



**LISSA VASCONCELLOS VILAS BOAS**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE  
GENÓTIPOS DE SOJA SUBMETIDOS AO  
ESTRESSE SALINO**

**LAVRAS - MG**

**2016**

**LISSA VASCONCELLOS VILAS BOAS**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE GENÓTIPOS DE SOJA  
SUBMETIDOS AO ESTRESSE SALINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Comportamento Fisiológico Vegetal sob Estresses Ambientais, para a obtenção do Título de Mestre.

Prof. Dr. Jose Donizeti Alves  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Vilas Boas, Lissa Vasconcellos.

Caracterização fisiológica de genótipos de soja submetidos ao estresse salino / Lissa Vasconcellos Vilas Boas. – Lavras : UFLA, 2016.

67 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador: Jose Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. Salinidade. 2. Glycine max. 3. Estresse. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título..

**LISSA VASCONCELLOS VILAS BOAS**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE GENÓTIPOS DE SOJA  
SUBMETIDOS AO ESTRESSE SALINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Comportamento Fisiológico Vegetal sob Estresses Ambientais, para a obtenção do Título de Mestre.

APROVADA em 08 de abril de 2016.

Prof. Dr. Jose Donizeti Alves	UFLA
Profa. Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart	UNILAVRAS
Prof. Dr. Adriano Teodoro Bruzi	UFLA

Prof. Dr. Jose Donizeti Alves  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2016**

Aos meus pais Rogério e Sônia...

**DEDICO**

Aos meus irmãos Lucas e Otávio...

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus por me iluminar e me dar proteção.

À minha família pelo amor, amizade companheirismo e incentivo, imprescindíveis para a concretização deste sonho.

Ao CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, à UFLA, pela oportunidade de estudo e ao Setor de Fisiologia Vegetal, pelo crescimento profissional e pessoal.

Ao orientador, Prof. Dr. José Donizeti Alves, pela confiança, apoio e orientação.

Aos integrantes do laboratório, sempre dispostos a ensinar, ajudar e contribuir: Kamila, Dayane, Cinthia e aos estagiários.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Aos amigos Margot, Lígia, Flávia, Jacqueline, Aline e Thaís, sempre positivos, tornando os momentos difíceis em alegres, leves e engraçados.

## RESUMO

A salinidade, cada vez mais presente nos solos agricultáveis, afeta a produtividade dos vegetais. No entanto, existem espécies mais tolerantes do que outras e é necessário o estudo dos mecanismos de resposta à salinidade a fim de elucidar quais as respostas estão correlacionadas com a tolerância à salinidade. Dessa forma, objetivou-se caracterizar, fisiologicamente, dois genótipos de *Glycine max* L. com relação ao estresse salino e identificar quais variáveis estão mais correlacionadas à tolerância à salinidade. Para isso, plantas das cultivares AS 3730 e M 8372 foram submetidas a três concentrações salinas (0, 50 e 100 mM) e foram realizadas coletas aos 0, 8 e 16 dias. Foram realizadas análises de crescimento, metabolismo antioxidante enzimático e não enzimático, fotossíntese, além do teor de clorofila a e b, carotenoides, açúcares solúveis totais, açúcares redutores, proteínas e prolina. Como resultados, foi obtido que a cultivar M 8372 possui maior crescimento, maior atividade das enzimas antioxidantes e maior teor de compostos antioxidantes como o ascorbato e carotenoides, quando comparada com a cultivar AS 3730. Além disso, a cultivar M 8372, também, obteve menores níveis de peroxidação lipídica. No entanto a cultivar AS 3730 obteve maiores teores de prolina, um osmoprotetor e menor comprometimento do crescimento quando comparada ao seu controle. Pode-se concluir que existe resposta diferencial das cultivares à salinidade.

**Palavras-chave:** Salinidade. *Glycine max*. Estresse.

## ABSTRACT

Salinity, ever present in agricultural soils, affects plant productivity. However, there are species more tolerant than others, and the study of response mechanisms to salinity is necessary in order to elucidate which responses are correlated with tolerance to salinity. Thus, we aimed at physiologically characterizing two *Glycine max* L. genotypes concerning saline stress, and identify which variables are more correlated with tolerance to salinity. For this, plants of cultivars AS 3730 and M 8372 were submitted to three saline concentrations (0, 50 and 100 mM), having sampled 0, 8 and 16 days. We conducted analysis for growth, enzymatic and non-enzymatic antioxidant metabolism, photosynthesis beyond the content of chlorophyll a and b, carotenoids, total soluble sugars, reducing sugars, proteins and proline. A results, cultivar M 8372 presented better growth, higher antioxidant enzyme activity and higher content of antioxidants such as ascorbate and carotenoids, when compared to cultivar AS 3730. In addition, cultivar M 8372 also presented lower levels of lipid peroxidation. However, cultivar AS 3730 obtained higher contents of proline, an osmoprotector and lower growth compromise when compared to its control. In conclusion, there is a differential response of the cultivars to salinity.

**Keywords:** Salinity. *Glycine max*. Stress.



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Características gerais .....	11
2.2	Mecanismos de defesa .....	12
2.3	Espécies reativas de oxigênio (EROs) .....	14
2.4	Respostas fisiológicas.....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	Condução do experimento .....	19
3.2	Trocas gasosas .....	21
3.3	Avaliações de crescimento .....	21
3.4	Avaliações bioquímicas .....	21
3.4.1	Enzimas do metabolismo antioxidante .....	22
3.4.1.1	Dismutase do superóxido (SOD).....	22
3.4.1.2	Catalase (CAT).....	23
3.4.1.3	Peroxidase do ascorbato (APX) .....	23
3.4.2	Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	23
3.4.3	Peroxidação lipídica.....	24
3.4.4	Ascorbato .....	24
3.4.5	Clorofilas e carotenoides.....	25
3.4.6	Carboidratos.....	25
3.4.7	Prolina.....	25
3.4.8	Quantificação de Sódio.....	26
3.5	Índice de tolerância.....	26
3.6	Análise estatística .....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXO A - TABELAS.....	65

## 1 INTRODUÇÃO

Estresses abióticos como a seca, baixas temperaturas, metais pesados e a salinidade estão entre os aspectos que mais afetam a produtividade das culturas (CHOUDHURY et al., 2013). Dentre esses, a salinidade é a principal contribuinte para que ocorra um decréscimo na produtividade (LIMA, 1998). Aproximadamente, 400 milhões de hectares (Mha) da área das terras do mundo é afetada pela salinidade, atingindo mais de 10% das terras aráveis, o que resulta em uma redução de mais de 50% nos rendimentos médios das principais culturas (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION, 2008; IQBAL et al., 2014; WANG et al., 2009).

Desse modo, diversas espécies têm sido objeto de estudo a fim de esclarecer os vários fatores que podem levar uma cultura a ser mais tolerante à salinidade do que outras. Estudos têm revelado que a prolina, a glicina betaína, os polifenóis e os antioxidantes não enzimáticos estão entre os compostos chave para que uma cultura tolere a salinidade (BOSE; RODRIGO-MORENO; SHABALA, 2013; IQBAL et al., 2014). A prolina, por exemplo, está comprometida com a síntese de proteínas necessárias que controlam as respostas ao estresse como a síntese de enzimas antioxidantes (HOQUE et al., 2007).

A salinidade induz a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais desencadeiam a peroxidação lipídica, danos ao DNA e à inibição da fotossíntese. O aumento da produção de EROs, em razão do estresse provocado no vegetal, pode ser removido por meio do sistema antioxidante enzimático e não enzimático. O sistema antioxidante enzimático é composto por enzimas como a dismutase do superóxido, a catalase e a peroxidase do ascorbato, dentre outras. E o sistema antioxidante não enzimático, compostos como o ascorbato e carotenoides. Nesse ponto, culturas tolerantes diferem das culturas não tolerantes, no qual a primeira irá remover as EROs com efetividade

não ocasionando tantas perdas em produção (BOSE; RODRIGO-MORENO; SHABALA, 2013; GUPTA; HUANG, 2014; JI et al., 2015).

O comportamento de diferentes espécies agrícolas como *Triticum spp.* L. (SAIRAM et al., 2005), *Ananas comosus* L. (MENDES et al., 2011) e *Glycine max* L. (LU et al., 2009) tem sido alvo de estudo sob estresse salino, uma vez que esse ambiente é cada vez mais presente nos solos agrícolas (CARVALHO et al., 2012). Estudos que correlacionam o comportamento e a tolerância das plantas frente à salinidade têm sido realizados, no entanto são inexistentes os estudos que abordam a fisiologia de diferentes genótipos de soja brasileiros frente à salinidade.

Novas fronteiras agrícolas surgem no país nos estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia (MATOPIBA). Em decorrência da expansão das fronteiras agrícolas no país, faz-se necessária a utilização de cultivares mais adaptadas às condições de salinidade, principalmente, porque é nessas regiões que está a maior parte dos solos salinos ou com probabilidade de salinização como o estado da Bahia. Diante do exposto, objetiva-se com o presente estudo caracterizar, fisiologicamente, dois genótipos de *Glycine max* L. com relação ao estresse salino e identificar quais variáveis estão mais relacionadas à tolerância à salinidade.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Características gerais**

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, superado apenas pelos Estados Unidos. Na safra 2015/2016, ocorreu um aumento de 3,6% da área cultivada com a soja comparada à safra anterior, atingindo uma produção estimada de, aproximadamente, 100 milhões de toneladas em fevereiro de 2016, sendo a cultura da soja a responsável por 48% da produção total de grãos no Brasil. No nordeste brasileiro, a maior área cultivada está no estado da Bahia, o qual obteve um aumento de 6,9% em relação a 2015. O estado com maior produção no Brasil é o Mato Grosso (27 milhões de toneladas) seguido do Paraná (18 milhões de toneladas) (COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2016).

O cultivo de soja é a principal atividade responsável pela expansão da fronteira agrícola no país, principalmente, em regiões de cerrado no nordeste brasileiro (PETTER et al., 2014), com destaque para a Bahia (CONAB, 2016). No entanto, é interessante ressaltar que as áreas de maior expansão do cultivo da soja coincidem com as regiões de maior ocorrência de solos salinos (CONAB, 2016; GONÇALVES, 1982).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION, 2002), dos 250 milhões de hectares da área de agricultura irrigada no mundo, 50% têm problema de salinização do solo. Dessa forma, a implantação da cultura da soja, em novas áreas de cultivo, requer tecnologias recentes e manejo adequado devido à existência de condições edafoclimáticas específicas em cada região (PETTER et al., 2014).

A salinização do solo, fenômeno crescente em todo o mundo, ocorre, principalmente, em regiões áridas e semiáridas (HORNEY et al., 2005). Nessas

regiões, há pouca ocorrência de chuvas, deficiências naturais de drenagem (DIAS et al., 2007), uso inadequado da água salina para irrigação (HORNEY et al., 2005) e a dosagem de fertilizantes acima da requerida pela planta (PETTER et al., 2014). Esses fatores, aliados à presença de altas temperaturas, favorecem a alta evaporação da água do solo (DIAS et al., 2007). Consequentemente, é inevitável o acúmulo gradual de sais, uma vez que, com a falta de chuvas, não há lixiviação dos mesmos (GABRIEL et al., 2012).

A fim de categorizar as plantas que vivem em locais com diferentes graus de salinidade e plantas que não suportam tal estresse, elas são classificadas de duas maneiras quanto à tolerância à salinidade. São consideradas glicófitas ou não halófitas aquelas que não suportam a salinidade e não completam seu ciclo de vida, ou seja, morrem em concentrações próximas a 40 mM de cloreto de sódio. Por outro lado, são consideradas halófitas aquelas que suportam a salinidade em torno de 200 mM de cloreto de sódio ou mais, completando o seu ciclo de vida, ou seja, são aquelas que conseguem reproduzir (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005).

A soja é considerada uma espécie glicófita, no entanto, alguns estudos recentes com transgênicos já têm introduzido a classificação de halófita para *Glycine max* (GUPTA; HUANG, 2014; HIMABINDU et al., 2016; KAO et al., 2006; KHAN et al., 2013; LEE et al., 2004). Em um estudo realizado com soja, foi observado que todos os genótipos avaliados acumularam mais sódio nas folhas do que em caules e raízes. Esse acúmulo de sódio, na parte aérea das plantas, pode ser relacionado com a maior tolerância de espécies vegetais à salinidade (KHAN et al., 2013).

## **2.2 Mecanismos de defesa**

O excesso de sais no solo pode afetar as plantas de duas maneiras. Inicialmente, a alta concentração de sais reduz o potencial hídrico do solo,

reduzindo ou até mesmo impedindo a absorção de água pela planta, uma vez que se faz necessário um gradiente de potencial hídrico para que ocorra a absorção de água (PRISCO; GOMES FILHO, 2010). Posteriormente, ocorre o estresse iônico causado pela toxicidade dos íons cloro e sódio absorvidos pela planta (LÄUCHLI; GRATTAN, 2007; MUNNS, 2002; PRISCO; GOMES FILHO, 2010).

Em seguida, ocorre nos vegetais a alteração na atividade enzimática, condutância estomática e distúrbio na permeabilidade da membrana, causada pela interferência dos sais nos processos fisiológicos, reduzindo o crescimento e o desenvolvimento do vegetal (MUNNS, 2002; NAVARRO et al., 2003; VERSLUES et al., 2006). Altos níveis de cloreto de sódio no solo interferem na capacidade das plantas em absorver água (MUNNS, 2002), reduzindo a taxa de expansão celular e o grau de abertura estomática. Com o fechamento estomático, os níveis do  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  elevam-se, tornando-se tóxicos à planta. Dessa forma, a maquinaria fotossintética é prejudicada, provocando alterações na taxa fotossintética líquida (A), concentração subestomática de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), condutância estomática (gs) e transpiração (E) (TAVAKKOLI et al., 2011).

A limitação da fixação de  $\text{CO}_2$ , no ciclo de Calvin, em plantas sob tais condições, diminui a oxidação do NADPH, induzindo a geração de radicais superóxido (DABROWSKA et al., 2007). Isso ocorre porque há a transferência do elétron da ferredoxina reduzida para o  $\text{O}_2$  e não para o  $\text{NADP}^+$  (AHMAD; SARWAT; SHARMA, 2008). Dessa forma, entre os efeitos da salinidade sobre as plantas está a restrição na assimilação do  $\text{CO}_2$  e queda no teor de clorofila (SILVA et al., 2010) resultando, frequentemente, na redução do crescimento da planta (MUNNS et al., 2002; WILLADINO et al., 2011). Cultivares tolerantes de soja possuem menor comprometimento do crescimento quando comparadas a cultivares sensíveis à salinidade. Essa redução de produção de massa seca é mais

pronunciada à medida que ocorre incremento nos níveis de sal na solução (HAKEEN et al., 2012).

A redução nos teores de clorofila pode ser associada a uma maior aclimatação ao estresse salino, uma vez que há redução na captação de energia luminosa e, conseqüentemente, menor fluxo de elétrons da cadeia de transporte de elétrons. Isso ocorre, porque uma cadeia de transporte de elétrons altamente reduzida favorece a redução parcial do oxigênio, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e maior degradação de clorofila (BROSCHÉ et al., 2010; WILLADINO et al., 2011). A salinidade pode influenciar, também, o *quenching* fotoquímico (*qp*) e o *quenching* não fotoquímico (*qn*). A redução no *quenching* fotoquímico ocorre em virtude da super-redução da quinona A (QA), o aceptor primário do PSII, levando à saturação do transporte de elétrons na fotossíntese e à redução na assimilação de carbono (LU et al., 2009).

### 2.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), em plantas sob salinidade, ocorre devido a um desequilíbrio entre a produção e a neutralização das mesmas (GUPTA; HUANG, 2014; SHARMA et al., 2012; SILVEIRA et al., 2010). Dentre as principais EROs, destacam-se o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (APEL; HIRT, 2004). As EROs são produzidas nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, durante a fotossíntese, respiração e fotorrespiração respectivamente, podendo, também, ser produzidas nas membranas plasmáticas (PRISCO; GOMES FILHO, 2010; SLESÁK et al., 2007). As EROs, quando em elevadas quantidades, podem ser altamente citotóxicas por reagir com lipídeos, proteínas e DNA, causando peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas e mutações no DNA, respectivamente

(QUILES; LÓPEZ, 2004; SHARMA et al., 2012). Com isso, a peroxidação de membranas plasmáticas leva ao extravasamento do conteúdo celular, rápida dessecação e até a morte celular (FOYER; NOCTOR, 2000; SCANDALIOS, 1993). Distúrbios na permeabilidade da membrana, bem como o seu rompimento, ocorrem devido à peroxidação lipídica causada pelo aumento na produção de EROs (GUPTA; HUANG, 2014; MUNNS, 2002; NAVARRO et al., 2003; VERSLUES et al., 2006). Assim sendo, o sistema antioxidante pode representar uma maior proteção frente ao estresse salino, uma vez que evita os danos celulares oxidativos causados pelo excesso de produção de EROs (GUPTA; HUANG, 2014).

A ocorrência da salinidade, frequentemente, leva ao aumento da atividade de uma ou mais enzimas do sistema antioxidante, tais como a peroxidase do ascorbato (APX) (BOR; OZDEMIR; TURKAN, 2003; GUPTA; HUANG, 2014; KOCA et al., 2007; MAIA et al., 2010) e catalase (CAT) (ABOGADALLAH; SERAG; QUICK, 2010; GUPTA; HUANG, 2014; KOCA et al., 2007). O aumento da atividade dessas enzimas minimiza os efeitos deletérios do  $H_2O_2$  sobre a célula e suas estruturas (GUPTA; HUANG, 2014). Em espécies vegetais, as cultivares tolerantes possuem maiores atividades de enzimas antioxidantes, quando comparadas a cultivares sensíveis, o que faz com que os níveis de malondialdeído sejam menores em cultivares tolerantes (HAKEEN et al., 2012; JI et al., 2016).

Adicionalmente, mecanismos antioxidantes não enzimáticos, caracterizados pelo acúmulo de antioxidantes de baixo peso molecular, como o ascorbato e os carotenoides, também, são capazes de neutralizar a ação tóxica de radicais livres. Estudos recentes têm demonstrado que ocorre o aumento do conteúdo de ascorbato e esse aumento tem sido maior em plantas halófitas quando se compara com plantas glicófitas sob salinidade. Os carotenoides, também, têm se mostrado importantes na detoxificação de EROs,



principalmente, o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e radicais peroxil formados, durante os processos fotossintéticos, mais especificamente, durante a excitação da clorofila, uma vez que ocorre o aumento do conteúdo de carotenoides em espécies halófitas, o que diminui os fotodanos (BOSE; RODRIGO-MORENO; SHABALA, 2013).

#### **2.4 Respostas fisiológicas**

Além das respostas do sistema antioxidante, as plantas desenvolveram outras respostas a esses estresses a fim de possibilitar sua sobrevivência sob condições adversas. Ao estresse osmótico, o mecanismo de diminuição da condutância estomática possibilita menor perda de água por transpiração. Entretanto, a taxa fotossintética é reduzida, ocorrendo menor incorporação de biomassa (KATERJI et al., 1994; REDDY; IYENGAR, 1999). Ao estresse iônico, o mecanismo chamado ajustamento osmótico permite a compartimentalização de íons tóxicos no vacúolo e seu transporte para o apoplasto, além do acúmulo de íons não tóxicos e solutos orgânicos no citosol, chamados osmoprotetores. Isto permite que o citosol não perca água para o vacúolo nem para o apoplasto, mantendo, também, o gradiente de potencial hídrico na planta favorecendo a absorção de água pelas raízes (PRISCO; GOMES FILHO, 2010).

As plantas podem, então, acumular metabólitos que agem como solutos osmoprotetores armazenados no citosol sem que o metabolismo normal seja afetado pela salinidade. Em soja, os solutos são, principalmente, a prolina, a glicina-betaína, a trigonelina e o pinitol (HASEGAWA et al., 2000; PHANG; SHAO; LAM, 2008) e o teor de prolina tende a aumentar com o incremento de salinidade (HAKEEN et al., 2012; PHANG; SHAO; LAM, 2008). Cultivares de soja tolerantes à salinidade possuem acúmulo diferencial de osmoprotetores,

quando comparadas a cultivares sensíveis, caracterizando um aumento no conteúdo em cultivares tolerantes (WOOD, 1999).

No que se refere ao teor de carboidratos, difere quanto ao acúmulo em diferentes órgãos e em diferentes cultivares sensíveis e tolerantes à salinidade (KEREPESI; GALIBA, 2000). Em diferentes cultivares de *Triticum aestivum* L. foi observado que o conteúdo de glicose e sacarose aumenta em cultivar tolerante. No entanto, em cultivar sensível, não foi observado um padrão, uma vez que foi observado tanto o aumento de glicose e sacarose quanto à redução (KEREPESI; GALIBA, 2000). Em contrapartida, em estudos realizados com diferentes cultivares de *Glycine max* L. sob salinidade foi observada a redução do conteúdo de glicose e sacarose em todas as cultivares analisadas conforme ocorria o aumento da salinidade (RAMANA; PADHY; CHAITANYIA, 2012).

Estudos revelam que alterações no metabolismo da sacarose podem proteger o aparato fotossintético, por meio de um maior acúmulo de açúcares redutores nas folhas como a glicose e a frutose, de modo que uma maior atividade da invertase nos tecidos fontes promove tolerância à salinidade por mecanismos, ainda, desconhecidos (FUKUSHIMA et al., 2001). Os açúcares solúveis, ainda, podem atuar no metabolismo protegendo contra produção e, também, a favor da eliminação de EROs, bem como no ajustamento osmótico (MILLER, et al., 2010).

Tem sido extensivamente demonstrado que uma complexa rede de interações no metabolismo coordena o comportamento fisiológico do vegetal em resposta ao estresse salino. No entanto, são necessários mais estudos genômicos, transcriptômicos, proteômicos, e metabolômicos e a abordagem conjunta é essencial para a determinação das vias ou dos processos preferenciais que controlam a tolerância à salinidade (GUPTA; HUANG, 2014).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Condução do experimento

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Lavras (UFLA), no departamento de Biologia, setor de Fisiologia Vegetal, no último trimestre de 2015. Para alcançar o objetivo, foram selecionadas duas cultivares de soja, sendo a Agroeste 3730 (AS 3730) entre as mais cultivadas no Sudeste e a Monsoy 8372 (M 8372) no Nordeste. Ambas as cultivares se destacam por serem altamente produtivas, ciclo precoce de, aproximadamente, 110 dias, ampla adaptação geográfica e designação “ipro”, ou seja, além da tolerância ao herbicida glifosato, a soja tem, também, proteção contra as principais lagartas que atacam a cultura. As características gerais de cada cultivar são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Características gerais das cultivares M 8372 e AS 3730.

Características	Cultivar	
	M 8372	AS 3730
Grupo de maturidade	8.3	7.3
Ciclo	Precoce	Superprecoce
Hábito de crescimento	Determinado	Indeterminado
Altura da planta	76 cm	90 cm
Acamamento	Muito resistente	Resistente

Em seguida, sementes das duas cultivares foram semeadas em substrato tipo Plantmax®. Vinte dias após a semeadura, as mudas de ambas cultivares, no estágio VC (cotilédones completamente abertos), foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e vigor e transferidas para recipientes plásticos com capacidade para 40 litros contendo solução nutritiva de Imsande e Ralston (1981). A solução nutritiva é constituída pelos macronutrientes: KCl (2,96 mM), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1 mM), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (2,1 mM), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1,0 mM), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,7 mM) e pelos micronutrientes: Fe-EDTA (92 µM),

MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (2 µM), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,8 µM), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (4,5 µM), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,6 µM), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,64 µM), CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,175 µM, suplementada com NH<sub>4</sub>·NO<sub>3</sub> (4 mM)

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e, antes da imposição dos tratamentos, as mudas passaram por um período de aclimação com duração de 21 dias. Durante o período de aclimação, foram utilizadas soluções com concentrações crescentes, iniciando com ¼ da força, durante sete dias, ½ força por sete dias e força completa por sete dias.

Plantas aclimatadas foram submetidas a três tratamentos, constituídos por 0 mM (1,3 dS.m<sup>-1</sup>), 50 mM (4,4 dS.m<sup>-1</sup>) e 100 mM de cloreto de sódio (7,1 dS.m<sup>-1</sup>). De acordo com US Salinity Laboratory (US SALINITY LABORATORY DIAGNOSIS AND IMPROVEMENT OF SALINE AND ALKALI SOILS, 1954), a concentração de 50 mM corresponde à salinidade moderada e a de 100 mM à salinidade alta, para vegetais em geral.

Para o tratamento controle, foi utilizada a concentração original da solução nutritiva, enquanto nos outros tratamentos foi utilizada a mesma solução, porém com a adição de NaCl na concentração definida em mM. O pH da solução foi ajustado a cada dois dias para  $5,5 \pm 0,5$  com solução de NaOH ou HCl 1 mol. L<sup>-1</sup> e as soluções foram trocadas, semanalmente e mantidas sob aeração constante durante todo o período experimental.

As avaliações e as coletas foram realizadas em 0 (T0), 8 (T1) e 16 dias (T2). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), sendo duas cultivares e três concentrações de NaCl, totalizando 6 tratamentos, em 3 tempos de coleta e cinco repetições. Cada parcela experimental foi constituída por duas plantas, sendo uma destinada às análises com massa seca, e outra destinada às análises com massa fresca. A seguir, estão descritas as avaliações realizadas.

### **3.2 Trocas gasosas**

As trocas gasosas foram medidas utilizando-se o analisador de gás por infravermelho (IRGA - LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA), em trifólios completamente expandidos, no folíolo central. As avaliações foram: taxa fotossintética líquida (A) e concentração de carbono interno (Ci). Assim, foi calculada a eficiência de carboxilação (A/Ci). Todas as avaliações foram realizadas em dias claros, entre 9 h e 10 horas. A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) usada foi  $1500 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , a média da temperatura foliar foi  $28^\circ\text{C}$  e a umidade relativa (UR) da câmara foi 50%.

### **3.3 Avaliações de crescimento**

O comprimento da raiz e altura das plantas, assim como o comprimento e a largura dos folíolos, foram mensurados com uma régua e foi contado o número de folhas. Com o auxílio de um paquímetro digital, foi medido, também, o diâmetro do caule. A massa seca de raiz e parte aérea (caule e folhas) foram obtidas de amostras secas em estufa de ventilação forçada a  $70^\circ\text{C}$  até peso constante. Com base nesses dados, foi realizada a taxa média de crescimento relativo, a área foliar específica e proporção parte aérea/raiz (HUNT et al., 2002).

### **3.4 Avaliações bioquímicas**

Em cada época de coleta, raízes e folhas coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  com a finalidade de serem utilizadas em análises as quais necessitam de matéria fresca. Para as análises que necessitam de matéria seca, as amostras foram moídas em moinho do tipo willey e armazenadas em tubos plásticos.

### **3.4.1 Enzimas do metabolismo antioxidante**

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 200 mg de material fresco de folhas e raízes, às quais foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 375 µL de tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), 15 µL de EDTA 10 mM, 75 µL de ácido ascórbico 200 mM, e 1035 µL de água. O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado a - 20° C durante o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

#### **3.4.1.1 Dismutase do superóxido (SOD)**

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), em um meio de incubação composto por 100 µL de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, 40 µL de metionina 70 mM, 3µL de EDTA 10 µM, 15 µL de NBT 1 mM, 2 µL de riboflavina 0,2 mM e 31 µL de água. Os tubos com o meio de reação e 10 µL de amostra foram iluminados, por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição =  $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$ . Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

### 3.4.1.2 Catalase (CAT)

A CAT foi avaliada, segundo Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionada a 180  $\mu\text{L}$  do meio de incubação, contendo 90  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 9  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 250 mM e 72  $\mu\text{L}$  de água, incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância, a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

### 3.4.1.3 Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 3  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionada a 180  $\mu\text{L}$  de tampão de incubação, composto por 90  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 9  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM, 9  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 2 mM e 63  $\mu\text{L}$  de água (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

### 3.4.2 Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Matéria fresca de folhas e raízes (200 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido com polivinil polipirrolidona (PVPP), homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação, contendo 45  $\mu\text{L}$  tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, 45  $\mu\text{L}$  do extrato e 90  $\mu\text{L}$  de iodeto de potássio 1M (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000). A quantificação foi realizada, com base na curva padrão de peróxido de hidrogênio, com concentrações conhecidas.



### 3.4.3 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada, por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Duzentos miligramas de folhas foram macerados em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Alíquotas (125 µL) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação, contendo 0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA, incubando-se, em seguida, a 95°C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação:  $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$ , em que:  $\xi$  (coeficiente de extinção =  $1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$ ); b (comprimento ótico = 1).

### 3.4.4 Ascorbato

A concentração de ascorbato foi determinada, conforme descrito por Arakawa et al. (1981), no qual 100 mg de material fresco foram macerados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% (m/v) e o homogeneizado pela centrifugação a 13.000 g, por 15 minutos, a 4°C. Alíquotas (20 µL) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação composto por TCA 5% (m/v), etanol 99,8% (v/v), ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 0,4% em etanol (v/v), bathophenantrolina 0,5% em etanol (p/v) e  $\text{FeCl}_3$  0,03% em etanol (m/v); a mistura foi homogeneizada, vigorosamente e incubada a 30°C, por 90 minutos. As leituras foram realizadas a 534 nm. A quantificação de ascorbato foi realizada com base na curva-padrão de ascorbato com concentrações conhecidas.

### **3.4.5 Clorofilas e carotenoides**

Para a determinação dos teores de clorofila e carotenoides, foram pesados 0,1 gramas de tecido foliar e colocados em frascos âmbar com 10 mL de acetona 80%. Após 15 horas, o volume foi completado para 10 mL, sendo realizadas leituras espectrofotométricas a 646,8 e 663,2 nm, e, para os teores de carotenoides, foram realizadas leituras a 470 nm, conforme metodologia adaptada de Lichtenthaler e Buschmann (2001).

### **3.4.6 Carboidratos**

Os carboidratos foram extraídos da massa seca de folhas completamente expandidas e raízes pela homogeneização de 200 mg de massa seca em 5 mL de tampão fosfato de potássio, 100 mM, pH 7,0, seguido de banho-maria por 30 minutos a 40°C. O homogenato foi centrifugado a 5.000 g, por 10 minutos, coletando-se o sobrenadante. O processo foi repetido e os sobrenadantes, combinados.

Para a quantificação de açúcares solúveis (AST) totais, foi utilizado o método da Antrona (DISCHE, 1962); para os açúcares redutores (AR) o protocolo descrito por Miller (1959), por meio do método DNS; para quantificação de proteínas, o protocolo de Bradford (1976) e, para sacarose, usou-se a diferença entre AST e AR.

### **3.4.7 Prolina**

A extração e a quantificação de prolina foram feitas por meio do método de Bates, Waldren e Teare (1973). Foi realizada por meio da maceração de 100 mg de material vegetal fresco com parte do extrator em ácido sulfosalicílico 3% (volume do extrator: 5 mL). Os extratos foram agitados à temperatura ambiente por 60 minutos e filtrados com papel filtro. A quantificação foi realizada com base na curva padrão com concentrações crescentes e conhecidas de prolina.

### 3.4.8 Quantificação de Sódio

Para quantificação dos teores de sódio (Na), foi utilizado o extrato nítrico-perclórico e foi determinado o teor de Na pelo método da fotometria de chama. A digestão nitroperclórica foi feita de 500 mg de material seco e moído em tubos de digestão. Foram adicionados 6 mL de uma mistura de HNO<sub>3</sub> e HClO<sub>4</sub> na proporção 2:1 (v/v). Os tubos foram colocados no bloco digestor e a temperatura foi aumentada, gradativamente, até atingir 160° C e foram mantidos a essa temperatura até o volume ser reduzido à metade (cerca de 40 minutos). Nesse ponto, a temperatura foi elevada para 210° C e mantida até que se obtivessem fumos brancos de HClO<sub>4</sub> e o extrato apresentar-se incolor (cerca de 20 minutos). Após esfriar, o volume foi completado para 20 mL com água destilada (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1989).

### 3.5 Índice de tolerância

A tolerância é medida com a redução do peso da raiz das plantas com o estresse em comparação com os controles não tratados e será expressa por um índice de tolerância (IT) em porcentagem:  $IT = (\text{peso da raiz das plantas tratadas} / \text{peso das raízes das plantas não tratadas}) \times 100\%$  (PIRSELOVÁ et al., 2011).

### 3.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados via análise de componentes principais (ACP). A importância de cada componente principal foi determinada pela distribuição Broken-Stick, em que se assume que a variância total é distribuída aleatoriamente. Os autovalores superiores aos valores da distribuição foram considerados significativos. As variáveis, com maior valor de correlação, foram selecionadas e os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias por Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Os dados obtidos foram submetidos, primeiramente, ao teste de normalidade de Kolmogorov - Smirnov ( $p \geq 0,05$ ) e os dados considerados fora da normalidade foram transformados por Box-cox.

Os dados, que mesmo transformados, não se enquadraram na normalidade, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ), um teste estatístico não paramétrico.

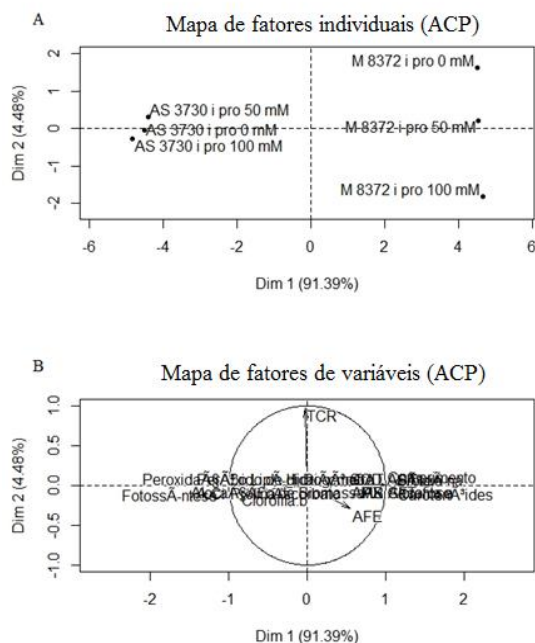


#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas análises de componentes principais em cada tempo de coleta (T0, T1 e T2), tanto para folhas quanto para raízes. Os valores de contribuição e coseno<sup>2</sup> de cada variável analisada estão demonstrados no anexo 1. Verificou-se o comportamento das cultivares AS 3730 e M 8372 e das variáveis em cada tempo de análise. O gráfico 1A mostra o comportamento das folhas das cultivares no T0. Segundo a dimensão 1 (dim 1) (91,39%), as duas cultivares possuem comportamentos opostos, porém AS 3730 se manteve à esquerda e M 8372 à direita.

As variáveis mais correlacionadas ao comportamento típico da cultivar AS 3730 foram: Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peroxidação lipídica, alocação de biomassa, clorofila b, fotossíntese, eficiência de carboxilação (A/Ci), prolina e clorofila a. Por outro lado, os parâmetros relacionados com o comportamento da M 8372 foram peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT), dismutase do superóxido (SOD), carotenoides, altura de plantas, proteína, açúcares solúveis totais (AST), sacarose, massa seca (MS), sódio, área foliar total (AFT), açúcares redutores (AR) e diâmetro (GRÁFICO 1B).

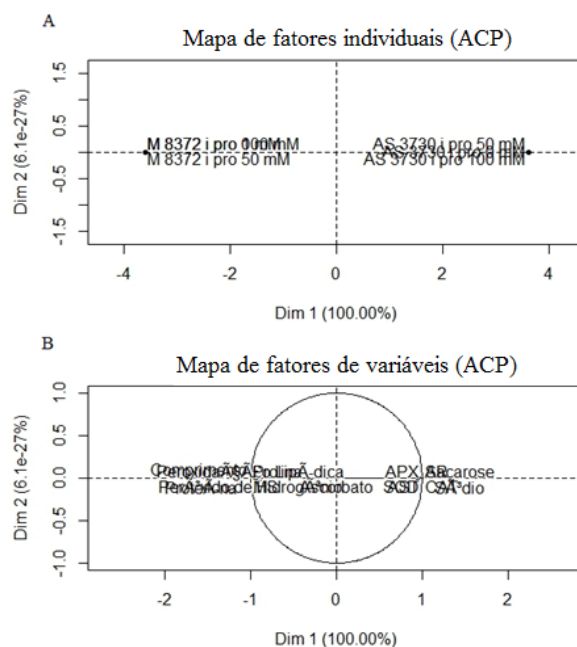
Gráfico 1 - Análise de componentes principais para cultivar AS 3730 e M 8372 (A) e análise de componentes principais, para os parâmetros avaliados (B), no tempo zero para folhas.



Com relação ao comportamento das raízes das cultivares no T0, as duas cultivares possuem comportamentos opostos, uma vez que, na dimensão 1 (100%), a cultivar AS 3730 se mantém à direita do zero, e a cultivar M 8372 se mantém à esquerda do zero (GRÁFICO 2A).

Dentre as variáveis que mais contribuíram para a divisão de comportamento das cultivares (dimensão 1), aquelas que estiveram mais relacionadas com o comportamento da cultivar AS 3730 foram: proteínas, prolina, peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, comprimento de raiz e MS. Por outro lado, os parâmetros avaliados, que estiveram relacionados com o comportamento da M 8372, foram AST, AR, CAT, APX, SOD, sódio e sacarose (GRÁFICO 2B).

Gráfico 2 - Análise de componentes principais para cultivar AS 3730 e M 8372 (A) e análise de componentes principais, para os parâmetros avaliados (B), no tempo zero para raízes.



No tempo 1, mesmo após 8 dias de tratamentos, as cultivares mantiveram-se com padrões opostos de comportamento (GRÁFICO 3A). No entanto, houve uma diferenciação de comportamento das folhas de plantas que foram submetidas a diferentes tratamentos em relação ao T0 (dimensão 2). Assim, houve semelhança de resposta para cultivar AS 3730 entre 0 mM e 50 mM, que se diferiram de AS 3730 100 mM. Para M 8372, 0 mM se comportou, diferentemente, de 50 mM e 100 mM, que apresentaram comportamentos semelhantes.

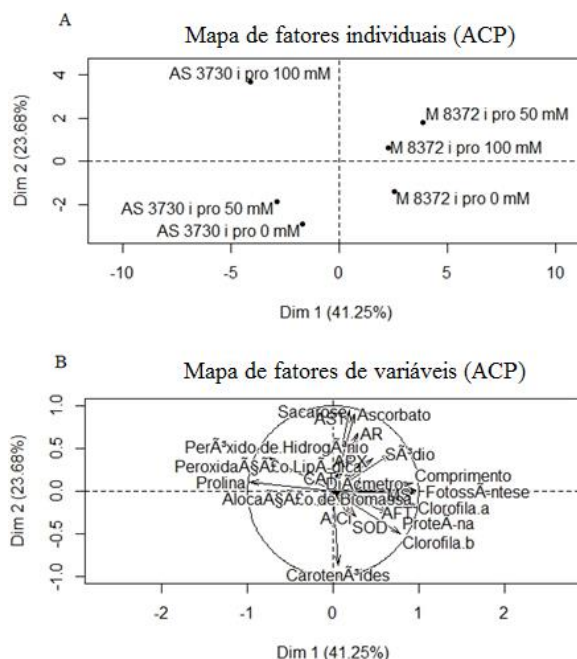
As variáveis que mais contribuíram para o comportamento de AS 3730 foram: prolina, peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio. E os parâmetros avaliados relacionados com o comportamento de M 8372 são: Clorofila a,



diâmetro, AFT, MS, fotossíntese (A), altura de plantas, clorofila b e proteína (GRÁFICO 3B).

Com relação às variáveis que mais contribuíram para a divisão de comportamento, entre os tratamentos (Dimensão 2), AST, AR, sacarose e ascorbato permitiram que AS 3730 100 mM, M 8372 50 mM e M 8372 100 mM se localizassem acima do zero em relação à dimensão 2. E os carotenoides contribuíram para que AS 3730 0 mM, AS 3730 50 mM e M 8372 0 mM se localizassem abaixo do zero em relação à dimensão 2.

Gráfico 3 - Análise de componentes principais para cultivar AS 3730 e M 8372 (A) e análise de componentes principais, para os parâmetros avaliados (B), no tempo 1 para folhas.



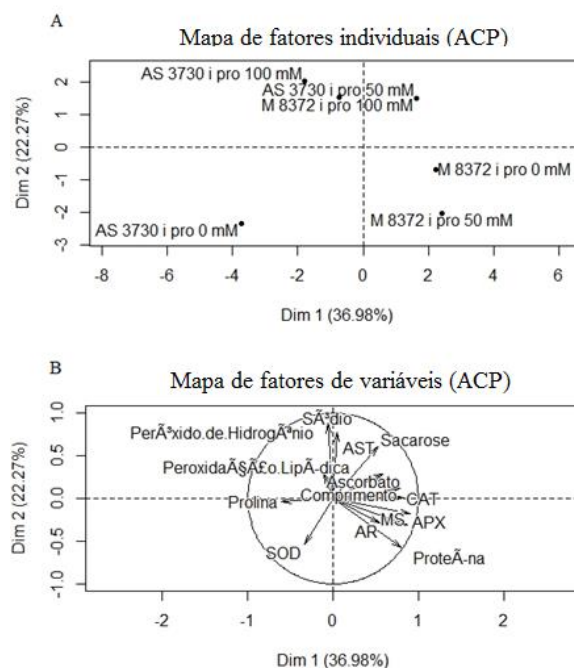
O comportamento das raízes das cultivares no T1, mesmo após 8 dias de tratamentos, manteve-se com padrões opostos de comportamento (GRÁFICO

4A). No entanto, houve uma diferenciação de comportamento das raízes de plantas que foram submetidas a diferentes tratamentos com semelhança de resposta entre AS 3730 50 mM e 100 mM, que se diferiram de AS 3730 0 mM. Já, para M 8372, 100 mM se comportou diferentemente de 0 mM e 50 mM, que apresentaram comportamentos semelhantes.

O comportamento de AS 3730 foi mais influenciado pela variável prolina. E os parâmetros avaliados relacionados com o comportamento de M 8372 foram APX, MS, CAT, proteínas e comprimento de raiz (GRÁFICO 4B).

As variáveis que mais contribuíram para a divisão entre os tratamentos para AS 3730 50 mM, AS 3730 100 mM e M 8372 100 mM foram sódio, peróxido de hidrogênio, sacarose e AST.

Gráfico 4 - Análise de componentes principais para cultivar AS 3730 e M 8372 (A) e análise de componentes principais, para os parâmetros avaliados (B), no tempo 1 para raízes.

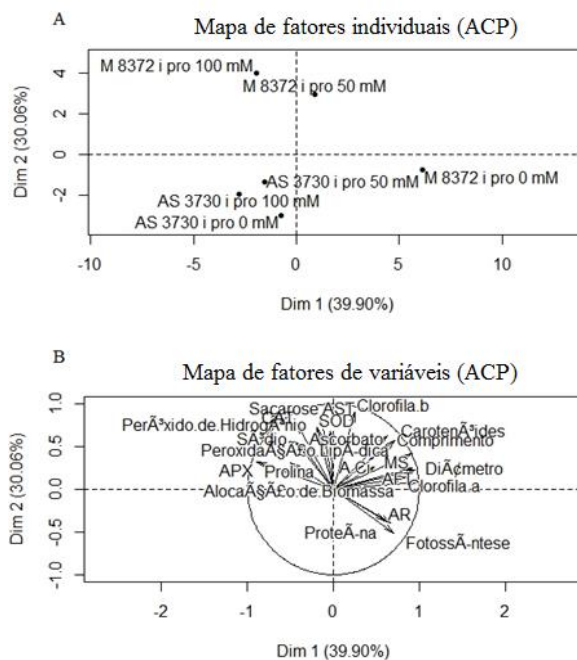


No T2, após 16 dias de tratamentos, não se observou o comportamento oposto das cultivares, mas ocorreu a diferenciação de comportamento das folhas de plantas que foram submetidas a diferentes tratamentos em relação ao T0, observado ao longo da dimensão 2 (GRÁFICO 5A). Assim, houve semelhança de resposta entre AS 3730 0 mM, 50 mM, 100 mM e M 8372 100 mM que se diferiram de M 8372 0 mM e 50 mM ao longo da dimensão 1. E semelhança de resposta entre M 8372 50 mM e 100 mM, as quais diferiram de M 8372 0 mM e AS 3730 sob todas as concentrações ao longo da dimensão 2.

O gráfico 5B mostra as variáveis relacionadas ao comportamento de AS 3730 e M 8372. A variável que mais contribuiu para o comportamento de AS 3730 sob todas as concentrações e M 8372 sob 100 mM foi a APX. E os parâmetros avaliados relacionados com o comportamento de M 8372 0 mM e 50 mM são alocação de biomassa, AFT, diâmetro, MS, altura de plantas, A, proteínas e carotenoides.

As variáveis que mais contribuíram para a divisão de comportamento entre os tratamentos para M 8372 50 mM e M 8372 100 mM foram clorofila b, sacarose, AST, CAT, SOD e peróxido de hidrogênio. No entanto, nenhuma variável contribuiu, significativamente, para o comportamento das demais.

Gráfico 5 - Análise de componentes principais para cultivar AS 3730 e M 8372 (A) e análise de componentes principais, para os parâmetros avaliados (B), no tempo 2 para folhas.

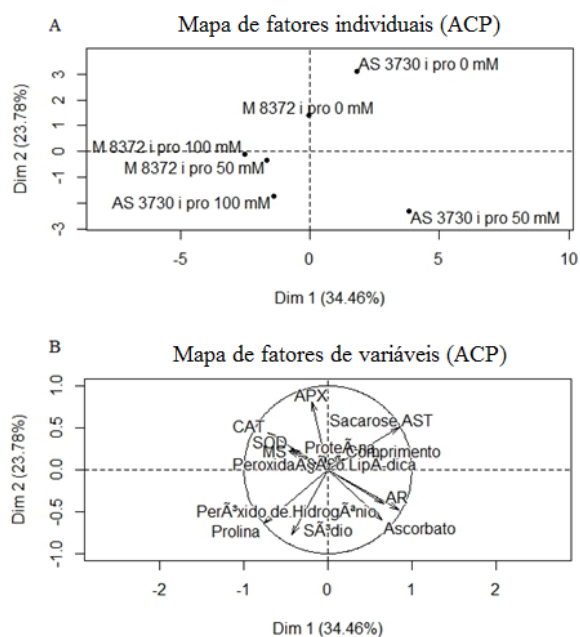


Para as raízes, no tempo 2, após 16 dias de tratamentos, também, não se observaram comportamentos opostos, porém houve a diferenciação de comportamento das raízes de plantas que foram submetidas a diferentes tratamentos em relação ao T0, observado ao longo da dimensão 2. Assim, houve semelhança de resposta entre AS 3730 0 mM e 50 mM, que se diferiram de M 8372 50 mM, 100 mM e AS 3730 100 mM, ao longo da dimensão 1, enquanto M 8372 fixou-se no ponto 0; e semelhança de resposta entre M 8372 e AS 3730, ambas sob 50 mM e 100 mM, as quais diferiram de M 8372 e AS 3730 ambas sob 0 mM ao longo da dimensão 2. Assim, observa-se que o comportamento de raízes submetidas a diferentes níveis de salinidade é diferente de raízes não submetidas a tal estresse, independente da cultivar no tempo 2.

As variáveis que mais contribuíram para o comportamento de AS 3730 0 mM e 50 mM foram proteínas e comprimento de raiz. E os parâmetros avaliados relacionados com o comportamento de M 8372 50 mM, 100 mM e AS 3730 100 mM foram APX, MS e CAT. Como a M 8372 0 mM está no zero, foi influenciada igualmente pelas variáveis.

As variáveis que mais contribuíram, para a divisão de comportamento entre os tratamentos para M 8372 e AS 3730, ambas sob 0 mM, foram sacarose e o AST. Já as variáveis que mais contribuíram, para o comportamento de M 8372 e AS 3730, ambas sob 50 mM e 100 mM, foram sódio e peróxido de hidrogênio.

Gráfico 6 - Análise de componentes principais para cultivar AS 3730 e M 8372 (A) e análise de componentes principais, para os parâmetros avaliados (B), no tempo 2 para raízes.



Após a análise dos resultados das ACPs, de posse das variáveis mais relacionadas ao comportamento das cultivares, realizou-se um teste de médias para entender a influência que cada uma exerceu. A cultivar AS 3730 possui menor crescimento de parte aérea no T1 em 50 e 100 mM quando comparada a 0 mM. E a cultivar M 8372 possui menor crescimento em T1 apenas na concentração de 100 mM. Já, em T2, M 8372 teve menor peso de MS na parte aérea em 50 e 100 mM enquanto em AS 3730 não foram observadas diferenças estatísticas. As raízes de a cultivar M 8372 não tiveram menor MS no T1 e T2 entre as concentrações. A cultivar AS 3730 teve menor MS no T1 em 50 e 100 mM e no T2 apenas em 100 mM. Isso mostra que sob 50 mM, há uma reação de a cultivar ao estresse e maior investimento em MS (TABELA 2). AS 3730 obteve alocação de biomassa semelhante entre os tratamentos em todos os tempos de coleta. Já M 8372 obteve menor alocação em 50 e 100 mM no T1 e em 100 mM no T2 (TABELA 2).

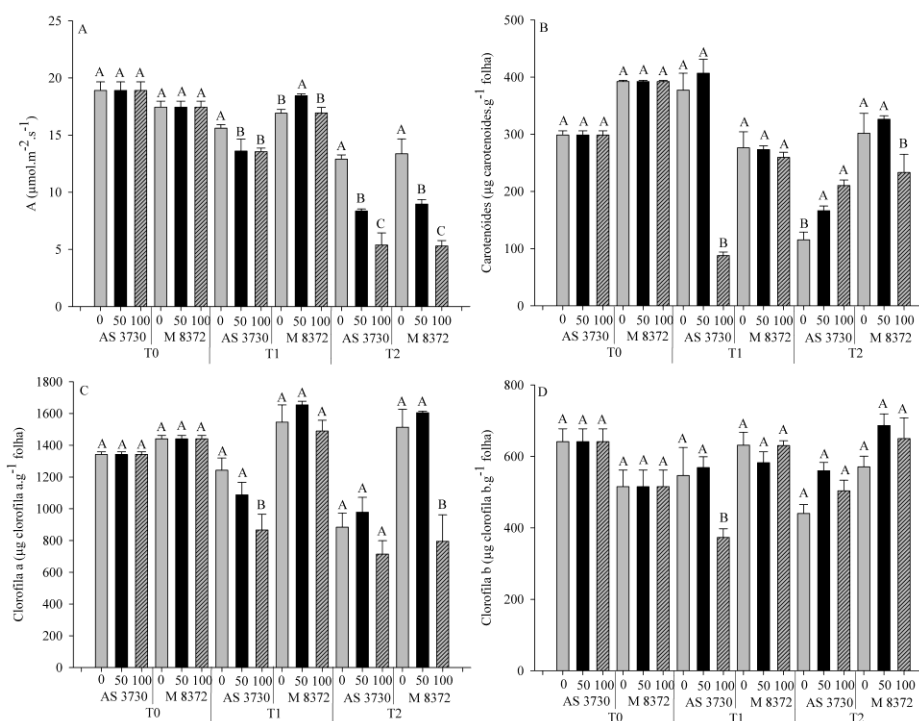
Tabela 2 - Massa seca de parte aérea e raiz e alocação de biomassa das cultivares AS 3730 e M 8372 sob 0, 50 e 100 mM de cloreto de sódio em T0, T1 e T2.

Tempo	Cultivar	Tratamento	MS parte aérea (g)	MS raiz (g)	Alocação de biomassa
T0	AS 3730	0	2,3 A	0,7 A	3,3 A
		50	2,3 A	0,7 A	3,3 A
		100	2,3 A	0,7 A	3,3 A
	M 8372	0	5,1 A	0,9 A	5,3 A
		50	5,1 A	0,9 A	5,3 A
		100	5,1 A	0,9 A	5,3 A
T1	AS 3730	0	4,8 A	1,3 B	3,7 A
		50	4,1 B	1,0 B	3,9 A
		100	3,5 B	0,9 B	3,6 A
	M 8372	0	9,5 A	2,1 A	4,4 A
		50	8,9 A	2,4 A	3,6 B
		100	6,9 B	2,2 A	3,0 B
T2	AS 3730	0	7,1 A	2,1 A	3,3 A
		50	6,3 A	2,0 A	3,1 A
		100	5,6 A	1,5 B	3,6 A
	M 8372	0	17,5 A	3,0 A	5,8 A
		50	13,1 B	2,8 A	4,6 A
		100	9,4 C	2,7 A	3,5 B

**Nota:** Letras maiúsculas comparam as concentrações dentro de cada cultivar e tempo. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade para alocação de biomassa e pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de probabilidade para massa seca de parte aérea e raiz.

Com a imposição dos tratamentos, verificou-se uma redução na taxa fotossintética e nos teores de clorofila “a” para todos os tratamentos de AS 3730 em T1. Exceções foram verificadas, na concentração de 100 mM, onde no T1 houve um decréscimo no teor de carotenoides e de clorofila “b” e no T2 houve manutenção de clorofila “a” e carotenoides em AS 3730. As maiores diferenças entre tratamentos foram observadas no T2 para o decréscimo da A com o aumento da salinidade para ambas as cultivares (GRÁFICO 7A) e para o decréscimo no teor de carotenoides de AS 3730 sob 100 mM no T1 e de M 8372 no T2 (GRÁFICO 7B).

Gráfico 7 - Fotossíntese (A), carotenoides (B), clorofila a (C) e clorofila b (D) das cultivares AS 3730 e M 8372 sob 0, 50 e 100 mM de cloreto de sódio em três tempos de coleta (T0, T1 e T2).



Letras maiúsculas comparam as concentrações dentro de cada cultivar e tempo. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de probabilidade (A) e tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade (B, C e D).

No T1, as plantas da cultivar AS 3730, submetidas a 100 mM, tiveram maior teor de AST nas folhas. Já, para M 8372, isso ocorreu em 50 mM, também, no T1. Nos demais tempos de coleta, os teores de AST foram iguais, estatisticamente, entre os tratamentos (GRÁFICO 8A).

Percebe-se em AS 3730 um acúmulo antecipado de AST nas raízes em 50 e 100 mM no T1, uma vez que esses valores são maiores do que em 0 mM. Mas, em T2, essa resposta é invertida, e o acúmulo de AST nas raízes passa a ser

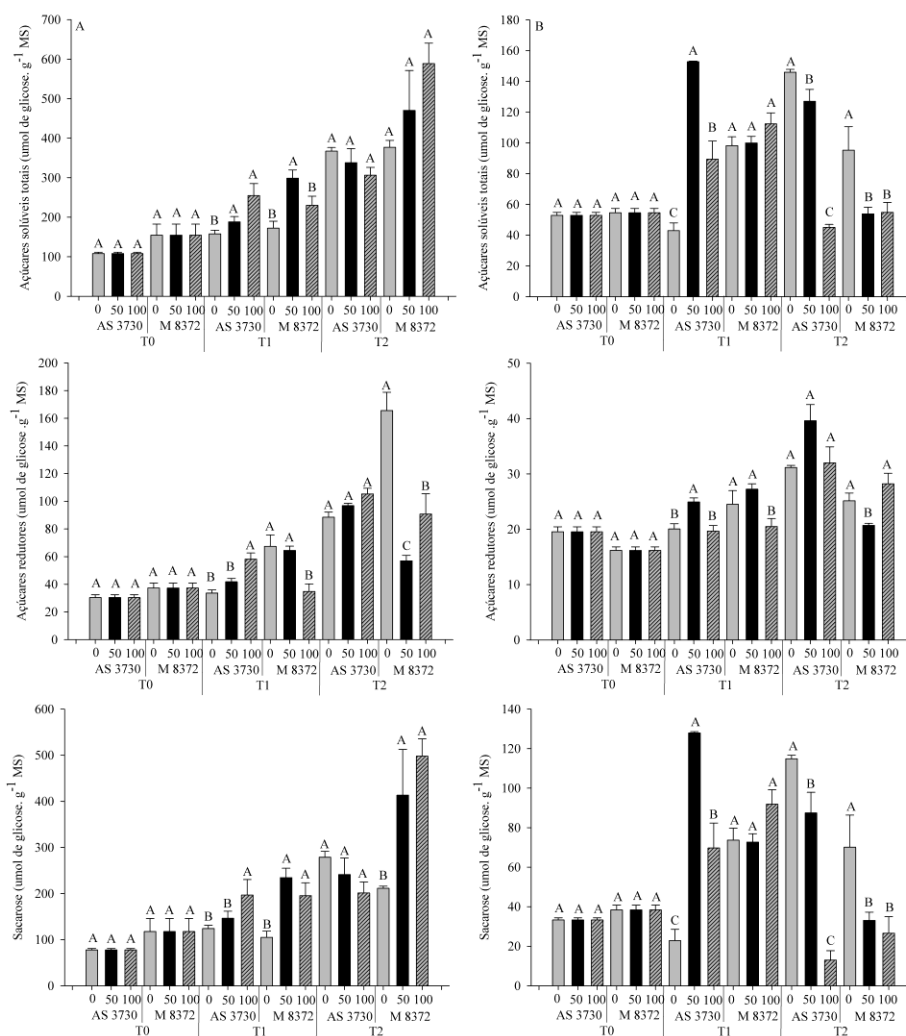


maior em 0 mM. M 8372 possui menor acúmulo de AST nas raízes apenas no T2 em 50 e 100 mM (GRÁFICO 8B).

No geral, o teor de AR nas folhas tende a aumentar com o aumento das concentrações em AS 3730 e reduzir com o aumento das concentrações em M 8372 (GRÁFICO 8C). Nas raízes, maior teor de AR é encontrado em AS 3730 sob a concentração de 50 mM no T1. Já, em M 8372, foi encontrado em 0 e 50 mM. No T2, AS 3730 não diferiu, estatisticamente, entre os tratamentos, mas M 8372 teve maiores valores em 0 e 100 mM (GRÁFICO 8D).

A cultivar AS 3730 no T1 teve maiores valores de sacarose na folha em 100 mM e M 8372 sob 50 e 100 mM. No T2, AS 3730 não difere entre os tratamentos e M 8372 possui maior teor de sacarose sob 50 e 100 mM, assim como no T1. (GRÁFICO 8E). Nas raízes, no T1, AS 3730 possui maior valor de sacarose quando as plantas estão submetidas a 50 mM. Os demais tratamentos e, também, a resposta da M 8372 não diferem estatisticamente. Já, em T2, ambas cultivares possuem redução do teor de sacarose com o aumento das concentrações de cloreto de sódio (GRÁFICO 8F).

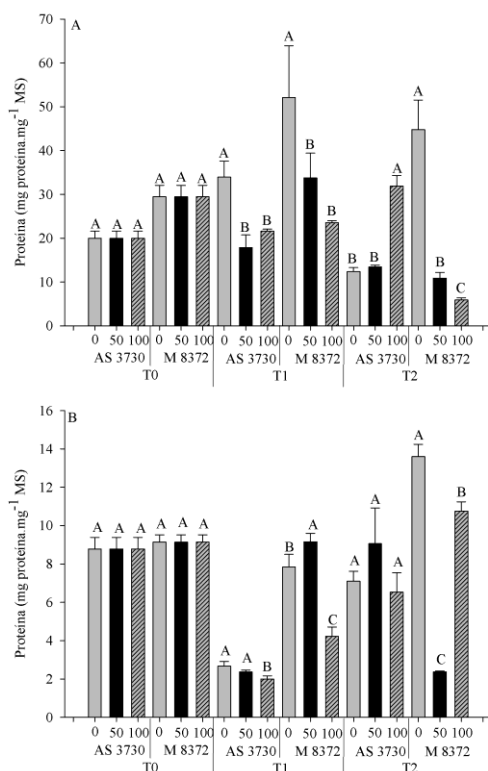
Gráfico 8 - Açúcares solúveis totais na folha (A) e na raiz (B), açúcares redutores na folha (C) e na raiz (D) e sacarose na folha (E) e na raiz (F) das cultivares AS 3730 e M 8372 sob 0, 50 e 100 mM de cloreto de sódio em três tempos de coleta (T0, T1 e T2).



Letras maiúsculas comparam as concentrações dentro de cada cultivar e tempo. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de probabilidade (A, B, E e F) e tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade (C e D).

Em T1, ambas as cultivares tiveram o mesmo padrão de resposta, em que menor teor de proteínas foi encontrado nas folhas sob 50 e 100 mM. Já, em T2, a cultivar AS 3730 teve maior teor em 100 mM, enquanto a M 8372 em 0 mM (GRÁFICO 9A). Nas raízes, no T1, o maior valor de proteínas encontrado para AS 3730 é sob 0 e 50 mM e, para M 8372, é sob 50 mM. No T2, AS 3730 não difere, estatisticamente, entre os tratamentos e M 8372 apresenta maior valor em 0 mM, seguido do 100 e 50 mM (GRÁFICO 9B).

Gráfico 9 - Proteínas da folha (A) e da raiz (B) das cultivares AS 3730 e M 8372 sob 0, 50 e 100 mM de cloreto de sódio em três tempos de coleta (T0, T1 e T2). Letras maiúsculas comparam as concentrações dentro de cada cultivar e tempo.

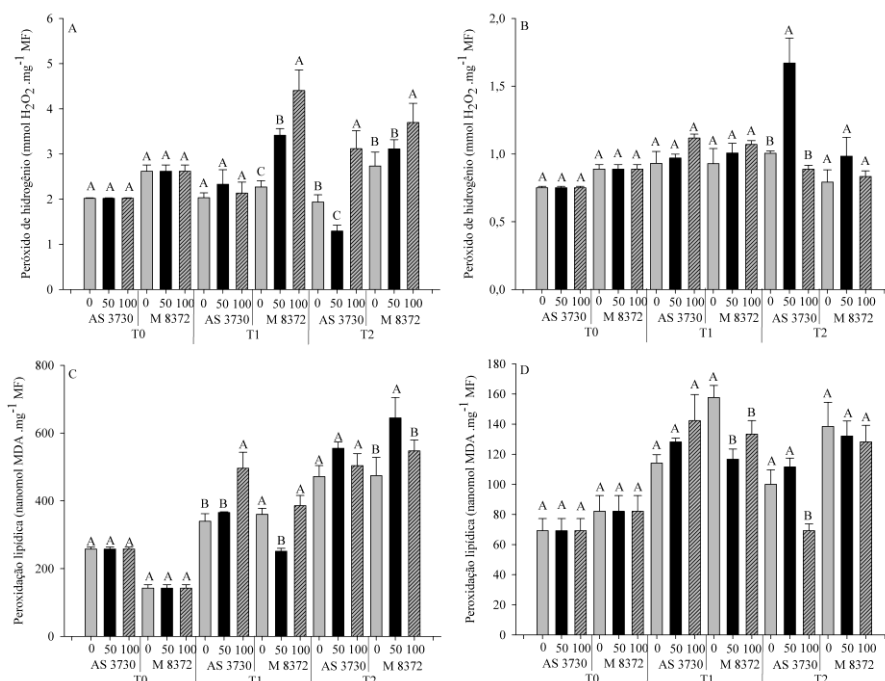


Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

No T1, a única diferença observada, para o teor de peróxido de hidrogênio nas folhas, foi na cultivar M 8372, a qual possui maior teor em 50 e 100 mM. Já, no T2, AS 3730 possui o menor teor em 50 mM e M 8372 em 0 e 50 mM (GRÁFICO 10A). Nas raízes, só houve diferença no T2 na cultivar AS 3730, na qual o maior teor observado foi em 50 mM (GRÁFICO 10B).

A cultivar M 8372 no T1 teve sua menor peroxidação lipídica em 50 mM, no entanto o contrário ocorreu para esta cultivar no T2, a qual obteve a maior peroxidação lipídica em 50 mM. A cultivar AS 3730 teve a maior peroxidação lipídica do T1, em 100 mM, no entanto foi semelhante entre os tratamentos no T2 (GRÁFICO 10C). Em raízes, no T1, a cultivar M 8372 teve menor peroxidação lipídica em 50 e 100 mM e valores iguais aos do controle no T2. Já a cultivar AS 3730 teve valores iguais aos do controle no T1 e menor peroxidação em 100 mM (GRÁFICO 10D).

Gráfico 10 - Peróxido de hidrogênio na folha (A) e na raiz (B) e de malondialdeído na folha (C) e na raiz (D) das cultivares AS 3730 e M 8372 sob 0, 50 e 100 mM de cloreto de sódio em três tempos de coleta (T0, T1 e T2).



Letras maiúsculas comparam as concentrações dentro de cada cultivar e tempo. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

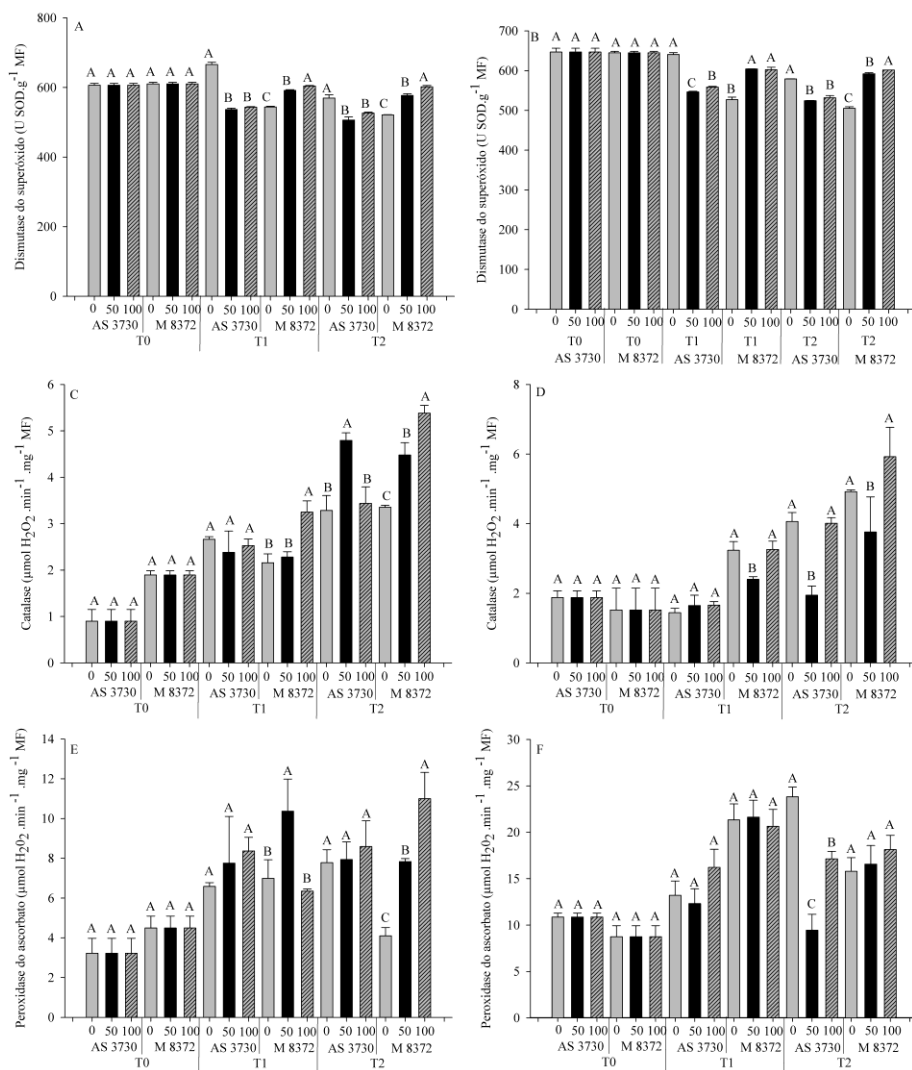
Em relação à atividade da SOD tanto em folhas quanto em raízes, quando se compara cada cultivar entre seus tratamentos, percebe-se que a salinidade inibe a atividade a SOD em AS 3730, uma vez que sob 50 e 100 mM há a redução da atividade desta enzima. O contrário ocorre com a M 8372, em que há o aumento da atividade da SOD conforme há o aumento da concentração de cloreto de sódio (GRÁFICO 11A e 11B).

A atividade da CAT, nas folhas do T1, ainda, não difere estatisticamente entre seus tratamentos, para cultivar AS 3730, no entanto, em T2, a maior

atividade encontrada foi em 50 mM. Já a cultivar M 8372 possui uma resposta mais rápida à salinidade e, logo, no T1 sob 100 mM já existe uma maior atividade em relação ao 0 e 50 mM. E, no T2, essa diferença é maior ainda, visto que as plantas sob 100 mM possuem maior atividade que as plantas sob 50 mM e estas maior atividade que as plantas sob 0 mM (GRÁFICO 11C). Nas raízes, no T1, a cultivar AS 3730, ainda, não diferencia a atividade da CAT em relação ao controle, mas a cultivar M 8372 tem sua maior atividade em 0 e 100 mM. No T2, AS 3730 e M 8372 têm suas maiores atividades em 0 e 100 mM (GRÁFICO 11D).

Quanto à atividade da APX, nas folhas, no T1 e T2, não são observadas diferenças estatísticas para a cultivar AS 3730 entre os tratamentos. No T1, a cultivar M 8372 tem maior atividade da APX sob 50 mM e, no T2, sob 50 e 100 mM (GRÁFICO 11E). Nas raízes, no T1, nenhuma das duas cultivares diferiu, estatisticamente, entre seus tratamentos. Em T2, AS 3730 teve maior atividade da APX sob 0 mM, seguida de 100 mM e 50 mM. M 8372 não diferiu entre seus tratamentos no T2 (GRÁFICO 11F).

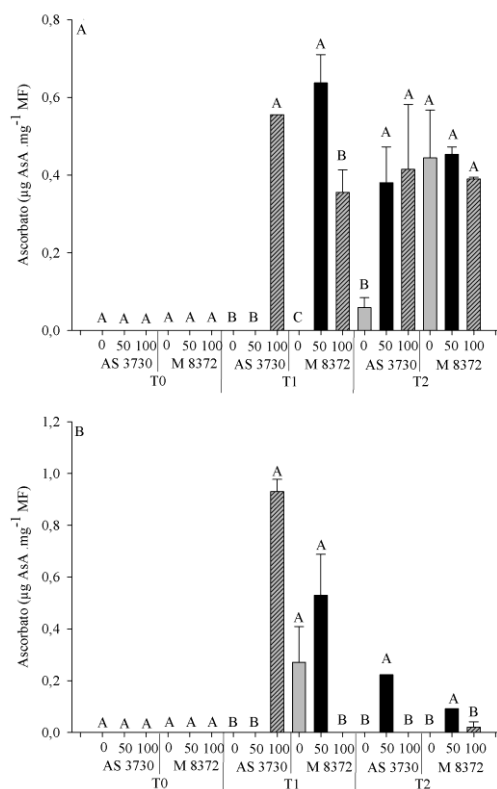
Gráfico 11 - Atividade das enzimas dismutase do superóxido na folha (A) e na raiz (B), catalase na folha (C) e raiz (D) e da peroxidase do ascorbato na folha (E) e na raiz (F) das cultivares AS 3730 e M 8372 sob 0, 50 e 100 mM de cloreto de sódio em três tempos de coleta (T0, T1 e T2).



Letras maiúsculas comparam as concentrações dentro de cada cultivar e tempo. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis (A e B) a 5% de probabilidade e tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade (C, D, E e F).

No que se refere ao teor de ascorbato nas folhas, no T1, AS 3730 teve o teor de ascorbato mais alto sob 100 mM, já a M 8372, sob 50 mM, seguido do 100 mM. No T2, AS 3730 teve teores similares em 50 e 100 mM e maiores que em 0 mM, já a M 8372 não apresentou diferença estatística entre os tratamentos (GRÁFICO 12A). Nas raízes no T1, quando se comparam os tratamentos de AS 3730, esta tem maior teor sob 100 mM, já a M 8372 tem maior teor sob 0 e 50 mM. No T2, o maior teor é sob 50 mM em ambas (GRÁFICO 12B).

Gráfico 12 - Ascorbato na folha (A) e na raiz (B) das cultivares AS 3730 e M 8372 sob 0, 50 e 100 mM de cloreto de sódio em três tempos de coleta (T0, T1 e T2).

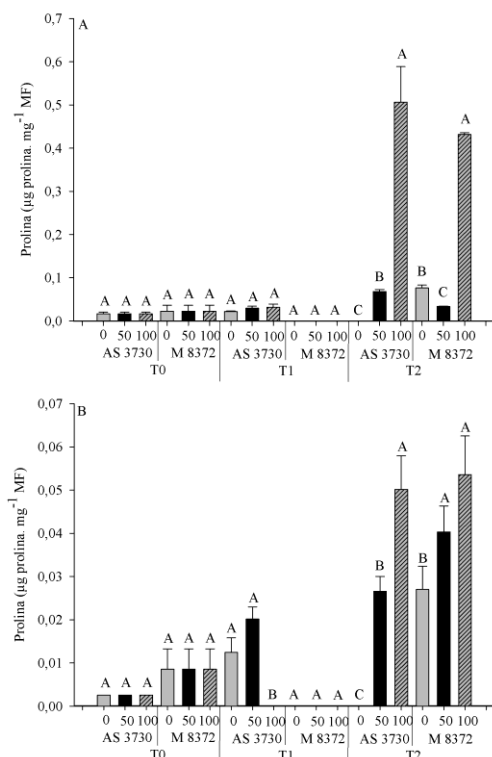


Letras maiúsculas comparam as concentrações dentro de cada cultivar e tempo. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de probabilidade.



Nas folhas, não houve diferença estatística em ambas cultivares para o teor de prolina no T1. Em T2, AS 3730 apresentou maior teor em 100 mM seguido de 50 e 0 mM. Já a M 8372 possuiu maior teor sob 100 mM seguido de 0 e 50 mM (GRÁFICO 13A). Nas raízes, no T1, AS 3730 obteve maior teor sob 0 e 50 mM, já a cultivar M 8372 não diferiu estatisticamente. No T2, AS 3730 teve maior teor sob 100 mM, seguido de 50 e 0 mM e M 8372 obteve maior valor em 50 e 100 mM (GRÁFICO 13B).

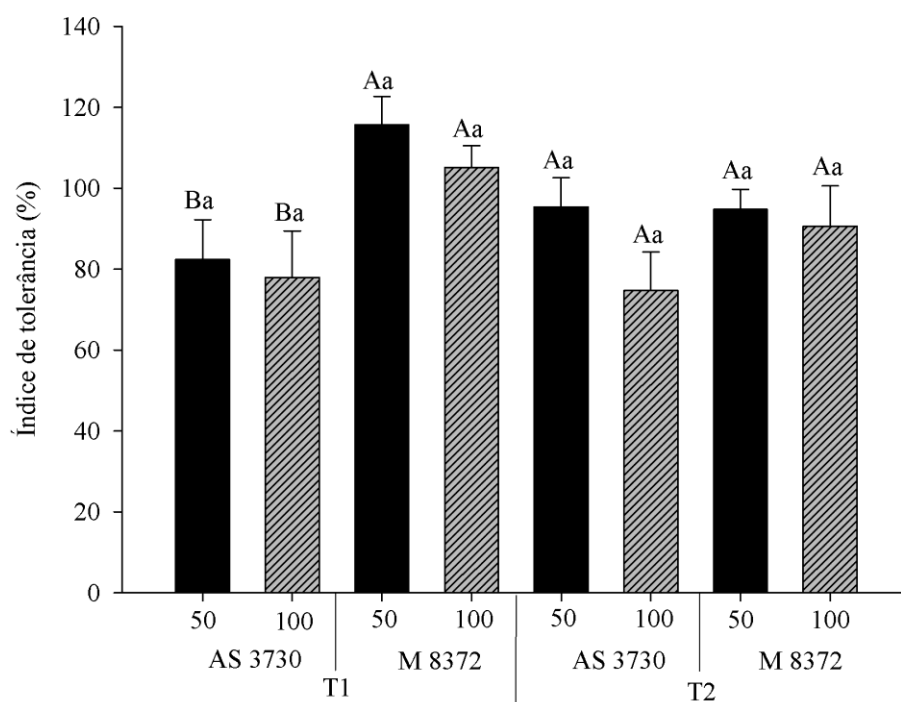
Gráfico 13 - Prolina na folha (A) e na raiz (B) das cultivares AS 3730 e M 8372 sob 0, 50 e 100 mM de cloreto de sódio em três tempos de coleta (T0, T1 e T2).



Letras maiúsculas comparam as concentrações dentro de cada cultivar e tempo. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de probabilidade.

A cultivar M 8372 teve maior índice de tolerância quando comparada à cultivar AS 3730, no T1, tanto sob 50 mM como 100 mM. No entanto, em T2, não houve diferença estatística entre as cultivares no que diz respeito ao índice de tolerância, tanto sob 50 mM quanto sob 100 mM (GRÁFICO 14).

Gráfico 14 - Índice de tolerância das cultivares AS 3730 e M 8372 sob 0, 50 e 100 mM de cloreto de sódio em três tempos de coleta (T0, T1 e T2).



Letras maiúsculas comparam as cultivares dentro de cada tempo e concentração. Letras minúsculas comparam as concentrações dentro de cada cultivar e tempo. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Com base nos resultados da ACP juntamente com a comparação de médias, é possível afirmar que a salinidade afeta o equilíbrio entre a produção e

a remoção de EROs, que podem provocar danos às estruturas celulares, quando em concentrações elevadas da cultivar M 8372 (SHARMA et al., 2012). Assim, foi quantificado o teor de  $H_2O_2$  e de MDA, que mede o nível de peroxidação lipídica.

Dessa forma, a cultivar M 8372 manteve crescimento enquanto a cultivar AS 3730 já providenciava o ajuste osmótico e provável síntese de enzimas antioxidantes por meio da prolina (HAKEEN et al., 2012; PHANG; SHAO; LAM, 2008) em razão da presença de peróxido de hidrogênio e consequente peroxidação lipídica (GRÁFICOS 3A, 3B, 10A, 10C, 13A). Mesmo a cultivar M 8372 possuindo maiores valores de peróxido de hidrogênio, quando comparada à AS 3730, a manutenção do metabolismo primário, ainda, é primordial, uma vez que essa cultivar possui, em relação ao controle, comprometimento do crescimento apenas em 100 mM. E a cultivar AS 3730, mesmo havendo um menor teor de  $H_2O_2$ , parece ser mais sensível, quando comparada à cultivar M 8372, em decorrência do maior nível de peroxidação lipídica sob 100 mM e já possui crescimento comprometido a partir de 50 mM. (TABELA 2, gráficos 3A, 3B, 7A, 7C, 7D, 9A).

Em resposta às EROs produzidas por meio do metabolismo normal ou sob estresse, as plantas possuem o sistema antioxidante enzimático e não enzimático de defesa com a função de remover o excesso das EROs e minimizar os seus efeitos deletérios no crescimento e desenvolvimento das plantas por meio da SOD, CAT, APX, ascorbato que atuam juntos em diferentes locais celulares. A SOD é a primeira linha de defesa e atua na conversão do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em  $H_2O_2$ . Em seguida, as enzimas CAT e APX atuam removendo o  $H_2O_2$  (SHARMA et al., 2012; YOU; CHAN, 2015).

Observa-se, também, que as folhas dos tratamentos que parecem apresentar maior estresse no T1 (M 8372 50 e 100 mM e AS 3730 100 mM) estão localizadas, diferentemente, das folhas dos tratamentos com menor

estresse (GRÁFICO 3A), as quais possuem maiores valores de ascorbato, um composto do sistema antioxidante não enzimático capaz de remover espécies reativas de oxigênio (EROs) e, também, maiores valores de AST, AR e sacarose, os quais podem servir como osmólitos compatíveis e, também, atuar na remoção de EROs (GRÁFICO 8A, 8C, 8E, 12A) (MILLER et al., 2010; YOU; CHAN, 2015). Estudos revelam que sob salinidade, alterações no metabolismo da sacarose podem proteger o aparato fotossintético, por meio de um maior acúmulo de açúcares redutores nas folhas, ou seja, uma maior atividade da invertase nos tecidos fontes pode promover a tolerância à salinidade (FUKUSHIMA et al., 2001). Nesse estudo, provavelmente, os açúcares redutores tenham atuado na proteção do aparato fotossintético em AS 3730 100 mM, enquanto os carotenoides atuaram nas folhas de M 8372 100 mM (GRÁFICOS 3B, 7B) (BOSE; MORENO; SHABALA, 2013).

No T1, é possível afirmar que as raízes da cultivar M 8372 mantêm em valores mais altos seu metabolismo antioxidante como as enzimas APX e CAT, o que pode proporcionar maiores valores de proteína (GRÁFICOS 4A, 4B, 9B, 11D, 11F). Assim, como observado para MS de parte aérea, a MS de raiz de a cultivar AS 3730 tem menor valor a partir de 50 mM e de M 8372 apenas em 100 mM, em relação ao controle. Já a cultivar AS 3730 possui maior teor de prolina principalmente sob 50 mM, ou seja, a cultivar investe em osmólito protetor e provável síntese de enzimas antioxidantes (HAKEEN et al., 2012; PHANG; SHAO; LAM, 2008) (GRÁFICO 4A, 4B, 13B).

Ao analisar o comportamento das raízes, assim como observado para as folhas do T1, houve uma separação entre o comportamento dos tratamentos. Logo, os tratamentos que, provavelmente, estão com maior estresse (M 8372 100 mM e AS 3730 50 e 100 mM) estão localizados, diferentemente, daqueles com menor estresse, uma vez que possuem maiores valores de sódio e similares de peróxido de hidrogênio que ocasionam o estresse nas raízes (TABELA 1,

gráficos 4A, 4B, 10B). No entanto, sacarose e AST, também, têm altos valores nas raízes desses tratamentos, indicando que a planta investe em raízes, no início do estresse, ampliando a sua área de exploração a fim de buscar um local com menos sódio, ou seja, minimizar o efeito do excesso de sais (GRÁFICOS 8B, 8F) (MENDONÇA et al., 2005). Essa maior concentração de açúcares, também, pode estar relacionada com a proteção contra as EROs geradas assim como regulação osmótica nas raízes (MILLER et al., 2010).

No T2 da parte aérea, é possível afirmar que a cultivar M 8372, sob 0 e 50 mM, mantém em valores mais altos o seu metabolismo primário assim como no T1, enquanto as cultivares AS 3730 e M 8372, sob 100 mM, já providenciam a remoção de EROs por meio da ação da APX (TABELA 2, gráficos 5A, 5B, 7A, 7B, 9A, 11E). Além disso, observa-se que, dentre as plantas que estão sob estresse, as plantas da cultivar M 8372 possuem valores mais altos do sistema antioxidante como a CAT e a SOD, o que pode ser em razão dos maiores valores de peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa de oxigênio (ERO) (GRÁFICOS 5A, 5B, 10A, 11A, 11C).

No T2 das raízes, observando-se o comportamento da M 8372 sob estresse, este pode ser explicado por maiores valores de MS, APX e CAT quando comparados com os valores de AS 3730. Explica-se, então, por que as plantas da cultivar M 8372 se posicionam mais próximas umas das outras no gráfico do que as plantas de AS 3730 (TABELA 2, gráficos 6A, 6B, 11D, 11F).

Os resultados do T2 nas raízes mostram que, realmente, as cultivares submetidas à salinidade estão sob estresse em decorrência de menores concentrações de sacarose e AST do que as plantas controle (GRÁFICOS 8B, 8F). Além dos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos tradicionais, evidências crescentes indicam que os açúcares solúveis estão diretamente ligados com as taxas de produção de EROs pela regulação das vias metabólicas de produção dessas espécies reativas, podendo atuar na proteção

contra produção e, também, a favor da eliminação de EROs, bem como no ajustamento osmótico, favorecendo um melhor desempenho dos controles e AS 3730 sob 50 mM (MILLER et al., 2010; YOU; CHAN, 2015).

No T2, M 8372, sob 50 mM e 100 mM, teve menor crescimento em relação ao controle do que AS 3730. M 8372 teve crescimento ao longo do tempo de 243, 156 e 84%, respectivamente, sob 0, 50 e 100 mM. Já a cultivar AS 3730, 208, 174 e 143%, respectivamente, sob 0, 50 e 100 mM. Já, nas raízes, no T2, não foi observada diferença na MS de M 8372, enquanto houve menor MS de AS 3730 sob 100 mM. Houve, ao longo do tempo, na cultivar M 8372, crescimento de 233, 211 e 200% e na AS 3730 de 200, 185 e 114%, respectivamente, sob 0, 50 e 100 mM.

A cultivar M 8372, mesmo com uma atividade fotossintética inferior à da cultivar AS 3730 no T0, teve maior desempenho e capacidade de adquirir maior crescimento mesmo sob o estresse imposto (GRÁFICO 7A). No T1, na cultivar M 8372, o maior teor de clorofila, em todas as concentrações e maior teor de clorofila b, sob 100 mM, podem ter favorecido a maior atividade fotossintética de essa cultivar quando comparada à AS 3730. Para ambas as cultivares, houve uma redução da atividade fotossintética, ao longo do tempo (56% e 73% para AS 3730 sob 50 e 100 mM, respectivamente e 53% e 71% para M 8372 sob 50 e 100 mM, respectivamente) em relação às plantas sob 0 mM. Isso pode ser em virtude da redução, ao longo do tempo, do teor de carotenoides em ambas as cultivares (45% e 30% para AS 3730 sob 50 e 100 mM, respectivamente e 17% e 41% para M 8372 sob 50 e 100 mM, respectivamente), um pigmento protetor do aparato fotossintético, por meio do rápido *quenching* dos estados excitados da clorofila (BOSE; RODRIGO-MORENO; SHABALA, 2013) (GRÁFICOS 7A, 7B, 7C e 7D). A redução da atividade fotossintética em plantas sob salinidade pode ser atribuída aos danos ao aparato fotossintético, ao fechamento estomático e à redução da eficiência da

Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase ou redução de sua capacidade de regeneração (KAO et al., 2006).

Todos esses resultados podem justificar o menor crescimento de parte aérea de a cultivar M 8372 com relação ao seu controle em razão dos valores mais altos de peróxido de hidrogênio, apesar da maior atividade do sistema antioxidante. No entanto, pode ter sido uma estratégia de combate ao estresse, uma vez que o crescimento das raízes foi mantido (LU et al., 2016). Estudos revelam que o menor comprometimento do crescimento, o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, bem como dos compostos que, também, atuam, na remoção de EROs, resultam em provável tolerância à salinidade. No entanto, também, é relatado ser importante o ajuste osmótico por meio de solutos osmoticamente compatíveis como a prolina (HAKEEN et al., 2012; PHANG; SHAO; LAM, 2008). Resultado observado na AS 3730. De acordo com os resultados obtidos, de modo geral, a cultivar M 8372 investiu em mecanismos diferentes (maior atividade do sistema antioxidante) dos investidos pela AS 3730 (maior acúmulo de solutos osmoticamente ativos).

O maior índice de tolerância, obtido pela cultivar M 8372 no T1, concorda com os resultados obtidos pela ACP, uma vez que no T1 ambas as cultivares possuem comportamentos distintos, localizando-se, cada uma delas, em um quadrante. No entanto, quando se observa que, no T2, não há mais diferença estatística entre as cultivares submetidas a 50 e 100 mM, é, também, observado na ACP no T2 que as cultivares submetidas a tal estresse estão localizadas mais próximas (GRÁFICO 3A, 4A, 5A, 6A).

## **5 CONCLUSÕES**

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que cada uma das cultivares investiu em mecanismos diferentes a fim de tolerar o estresse imposto e, ao final do T2, ambas possuíram o mesmo índice de tolerância.

Além disso, as variáveis identificadas como sendo mais correlacionadas à tolerância à salinidade em soja são o acúmulo de solutos osmoprotetores, fotossíntese e o crescimento.





## REFERÊNCIAS

- ABOGADALLAH, G. M.; SERAG, M. M.; QUICK, P. W. Fine and coarse regulation of reactive oxygen species in the salt tolerant mutants of barnyard grass and their wild-type parents under salt stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 138, n. 1, p. 60-73, Jan. 2010.
- AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. **Journal of Plant Biology**, Heidelberg, v. 51, n. 3, p. 167-173, May 2008.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, Jan. 2004.
- ARAKAWA, N. et al. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tóquio, v. 45, n. 5, p. 1289-1290, May 1981.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 39, n. 1-2, p. 205-207, Aug. 1973.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.
- BOR, M.; OZDEMIR, F.; TURKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, Irlanda, v. 164, n. 1, p. 77-84, Jan. 2003.
- BOSE, J.; RODRIGO-MORENO, A.; SHABALA, S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, p. 1-17, Dec. 2013.
- BRADFORD, M. N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, Orlando, v. 72, p. 248-254, May 1976.

BROSCHÉ, M. et al. Stress signaling III: reactive oxygen species (ROS). In: PAREEK, A. et al. **Abiotic stress adaptation in plants: physiological, molecular and genomic foundation**. Dordrecht: Springer, 2010. Cap. 5, p. 91-102.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 52, p. 302-310, Feb. 1978.

CARVALHO, T. C. et al. Germination and initial development of soybean seedlings and their transgenic derivatives in salt stress condition. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1366-1371, ago. 2012.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J. K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 2, p. 437-448, Jan. 2005.

CHOUDHURY, S. et al. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 8, n. 4, p. e23681-1-e23681-6, Apr. 2013.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quinto levantamento, fevereiro 2016: volume 3**. Brasília: Conab, 2016. 182 p.

DABROWSKA, G. et al. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia series Botânica**, Crakow, v. 49, n. 1, p. 7-17, 2007.

DIAS, N. S. et al. Salinização do solo por aplicação de fertilizantes em ambiente protegido. **Irriga**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 135-143, jan./mar. 2007.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 477-520.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Crops and drops: making the best use of water for agriculture**. Rome: FAO, 2002. 27 p.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Land and plant nutrition management service**. Rome: FAO, 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/ag1/ag11/spush/>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**, Hoboken, v. 146, n. 3, p. 359-388, Jan. 2000.

FUKUSHIMA, E. et al. Improved salt tolerance of transgenic tobacco expressing apoplastic yeast-derived invertase. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 42, n. 2, p. 245–249, Feb. 2001.

GABRIEL, J. L. et al. The role of cover crops in irrigated systems: soil salinity and salt leaching. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 158, p. 200-207, Sept. 2012.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GONÇALVES, A. N. Fatores limitantes para o crescimento e desenvolvimento de árvores em regiões áridas e semiáridas do nordeste brasileiro. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 3, n. 10, p. 99-105, jun. 1982.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. **International Journal of Genomics**, New York, v. 2014, p. 1-18, Apr. 2014.

HAKEEM, K. R. et al. Genotypic variability among soybean genotypes under NaCl stress and proteome analysis of salt-tolerant genotype. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Duluth, v. 168, n. 8, p. 2309-2329, Dec. 2012.

HASEGAWA, P. M. et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 463-499, June 2000.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HIMABINDU, Y. et al. Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. **Environmental and Experimental Botany**, New York, v. 124, p. 39–63, Apr. 2016.

HOQUE, M. A. et al. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 164, n. 5, p. 553–561, May 2007.

HORNEY, R. D. et al. Development of practical site-specific management methods for reclaiming salt-affected soil. **Computers and Electronics in Agriculture**, New York, v. 46, n. 1, p. 379-397, Mar. 2005.

HUNT, R. et al. A modern tool for classical plant growth analysis. **Annals of Botany**, London, v. 90, n. 4, p. 485-488, Oct. 2002.

IMSANDE, J.; RALSTON, E. J. Hydroponic growth and the nondestructive assay for dinitrogen fixation. **Plant Physiology**, New York, v. 68, n. 6, p. 1380-1384, Dec. 1981.

IQBAL, N. et al. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 100, p. 34-42, Apr. 2014.

JI, W. et al. Quantitative proteomics reveals an important role of GsCBRLK in salt stress response of soybean. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 402, n. 1, p. 159-178, Dec. 2016.

KAHN, F. et al. RAPD markers associated with salt tolerance in soybean genotypes under salt stress. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 170, n. 2, p. 257-272, May 2013.

KAO, W. Y. et al. Response of three Glycine species to salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 120-125, May 2006.

KATERJI, N. et al. Effect of salinity on emergence and on water stress and early seedling growth of sunflower and maize. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 81-91, Sept. 1994.

KEREPESI, I.; GALIBA, G. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 2, p. 482-487, Mar. 2000.

KOCA, H. et al. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 60, n. 3, p. 344-351, July 2007.

LÄUCHLI, A.; GRATTAN, S. R. Plant growth and development under salinity stress. In: JENKIS, M. A.; HASEGAWA, P. M.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops**. New York: Springer, 2007. p. 1-32.

LEE, G. J. et al. A major QTL conditioning salt tolerance in S-100 soybean and descendent cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, n. 8, p.1610–1619, Nov. 2004.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. et al. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. Davis: John Wiley, 2001. p. F4.3.1-F4.3.8.

LIMA, V. L. A. **Efeitos da qualidade da água de irrigação e da fração de lixiviação sobre a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em condições de lisímetro de drenagem**. 1998. 87 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

LU, K. et al. Salt-induced difference between *Glycine cyrtoloba* and *G. max* in anti-oxidative ability and  $K^+$  vs.  $Na^+$  selective accumulation. **The Crop Journal**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 129-138, Apr. 2016.

LU, K. X. et al. Photosynthetic response of salt-tolerant and sensitive soybean varieties. **Photosynthetica**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 381-387, Sept. 2009.

MAIA, J. M. et al. Antioxidative enzymatic protection in leaves of two contrasting cowpea cultivars under salinity. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 54, n. 1, p. 159-163, Mar. 2010.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: FEALQ, 1989. 201 p.

MENDES, B. S. S. et al. Mecanismo fisiológicos e bioquímicos do abacaxi ornamental sob estresse salino. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 3, p. 71-77, jul./set. 2011.

MENDONÇA, A. V. R. et al. Effects of the embebibition and osmoconditioning in *Ttriplaris Americana* seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 27 n. 2, p. 111-116, dez. 2005.

MILLER, G. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 453–467, Apr. 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 239–250, Feb. 2002.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867–880, June 1981.

NAVARRO, J. M. et al. Water relations and xylem transport of nutrients in pepper plants grown under two different salts stress regimes. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 41, n. 3, p. 237–245, Nov. 2003.

PETTER, F. A. et al. Productivity and quality of soybean seeds as a function of potassium application. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 89–100, jan./fev. 2014.

PHANG, T.; SHAO, G.; LAM, H. Salt tolerance in soybean. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 50, n. 10, p. 1196–1212, Oct. 2008.

PIRŠELOVÁ, B. et al. Biochemical and physiological comparison of heavy metal-triggered defense responses in the monocot maize and dicot soybean roots. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 38, n. 5, p. 3437–3446, June 2011.

PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: DIAS, N. da S.; BLANCO, F. F. **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados: volume 175**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2010. p. 147–164.

QUILES, M. J.; LÓPEZ, N. I. Photoinhibition of photosystems I and II induced by exposure to high light intensity during oat plant grown effects on the chloroplastic NADH dehydrogenase complex. **Plant Science**, East Park Shannon, v. 166, n. 3, p. 815–823, Mar. 2004.

RAMANA, G. V.; PADHY, S. P.; CHAITANYIA, K. V. Differential responses of four soybean (*Glycine max* L.) cultivars of salinity stress. **Legume Research**, Haryana, v. 35, n. 3, p. 185-193, Sept. 2012.

REDDY, M.; IYENGAR, E. Crop responses to salt stress: seawater application and prospects. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of plant and crop stress**. New York: CRC Press, 1999. p. 1041-1068.

SAIRAM, R. K. et al. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 49, n. 1, p. 85-91, Mar. 2005.

SCANDALIOS, J. G. Oxygem stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 1, p. 7-12, Jan. 1993.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, New York, v. 2012, p. 01-26, Feb. 2012.

SILVA, E. N. et al. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Arid Environments**, London, v. 74, n. 10, p. 1130-1137, Oct. 2010.

SILVEIRA, J. A. G. et al. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: DIAS, N. da S.; BLANCO, F. F. **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados: volume 1**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2010. p. 166-185.

SLESACK, I. et al. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cell signaling in response to environmental stresses. **Acta Biochimica Polonica**, Warsaw, v. 54, n. 1, p. 39-50, Feb. 2007.

TAVAKKOLI, E. et al. Additive effects of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions on barley growth under salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 6, p. 2189-2203, Jan. 2011.

US SALINITY LABORATORY DIAGNOSIS AND IMPROVEMENT OF SALINE AND ALKALI SOILS. Washington: United States Department of Agriculture, 1954.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Limerick, v. 151, n. 1, p. 59-66, Feb. 2000.



VERSULES, P. E. et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stress that affect plant water status. **Plant Journal**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 523-539, Feb. 2006.

WANG, W. B. et al. Analysis of antioxidant enzymes activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 47, n. 7, p. 570–577, July 2009.

WILLADINO, L. et al. Salinity stress in two varieties of sugar cane: enzymes of the antioxidant system and chlorophyll fluorescence. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 417-422, abr./jun. 2011.

WOOD, A. J. Comparison of salt-induced osmotic adjustment and trigonelline accumulation on two soybean cultivars. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 42, n. 3, p. 389-394, Nov. 1999.

YOU, J.; CHAN, Z. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 1-15, Dec. 2015.

## ANEXO A - TABELAS

Tabela 1 - Contribuições e conseno<sup>2</sup> das variáveis utilizadas na análise de componentes principais (ACP)

Variáveis		T0		T1				T2			
		Parte aérea	Raiz	Parte aérea		Raiz		Parte aérea		Raiz	
		Dim.1	Dim.1	Dim.1	Dim.2	Dim.1	Dim.2	Dim.1	Dim.2	Dim.1	Dim.2
AST	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,03	0,89	0,27	3,63e <sup>-1</sup>	0,02	0,76	0,27	3,63e <sup>-1</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	0,39	17,17	5,30	11,65	0,23	11,50	5,30	11,65
Proteína	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,44	0,06	0,63	3,30e <sup>-1</sup>	0,44	0,15	0,63	3,30e <sup>-1</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	4,86	1,29	12,22	10,60	5,06	2,34	12,22	10,60
AR	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,08	0,46	0,29	8,29e <sup>-2</sup>	0,36	0,13	0,29	8,29e <sup>-2</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	0,90	8,85	5,73	2,66	4,19	2,04	5,73	2,66
Sacarose	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,03	0,89	0,27	3,63e <sup>-1</sup>	0,02	0,76	0,27	3,63e <sup>-1</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	0,39	17,17	5,29	11,65	0,24	11,51	5,29	11,65
Prolina	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,96	0,01	0,36	1,23e <sup>-3</sup>	0,25	0,09	0,36	1,23e <sup>-3</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	10,63	0,23	7,10	0,03	2,87	1,41	7,10	0,03
APX	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,04	0,20	0,80	3,21e <sup>-2</sup>	0,79	0,10	0,80	3,21e <sup>-2</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	0,51	3,98	15,57	1,03	9,03	1,56	15,57	1,03
CAT	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,00	0,05	0,67	8,52e <sup>-5</sup>	0,18	0,58	0,67	8,52e <sup>-5</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	0,03	1,14	13,12	0,00	2,08	8,89	13,12	0,00
SOD	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,04	0,10	0,11	2,86e <sup>-1</sup>	0,03	0,51	0,11	2,86e <sup>-1</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	0,45	2,06	2,23	9,19	0,43	7,85	2,23	9,19

**Tabela 1, continuação**

Variáveis		T0		T1				T2			
		Parte aérea	Raiz	Parte aérea		Raiz		Parte aérea		Raiz	
		Dim.1	Dim.1	Dim.1	Dim.2	Dim.1	Dim.2	Dim.1	Dim.2	Dim.1	Dim.2
Ascorbato	Coseno <sup>2</sup>	NS	NS	0,06	0,82	0,01	8,80e <sup>-2</sup>	0,37	0,26	0,01	8,80e <sup>-2</sup>
	Contribuição	0,00	0,00	0,69	15,86	0,21	2,82	4,26	3,93	0,21	2,82
Peróxido de hidrogênio	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,46	0,19	0,00	5,99e <sup>-1</sup>	0,00	0,46	0,00	5,99e <sup>-1</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	5,08	3,65	0,03	19,21	0,01	6,98	0,03	19,21
Peroxidação lipídica	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,56	0,15	0,34	8,39e <sup>-2</sup>	0,19	0,31	0,34	8,39e <sup>-2</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	6,26	2,93	6,57	2,69	2,20	4,72	6,57	2,69
Clorofila a	Coseno <sup>2</sup>	0,99	-	0,92	0,03	-	-	0,72	0,01	-	-
	Contribuição	4,75	-	10,24	0,68	-	-	8,20	0,28	-	-
Clorofila b	Coseno <sup>2</sup>	0,99	-	0,61	0,24	-	-	0,06	0,81	-	-
	Contribuição	4,75	-	6,76	4,79	-	-	0,69	12,28	-	-
Carotenoides	Coseno <sup>2</sup>	0,99	-	0,00	0,75	-	-	0,39	0,39	-	-
	Contribuição	4,75	-	0,03	14,45	-	-	4,55	6,00	-	-
Sódio	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,21	0,14	0,00	7,71e <sup>-1</sup>	0,14	0,28	0,00	7,71e <sup>-1</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	2,36	2,71	0,08	24,74	1,70	4,27	0,08	24,74
Fotossíntese	Coseno <sup>2</sup>	0,99	-	0,87	0,00	-	-	0,48	0,26	-	-
	Contribuição	4,75	-	9,66	0,01	-	-	5,50	3,97	-	-
A/Ci	Coseno <sup>2</sup>	0,99	-	0,06	0,08	-	-	0,22	0,06	-	-
	Contribuição	4,75	-	0,73	1,71	-	-	2,59	1,04	-	-

**Tabela 1, conclusão**

Variáveis		T0		T1				T2			
		Parte aérea	Raiz	Parte aérea		Raiz		Parte aérea		Raiz	
		Dim.1	Dim.1	Dim.1	Dim.2	Dim.1	Dim.2	Dim.1	Dim.2	Dim.1	Dim.2
AFT	Coseno <sup>2</sup>	0,99	-	0,91	0,02	-	-	0,91	0,05	-	-
	Contribuição	4,75	-	10,06	0,47	-	-	10,37	0,77	-	-
Diâmetro	Coseno <sup>2</sup>	0,99	-	0,92	0,00	-	-	0,84	0,06	-	-
	Contribuição	4,75	-	10,20	0,00	-	-	9,60	0,94	-	-
Comprimento	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,85	0,00	0,61	1,47e <sup>-2</sup>	0,51	0,32	0,61	1,47e <sup>-2</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	9,42	0,16	11,81	0,47	5,86	4,90	11,81	0,47
MS	Coseno <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,89	0,00	0,75	9,99e <sup>-2</sup>	0,82	0,17	0,75	9,99e <sup>-2</sup>
	Contribuição	4,75	7,69	9,87	0,01	14,66	3,20	9,35	2,61	14,66	3,20
Alocação de Biomassa	Coseno <sup>2</sup>	0,99	-	0,03	0,02	-	-	0,95	0,00	-	-
	Contribuição	4,75	-	0,37	0,56	-	-	10,87	0,09	-	-