.131-152, 1995.

GONZALEZ-GUZMÁN, M., APOSTOLOVA, N., BELLÉS, J.M., BARRERO, J.M., PIQUERAS, P., PONCE, M.R., MICOL, J.L., SERRANO, R. AND RODRÍGUEZ, P.L.The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *The Plant Cell*, v.14, n.8, p.1833-1846, 2002.

GRASSI, G., MAGNANI, F. STOMATAL, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, Cell and Environment.* v. 28, p. 834–849, 2005.

GUO, Y.; YANG, R.; CHEN, H.; SONG, Y.; GU, Z. Accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid in germinated soybean (*Glycine max* L.) in relation to glutamate decarboxylase and diamine oxidase activity induced by additives under hypoxia. *European Food Research and Technology*, v. 234, n. 4, p. 679-687, 2012.

HAND, S.C., MENZE, M.A., TONER, M., BOSWELL, L.; MOORE, D. LEA Proteins during Water Stress: Not Just for Plants Anymore. *Annual Review of Physiology*, v. 73, p. 115-134, 2011.

HANDA, S., HANDA, A.K., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A .Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiol.* V. 80, p.938-945, 1986.

HARTMANN, E., KILBINGER,H. Gas-liquid chromatographic determination of light-dependent acetylcholine concentration in moss callus. *The biochemical Journal.* V.137, n.2,p.249-252, 1974.

HASANUZZAMAN, M., HOSSAIN, M.A., DA SILVA, J.A., FUJITA, M. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In *Crop stress and its management: Perspectives and strategies.* Springer Netherlands. p. 261-315, 2012.

HAWORTH, M., COSENTINO, S.L., MARINO, G., BRUNETTI, C., SCORDIA, D., TESTA, G., RIGGI, E., AVOLA, G., LORETO, F., CENTRITTO, M. Physiological responses of *Arundo donax* ecotypes to drought: a common garden study. *GCB Bioenergy*, 2016b.

HORIUCHI, Y., KIMURA, R., KATO, N., FUJII, T., SEKI, M., ENDO, T., KATO, T. AND KAWASHIMA, K. Evolutional study on acetylcholine expression. *Life sciences*, v.72, n.15, p.1745-1756, 2003.

HORIUCHI, Y., KIMURA, R., KATO, N., FUJII, T., SEKI, M., ENDO, T., KATO, T., KOTAKIS, C., THEODOROPOULOU, E., TASSIS, K., OUSTAMANOLAKIS, C., NIKOLAOS, E.I., KOTZABASIS, K. Putrescine, a fast-acting switch for tolerance against osmotic stress. *Journal of Plant Physiology*. v. 171, p. 48-51, 2013.

HONG, Z., LAKKINENI, K., ZHANG, Z., VERMA, D.P.S. Removal of feedback inhibition of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol*, v.122, p.1129-1136, 2000.

HONG, Y., ZHANG, W., WANG, X. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant Cell Environment*, v.33, n.4, p.627–635, 2010.

HONG, Y., ZHAO, J., GUO, L., KIM, S.C., DENG, X., WANG, G., ZHANG, G., LI, M., WANG, X. Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. *Progress in lipid research*, v.30, n.62, p.55-74, 2016.

HOSY, E., VAVASSEUR, A., MOULINE, K., DREYER, I., GAYMARD, F., PORE'E, F., BOUCHEREZ, J., LEBAUDY, A., BOUCHEZ, D., VE'RY, A-A. The Arabidopsis outward K channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci*. v. 100, p.5549–5554, 2003

HUNDERTMARK, M. AND HINCHA, D.K. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics*, v.9, n.1, p.118, 2008.

INGRAM, J., BARTELS, D. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 47, p. 377-403, 1996.

ISLAM, M. O., RAHIM, M. A., PRODHAN, A. K. M. A. Flowering pattern, floral abscission and yield attributes in soybean influenced by GABA. *Bangladesh Agril. Univ*, v.8, n.1, p. 29–33, 2010.

INMAN-BAMBER, N. G., BONNET, G.D., SPILLMAN, M.F., HEWITT, M.L., JACKSON, J. Increasing sucrose accumulation in sugarcane by manipulating leaf extension and photosynthesis with irrigation. *Australian Journal of Agricultural & Resource Economics*, n. 59, p. 13–26, 2008.

JIA, W., ZHANG, J. Stomatal movements and long-distance signaling in plants. *Plant signaling & behavior*, v. 3, n.10, p.772-777, 2008.

KATHIRESAN, A., MIRANDA, J., CHINNAPPA, C.C., Reid, D.M.  $\gamma$ -Aminobutyric acid promotes growth elongation in *Stellaria longipes*: the role of ethylene. *Plant Growth Regul*, v. 26, p.131–137, 1998.

KIDO, E.A., FERREIRA NETO, J.R.C., SILVA, R.L.O., BELARMINO, L.C., BEZERRA NETO, J.P., SOARES-CAVALCANTI, N.M.S., PANDOLFI, V., SILVA, M.D., NEPOMUCENO, A.L., ISEPPON, A.M.B. Expression dynamics and genome distribution of osmoprotectants in soybean: identifying important components to face abiotic stress. *BMC Bioinformatics*, 2013

KOSHIBA, T., MATSUYAMA, H. An in vitro system of indole-3-acetic acid formation from tryptophan in maize (*Zea mays*) coleoptile extracts. *Plant Physiology*, v. 102, n. 4, p. 1319-1324, 1993.

KOSTIR, J. KLENHA, J. JIRACEK, V. O efeito da acetilcolina na germinação de sementes de plantas agrícolas. *Rostlinna Výroba*. v,12, p. 1239-1279, 1965.

KISHOR, K.P.B., ZONGLIE, H., MIAO, G.H., HU, C.A., VERMA, D.P.S. Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol*, v.108, p.1387–1394, 1995.

KRISHNAN, S., LASKOWSKI, K., SHUKLA, V., MEREWITZ, E.B. Mitigation of Drought Stress Damage by Exogenous Application of a Non-Protein Amino Acid  $\gamma$ -Aminobutyric Acid on Perennial Ryegrass. *J. AMER. SOC. HORT. SCI*, v.138, n.5, p.358–366. 2013.

KURCHII, B.A. Acetylcholine and ethylene: do they share similar receptors and biological action. *Ukrainica Bioorganica Acta*. v.7, n.1,p.36-44, 2009.

KUBALA, S., WOJTYLA, L., QUINET, M., LECHOWSKA, K., LUTTS, S., GARNICZARSKA, M.: Enhanced expression of the proline synthesis gene P5CSA in relation to seed osmopriming improvement of *Brassica napus* germination under salinity stress. - *J. Plant Physiol*. V.183, p. 1-12, 2015

KUMAR, K., MADHURI, K., MURUGAN, V., SAKTHIVEL, K., ANANTHARAJ, A., SINGH, A.K., ROY, S.D. Growth enhancement in vegetable crops by multifunctional resident plant growth promoting rhizobacteria under tropical Island Ecosystem. *Afr. J. Microbiol. Res*. v.8, p.2436-2448, 2014.

LENG, Q., HUA, B., GUO, Y., LOU, C. Regulating role of acetylcholine and its antagonists in inward rectified  $K^+$  channels from guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Science in China*.v.43, n.2, p. 217-224, 2000.

LI, R.H., GUO, P.G., MICHAEL, B., STEFANIA, G., SALVATORE, C. Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agric Sci China*, v.5,p. 751–757, 2006.

LI, Z., YU, J., PENG, Y., HUANG, B. Metabolic pathways regulated by abscisic acid, salicylic acid and  $\gamma$ -aminobutyric acid in association with improved drought tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Physiologia Plantarum*. 2016.

Li, Y., Fan, Y., Ma, Y., Zhang, Z., Yue, H., Wang, L., Jiao, Y. Effects of exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) on photosynthesis and antioxidant system in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings under low light stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, v.36, n.2, p.436-449, 2017.

LIANG, J., ZHOU, M., ZHOU, X., JIN, Y., XU, M., LIN, J. J, CLEA, a Novel LEA-Like Protein from *Jatropha curcas*, Confers a High Level of Tolerance to Dehydration and Salinity in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, v. 8, p. 83056, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LIU, C., ZHAO, L., YU, G. The Dominant Glutamic Acid Metabolic Flux to Produce  $\gamma$ -Amino Butyric Acid over Proline in *Nicotiana glauca* Leaves under Water Stress Relates to its Significant Role in Antioxidant Activity. *Journal of Integrative Plant Biology*. v.53, n.8. p. 608–618, 2011.

LIU, H.R., SUN, G.W., DONG, L.J., YANG, L.Q., YU, S.N., ZHANG, S.L., LIU, J.F. Physiological and molecular responses to drought and salinity in soybean, *BIOLOGIA PLANTARUM*, v.61, n.3, p. 557-564, 2017

LOU, C.H. Integrated action in plant irritability. In: Kung SD, Yang SF, eds. *Discoveries in Plant Biology*. Singapore: World Scientific. v.2, p327-347, 1998.

LUCHI, S., KOBAYASHI, M., TAJI, T., NARAMOTO, M., SEKI, M., KATO, T., TABATA, S., KAKUBARI, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AND SHINOZAKI, K. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, v.27, n.4, p.325-333, 2001.

LUDEWIG, F., HUSER, A., FROMM, H., BEAUCLAIR, L., BOUCHÉ, N. Mutants of GABA Transaminase (POP2) Suppress the Severe Phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase (ssadh) Mutants in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2008.

LUTTS, S., MAJERUS, V., KINET, J.M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiol Plant*. v.105, p.450-458, 1999.

MA, Y. I., SZOSTKIEWICZ, A., KORTE, D., MOES, Y., YANG, A. Christmann, Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors, *Science*, v.324, p. 1064-1068, 2009.

MADHAVAN, S., SARATHA, G., LEE, B.H., PEGDEN, R.S. Guard cell protoplasts contain acetylcholinesterase activity. *Plant Science*. v.109, n.2, p. 119-127, 1995.

MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Cropping Science*. v.2, p. 176-7, 1962.

MAHDAVI, V., GHANATI, F. AND GHASSEMPOUR, A. Integrated pathway-based and network-based analysis of GC-MS rice metabolomics data under diazinon stress to infer affected biological pathways. *Analytical biochemistry*, v.494, p.31-36, 2016.

MAHMUD, J.A.L., HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., RAHMAN, A., HOSSAIN, S., FUJITA, M.  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) confers chromium stress tolerance in *Brassica juncea* L. by modulating the antioxidant defense and glyoxalase systems. *Ecotoxicology*, v.26, p.675–690, 2017.

MALEKZADEH, P., KHARA, J., HEYDARI, R. Alleviating effects of exogenous gamma-aminobutyric acid on tomato seedling under chilling stress. *Physiol Mol Biol Plants*, v. 20, n.1, p.133–137, 2014.

MANAVALAN, L.P, GUTTIKONDA, S.K., TRAN, L.S.P., NGUYEN, H.T. Physiological and Molecular Approaches to Improve Drought Resistance in Soybean. *Plant Cell Physiology* , v 50, 2009.

MARIN, E., NUSSAUME, L., QUESADA, A., GONNEAU, M., SOTTA, B., HUGUENEY, P., FREY, A., MARION-POLL, A. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J*, v.15, p.2331–2342, 1996.

MAZZEI, P., VINALE, F., WOO, S.L., PASCALE, A., LORITO, M. AND PICCOLO, A. Metabolomics by H-<sup>1</sup>H-RMAS-NMR of tomato plants treated with two secondary metabolites isolated from *Trichoderma*. *J. Agric. Food Chem*, 2016.

MENESES, C. H. S. G., LIMA L. H. G. M., LIMA M. M. A., VIDAL M. S. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibras*. v. 10, n. 1/2, p. 1039-1072, 2006.

MENG, F., LUI, X., ZHANG, S., LOU, C. Localization of muscarinic acetylcholine receptor in plant guard cells. *Chinese Science Bulletin*.v.46, n.7, p.590-591, 2001.

MENG, F., MIAO, L., ZHANG, S., LOU, C. Ca<sup>2+</sup> is involved in muscarin-Acetylcholine signal transduction in guard cells of *Vicia faba* L. *Chinese Science Bulletin*. v.49, n.5, p.471-475, 2004.

MILLER, G., SHULAEV, V., MITTER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plant* , v.133, p.481–489, 2008.

MIRET, J.A., BOSCH, S.M., DIJKWEL, P.P . ABA signalling manipulation suppresses senescence of a leafy vegetable stored at room temperature. *Plant Biotechnology Journal*, p. 1–15, 2017

- MIURA, G.A., SHIH, T.M. Cholinergic constituents in plants: Characterization and distribution of acetylcholine and choline. *Physiologia Plantarum*. V.61, n.3, p.417-421, 1984.
- MOMONOKI, Y.S., MOMONOKI, T. Changes in acetylcholine levels following leaf wilting and leaf recovery by heat stress in plant cultivars. *Japanese Journal of Crop Science*. v.60, n.2, p.283-290, 1991.
- MOMONOKI, Y.S. Occurrence of acetylcholine-hydrolyzing activity at the stele-cortex interface. *Plant physiology*, v.99, n.1, p.130-133. 1992.
- MUKHERJEE, I. The effect of acetylcholine on hypocotyl elongation in soybean. *Plant and Cell Physiology*. v.21, n.8, p.1657-1660, 1980.
- MURCH, S. J. Neurotransmitters, neuroregulators and neurotoxins in the life of plants. In Baluska, F.; Mancuso, S.; VOLKMANN, D. (Ed.) *Communication in plants: Neuronal aspects of plant life*, p. 137, 2006.
- MURATA, J., WATANABE, T., SUGAHARA, K., YAMAGAKI, T. AND TAKAHASHI, T. High-resolution mass spectrometry for detecting Acetylcholine in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior*, v.10, n.10, p.1074367, 2015.
- NAKAGAWA, J. Teste de Vigor baseados no desempenho das plântulas. In: Krzyzanowski FC; Vieira R D; França-Neto JB (Ed.) *Vigor de Sementes: Conceitos e Testes*. ABRATES, Londrina, p. 2-24, 1999.
- NANJO, T., KOBAYASHI, M., YOSHIBA, Y., SANADA, Y., WADA, K., TSUKAYA, H., KAKUBARI, H., YAMAGUSHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, v. 18, p.185-193, 1999.
- NAYYAR, H., KAUR, R., KAUR, S., SINGH, R. c-Aminobutyric Acid (GABA) Imparts Partial Protection from Heat Stress Injury to Rice Seedlings by Improving Leaf Turgor and Upregulating Osmoprotectants and Antioxidants. *Journal Plant Growth Regular*. 2013.
- NEUMAIER, N; NEPOMUCENO, A. L; FARIAS, J. R. B. Estresses de ordem ecofisiológica. In: Bonato, E. R. (ed. ). *Estresses em soja*. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, p.254, 2000.
- OH, S., SHIN, H., ARORA, R., KIM, K., KIM, D. Proline accumulation and related gene expression during spring regrowth in three rosaceae species. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, v.58, n.1, p.21-26, 2017.
- PALANIVELU, R., BRASS, L., EDLUND, A. F., & PREUSS, D. Pollen Tube Growth and Guidance Is Regulated by *POP2*, an *Arabidopsis* Gene that Controls GABA Levels. *Cell*. v.114, n.1, p.47-59, 2003.

- PANG, J., YANG, J., WARD P., SIDDIQUE K. H. M., LAMBERS, H., TIBBETT, M., RYAN, M. Contrasting responses to drought stress in herbaceous perennial legumes. *Plant Soil*. v. 348, p. 299-314, 2011.
- PANDA, S.K., CHAUDHARY, I., KHAN, M.H. Heavy metal induced lipid peroxidation and affects antioxidants in wheat leaves. *Biol. Plant* v.46, p. 289-294, 2003a.
- PANDA, S.K., SINHA, L.B., KHAN, M.H. Does aluminiumphytotoxicity induce oxidative stress in green gram (*Vigna radiate*). *Bulg. J. Plant Physiol.* v.29, p.77-86, 2003b.
- PARK, W.; SCHEFFLER, B.E.; BAUER, P.J.; CAMPBELL, B.T. Genome-wide identification of differentially expressed genes under water deficit stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biology*, p.12:90, 2012.
- PARSAEIMEHR, A., SOL, Z., DOU, X., CHEN, Y.F. Simultaneous improvement in production of microalgal biodiesel and high-value alpha-linolenic acid by a single regulator acetylcholine. *Biotechnology for Biofuels*, p.8- 11, 2015.
- PASALA, R. K., MINHAS, P. S., & WAKCHAURE, G. C. Plant Bioregulators: A Stress Mitigation Strategy for Resilient Agriculture. In *Abiotic Stress Management for Resilient Agriculture*. p. 235-259, 2017.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.11, n. 3, p. 137-143, 1999.
- PIMENTEL, C. A relação da planta com a água. *Seropédica: Edur*, p.191, 2004.
- PINHEIRO, C., CHAVES, M.M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data. *J Exp Bot* . v. 62, p. 869–882, 2011.
- POPINIGIS, F. *Fisiologia da semente*. Brasília: AGIPLAN, p. 289, 1985.
- RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, Amsterdam, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.
- RAPER, C. D; KRAMER, P. J. Stress physiology. In: Wilcox, J. R. (Ed.). *Soybeans: Improvement, production, and uses*. Madison, WI: American Society of Agronomy, p. 589-641, 1987.
- RATNAKUMAR, P., KHAN, M.I.R., MINHAS, P.S., PER, T.S., SULTANA, R., DEOKATE, P.P., KHAN, N.A., SINGH, Y., RANE, J. Can plant bio-regulators minimize the crop productivity losses caused by drought, heat stress and salinity? An integrated review. *J. Appl. Bot. Food Qual.* v.89, 2016.
- REDDY, A.R., CHAITANYA, K.V., VIVEKANANDAN, M. Droughtinduced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* , v.161, p.1189–1202, 2004.

REYNOLDS-HENNE, C. E., LANGENEGGER, A., MANI, J., SCHENK, N., ZUMSTEG, A., FELLER, U. Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes. *Environmental and Experimental Botany*, v.68, n.1, p. 37-43, 2010.

RIVAS-SAN VICENTE, M., PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* v.62, p.3321-3338, 2011.

ROESSING, A. C.; SANCHES, A. C.; MICHELLON, E.; As Perspectivas de Expansão da Soja. *Anais dos Congressos. XLIII Congresso da Sober em Ribeirão Preto.* 2005.

ROSCHINA, V.V. Biomediators in plants: acetylcholine and biogenic amines. Pushchino: Biological Center of USSR Academy of Science.p.192, 1991.

ROSCHINA, V.V. Neurotransmitters in plant life.Science Publishers Inc., Enfield, p.99-150, 2001.

ROSSDEUTSCH,R., EDWARDS, E., COOKSON, S.J., BARRIEU, F., GAMBETTA, G.A., DELROT, S., OLLAT, N. ABA-mediated responses to water deficit separate grapevine genotypes by their genetic background, *Plant Biology*, p.16:91, 2016.

ROTUNDO, R.L. Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction.*Journal of Neurocytology.* v.32, n.5.8,p.743-766, 2003.

SAEED, M. R.; KHEIR, A. M.; AL-SAYED, A. A. Supperssive effect of some amino acids against *Meloidogyne incognita* on soybeans. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ*, v. 30, n. 2, p. 1097-1103, 2005.

SAIRAM, R.K., TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr Sci-Bang.* v.86, n.3, p.407–421, 2004.

SANTOS, R.F., CARLESSO, R. Défcit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.2, p.287-294, 1998.

SATO, A., SATO, Y., FUKAO, Y., FUJIWARA, M., UMEZAWA, T., SHINOZAKI, K., HIBI, T., TANIGUCHI, M., MIYAKE, H., GOTO, D.B., UOZUMI, N. Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem. J.* v.424, p.439–448, 2009.

SCHROEDER, J.I., ALLEN, G.J., HUGOUVIEUX, V., KWAK, J.M. AND WANER, D. Guard cell signal transduction. *Annual review of plant biology*, v.52, n.1, p.627-658, 2001.

SCHWEIGHOFER, A., HIRT, H., MESKIENE, I . Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plants Science.* v. 9, n.5 p. 236-243,2004.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. Origem, evolução e importância econômica. In: SEDIYAMA, T. (Ed.). Tecnologias de produção e usos da soja. Londrina: Mecenias, 2009.

SEEVE, C.M.; CHO, I.J.; HEARNE, B.H; GYAN, P.S.; JOSHI, T.; SMITH, D.O.; SHARP, R.E.; MELVIN, J.O. Water-deficit-induced changes in transcription factor expression in maize seedlings. *Plant, Cell & Environment*, v. 40, n.5, p. 686-701, 2017.

SEKI, M., ISHIDA, J., NARUSAKA, M. Monitoring the expression pattern of ca. 7000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional and Integrative Genomics*, v.2, p. 282–291, 2002.

SEKI, M., UMEZAWA, T., URANO, K., SHINOZAKI, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 10, p. 296-302, 2007.

SEILER, C., HARSHAVARDHAN, V.T., RAJESH, K., REDDY, P.S, STRICHERT, M., ROLLETSCHEK, H., SCHOLZ, U., WOBUS, U., SREENIVASULU, N. ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *J Exp Bot.* n.62, p. 2615– 2632, 2011.

SEO, M., KOSHIBA, T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in plant science*, v.7, n.1, p.41-48, 2002.

SERRAJ, R., SHELP, B.J., SINCLAIR, T.R. Acúmulo de ácido  $\gamma$ -aminobutírico em soja noduladas em resposta ao estresse hídrico. *Physiologia Plantarum*. v.102, n.1, p.79-86, 1998.

SHAO, H.B, CHU, L.Y, JALEEL, C.A, MANIVANNAN, P, PANNEERSELVAM, R, SHAO, M.A . Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants-biotechnologically and sustainably improving agriculture and the eco-environment in arid regions of the globe. *Crit Rev Biotechnol*, v. 29, p.131–151, 2009.

SHELP, B.J. Regulation of  $\gamma$ -amino acid synthesis in situ by glutamate availability. *Physiology Plant*. v.106, n.4, p.363–369, 1999.

SHELP, B.J., ALLAN, W.L., FAURE, D. Role of  $\gamma$ -aminobutyrate and  $\beta$ -hydroxybutyrate in plant communication. In *Plant-environment interactions, signaling and communication in plants*. Edited by F. Baluska. Springer-Verlag, Berlin. p. 73–84, 2009.

SHELP, B. J.; MULLEN, R. T.; WALLER, J. C. Compartmentation of GABA metabolism raises intriguing questions. *Trends in plant science*, v. 17, n. 2, p. 57-59, 2012.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, v.6, n.5, p.410-417, 2003.

SHINOZAKI, K.Y.; SHINOZAKI, K. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses, *Annual Reviews*, v.1, p. 781-803, 2006.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI, S. K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal Experimental of Botany*, v.58, p.221–227, 2007.

SHI, S.Q., SHI, Z., JIANG, Z.P., QI, L.W., SUN, X.M., LI, C.X., LIU, J.F., XIAO, W.F., ZHANG, S.G. Effects of exogenous GABA on gene expression of Caraganaintermediaroots under NaCl stress: regulatory roles for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethylene production. *Plant, Cell and Environment*.v.33, p.149–162, 2010.

SIGNORELLI, S., DANS, P.D., COITIÑO, E.L., BORSANI, O., MONZA, J. Connecting proline and gamma-aminobutyric acid in stressed plants through non-enzymatic reactions. *PlosOne*, v. 10, p.115349, 2015.

SINGH, R., PARIHAR, P., SINGH, S., MISHRA, R.K., SINGH, V.P., PRASAD, S.M. Reactive oxygen species signaling and stomatal movement: Current updates and future perspectives. *Redox Biology*, v. 11, p. 213–218, 2017.

SILVA-ORTEGA, C.O., OCHOA-ALFARO, A.E., REYES-AGUERO., J.A., AGUADO-SANTA CRUZ, G.A., JIMENEZ-BREMONT., J.F. Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiology and Biochemistry* , v.46, p.82–92, 2008.

SILVA, A.C., LIMA, E.P.C., BATISTA, H.R.A Importância da soja para o agronegócio brasileiro: Uma análise sob o enfoque da produção, emprego e exportação. *Apec,Unesc*. 2011.

SILVENTE, S., SOBOLEV, A.P., LARA, M. Metabolite Adjustments in Drought Tolerant and Sensitive Soybean Genotypes in Response to Water Stress. *Plo Sone*, v. 7, n. 6, p. e38554, 2012.

SMIRNOFF, N., CUMBES, Q.J . Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. V.28, p.1057-1060, 1989.

SONG, H., XU, X., WANG, H., WANG, H., TAO, Y. Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid alleviates oxidative damage caused by aluminium and proton stresses on barley seedlings. *Journal Science Food Agriculture*.v.90, p. 1410–1416, 2010.

SONG, Y.J., DIAO, Q.N., QI, H.Y. Putrescine enhances chilling tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through modulating antioxidant systems. *Acta Physiol Plant*, v.36, p.3013–3027, 2014.

SORRENTINO, G., HAWORTH, M., WAHBI, S., MAHMOOD, T., ZUOMIN, S., CENTRITTO, M. Abscisic acid induces rapid reductions in mesophyll conductance to carbon dioxide. *PLoS One* 11: e0148554, 2016.

SOUZA, G.M., CATUCHI, T.A., BERTOLLI, S.C., SORATTO, R.P. Soybean Under Water Deficit: Physiological and Yield Responses. 2013.

SOUZA, G.M. et al. Soybean under water deficit: physiological and yield responses. In: A comprehensive survey of international soybean research- genetics, physiology, agronomy and nitrogen relationships. 1. ed. Rijeka, Croatia: In Tech Open Access Publisher, p. 273- 298, 2012.

SRIVASTAVA, A.K., RATNAKUMAR, P., MINHAS, P.S., SUPRASANNA, P. Plant bioregulators for sustainable agriculture; integrating redox signaling as a possible unifying mechanism. *Adv. Agron.* v.137, 2016.

STOLF, R. Identificação e Análise da Expressão de Genes Relacionados com Tolerância à Seca em Soja Através de Microarranjos de DNA e PCR em Tempo Real. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2007.

SUGIYAMA, K.I., TEZUKA, T. Acetylcholine promotes the emergence and elongation of lateral roots of *Raphanussativus*. *Plant Signaling & Behavior*.v.6, n.10, p.1545-1553, 2011.

SULIEMAN, S. Does GABA increase the efficiency of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in legumes?. *Plant signaling & behavior*, v. 6, n. 1, p. 32-36, 2011.

SWANSON, R., EDLUND, A.F., PREUSS, D. Species specificity in pollen-pistil interactions. *Annu Rev Genet*.v.38, p.793-818, 2004.

SZABADOS, L., SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci*, v. 15, p.89-97, 2010.

TAKAHASHI, Y., TSUNEO, S., ABE, T. Accumulation of gamma-aminobutyrate (GABA) caused by heat-drying and expression of related genes in immature vegetable soybean (edamame). *Breeding Science*. v.63, n.2. 2013.

TARDIEU, F., DAVIES, W.J. Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. 1992.

TATTINI, M., REMORINI, D., PINELLI, P., AGATI, G., SARACINI, E., TRAVERSI, M.L. AND MASSAI, R. Morpho-anatomical, physiological and biochemical adjustments in response to root zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*. *New Phytologist*, v.170, n.4, p.779-794, 2006.

TAVARES, L.C., RUFINO, C.A., BRUNES, A.P., TUNES, L.M., BARROS, A.C.S.A., PESKE, S.T. Desempenho de sementes de soja sob deficiência hídrica: rendimento e qualidade fisiológica da geração F1. *Ciência Rural*, v.43, n.8, p.1357-1363, 2013.

TESTERINK, C., MUNNIK, T. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal Experimental Botany*, v.79, p.11–14, 2011.

TERRA, T.G.R., LEAL, T.C.A.B., BORÉM, A., RANGEL, P.H.N. Tolerância de linhagens de arroz de terras altas à seca. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. v. 43, n. 2, p. 201-208, 2013.

TRETYN, A., SLESÁK, E., ANDERSZ, A. Interaction of light and the cholinergic system in the process of seed germination. In: *LIGHT AND HORMONAL INTERACTIONS OF PLANTS SYMPOSIUM, 1985*, Berlin. Abstracts... Berlin: Humboldt University, p. 93-94, 1985.

TRETYN, A., KOPCEWICZ, J. AND ŚLESÁK, E. Interaction of light and the cholinergic system in the regulation of seed germination. *Biologia plantarum*, v.30, n.5, p.338-342, 1988.

TRIPATHI, P., RABARA, R.C., REESE, R.N., MILLER, M.A., ROHILA, J.S., SUBRAMANIAN, S., SHEN, Q.J., MORANDI, D., BUCHING, H., SHULAEV, V., RUSHTON, P.J. A toolbox of genes, proteins, metabolites and promoters for improving drought tolerance in soybean includes the metabolite coumestrol and stomatal development genes. *BMC Genomics*, p.17:102, 2016.

TODAKA, D., ZHAO, Y., YOSHIDA, T., KUDO, M., KIDOKORO, S., MIZOI, J., KODAIRA, K.S., TAKEBAYASHI, Y., MIKIKO, K., SAKAKIBARA, H., TOYOOKA, K., SATO, M., FERNIE, A.R., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions. *The Plant Journal*, v. 90, p. 61–78, 2017.

UENO, S., KATAYAMA, T., WATANABE, T., NAKAJIMA, K., HAYASHI, M., SHIGEMATSU, T., FUJII, T. Bioconversion of glutamic acid to gamma-aminobutyric acid in soybean by high pressure with precursor feeding. *Procedia Food Science*. n. 1 p. 842 – 846, 2011.

UNTERGASSER, A., NIJVEEN, H., RAO, X., BISSELING, T., GEURTS, R., LEUNISSE, J.A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 35, p. 71-74, 2007

UMEZAWA, T., YOSHIDA, R., MARUYAMA, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AND SHINOZAKI, K. SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, n.49, p.17306-17311, 2004.

UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 17, p. 113–122, 2006.

UMEZAWA, T., SUGIYAMA N., MIZOGUCHI, M., HAYASHI, S., MYOUGA, F., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., ISHIHAMA, Y., HIRAYAMA, T., SHINOZAKI, K. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. V. 106, n. 41, p. 17588-17593, 2009.

UMEZAWA, T., NAKASHIMA, K., MIYAKAWA, T., KUROMORI, T., TANOKURA, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. Plant Cell Physiology, v.11, p.1821-1839, 2010.

VENDRUSCOLO, E.C.G., SCHUSTER, I., PILEGGI, M., SCAPIM, C.A., MOLINARI, H.B.C., MARUR, C.J., VIEIRA, L.G.E. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. Journal of plant physiology, v. 164, n.10, p.1367-1376, 2007.

VERBRUGGEN, N., HERMANS, C.: Proline accumulation in plants: a review. - Amino Acids 35: 753-759, 2008.

VIEIRA, F.C.F., SANTOS JUNIOR, C.D., NOGUEIRA, A.P.O., DIAS, A.C.C., HAMAWAKI, O .T., BONETTI, A.M. Aspectos fisiológicos e bioquímicos de cultivares de soja submetidos a déficit hídrico induzido por Peg 6000. Bioscience Journal. v. 29, n. 2, p. 543-552, 2013.

VIJAYAKUMARI, K., PUTHUR, J. T.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) priming enhances the osmotic stress tolerance in *Piper nigrum* Linn. plants subjected to PEG-induced stress. Plant Growth Regulation, v.78, n.1, p. 57-67, 2016.

VLOT, A.C., DEMPSEY, D.M.A., KLESSIG, D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. Ann. Rev. Phytopathol. v.47, p.177-206, 2009.

VON WETTSTEIN, D., GOUGH, S., KANNANGARA, C.G. Chlorophyll biosynthesis. Plant Cell v.7, p.1039, 1995.

WANG, H., WANG, X., LOU, C. Relationship between acetylcholine and stomatal movement in *Vicia faba*. Acta Botanica Sinica. v. 41, n.2, p. 171-175, 1999.

WANG, H., WANG, X., ZHANG, S., LOU, C. Muscarinic acetylcholine receptor is involved in acetylcholine regulating stomatal movement. Chinese Science Bulletin. v.45, n.3, p. 250-252, 2000.

WANG, H., ZHANG, S., WANG, X., LOU, C. Involvement of  $Ca^{2+}$ -CaM in the signal transduction of acetylcholine-regulating stomatal movement. Chinese Science Bulletin. v.48, n.4, p.351-354, 2003. KAWASHIMA, K. Evolutional study on acetylcholine expression. Life Sciences. v.72, n.15, p. 1745-1756, 2003.

WAKCHAURE, G. C., MINHAS, P. S., RATNAKUMAR, P., CHOUDHARY, R. L. Optimising supplemental irrigation for wheat (*Triticum aestivum* L.) and the impact of plant bio-regulators in a semi-arid region of Deccan Plateau in India. Agricultural Water Management, v.172, p.9-17, 2016.

WESSLER, I., KILBINGER, H., BITTINGER, F. AND KIRKPATRICK, C.J. The non-neuronal cholinergic system. *The Japanese Journal of Pharmacology*, v.85, n.1, p.2–10, 2001.

WESSLER, I.K. AND KIRKPATRICK, C.J. Detection of Non-neuronal Acetylcholine. *Muscarinic Receptor: From Structure to Animal Models*, p.205-220, 2016.

WOJTASZEK, P. *Neurotransmitters in plant life*, Roschina, V.V.; Ed.; Science publishers inc.: New Hampshire, 2001.

XIA, Q. P., GAO, H. B., LI, J. R. Effects of gamma-aminobutyric acid on the photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters of muskmelon seedlings under hypoxia stress. *Chin. J. Appl. Ecol*, v.4, p. 999–1006, 2011.

XIONG, L., SCHUMAKER, K.S., ZHU, J.K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell Online*, v. 14, n.1, p.165–183, 2002.

XU, X.D, LOU, C.H. Presence of roots—A prerequisite for normal function of stomata on sweet potato leaves. *J Peking Agriculture University*.v.1, p.37-45, 1980.

XU, J., HU, Q.P. Changes in  $\gamma$ -aminobutyric acid content and related enzyme activities in Jindou 25 soybean (*Glycine max L.*) seeds during germination. *LWT - Food Science and Technology*. v.55, n.1, p.341-346, 2013.

YAMAMOTO, K., SAKAMOTO, H., MOMONOKI, Y. S. Maize acetylcholinesterase is a positive regulator of heat tolerance in plants. *Journal of plant physiology*, v. 168, n. 16, p. 1987-1992, 2011.

YAMAMOTO, K., MOMONOKI, Y. S. Tissue localization of maize acetylcholinesterase associated with heat tolerance in plants. *Plant signaling & behavior*, v. 7, n. 3, p. 301-305, 2012.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Organization of cisacting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*, v.10, p. 88–94, 2005.

YAMAZAKI, D., YOSHIDA, S., ASAMI, T., KUCHITSU, K. Visualization of abscisic acid-perception sites on the plasma membrane of stomatal guard cells. *Plant J*, v.35, p.129–139, 2003.

YANG, A., CAO, S., YANG, Z., CAI, Y. & ZHENG, Y.  $\gamma$ -Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and activates the defence response of peach fruit. *Food Chem*. v.129, p.1619–1622, 2011.

YIN, Y.; YANG R.; GU Z. Calcium regulating growth and GABA metabolism pathways in germinating soybean (*Glycine max L.*) under NaCl stress. *European Food Research and Technology*, p. 1-8, 2014.

ZHANG, Z., QUICK, M.K., KANELAKIS, K.C., GIJZEN, M., KRISHNA, P. Characterization of a plant homolog of hop, a cochaperone of hsp90. *Plant Physiology*, v. 131, n.2, p.525–535, 2003.

ZHU, B., SU, J., CHANG, M., VERMA, D.P.S., FAN, Y.L., WU, R. Overexpression of a  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci*, v.139, p. 41–48, 1998.

## ANEXOS

### ANEXO A

Tabela 2. Resultados do ensaio 1 do experimento 1: *combinações das diferentes concentrações de GABA (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob controle e -1,0 MPa induzidas com manitol*. Parâmetros avaliados: porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5dia), porcentagem de germinação de raiz ao 8dia (%GPR8dia), número de plântulas normais fortes (NPFT), número de plântulas normais fracas (PNFR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT), relação entre raiz e parte aérea (R/PA).

Osmótico (MPa) VAR-DOSE	CONTROLE (0,0)				MANITOL (-1,0)			
	0	0,5	1	2	0	0,5	1	2
%G	72,50 Aa	75,00 Aa	70,50 Aa	70,00 Aa	39,50 Bb	52,50 Ba	53,00 Ba	49,00 Bab
IVG	5,22 Aa	5,25 Aa	5,58 Aa	5,25 Aa	2,7 Bb	3,89 Ba	3,79 Ba	3,58 Ba
%GPR5dias	60,50 Aa	63,00 Aa	66,50 Aa	52,50 Aa	37,00 Ba	47,50 Ba	50,50 Ba	52,50 Ba
%GPR8dias	82,50 Aa	77,50 Aa	84,00 Aa	85,00 Aa	56,00 Ba	61,50 Ba	63,50 Ba	63,00 Ba
PNFT	25,00 Aa	24,50 Aa	26,75 Aa	26,25 Aa	9,00 Bb	14,25 Ba	17,00Ba	15,50 Ba
PNFR	11,25 Aa	12,25 Aa	10,75 Aa	9,00 Aa	10,75 Aa	10,75 Aa	9,25 Aa	8,75 Aa
CPA	11,71Aa	8,08Ab	6,87Ab	7,38Ab	1,22Bb	6,32Aa	5,12Aa	5,25Aa
CR	8,72Aab	10,83Aa	5,71Ab	8,83Aab	2,86Ba	7,04Ba	6,12Aa	4,66Ba
CT	20,44Aa	18,92Aab	12,59Ab	15,76Aab	4,09Bb	13,36Ba	11,25Aa	9,91Bab
MSPA	0,010Aa	0,015Aa	0,012Aa	0,013Aa	0,008Ab	0,020Aa	0,013Aab	0,015Aab
MSR	0,012Aa	0,011Aa	0,009Aa	0,009Aa	0,002Bb	0,008Aa	0,006Aa	0,005Bab
MST	0,023Aa	0,027Aa	0,021Aa	0,023Aa	0,010Ab	0,029Aa	0,027Aa	0,020Aab
RPA	1,32Aa	0,79Ab	0,80Ab	0,81Ab	0,38Ba	0,46Ba	0,51Aa	0,56Aa

Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença estatística com  $p < 0,05$  pelo teste de comparação de médias de Tukey.

ANEXO B

Tabela 3. Resultados do ensaio 2 do experimento 1: *combinações das diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob controle e -1,0 MPa induzidas com manitol*. Parâmetros avaliados: porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5dia), porcentagem de germinação de raiz ao 8dia (%GPR8dia), número de plântulas normais fortes (NPFT), número de plântulas normais fracas (PNFR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT), relação entre raiz e parte aérea (R/PA).

Osmótico (MPa) Ach (mM)	Controle (0,0)				Manitol (-1,0)			
	0	0,5	1	2	0	0,5	1	2
%GPN	72,50Aa	61,00Aab	64,50Aab	49,50Ab	39,50Bb	57,00Aa	51,00Bab	59,99Aa
IVG (d)	5,22Aa	4,27Aab	4,41Aab	3,45Ab	2,77Bb	3,72Aab	3,75Aab	3,93Aa
%GPR5dia	60,50Aa	53,50Aab	46,00Aab	42,00Ab	37,00Ba	36,50Ba	46,50Aa	41,50Aa
%GPR8dia	82,50Aa	79,00Aab	78,00Aab	68,00Ab	56,00Bb	70,50Aa	69,50Aab	69,00Aab
PNFT	25,00Aa	21,50Aab	22,25Aab	18,50Ab	9,00Bb	20,75Aa	15,75Ba	20,50Aa
PNFR	11,25Aa	9,00Aa	10,00Aa	6,25Aa	10,75Aa	7,75Aa	9,75Aa	9,00Aa
CPA	11,71Aa	7,85Ab	9,68Aab	8,87Aab	1,22Bb	5,60Aa	4,26Bab	5,47Ba
CR	8,72Ac	14,56Aab	10,60Abc	18,58Aa	2,86Ba	6,88Ba	6,12Ba	4,20Ba
CT	20,44Ab	22,41Aab	20,29Ab	27,45Aa	4,09Bb	12,49Ba	10,40Bab	9,68Bab
MSPA	0,010Ab	0,033Aab	0,042Aa	0,040Aab	0,008Ac	0,040Aa	0,012Bbc	0,025Bb
MSR	0,012Ab	0,022Aa	0,027Aa	0,020Aab	0,002Bb	0,022Aa	0,020Ba	0,017Aa
MST	0,023Ab	0,054Aa	0,070Aa	0,061Aa	0,010Ac	0,062Aa	0,033Bb	0,045Bab
R/PA	1,32Aa	0,62Ab	0,63Bb	0,59Ab	0,38Bb	0,58Ab	1,79Aa	0,70Ab

Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença estatística com  $p < 0,05$  pelo teste de comparação de médias de Tukey.

ANEXO C

Tabela 4. Combinações das doses de GABA a 0,5 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontencial osmótico de 0MPa, e -1,0MPa induzido por manitol (M1) comparados ao tratamento Controle o qual foi utilizado água destilada. *Parâmetros avaliados: porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5), porcentagem de germinação de raiz ao 8 dia (%GPR8), número de plântulas normais fortes (NPFT), número de plântulas normais fracas (PNFR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT), relação entre raiz e parte aérea (R/PA).*

**CONTROLE (0MPa)**

Tratamentos/Variáveis	%G	IVG	%GPR5	%GPR8	NPFT	PNFR	CPA	CR	CT	MSPA	MSR	MST	RPA
AG0,5 (mM)Var/Dose													
Controle	72,5	5,22	60,5	82,5	25	11,25	11,71	8,72	20,44	0,01	0,012	0,023	1,32
G0,5 A0,5	68,5	5,14	59	72	22,25	12	8,78 *	16,13 *	24,91 *	0,034*	0,015	0,050 *	0,49*
G0,5 A1,0	47,50 *	3,20*	36,00 *	57,00 *	14,50*	10,25	7,82*	10,26	18,08	0,024*	0,012	0,036*	0,76*
G0,5 A2,0	60,5	4,41	49,50 *	69,5	24,5	5,75*	10,47	16,32 *	26,79 *	0,029*	0,021*	0,051 *	0,85*
G0,5 A0,5M1	55*	3,95*	41*	63	18,25*	9,25	5,12*	4,57*	9,69*	0,016	0,008	0,024*	0,59*
G0,5 A1,0M1	67*	4,56*	47*	75	22	11,5	5,07*	6,58	11,66*	0,016	0,01	0,026*	0,69*
G0,5 A2,0M1	50,5*	3,75	48*	62,5	15,75*	9,5	6,4*	9,58	15,99*	0,026*	0,018*	0,044*	0,75*

Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem do tratamento Controle (0MPa ) pelo teste de Dunnett; \* Significativo a 5%

## ANEXO D

Tabela 5. Combinações das doses de GABA a 0,5 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontencial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Manitol a -1,0MPa. *Parâmetros avaliados: porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5), porcentagem de germinação de raiz ao 8 dia (%GPR8), número de plântulas normais fortes (NPFT), número de plântulas normais fracas (PNFR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT), relação entre raiz e parte aérea (R/PA)*

<b>MANITOL (-1,0 MPa)</b>													
Tratamentos/Variáveis	%G	IVG	%GPR5	%GPR8	NPFT	PNFR	CR	CPA	CT	MSPA	MSR	MST	RPA
<i>AG0,5 (mM)Var/Dose</i>													
M1	39,5	2,77	37,0	56,0	9	10,75	1,22	2,86	4,09	0,008	0,002	0,01	0,38
G0,5 A0,5	68,5*	5,14*	59,0*	72,0*	22,25*	12	8,78 *	16,13 *	24,91 *	0,034*	0,015*	0,050 *	0,49
G0,5 A1,0	47,5	3,2	36,0	57,0	14,5	10,25	7,82*	10,26*	18,08*	0,024*	0,012*	0,036*	0,76
G0,5 A2,0	60,5*	4,41*	49,5	69,5	24,5*	5,75*	10,47*	16,32 *	26,79 *	0,029*	0,021*	0,051 *	0,85*
G0,5 A0,5M1	55*	3,95*	41,0	63,0	18,25*	9,25	5,12*	4,57	9,69*	0,016*	0,008*	0,024*	0,59
G0,5 A1,0M1	67*	4,56*	47,0	75,0*	22*	11,5	5,07*	6,58	11,66*	0,016*	0,01*	0,026*	0,69
G0,5 A2,0M1	50,5	3,75	48,0	62,5	15,75*	9,5	6,4*	9,58*	15,99*	0,026*	0,018*	0,044*	0,75

Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem do tratamento Controle (0MPa ) pelo teste de Dunnett; \* Significativo a 5%

## ANEXO E

Tabela 6. Combinações das doses de GABA a 1,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontencial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Controle a 0MPa. *Parâmetros avaliados: porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5), porcentagem de germinação de raiz ao 8 dia (%GPR8), número de plântulas normais fortes (NPFT), número de plântulas normais fracas (PNFR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT), relação entre raiz e parte aérea (R/PA).*

<b>CONTROLE (0MPa)</b>													
<b>Tratamentos/Variáveis</b>	<b>%G</b>	<b>IVG</b>	<b>%GPR5dias</b>	<b>%GPR8dias</b>	<b>PNFT</b>	<b>PNFR</b>	<b>CPA</b>	<b>CR</b>	<b>CT</b>	<b>MSPA</b>	<b>MSR</b>	<b>MST</b>	<b>RPA</b>
<b>AG0,5 (mM)Var/Dose</b>													
Controle	72,5	5,22	60,5	82,5	25	11,25	11,71	8,72	20,44	0,01	0,012	0,023	1,32
G1 A0,5	54*	3,89*	47,5*	62,5*	19,75	7,25	13,51	9,15	22,67	0,015*	0,027*	0,043	0,58*
G1 A1,0	67,5	5,04	60	74	21,5	12,25	13,13	9,27	22,4	0,014*	0,035*	0,05	0,44*
G1 A2,0	68,5	4,85	58,5	73	18,5	15,75*	15,1*	8,66	23,76	0,021*	0,031*	0,52*	0,68*
G1A0,5M1	71,5	4,81	44*	77	26,5	9,25	5,58	5,03	10,62*	0,009	0,016	0,025	0,67*
G1A1M1	57*	4,27*	45,5*	66,5*	17,5*	11	5,09	4,51	9,60*	0,01	0,020*	0,03	0,52*
G1A2M1	58,5*	4,37	46,5*	64*	10,5*	18,75*	8,6	4,3	12,91*	0,007*	0,016	0,023	0,53*

Tratamentos que diferem significativamente do tratamento Controle (0MPa ) indicado por (\*) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

ANEXO F

Tabela 7. Combinações das doses de GABA a 1,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontencial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Manitol a -1,0MPa. *Parâmetros avaliados: porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5), porcentagem de germinação de raiz ao 8 dia (%GPR8), número de plântulas normais fortes (NPFT), número de plântulas normais fracas (PNFR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT), relação entre raiz e parte aérea (R/PA)*

MANITOL (-1,0 MPa)													
Tratamentos/Variáveis	%G	IVG	%GPR5dias	%GPR8dias	PNFT	PNFR	CR	CPA	CT	MSPA	MSR	MST	RPA
<b>AG0,5 (mM)Var/Dose</b>													
M1	39,5	2,77	37	56	9	10,75	1,22	2,86	4,09	0,008	0,002	0,01	0,38
G1 A0,5	54*	3,89*	47,5*	62,5	19,75*	7,25	13,51*	9,15*	22,67*	0,015*	0,027*	0,043	0,58
G1 A1,0	67,5*	5,04*	60*	74*	21,5*	12,25	13,13*	9,27*	22,4*	0,014*	0,035*	0,05	0,44
G1 A2,0	68,5*	4,85*	58,5*	73*	18,5*	15,75*	15,1*	8,66*	23,76*	0,021*	0,031*	0,52*	0,68*
G1A0,5M1	71,5*	4,81	44*	77*	26,5*	9,25	5,58*	5,03*	10,62*	0,009	0,016*	0,025	0,67*
G1A1M1	57*	4,27*	45,5	66,5	17,5*	11	5,09*	4,51*	9,60*	0,01	0,020*	0,03	0,52
G1A2M1	58,5*	4,37*	46,5	64	10,5	18,75*	8,6*	4,3*	12,91*	0,007	0,016*	0,023	0,53

Tratamentos que diferem significativamente do tratamento Controle (0MPa ) indicado por (\*) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

## ANEXO G

Tabela 8. Combinações das doses de GABA a 2,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontencial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Controle a 0MPa. *Parâmetros avaliados: porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5), porcentagem de germinação de raiz ao 8 dia (%GPR8), número de plântulas normais fortes (NPFT), número de plântulas normais fracas (PNFR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT), relação entre raiz e parte aérea (R/PA).*

<b>CONTROLE (0MPa)</b>													
<b>Tratamentos/Variáveis</b>	<b>%G</b>	<b>IVG</b>	<b>%GPR5dias</b>	<b>%GPR8dias</b>	<b>PNFT</b>	<b>PNFR</b>	<b>CR</b>	<b>CPA</b>	<b>CT</b>	<b>MSPA</b>	<b>MSR</b>	<b>MST</b>	<b>RPA</b>
<b>AG0,5 (mM)Var/Dose</b>													
Controle	72,5	5,22	60,5	82,5	25	11,25	8,72	11,71	20,44	0,01	0,012	0,023	1,32
G2 A0,5	55,5*	4,29*	52,5*	65*	18,25*	9,75	14,33*	7,57*	21,91	0,028*	0,023	0,045*	0,6*
G2 A1,0	60,5*	4,66*	58	72,5*	21,5	8,75	12,52*	8,88*	21,41	0,032*	0,016	0,048*	0,52*
G2 A2,0	62,5*	4,93*	60	78,5	16,5*	14,75	10,13	8,09*	18,23	0,030*	0,015	0,046*	0,55*
G2A0,5M1	55*	4,14*	50,5*	63,5*	18,5*	8,75	9,13	4,3*	13,43*	0,016*	0,008	0,024	0,55*
G2A1M1	71*	5,7*	68,5*	83,5	16,75*	18,75*	4,82*	3,08*	7,9*	0,013	0,008	0,021	0,66*
G2A2M1	75	5,79*	68,5*	86	23,75	13,75	7,03	4,21*	11,25*	0,015	0,011	0,027	0,84*

Tratamentos que diferem significativamente do tratamento Controle (0MPa ) indicado por (\*) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

## ANEXO H

Tabela 9. Combinações das doses de GABA a 2,0 mM com as diferentes concentrações de Ach (0,5, 1,0 e 2,0 mM) sob pontencial osmótico de 0MPa,e -1,0MPa (M1) comparados ao tratamento Manitol a -1,0MPa. *Parâmetros avaliados: porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de protusão de raiz ao 5 dia (%GPR5), porcentagem de germinação de raiz ao 8 dia (%GPR8), número de plântulas normais fortes (NPFT), número de plântulas normais fracas (PNFR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT), relação entre raiz e parte aérea (R/PA).*

<b>MANITOL (-1, 0 MPa)</b>													
<b>Tratamentos/Variáveis</b>	<b>%G</b>	<b>IVG</b>	<b>%GPR5dias</b>	<b>%GPR8dias</b>	<b>PNFT</b>	<b>PNFR</b>	<b>CPA</b>	<b>CR</b>	<b>CT</b>	<b>MSPA</b>	<b>MSR</b>	<b>MST</b>	<b>RPA</b>
<b>AG0,5 (mM)Var/Dose</b>													
M1	39,5	2,77	37	56	9	10,75	2,86	1,22	4,09	0,008	0,002	0,01	0,38
G2 A0,5	55,5*	4,29*	52,5*	65*	18,25*	9,75	14,33*	7,57*	21,91*	0,028*	0,023*	0,045*	0,6
G2 A1,0	60,5*	4,66*	58,0*	72,5*	21,5	8,75	12,52*	8,88*	21,41*	0,032*	0,016*	0,048*	0,52
G2 A2,0	62,5*	4,93*	60,0*	78,5*	16,5*	14,75*	10,13*	8,09*	18,23*	0,030*	0,015*	0,046*	0,55
G2A0,5M1	55*	4,14*	50,5*	63,5*	18,5*	8,75	9,13*	4,3*	13,43*	0,016*	0,008	0,024*	0,55
G2A1M1	71*	5,7*	68,5*	83,5*	16,75*	18,75*	4,82	3,08	7,9*	0,013*	0,008	0,021*	0,66*
G2A2M1	75	5,79*	68,5*	86*	23,75	13,75	7,03*	4,21*	11,25*	0,015*	0,011*	0,027*	0,84*

Tratamentos que diferem significativamente do tratamento Controle (0MPa ) indicado por (\*) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

