

ADINAN ALVES DA SILVA

**ESTUDO DA RESISTÊNCIA À SECA EM SOJA: AVALIAÇÕES
FISIOLÓGICAS, METABÓLICAS E MOLECULARES**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2017

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

T

S586e Silva, Adinan Alves da, 1982-
2017 Estudo da resistência à seca em soja : avaliações fisiológicas,
metabólicas e moleculares / Adinan Alves da Silva. - Viçosa, MG, 2017.
viii, 102f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Cleberson Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Soja. 2. Fisiologia vegetal. 3. Plantas - Metabolismo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

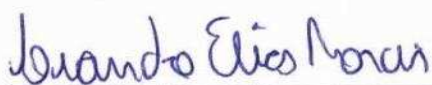
CDD 22 ed. 633.34

ADINAN ALVES DA SILVA

**ESTUDO DA RESISTÊNCIA À SECA EM SOJA: AVALIAÇÕES
FISIOLÓGICAS, METABÓLICAS E MOLECULARES**

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

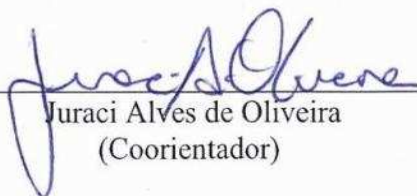
APROVADA: 15 de agosto de 2017.



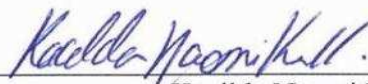
Leandro Elias Moraes



Maximilher Dal-Bianco Lamas Costa



Juraci Alves de Oliveira
(Coorientador)



Kacilda Naomi Kuki
(Coorientadora)



Cleberson Ribeiro
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal por me proporcionar esta oportunidade.

À CAPES e ao CNPq, pela concessão de bolsas de estudo e pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

À minha família, por todo o apoio e incentivo de sempre.

Ao meu orientador, Cleberson Ribeiro pela orientação e ensinamentos.

Aos professores Juraci Alves de Oliveira e Dimas Mendes Ribeiro, pela coorientação e disponibilidade em ajudar sempre.

À pesquisadora Kacilda Naomi Kuki, pela coorientação e ensinamentos durante todo o doutorado.

A todos os colegas do Laboratório de Genética Molecular de Plantas, em especial à Cíntia e Vanessa, pela ajuda na realização desse trabalho e pelos momentos de descontração e boas risadas.

Aos estagiários do laboratório, especialmente à Noane, Michel e Paloma, que contribuíram de maneira imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao Camilo e à Nívea do NUBIOMOL/UFV, pelo apoio na realização de importantes análises.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal/UFV, especialmente à professora Aristéa Alves Azevedo, por disponibilizar sua estrutura e pelos ensinamentos.

Ao professor Maximiller, aos pós-doutorandos Rafael e Luiz e à estagiária Danyelle do laboratório “Biomol”/UFV, pela cooperação nas análises de expressão gênica.

Ao amigo Diego, pela colaboração nas Análises Estatísticas, dentre outras.

Aos amigos que fiz em Viçosa, especialmente ao David, Fernanda, Rebeca e Amanda por terem compartilhado comigo momentos bons e ruins, nessa longa jornada na pós-graduação.

A todos os Professores do PPG Fisiologia Vegetal da UFV, pelos ensinamentos por meio das disciplinas e colaboração para a realização deste trabalho.

Ao funcionário José Carlos (Cal), pela ajuda essencial no cultivo e trato das plantas.

A Deus, que sempre me protegeu, capacitou e ajudou até aqui.

A todos os demais, que de maneira direta, ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	3
Objetivo geral	3
Objetivos específicos	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1.....	7
Caracterização de mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na tolerância diferencial ao déficit hídrico em soja.....	7
RESUMO	7
INTRODUÇÃO	9
METODOLOGIAS	11
RESULTADOS.....	23
DISCUSSÃO.....	42
CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
CAPÍTULO 2.....	75
Ajustamento metabólico e expressão de genes responsivos ao déficit hídrico em genótipos de soja.....	68
RESUMO	68
INTRODUÇÃO	70
METODOLOGIAS	72
RESULTADOS.....	76
DISCUSSÃO.....	83
CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
CONCLUSÕES GERAIS.....	97

DADOS SUPLEMENTARES	98
----------------------------------	-----------

RESUMO

SILVA, Adinan Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2017. **Estudo da resistência à seca em soja: avaliações fisiológicas, metabólicas e moleculares.** Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Juraci Alves de Oliveira, Dimas Mendes Ribeiro e Kacilda Naomi Kuki.

A soja é a principal planta leguminosa cultivada no mundo. A elevada demanda pela soja se justifica na importância do seu grão para a alimentação humana e animal. Entretanto, o seu rendimento pode ser afetado pelos estresses abióticos, sendo a seca o fator ambiental mais impactante na sua produtividade. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar linhagens de soja contrastantes para a resistência à seca, mediante avaliações fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Quatro genótipos de soja foram utilizados nos experimentos: cultivar Embrapa 48 (E48), referencial de tolerância ao déficit hídrico e 3 linhagens provenientes do Programa de Melhoramento da Soja da Universidade Federal de Viçosa, previamente caracterizadas como sensível (11644) e tolerantes (11377 e 13241) ao déficit hídrico. As plantas foram avaliadas em três condições: 1) plena irrigação (controle), 2) déficit hídrico (DH) após suspensão da irrigação do solo até atingir potencial hídrico foliar na antemanhã de -1,5 MPa, e 3) reidratação por 3 dias (RH), posterior ao déficit hídrico. Os genótipos 11644, 11377 e E48 alcançaram o potencial hídrico de -1,5 MPa após 8 dias de suspensão da irrigação, contra 10 dias na linhagem 13241. Menor área foliar constitutiva e maior incremento na concentração de ácido abscísico (ABA) foliar permitiram a linhagem 13241 exibir a menor redução no Teor Relativo de Água (TRA), após o déficit hídrico. De maneira inversa, a linhagem 11644 apresentou as maiores reduções no TRA e suculência foliar. O processo fotossintético foi igualmente inibido pelo déficit hídrico em todos os genótipos. Porém, o cultivar tolerante E48 exibiu maior incremento na eficiência no uso da água (EUA). O acúmulo de osmolitos foi mais expressivo nas linhagens 11377 e 13241. Nas análises dos componentes antioxidativos, a linhagem 11644 obteve maiores incrementos na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), maior nível de peroxidação de lipídios e menor atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e dismutase do superóxido (SOD). Adicionalmente nessa linhagem, a glutatona teve limitada atuação contra o estresse oxidativo induzido pelo déficit hídrico. Na linhagem 13241, maiores incrementos na atividade da CAT, SOD, peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase da glutatona (GPX) indicam a participação efetiva dessas enzimas antioxidantes na defesa contra o estresse. No cultivar E48, metabólitos antioxidantes,

como a glutatona e ascorbato, demonstraram papel mais importante. A partir desses resultados, pôde-se corroborar que dentre as linhagens, a 11644 foi a mais sensível ao déficit hídrico, enquanto a 13241 foi a mais tolerante. Por essa razão, a linhagem 11377 foi excluída das análises de perfil metabólico e expressão gênica. A avaliação do perfil metabólico demonstrou que a resposta dos genótipos ao déficit hídrico foi direcionada para o ajustamento osmótico, pelo aumento dos aminoácidos, carboidratos e poliaminas. Contudo, não foi possível por meio do perfil metabólico discernir níveis de tolerância ao déficit hídrico entre os genótipos. A análise da expressão gênica via PCR real time foi realizada somente com as linhagens 11644 e 13241. Os resultados não apresentaram diferenças significativas para a maioria dos genes avaliados, mas foi possível identificar um padrão evidente de resposta ao se observar as médias dos resultados. Genes diretamente envolvidos com: mecanismos de resistência à seca, biossíntese do ABA, defesas antioxidantes e fatores de transcrição responsivos a estresses, apresentaram aumento na expressão na linhagem 13241. Em conclusão, a linhagem 13241 apresenta maior tolerância ao déficit hídrico em comparação a 11377, e ainda, se equipara na maioria das respostas com aquelas apresentadas pelo cultivar E48. Por outro lado, os resultados evidenciam que a linhagem 11644 se mostra sensível ao déficit hídrico. Conclui-se também que a reidratação das plantas por 72 horas propiciou a recuperação da maioria dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos para os mesmos níveis do tratamento controle. Todos esses resultados são importantes para a identificação e caracterização de mecanismos de tolerância de plantas cultivadas, que posteriormente poderão ser utilizados em Programas de Melhoramento da Qualidade da Soja, visando à geração de genótipos mais resistentes à seca.

ABSTRACT

SILVA, Adinan Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2017. **Study of drought resistance in soybean: physiological, metabolic and molecular evaluations.** Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-advisers: Juraci Alves de Oliveira, Dimas Mendes Ribeiro and Kacilda Naomi Kuki.

Soybean is the main oilseed crop grown in the world. The high demand for soybeans is justified by the importance of their grain in human and animal nutrition. However, its yield can be affected by the abiotic stresses, being the drought the most impacting environmental factor in its productivity. However, its yield can be affected by the abiotic stresses, being the drought the most impacting environmental factor in its productivity. Therefore, the goal of this work was to identify and characterize contrasting soybean lines for drought resistance, through physiological, biochemical and molecular evaluations. Four soybean genotypes were used in the experiments: cultivar Embrapa 48 (E48), reference for tolerance to water deficit and 3 lines from the Programa de Melhoramento da Soja da Universidade Federal de Viçosa, one previously characterized as sensitive (11644) and two tolerant (11377 and 13241) to the water deficit. Plants were evaluated under three conditions: 1) full irrigation (control), 2) water deficit (DH) after suspension of soil irrigation until reaching leaf water potential in the morning of -1.5 MPa, and 3) Rehydration for 3 days (RH), after the water deficit. The genotypes 11644, 11377 and E48 reached the water potential of -1.5 MPa after 8 days of irrigation suspension, versus 10 days in the line 13241. Lower constitutive leaf area and greater increase in abscissic acid (ABA) foliar concentration allowed the line 13241 exhibits the lowest reduction in Relative Water Content (TRA), after water deficit. Conversely, the line 11644 presented the greatest reductions in TRA and foliar succulence. The photosynthetic process was similarly inhibited by water deficit in all genotypes, through intense diffusive restriction. However E48 tolerant genotype exhibited a greater increase in water use efficiency (WUE). The accumulation of osmolytes was more expressive in lines 11377 and 13241. In the analysis of the antioxidative components line 11644 showed higher increases in the concentration of reactive oxygen species (ROS), higher level of lipid peroxidation and lower activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). Additionally, glutathione had limited action against the oxidative stress induced by the water deficit in line 11644. In line 13241, greater increases in the activity of CAT, SOD, ascorbate peroxidase (APX) and glutathione peroxidase (GPX) indicate the effective participation

of antioxidative enzymes in defense against stress. In E48 antioxidant metabolites, such as glutathione and ascorbate have been shown to play a more important role. From these results it was possible to corroborate that 11644 is the most sensitive line to the water deficit, whereas the 13241 is the most tolerant. Therefore, line 11377 was excluded from metabolic profile and gene expression analyzes. Metabolic adjustment demonstrated that plants responses to the water deficit was directed to the osmotic adjustment by the increase of amino acids, carbohydrates and polyamines. However, it was not possible through the metabolic profile to discern levels of tolerance to water deficit among genotypes. Gene expression analysis via real time PCR was performed only with the lines 11644 and 13241. The results did not showed significant differences for most evaluated genes, but it was possible to identify an obvious response pattern when observing the results. Genes directly involved in drought resistance mechanisms, such as ABA biosynthesis, antioxidant defenses and stress-responsive transcription factors, apparently have most strongly induced expression in line 13241. In conclusion, line 13241 is more tolerant to water deficit than 11377, and most of its responses match those of tolerant reference genotype E48. Line 11644 is a soybean genotype sensitive to water deficit. It was also concluded that the plants rehydration for 72 hours provided the recovery of physiological and biochemical parameters for the same levels of control treatment. All these results are important for the identification and characterization of tolerance mechanisms of cultivated plants, which can later be used in Soybean Quality Improvement Programs, aiming at the generation of more drought resistant genotypes.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, o agronegócio se tornou a principal atividade econômica do Brasil, tendo a soja como o seu principal produto (Rio et al., 2016). No cenário agrícola mundial, o Brasil destaca-se como o segundo colocado no ranking de produção e o primeiro na exportação de soja (Battisti et al., 2017). O chamado “Complexo Soja” (grão, farelo e óleo) apresenta-se como importante componente da economia brasileira, com receita prevista de US\$ 30 bilhões em exportações para o ano de 2017 (CONAB, 2017; MAPA, 2017). Globalmente, a soja está entre as 4 plantas mais cultivadas, ocupando o primeiro lugar entre as leguminosas, numa área estimada em 6% das terras aráveis (Valliyodan et al., 2017). A elevada demanda mundial pelo grão da soja se justifica na sua importância como fonte de alimento de elevado valor nutricional, e deverá aumentar 25% até 2026 (Foyer et al., 2016; O’Donoghue et al., 2017).

Todas as culturas apresentam perdas no seu rendimento máximo devido estresses abióticos que afetam seu crescimento no campo, sendo a seca o principal fator ambiental adverso enfrentando pelas plantas (Fita et al., 2015). No Brasil, se considerarmos as últimas seis safras de soja, quase todos os estados produtores tiveram queda na produção superior a 10%, ocasionadas principalmente por longos e severos períodos de estiagem ocorridos durante o ciclo da cultura (Hirakuri, 2016).

Uma recente ameaça à agricultura no Brasil e no mundo são os fenômenos climáticos extremos, resultantes das mudanças climáticas globais em curso. Nesse cenário, existe a previsão de aumento nas temperaturas e na frequência e intensidade de eventos de seca, o que deverá afetar diretamente a produção de grãos (Iizumi e Ramankutty, 2015; Lesk et al., 2016). Temperaturas mais elevadas poderão permitir o cultivo em regiões antes muito frias, e a elevação na concentração de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico deverá estimular a fotossíntese e crescimento em plantas de metabolismo C₃, porém esses efeitos não compensarão a redução esperada no rendimento das culturas sob condições quentes e secas (Bitu e Gerats, 2013; Gray et al., 2016).

Quase 50% da superfície terrestre é composta de regiões áridas ou semiáridas, mas muitas são altamente produtivas pelo uso de sistemas de irrigação. Porém, essa prática pode se tornar inviável num futuro próximo e gerar perdas de até 43% na produção atual de alimentos nesses locais (Elliott et al., 2014; Dalin et al., 2017). Essa conjuntura coloca em risco a segurança alimentar das populações humanas, uma vez que serão necessários incrementos de até 80% na produção agrícola para atender a

demanda por alimentos dos 9,2 bilhões de habitantes do planeta, previstos para o ano de 2050 (Keating et al., 2014; Odegard e van der Voet, 2014).

Diante do contexto apresentado, países produtores de grãos, como o Brasil, terão que privilegiar além da rentabilidade o plantio de cultivares mais resistentes a estresses abióticos para garantir a expansão na produtividade das culturas e contribuir para a segurança alimentar. Assim, a busca por genótipos de soja mais resistentes à seca possui relevante importância econômica, ambiental e social.

Apesar de todo o avanço obtido em anos mais recentes, o entendimento acerca das redes de sinalização e respostas à seca ainda permanece fragmentado. A grande variedade de vias ativadas nessa condição e o *crosstalk* com outros estresses abióticos são fatores que dificultam desvendar em detalhes, os mecanismos adjacentes à resistência à seca em plantas (Nakashima et al., 2014; Kooyers, 2015). A aclimação de plantas à seca é possível mediante um conjunto de alterações fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e moleculares, as quais podem ser reunidas nas estratégias de escape, de evitação e de tolerância (Salehi-Lisar e Bakhshayeshan-Agdam, 2016).

O escape ocorre pelos ajustes no ciclo de vida e de crescimento da planta, de forma a se desenvolver e reproduzir, antes que o seu ambiente se torne excessivamente seco. Logo, essa resposta depende diretamente das condições ambientais, embora o genótipo da planta também possa influenciar (Akhtar e Nazir, 2013; Kooyers, 2015).

A evitação é uma estratégia de preservação de um elevado potencial hídrico na planta e aumento na eficiência no uso da água (EUA), por meio da redução da transpiração foliar e crescimento do sistema radicular, evitando a desidratação durante períodos mais curtos de seca no ambiente (Blum, 2005; Luo, 2010; Kooyers, 2015).

A tolerância à seca pode ser entendida como a capacidade da planta em manter suas atividades fisiológicas funcionando, ainda que em nível mais baixo, diante de um déficit hídrico severo (Luo, 2010; Fang e Xiong, 2015). Isso é possível por meio da regulação de processos fisiológicos, de vias metabólicas e da expressão de genes de proteínas e metabólitos de defesa, que em conjunto, atuam no sentido de reduzir e reparar os danos decorrentes do estresse (Hu e Xiong, 2014).

Cada uma dessas estratégias pode apresentar-se como uma resposta constitutiva da planta, ou como uma resposta plástica hereditária, que depende de sinais ambientais, como o déficit hídrico no solo. As estratégias de evitação e tolerância à seca são as mais comuns e podem ser combinadas numa mesma planta, dependendo da espécie, da fase de desenvolvimento e das características do ambiente, o que torna o estudo desse tema ainda mais complexo (Varshney et al., 2014; Zhou et al., 2014; Yildirim e Kaya, 2017).

O déficit hídrico no solo resultante da seca, afeta o crescimento e produtividade da soja independente das fases de desenvolvimento da planta. Apesar da soja ser mais sensível na fase reprodutiva, a ocorrência de déficit hídrico expressivo durante estádios vegetativos pode acarretar em reduções de até 40% no rendimento de grãos e ainda, reduz a qualidade das sementes (Thao e Tran, 2012; Krishnan et al., 2014). Além disso, déficit hídrico prolongado em campo pode causar a morte prematura das plantas ainda durante o crescimento vegetativo e resultar na total perda da colheita (Fita et al., 2015).

Os mecanismos que permitem a planta se aclimatar à seca, geralmente se contrapõem a uma elevada produtividade, uma vez que a alocação de recursos precisa ser destinada tanto para aclimação ao estresse, quanto para o seu rendimento (Griffiths e Paul, 2017). Por essa razão, avaliar as plantas durante o crescimento vegetativo pode ser uma forma de evitar essa competição e permitir a máxima expressão do caráter de resistência do genótipo.

Dada a importância da soja como alimento e o grande impacto negativo da seca na sua produtividade, genótipos que apresentam maior resistência ao déficit hídrico são importantes para a segurança alimentar no futuro. O melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares que diferenciam resistência de suscetibilidade ao déficit hídrico entre linhagens de soja, pode ser utilizado na geração de cultivares mais tolerantes, mediante abordagens clássicas de melhoramento genético, juntamente com ferramentas da Biotecnologia. Adicionalmente, esse estudo contribui para elucidar a complexa maquinaria biológica que governa o intrincado tema da resistência à seca em plantas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar genótipos de soja resistentes à seca, mediante um conjunto de avaliações fisiológicas, bioquímicas e moleculares.

2.2. Objetivos específicos

Selecionar linhagens de soja do Banco de Germoplasma do Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO-UFV), a partir de dados obtidos em campo para a tolerância diferencial ao déficit hídrico no solo, expor as plantas a diferentes condições hídricas e avaliar:

- a) O *status* hídrico;
- b) O crescimento da parte aérea e do sistema radicular;
- c) O funcionamento do aparato fotossintético, por meio das trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e a concentração de pigmentos cloroplastídicos;
- d) O potencial osmótico e a concentração de solutos orgânicos;
- e) O acúmulo de espécies reativas de oxigênio, os danos em membranas celulares e as respostas do metabolismo antioxidativo enzimático e não enzimático;
- f) O perfil hormonal;
- g) O perfil metabólico;
- h) A expressão de genes de resistência à seca.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhtar I, Nazir N (2013) Effect of waterlogging and drought stress in plants. **Int J Water Resources Environ Sci** 2: 34–40
- Battisti R, Sentelhas PC, Boote KJ, GMS, Farias JRB, Basso CJ (2017) Assessment of soybean yield with altered water-related genetic improvement traits under climate change in Southern Brazil. **Eur J Agron** 83: 1-14
- Bitá CE, Gerats T (2013) Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Front Plant Sci** 4: 273. doi: 10.3389/fpls.2013.00273.
- Blum A (2005) Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential-are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? **Aust J Agric Res** 56: 1159–1168
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (2017). **Acompanhamento da safra brasileira – grãos**. V.8, Safra 2016/17. Décimo levantamento, Brasília, pp 1-166.
- Dalin C, Wada Y, Kastner T, Puma NJ (2017) Groundwater depletion embedded in international food trade. **Nature** 543: 700–704
- Elliott J, Deryng D, Müller C et al. (2014) Constraints and potentials of future irrigation water availability on agricultural production under climate change. **Proc Natl Acad Sci** 111: 3239–3244
- Fang Y, Xiong L (2015) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cell Mol Life Sci** 72: 673–689
- Fita A, Rodríguez-Burruezo A, Boscaiu M, Prohens J, Vicente O (2015) Breeding and domesticating crops adapted to drought and salinity: A new paradigm for increasing food production. **Front Plant Sci** 6:978. doi: 10.3389/fpls.2015.00978

Foyer CH, Lam H-M, Nguyen HT et al. (2016) Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. **Nat Plants** 2;2: 16112. doi: 10.1038/nplants.2016.112

Gray SB, Dermody O, Klein SP et al. (2016) Intensifying drought eliminates the expected benefits of elevated carbon dioxide for soybean. **Nat Plants** 16132 16132. doi: 10.1038/NPLANTS.2016.132

Griffiths CA, Paul MJ (2017) Targeting carbon for crop yield and drought resilience. **J Sci Food Agric**. doi: 10.1002/jsfa.8501

Hirakuri MH (2016) Impactos econômicos de estresses na produção de soja da safra 2015/16. **Circular Técnica 125- Embrapa**, Londrina, pp 1-8

Hu H, Xiong L (2014) Genetic Engineering and Breeding of Drought-Resistant Crops. **Annu Rev Plant Biol** 65: 715–41

Iizumi T, Ramankutty N (2015) How do weather and climate cropping área and intensity? **Glob Food Sec** 4: 46-50

Keating BA, Herrero M, Carberry PS, Gardner J, Cole MB (2014) Food wedges: Framing the global food demand and supply challenge towards 2050. **Glob Food Sec** 3: 125–132

Kooyers NJ (2015) The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. **Plant Sci** 234:155-162

Krishnan P, Singh R, Verma APS, Joshi DK, Singh S (2014) Changes in seed water status as characterized by NMR in developing soybean seed grown under moisture stress conditions. **Biochem Biophys Res Commun** 444: 485–490

Lesk C, Rowhani P, Ramankutty N (2016) Influence of extreme weather disasters on global crop production. **Nature** 7;529 (7584): 84-7. doi: 10.1038/nature16467

Luo LJ (2010) Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. **J Exp Bot** 61: 3509–3517

MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária) (2017) <http://www.agricultura.gov.br/>. Acessado em 18 de julho, 2017.

Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2014) The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Front Plant Sci** 5: 170. doi: 10.3389/fpls.2014.00170

O'Donoghue EJ, Hansen J, Stallings D (2017) USDA Agricultural Projections to 2026. **World Agricultural Outlook Board, U.S. Department of Agriculture**, pp 1-106

Odegard IYR, van der Voet E (2014) The future of food - Scenarios and the effect on natural resource use in agriculture in 2050. **Ecol Econ** 97: 51–59

Rio A, Sentelhas PC, Farias JRB, Sibaldelli RNR, Ferreira RC (2016) Alternative sowing dates as a mitigation measure to reduce climate change impacts on soybean yields in southern Brazil. **Int J Climatol** 36: 3664–3672

Salehi-Lisar S.Y., Bakhshayeshan-Agdam H. (2016) Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. In: Hossain M, Wani S, Bhattacharjee S, Burritt D, Tran LS (Eds) **Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1**. Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-319-28899-4_1

Thao NP, Tran LP (2011) Potentials toward genetic engineering of drought tolerant soybean. **Crit Rev Biotechnol** 32: 349-362

Valliyodan B, Ye H, Song L, Murphy M, Shannon JG, Nguyen HT (2017) Genetic diversity and genomic strategies for improving drought and waterlogging tolerance in soybeans. **J Exp Bot** 68: 1835–1849

Varshney RK, Thudi M, Nayak SN et al. (2014) Genetic dissection of drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Theor Appl Genet** 127: 445–462

Yıldırım K, Kaya Z (2017) Gene regulation network behind drought escape, avoidance and tolerance strategies in black poplar (*Populus nigra* L.) **Plant Physiol Biochem** 115: 183-199

Zhou P, An Y, Wang Z, Du H, Huang B (2014) Characterization of gene expression associated with drought avoidance and tolerance traits in a perennial grass species. **PLoS One** 25;9(8): e103611. doi: 10.1371/journal.pone.0103611

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO DÉFICIT HÍDRICO EM SOJA

Resumo

A seca é o principal fator abiótico limitante da produtividade agrícola, capaz de gerar grande impacto no rendimento das culturas. Considerando a importância da soja como fonte de alimento, justifica-se a busca por genótipos que apresentam maior resistência ao déficit hídrico. Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar mecanismos fisiológicos e bioquímicos, envolvidos na tolerância diferencial ao déficit hídrico em 4 genótipos de soja: linhagem 11644 (sensível ao déficit hídrico), cultivar Embrapa 48 (E48) e linhagens 111377 e 13241 (tolerantes ao déficit hídrico). Ao atingirem o estágio de desenvolvimento V4, foi suspensa a irrigação das plantas e realizadas coletas e avaliações em dois momentos: quando os genótipos apresentaram potencial hídrico foliar na antemanhã de $-1,5 \pm 0,2$ MPa e também, ao terceiro dia de reidratação (RH), posterior ao déficit hídrico. O cultivar E48 e as linhagens 11644 e 11377, alcançaram o potencial hídrico de referência ($-1,5 \pm 0,2$ MPa) no oitavo dia após a suspensão da irrigação. Na linhagem 13241, foram necessários dez dias. Nesse genótipo, o maior acúmulo de ácido abscísico e reduzida área foliar são características que contribuíram para a perda mais lenta de água, resultando na menor queda no seu Teor Relativo de Água (TRA) e, menor redução no crescimento da parte aérea. Resultados contrários a esses foram observados na linhagem 11644. O processo fotossintético foi inibido de maneira semelhante em todos os genótipos, porém, o cultivar tolerante E48 apresentou melhor eficiência no uso da água (EUA) e ainda, menores quedas na taxa de transporte de elétrons (ETR) e rendimento quântico efetivo do fotossistema II. Isso denota maior eficiência do processo fotossintético, durante o déficit hídrico. Maior incremento na concentração de zeatina sugere o cultivar E48 como mais apto em atrasar a senescência foliar induzida pelo déficit hídrico. O ajustamento osmótico foi um mecanismo de tolerância à seca registrado em todos os genótipos, porém, o acúmulo de osmolitos, tais como aminoácidos livres e glicina betaína, foram mais expressivos nas linhagens 11377 e 13241. Considerando o estresse oxidativo induzido pelo déficit hídrico, a linhagem 11644 apresentou maiores incrementos nos teores de espécies reativas de oxigênio e no nível de peroxidação de

lipídios e ainda, ineficiente atividade da enzima catalase (CAT) e do metabolismo da glutathione. Na linhagem 13241, componentes enzimáticos demonstraram relevante atuação na tolerância ao estresse oxidativo, ao se considerar os maiores incrementos na atividade da CAT, superóxido dismutase (SOD) e ainda, na peroxidase do ascorbato (APX). Embora a linhagem 11377 também tenha apresentado algumas respostas de tolerância relevantes no déficit hídrico, o grande incremento na concentração de H_2O_2 , junto com a ausência de incrementos na atividade da APX, sugerem mecanismos antioxidantes menos robusto nesse genótipo. No cultivar E48, resultados do metabolismo da glutathione e do ascorbato indicam importante participação desses metabólitos antioxidativos na tolerância ao estresse. Comparados ao cultivar E48, referencial de tolerância à seca, pôde-se concluir que o genótipo de soja 11644 é o mais sensível ao déficit hídrico e o 13241, o mais tolerante. A reidratação das plantas por 3 dias propiciou, na maioria dos casos, recuperação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos para os mesmos níveis do controle.

Palavras chave: ajustamento osmótico, antioxidantes, fotossíntese, fluorescência da clorofila, fitohormônios, seca.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta leguminosa cultivada de grande importância na alimentação humana e animal, pelo elevado teor de proteína e óleo no seu grão (Day, 2013). Atualmente, também é considerada importante matéria-prima para a produção de biodiesel (Oliveira e Coelho, 2017).

A grande demanda pela soja e seus produtos em todo o mundo contribui para um elevado grau de investimentos em Ciência e Tecnologia, no sentido de aumentar o seu rendimento de grãos. Entretanto, o potencial produtivo da soja é afetado por fenômenos climáticos extremos, como a seca (Rose et al., 2016). A seca gera déficit hídrico no solo e as plantas respondem ativamente a esse estímulo, iniciando uma série de alterações fisiológicas e bioquímicas no seu metabolismo, no sentido de aclimatar-se à nova condição no seu ambiente. Esse processo de aclimação pode envolver diferentes estratégias de resistência à seca, como evitação e tolerância (Fang e Xiong, 2015).

Em resposta ao déficit hídrico, o fitormônio ácido abscísico (ABA) promove evitação ao estresse, ao induzir o rápido fechamento estomático. Assim, evita a perda excessiva de água via transpiração foliar, mantendo a hidratação dos tecidos e contribuindo para maior resistência à seca (Lim et al., 2015). Outros fitormônios endógenos, como as citocininas e o etileno também alteram o metabolismo da planta durante o déficit hídrico, mas essas respostas muitas vezes são inconstantes devido ao *cross-talk* entre esses compostos (Peleg e Blumwald, 2011; Daszkowska-Golec e Szarejko, 2013).

Com o fechamento estomático, ocorre limitação na difusão de gases através dos estômatos, reduzindo a disponibilidade de CO₂ para a enzima Rubisco, resultando na diminuição da taxa fotossintética. Além disso, o fechamento estomático diminuiu a demanda por poder redutor na etapa bioquímica da fotossíntese (Flexas et al., 2004; Chaves et al., 2009; Lauteri et al., 2014). Plantas expostas ao déficit hídrico severo, juntamente com elevada irradiância, recebem excesso de energia de excitação sobre os fotossistemas, o que pode acarretar num estado de “super-redução” dos componentes da cadeia de transporte de elétrons nos cloroplastos e promover a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Dinakar et al., 2012; Dahal et al., 2015; Zhang et al., 2016).

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o ânion superóxido (O₂^{•-}) são ROS altamente reativas, capazes de desencadear danos oxidativos aos componentes da maquinaria fotossintética, promovendo assim a fotoinibição do fotossistema II (PSII) (Nishiyama e Murata, 2014; Gururani et al., 2015). Uma forma eficiente de verificar o *status*

fisiológico do aparato fotossintético em plantas expostas a estresses ambientais, incluindo o déficit hídrico, se faz mediante a avaliação da fluorescência da clorofila (Zivcak et al., 2013), uma ferramenta útil e apropriada para estimar a inibição e/ou os danos ao PSII (Boureima et al., 2012; Guan et al., 2015; Su et al., 2015).

Em condições normais de crescimento, há um equilíbrio entre a geração e a eliminação de ROS na planta, mas em situações de estresse esse equilíbrio fica prejudicado, levando ao acúmulo desses compostos tóxicos na célula (Choudhury et al., 2016). O principal alvo das ROS são os fosfolipídios de membrana, induzindo desarranjo na bicamada lipídica e perda da compartimentalização celular. Adicionalmente, as ROS são capazes de causar danos ao DNA, oxidação de proteínas e inibição enzimática (Carvalho, 2008; Anjum et al., 2015). Para reduzir os danos gerados pelas ROS, eficientes sistemas de defesa antioxidativos enzimáticos e não enzimáticos atuam de maneira coordenada sob condições de estresse, no sentido de manter a homeostase intracelular (You e Chan, 2015).

Outro importante mecanismo de tolerância em plantas sob déficit hídrico é o ajustamento osmótico (AO), que se refere ao acúmulo de substâncias osmoticamente ativas na célula, tais como carboidratos, aminoácidos e compostos nitrogenados. O AO aumenta a concentração da solução celular e reduz o seu potencial osmótico, contribuindo para uma maior retenção hídrica na célula e também, manutenção da absorção de água pelas raízes em solos secos (Kido et al., 2013; Singh et al., 2015). Além de promover AO, o acúmulo de solutos compatíveis confere osmoproteção e auxilia na defesa da planta contra efeitos danosos do déficit hídrico, por meio da eliminação de ROS, proteção da integridade de membranas, estabilização de proteínas e enzimas (Blum, 2017).

A seca é um grande desafio a ser superado para aumentar a produção agrícola nas próximas décadas e assim, garantir o suprimento adequado de alimentos para a crescente população mundial (Mickelbart et al., 2015). Nesse cenário, a soja brasileira destaca-se pela elevada produtividade em campo e possibilidade de expansão das lavouras, capazes de manter o país como principal fornecedor mundial do grão no futuro. Entretanto, esse potencial pode estar ameaçado pela intensificação e recorrência de eventos de seca nas regiões produtoras (Daryanto et al., 2015).

A multiplicidade de vias envolvidas na resistência à seca torna difícil e complexa a tarefa de aumentar a expressão dessa característica em plantas cultivadas. Ao mesmo tempo, o desenvolvimento de culturas mais resilientes se faz necessário, devido à ameaça que as mudanças climáticas representam para a agricultura no mundo

(Basu, et al., 2016). Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na tolerância diferencial ao déficit hídrico em genótipos de soja.

2. METODOLOGIAS

2.1. Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental

Na safra 2013/2014 foram cultivadas em campo nos Estados de Minas Gerais e Bahia, linhagens de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] para ensaios de VCU (*Valor de Cultivo e Uso*). Essas linhagens foram obtidas a partir de cruzamentos realizados pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante o cultivo, a escassez de chuvas nas regiões permitiu separar os genótipos em resistentes e suscetíveis à seca, por meio de análises visuais.

A partir dos resultados obtidos em campo foi realizado um experimento em casa de vegetação, entre os meses de outubro a dezembro do ano de 2014, no qual avaliou-se a tolerância diferencial ao déficit hídrico em 12 linhagens de soja, mediante análises de crescimento e do processo fotossintético. Nesse ensaio, as linhagens 11377 e 13241 apresentaram maior tolerância ao déficit hídrico, enquanto a linhagem 11644 foi o genótipo mais sensível, considerando parâmetros como taxa fotossintética líquida (A_n), eficiência instantânea no uso da água (EUA) e rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\phi PSII$), além da intensidade de murcha foliar, por meio de avaliação visual das plantas. Nos experimentos posteriores, juntamente com as linhagens 11644, 11377 e 13241, o cultivar de soja Embrapa 48 (E48), produzido e comercializado pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), também foi utilizado nos experimentos, servindo como referencial de tolerância ao déficit hídrico (Kido et al., 2013).

Os quatro genótipos de soja foram cultivados em casa de vegetação do BIOAGRO/UFV, entre os meses de janeiro a abril e setembro a dezembro, dos anos 2015 e 2016. As sementes foram germinadas em substrato comercial e após 7 dias, 4 plantas foram transplantadas para vasos com capacidade para 10 litros, contendo 8 kg de uma mistura de 2:1 de solo/areia, adubada com NPK (Nitrogênio/Fósforo/Potássio: 04-14-08) e cultivadas sob condições de temperatura e umidade parcialmente controladas. A temperatura média e umidade média durante os experimentos foram de 38°C e 15°C, e de 97% e 43%, máximas e mínimas, respectivamente.

As plantas foram mantidas em condições de plena irrigação (controle) até atingirem o estágio de desenvolvimento V4 (quarto nó, terceiro trifólio expandido e a quarta folha trifoliolada aberta), quando foi suspensa a irrigação de um grupo de plantas por até 10 dias, até resultar num potencial hídrico foliar na antemanhã ($\Psi_{w_{am}}$) de $-1,5 \pm 0,2$ MPa, valor que caracteriza uma condição de estresse severo para soja (Mesquita, 2013). Nesse momento, foram realizadas avaliações não destrutivas e coleta de material vegetal para as análises posteriores. Além dos tratamentos controle (C) e do déficit hídrico (DH), um terceiro grupo de plantas também foi mantido sem água até propiciar um $\Psi_{w_{am}}$ foliar de $-1,5 \pm 0,2$ MPa, quando as plantas foram reidratadas (RH) e mantidas sob plena irrigação durante 3 dias, sendo posteriormente avaliadas e coletadas.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado (C, DH e RH) e o segundo, aos genótipos de soja (linhagens 11644, 11377 e 13241; cultivar Embrapa 48), com 5 repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo posteriormente aplicado um teste de médias, Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o software RBio (Bhering, 2017).

2.2. Potencial hídrico foliar, Teor relativo de água (TRA %) e Suculência foliar

O *status* hídrico das plantas foi acompanhado por meio de medições diárias do potencial hídrico foliar, a partir do sexto dia de imposição do déficit hídrico, até resultar num potencial hídrico foliar na antemanhã ($\Psi_{w_{am}}$) de $-1,5 \pm 0,2$ MPa, sempre na folha mais jovem, completamente expandida e sem diagnóstico fitossanitário. As medições foram realizadas entre 04:00h e 06:00h, utilizando-se uma bomba de pressão do tipo Scholander (Scholander et al., 1965).

O teor relativo de água (TRA) foi obtido a partir de 10 discos foliares com 0,5 cm de diâmetro cada, coletados de folhas completamente expandidas, localizada na altura mediana de cada planta e logo em seguida, pesados em balança de precisão para obter a massa fresca (MF). Posteriormente, os discos foram transferidos para placas de Petri, onde permaneceram submersos em água, durante seis (6) horas. Em seguida, os discos foram novamente pesados para determinar a massa túrgida (MT) e colocados para secar à 70°C por 72 horas, para obtenção da massa seca (MS) (Catsky, 1974). Os valores de TRA (%) foram obtidos a partir da seguinte fórmula:

$$\text{TRA (\%)} = \frac{(MF - MS)}{(MT - MS)} \times 100$$

A suculência foliar foi calculada pela razão MF/A , onde MF representa a massa fresca, e A representa a área de 10 discos foliares de 0,5 cm de diâmetro, conforme descrito por Silveira et al. (2009).

2.3. Análises de crescimento e biométricas

As análises de crescimento foram realizadas somente nos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). A taxa de crescimento relativo (TCR) da parte aérea foi determinada de acordo com metodologia de Hunt (1978). A área foliar total foi medida através do equipamento integrador de área foliar (Licor- LI-3100C). O comprimento de raízes foi obtido com régua graduada em centímetros. O volume radicular foi avaliado mediante o deslocamento de água numa proveta graduada ao se inserir a massa radicular, sendo os valores expressos em cm^3 . A massa de matéria seca das raízes e da parte aérea foi obtida após secagem do material vegetal em estufa de ventilação forçada ($65 \pm 5^\circ\text{C}$), até atingir massa constante. A razão Raiz/PA foi obtida a partir da razão entre a massa seca radicular e da parte aérea (MS/MS).

2.4. Concentração de pigmentos foliares, Trocas gasosas e Fluorescência da clorofila *a*

Os pigmentos foliares foram extraídos de 2 (dois) discos foliares de 0,5 cm de diâmetro, utilizando-se 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), durante 6 horas de incubação a 65°C . As concentrações de (clorofilas *a*, *b* e carotenoides) foram determinadas em espectrofotômetro UV-visível, nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm, respectivamente, e calculadas de acordo com as equações propostas por Wellburn (1994) e os resultados expressos em mg g^{-1} MF.

As trocas gasosas foram avaliadas com um analisador de gases do infravermelho (IRGA), equipado com um fluorômetro (modelo LI-6400xt, LI-COR Inc., Lincoln, USA). Os seguintes parâmetros foram obtidos: assimilação líquida do CO_2 (A_n), condutância estomática de vapor d'água (g_s) e taxa transpiratória (E), sempre no quarto trifólio completamente expandido (V4). As medições foram realizadas entre 08:00h e 11:00h, utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração atmosférica de CO_2 , temperatura e umidade ambientes. A eficiência instantânea do uso da água (EUA) foi calculada pela razão A/E .

As variáveis de fluorescência da clorofila foram obtidas na mesma folha utilizada na medição das trocas gasosas, utilizando o fluorômetro acoplado ao IRGA. Com as variáveis registradas nas plantas adaptadas ao claro e ao escuro, foram obtidos

e/ou calculados os seguintes parâmetros: o rendimento quântico potencial do PSII (F_v/F_m), o rendimento quântico efetivos do fluxo linear de elétrons pelo PSII (ϕ_{PSII}) e a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) (Genty et al., 1989; Bilger et al., 1995), os rendimentos quânticos da dissipação regulada de energia $Y(NPQ)$ e dissipação não regulada de energia $Y(NO)$ e a estimativa de centros de reações abertos do PSII (qL) (Kramer et al., 2004).

2.5. Quantificação de fitohormônios

Os hormônios foram extraídos, segundo metodologia descrita por Müller e Munné-Bosch (2011), com modificações. Foram adicionados 400 μ l de solução extratora (metanol:isopropanol:ácido acético 20:79:1) em 20 mg de tecido foliar. Em seguida, as amostras foram agitadas por 20 segundos e posteriormente, colocadas em banho de gelo por 30 minutos. Após centrifugação (13000g, 10 min a 4°C), 350 μ l do sobrenadante foram coletados para novo tubo. Ao pellet resultante, repetiu-se o processo de extração e, em seguida, juntaram-se os dois sobrenadantes. Uma última centrifugação (20.000 g, 5 min a 4°C) foi realizada para remoção dos restos de tecido em suspensão e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

O extrato obtido foi automaticamente injetado (5 μ l) no sistema LC-MS/MS utilizando o equipamento modelo Agilent 1200 Infinity Series, acoplado ao espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo (QqQ), modelo 6430 Agilent Technologies. Uma curva de calibração (0.1ng a 200 ng) utilizando os padrões de cada hormônio foi realizada para a obtenção da quantificação absoluta. Os dados gerados foram analisados no software “MassHunter Workstation” para obtenção da área dos picos de cada hormônio nas amostras e os resultados expressos em μ g g⁻¹ MS.

2.6. Potencial osmótico

A determinação do potencial osmótico da planta foi realizada em amostras de folhas, previamente congeladas a -20 °C, após a coleta. A seiva foliar foi extraída por compressão da amostra descongelada. Após extração, a seiva foi centrifugada durante 10 minutos a 5.000 rpm. Em seguida, 10 μ L do sobrenadante foram coletados para leitura da osmolalidade num osmômetro de pressão de vapor (Vapro 5520 - Wescor). Os valores de potencial osmótico foram obtidos mediante o uso da equação de Van't Hoff (Souza et al., 2012), e os resultados convertidos para MPa.

2.7. Extração etanólica para análises de metabólitos e proteínas solúveis

Alíquotas de aproximadamente 10 mg de material vegetal liofilizado (folha) foram adicionadas a 250 μ L de etanol 98%, incubadas por 20 min a 80 °C e posteriormente centrifugadas a 17.000 *g* por 10 min a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado e com o pellet resultante, outras duas extrações sequenciais foram realizadas, conforme descrito acima, porém utilizando 250 μ L de etanol 80% e posteriormente, 50%. Os sobrenadantes obtidos com as extrações foram combinados e utilizados na determinação de aminoácidos livres e açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose). O pellet resultante das extrações foi utilizado para a determinação das concentrações de amido e de proteínas solúveis.

2.7.1. Determinação da concentração de aminoácidos livres

A concentração de aminoácidos livres foi avaliada conforme descrito por Gibon et al. (2004). Para a reação, foram combinados 10 μ L do extrato etanólico, 40 μ L de etanol 70%, 50 μ L de tampão citrato pH 5,2 contendo ácido ascórbico 0,2 % (p/v) e 100 μ L de ninhidrina 1% (p/v) em etanol 70% (v/v). A reação foi incubada a 95 °C por 20 min no escuro e posteriormente lida no comprimento de onda de 570 nm. A concentração de aminoácidos livres nas amostras foi determinada utilizando-se curva padrão de leucina e os resultados expressos em μ mol g^{-1} MS.

2.7.2. Determinação da concentração de açúcares solúveis

As concentrações de glicose, frutose e sacarose foram determinadas segundo metodologia de Fernie et al. (2001). Alíquota de 10 μ L de extrato etanólico foi adicionada em 60 μ L de tampão HEPES/KOH 0,1 M pH 7,0, contendo $MgCl_2$ 3 mM, 5 μ L de ATP 60 mg/mL, 5 μ L de $NADP^+$ 36 mg/mL e 0,58 U de desidrogenase da glicose-6-fosfato (G6PDH). Essa solução foi avaliada no comprimento de onda de 340 nm até estabilizar a OD (aprox. 30 min). Em seguida, foram adicionados, sucessivamente, 5 μ L das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U por reação) e invertase (5 U por reação) com intervalos de 40 min entre cada aplicação e 1 min de intervalo entre cada leitura.

Para estimar a concentração da glicose, frutose e sacarose, utilizou-se a seguinte equação, baseada na lei de Lambert-Beer “ μ mol NADPH = $\Delta OD / (2,85 \cdot 6,22)$ ” e os resultados foram expressos em μ mol g^{-1} MS.

2.7.3. Determinação da concentração de proteínas solúveis totais

A concentração de proteínas solúveis totais foi determinada segundo Gibon et al. (2004). O precipitado resultante da extração etanólica foi ressuspensionado em 400 μL de NaOH 0,1 M. As amostras foram incubadas por 1 h a 95 °C sob agitação e após, centrifugadas por 5 min a 14.000 g , sob temperatura de 4 °C. Uma alíquota de 3 μL do sobrenadante foi adicionada a 180 μL da solução do reagente de Bradford (Bradford, 1976) e, posteriormente lida no comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas solúveis nas amostras foi determinada utilizando-se curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) e os resultados expressos em mg g^{-1} MS.

2.7.4. Determinação da concentração de amido

A concentração de amido foi determinada no pellet resultante da extração etanólica, segundo Fernie et al. (2001). Aos tubos contendo o NaOH 0,1 M utilizado na quantificação de proteínas, foram adicionados 70 μL de ácido acético 1 M, seguido de agitação. Uma alíquota de 40 μL da suspensão foi combinada com 60 μL do *mix* de hidrólise do amido, composto pelas enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades μL^{-1}) e α -amilase (0,01 U μL^{-1}).

As amostras foram incubadas por 1 h a 55 °C, sob agitação a 500 rpm. Em seguida, uma alíquota de 10 μL dessa reação foi combinada com 160 μL de tampão Hepes/KOH 0,1M pH 7,0, contendo MgCl_2 3 mM, 5 μL de ATP 60 mg mL^{-1} , 5 μL de NADP^+ 36 mg mL^{-1} e 0,58 U de desidrogenase da glicose-6-fosfato dependente de NADP^+ (G6PDH). Essa nova reação foi lida no comprimento de onda de 340 nm até estabilização da densidade óptica (OD), momento em que foram adicionados 5 μL de hexocinase (2 unidades/reação). As leituras a 340 nm continuaram por mais 60 minutos, com 1 min de intervalo entre cada leitura. A concentração de amido foi estimada indiretamente pela quantidade de glicose resultante da sua degradação e os resultados calculados por meio da equação “ $\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 \times 6,22)$ ” e expressos em $\text{mmol de amido g}^{-1}$ MS.

2.8. Determinação de prolina

A determinação da concentração de prolina foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Shabnam (2016). Amostras de 100 mg de tecido foliar foram homogeneizadas em 1 mL de ácido sulfossalicílico 3% (p/v), seguido de centrifugação a 7.500 rpm por 10 min. Em seguida, foram coletados 100 μL do extrato e adicionados a 200 μL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina; 30 mL de ácido acético

glacial; 20 mL de ácido fosfórico 6M). As amostras foram incubadas por 1 h a 100°C e, em seguida a reação foi paralisada em banho de gelo. As amostras foram lidas no comprimento de onda de 520 nm e as absorbâncias comparadas à curva-padrão de prolina (0 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados foram expressos em $\text{nmol g}^{-1} \text{MF}$.

2.9. Determinação de glicina betaina

A concentração de glicina betaina foi determinada pelo método de Grieve e Grattan (1983) com modificações. Amostras de 250 mg de massa seca de folhas foram agitadas mecanicamente em 20 mL de água desionizada, durante 24 horas a 25 °C. Em seguida, as amostras foram filtradas e diluídas a 1:1 com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4 M. Alíquotas de 0,5 mL foram resfriadas em tubos de água gelada, durante 1 h. Posteriormente, foi adicionado 0,2 mL do reagente iodeto-iodo de potássio (KI-I_2) gelado, seguido de agitação. As amostras foram armazenadas a 4 °C por 16 h e, em seguida, centrifugadas a 10.000 g, durante 15 min a 0 °C, sendo o sobrenadante descartado. O pellet foi dissolvido em 5 mL de 1,2-dicloreto e após 2 horas de agitação, as amostras foram lidas no comprimento de onda de 365 nm. Padrões de referência de betaina (50-500 mg mL^{-1}) foram preparados em H_2SO_4 2 M e utilizados para cálculo da concentração de glicina betaina nas amostras.

2.10. Determinação de ânion superóxido

Cerca de 50 mg de massa fresca de folhas foram homogeneizadas em meio de extração composto por sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 100 μM , NADH 20 μM e tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001). A reação foi iniciada pela introdução de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N. As amostras foram incubadas a 28 °C, sob agitação, por 5 minutos. A leitura da absorbância a 480 nm foi realizada em leitor de microplaca, durante 5 minutos (Misra e Fridovich, 1971; Boveris et al., 2002). A produção de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) foi avaliada pela determinação do adrenocromo acumulado, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Boveris et al., 2002).

2.11. Determinação de peróxido de hidrogênio

Amostras de 100 mg de massa fresca de folhas foram homogeneizadas em meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, e centrifugadas a 10.000g, por 15 minutos, a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo FeNH_4SO_4 100 μM ,

H₂SO₄ 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM (Gay e Gebicki, 2000). Após 30 minutos no escuro, foi determinada a absorbância das amostras a 560 nm. As concentrações de H₂O₂ foram estimadas com base em curva de calibração, preparada com padrões de H₂O₂.

2.12. Determinação da peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios foi estimada pela concentração de malondialdeído (MDA), por meio de teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Amostras de 0,1 g de folhas foram maceradas em 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v), juntamente com polivinilpolipirrolidona (PVPP) 10% (p/p) e em seguida, centrifugadas a 10.000g por 15 minutos a 4 °C. Aliquotas de 250µL do sobrenadante foram adicionadas a 750 µL de solução de TCA 20% (p/v) contendo 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA). No controle negativo foi adicionado TCA 20%, sem TBA. As amostras foram incubadas a 95 °C por 30 minutos e a absorbância lida a 532 nm e 600 nm. A concentração de MDA nas amostras foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Du e Bramlage, 1992).

2.13. Extração enzimática

Os extratos enzimáticos para a determinação da atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) e catalase (CAT, EC 1.11.1.6), foram obtidos pela maceração de, aproximadamente 50 mg de folhas em 1 mL de meio de extração, constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8; EDTA 0,1mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e PVPP 1% (p/v). O extrato foi submetido à centrifugação a 12.000 g, por 15 min, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação da atividade enzimática.

2.13.1. Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD - EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada num meio de reação composto por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 mM; metionina 13 mM, pH 7,8, e de riboflavina 2 µM, juntamente com o extrato enzimático (Giannopolitis e Ries, 1977). A reação foi iniciada pela exposição das amostras à luz fluorescente de 15 watts numa câmara fechada, durante 10 minutos. Após esse período, a quantificação da produção fotoquímica de azul de formazana (produto da reação) foi determinada a 560 nm. O branco consistiu de um meio de reação idêntico ao anterior, porém, mantido no escuro. Uma unidade de SOD foi considerada como a

quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). O resultado foi expresso em U SOD $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.13.2. Determinação da atividade da catalase (CAT - EC 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada pela adição do extrato enzimático ao meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi avaliado a 240 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995) e expresso em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.14. Metabolismo do Ascorbato

2.14.1. Determinação das concentrações de ascorbato (AA) e desidroascorbato (DHA)

Para a determinação das concentrações de ascorbato (AA) e desidroascorbato (DHA), amostras de 100 mg de folhas foram homogeneizadas em TCA 6% (p/v) e posteriormente centrifugadas a 15.000 g por 5 min, a 4 °C (Kampfenkel et al., 1995). Ascorbato total (AA + DHA) foi determinado em alíquotas dos sobrenadante tratadas com ditioneitol (DTT) 0,5 mM e tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4, na temperatura de 42°C, por 15 min. Em seguida, foi adicionado N-etilmaleimida (NEM) 0,025% (p/v), TCA 2,5% (p/v), H_3PO_4 8,4% (v/v), 2,2'-dipiridil 0,8% (p/v) e FeCl_3 0,3% (p/v) e incubou-se novamente a 42 °C, durante 40 min. A reação foi paralisada em banho de gelo e a absorvância determinada a 525 nm.

A concentração de AA foi determinada conforme descrito anteriormente, mas omitindo-se o DTT e o NEM. A concentração de DHA foi calculada pela diferença entre a concentração total (AA + DHA) e a concentração da forma reduzida (AA). As concentrações de AA, DHA e ascorbato total foram estimadas com base em curva de calibração preparada, com padrões e ascorbato e os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

2.14.2. Extração enzimática

Amostras de 250 mg folhas foram maceradas em 1 mL de meio de extração, constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8; EDTA 0,1 mM; PMSF 1mM e PVPP 1% (p/v), para a enzima peroxidase do ascorbato (APX); tampão fosfato de

potássio 50 mM, pH 7,8 e ascorbato 1 mM para a enzima monodesidroascorbato redutase (MDHAR) (Eltayeb et al., 2007) e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; cloreto de sódio 100 mM, EDTA 2 mM e cloreto de magnésio (MgCl_2) 1 mM para a enzima desidroascorbato redutase (DHAR) (Chen e Gallie, 2006). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático.

2.14.3. Determinação da peroxidase do ascorbato (APX - EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi avaliada de acordo com o método de Nakano e Asada, (1981). O meio de reação foi constituído pela adição do extrato enzimático em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0; ácido ascórbico 0,8 mM e H_2O_2 1 mM. A oxidação do ascorbato foi acompanhada pela mudança na absorvância a 290 nm, durante um minuto. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em μmol de ácido ascórbico (AA) $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.14.4. Determinação da redutase do monodesidroascorbato (MDHAR - EC 1.6.5.4)

A atividade da MDHAR foi determinada pela adição do extrato enzimático a um meio de reação, constituído de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6; NADH 0,1 mM; ascorbato 2,5 mM e 0,4 unidades de ascorbato oxidase (Hossain et al., 1984). A variação na absorvância foi avaliada a 340 nm durante o primeiro minuto de reação e a atividade enzimática calculada pelo coeficiente de extinção molar de $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.14.5. Determinação da redutase do desidroascorbato (DHAR - EC 1.8.5.1)

A atividade da DHAR foi determinada de acordo com Nakano e Asada, (1981), pela adição do extrato enzimático em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0; desidroascorbato 2 mM e GSH 5 mM. O meio de reação foi incubado a 30°C e a variação na absorvância avaliada a 265 nm, durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.15. Metabolismo da Glutathione

2.15.1. Determinação da concentração de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

As concentrações de GSH e GSSG foram determinadas de acordo como o método descrito por Griffith (1980). Amostras de aproximadamente 100 mg de massa fresca de folhas foram homogeneizadas em meio constituído de HCl 0,1 M e EDTA 1 mM, seguido de centrifugação a 12.000 *g*, por 10 min a 4 °C. Para a determinação da concentração de glutathione total (GSH+GSSG), 100 µL do sobrenadante foram adicionados a um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,5, NADPH 30 µM e DTNB 0,6 mM [ácido 5,5'-ditio-bis (2- nitrobenzóico)]. Após incubação a 30 °C durante 5 min, foram adicionados 10 µL da enzima redutase da glutathione (50 U mL⁻¹) e a absorvância monitorada durante o primeiro minuto de reação a 412 nm.

Para a determinação da concentração de glutathione oxidada (GSSG), uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi tratada com 10 µL de 2-vinilpiridina (2-VP) durante 60 min a 30°C. Após derivatização da GSH com 2-VP, a concentração de GSSG foi determinada conforme descrito anteriormente para glutathione total. A concentração de GSH foi calculada pela diferença entre as concentrações de glutathione total e de GSSG. As concentrações de GSH e GSSG foram determinadas por meio de curva de calibração, utilizando-se padrões de glutathione e os resultados expressos em µmol g⁻¹ MF.

2.15.2. Determinação da atividade da sintetase da γ-glutamylcisteína (γ-GCS - EC 6.3.2.2)

Amostras de 50 mg de folhas foram maceradas em meio de extração, constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M e EDTA 5 mM (pH 8,0). O homogeneizado obtido foi centrifugado a 25.000 *g* por 10 minutos, a 4 °C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático. A atividade enzimática foi determinada pela adição do extrato em um meio de reação, contendo 10 µmoles de glutamato de sódio, 10 µmoles de L-aminobutirato, 2 µmoles de Na₂EDTA, 0,2 mg de BSA, 20 µmoles de MgCl₂, 5 µmoles do sal dissódico de ATP e 100 µmoles de tampão Tris-HCl, pH 8,2 (Orlowski e Meister, 1971). Após incubação a 37 °C, durante 30 min, a reação foi paralisada pela adição de 100 µL de TCA 50 % (p/v), seguida de centrifugação a 10.000 *g* por 10 min. O teor de fosfato inorgânico foi determinado no sobrenadante pelo método do fosfo-molibdato

(Lindeman, 1958). A atividade da enzima foi representada como μg de P_i liberado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.15.3. Determinação da atividade da redutase da glutathione (GR - EC 1.8.1.7)

Amostras de folhas com aproximadamente 50 mg foram homogeneizadas em meio de extração, contendo tampão fosfato de potássio 0,10 M, pH 7,0; EDTA 1,0 mM, DTT 2,0 mM, PMSF 1,0 mM e PVPV 1% (p/v). O extrato foi centrifugado a 12.000 *g* por 15 min, a 4 °C e o sobrenadante obtido, utilizado para a avaliação enzimática. A atividade da GR foi determinada pelo método de Foyer e Halliwell (1976), pelo monitoramento da oxidação do NADPH dependente de glutathione em 340 nm, à temperatura de 30°C, durante o primeiro minuto da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados expressos em nmoles de NADPH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.15.4. Determinação da atividade da peroxidase da glutathione (GPXs - EC 1.11.1.9)

A atividade da GPX foi determinada em extrato obtido pela maceração de aproximadamente 50 mg folhas em um meio de homogeneização, constituído de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,5, EDTA 1,0 mM e MgCl_2 10 mM (Nagalakshmi e Prasad, 2001). Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 30.000 *g*, durante 10 minutos a 4 °C. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada em um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0; EDTA 1,0 mM; cloreto de sódio 0,114 M; GSH 1,0 mM; NADPH 0,2 mM; H_2O_2 0,25 mM e 1 unidade de redutase da glutathione. A variação na absorvância a 340 nm à temperatura de 30 °C, foi medida no primeiro minuto de reação e a atividade enzimática calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson e Davis, 2004). Os resultados foram expressos em nmoles de NADPH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.16. Concentração de proteínas nos extratos enzimáticos

A determinação da concentração de proteínas nos extratos utilizados na avaliação da atividade enzimática foi realizada pela metodologia proposta por Bradford (1976) no comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão da proteína albumina sérica bovina (BSA).

3. RESULTADOS

3.1. Potencial hídrico foliar

A partir do sexto dia após a suspensão da irrigação, quando as plantas apresentaram murcha foliar, foram iniciadas as avaliações do potencial hídrico foliar na antemanhã. A cultivar E48 e as linhagens 11644 e 11377 atingiram o potencial hídrico em torno de 1,5 MPa no oitavo dia após o início da suspensão da irrigação, enquanto para a linhagem 13241, foram necessários 10 dias (Fig. 1-A). No momento das análises e coletas, os genótipos de soja não apresentaram diferenças no potencial hídrico foliar nos tratamentos controle e déficit hídrico. Além disso, após 3 dias de reidratação todos os genótipos recuperaram o seu *status* hídrico ao nível de seus respectivos controles (Fig. 1-B).

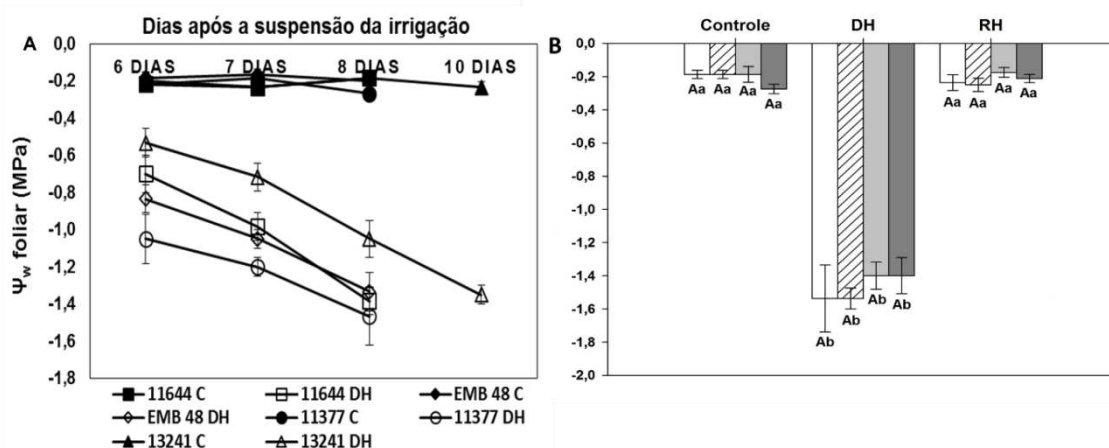


Figura 1. Potencial hídrico foliar na antemanhã em 4 genótipos de soja após imposição do déficit hídrico. Avaliações durante os dias após a suspensão da irrigação (A) e avaliações no oitavo dia (Embrapa 48, 11377 e 11644) e décimo dia (13241) (B), após suspensão da irrigação nos 4 genótipos de soja: 11644 (□), Embrapa 48 (▨), 11377 (▤) e 13241 (▩). Tratamentos: Controle, DH: déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa e RH: 3 dias após reidratação. Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$).

3.2. Teor relativo de água (TRA %) e Suculência foliar

O TRA não diferiu entre os genótipos dentro dos tratamentos controle e RH. Houve queda no tratamento DH, sendo a maior redução registrada para a linhagem 11644 (49%) e a menor para 13241 (25%), quando comparados aos seus respectivos controles. O TRA das plantas reidratadas não diferiu do controle para todos os genótipos (Fig. 2-A).

A suculência foliar reduziu somente na linhagem 11644 e no cultivar E48 após o déficit hídrico. A maior redução na suculência foliar foi verificada na linhagem 11644, em comparação ao seu respectivo controle. Não houve diferença entre os tratamentos controle e RH para todos os genótipos (Fig. 2-B).

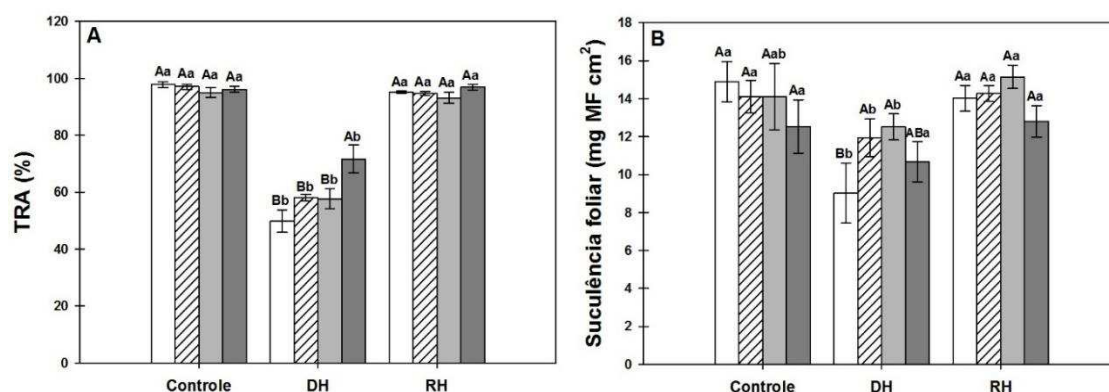


Figura 2. TRA- Teor Relativo de Água (A) e suculência foliar (B) nos 4 genótipos de soja: 11644 (□), Embrapa 48 (▨), 11377 (▤) e 13241 (■), nos tratamentos Controle, déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e após 3 dias de reidratação (RH). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$).

3.3. Análises visuais da parte aérea e raízes das plantas

Todos os genótipos de soja apresentaram murcha foliar evidente ao atingirem potencial hídrico de aproximadamente 1,5 MPa na antemanhã. Além disso, todos recuperaram a turgescência foliar após 3 dias de reidratação (Fig. 3). Não foi possível diferenciar pelo aspecto visual das folhas, qual genótipo apresentou maior murcha foliar após déficit hídrico.

As imagens do sistema radicular das plantas demonstram que houve redução do comprimento e do volume em todos os genótipos, após exposição ao déficit hídrico (Fig. 4). Baseando-se nas imagens do sistema radicular, não foi possível fazer inferências sobre qual genótipo de soja teve o sistema radicular mais afetado pelo déficit hídrico.

3.4. Análises de crescimento das plantas

A TCR reduziu em todos os genótipos após imposição do déficit hídrico. Nessa condição hídrica, o cultivar E48 apresentou maior TCR em relação as linhagens de soja 11377 e 13241. Após DH, a TCR nas linhagens 11377 e 11644 apresentaram redução

de 49% e 46%, enquanto para E48 e linhagem 13241, foram de 20% e 27%, respectivamente (Fig. 5-A). As linhagens 11644 e 11377 apresentaram maior área foliar sob plena irrigação. Após déficit hídrico, houve redução na área foliar em todos os genótipos, mas sem diferença entre eles (Fig. 5-B).

O volume e o comprimento radicular apresentaram resultados semelhantes. Para ambos, não houve diferença entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, mas todos apresentaram redução após déficit hídrico (Fig. 5-C, D). A razão raiz/parte aérea não diferiu entre os genótipos dentro dos tratamentos controle e DH. Em relação ao controle, somente houve redução na razão raiz/parte aérea para a linhagem 13241, enquanto não diferiu para os demais genótipos sob déficit hídrico (Fig. 5-E).

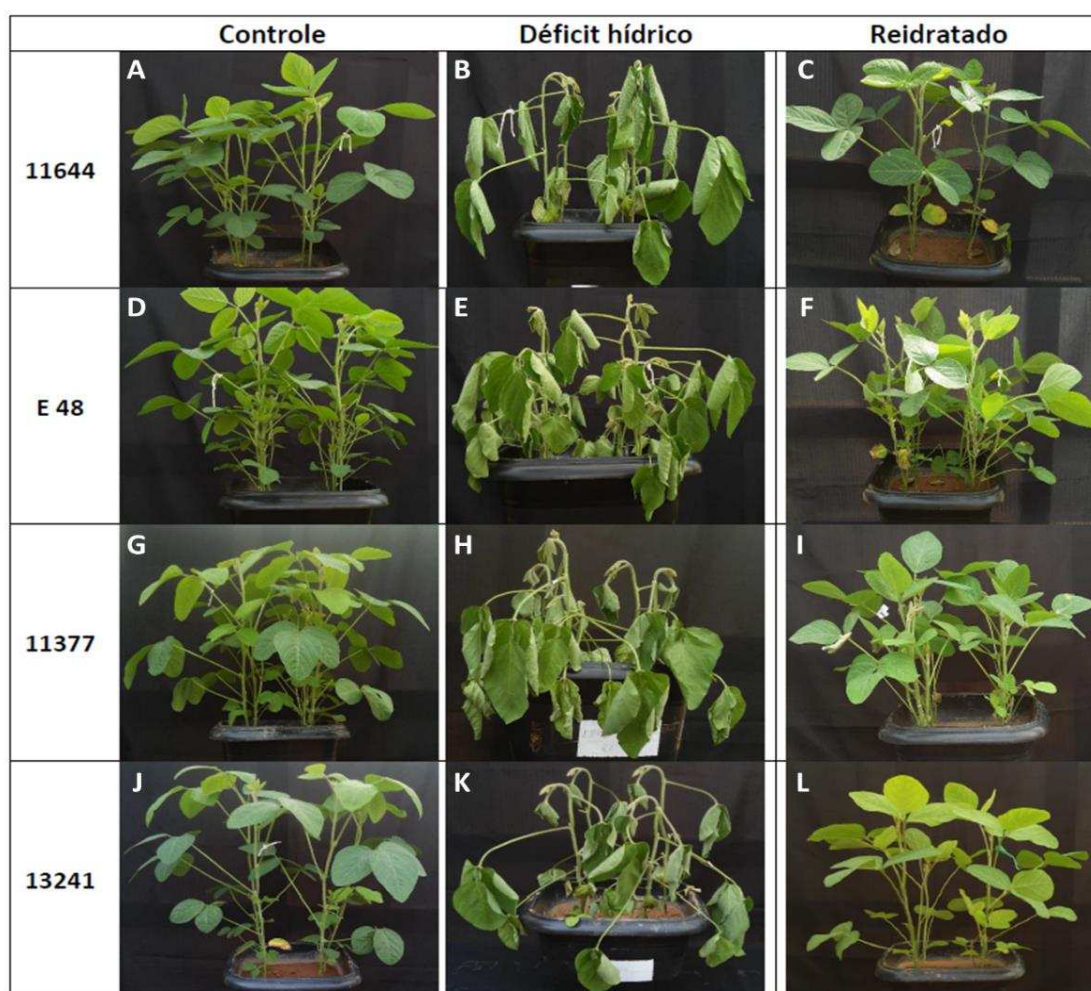


Figura 3. Aspecto visual da parte aérea das plantas dos 4 genótipos de soja sob diferentes disponibilidades hídricas. **A, B e C** - 11644; **D, E e F** - Embrapa 48, **G, H e I** - 11377; **J, K, L** - 13241, sob plena irrigação (Controle), potencial hídrico foliar de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e 3 dias de reidratação (RH).

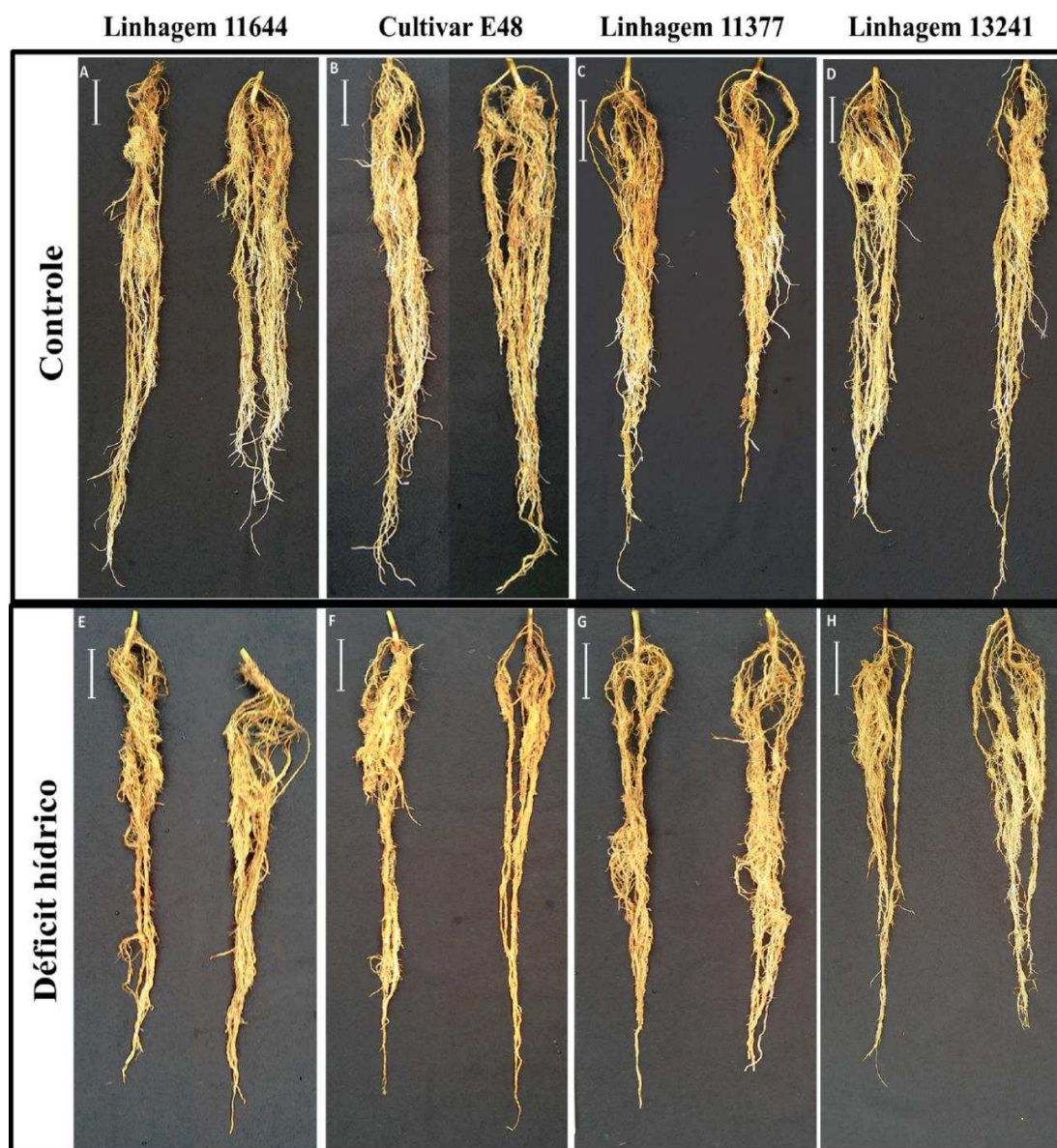


Figura 4. Aspecto visual do sistema radicular das plantas de 4 genótipos de soja em diferentes níveis de disponibilidade hídrica. **A** (11644), **B** (E48), **C** (11377) e **D** (13241) sob plena irrigação (Controle) e **E** (11644), **F** (E48), **G** (11377) e **H** (13241) e déficit hídrico (Ψ_w foliar de $-1,5 \pm 0,2$ MPa). Comprimento da barra: 5 cm.

3.5. Trocas gasosas

A taxa fotossintética (A_n), a condutância estomática (g_s) e a taxa transpiratória (E) demonstraram respostas muito semelhantes em todos os genótipos avaliados. Houve queda desses três parâmetros nas plantas de todos os genótipos sob déficit hídrico, e recuperação aos mesmos níveis dos seus respectivos controles, ou até superior (A_n na linhagem 11644), após a reidratação. Somente na linhagem 11377 os parâmetros A_n e g_s foram menores nas plantas reidratadas, em comparação com aquelas sob plena irrigação (Fig. 6-A, B, C).

A eficiência instantânea no uso da água (*EUA*) não diferiu entre os genótipos de soja dentro de nenhuma das condições hídricas. A *EUA* aumentou nas plantas sob déficit hídrico, sendo 1,7; 1,95; 2,3 e 2,4 vezes superior ao observado no controle das linhagens 11644, 13241, 11377 e cultivar E48, respectivamente. Após a reidratação, houve redução da *EUA* para valores iguais aos dos controles de cada genótipo (Fig. 6-D).

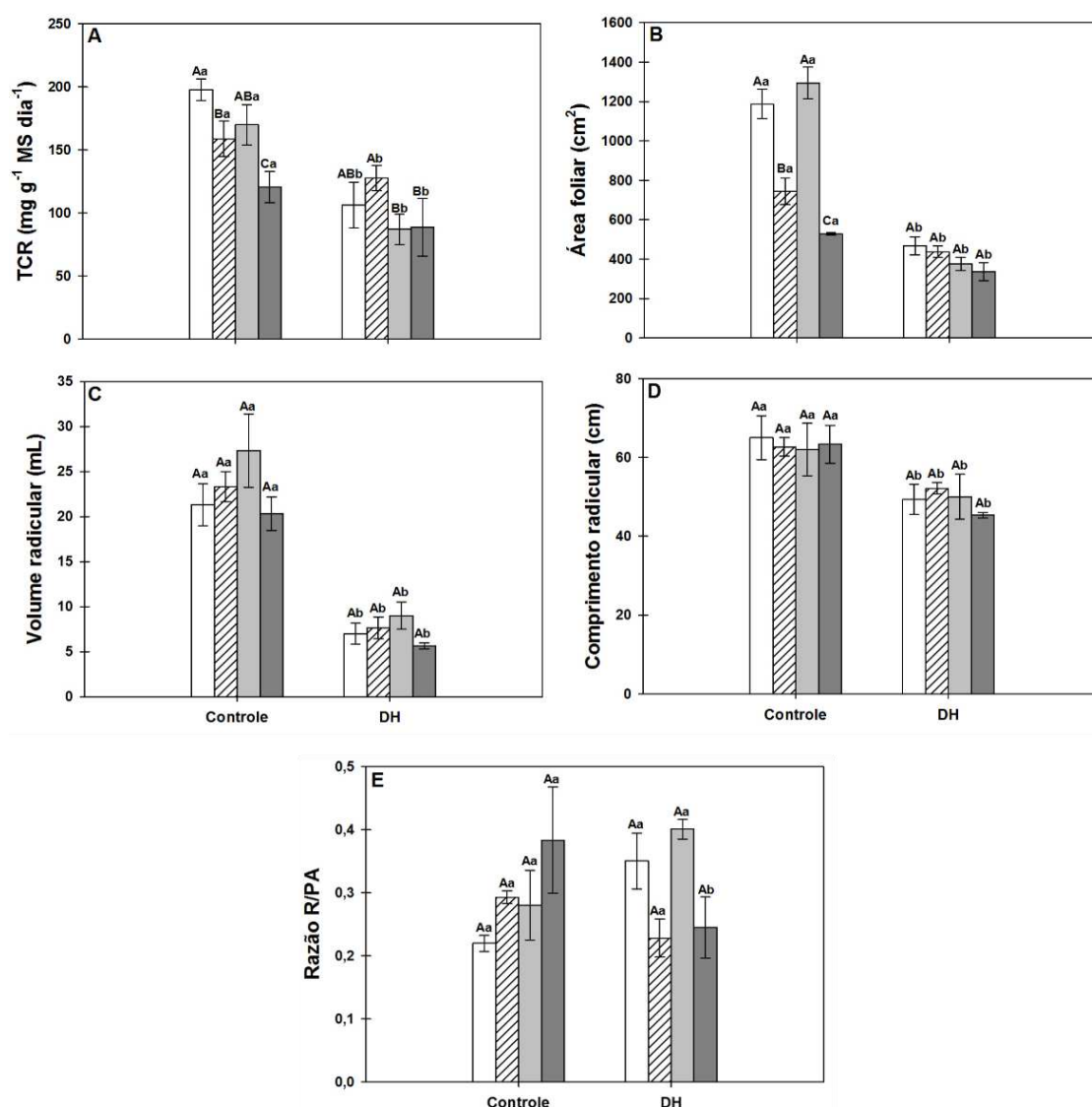


Figura 5. Análises de crescimento. TCR- Taxa de Crescimento Relativo da parte aérea (A), área foliar total (B), volume radicular (C), comprimento radicular (D) e razão raiz/parte aérea (E) nos 4 genótipos de soja: 11644 (□), Embrapa 48 (▨), 11377 (▤) e 13241 (■), nos tratamentos Controle e déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$).

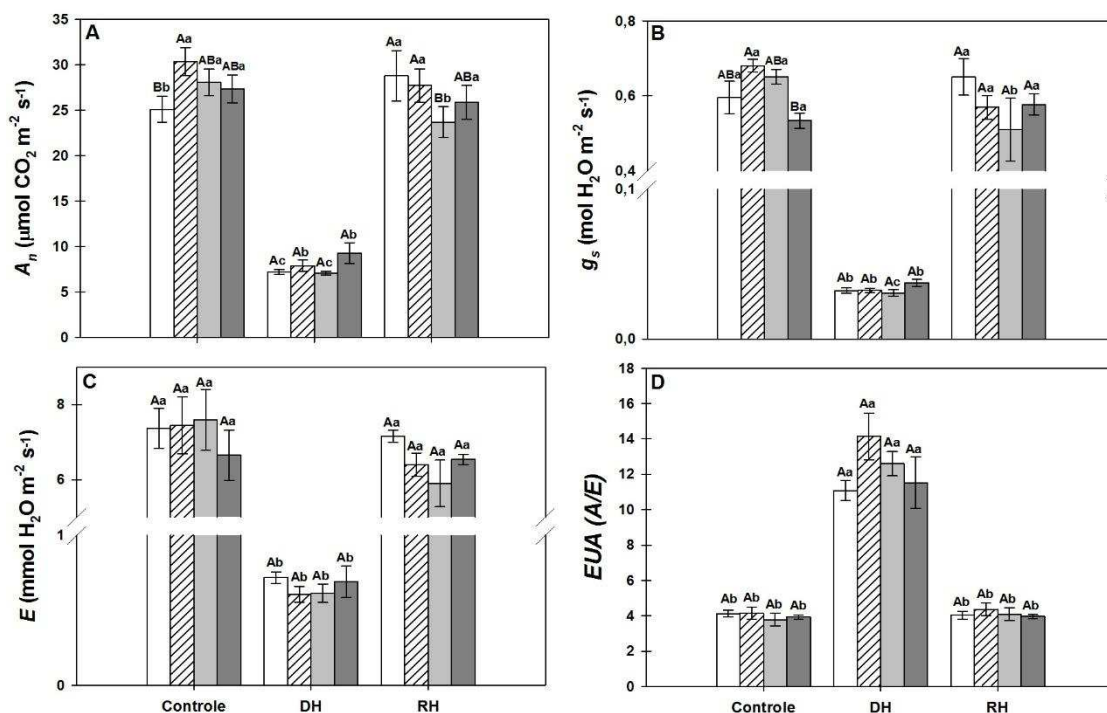


Figura 6. Trocas gasosas. Taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (B), taxa transpiratória (C) e eficiência no uso da água (D) nos 4 genótipos de soja: 11644 (□), Embrapa 48 (▨), 11377 (▤) e 13241 (■), nos tratamentos Controle, déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e após 3 dias de reidratação (RH). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$).

3.6. Concentração de pigmentos foliares

A concentração de clorofila total foi maior na linhagem 13241 sob déficit hídrico. Não houve diferença entre os genótipos após a reidratação. Comparando com os seus respectivos controles, somente na linhagem 11644, houve redução na concentração de clorofila total após déficit hídrico e se manteve menor, mesmo com a reidratação. Para os demais genótipos não houve diferença entre controle e DH (Fig. 7-A).

As linhagens 11377 e 13241 apresentaram maior concentração de carotenoides do que os demais genótipos no controle. Sob déficit hídrico, maior concentração de carotenoides foi verificado na linhagem 13241, enquanto não houve diferença entre os genótipos, após reidratação das plantas. A concentração de carotenoides aumentou somente nas linhagens 11644 e 13241, em resposta ao DH. A linhagem 11377 não diferiu entre nenhum dos níveis de disponibilidade hídrica (Fig. 7-B).

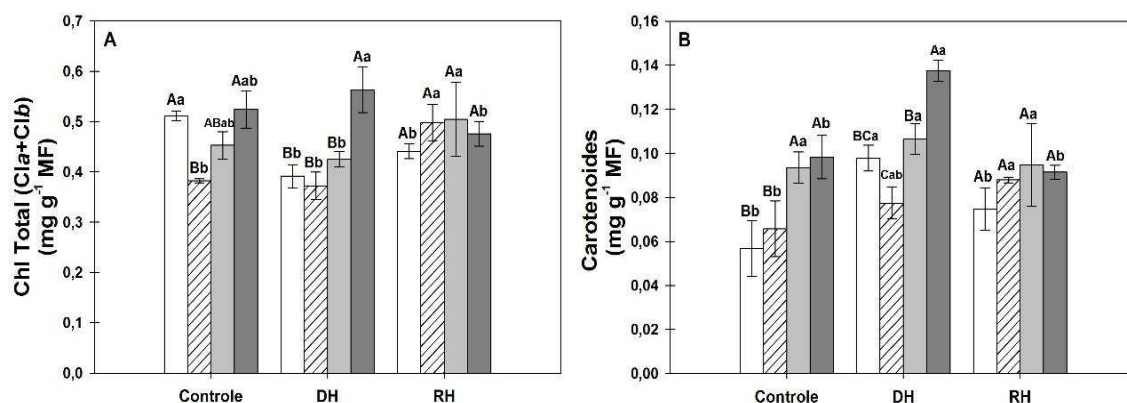


Figura 7. Concentração de clorofila total (A) e concentração de carotenoides (B) nos 4 genótipos de soja: 11644 (□), Embrapa 48 (▨), 11377 (▤) e 13241 (■), nos tratamentos Controle, déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e após 3 dias de reidratação (RH). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$).

3.7. Fluorescência da clorofila *a*

A razão F_v/F_m não variou entre os genótipos e manteve valores considerados ótimos nos diferentes níveis de disponibilidade hídrica, indicando não haver danos fotooxidativos ao ponto de comprometer o PSII, em decorrência do déficit hídrico (Fig. 8-A). Houve queda na ETR de todos os genótipos sob déficit hídrico. Nesse tratamento, os genótipos 11644 e 13241 apresentaram menores valores de ETR do que no cultivar E48 e na linhagem 11377. Após reidratação todos os genótipos recuperaram a ETR para o mesmo nível de seus respectivos controles (Fig. 8-B).

A linhagem 11377 apresentou o menor $\phi PSII$ no tratamento controle. Houve redução do $\phi PSII$ em os genótipos no déficit hídrico, sendo 1,9 vezes e 1,5 vezes menor do que no controle nas linhagens 11644 e 13241, respectivamente e, 85% e 75% menor no cultivar E48 e linhagem 11377, respectivamente. No DH, maior $\phi PSII$ foi registrado no cultivar E48. Nas plantas reidratadas, o $\phi PSII$ aumentou em todos os genótipos e não diferiu entre seus respectivos controles (Fig. 8-C).

O $Y(NO)$ reduziu em todos os genótipos após déficit hídrico, mas não diferiu entre eles. Após a reidratação, somente recuperou ao mesmo nível do controle na linhagem 11644, enquanto aumentou na linhagem 11377 e permaneceu menor no cultivar E48 e linhagem 13241 (Fig. 8-D). O $Y(NPQ)$ aumentou em todos os genótipos submetidos ao déficit hídrico. Não houve diferença no $Y(NPQ)$ dos genótipos nos tratamentos DH e RH. Após reidratação, somente a linhagem 11377 apresentou menor $Y(NPQ)$ do que no controle (Fig. 8-E).

Sob plena irrigação, a linhagem 13241 apresentou menor valor de qL . Após déficit hídrico, o qL reduziu em relação ao controle em todos os genótipos, exceto na linhagem 13241. Somente a linhagem 11377 não recuperou o qL ao mesmo nível do controle, após a reidratação (Fig. 8-F).

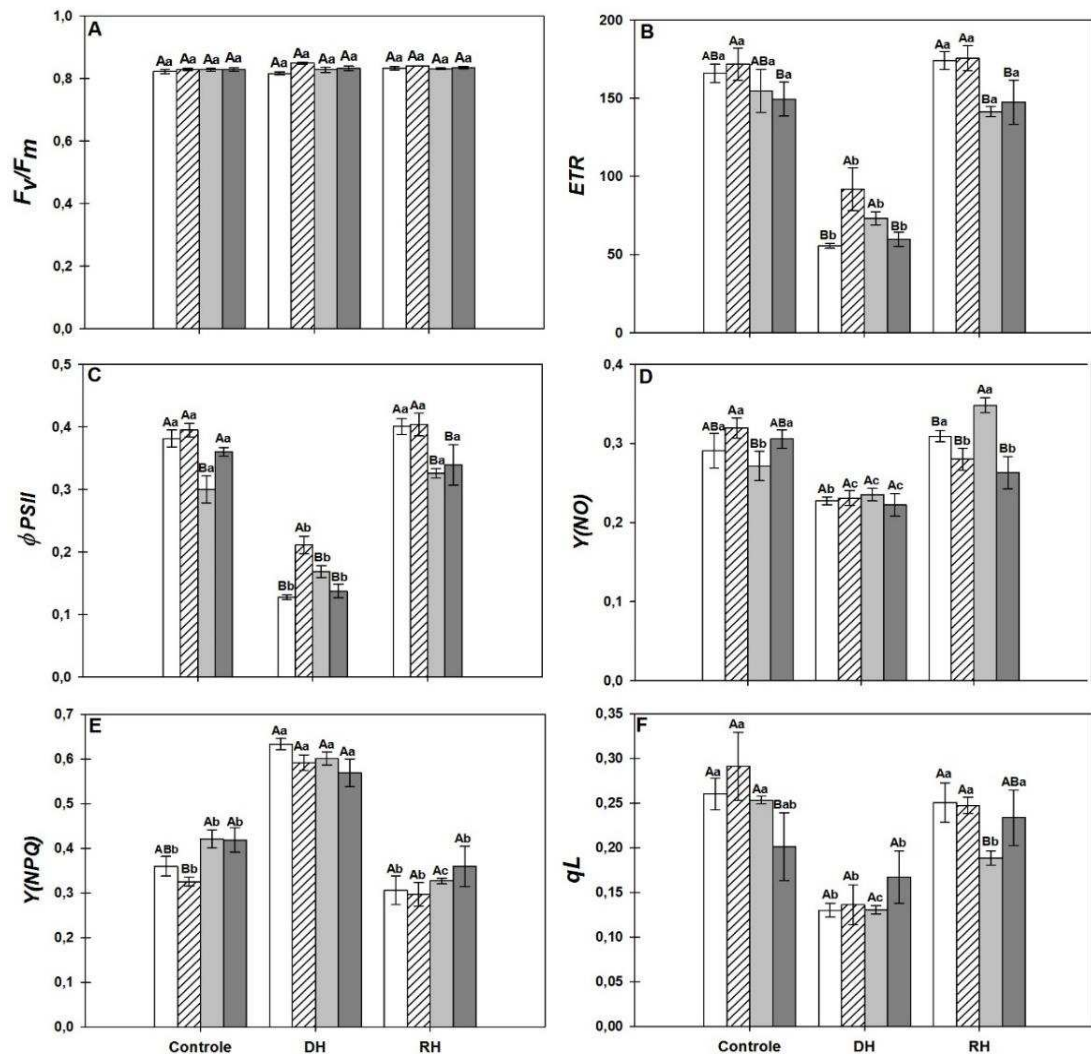


Figura 8. Fluorescência da clorofila *a*. Razão F_v/F_m (A), ETR- taxa de transporte de elétrons (B), $\phi PSII$ - rendimento quântico efetivo do fotossistema II (C), $Y(NO)$ -rendimento quântico da dissipação não regulada de energia (D), $Y(NPQ)$ - rendimento quântico da dissipação regulada de energia (E) e qL - fração dos centros de reação do PSII que estão abertos (F) nos 4 genótipos de soja: 11644 (□), Embrapa 48 (▨), 11377 (▤) e 13241 (■), nos tratamentos Controle, déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e após 3 dias de reidratação (RH). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$).

3.8. Concentração de fitohormônios

A concentração de ABA aumentou em todos os genótipos de soja sob déficit hídrico, porém foi maior na linhagem 13241. Em comparação ao controle, os incrementos na concentração de ABA nos genótipos 11377, 11644, E48 e 13241, foram de 15,16, 21 e 24 vezes, respectivamente. Após a reidratação das plantas, maior concentração foi observada na linhagem 11377 (Fig. 9-A).

A concentração de ACC aumentou em todos os genótipos sob déficit hídrico, porém foi menor no cultivar E48. Maior concentração de ACC foi verificada na linhagem 11377 em todos os tratamentos, em comparação aos demais genótipos. Após a reidratação, reduziu em comparação ao DH e se igualou ao controle, exceto na linhagem 11377, que manteve maior concentração de ACC (Fig. 9-B)

A concentração de zeatina não variou entre os níveis de disponibilidade hídrica nas linhagens 11377 e 13241. Porém, aumentou nas plantas sob déficit hídrico da linhagem 11644 e do cultivar E48. A concentração de zeatina diminuiu nas plantas reidratadas da linhagem 11644 e cultivar E48, mas ainda permaneceu acima do controle nessa linhagem (Fig. 9-C).

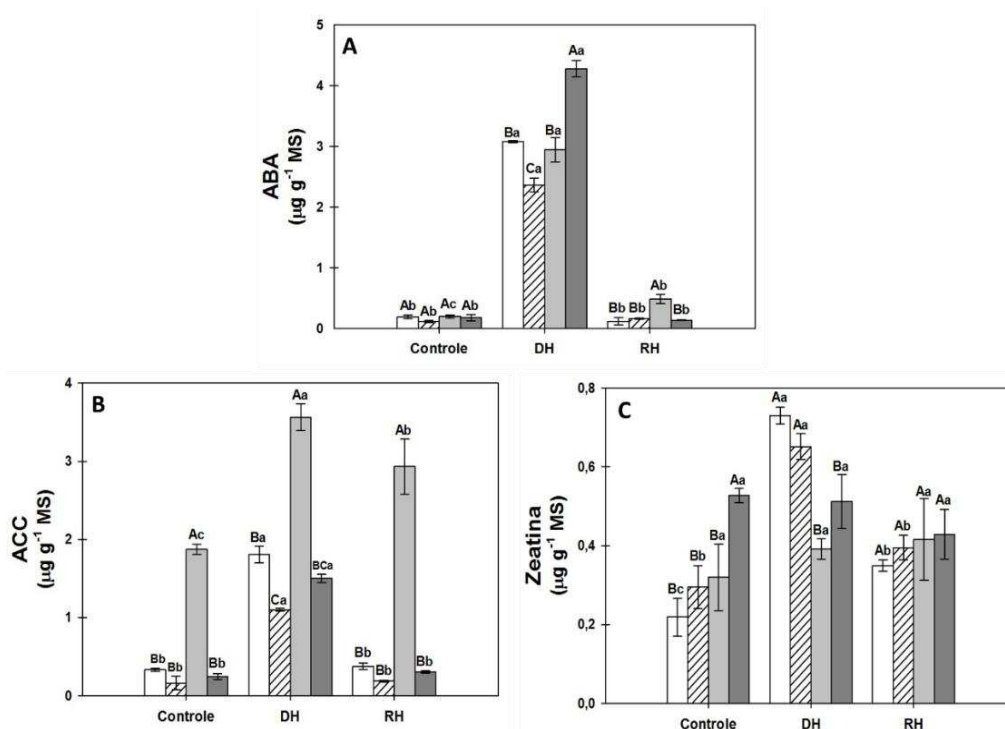


Figura 9. Concentração de ácido abscísico (ABA) (A), concentração de ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) (B) e concentração de zeatina (C) em folhas dos 4 genótipos de soja: 11644 (□), Embrapa 48 (▨), 11377 (▤) e 13241 (■), nos tratamentos Controle, déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e após 3 dias de reidratação (RH). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$).

3.9. Potencial osmótico, metabólitos osmorreguladores e proteínas solúveis totais

O potencial osmótico não variou entre os genótipos sob plena irrigação. A linhagem 11377 apresentou o potencial osmótico mais alto no DH. Porém, houve redução no potencial osmótico de todos os genótipos em relação ao seu controle, nesse tratamento. A maior queda foi verificada na linhagem 13241 (103%), enquanto nos demais genótipos foi de 75%, 65% e 41% para E48, 11644 e 11377, respectivamente. Nas plantas reidratadas o potencial osmótico não diferiu do controle nas linhagens 11377 e 13241, enquanto permaneceu menor nos genótipos 11644 e E48 (Fig. 10-A).

A concentração de aminoácidos livres aumentou em todos os genótipos sob déficit hídrico. Em relação ao controle, verificou-se incrementos de aproximadamente, 9, 17 e 21 vezes para o cultivar E48 e linhagens 11377 e 13241, respectivamente, enquanto para a linhagem 11644 foi de 6 vezes. Após a reidratação, a concentração de aminoácidos nas linhagens 11377 e 13241 foi maior do que nos demais genótipos e do que nos seus respectivos controles (Fig. 10-B).

A concentração de prolina não diferiu entre os genótipos dentro dos tratamentos controle e RH. Houve aumento na concentração de prolina em todos os genótipos sob déficit hídrico, sendo maior na E48 e linhagem 11377 nesse tratamento. O aumento na concentração de prolina no DH, em relação ao controle, foi de 34, 30, 28 e 22 vezes para os genótipos 11644, 13241, E48 e 11377, respectivamente. Quando reidratados, a concentração de prolina diminuiu em todos os genótipos, e não diferiu dos seus respectivos controles (Fig. 10-C).

A concentração de glicina-betaína (GB) aumentou em todas as linhagens após exposição ao déficit hídrico. As linhagens 11377 e 13241 apresentaram maiores concentrações de GB em relação aos genótipos 11644 e E48, tanto nas plantas sob plena irrigação, quanto sob déficit hídrico. Maior incremento na concentração de GB no DH foi verificado na linhagem 13241, sendo 52% maior que no controle. Nas plantas reidratadas, maiores concentrações de GB novamente ocorreram nas linhagens 11377 e 13241, mas não diferiu em relação aos seus respectivos controles (Fig. 10-D).

Após déficit hídrico houve aumento na concentração de proteínas para todos os genótipos de soja, exceto na linhagem 11644. Quando reidratadas, não houve diferença em relação ao controle para as linhagens (Fig. 10-E).

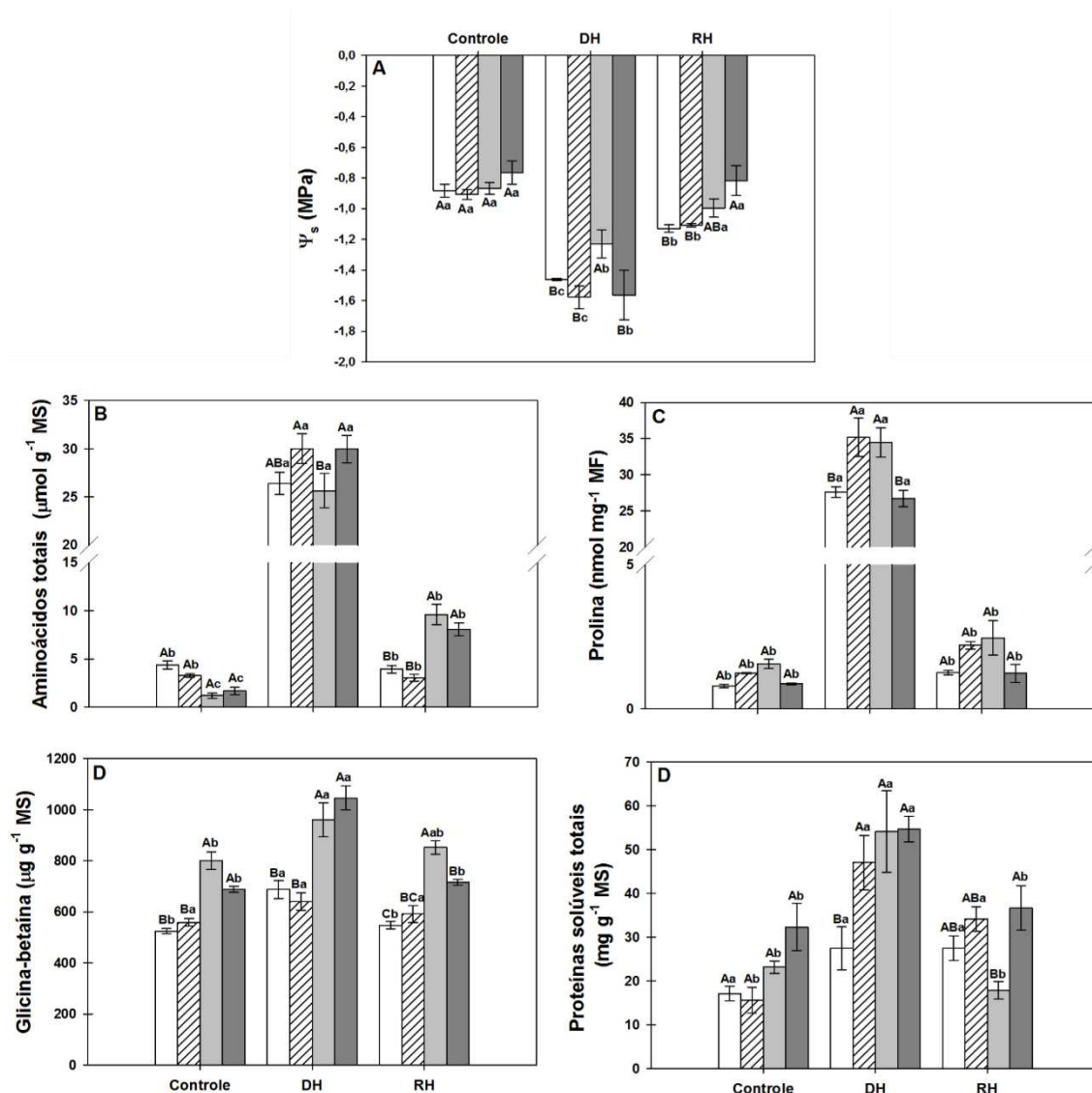


Figura 10. Potencial osmótico (A), concentração de aminoácidos livres (B), prolina (C), glicina betaína (D) e proteínas solúveis totais (E) em folhas dos 4 genótipos de soja: 11644 ($\square$), Embrapa 48 ($\square$), 11377 ($\square$) e 13241 ($\blacksquare$), nos tratamentos Controle, déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e após 3 dias de reidratação (RH). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$).

3.10. Concentração de amido e de açúcares solúveis

A linhagem 13241 apresentou a maior concentração de amido nas plantas sob irrigação plena. Após exposição ao DH, houve redução na concentração de amido em todos os genótipos, mas não diferiram entre si. Após reidratação, a concentração de amido somente não aumentou no cultivar E48, permanecendo igual ao DH. Quando comparados aos seus respectivos controles, não diferiu na linhagem 11644, diminuiu no cultivar E48 e linhagem 13241, enquanto aumentou na 11377 (Fig. 11-A).

A concentração de sacarose foi maior no cultivar E48 do que nas linhagens, nos tratamentos controle e DH. As linhagens 11644 e 13241 não apresentaram diferenças entre os diferentes níveis de disponibilidade hídrica. No cultivar, não diferiu entre controle e DH, mas diminuiu em relação a estes no RH. A linhagem 11377 apresentou aumento na concentração de sacarose no DH e RH, em comparação ao controle (Fig. 11-B). A concentração de glicose aumentou em todos os genótipos sob déficit hídrico, sendo maior na linhagem 11377. Após reidratação, diminuiu em todos os genótipos para o mesmo nível de seus respectivos controles, exceto na 13241, onde foi menor. Comparados dentro do RH, menor concentração de glicose foi observada na E48 e 13241 (Fig. 11-C).

A concentração de frutose aumentou em todos os genótipos sob déficit hídrico, em relação ao controle. No tratamento DH, menor concentração de frutose foi registrada no cultivar E48. Nas plantas reidratadas, a linhagem 11644 apresentou menor concentração de frutose em relação aos demais genótipos. Quando comparados aos seus respectivos controles, menor concentração de frutose foi registrada nas plantas reidratadas de todos os genótipos (Fig. 11-D).

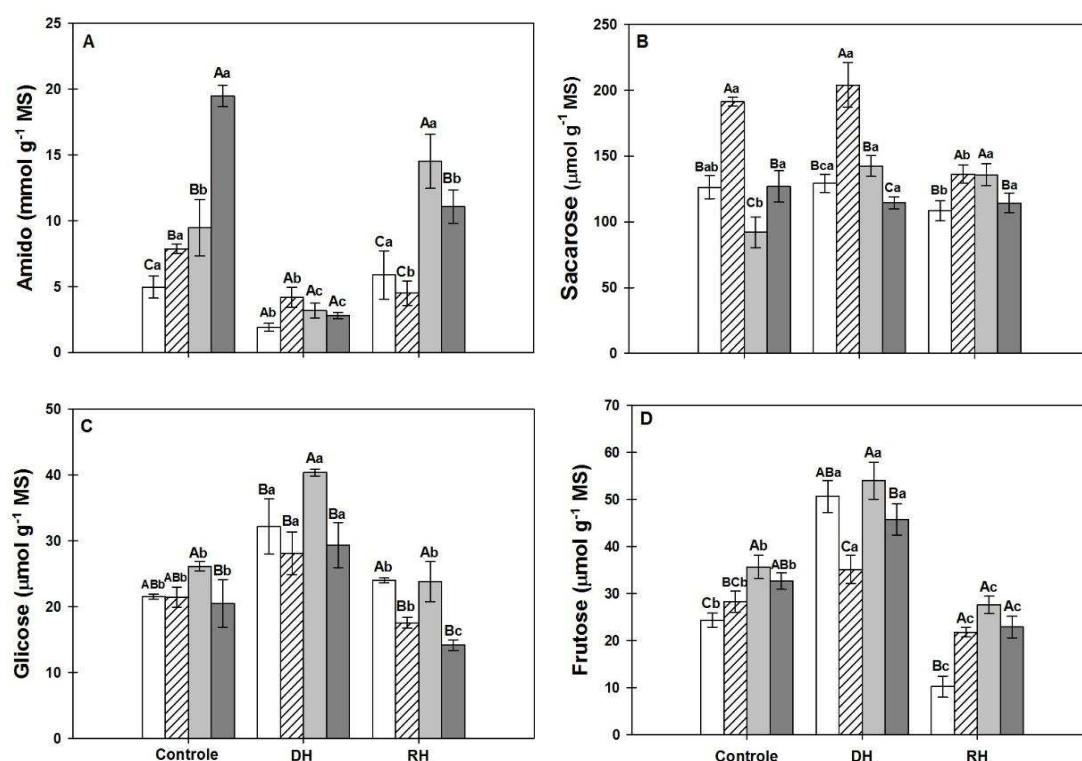


Figura 11. Concentrações de amido (A), sacarose (B), glicose (C) e frutose (D) em folhas dos 4 genótipos de soja: 11644 (□), Embrapa 48 (▨), 11377 (▤) e 13241 (■), nos tratamentos Controle, déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e após 3 dias de reidratação (RH). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$).

3.11. Espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxidação de lipídios e enzimas antioxidantes

A concentração de ânion superóxido foi maior na linhagem 13241 em todos os níveis de disponibilidade hídrica. A linhagem 11377 apresentou menor concentração de ânion superóxido após déficit hídrico reidratação. Em relação ao controle, houve aumento na concentração de ânion superóxido em todos os genótipos de soja sob DH e RH, exceto na linhagem 11377 (Fig. 12-A).

O déficit hídrico promoveu aumento na concentração de H_2O_2 em todos os genótipos de soja. Nessa disponibilidade hídrica, menor concentração de H_2O_2 foi registrada no cultivar E48. Quando comparados aos seus respectivos controles, foram verificados incrementos na concentração de H_2O_2 de 3,5 e 3 vezes nas linhagens 11644 e 11377 e de 1,6 e 2 vezes na linhagem 13241 e cultivar E48, respectivamente. Nas plantas reidratadas, houve redução na concentração de H_2O_2 para todos os genótipos e não diferiu de seus respectivos controles (Fig. 12-C).

Sob DH, houve aumento na concentração de MDA em todos os genótipos de soja. O maior aumento ocorreu na linhagem 11644 (80%) e o menor na 11377 (53%). Após reidratação, a concentração de MDA reduziu em todos os genótipos e não diferiu de seus respectivos controles. (Fig. 12-D).

A atividade da SOD não diferiu entre os genótipos dentro do tratamento controle. Porém, aumentou em todos sob déficit hídrico, sendo menor na linhagem 11644. O maior aumento foi de 1,7 vezes na linhagem 13241, enquanto o menor foi de 72% na linhagem 11644. O cultivar E48 apresentou a maior atividade da SOD dentro do grupo de plantas reidratadas, enquanto a menor foi registrada para a linhagem 11644 (Fig. 12-B).

A atividade da CAT não variou entre os tratamentos na linhagem 11644. Nos demais genótipos, houve aumento nas plantas sob déficit hídrico, sendo maior na linhagem 13241, seguida pela 11377. Após reidratação, houve redução na atividade da CAT, que não diferiu do controle em nenhum dos genótipos (Fig. 12-E).

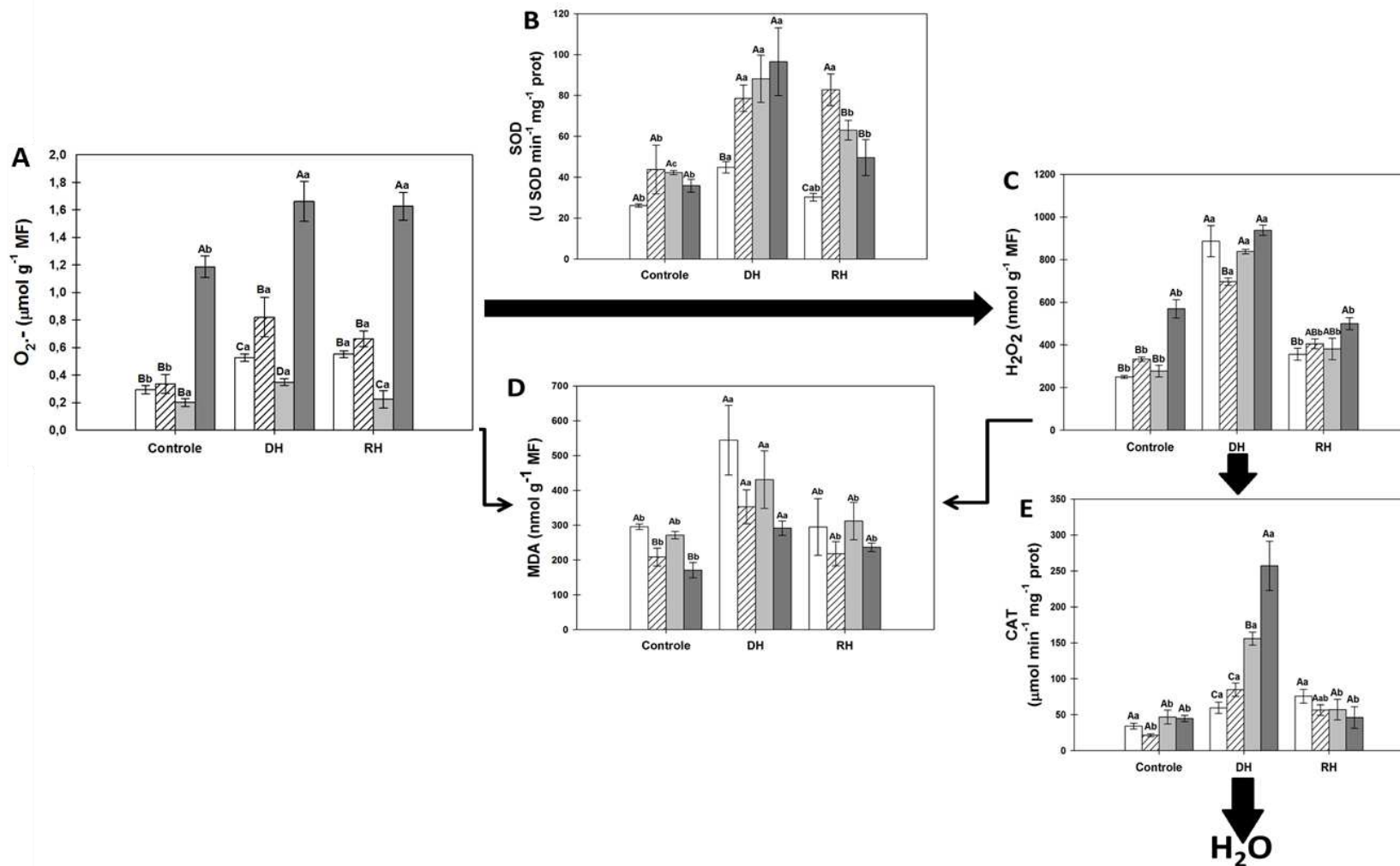


Figura 12. Concentração de ânion superóxido (**A**), atividade da dismutase do superóxido (SOD) (**B**), concentração de peróxido de hidrogênio (**C**), concentração de malonaldeído (MDA) (**D**) e atividade da catalase (CAT) (**E**) em folhas dos 4 genótipos de soja: 11644 (□), Embrapa 48 (▤), 11377 (▥) e 13241 (■), nos tratamentos Controle, déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e após 3 dias de reidratação (RH). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$).

3.12. Concentração de ascorbato total e glutatona total

A concentração de ascorbato total não variou entre os diferentes níveis hídricos para todas as linhagens 11377 e 13241. No cultivar E48, aumentou em relação ao controle no déficit hídrico e também foi maior do que nos demais genótipos. Após reidratação, menor concentração de ascorbato total foi registrada na linhagem 11644, em relação ao controle, enquanto não diferiu nos demais genótipos (Fig. 13-A).

A concentração de glutatona total não diferiu entre controle e déficit hídrico para a linhagem 11644, porém diminuiu nas plantas reidratadas. Para os demais genótipos sob DH, houve aumento de 65% para o cultivar E48 e de 53% para as linhagens 11377 e 13241. Nas plantas reidratadas, maior concentração de GSH total foi verificada para E48. Após reidratação, a concentração de glutatona total reduziu em relação ao DH e não diferiu do controle no cultivar E48 e nas linhagens 11377 e 13241 (Fig. 13-B).

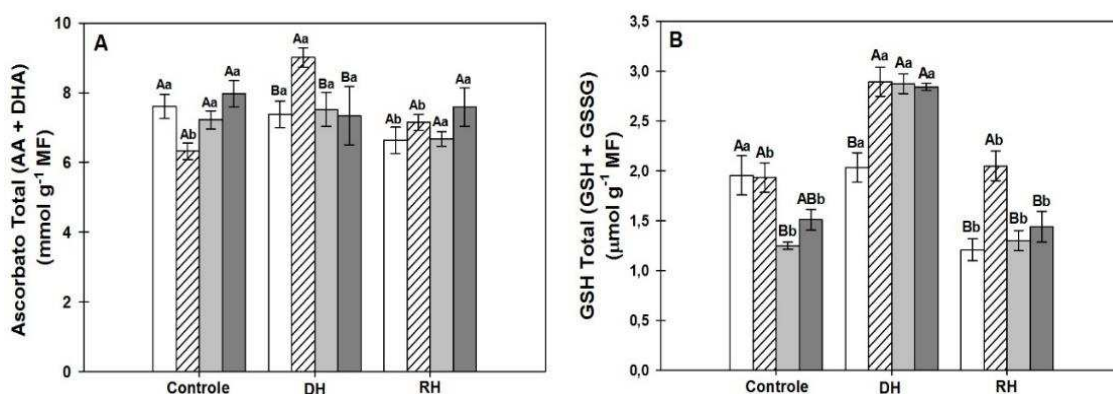


Figura 13. Concentração de ascorbato total (A) e concentração de glutatona total (B) em folhas dos 4 genótipos de soja: 11644 (□), Embrapa 48 (▨), 11377 (▤) e 13241 (■), nos tratamentos Controle, déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e após 3 dias de reidratação (RH). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$).

3.13. Metabolismo do ascorbato

A atividade da APX foi maior nas linhagens 11377 e 13241 no controle. Sob déficit hídrico, apenas a linhagem 11377 não apresentou aumento na atividade da APX. Nos demais genótipos de soja, os incrementos foram de 71%, 61% e 47% para 11644, 13241 e E48, respectivamente. Após reidratação, a atividade enzimática não diferiu do controle nas linhagens 11377, 13241 e cultivar E48. (Fig. 14-A).

Independente do tratamento, sempre houve maior concentração de DHA nas linhagens 11377 e 13241. No déficit hídrico, a concentração de DHA aumentou somente na linhagem 13241 e no cultivar E48. Com a reidratação, as linhagens 11644 e 13241 e o cultivar E48 apresentaram redução na concentração de DHA, em relação às plantas do DH, sendo o oposto verificado na linhagem 11377. (Fig. 14-B).

Sob exposição ao déficit hídrico, incrementos na atividade da MDHAR foram observados em todos os genótipos de soja, sendo de 2,7 e 3,2 vezes maiores para a linhagem 11644 e cultivar E48, respectivamente e de 4,3 vezes para as linhagens 11377 e 13241. Nas plantas reidratadas, a atividade da MDHAR foi igual ao controle, exceto para a E48, na qual reduziu (Fig. 14-C). Sob déficit hídrico, houve aumento na atividade da DHAR nas três linhagens, enquanto o cultivar E48, não variou entre nenhum dos níveis de disponibilidade hídrica. Após a reidratação, a atividade da enzima se manteve mais alta do que no controle nas linhagens 11644 e 11377 (Fig. 14-D).

A concentração de ascorbato reduzido (AA) aumentou no cultivar E48, mas diminuiu na linhagem 13241, após exposição das plantas ao déficit hídrico. Nessa disponibilidade hídrica, a concentração de AA foi maior no cultivar E48 do que nas linhagens 11377 e 13241. A concentração de AA não variou entre nenhuma das disponibilidades hídricas para a linhagem 11644. Nas plantas reidratadas, menor concentração foi verificada na linhagem 11377. Não houve diferença entre as plantas dos tratamentos controle e RH (Fig. 14-E).

3.14. Metabolismo da glutathione

Após exposição ao déficit hídrico e reidratação, houve aumento na atividade da γ -GCS nas linhagens 11377 e 13241 e cultivar E48. Na linhagem 11644, a atividade enzimática não aumentou em resposta ao estresse e foi menor do que nos demais genótipos, porém, aumentou após reidratação. Não houve diferença na atividade da γ -GCS entre os genótipos de soja, para os tratamentos controle e RH (Fig. 15-A).

No tratamento controle, a linhagem 13241 apresentou a menor concentração de GSH. A concentração de GSH aumentou em resposta ao déficit hídrico em todos os genótipos, exceto para a linhagem 11644. Após reidratação, a concentração de GSH diminuiu na linhagem 11644 e 11377, em relação aos seus respectivos controles. (Fig. 15-B).

A atividade da enzima GPX não variou entre as diferentes disponibilidades hídricas na linhagem 11644. Nos demais genótipos, houve aumento na GPX nas plantas sob déficit hídrico, sendo a linhagem 13241 a que apresentou maior atividade. O maior aumento, em relação ao controle ocorreu na linhagem 11377, sendo de aproximadamente 7,5 vezes. Nas plantas reidratadas, o cultivar E48 e a linhagem 13241 mantiveram a atividade enzimática igual ao controle, mas na linhagem 11377, houve aumento (Fig. 15-C).

No tratamento controle, a concentração de GSSG foi menor na linhagem 11377. Já nas plantas sob déficit hídrico, menor concentração de GSSG foi registrada na 11644. Inclusive, não houve diferença entre os níveis hídricos para essa linhagem. Nas plantas reidratadas, não houve diferença entre os genótipos de soja. Somente a linhagem 11377 manteve maior concentração de GSSG nas plantas reidratadas, em relação ao controle (Fig. 15-D).

O déficit hídrico induziu aumento na atividade da enzima GR no cultivar E48 e nas linhagens 11377 e 13241. Os incrementos foram de 1,5 vezes para E48 e de 96% e 2,6 vezes nas linhagens 11377 e 13241, respectivamente. No tratamento DH, maior atividade da GR foi verificada no cultivar E48. A atividade da GR também não variou na linhagem 11644, entre todos os níveis de disponibilidade hídrica. Não houve diferença entre os genótipos após a reidratação e, somente a linhagem 13241 apresentou maior atividade da GR nas plantas reidratadas, em relação ao controle (Fig. 15-E).

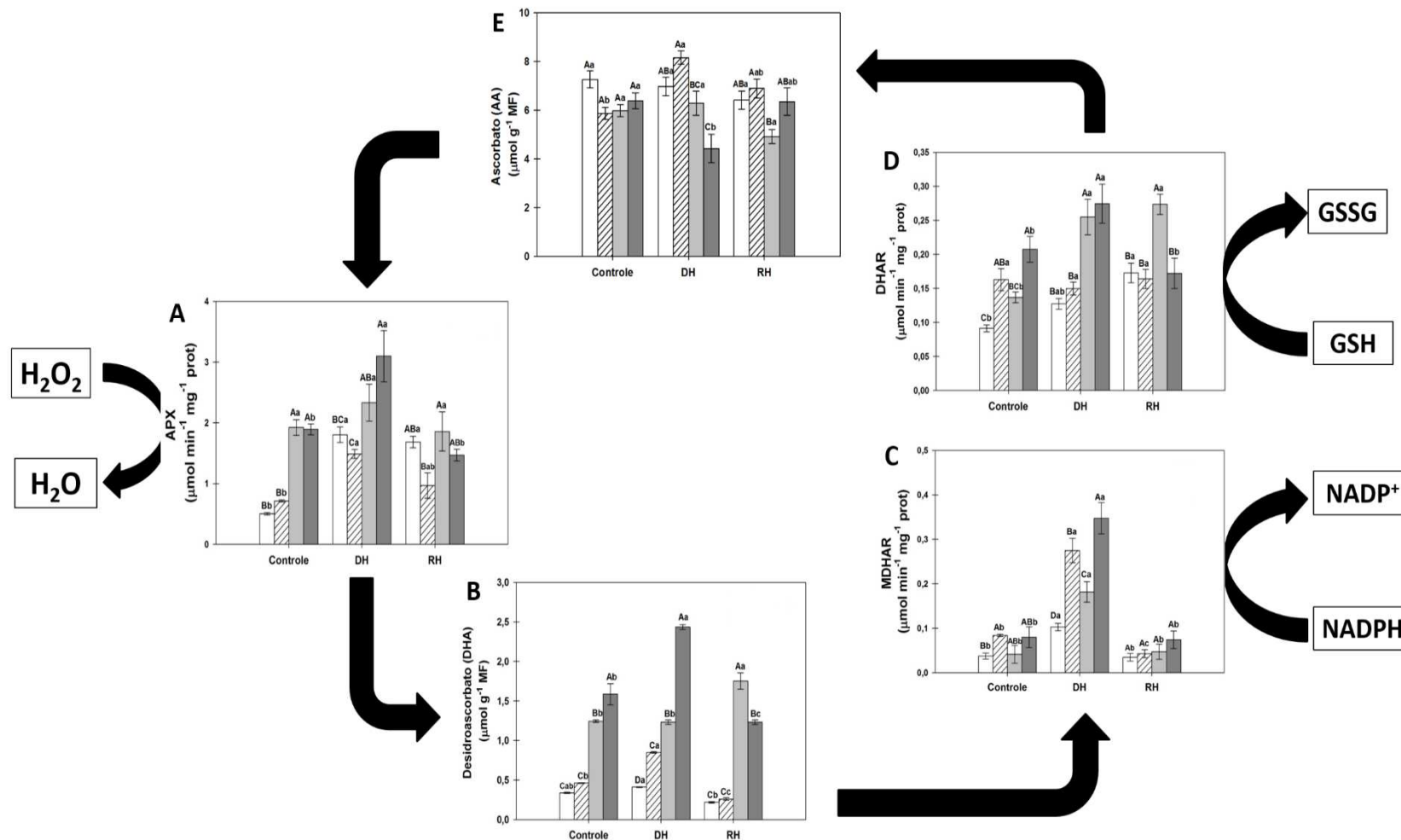


Figura 14. Metabolismo do ascorbato. Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) **(A)**, concentração de desidroascorbato (DHA) **(B)**, atividade da redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) **(C)**, atividade da redutase do desidroascorbato (DHAR) **(D)** e concentração de ascorbato (AA) **(E)** em folhas dos 4 genótipos de soja: 11644 (□), Embrapa 48 (▤), 11377 (▥) e 13241 (■), nos tratamentos Controle, déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e após 3 dias de reidratação (RH). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$).

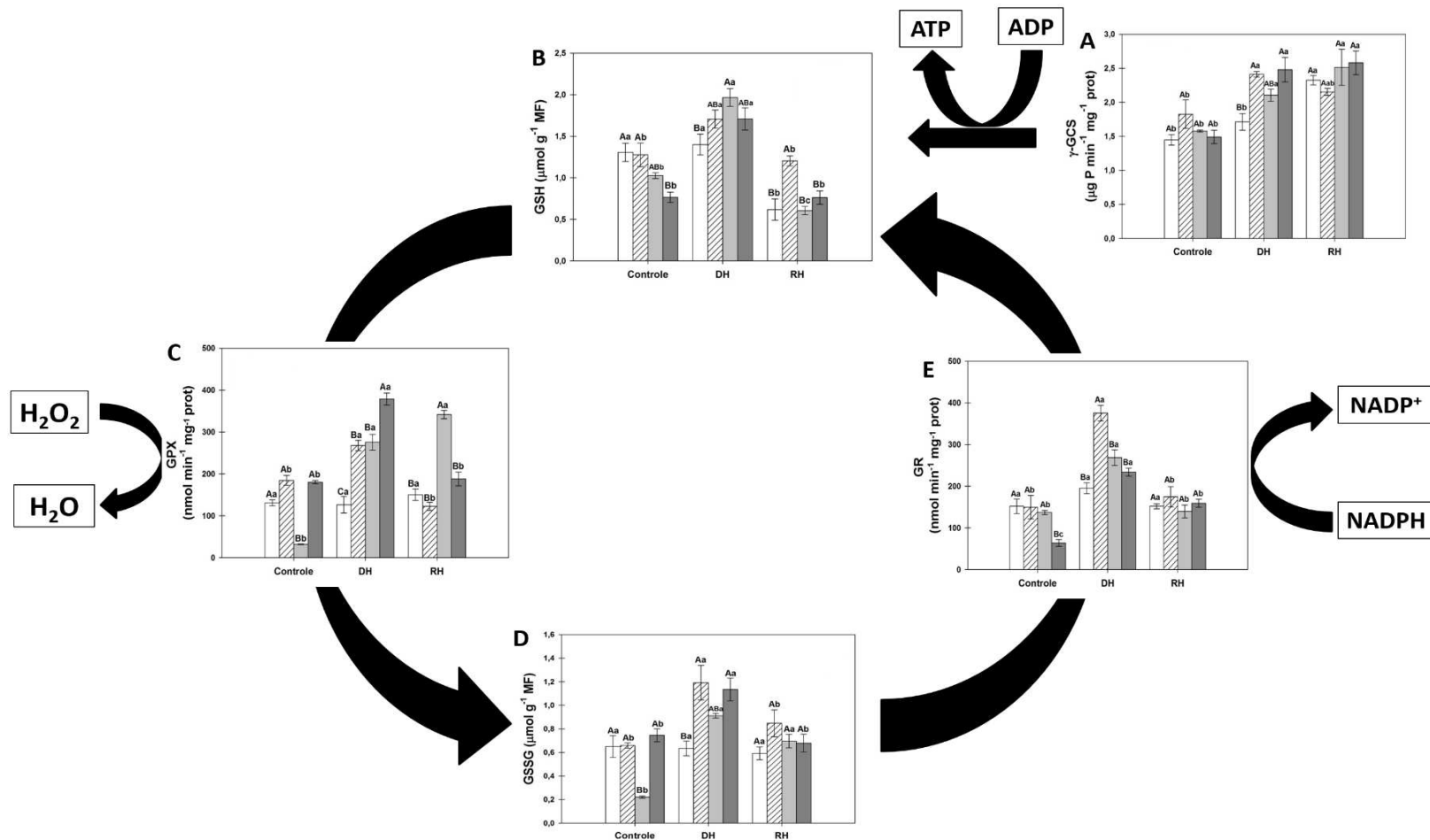


Figura 15. Metabolismo da glutathiona. Atividade da enzima sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS) (A), concentração de glutathiona reduzida (GSH) (B), atividade da peroxidase da glutathiona (GPX) (C), concentração de glutathiona oxidada (GSSG) (D) e atividade da redutase da glutathiona (GR) (E) em folhas dos 4 genótipos de soja: 11644 (□), Embrapa 48 (▨), 11377 (▤) e 13241 (■), nos tratamentos Controle, déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e após 3 dias de reidratação (RH). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento, e diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas para um mesmo genótipo, entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=5$)

4. DISCUSSÃO

O déficit hídrico no solo leva à desidratação dos tecidos do vegetal e afeta as suas relações hídricas, causando queda no potencial hídrico. Logo, plantas capazes de reter maior teor de água em suas células, conseguem manter em funcionamento processos fisiológicos fundamentais e dessa forma, tolerar por mais tempo o déficit hídrico (Hossain et al., 2014). Nesse sentido, a linhagem 13241, pré-selecionada como resistente, levou maior tempo para alcançar o potencial hídrico em torno de -1,5 MPa e ainda, apresentou maior TRA nesse momento. Esse maior tempo pode ter sido importante para a sua aclimação e/ou recuperação dos danos e consequentemente, maior resistência ao estresse.

O déficit hídrico não alterou a suculência foliar das linhagens 11377 e 13241, o que reflete uma maior capacidade em armazenar água por unidade de área foliar nesses genótipos. Em estresses prolongados, essa característica pode se traduzir em maior tolerância ao déficit hídrico no solo (Nahar et al., 2015). A água é essencial para o correto funcionamento do metabolismo celular da planta e à medida que diminuiu, diversas funções são prejudicadas. Considerando a maior redução na hidratação foliar da linhagem 11644, verificada por meio da análise do TRA e suculência foliar, esse genótipo de soja apresenta menor aptidão para o enfrentamento do déficit hídrico do que os demais.

Apesar do estresse severo, a reidratação reestabeleceu o *status* hídrico das plantas de todos os genótipos para o mesmo nível de seus respectivos controles. As imagens obtidas após 3 dias de reidratação atestam esse resultado e indicam que as plantas restauraram a capacidade hidráulica após o déficit hídrico. Resultados semelhantes foram observado para *Eucalypto sp.*, com 6 horas de reidratação após déficit hídrico severo (Martorell et al., 2014). Essa recuperação pode ocorrer pelo eficiente reparo de vasos xilemáticos que, porventura, apresentem embolia durante o estresse. Embora esse mecanismo seja reconhecido em diversas espécies de angiospermas, ainda necessita ser completamente elucidado (Brodersen e McElrone, 2013; Rolland et al., 2015).

A redução na área foliar é uma resposta ativamente regulada em plantas sob seca e se constitui num mecanismo de conservação de água, já que reduz a área transpiratória. Com isso, a planta se mantém melhor hidratada, além de economizar a água do solo (Claeys e Inzé, 2013). A linhagem 13241 e o cultivar E48 apresentaram menor área foliar no tratamento controle, evidenciando ser uma característica

constitutiva desses genótipos. Menor área foliar é uma característica fenotípica importante para identificar plantas cultivadas mais aptas em resistir à seca (Lonbani e Arzani, 2011; Lawlor, 2013; Borrel et al., 2014). Por outro lado, as linhagens 11644 e 11377 apresentaram maior área foliar no tratamento controle, o que pode contribuir para maior sensibilidade ao estresse, uma vez que resulta em elevado consumo da água disponível no solo, e de maneira mais rápida. Por esse motivo, a linhagem 11644 pode ter apresentado as maiores reduções do TRA e da TCR da parte aérea.

Durante o déficit hídrico no solo, características fenotípicas do sistema radicular, como extensão e profundidade, são importantes para suprir com água de forma satisfatória a parte aérea da planta (Fenta et al., 2014). Nesse contexto, a elevada razão Raiz/PA da linhagem 13241 no tratamento controle pode se traduzir em maior capacidade de absorção de água e nutrientes, o que juntamente com sua menor área foliar nessa condição, contribuiu para adiar o início do estresse severo nesse genótipo. Essas características são componentes da estratégia de evitação à seca em plantas herbáceas (Kooyers, 2015).

Pela análise visual do sistema radicular (Figura 4), não foi possível a diferenciação entre os genótipos quanto à resistência à seca. Assim, para uma visão mais abrangente, sugere-se a realização de análises mais detalhadas como, por exemplo, por meio de scanners, que permitem avaliações mais acuradas da morfologia de raízes (Tomar et al., 2016).

O déficit hídrico severo apresenta notável efeito redutor da taxa fotossintética, principalmente por induzir o fechamento estomático e inibir a fixação de carbono (Basu et al., 2016). A drástica redução em g_s observada nas plantas de soja desse experimento denota intensa restrição difusiva ao processo fotossintético, o que afetou igualmente a A_n em todos os genótipos (Chaves et al., 2009). Nesse caso, a intensidade do estresse não permitiu diferenciar a capacidade fotossintética das plantas sob déficit hídrico, de forma que parâmetros de trocas gasosas não foram bons biomarcadores para a tolerância ao estresse, nas condições avaliadas.

Com a reidratação das plantas, os parâmetros A_n , g_s e E recuperaram ao mesmo nível do controle, exceto no genótipo 11377. Essas respostas indicam que a reidratação aliviou a restrição estomática ao processo fotossintético, mas que possíveis danos bioquímicos podem ter atrasado a recuperação da linhagem 11377. Genótipos mais tolerantes ao déficit hídrico tendem a recuperar a capacidade fotossintética mais rapidamente do que os sensíveis, durante a reidratação (Rivas et al., 2016).

Elevada eficiência instantânea no uso da água (*EUA*), dada pela razão A_n/E é uma característica importante para a seleção de cultivares tolerantes ao déficit hídrico, pois denota economia de água pela planta e, quase sempre se traduz num maior rendimento da cultura (Flexas, 2016). Apesar da *EUA* ter aumentado em todos os genótipos de soja em resposta ao déficit hídrico, não houve diferença entre eles, embora seja válido ressaltar que o menor incremento em relação ao controle ocorreu na linhagem 11644. A ausência de diferenças entre os genótipos pode ter decorrido do fato de que medidas instantâneas da *EUA*, somente em nível foliar podem não ser eficientes para determinar o real valor desse parâmetro, sendo mais recomendadas análises de longo prazo, como a composição isotópica de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) (Tómas et al., 2014; Medrano et al., 2015).

A eficiência do processo fotossintético depende dos pigmentos cloroplastídicos, cujas concentrações podem ser alteradas em resposta ao déficit hídrico (Farooq et al., 2009). Nesse sentido, a linhagem 11644 apresentou redução na concentração de clorofila total após o estresse. Por outro lado, a linhagem 13241 apresentou maiores concentrações de clorofila total, tanto em condições ótimas de água disponível, quanto no déficit hídrico. Essa característica está relacionada com respostas mais robustas de tolerância ao estresse. Por exemplo, em *Cicer arietinum*, planta da família Fabaceae, genótipos com maior concentração de pigmentos também apresentaram maior índice de tolerância à seca (Talebi et al., 2013). No cultivar E48, a manutenção na concentração de clorofila total sob déficit hídrico é considerado um dos componentes que contribuem para o seu caráter tolerante (Carvalho et al., 2015).

Quanto aos carotenoides, aumento na concentração desses pigmentos em diferentes espécies de plantas também pode contribuir para maior tolerância ao déficit hídrico (Abbasi et al., 2014; Khoyerdi et al., 2016; Mibei et al., 2016). Nesse estudo, somente as linhagens 11644 e 13241 apresentaram aumento na concentração de carotenoides diante da restrição hídrica no solo, o que sugere existir nesses genótipos a capacidade de proteção contra danos fotooxidativos nos fotossistemas, por meio da dissipação do excesso de energia luminosa (Cazzonelli, 2011). Porém, além dos carotenoides, outras vias de dissipação de energia também podem atuar nas plantas sob estresse e aumentar a proteção do aparato fotossintético contra o fotodano, como por exemplo, a fotorrespiração, o fluxo cíclico de elétrons e o Ciclo Água-Água (Takahashi e Badger, 2011; Yamori et al., 2016).

Ao limitar a taxa fotossintética, o déficit hídrico promove um desbalanço na atividade fotoquímica da planta e pode acarretar em danos fotoinibitórios ao centro de reação do fotossistema II (PSII) (Kalaji et al., 2016). Nas condições de déficit hídrico impostas nesse experimento, valores de F_v/F_m foram mantidos próximos de 0,83 em todos os genótipos e indicam que a estabilidade física do aparato fotossintético das plantas não foi afetada pelo estresse (Murchie e Lawson, 2013). De fato, esse parâmetro tende a ser alterado em estresses prolongados, quando o déficit hídrico promove potenciais hídricos muito baixos (Woo et al., 2008). Em tomate, por exemplo, a razão F_v/F_m somente foi reduzida a partir do 14º dia de suspensão da água, quando o potencial hídrico foliar estava abaixo de -1,5 MPa (Mishra et al., 2012).

Apesar da estabilidade do PSII, o déficit hídrico reduziu a ETR e o $\phi PSII$ em todos os genótipos de soja. Reduzir o transporte de elétrons é uma estratégia de defesa contra danos fotooxidativos em plantas cuja fixação de CO_2 encontra-se comprometida, mas ao mesmo tempo limita a etapa fotoquímica da fotossíntese (Gururani et al., 2015; Yamori, 2016). O cultivar tolerante (E48) utilizado como referência, apesar das reduções, demonstrou as menores quedas em comparação ao controle. Além disso, nesse mesmo genótipo também foi registrado o maior $\phi PSII$ nas plantas sob déficit hídrico. Resultados semelhantes foram obtidos por Mesquita (2013), ao comparar o cultivar E48 com outro cultivar sensível de soja, no mesmo nível de estresse. Nesse estudo, maiores valores de ETR e $\phi PSII$ após o estresse foram relacionados ao fenótipo tolerante ao déficit hídrico desse genótipo.

Quando reidratadas, plantas de todos os genótipos apresentaram aumentos da ETR e do $\phi PSII$, que se igualaram aos seus respectivos controles. Esse resultado sugere a atuação de eficientes mecanismos de prevenção de danos aos seus aparatos fotossintéticos (Efeoğlu et al., 2009).

A fração de energia não utilizada na fotoquímica, composta pelos $Y(NPQ)$ e $Y(NO)$ (Kramer et al., 2004), tende a aumentar em plantas sob déficit hídrico (Sanchita et al., 2015). Klughammer e Schreiber (2008) afirmaram que elevados valores de $Y(NO)$ refletem uma baixa capacidade de proteção do aparato fotossintético contra danos pelo excesso de energia luminosa, mas elevado $Y(NPQ)$ pode reduzir o $Y(NO)$. Nesse sentido, o $Y(NPQ)$ aumentou em todos os genótipos de soja, enquanto o $Y(NO)$ reduziu após o estresse.

O $Y(NPQ)$ tende a aumentar em plantas sob déficit hídrico, uma vez que o fechamento estomático induzido pelo estresse reduz o $\phi PSII$ e ativa vias de dissipação de energia não fotoquímica como o calor, no sentido de conferir fotoproteção (Sanchita

et al., 2015). De fato, o $Y(NPQ)$ têm demonstrado importante papel na proteção dos fotossistemas de plantas sob déficit hídrico e adicionalmente, o fluxo cíclico de elétrons através do fotossistema I (PSI) apresenta ativa participação nessa resposta, pela indução desse mecanismo (Zhang et al., 2011; Zivcak et al., 2013, Singh et al., 2014). A redução do $Y(NPQ)$ após a reidratação para níveis iguais, ou até mesmo abaixo do controle, demonstra a retomada da fotoquímica como a principal via de dissipação de energia luminosa. Os maiores valores de ETR e $\phi PSII$ apoiam essa afirmação.

A redução em qL em todos os genótipos de soja após o déficit hídrico indica que o estresse promoveu um desbalanço entre as taxas de excitação e transferência de elétrons, que resultou em decréscimo na fração de fotossistemas abertos (Brestic e Zivcak, 2013). A maior queda em qL verificada na linhagem 11644 indica menor eficiência fotossintética dessa linhagem e maior sensibilidade do seu aparato fotossintético ao estresse. A intensidade na queda de qL , bem como a capacidade de recuperação desse parâmetro após a reidratação já foi utilizada para diferir níveis de tolerância à seca entre genótipos de milho, sendo os mais estáveis para esse parâmetro, considerados mais tolerantes (Efeoğlu et al., 2009).

A fluorescência da clorofila é considerada uma ferramenta útil para o *screening* de genótipos tolerantes à seca. Plantas cuja habilidade de manter a funcionalidade de sua maquinaria fotossintética, tendo parâmetros como a razão F_v/F_m , ETR e o $\phi PSII$ menos afetados pelo déficit hídrico, podem ser consideradas mais tolerantes, no que concerne ao processo fotossintético (Zlatev e Lidon, 2012; Guha et al., 2013). Nesse contexto, podemos indicar a linhagem 11644 como sendo a mais sensível aos efeitos do déficit hídrico na sua eficiência fotoquímica, enquanto o genótipo mais tolerante foi o cultivar E48.

Interferindo diretamente no processo fotossintético de plantas sob seca, o ABA é o hormônio vegetal mais importante para a adaptação ao estresse, pois controla a abertura estomática (Iovieno et al., 2016). Durante o déficit hídrico, elevados níveis de ABA reduz a condutância estomática e a taxa fotossintética, conforme de fato foi verificado nos genótipos de soja. Por outro lado, menor abertura estomática resulta em conservação de água na planta, permitindo maior tolerância ao prolongamento do estresse (Lim et al., 2015). Considerando essa relação, é possível afirmar que os maiores incrementos na concentração de ABA nas folhas da linhagem 13241 após o déficit hídrico, contribuíram para os resultados de potencial hídrico e TRA desse genótipo e reforçam a sua maior capacidade de resistência à seca, mediante estratégia de evitação ao estresse.

A redução na concentração do ABA em resposta a reidratação ocorre, principalmente por meio da degradação enzimática, mediante a sinalização de alívio do estresse pela recuperação do adequado *status* hídrico da planta (Roychoudhury et al., 2013). Por outro lado, a maior concentração de ABA na linhagem 11377 mesmo após o retorno da irrigação, pode ter resultado numa menor abertura estomática justificaria o fato desse genótipo não ter recuperado g_s e A_n para os mesmos níveis do controle. Lovisolo et al. (2008) também observaram nas folhas de videiras maior concentração de ABA após a reidratação e atribuíram a esse fato o atraso na recuperação de g_s , como forma de controlar a transpiração foliar e promover o reparo da embolia no xilema.

Etileno e citocininas são outros hormônios vegetais que podem atuar durante o déficit hídrico, mas de maneira antagônica. O etileno é um hormônio capaz de promover a senescência de órgãos vegetais em plantas expostas à seca severa (Zhang et al., 2015a), enquanto as citocininas, por exemplo a zeatina, têm como um de seus efeitos atrasar a senescência de plantas durante eventos de estresses abióticos (Jibran et al., 2013).

A biossíntese do etileno ocorre diretamente a partir do ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano) (Wani et al., 2016), embora nem sempre exista uma relação direta e constante entre os níveis de ACC e etileno em folhas de soja sob déficit hídrico (Arraes et al., 2015). Porém, maiores níveis de ACC em arroz sob condições semelhantes as desse experimento, resultaram também em maior concentração de etileno nas plantas (Zhang et al., 2015a). Dessa forma, a elevada concentração de ACC nos genótipos de soja sob déficit hídrico pode ter resultado em aumento de etileno e disparado o processo de senescência foliar nas plantas (Jibran et al., 2013; Iqbal et al., 2017).

No cultivar E48, menor concentração de ACC, juntamente com maior concentração de zeatina nas folhas, indicam nesse genótipo maior habilidade para atrasar o processo de senescência foliar em resposta ao estresse, e reforçam a sua capacidade de tolerar o déficit hídrico. Segundo Le et al. (2012), incrementos no conteúdo de citocininas em folhas de soja no início do estresse por seca podem aumentar a longevidade desses órgãos e a sua eficiência fotossintética, resultando em maior capacidade de aclimação das plantas. Quanto aos elevados níveis de ACC na linhagem 11377 nos três tratamentos, além da senescência induzida pelo estresse, o etileno pode também estar relacionados com outras respostas metabólicas nesse genótipo, por exemplo, regulação do crescimento vegetativo (Poel, 2015).

Quando o potencial hídrico da célula vegetal é reduzido pelo déficit hídrico, pode ocorrer o acúmulo de solutos no seu interior, que contribui para a manutenção do turgor celular, sustento da condutância estomática e dos processos fotossintético e de crescimento (Singh et al., 2015; Basu et al., 2016). Esse acúmulo de solutos reflete o ajustamento osmótico da planta e pode ser medido indiretamente por meio da avaliação do potencial osmótico. Redução no potencial osmótico durante o déficit hídrico é uma resposta considerada genérica de plantas cultivadas, incluindo a soja (Blum, 2017), como de fato ocorreu nos genótipos desse experimento. De forma semelhante, intensa redução no potencial osmótico também foi observada em cultivares de soja tolerante e sensível à seca, após 12 dias de restrição hídrica (Hossain et al., 2014).

Existe uma gama de solutos compatíveis que tendem a se acumular numa planta sob seca e reduzir o seu potencial osmótico. Nesse sentido, a concentração de aminoácidos livres aumentou em todos os genótipos no déficit hídrico, mas em maior proporção nas linhagens 11377 e 13241. Parte desse aumento pode ter resultado do expressivo incremento na concentração de prolina. Segundo Szabados e Saviouré (2010), até 80% do *pool* de aminoácidos total em plantas submetidas à seca pode ser constituído pela prolina, em comparação com apenas 5% sob condições ótimas de crescimento.

Aumento na concentração de aminoácidos livres e de prolina é uma resposta comum em plantas expostas à restrição hídrica, mas que possui importante papel osmorregulador e osmoprotetor (Kaur e Asthir, 2015). Logo, maiores incrementos podem se traduzir numa maior capacidade de tolerar o estresse. A prolina pode contribuir também para a recuperação da planta após o déficit hídrico, ao ser metabolizada nas mitocôndrias, fornecendo ATP para o reparo de danos e retomada do crescimento (Araújo et al., 2013). Essa pode ser uma explicação para a expressiva queda na concentração de prolina nos genótipos de soja após a reidratação.

A concentração de glicina-betaína (GB) também aumentou nos genótipos de soja sob déficit hídrico, exceto no cultivar E48. Com funções semelhantes às da prolina (Ahmad et al., 2013; Wani et al., 2013), a GB pode contribuir para um fenótipo mais tolerante nas linhagens 11377 e 13241, as quais apresentaram maiores concentrações dentro dos três tratamentos hídricos.

O acúmulo de aminoácidos livres em plantas sob seca, geralmente está relacionado com o decréscimo na concentração de proteínas (Khoyerd et al., 2016). Porém, de modo contrário, a concentração de proteínas solúveis aumentou nos genótipos de soja avaliados como tolerantes. Essa resposta pode estar relacionada com o acúmulo de diversos grupos de proteínas envolvidas na resposta ao estresse, como por

exemplo, chaperonas moleculares, osmotinas e proteínas sinalizadoras (Ashoub et al., 2013; Hao et al., 2015; Wang et al., 2016; Cao et al., 2016). A redução na concentração das proteínas com a reidratação pode ser o resultado da inibição da expressão de genes ativados somente em resposta ao estresse, cuja necessidade pela planta diminuiu após o reestabelecimento do seu adequado balanço hídrico (Hao et al., 2015).

Componentes importantes para o ajustamento osmótico, as concentrações de carboidratos nas folhas passam por alterações que resultam de respostas adaptativas ao estresse, mas também, como consequência do prejuízo ao processo fotossintético (Zhou et al., 2017). Nesse sentido, a reserva de carboidratos na forma de amido tende a reduzir quando a fotossíntese é inibida (Mutava et al., 2015; Silva et al., 2017), o que de fato foi verificado nos genótipos de soja desse experimento. Porém, convém destacar a maior concentração de amido observada na linhagem 13241 sob plena irrigação. Nesse caso, o maior *pool* inicial de amido pode ter sido remobilizado para a liberação de energia e também para biossíntese de outros metabólitos durante o estresse, o que contribuiu para maior tolerância nesse genótipo (Thalmann e Santelia, 2017).

Açúcares solúveis são carboidratos com diferentes funções durante o déficit hídrico. Por exemplo, maior concentração de sacarose, conforme foi observado no cultivar E48 e na linhagem 11377, pode significar maior capacidade de tolerância ao estresse nesses genótipos, por meio da osmoproteção de estruturas celulares (Velázquez-Márquez et al., 2015; 2016; Khoyerd et al., 2016). Por outro lado, a ausência de incrementos na concentração de sacarose em outros genótipos pode ser explicada pela sua degradação em glicose e frutose, o que sustentou o aumento desses açúcares no déficit hídrico.

A variação nas respostas dos genótipos de soja para o acúmulo dos açúcares solúveis pode ser resultado da forma de utilização destes, de acordo com a reação da planta ao estresse. Por exemplo, sacarose e glicose estão mais relacionadas com a sinalização do estresse e controle da expressão de genes de tolerância, produção de energia e atuação como osmolitos, enquanto a frutose está mais envolvida com a biossíntese de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos e também com a osmorregulação da célula (Gupta et al., 2005; Rosa et al., 2009; Sami et al., 2016). Assim, uma vez que as concentrações de glicose e frutose aumentaram em todos os genótipos sob déficit hídrico, pode-se inferir que esses açúcares tenham desempenhado diferentes papéis na aclimação das plantas ao estresse, porém, torna-se difícil nessas condições, precisar quais foram e em quais genótipos.

A queda nas concentrações de amido, sacarose e frutose no cultivar E48 e de amido, glicose e frutose na linhagem 13241 após a reidratação, sugerem maior consumo de carboidratos nesses genótipos pós-estresse, o que pode ocorrer para a retomada do crescimento e/ou recuperação de danos (Yang et al., 2013).

O funcionamento do metabolismo energético da célula vegetal é alterado pelo déficit hídrico e processos celulares, tais como fotossíntese e respiração, passam por desequilíbrios na produção e eliminação de ROS, as quais podem se acumular e promover danos em biomoléculas. Essa condição configura um estado conhecido por estresse oxidativo celular, que se intensifica em eventos de déficit hídrico severo (Noctor et al., 2014, Das et al., 2015).

Nesse sentido, foram verificados incrementos nas concentrações, tanto de $O_2^{\cdot-}$, quanto de H_2O_2 nas plantas desse experimento. Logo, ocorreram danos oxidativos, verificados por meio do aumento na concentração de malodialdeído (MDA) nas folhas de todos os genótipos de soja. Entretanto, vale destacar que o maior incremento de MDA em relação ao controle foi verificado na linhagem 11644. Por outro lado, a linhagem 11377 apresentou os menores danos em membranas. Segundo Yu et al. (2017), uma baixa concentração de MDA pode ser utilizado como indicador fisiológico de maior tolerância à seca em plantas.

Enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são importantes componentes do sistema de eliminação de ROS em plantas expostas a fatores de estresses abióticos. Logo, o maior incremento na atividade da SOD na linhagem 13241 denota maior habilidade desse genótipo em evitar danos oxidativos e dessa forma, melhor aptidão para tolerar o déficit hídrico (Boaretto et al., 2014; Zhang et al., 2015b; Anjum et al., 2017). Nesse contexto, a menor atividade da SOD na linhagem 11644 pode resultar em maior sensibilidade ao estresse.

A CAT é bastante importante durante o déficit hídrico devido a sua eficiente eliminação de H_2O_2 , principalmente nos peroxissomos, onde é gerado por meio do processo fotorrespiratório (Sofa et al., 2015). Logo, os incrementos na atividade da CAT nos genótipos de soja avaliados como tolerantes, indicam um provável incremento na fotorrespiração das plantas atuando como um mecanismo de prevenção de danos fotooxidativos ao aparato fotossintético, e denotam remoção mais eficiente do H_2O_2 produzido nessa condição (Voss et al., 2013; Catola et al., 2016).

A presença de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 nos compartimentos celulares, juntamente com a disponibilidade de íons de ferro pode resultar na formação da radical hidroxila ($\cdot OH$), uma molécula altamente reativa e danosa à célula e para a qual, ainda não se conhece

um sistema de eliminação (Halliwell e Gutteridge, 2015). Dessa forma, maiores atividades da CAT e SOD são respostas relevantes ao se determinar a tolerância à seca em plantas. A constância na atividade da CAT e o menor incremento na atividade da SOD na linhagem 11644 apontam para uma baixa eficiência na remoção de ROS, que resultou nos maiores incrementos nas concentrações de H_2O_2 e no maior grau de peroxidação de lipídios nesse genótipo.

Com a reidratação das plantas, todos os genótipos foram capazes de recuperar a homeostase celular pela redução nos níveis de ROS e de MDA para valores iguais ao controle. Com a menor oferta de substrato, as atividades da CAT e SOD, na maioria dos genótipos, também se igualaram ao controle. A retomada do processo fotossintético após o retorno da irrigação pode ser um dos fatores responsáveis por essa resposta, ao normalizar o fluxo de elétrons entre os fotossistemas e o consumo de energia e poder redutor no ciclo de Calvin (Furlan et al., 2016).

Além das enzimas, as plantas utilizam diversos metabólitos que também possuem propriedades antioxidantes, dos quais se destacam a glutatona (GSH) e o ascorbato (AA) (Foyer e Noctor, 2011). A biossíntese de AA ocorre a partir da glicose e a limitação no suprimento de esqueletos de carbono pode ser um fator que restringe esse processo (Bulley e Laing, 2016). Assim, a redução na fotossíntese em decorrência do déficit hídrico pode ter interferido nas concentrações de AA total nas folhas das plantas de soja e resultado na pouca variação observada entre os genótipos, destacando-se somente o incremento no cultivar E48. O investimento da planta em diferentes metabólitos de defesa contra o estresse também é um fator que altera as concentrações de AA total, que podem inclusive diminuir durante o déficit hídrico (Huseynova et al., 2016).

Diferente do ascorbato, o déficit hídrico promoveu aumento nas concentrações de glutatona total na maioria dos genótipos de soja, com exceção da linhagem 11644. De forma semelhante ao observado para o AA, no cultivar E48 houve maior aumento na concentração de GSH total nessa condição. A GSH é um metabólito antioxidante fundamental para o adequado funcionamento do metabolismo vegetal em condições de estresse, pelas funções que desempenha no equilíbrio redox e seu papel central na eliminação de ROS (Hasanuzzaman et al., 2017). Assim, antioxidantes não enzimáticos podem ser um diferencial na tolerância à seca no cultivar E48.

A dinâmica de uso do AA e da GSH na proteção contra o estresse oxidativo em plantas envolve uma gama de enzimas (Pandey et al., 2015). Por exemplo, a atuação conjunta da peroxidase do ascorbato (APX), que utiliza o AA para eliminar H_2O_2 ,

juntamente com as enzimas de regeneração do AA, redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) e redutase do desidroascorbato (DHAR), promovem o equilíbrio entre a eliminação de ROS e a manutenção do *pool* de ascorbato reduzido em plantas sob estresses abióticos (Gallie, 2013; Sofo et al., 2015). Assim, os incrementos na atividade dessas enzimas nos genótipos de soja indicam atuação do metabolismo do ascorbato no enfrentamento ao déficit hídrico, no sentido de manter a homeostase redox celular e proteger contra danos oxidativos, promovendo maior tolerância das plantas ao estresse (Pyngrope et al., 2013).

Sabe-se que o AA também pode atuar diretamente na eliminação de ROS (Gest et al., 2013; Akram et al., 2017). Isso explica os incrementos nas atividades das enzimas de regeneração do AA na linhagem 11377, embora a atividade APX não tenha variado nesse genótipo. É relevante destacar que em todos os genótipos de soja os níveis de AA foram sempre superiores ao de desidroascorbato (DHA), possivelmente pela eficiência das enzimas DHAR e MDHAR. Isso denota a importância da manutenção do *pool* de ascorbato na forma reduzida em plantas sob estresses (Gallie, 2013). Apesar disso, os níveis desse metabólito não aumentaram nas linhagens de soja após o déficit hídrico. Porém, essa resposta pode ter ocorrido devido à regulação do *pool* de AA envolver o seu consumo, simultaneamente à sua regeneração (Shin et al., 2013).

De forma geral, a reidratação das plantas reestabeleceu o funcionamento do metabolismo do ascorbato para níveis semelhantes ao controle, embora algumas respostas divergentes ainda tenham sido verificadas. Por exemplo, maior atividade da APX na linhagem 11644 e da DHAR na 11377. Isso pode ocorrer devido à recuperação mais lenta da homeostase redox nessas plantas, o que justificaria manter defesas antioxidantes funcionando em nível mais elevado, mesmo após o reestabelecimento do potencial hídrico celular (Fillippou et al., 2011; Maevskaya et al., 2013; Jin et al., 2015). Nesse contexto, genótipos de soja que recuperam mais rapidamente do déficit hídrico podem ser considerados mais tolerantes (Sulieman et al., 2015).

O funcionamento do metabolismo da glutathiona foi mais efetivo nos genótipos de soja considerados tolerantes ao déficit hídrico. Inclusive, na linhagem 11644 a utilização da GSH não demonstrou atuação na defesa das plantas, uma vez que os níveis do metabólito, bem como da atividade das enzimas da sua biossíntese e utilização como antioxidante, não se alteraram em resposta ao estresse. Esses resultados apoiam a hipótese de que esse genótipo é mais sensível ao déficit hídrico do que os demais. De fato, plantas cultivadas com menor concentração de GSH em condições de estresse podem apresentar um fenótipo suscetível à seca, uma vez que a sua eficiência na

eliminação de ROS fica comprometida (Sánchez-Rodríguez et al., 2012; Cheng et al., 2015; Gietler et al., 2016).

A enzima peroxidase da glutathione (GPX), que utiliza a GSH como substrato, apresenta grande importância devido a sua capacidade de eliminar vários compostos tóxicos acumulados na célula vegetal durante o estresse oxidativo, tais como o H_2O_2 , o hidroperóxido orgânico e hidroperóxidos lipídicos, desempenhando papel principal na defesa das membranas biológicas durante eventos de estresse (Gaber et al., 2012; Fu, 2014; Bela et al., 2015). Por essa razão, a linhagem 11377, genótipo de soja que apresentou o maior incremento na atividade da GPX, pode ter demonstrado o menor grau de peroxidação de lipídios no estresse. Ao mesmo tempo, a linhagem 13241 foi quem teve a maior atividade da GPX entre os genótipos no déficit hídrico, resposta que contribui para o reforço da sua tolerância ao déficit hídrico.

Como consequência do aumento na atividade da GPX, a concentração de glutathione oxidada (GSSG) também aumentou nas plantas sob déficit hídrico. A GSH é recuperada a partir da GSSG, principalmente pela atividade da enzima redutase da glutathione (GR), que também une AA e GSH na tolerância de plantas aos estresses abióticos (Gill et al., 2013). Esses dois metabólitos participam do chamado Ciclo Ascorbato-Glutathione (AA-GSH), no qual a GR possui papel essencial, pois sua atividade mantém o *pool* de glutathione no seu estado reduzido e assim, o ciclo em funcionamento (Pandey et al., 2015).

Baseando-se nos resultados desse experimento, podemos afirmar que o cultivar E48 e as linhagens 11377 e 13241 apresentam maior participação do Ciclo AA-GSH como componente das suas defesas antioxidantes durante o estresse, considerando a evidente utilização da glutathione e do ascorbato nesses genótipos. Já na linhagem 11644, sua baixa eficiência na utilização da GSH como composto antioxidativo pode aumentar a sua suscetibilidade ao estresse oxidativo, decorrente do déficit hídrico. O Ciclo AA-GSH é a principal via de eliminação do H_2O_2 nos cloroplastos de plantas sob seca, mantendo o estado redox desse compartimento celular, além de proteger a maquinaria fotossintética contra danos oxidativos (Zagorchev et al., 2016). Assim, podemos considerar os genótipos de soja com mecanismos antioxidantes mais robustos, também os mais tolerantes ao déficit hídrico.

5. CONCLUSÕES

Mediante um conjunto de análises fisiológicas e bioquímicas, os resultados desse trabalho confirmam a atuação conjunta de diferentes mecanismos envolvidos na resistência ao déficit hídrico em plantas.

O cultivar E48 apresentou respostas superiores de características que confirmam o seu fenótipo tolerante ao déficit hídrico. Os resultados dos parâmetros *EUA*, *ETR* e $\phi PSII$ indicam maior aptidão do processo fotossintético nesse genótipo para o enfrentamento do estresse. Os níveis de ACC e de zeatina sugerem maior capacidade em atrasar a senescência foliar, induzida pelo déficit hídrico. As maiores concentrações de AA total e GSH total, associadas com elevadas atividades das enzimas MDHAR e GR, denotam importante atuação de metabolitos antioxidantes na capacidade de tolerância ao déficit hídrico desse genótipo. A maior concentração de sacarose sugere a participação desse açúcar no ajustamento osmótico e osmoproteção das plantas.

A linhagem 13241, pré-selecionada como tolerante ao déficit hídrico, exibiu resultados que sustentam esse prognóstico, como o maior tempo (10 dias) para atingir o potencial hídrico foliar de -1,5 MPa. Sua menor área foliar e maior razão raiz/parte aérea sob plena irrigação, juntamente com a maior concentração de ABA nas folhas após déficit hídrico, favoreceram a perda mais lenta de água e manutenção do TRA mais elevado nas plantas. Essas respostas que conservam água denotam estratégia de evitação ao estresse. Alguns componentes da tolerância ao déficit hídrico também foram mais efetivos nessa linhagem, considerando os maiores incrementos na atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, APX, MDHAR e DHAR, e na concentração de glicina-betaína. Além disso, maior teor de amido no início do estresse pode fornecer energia para o funcionamento de mecanismos de tolerância, bem como esqueletos de carbono para a síntese de metabólitos que prolongam o tempo de resistência ao estresse nesse genótipo.

A linhagem 11377 também possui características que indicam tolerância ao déficit hídrico, tais como, maior *EUA* e menores quedas na *ETR* e no $\phi PSII$ do que nas demais linhagens. Além disso, não demonstrou variações no acúmulo de O_2^- , apresentou maiores incrementos de glicose, frutose e glicina-betaína, bem como superior atividade das enzimas CAT e GPX, em relação ao cultivar E48. Por outro lado, alguns resultados apontam para maior sensibilidade dessa linhagem ao déficit hídrico, frente a linhagem 13241, como por exemplo, a incapacidade de recuperar totalmente A_n e *gs* após a reidratação, o maior acúmulo de H_2O_2 e a ausência de atuação da enzima APX.

A linhagem 11644 exibiu respostas que confirmaram a sua maior sensibilidade ao déficit hídrico. Seu balanço hídrico e crescimento foram mais afetados pelo estresse, considerando as maiores reduções no seu TRA, na suculência foliar e na TCR da parte área. Menor incremento na *EUA*, maiores quedas na *ETR* e no $\phi PSII$ e redução na concentração de clorofilas total, apontam para efeito mais severo do estresse no processo fotossintético dessa linhagem. Análises dos sistemas antioxidantes das plantas foram importantes na determinação da sensibilidade da linhagem 11644, devido ao registro de menor atividade das enzimas CAT e SOD e ainda, ineficiente atuação do metabolismo antioxidativo dependente da glutathione. Essas respostas podem ser a causa dos maiores incrementos na concentração de H_2O_2 e na peroxidação de lipídios, indicando estresse oxidativo mais intenso. Apesar do desempenho inferior ao dos demais genótipos, ainda demonstrou algumas respostas de tolerância, por exemplo, maiores incrementos na concentração de prolina e na atividade da enzima APX.

Por fim, conclui-se que o genótipo 11644 é o mais sensível ao déficit hídrico. A linhagem 11377, embora apresente características de tolerância possui um potencial menor do que a linhagem 13241, na qual os resultados indicam um fenótipo resistente ao déficit hídrico, por meio das estratégias de evitação e tolerância ao estresse. Inclusive, na linhagem 13241 os resultados das análises foram quase sempre muito semelhantes, ou até mesmo superiores aos do cultivar E48, utilizado nesse estudo como referencial de tolerância ao déficit hídrico para a soja.

Conclui-se também que a reidratação das plantas por 72 horas propiciou, na maioria dos casos, recuperação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos para os mesmos níveis do controle, indicando que mesmo após déficit hídrico severo a planta pode retornar o seu metabolismo para um estado de equilíbrio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi AR, Sarvestani R, Mohammadi B, Bagheri A (2014) Drought stress-induced changes at physiological and biochemical levels in some common vetch (*Vicia sativa* L.) genotypes. **J Agric Sci Tech** 16: 505–516
- Ahmad R, Ju Lim CJ, Kwon SY (2013) Glycine betaine: a versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses. **Plant Biotechnol Rep** 7: 49–57
- Akram NA, Shafiq F and Ashraf M (2017) Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. **Front Plant Sci** 8: 613. doi: 10.3389/fpls.2017.00613
- Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiol** 109: 1247-1257
- Anjum AS, Ashraf U, Tanveer M et al. (2017) Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. **Front Plant Sci**; 8: 69. doi: 10.3389/fpls.2017.00069
- Anjum NA, Sofo A, Scopa A et al (2015) Lipids and proteins--major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. **Environ Sci Pollut Res** 22: 4099-4121
- Araújo WL, Trofimova L, Mkrtchyan G, Steinhauser D, Krall L, Graf A (2013) On the role of the mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in amino acid metabolism. **Amino Acids** 44: 683-700
- Arraes FBM, Beneventi MA, de Sa MEL et al. (2015) Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance. **BMC Plant Biol** 15:213. doi: 10.1186/s12870-015-0597-z
- Ashoub A, Beckhaus T, Berberich T, Karas M, Brüggemann W (2013) Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress. **Planta** 237: 771–781
- Basu S, Ramegowda V, Kumar A, Pereira A (2016) Plant adaptation to drought stress. **F1000 Res** 5:1554 doi: 10.12688/f1000research.7678.1
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem** 44: 276-287
- Bela K, Horváth E, Gallé Á, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2015) Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. **J Plant Physiol** 176: 192–201
- Bhering LL (2017) Rbio: A tool for biometric and statistical analysis using the R platform. **Crop Breed Appl Biotechnol** 17: 187-190

Bilger W, Schreiber U, Bock M (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecol** 102: 425-432

Blum A (2017) Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant Cell Environ** 40: 4-10

Boaretto LF, Carvalho G, Borgo L et al. (2014) Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. **Plant Physiol Biochem** 74:165-175

Borrell AK, Mullet JE, George-Jaeggli B et al. (2014) Drought adaptation of stay-green sorghum is associated with canopy development, leaf anatomy, root growth, and water uptake. **J Exp Bot** 21: 6251-6263

Boureima S, Oukarroum A, Diouf M, Cisse N, Van Damme P (2012) Screening for drought tolerance in mutant germplasm of sesame (*Sesamum indicum*) probing by chlorophyll a fluorescence. **Environ Exp Bot** 81: 37-43

Boveris A, Alvarez S, Bustamante J, Valdez L (2002) Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. **Methods Enzymol** 349: 280-287

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem** 72: 248-254

Brestic M, Zivcak M (2013) PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in plants: protocols and applications. In: Rout GR, Das AB (Eds.) **Molecular stress physiology of plants**. Springer Dordrecht pp. 87-131.

Bulley S, Laing W (2016) The regulation of ascorbate biosynthesis. **Curr Opin Plant Biol** 33:15–22

Cao Y, Luo Q, Tian Y, Meng F (2017) Physiological and proteomic analyses of the drought stress response in *Amygdalus Mira* (Koehne) Yü et Lu roots. **BMC Plant Biol** 27;17:53. doi: 10.1186/s12870-017-1000-z.

Carvalho JFC, Crusiol LGT, Perini LJ et al. (2015) Phenotyping soybeans for drought responses using remote sensing techniques and non-destructive physiological analysis. **GI Sci Technol** 08: 1-16

Carvalho MHC (2008) Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signalling. **Plant Signal Behav** 3: 156–165

Catola S, Marino G, Emiliani E, Huseynova T, Musayev M, Akparov Z, Maserti BE (2016) Physiological and metabolomic analysis of *Punica granatum* (L.) under drought stress. **Planta** 243: 441–449

Catsky J (1974) Water saturation deficit (relative water content). In: Slavik B (Ed.) **Methods of studying plant water relations**. Springer-Verlag, Berlin. p.136-154

- Cazzonelli CI (2011) Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. **Funct Plant Biol** 38: 833–847
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Ann Bot** 103: 551–560
- Chen Z, Gallie DR (2006) Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. **Plant Physiol** 142: 775–787
- Cheng MC, Ko K, Chang WL, Kuo WC, Chen GH, Lin TP (2015) Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in Arabidopsis. **Plant J** 83: 926–39
- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Ron Mittler R (2016) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **Plant J** 90: 856–867
- Claeys H, Inzé D (2013) The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. **Plant Physiol** 162: 1768–1779
- Brodersen CR, McElrone AJ (2013) Maintenance of xylem network transport capacity: a review of embolism repair in vascular plants. **Front Plant Sci** 4: 108.doi: 10.3389/fpls.2013.00108
- Dahal K, Martyn GD, Vanlerberghe GC (2015) Improved photosynthetic performance during severe drought in *Nicotiana tabacum* overexpressing a nonenergy conserving respiratory electron sink. **New Phytol** 208: 382–395
- Daryanto S, Wang L, Jacinthe PA (2015) Global synthesis of drought effects on food legume production. **PLoS ONE** 10: e0127401. doi:10.1371/journal.pone.0127401
- Das P, Nutan KK, Singla-Pareek SL, Pareek A (2015) Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles. **Front Environ Sci** 2, 70. doi.org/10.3389/fenvs.2014.00070
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I (2013) Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. **Front Plant Sci** 4: 138 doi: 10.3389/fpls.2013.00138
- Day L (2013) Proteins from land plants - Potential resources for human nutrition and food. **Trends Food Sci Technol** 32: 25–42
- Dinakar C, Djilianov D, Bartelsa D (2012) Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Sci** 182: 29–41
- Du Z, Bramlage WJ (1992) Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. **J Agric Food Chem** 40: 1566–1570
- Efeoglu B, Ekmekçi Y, Çiçek N (2009) Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. **S Afr J Bot** 75: 34–42

- Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH et al. (2007) Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confer enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. **Planta** 225: 1255-1264
- Fang Y, Xiong L (2015) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cell Mol Life Sci** 72: 673–689
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agron Sustain Dev** 29: 185–212
- Fenta BA, Beebe SE, Kunert KJ, BurrIDGE JD, Barlow KM, Lynch JP, Foyer CH (2104) Field phenotyping of soybean roots for drought stress tolerance. **Agronomy** 4: 418-435
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta** 212: 250-263
- Filippou P, Antoniou C, Fotopoulos V (2011) Effect of drought and rewatering on the cellular status and antioxidant response of *Medicago truncatula* plants. **Plant Signal Behav** 6: 270–277
- Flexas J (2016) Genetic improvement of leaf photosynthesis and intrinsic water use efficiency in C3 plants: Why so much little success? **Plant Sci** 251: 155-161
- Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C(3) plants. **Plant Biol** 6: 269-279
- Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta** 133: 21. doi:10.1007/BF00386001
- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. **Plant Physiol** 155: 2–1
- Fu JY (2014) Cloning of a new glutathione peroxidase gene from tea plant (*Camellia sinensis*) and expression analysis under biotic and abiotic stresses. **Bot Stud** 55:7. doi: 10.1186/1999-3110-55-7
- Furlan A, Bianucci E, Tordable MC, Kleinert A, Valentine A, Castro S (2016) Dynamic responses of photosynthesis and the antioxidant system during a drought and rehydration cycle in peanut plants. **Functional Plant Biol** 43: 337-345
- Gaber A, Ogata T, Maruta T, Yoshimura K, Tamoi M, Shigeoka S (2012) The involvement of Arabidopsis Glutathione Peroxidase 8 in the suppression of oxidative damage in the nucleus and cytosol. **Plant Cell Physiol** 53: 1596–1606
- Gallie DR (2013) The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. **J Exp Bot** 63: 695–709

- Gay C, Gebicki JM (2000) A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. **Anal Biochem** 284:217-220
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochim Biophys Acta** 990: 87-92
- Gest N, Gautier H, Stevens R (2013) Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? **J Exp Bot** 64: 33–53
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiol** 1977 59: 309–314
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J et al. (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **Plant Cell** 16: 3304-3325
- Gietler M, Nykiel M, Zagdanska BM (2016) Changes in the reduction state of ascorbate and glutathione, protein oxidation and hydrolysis leading to the development of dehydration intolerance in *Triticum aestivum* L. seedlings. **Plant Growth Regul** 79: 287-297
- Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M et al. (2013) Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. **Plant Physiol Biochem** 70: 204-212
- Grieve CM, Grattan SR (1983) Rapid assay for Determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant Soil** 70: 303-307
- Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal Biochem** 106: 207-212
- Guan XK, Song L, Wang TC, Turner NC, Li FM (2015) Effect of drought on the gas exchange, chlorophyll fluorescence and yield of six different-era spring wheat cultivars. **J Agro Crop Sci** 201: 253–266
- Guha A, Sengupta D, Reddy AR (2013) Polyphasic chlorophyll a fluorescence kinetics and leaf protein analyses to track dynamics of photosynthetic performance in mulberry during progressive drought. **J Photochem Photobiol B** 119:71–83
- Gupta AK, Kaur N (2005) Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. **J Biosci** 30: 761-776
- Gururani MA, Venkatesh J, Tran LSP (2015) Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. **Mol Plant** 8: 1304-1320
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2015) **Free radicals in biology and medicine**. 5th Ed. Oxford: Oxford University Press.

- Hao P, Zhu J, Gu A et al. (2015) An integrative proteome analysis of different seedling organs in tolerant and sensitive wheat cultivars under drought stress and recovery. **Proteomics** 15:1544–1563
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI, Fujita AM (2017) Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. **Physiol Mol Biol Plants** 23: 249–268
- Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol** 84: 450-455
- Hossain MA, Nakano Y, Asada K (1984) Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. **Plant Cell Physiol** 25: 385-395
- Hossain MM, Liu X, Qi X, Lam HM, Zhang J (2014) Differences between soybean genotypes in physiological response to sequential soil drying and rewetting. **Crop J** 6: 366-380
- Hunt, R (1978) Plant growth analysis. **Studies in Biology** Series N° 96. Edward Arnold Ltd., London, U.K. 57p
- Huseynova IM, Rustamova SM, Suleymanov SY, Aliyeva DR, Mammadov AC, Aliyev JA (2016) Drought-induced changes in photosynthetic apparatus and antioxidant components of wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties. **Photosynth Res** 130:215–223
- Iovieno P, Paola Punzo P, Guida G et al. (2016) Transcriptomic changes drive physiological responses to progressive drought stress and rehydration in tomato. **Front Plant Sci** 7: 371. doi: 10.3389/fpls.2016.00371
- Iqbal N, Khan NA, Ferrante A, Trivellini A, Francini , Khan MIR (2017) Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. **Front Plant Sci** 8:475. doi: 10.3389/fpls.2017.00475
- Jibrán R, Hunter DA, Dijkwel PP (2013) Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. **Plant Mol Biol** 82:547–561
- Kalaji MH, Jajoo A, Oukarroum A et al. (2016) Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiol Plant** 38: 102
- Kampfenkel K, Montagu MV, Inzé D (1995) Extraction and Determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Anal Biochem** 225: 165-167
- Kaur G, Asthir B (2015) Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biol Plant** 59: 609-619
- Khoyerdi FF, Shamshiri MH, Estaji A (2016) Changes in some physiological and osmotic parameters of several pistachio genotypes under drought stress. **Sci Horti** 198: 44–51

- Kido EA, Ferreira Neto JR, Silva RL et al. (2013) Expression dynamics and genome distribution of osmoprotectants in soybean: identifying important components to face abiotic stress. **BMC Bioinformatics** doi: 10.1186/1471-2105-14-S1-S7
- Klughammer C, Schreiber U (2008) Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. **PAM Application Notes** 1: 27-35
- Kooyers NJ (2015) The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. **Plant Sci** 234:155-162
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. **Photosynth Res** 79: 209–218
- Lauteri M, Haworth M, Serraj R, Monteverdi MC, Centritto M (2014) Photosynthetic diffusional constraints affect yield in drought stressed rice cultivars during flowering. **Plos One** 9: e109054. doi:10.1371/journal.pone.0109054
- Lawlor DW (2013) Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **J Exp Bot** 64: 83-108
- Le DT1, Nishiyama R, Watanabe Y, Vankova R et al. (2012) Identification and expression analysis of cytokinin metabolic genes in soybean under normal and drought conditions in relation to cytokinin levels. **PLoS One** 7: e42411. doi: 10.1371/journal.pone.0042411
- Lim CW, Baek W, Jung J, Kim J-H, Lee SC (2015) Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses. **Int J Mol Sci** 16: 15251-15270
- Lindeman W (1958) **Observations on the behavior of phosphate compounds in Chlorella at the transition from dark to light**. Proc, 2nd Int. Conference on the Peaceful Uses Atomic Energy 24:8-15
- Lonbani M, Arzani A (2011) Morpho-physiological traits associated with terminal droughtstress tolerance in triticale and wheat. **Agron Research** 9: 315-329
- Lovisol C, Perrone I, Hartung W, Schubert A (2008) An abscisic acid-related reduced transpiration promotes gradual embolism repair when grapevines are rehydrated after drought. **New Phytol** 180: 642-651
- Maevskaya SV, Nikolaeva MK (2013) Response of antioxidant and osmoprotective systems of wheat seedlings to drought and rehydration. **Russian J Plant Physiol** 60: 343-350
- Martorell S, Diaz-Espejo A, Medrano H, Ball MC, Choat B (2014) Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange. **Plant Cell Environ** 37: 617–626.

Medrano H, Tomás M, Martorell S et al. (2015) From leaf to whole-plant water use efficiency (WUE) in complex canopies: limitations of leaf WUE as a selection target. **Crop J** 3:220–228

Mesquita, RO (2013) Determinantes fisiológicos e moleculares da resposta diferencial à seca em soja. **Tese**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 143 pp.

Mibei EK, Ambuko J, Giovannoni JJ, Onyango AN, Owino WO (2017) Carotenoid profiling of the leaves of selected African eggplant accessions subjected to drought stress. **Food Sci Nutr** 5:113–122

Mickelbart MV, Hasegawa PM, Bailey-Serres J (2015) Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. **Nature Rev Genetics** 16: 237-251

Mishra KB, Iannaccone R, Petrosz A e tal. (2012) Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. **Plant Sci** 182:79-86. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.03.022

Misra HP, Fridovich I (1971) The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **J Biol Chem** 246: 6886-6890

Mohammadi M, Karr AL (2001) Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **J Plant Physiol** 158: 1023-1029

Müller M, Munné-Bosch S (2011) Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Plant Methods** 7:37. doi: 10.1186/1746-4811-7-37

Murchie EH, Lawson T (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **J Exp Bot** 64: 3983-3998

Mutava RN, Prince SJ, Syed NH et al. (2015) Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: A comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. **Plant Physiol Biochem** 86: 109-120

Nagalakshmi N, Prasad MNV (2001) Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. **Plant Sci** 160: 291-299

Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam MM, Fujita M (2015) Glutathione-induced drought stress tolerance in mung bean: Coordinated roles of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. **AoB Plant** 1;7 doi: 10.1093/aobpla/plv069

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol** 22: 867-880

Nishiyama Y, Murata N (2014) Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery. **App Microbiol Biotechnol** 98: 8777-8796

Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. **Plant Physiol** 164:1636–1648

- Oliveira FC, Coelho ST (2016) History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil: a review. **Renew Sustainable Energy Rev** 75: 168-179
- Orlowski Meister A (1971) Partial reactions catalyzed by γ -glutamylcysteine synthetase and evidence for an activated glutamate intermediate. **J Biol Chem** 246: 7095-7105
- Pandey P, Singh J, Achary VMM, Reddy MK (2015) Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway. **Front Environ Sci** 3: 25. doi: 10.3389/fenvs.2015.00025
- Peleg Z, Blumwald E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. **Curre Opini Plant Biol** 14: 290-295
- Poel BV, Smet D, Straeten DVD (2015) Ethylene and hormonal cross talk in vegetative growth and development. **Plant Physiol** 169: 61–72
- Pyngrope S, Bhoomika K, Dubey RS (2013) Reactive oxygen species, ascorbate–glutathione pool, and enzymes of their metabolism in drought-sensitive and tolerant indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings subjected to progressing levels of water deficit. **Protoplasma** 250: 585–600
- Rivas R, Falcão HM, Ribeiro RV, Machado EC, Pimentel C, Santos MG (2016) Drought tolerance in cowpea species is driven by less sensitivity of leaf gas exchange to water deficit and rapid recovery of photosynthesis after rehydration. **S Afr J Bot** 103:101–107
- Rolland V, Bergstrom DM, Lenné T et al. (2015) Easy come, easy go: capillary forces enable rapid refilling of embolized primary xylem vessels. **Plant Physiol** 168: 1636–1647
- Rosa M, Prado C, Podaza G, Internadato R, Gonzalez JA, Hilal M, Prado FE (2009) Soluble sugars: metabolism, sensing and abiotic stress. **Plant Signal Behav** 4: 388-393
- Rose G, Osborne T, Helen Greatrex H, Wheeler T (2016) Impact of progressive global warming on the global-scale yield of maize and soybean. **Climatic Change** 134: 417-428.
- Roychoudhury A, Paul S, Basu S (2013) Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. **Plant Cell Rep** 32: 985–1006
- Sami F, Yusuf M, Faizan M, Faraz A, Hayat S (2016) Role of sugars under abiotic stress. **Plant Physiol Biochem** 109: 54-61
- Sánchez-Rodríguez E, Rubio-Wilhelmi M, Blasco B, Leyva R, Romero L, Ruiz JM (2012) Antioxidant response resides in the shoot in reciprocal grafts of drought-tolerant and drought-sensitive cultivars in tomato under water stress. **Plant Sci** 188-189: 89-96.
- Sanchita, Singh R, Mishra A et al. (2015) Physiological performance, secondary metabolite and expression profiling of genes associated with drought tolerance in *Withania somnifera*. **Protoplasma** 252:1439–1450

- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. **Science** 148: 339 – 345
- Shabnam N, Tripathi I, Sharmila P, Pardha-Saradhi P (2016) A rapid, ideal, and eco friendlier protocol for quantifying proline. **Protoplasma** 253: 1577-1582
- Shin SY, Kim MH, YH, Park HM, Yoon HS (2013) Co-Expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase from *Brassica rapa* effectively confers tolerance to freezing-induced oxidative stress. **Mol Cells** 36: 304–315
- Silva PA, Cosme VS, Rodrigues KCB et al. (2017) Drought tolerance in two oil palm hybrids as related to adjustments in carbon metabolism and vegetative growth. **Acta Physiol Plant** 39:58
- Silveira JAG, Araújo SAM, Lima JPMS, Viégas RA (2009) Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex numularia*. **Environ Exp Bot** 66: 1–8
- Singh M, Kumar J, Singh S, Singh VP, Prasad SM (2015) Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Rev Environ Sci Biotechnol** 14: 407–426
- Singh R, Naskar J, Pathre UV, Shirke PA (2014) Reflectance and cyclic electron flow as an indicator of drought stress in cotton (*Gossypium hirsutum*). **Photochem Photobiol**
- Sofo A, Scopa A, Nuzzaci M, Vitti A (2015) Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. **Int J Mol Sci** 16: 13561-13578
- Souza ER, Freire MBGS, Cunha KPV, Nascimento CWA, Ruiz HA, Lins CMT (2012) Biomass, anatomical change and osmotic potential in *Atriplex numularia* L cultivated in sodic saline soil under water stress. **Environ Exp Bot** 82: 20-27
- Su L, Dai Z, Li S, Xin H (2015) A novel system for evaluating drought–cold tolerance of grapevines using chlorophyll fluorescence. **BMC Plant Biol** 15:82 doi: 10.1186/s12870-015-0459-8
- Sulieman S, Ha CV, Esfahani MN et al. (2015) DT2008: A promising new genetic resource for improved drought tolerance in soybean when solely dependent on symbiotic N₂ fixation. **BioMed Res Int** 687213. doi: 10.1155/2015/687213
- Szábados L, Savouré A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. **Trends Plant Sci** 15: 89-97
- Takahashi S, Badger MR (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. **Trends Plant Sci** 16: 53–60
- Talebi R, Ensafi MH, Baghebani N, Karami E, Mohammadi K (2013) Physiological responses of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes to drought stress. **Environ Exp Biol** 11: 9-15

- Thalmann M, Santelia D (2017) Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytol** 214: 943–951
- Tomar RSS, Tiwari S, Vinod et al. (2016) Molecular and morpho-agronomical characterization of root architecture at seedling and reproductive stages for drought tolerance in wheat. **PLoS ONE** 11: e0156528. doi:10.1371/journal.pone.0156528
- Tomás M, Medrano H, Escalona JM et al. (2014) Genetic variability in water use efficiency in grapevines. **Environ Exp Bot** 103: 148–157
- Velázquez-Márquez S, Conde-Martínez V, Trejo C et al. (2015) Effects of water deficit on radicle apex elongation and solute accumulation in *Zea mays* L. **Plant Physiol Biochem** 96: 29-37
- Voss I, Suni B, Scheibe R, Raghavendra AS (2013) Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. **Plant Biol** 15: 713–722
- Wang X, Cai X, Xu C, Wang Q, Dai S (2016) Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. **Int J Mol Sci** 18;17. doi: 10.3390/ijms17101706
- Wani SH, Kumar V, Shriram V, Kumar Sah SJ (2016) Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. **Crop J** 4: 162-176
- Wani SH, Singh NB, Haribhushan A, Iqbal Mir JI (2013) Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance - Role of glycine betaine. **Curr Genomics** 14: 157-165
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J Plant Physiol** 144: 307-313
- Woo NS, Badger MR, Pogson BJ (2008) A rapid, non-invasive procedure for quantitative assessment of drought survival using chlorophyll fluorescence. **Plant Methods**. 4:27 doi:10.1186/1746-4811-4-27
- Yamori W (2016) Photosynthetic response to fluctuating environments and photoprotective strategies under abiotic stress. **J Plant Res** 129: 379-95
- Yang Z, Xu L, Yu J, DaCosta M, Huang B (2013) Changes in carbohydrate metabolism in two Kentucky Bluegrass cultivars during drought stress and recovery. **J Amer Soc Hort Sci** 138: 24-30
- You J and Chan Z (2015) ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. **Front Plant Sci** 6:1092. doi: 10.3389/fpls.2015.01092
- Yu TF, Xu ZS, Guo JK et al. (2017) Improved drought tolerance in wheat plants overexpressing a synthetic bacterial cold shock protein gene *SeCspA*. **Sci Rep** 10;7:44050. doi: 10.1038/srep44050
- Yue B, Xue W, Xiong L et al. (2006). Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice: separation of drought tolerance from drought avoidance. **Genetics** 172: 1213–28

- Zargorchev L, Teofanova D, Odjakova M (2016) Ascorbate–Glutathione Cycle: controlling the redox environment for drought tolerance. In: Hossain MA, Wani SH, Bhattacharjee S, Burritt DJ, Tran LSP (Eds.) **Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1**. Springer International Publishing, Switzerland. pp. 187-226
- Zhang H, Liu K, Wang Z, Liu L, Yang J (2015a) Absciscic acid, ethylene and antioxidative systems in rice grains in relation with grain filling subjected to postanthesis soil-drying. **Plant Growth Regul** 76:135–146
- Zhang J, Liub J, Yangc C, Dud S, Yang W (2016) Photosynthetic performance of soybean plants to water deficit under high and low light intensity. **S Afri J Bot** 105: 279–287
- Zhang M, Jin ZQ, Zhao J, Zhang G, Wu F (2015b) Physiological and biochemical responses to drought stress in cultivated and Tibetan wild barley. **Plant Growth Regul** 75: 567-574
- Zhang YL, Hu YY, Luo HH, Chow WS Zhang WF (2011) Two distinct strategies of cotton and soybean differing in leaf movement to perform photosynthesis under drought in the field. **Funct Plant Biol** 38 567–575
- Zhou R, Yu X, Ottosen Co et al. (2017) Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. **BMC Plant Biol** 17:24. doi: 10.1186/s12870-017-0974-x
- Zivcak M, Brestic M, Balatova Z et al. (2013) Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. **Photosyn Res** 117: 529-546
- Zlatev Z, Lidon FC (2012) An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. **Emir J Food Agric** 24: 57-72

CAPITULO 2

AJUSTAMENTO METABÓLICO E EXPRESSÃO DE GENES RESPONSIVOS AO DÉFICIT HÍDRICO EM GENÓTIPOS DE SOJA

Resumo

A seca é o fator de estresse abiótico que mais ameaça a produtividade agrícola mundial, devido ao seu impacto negativo no metabolismo vegetal, capaz de gerar perdas no rendimento das grandes culturas. Para contrapor os efeitos do déficit hídrico, as plantas passam por modificações no seu metabolismo e expressão gênica, no sentido de se aclimatar e tolerar o estresse. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar o ajustamento metabólico e a expressão de genes responsivos à seca em genótipos de soja com tolerância diferencial ao déficit hídrico. Para a análise do perfil metabólico foram utilizados três genótipos de soja: Embrapa 48 (E48-cultivar tolerante) e as linhagens 11644 e 13241, sensível e tolerante ao déficit hídrico, respectivamente. Para a análise da expressão gênica, somente as linhagens 11644 e 13241 foram utilizadas. As plantas foram avaliadas no estágio de desenvolvimento V4, expostas aos seguintes tratamentos: Controle (plena irrigação), déficit hídrico (DH) (potencial hídrico foliar na antemanhã de $-1,5 \pm 0,2$ MPa) e reidratação (RH) (3 dias de reidratação, após DH). A análise de Componentes Principais (PCA) separou as plantas expostas ao déficit hídrico, daquelas sob plena irrigação e reidratadas. Os resultados do perfil metabólico indicaram resposta de tolerância voltada para o ajustamento metabólico das plantas, mediante incrementos em aminoácidos (valina, leucina e isoleucina), carboidratos (os açúcares frutose, manose e trealose) e poliaminas (putrescina e cadaverina). De modo geral, não foi possível discernir por meio do perfil metabólico, níveis de tolerância ao déficit hídrico entre os genótipos, uma vez que todos apresentaram incrementos e reduções para diferentes metabólitos, ou ainda, respostas metabólicas em comum. A análise da expressão gênica não apresentou diferenças significativas para a maioria dos genes avaliados, entretanto, foi possível observar padrões de resposta biológica evidentes nas suas expressões relativas. Genes que codificam enzimas da via de biossíntese do ABA (*Gm08g176300* e *Gm11g055700*), fatores de transcrição responsivos a estresses (*Gm16g02390*, *Gm05g35050* e *Gm12g22880*) e enzimas antioxidantes (*Gm04g248300*, *Gm12g073100* e *Gm02g141800*), demonstraram ser mais induzidos pelo déficit hídrico na linhagem 13241. Por outro lado, genes envolvidos nas vias de biossínteses de alguns osmolitos, tais como rafinose (*Gm03g137900*), trealose (*Gm08g288600*) e prolina

(*Gm19g131500*), tiveram suas expressões relativas superiores na linhagem 11644. Tomados em conjunto, os resultados da expressão gênica contribuíram para confirmar o caráter tolerante ao déficit hídrico na linhagem 13241 e esclarecer quais os mecanismos mais importantes nessa resposta.

Palavras chave: ácido abscísico, aminoácidos, açúcares, poliaminas, seca, tolerância.

1. INTRODUÇÃO

Fatores ambientais adversos são os principais agentes limitantes ao rendimento das culturas. Dentre os estresses abióticos, a seca é considerada a maior ameaça à produtividade agrícola mundial, com grandes impactos anuais na produção de alimentos (Calanca, 2017). Nesse contexto, a escassez de água no solo afeta negativamente o crescimento e a produtividade da soja, podendo resultar em elevadas perdas na produção final de grãos dessa cultura (Valliyodan et al., 2017).

A resistência à seca em plantas é uma característica bastante complexa e envolve a participação de múltiplas vias biológicas. Entretanto, importantes descobertas acerca dos mecanismos que governam essa característica vêm sendo realizadas nos últimos anos, principalmente por meio do uso de modernas técnicas de biologia molecular e de biotecnologia. Nesse sentido, estudos utilizando as chamadas ferramentas “ômicas” têm contribuído para o avanço das pesquisas relacionadas com a resistência à seca em soja (Deshmukh et al., 2014; Osakabe et al., 2014; Singh et al., 2015a).

Uma abordagem bastante útil para avaliar as respostas das plantas diante de estresses ambientais, se faz pelo uso da Metabolômica (Arbona et al., 2013). O conjunto de metabólitos presente nos tecidos vegetais é alterado em decorrência de fatores endógenos da planta, no decorrer do seu crescimento e desenvolvimento, mas também está sujeito à influência do ambiente. Quando determinados agentes bióticos e abióticos se tornam fatores de estresse, uma complexa rede de sinalização modifica o padrão de expressão gênica na planta, induzindo a produção de metabólitos envolvidos em respostas de aclimação e tolerância (Bhargava e Sawant et al., 2013; Mohanty et al., 2016). Assim, o perfil metabólico de uma planta tende a ser modificado durante eventos de estresse (Sun et al., 2016).

Uma ferramenta analítica amplamente utilizada na Metabolômica utiliza as técnicas de cromatografia gasosa (GC) acoplada a espectrometria de massas (MS), nos sistemas de análises conhecidos por GC-MS. Análises do perfil metabólico por GC-MS permitem a quantificação dezenas de metabólitos em um único extrato, resultando numa ampla cobertura das vias centrais do metabolismo primário vegetal (Obata e Fernie, 2012; Zhang et al., 2012; Jorge et al., 2016). Com isso, obtêm-se uma visão mais abrangente das diferentes respostas de tolerância aos estresses abióticos em plantas, inclusive soja submetida ao déficit hídrico (Komatsu et al., 2014; Chebrolu et al., 2016; Tripathi et al., 2016; Das et al., 2017).

Apesar de todo o progresso na área, o inconcluso entendimento das alterações metabólicas associadas aos estresses abióticos, bem como a identificação de metabolitos chave nessas condições, ainda permanecem uma grande lacuna nas pesquisas com soja na atualidade (Fernandez et al., 2016; Das et al., 2017).

Em plantas expostas ao déficit hídrico, diferentes classes de metabolitos passam por modificações nas suas concentrações. Carboidratos, incluindo diversos açúcares e polióis, múltiplos aminoácidos, ácidos orgânicos e as poliaminas são alguns dos grupos de compostos alterados, detectados por meio da técnica GC-MS. Sendo o ajustamento osmótico um importante mecanismo da tolerância nessa condição, diferentes metabolitos acumulados induzem essa resposta na planta. Muitos metabolitos também são associados à proteção contra os efeitos da desidratação nos tecidos vegetais, pelas suas propriedades de estabilizar estruturas e macromoléculas celulares, eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e atraso da senescência induzida pelo estresse (Mata et al., 2016; Adbelrahman et al., 2017).

O ramo da Transcriptômica também trouxe importantes contribuições para o entendimento da tolerância à seca em plantas cultivadas. Através dessa técnica, foram descobertos vários genes envolvidos com a biossíntese e sinalização de componentes que atuam na defesa contra o estresse e limitação de danos, como metabolitos osmoprotetores e osmorreguladores, fitohormônios, grupos de proteínas LEA, chaperonas e antioxidantes e ainda, genes relacionados à homeostase iônica (Chen et al., 2013; Brasileiro et al., 2015; Krannich et al., 2015; Ma et al., 2016; Tripathi et al., 2016). Um grupo de fatores de transcrição (FTs), proteínas reguladoras da transcrição de genes responsivos à seca também têm sido identificadas, aumentando assim o conhecimento sobre as respostas das plantas no enfrentamento do estresse (Singh e Laxmi 2015; Joshi et al., 2016; Seeve et al., 2017).

Devido às mudanças climáticas globais, estão previstos eventos mais frequentes de seca, tornando a escassez de água um entrave cada vez maior para a agricultura. Com o aumento da população mundial, mais alimentos precisarão ser produzidos, no entanto, cada vez com menos água disponível (Wheeler e Braun; 2013; Reynolds et al., 2016). Nessa conjuntura, torna-se importante a compreensão de como as plantas cultivadas se aclimatam e toleram o déficit hídrico.

Durante o período de seca, o crescimento e o desenvolvimento das plantas cultivadas são prejudicados. Dessa forma, um rápido rearranjo metabólico deve ser induzido para permitir ajustamento ao estresse, de forma a mitigar danos e minimizar possíveis perdas na sua produtividade. Essas alterações podem ser avaliadas por meio

do perfil metabólico e contribuir para caracterizar a tolerância diferencial ao déficit hídrico entre genótipos. Já a identificação de genes que atuam na regulação de respostas de tolerância pode ser utilizada para a geração de cultivares de soja mais aptos para crescimento e reprodução em condições adversas, garantindo maior rendimento da cultura, mesmo num ambiente desfavorável (Batley e Edwards, 2016; Abberton et al., 2016; Tripathi et al., 2016). Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar o ajustamento metabólico e a expressão de genes responsivos à seca em genótipos de soja com tolerância diferencial ao déficit hídrico.

2. METODOLOGIAS

2.1. Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental

Para a análise do perfil metabólico foram utilizados três genótipos de soja: Embrapa 48 (E48-cultivar tolerante) e as linhagens 11644 e 13241, sensível e tolerante ao déficit hídrico, respectivamente. Para a análise da expressão gênica, somente as linhagens 11644 e 13241 foram utilizadas.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do BIOAGRO/UFV, entre os meses de janeiro e abril, do ano de 2016. As sementes foram germinadas em substrato comercial e após 7 dias, 4 plantas foram transplantadas para vasos com capacidade para 10 litros, contendo 8 kg de uma mistura de 2:1 de solo/areia, adubada com NPK (04-14-08), e cultivadas em casa de vegetação sob condições de temperatura e umidade parcialmente controladas. A temperatura média e umidade média durante os experimentos foram de 38°C e 15°C, e de 97% e 43%, máximas e mínimas, respectivamente.

As plantas foram mantidas em condições de plena irrigação (controle) até atingirem o estágio de desenvolvimento V4 (quarto nó, terceiro trifólio expandido e a quarta folha trifoliolada aberta), quando foi suspensa a irrigação de um grupo de plantas até resultar num potencial hídrico foliar na antemanhã ($\Psi_{w_{am}}$) de $-1,5 \pm 0,2$ MPa, medido entre 04:00h e 06:00h, utilizando uma bomba de pressão do tipo Scholander (Scholander et al., 1965). Nesse momento, foi realizada a coleta de material vegetal para as análises posteriores. Além dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH), um terceiro grupo de plantas também foi mantido sem água até propiciar um $\Psi_{w_{am}}$ foliar de $-1,5 \pm 0,2$ MPa, quando foram reidratadas e mantidas sob plena irrigação durante 3 dias (RH), sendo posteriormente avaliadas e coletadas.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), num arranjo fatorial, com 3 repetições para cada tratamento. Para apresentação dos resultados do perfil metabólico foi gerado um *heatmap* (mapa de calor) dos metabólitos, utilizando o software *online* “Metaboanalyst” (<http://www.metaboanalyst.ca>) (Xia et al., 2016). As Análises de Componentes Principais (PCA) do perfil metabólico também foram realizadas utilizando esse mesmo software. Os resultados apresentados no *heatmap* foram normalizados pela média do controle do cultivar tolerante (E48) e as demais médias comparadas a esse tratamento pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$), expressando a abundância relativa de cada metabólito.

Os resultados da análise de PCR-Real Time foram calculados utilizando os níveis de $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Livak e Schmittgen 2001) e apresentados como “Expressão relativa normalizada” de cada gene. Os valores obtidos no tratamento 11644 Controle foram normalizados para 1 (um), e utilizados como controle de referência para a expressão gênica nos demais tratamentos. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$). Os testes de médias foram realizados no software para análises estatísticas RBio (Bhering, 2017).

2.2. Perfil metabólico

A análise do perfil metabólico foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Lisec et al. (2006), com modificações. Para a extração dos metabólitos foram utilizados aproximadamente 10 mg de material vegetal liofilizado, obtidas a partir de um *pool* composto por folhas completamente expandidas, coletadas de uma única planta, de cada repetição, na metade do período de luz. Os metabólitos foram extraídos em 1,5 mL de solução extratora, constituída por água:metanol:clorofórmio (1:2,5:1). Adicionou-se em cada amostra, 60 μL de ribitol como padrão interno (0,2 mg mL^{-1} em água ultrapura), seguido por vórtex e agitação durante 15 min a 70 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14000 *g* e o sobrenadante foi coletado em um novo microtubo.

Foi realizada uma partição com o sobrenadante e 1500 μL de água ultrapura, seguido de vórtex e centrifugação por 15 min a 14000 *g*. Posteriormente, foi coletada uma alíquota de 100 μL da fase superior, correspondente à fase polar da amostra, a qual foi transferida para outro microtubo e realizada a secagem em concentrador a vácuo (*speed vac*) durante 3h, em temperatura ambiente. A amostra foi armazenada a -80°C até o momento da derivatização.

As amostras foram submetidas à derivatização com 40 μL de piridina, contendo metoxiamina hidrocloreto a 20 mg mL^{-1} , sob agitação por 2 horas a 37°C. Após esse período foi adicionado 70 μL da solução de N-Metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) (20 $\mu\text{L mL}^{-1}$ da mistura padrão do tempo de retenção), previamente preparada segundo Lisec et al. (2006), seguido por aquecimento a 37°C por 30 min. Por fim, 100 μL da alíquota foi transferida para vial e realizada a análise subsequente.

Os níveis relativos de metabólitos foram determinados nas amostras derivatizadas por meio de cromatografia gasosa acoplada ao detector por espectrometria de massas (GC-MS), num sistema de análises composto por cromatógrafo a gás (Agilent 7890A) e espectrômetro TruTOF[®] HT TOFMS, Leco, equipado com coluna capilar de 30 m (MDN-35), de acordo com (Lisec et al., 2006). Para realização das análises, foi injetado 1 μL da amostra no modo *splitless* a 230°C, carregado pelo gás hélio, em fluxo contínuo de 2 mL min^{-1} . A temperatura do forno foi inicialmente mantida constante a 80° C e, em seguida, foi aumentado em 15°C min^{-1} , até alcançar a temperatura de 330 °C, a qual foi mantida durante 5 minutos.

Os dados foram processados no programa TargetSearch (Cuadros-Inostroza et al., 2009). Depois de identificados, os valores relativos dos metabólitos foram normalizados pelo peso da amostra e pela mediana do valor relativo.

2.3. Análise da expressão gênica

2.3.1. Extração do RNA total

Amostras de 100 mg de folhas (V4 - quarta folha trifoliolada aberta) das linhagens 11644 e 13241 foram utilizadas para a extração do RNA total. As amostras foram maceradas com 750 μL de reagente Trizol[®] (Invitrogen) e posteriormente centrifugadas com clorofórmio para a separação das fases. A fase aquosa, contendo o RNA foi precipitada com igual volume de isopropanol e em seguida, lavada com etanol 70%. Em seguida, o RNA foi ressuspensionado em água ultrapura. Após extração, a quantificação foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific). Para a remoção da contaminação por DNA, as amostras foram tratadas com DNase I RNase Free (Invitrogen), segundo o protocolo do fabricante. Em seguida, a concentração de RNA foi novamente determinada utilizando um fluorímetro SpectraMax M5 Microplate Reader (Molecular Devices), utilizando kit Quant-iT[™] RiboGreen[®] RNA (Molecular Devices), de modo a obter maior precisão na quantificação. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,7%.

2.3.2. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total, utilizando a enzima Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. A reação de transcriptase reversa para um volume final de 12 µL foi realizada em termociclador e as amostras conservadas em freezer a -20° C, até o momento da análise.

2.3.3. PCR Real-Time

A partir de revisão da literatura e resultados obtidos em outras análises apresentadas no Capítulo 1, foram selecionados 16 genes envolvidos com diversas vias de respostas ao déficit hídrico em plantas. O conjunto de *primers* dos genes selecionados foram projetados no software Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando a sequência completa do transcrito, obtida no banco de dados virtual, Phytozome (Goodstein et al., 2012). As sequências dos *primers* estão listadas na Tabela 2 dos dados suplementares. Como controles endógenos, a expressão dos genes 60S (Le et al., 2012) e UKN2 (Hu et al., 2009) foram utilizadas para a normalização da expressão dos genes alvos desse estudo. Os controles endógenos foram previamente testados para a verificação de suas expressões estáveis.

Os 16 genes alvo selecionados, bem como os genes de controle endógeno foram amplificados, segundo o mesmo protocolo. As análises de PCR foram conduzidas em microplacas de 96 poços, utilizando o equipamento 7500 Real Time PCR Systems (AppliedBiosystems), em reação contendo 1,0 µL de cDNA diluído 1:10; 5 µL de solução contendo os *primers Forward* e *Reverse* na concentração de 1,5 µM, e 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas nas seguintes condições: 95°C por 10 min e 40 ciclos de: desnaturação 95 °C por 15 segundos, seguido de anelamento e extensão a 60 °C por 1 min. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento. Controles negativos sem a adição de cDNA sintetizado e/ou *primers* foram utilizados para confirmar a ausência de qualquer tipo de contaminante no meio de reação (No Template Control, NTC). Os valores threshold (quantification cycle value – Cq) foram convertidos pelo programa QBASE v1.3.5 em quantidades relativas normalizadas (NRQ) (Hellemans et al., 2007).

3. RESULTADOS

Os dois primeiros componentes principais, PC1 (42,9%) e PC2 (19,6%), permitiram a separação dos 9 tratamentos (3 genótipos de soja x 3 disponibilidades hídricas) em 5 grupos diferentes: os 3 genótipos sob déficit hídrico (grupo 1); linhagem 11644 controle e cultivar E48 reidratado (grupo 2); cultivar E48 controle e linhagem 13241 reidratada (grupo 3), e ainda mais dois grupos distintos, representados por um tratamento cada: 11644 reidratado (grupo 4) e 13241 controle (grupo 5) (Fig. 1A).

O gráfico de cargas mostra os metabólitos que mais contribuíram para separação dos grupos, destacando-se os aminoácidos valina, isoleucina e leucina, os açúcares trealose e xilose, o poliól xilitol e as poliaminas cadaverina e putrescina (Fig. 1B).

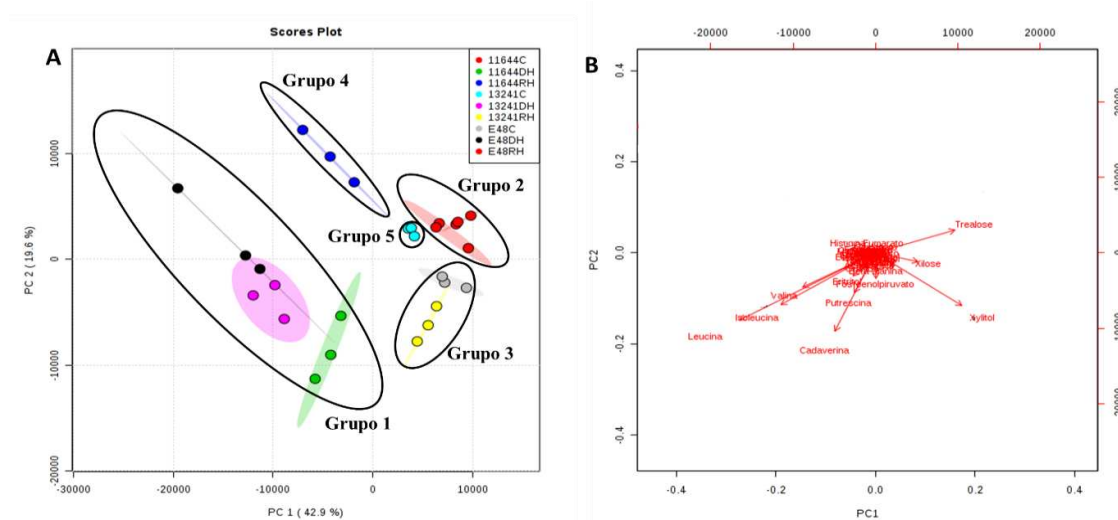


Figura 1. Distribuição dos tratamentos no biplot composto pelos dois primeiros componentes principais (A) e Cargas das variáveis originais nos dois primeiros componentes principais (B), em folhas de 3 genótipos de soja: linhagem 11644, linhagem 13241 e cultivar Embrapa 48, em três disponibilidades hídricas: controle (C), déficit hídrico (DH) e reidratação (RH).

3.1. Análise do perfil metabólico em três genótipos de soja contrastantes para a tolerância à seca

Para obtenção dos resultados de abundância relativa de metabólitos, foram utilizados como referencial os valores relativos do tratamento controle do cultivar tolerante à seca (E48), sendo os demais tratamentos comparados em relação a este. Dos 11 aminoácidos detectados no perfil metabólico, 4 aumentaram sob déficit hídrico no cultivar E48 (cisteína, isoleucina, leucina e valina), enquanto um deles diminuiu (glutamato). O maior aumento proporcional ao controle ocorreu para leucina, e o menor, para cisteína. As linhagens 11644 e 13241 sob plena irrigação (C), apresentaram reduções em 3 (alanina, β -alanina e glutamina) e 2 (β -alanina e glutamato) aminoácidos, respectivamente, em comparação ao tratamento de referência. Porém, o resultado da

abundância relativa de aminoácidos entre as linhagens foi semelhante em resposta ao estresse, havendo incrementos em ambas para isoleucina, leucina, ornitina e valina e ainda, cisteína na 11644 e glutamina na 13241.

Ambos os genótipos apresentaram redução para um aminoácido, sendo β -alanina no tolerante (13241) e glutamato no sensível (11644). Quando as plantas foram reidratadas, somente β -alanina reduziu no E48. Novamente, o mesmo número de aminoácidos variou nas linhagens, mas de forma contrária, com reduções para β -alanina, cisteína e glutamato na 11644, e incrementos em asparagina, β -alanina e isoleucina na 13241.

De forma geral, os ácidos orgânicos apresentaram a tendência de diminuição nas plantas sob déficit hídrico de todos os genótipos. Nesse sentido, fumarato, malonato, fosfoenolpiruvato e succinato reduziram no cultivar E48. Nas linhagens, os níveis de três ácidos orgânicos reduziram nos dois genótipos, sendo o fumarato na 11644 e o fosfoenolpiruvato na 13241, e ainda, malonato e succinato em ambas. Somente o fosfoenolpiruvato apresentou ligeiro aumento na linhagem 11644. A reidratação das plantas levou a pequenos incrementos de malonato e succinato no cultivar E48 e também, discreta redução em fosfoenolpiruvato. Entre as linhagens, as respostas nas plantas reidratadas foram variadas, com reduções para ascorbato, fosfoenolpiruvato e succinato na 11644. Na linhagem 13241, registraram-se incrementos para citrato e fosfoenolpiruvato, porém, houve redução de malonato e succinato.

Dos 15 carboidratos (9 açúcares e 5 polióis, ou álcoois de açúcar) detectados nas folhas dos genótipos de soja, somente manose e isomaltose aumentaram sob déficit hídrico do cultivar E48, enquanto o açúcar fucose e os polióis sorbitol, xilitol, galactitol e mio-inositol, apresentaram reduções. Após a reidratação, os níveis de fucose, galactose, xilitol mio-inositol permaneceram menores do que no controle para E48, porém um grande aumento ocorreu para trealose. Na linhagem 11644, níveis inferiores de galactose, xilitol e mio-inositol ocorreram sob irrigação plena, porém, trealose aumentou muito, nessa mesma condição. Na 13241, reduziram os níveis de fucose, galactose, xilitol, arabitól e mio-inositol no controle, enquanto apresentou um elevado aumento de manose, em comparação ao tratamento referência.

Sob déficit hídrico, houve redução para galactose, xilitol e mio-inositol na linhagem 11644, mas para isomaltose, galactitol e trealose, ocorreram incrementos. Já na linhagem tolerante, houve aumento de frutose e manose, sendo para este último, bastante elevado. De modo contrário, isomaltose e xilitol reduziram na linhagem 13241. Com a reidratação, frutose, xilitol e mio inositol reduziram na 11644, mas na linhagem

13241, somente mio-inositol diminuiu. Houve aumento de manose nas duas linhagens, após a reidratação. É válido destacar os incrementos na abundância relativa de manose na linhagem 13241, em todas as disponibilidades hídricas avaliadas.

As poliaminas apresentaram padrão de resposta mais restrito ao déficit hídrico, havendo redução para espermidina no cultivar E48 e para a espermina na linhagem 11644, nessa disponibilidade hídrica. Também sob déficit hídrico, espermina aumentou no E48 e na linhagem 13241. Espermidina aumentou nas duas linhagens, sendo que na 11644, também aumentaram a cadaverina e a putrescina. Dessa forma, das 4 poliaminas detectadas, três delas aumentaram na linhagem 11644, com destaque para a putrescina, que apresentou grandes incrementos, em comparação ao tratamento de referência. A reidratação somente promoveu mudanças significativas para cadaverina na linhagem 13241, a qual aumentou em relação ao tratamento de referência (Fig. 2).

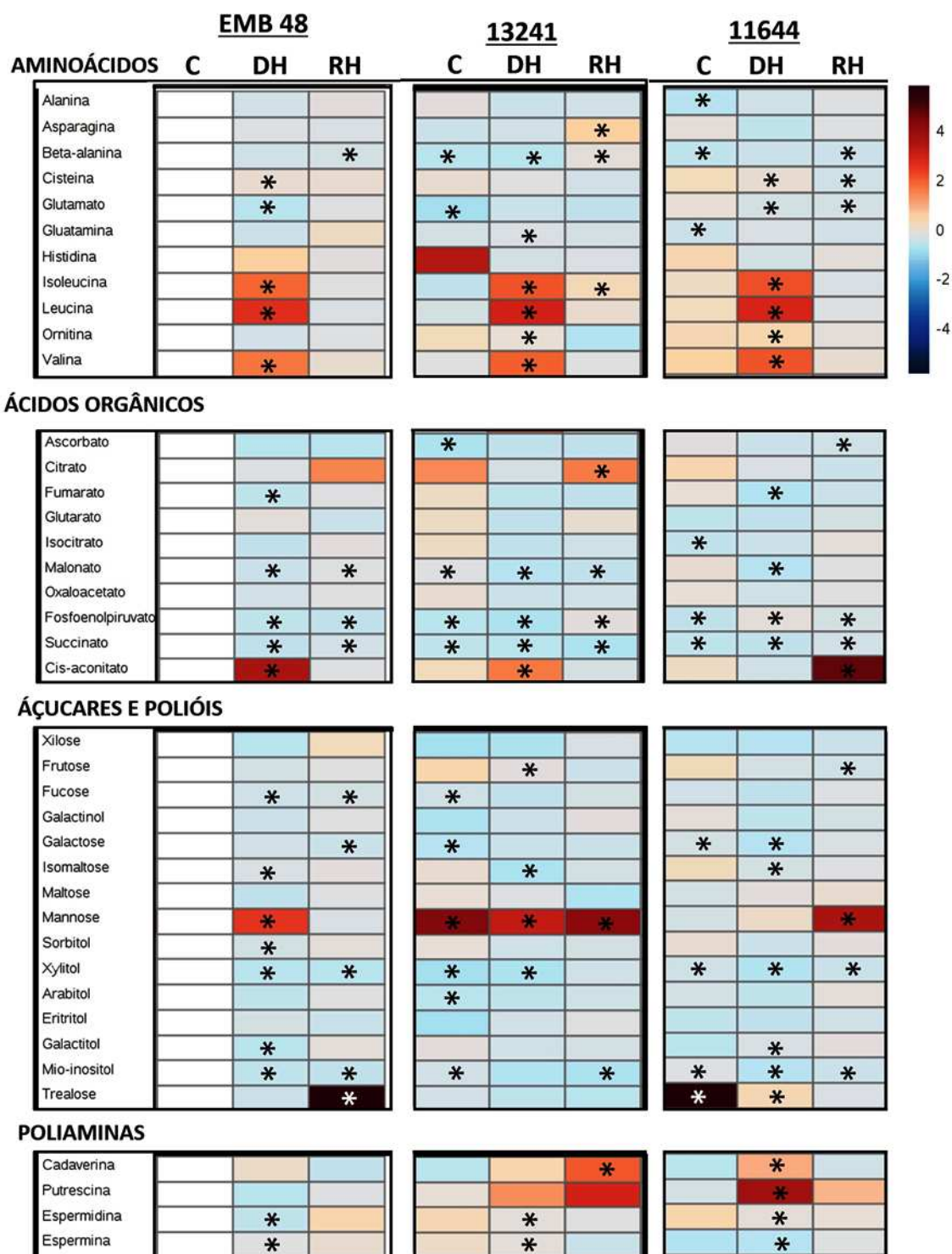


Figura 2. *Heatmap* representando as mudanças na abundância relativa de diferentes grupos de metabólitos em folhas de 3 genótipos de soja: linhagem 11644, linhagem 13241 e cultivar Embrapa 48, em três disponibilidades hídricas: controle (C), déficit hídrico (DH) e reidratação (RH). Os valores representam as médias de $n=3$. Os asteriscos denotam valores significativamente diferentes do controle do cultivar Embrapa 48 para um mesmo metabólito, de acordo com o teste de Dunnet ($P<0,05$). Os valores relativos estão disponíveis nos Dados Suplementares (Tabela 1).

3.2. Análise da expressão de genes em dois genótipos de soja contrastantes para a tolerância ao déficit hídrico

No grupo de genes que codificam fatores de transcrição (FTs): *Gm12g22880* (NAC), *Gm16g02390* (HD-ZiP) e *Gm05g35050* (MYB) (Fig. 3 A-C), não houve diferença estatística entre o tratamento de referência (11644 Controle) e os demais. Entretanto, ocorreram grandes incrementos na expressão relativa dos genes *Gm16g02390* e *Gm05g35050* somente na linhagem tolerante ao estresse (13241), após exposição ao déficit hídrico. Já a expressão relativa do gene *Gm12g22880* aumentou em ambos os genótipos, porém, também de forma superior na linhagem 13241 (Fig. 3).

Foram avaliados 3 genes envolvidos nas vias de sinalização e biossíntese do ácido abscísico (ABA): *Gm01g43460* (PP2C) (Fig. 3 D), que codifica uma proteína fosfatase da via de sinalização ABA e os genes *Gm08g176300* (NCED3) e *Gm11g055700* (ZEP) (Fig. 3 E-F), que codificam para as enzimas da biossíntese, 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase 3 e Zeaxantina epoxidase, respectivamente. Nesse grupo de genes, também não houve diferença significativa entre os tratamentos, muito embora seja possível observar incrementos na expressão relativa normalizada dos genes *NCED3* e *ZEP* somente na linhagem 13241. Por outro lado, a expressão relativa do gene *PP2C* apresentou aumento superior na linhagem 11644, em comparação ao tratamento de referência.

No grupo das enzimas antioxidantes, a expressão relativa dos genes *Gm04g248300* e *Gm12g073100* (Fig. 3 G-H), que codificam, respectivamente, isoformas das enzimas peroxidase do ascorbato (APX) cloroplastídica e citosólica, embora também não tenham apresentado diferença significativa entre os tratamentos, demonstraram serem regulados positivamente pelo déficit hídrico somente na linhagem 13241. O gene *Gm02g141800* (GR/NADPH) (Fig. 3 I), que codifica a enzima antioxidante redutase da glutatona dependente de NADPH (GR), apresentou também na linhagem 13241, maior expressão relativa normalizada, considerando os valores das médias no déficit hídrico.

As análises da expressão de genes de proteínas que atuam no processo fotossintético demonstraram regulação negativa pelo déficit hídrico em ambas as linhagens de soja. A expressão relativa do gene *Gm18g036400* (RCA) (Fig. 3 J), que codifica para a enzima Rubisco ativase, reduziu significativamente nos dois genótipos. Inclusive, na linhagem 11644, continuou menor do que no controle, após a reidratação. Na linhagem 13241, a expressão relativa do gene *RCA* também diminuiu significativamente nas plantas sob estresse, em relação ao tratamento de referência,

porém, de forma menos intensa do que no genótipo sensível, considerando os valores das médias.

Os genes que codificam para proteínas envolvidas com a absorção de energia no complexo antena (*Gm16g165500*-LHBC1) (Fig. 3 K) e transporte de elétrons durante o processo fotossintético (*Gm07g163600*-Citocromo b6f - PetM) (Fig. 3 L), também apresentaram redução nas suas expressões relativas para as duas linhagens no déficit hídrico, em relação ao tratamento de referência. Também não houve diferença estatística na expressão relativa desses genes, entretanto, as barras que representam as médias da expressão relativa normalizada demonstram essa redução e ainda, denotam maior queda na linhagem 11644. Além disso, a recuperação da expressão dos genes do processo fotossintético aparenta ocorrer de maneira mais eficiente no genótipo tolerante após a reidratação.

De forma geral, os genes que atuam em vias de biossíntese de osmolitos demonstraram aumento superior da expressão relativa normalizada na linhagem 11644. Inclusive, o gene *Gm03g137900* (RS1) (Fig. 3 M), que codifica para a enzima sintase da rafinose (RS), apresentou aumento significativo da sua expressão relativa na linhagem 11644 sob déficit hídrico, em relação ao tratamento de referência. Além disso, os genes *Gm08g288600* (TPS) e *Gm19g131500* (P5CR) (Fig. 3 N-O), os quais codificam enzimas chaves da biossíntese da trealose e prolina, trealose-6-fosfato sintase (TPS) e Δ 1-pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR), respectivamente, não apresentaram diferença estatística, mas também aparentam ser mais induzidos pelo déficit hídrico na linhagem 11644, considerando as médias da expressão relativa normalizada, representadas nos gráficos de barras. Por outro lado, o gene da via de biossíntese do poliól galactinol: *Gm20g094500* (GolS6) (Fig. 3 P), que codifica uma isoforma da enzima sintase do galactinol (GolS), apresentou aumento de expressão relativa superior na linhagem 13241, após o déficit hídrico (Fig. 3).

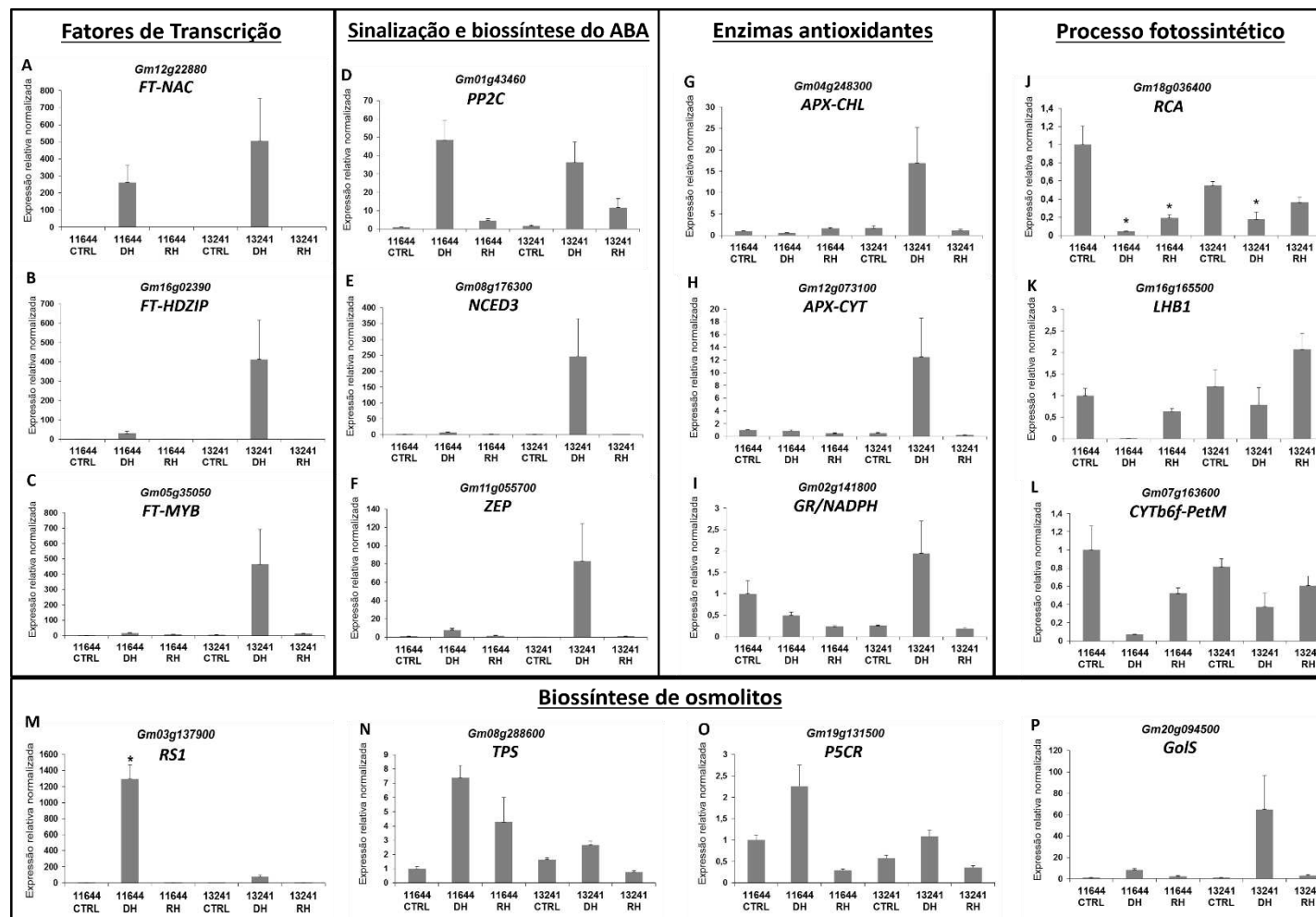


Figura 3. Expressão relativa normalizada dos genes: *Gm12g22880* (A), *Gm16g02390* (B), *Gm05g35050* (C), *Gm01g43460* (D), *Gm08g176300* (E), *Gm11G055700* (F), *Gm04g248300* (G), *Gm12g073100* (H), *Gm02g141800* (I), *Gm18g036400* (J), *Gm16g165500* (K), *Gm07g163600* (L), *Gm03g137900* (M), *Gm08g288600* (N), *Gm19g131500* (O) e *Gm20g094500* (P) em folhas de duas linhagens de soja: 11644-SS e 13241-TS, em três disponibilidades hídricas: controle (CTRL), déficit hídrico (DH) e reidratação (RH). TS= tolerante à seca e SS= sensível à seca. Os resultados foram comparados ao controle da linhagem 11644 (normalizado para 1). Os valores representam as médias de $n=3$. As barras representam o erro padrão. Os asteriscos denotam valores significativamente diferentes do controle da linhagem 11644, de acordo com o teste de Dunnett ($P<0,05$).

4. DISCUSSÃO

Um método de exploração de dados útil para reduzir a complexidade de um grande número de elementos e destacar similaridades e diferenças entre amostras trata-se da Análise de Componentes Principais (PCA) (Worley e Powers, 2013). Nesse estudo, pela distribuição dos tratamentos no biplot, foi possível observar uma tendência clara de separação entre plantas submetidas ao estresse, daquelas do controle e reidratadas, e ainda, um maior agrupamento dos genótipos de soja considerados tolerantes. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Silvente et al. (2012), no qual também foram avaliados cultivares de soja contrastantes nas respostas ao déficit hídrico, havendo também a separação entre os tratamentos hídricos e os genótipos.

Aminoácidos são compostos do metabolismo vegetal com reconhecida importância no enfrentamento do déficit hídrico. Nessa condição, os aminoácidos de cadeia ramificada (*Branched-Chain Amino Acids-BCAA*): leucina, isoleucina e valina, tendem a aumentar sua abundância, conforme observado em todos os genótipos de soja. BCAA's podem servir como fonte de energia quando a disponibilidade de açúcares é baixa, e a degradação destes contribui para atrasar o início do estresse em plantas expostas à seca (Galili et al., 2014; Pires et al., 2016).

Redução de alguns aminoácidos nas folhas dos genótipos de soja pode indicar translocação para as raízes, como forma de garantir uma reserva de nitrogênio com o prolongamento do estresse (Martinelli et al., 2007). Por esse motivo, o glutamato pode ter diminuído no cultivar E48 e na linhagem 11644 sob déficit hídrico. Além disso, o glutamato é um dos precursores da biossíntese de prolina e poliaminas, metabólitos que tendem a se acumular em plantas expostas a estresses abióticos, principalmente seca, o que funcionaria como dreno nessa condição (Fichman et al., 2014). De fato, o estresse promoveu aumento de prolina e poliaminas nos genótipos de soja. A ornitina também é um aminoácido intermediário em vias de biossíntese de metabólitos osmoprotetores e pode ter aumentado nas duas linhagens de soja, como uma resposta de tolerância ao déficit hídrico (Kalamaki et al., 2009; Muscolo et al., 2015).

Cisteína, glutamato e β -alanina são aminoácidos componentes dos tióis não proteicos, glutationa e homoglutationa (Galant et al., 2011; Colville et al., 2015). A biossíntese desses metabólitos antioxidantes nas plantas, como uma resposta de defesa contra o déficit hídrico pode sido uma das causas das modificações na abundância desses aminoácidos entre os genótipos. Além de papéis específicos, os aminoácidos acumulados durante o déficit hídrico podem servir como fonte de carbono e nitrogênio

para a síntese de proteínas e também, reserva de energia para uma recuperação mais rápida da planta após o estresse (Suguiyama et al., 2014).

As poliaminas (PAs): putrescina (Put), espermidina (Spd), espermina (Spm) e cadaverina (Cad), são metabólitos com reconhecido papel na tolerância à seca em plantas (Minocha et al., 2014; Tiburcio et al., 2014; Jancewic et al., 2016). Entretanto, houve pouca variação na abundância relativa das poliaminas no cultivar E48 após déficit hídrico. Uma inferência possível é que nessa condição, outros metabólitos contendo nitrogênio podem ter sido mais relevantes na resposta de tolerância desse genótipo, como por exemplo, aminoácidos e proteínas de defesa (Bascuñán-Godoy et al., 2016). Por outro lado, diferentes PAs se acumularam nas linhagens de soja sob déficit hídrico, destacando-se a Put na 11644. Isso sugere que PAs são metabólitos mais importantes no enfrentamento do déficit hídrico nesse genótipo.

Considerando os papéis desempenhados pelas PAs durante o estresse por seca, tais como promover o acúmulo osmoprotetores, ativar genes de defesa antioxidantes, interagir com fitohormônios e moléculas sinalizadoras e ainda, modificar a parede celular (Sziderics et al., 2010; Do et al., 2014; Li et al., 2015a; Gupta et al., 2016; Peng et al., 2016; Nahar et al., 2017), pode-se inferir que os incrementos na abundância desses metabólitos melhoraram a tolerância ao déficit hídrico nos genótipos de soja, mas principalmente nas linhagens. É pertinente destacar que o acúmulo de PAs em plantas sob estresses, nem sempre ocorre como resposta de tolerância, mas também por modificações no metabolismo de nitrogênio, no sentido de evitar o acúmulo de amônia (NH_3) na célula (Majumdar et al., 2016).

Modificações qualitativas e quantitativas dos carboidratos ocorrem em genótipos de soja, tanto sensíveis, quanto tolerantes, quando as plantas são expostas ao déficit hídrico (Silvente et al., 2012, Rodrigues et al., 2015). Nesse sentido, ocorreram incrementos para trealose nas plantas da linhagem 11644, e de frutose e manose no cultivar E48 e linhagem 13241. Segundo Ogbaga et al. (2016), a frutose pode proteger a função fotossintética foliar em plantas de sorgo tolerantes à seca. A manose além de ser um soluto compatível, também está envolvida na regulação da abertura estomática durante situações de estresse, e melhora a eficiência no uso da água pela planta (Li et al., 2016). Um elevado *pool* de manose, conforme observado na linhagem 13241, pode servir também para a síntese de outros metabólitos de defesa, como o poliól manitol que possui papel osmorregulador e eliminador de ROS (Meena et al., 2015).

Estresses abióticos alteram o processo respiratório celular e modificam o funcionamento do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) em diferentes espécies de plantas (Cramer et al., 2007; Zuther et al., 2007; Sanchez et al., 2008a, b). Nesse sentido, o déficit hídrico imposto aos genótipos de soja causou redução de alguns de seus intermediários, como fumarato e succinato. Resposta semelhante foi verificada nas folhas de um cultivar de soja exposto à seca e calor, havendo redução nos teores dos ácidos orgânicos oxaloacetato, citrato e succinato (Das et al., 2017).

Decréscimos na abundância dos ácidos orgânicos podem ocorrer pela diminuição do metabolismo vegetal durante a seca, e nesse caso, resultar em maior suscetibilidade ao estresse pela menor produção de ATP (Muscuolo et al., 2015; Igamberdiev e Eprintsev, 2017). Por outro lado, a redução na abundância dos ácidos orgânicos nos genótipos de soja também pode ser uma resposta de tolerância, considerando a hipótese de que esses metabólitos podem ser exsudados na rizosfera de plantas sob déficit hídrico para aumentar a solubilidade e a absorção de alguns nutrientes mineiras, evitando a deficiência nutricional decorrente do estresse (Ogbaga et al., 2016).

Mesmo com a reidratação, alguns metabólitos ainda apresentaram níveis superiores aos do controle, principalmente na linhagem 13241. De maneira similar, Vanková et al. (2012), registraram elevadas concentrações de osmoprotetores em tabaco durante os estágios iniciais da recuperação da seca. Segundo Perlikowski et al. (2016), essa capacidade pode estar relacionada com um tipo de “memória ao estresse” e garante melhor desempenho fisiológico da planta até a sua total recuperação.

Da mesma forma que o perfil metabólico de uma planta sob seca pode ser bastante alterado, a expressão de genes também é modificada no sentido de expressar um fenótipo que se aclimate às condições do ambiente. Ao considerarmos os genes envolvidos na biossíntese de osmolitos, aparentemente a linhagem 11644 investe mais no ajustamento osmótico como resposta de tolerância ao déficit hídrico, pelos grandes incrementos apresentados na expressão relativa dos genes *RS1* e *TPS*, das vias de biossíntese dos açúcares rafinose e trealose, respectivamente.

Na linhagem 13241, maior expressão relativa do gene *GolS* da via de biossíntese do galactinol, sugere o acúmulo desse poliól como resposta ao estresse. Galactinol e rafinose podem atuar como osmorreguladores e osmoprotetores, também estabilizam membranas e eliminam ROS, protegendo as células de danos oxidativos. Segundo Nishizawa et al. (2008), esses dois compostos contribuem de maneira semelhante para a tolerância a estresses abióticos em plantas.

Pelos resultados obtidos é possível inferir que a linhagem sensível direciona seu metabolismo mais para a produção de açúcares, enquanto a tolerante aparenta investir no acúmulo do poliál galactinol. Contudo, essa suposição é apenas especulativa, uma vez que o metabolismo desses carboidratos é bastante dinâmico e muitos outros compostos intermediários estão presentes nas suas vias de biossíntese e degradação (Lunn et al., 2014; Sengupta et al., 2015). De fato, pelos resultados do perfil metabólico, a trealose demonstrou incrementos somente na linhagem 11644, porém, a rafinose não demonstrou aumento nesse genótipo e nem o galactinol na 13241 (Tab. Suplementar 1).

De modo oposto ao observado na análise da concentração de prolina nas duas linhagens de soja (Fig. 13-B, Cap.1), a expressão relativa do gene *P5CR* da via de biossíntese desse aminoácido apresentou pequeno aumento na linhagem 11644 em relação ao controle e sequer aumentou na linhagem 13241. A síntese da prolina em plantas ocorre por intermédio das enzimas $\Delta 1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase (*P5CS*) e $\Delta 1$ -pirrolina-5-carboxilato redutase (*P5CR*) (Szabados e Savoure, 2010).

Aparentemente, o gene *P5CS* avaliado tem a sua expressão induzida por estresses abióticos, enquanto transcritos *P5CR* não parecem ser induzidos na mesma intensidade e ainda, a produção do transcrito pode não resultar na produção da proteína (Xue et al., 2009; Sharma e Verslues, 2010). Isso indica que a enzima limitante na via de biossíntese de prolina é a *P5CS* (Liang et al., 2013). Por essa razão, pode ter havido pouca variação nos níveis de expressão do gene *P5CR*. No entanto, convém ressaltar que, dependendo da espécie e do tipo de estresse, a enzima *P5CR* também desempenha papel importante na síntese da prolina (Li et al., 2015b).

Pela tendência biológica apresentada na análise da expressão gênica, as defesas antioxidantes são mais ativas na tolerância ao estresse na linhagem 13241, o que de fato confirma os dados discutidos no Capítulo 1 deste trabalho. A regulação positiva de genes codificando para as enzimas GR e APX, tem sido relacionada com uma maior capacidade de tolerância ao déficit hídrico em diferentes espécies de plantas (Pan et al., 2016; Ren et al., 2016). Considerando de uma forma geral os resultados discutidos, parece haver maior investimento da linhagem 11644 em vias metabólicas que levam à produção de solutos compatíveis, enquanto na 13241, as respostas antioxidantes são preferenciais.

Existem diversas famílias de fatores de transcrição (FTs), por exemplo, AREB, DREB, MYB, WRKY, NAC, e ZIP, os quais atuam nas respostas de plantas à seca, ativando a expressão de genes de tolerância em vias dependentes e independentes do ABA (Gahlaut et al., 2016). Neste experimento, os genes *Gm16g02390*, *Gm05g35050* e

Gm12g22880, que codificam FTs das famílias, HD-ZIP, MYB e NAC, respectivamente, embora não tenham demonstrado diferenças estatísticas entre os tratamentos, apresentam médias que denotam maior nível de expressão na linhagem 13241, em resposta ao déficit hídrico.

Num estudo de Belamkar et al. (2014), o gene *Gm16g02390* (FT-HD-ZIP) também foi diferencialmente expresso num genótipo de soja, tanto em resposta à desidratação, quanto ao estresse salino. Genes desse mesmo clado apresentam importante papel na melhoria das respostas de tolerância ao déficit hídrico em outras espécies de planta, sendo assim um potencial candidato para estudos adicionais em soja. Transcritos dos genes *Gm05g35050* (FT MYB) e *Gm12g22880* (FT-NAC), aumentaram 74 e 148 vezes, respectivamente em folhas de soja, após somente 3 horas de desidratação e podem ser importantes para a melhoria da tolerância à seca nessa planta, segundo Tripathi et al. (2016). O gene *Gm12g22880* é ortólogo ao *RD26/ANAC071* de *Arabidopsis*, responsivo à dessecação e que está envolvido na via de sinalização a estresses abióticos, dependente do ABA (Hu et al., 2010).

Nesse contexto, torna-se possível inferir que a elevação nos níveis de expressão dos genes FTs na linhagem 13241 em resposta ao estresse pode significar a ativação de outros genes, que codificam para proteínas envolvidas com a tolerância da planta. Entretanto, a caracterização dos seus papéis específicos nesse genótipo necessita de estudos adicionais.

Para validar a importância do ABA nas linhagens de soja desse estudo, foi avaliada a expressão de genes participantes da sua síntese e sinalização. Nesse caso, a expressão relativa dos genes *PP2C*, *NCED* e *ZEP* também não apresentaram diferenças estatísticas, mas para os dois últimos, os quais codificam enzimas chave da rota de biossíntese do ABA, a expressão relativa foi muito superior na linhagem 13241. Essa resposta sugere maior produção de ABA nesse genótipo de soja, o que de fato foi confirmado pela análise da concentração de ABA foliar (Capítulo 1, Fig. 9). Maior expressão de genes *NCED* pode se traduzir num rápido fechamento estomático em resposta à seca, gerando menor perda de água pela transpiração foliar (McAdam et al., 2016). Esses resultados atestam a capacidade da linhagem 13241 em tolerar o déficit hídrico no solo por mais tempo, por meio da evitação ao estresse.

O fechamento estomático induzido pelo ABA durante o déficit hídrico leva à redução da fotossíntese. Nessa condição, genes que codificam para proteínas do processo fotossintético geralmente têm suas expressões diminuídas pelo estresse (Nouri et al., 2015). De fato, a expressão relativa do gene *RCA*, que codifica para a enzima

Rubisco ativase, apresentou redução significativa nas duas linhagens de soja, porém de forma aparentemente mais intensa na 11644. Inclusive, a reidratação desse genótipo não recuperou a expressão desse gene para o mesmo nível de antes do estresse.

Os genes relacionados da fase fotoquímica da fotossíntese: *Gm16g165500* (LHBC1) e *Gm07g163600* (Cyt b6f - PetM), também apresentaram reduções, considerando as médias de suas expressões relativas nos dois genótipos de soja. Esses resultados atestam que, além de restrições difusivas impostas pelo déficit hídrico, existe também uma regulação negativa em nível molecular do processo fotossintético em resposta ao estresse nas plantas, presumivelmente mais intensa na linhagem 11644. Segundo Shin et al. (2015), genótipos de soja mais tolerantes à seca apresentam menor inibição da expressão de genes relacionados ao processo fotossintético no início do estresse.

Com o retorno da irrigação, houve o reestabelecimento da expressão gênica para níveis semelhantes àqueles do tratamento controle nos dois genótipos de soja. Muito dos genes que haviam sido induzidos pelo déficit hídrico, foram reprimidos pela reidratação, enquanto a expressão de genes regulados negativamente pelo estresse foi estimulada nessa condição. Segundo Chen et al. (2013), genes com essa resposta adaptativa às condições do ambiente podem melhorar a tolerância da soja ao déficit hídrico e também, promover crescimento e recuperação das plantas, após a retomada do seu adequado *status* hídrico.

5. CONCLUSÕES

O perfil metabólico dos genótipos de soja apresentou modificações que permitiram a separação das plantas sob déficit hídrico dentro de um mesmo grupo. Plantas sempre irrigadas, juntamente com as reidratadas, também demonstraram a tendência de se agruparem, o que indica que houve o retorno do metabolismo vegetal para condições semelhantes àsquelas de antes do estresse.

O ajustamento metabólico demonstrou que a resposta de tolerância dos genótipos foi direcionada principalmente para o ajustamento osmótico e osmoproteção das plantas, pelo aumento de aminoácidos, carboidratos e poliaminas, destacando-se os maiores incrementos nos aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina), nos açúcares frutose, manose e trealose e nas poliaminas putrescina e cadaverina. De forma geral, não foi possível discernir por meio do perfil metabólico níveis de tolerância ao déficit hídrico entre os genótipos, nas condições avaliadas.

A análise da expressão gênica, conforme foi assumido, não apresentou diferenças significativas para a maioria dos genes. Porém, inferências foram possíveis a partir da tendência biológica observada nos resultados, que reforçaram a conclusão do capítulo 1 do presente estudo, no qual as linhagens 11644 e 13241 foram determinadas como sensível e tolerante ao déficit hídrico, respectivamente. Genes diretamente envolvidos com mecanismos de tolerância à seca, como biossíntese do ABA, defesas antioxidantes e fatores de transcrição responsivos a estresses, aparentemente têm suas expressões induzidas em maior intensidade na linhagem 13241, o que contribui para reforçar o entendimento do seu caráter tolerante ao déficit hídrico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abberton M, Batley J, Bentley A et al. (2016) Global agricultural intensification during climate change: a role for genomics. **Plant Biotechnol J** 14: 1095–1098
- Adbelrahman M, Burritt DJ, Tran L-S P (2017) The use of metabolomic quantitative trait locus mapping and osmotic adjustment traits for the improvement of crop yields under environmental stresses. **Semin Cell Dev Biol** 16: 30394-9. doi: 10.1016/j.semcd.2017.06.020
- Arbona V, Manzi M, de Ollas C, Gómez-Cadenas A (2013) Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. **Int J Mol Sci** 14: 4885-4911
- Batley J, David Edwards D (2016) The application of genomics and bioinformatics to accelerate crop improvement in a changing climate. **Curr Opin Plant Biol** 30: 78–81
- Bascuñán-Godoy L, Reguera M, Abdel-Tawab YM, Blumwald E (2016) Water deficit stress-induced changes in carbon and nitrogen partitioning in *Chenopodium quinoa* Willd. **Planta** 243: 591–603
- Belamkar V, Weeks NT, Bharti AK, Farmer AD, Graham MA, Cannon SB (2016) Comprehensive characterization and RNA-Seq profiling of the HD-Zip transcription factor family in soybean (*Glycine max*) during dehydration and salt stress. **BMC Genomics** 3; 15:950. doi: 10.1186/1471-2164-15-950
- Bhargava S, Sawant K (2013) Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. **Plant Breeding** 132: 21-32
- Bhering LL (2017) Rbio: A tool for biometric and statistical analysis using the R platform. **Crop Breed Appl Biotechnol** 17: 187-190
- Brasileiro ACM, Morgante CV, Araujo ACG et al. (2015) Transcriptome profiling of wild arachis from water-limited environments uncovers drought tolerance candidate genes. **Plant Mol Biol Rep** 33: 1876-1892
- Calanca PP (2017) Effects of abiotic stress in crop production. In: Ahmed M, Stockle C (Eds) **Quantification of climate variability, adaptation and mitigation for agricultural sustainability**. Springer, Cham. pp. 165-180
- Chebrolu KK, Fritschi FB, Ye S, Krishnan HB, Smith JR, Gillman JD (2016) Impact of heat stress during seed development on soybean seed metabolome. **Metabolomics** 12:28. doi:10.1007/s11306-015-0941-1
- Chen LM, Zhou XA, Li WB et al. (2013) Genome-wide transcriptional analysis of two soybean genotypes under dehydration and rehydration conditions. **BMC Genomics** 14: 687. doi: 10.1186/1471-2164-14-687
- Colville L, Sáez CMB, Lewis GP, Kranner I (2015) The distribution of glutathione and homogluthione in leaf, root and seed tissue of 73 species across the three sub-families of the Leguminosae. **Phytochemistry** 115: 175–183

Cramer GR, Ergul A, Grimplet J et al. (2007) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. **Funct Integr Genomics** 7: 111-134

Cuadros-Inostroza A, Caldana C, Redestig H et al. (2009) TargetSearch-a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics** 16;10: 428. doi: 10.1186/1471-2105-10-428.

Das A, Rushton PJ, Rohila JS (2017) Metabolomic profiling of soybeans (*Glycine max* L.) reveals the importance of sugar and nitrogen metabolism under drought and heat stress. **Plants** 6, 21. doi:10.3390/plants6020021

Deshmukh R, Sonah H, Patil G, Chen W, Prince S, Mutava R, Vuong T, Valliyodan B, Nguyen HT (2014) Integrating omic approaches for abiotic stress tolerance in soybean. **Frontiers Plant Sci** 5: 1-12

Do PT, Drechsel O, Heyer AG, Hinch DK, Zuther E (2014) Changes in free polyamine levels, expression of polyamine biosynthesis genes, and performance of rice cultivars under salt stress: a comparison with responses to drought. **Front Plant Sci** 8; 5:182. doi: 10.3389/fpls.2014.00182

Fernandez O, Urrutia M, Bernillon S et al. (2016) Fortune telling: metabolic markers of plant performance. **Metabolomics** 12:158. doi: 10.1007/s11306-016-1099-1

Fichman Y, Gerdes SY, Kovács H, Szabados L, Zilberstein A, Csonka LN (2015) Review Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. **Biol Rev Camb Philos Soc** 9: 1065-99

Gahlaut V, Jaiswa V, Kumar A, Gupta PK (2016) Transcription factors involved in drought tolerance and their possible role in developing drought tolerant cultivars with emphasis on wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theor Appl Genet** 129: 2019-2042

Galant A, Preuss ML, Cameron JC, Jez JM (2011) Plant glutathione biosynthesis: diversity in biochemical regulation and reaction products. **Front Plant Sci** 5;2:45. doi: 10.3389/fpls.2011.00045

Galili G, Wittenberg TA, Angelovici R, Fernie AR (2014) The role of photosynthesis and amino acid metabolism in the energy status during seed development. **Front Plant Sci** 5: 447. doi: 10.3389/fpls.2014.00447

Goodstein DM, Shu S, Howson R et al. (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Res** 40. 1178-86. doi: 10.1093/nar/gkr944

Gupta K, Sengupta A, Chakraborty M, Gupta B (2016) Hydrogen peroxide and polyamines act as double edged swords in plant abiotic stress responses. **Front Plant Sci** 7:1343. doi: 10.3389/fpls.2016.01343

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol** 8: R19. doi: 10.1186/gb-2007-8-2-r19

- Hu R, Fan C, Li H, Zhang Q, Fu YF (2009) Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Mol Biol.** 28;10:93. doi: 10.1186/1471-2199-10-93.
- Hu R, Qi G, Kong Y, Kong D, Gao Q, Zhou GE (2010) Comprehensive analysis of nac domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. **BMC Plant Biol** 10:145. doi: 10.1186/1471-2229-10-145
- Igamberdiev AU, Eprintsev AT (2016) Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. **Front Plant Sci** 7:1042. doi: 10.3389/fpls.2016.01042
- Jancewicz AL, Gibbs NM, Masson PH (2016) Cadaverine's functional role in plant development and environmental response. **Front Plant Sci** 7:870. doi: 10.3389/fpls.2016.00870
- Jorge TF, Rodrigues JA, Caldana C et al. (2016) Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. **Mass Spectrom Rev** 35: 620–649
- Joshi R, Wani SH, Singh B et al. (2016) Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. **Front Plant Sci** 7:1029. doi: 10.3389/fpls.2016.01029
- Kalamaki MS, Merkouropoulos G, Kanellis AK (2009) Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in Arabidopsis? **Plant Signal Behav** 4: 1099-1101
- Komatsu S, Nakamura T, Sugimoto Y, Sakamoto K (2014) Proteomic and metabolomic analyses of soybean root tips under flooding stress. **Protein Pept Lett** 21: 865-884
- Krannich CT, Maletzki L, Kurowsky C, Horn R (2015) Network candidate genes in breeding for drought tolerant crops. **Int J Mol Sci** 16: 16378-16400
- Le DT, Aldrich DL, Valliyodan B et al. (2012) Evaluation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in soybean tissues under various abiotic stress conditions. **PLoS One** 7: e46487. doi: 10.1371/journal.pone.0046487
- Li C, Shuqiang W, Lei H, Yongqiang Q, Huali Z, Haibo X, Zhenyuan S (2015b) Gene cloning and expression of the Pyrroline-5-carboxylate reductase gene of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). **Hort Plant J** 2: 113–120
- Li Y, Xu S, Gao J, Pan S, Wang G (2016) Glucose and mannose-induced stomatal closure is mediated by ROS production, Ca²⁺ and water channel in *Vicia faba*. **Physiol Plant** 156: 252-261
- Li Z, Jing W, Peng Y et al. (2015a). Spermine alleviates drought stress in white clover with different resistance by influencing carbohydrate metabolism and dehydrins synthesis. **PLoS One** 10:e0120708. doi.org/10.1371/journal.pone.0120708
- Liang X, Zhang L, Natarajan SK, Becker DF (2013) Proline mechanisms of stress survival. **Antioxid Redox Signal** 19: 998-1011

- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nat Protoc** 1: 387-396
- Liu L, Zhang Z, Dong J, Wang T (2016). Overexpression of *MtWRKY76* increases both salt and drought tolerance in *Medicago truncatula*. **Environ Exp Bot** 123: 50-58
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods** 25: 402–408
- Lunn JE, Delorge I, Figueroa CM, Dijck PV, Mark Stitt M (2014) Trehalose metabolism in plants. **Plant** 79: 544-567
- Ma X, Xia H, Liu Y et al. (2016) Transcriptomic and metabolomic studies disclose key metabolism pathways contributing to well-maintained photosynthesis under the drought and the consequent drought-tolerance in rice. **Front Plant Sci** 7:1886. doi: 10.3389/fpls.2016.01886
- Majumdar R, Barchi B, Turlapati AS et al. (2016) Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: The pathway is regulated at the post-transcriptional level. **Front Plant Sci** 7:78. doi: 10.3389/fpls.2016.00078
- Martinelli T, Whittaker A, Bochicchio A, Vazzana C, Suzuki A, Masclaux-Daubresse C (2007) Amino acid pattern and glutamate metabolism during dehydration stress in the ‘resurrection’ plant *Sporobolus stapfianus*: a comparison between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant leaves. **J Exp Bot** 58: 3037–3046
- Mata AT, Jorge TF, Pires MV, Antonio C (2016) Drought stress tolerance in plants: insights from metabolomics. In: Hossain MA et al. (Eds.) **Drought Stress Tolerance in Plants - Vol 2**, Springer International, Switzerland, doi: 10.1007/978-3-319-32423-4_7
- McAdam SA, Sussmilch FC, Brodribb TJ (2016) Stomatal responses to vapour pressure deficit are regulated by high speed gene expression in angiosperms. **Plant Cell Environ** 39: 485-91. doi: 10.1111/pce.12633
- Meena M, Prasad V, Zehra A, Gupta VK, Upadhyay RS (2015) Mannitol metabolism during pathogenic fungal–host interactions under stressed conditions. **Front Microbiol** 6:1019. doi: 10.3389/fmicb.2015.01019
- Minocha R, Majumdar R, Minocha SC (2014) Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. **Front Plant Sci** 5: 175. doi:10.3389/fpls.2014.00175
- Mohanty B, Kitazumi A, Cheung CYM et al. (2016) Identification of candidate network hubs involved in metabolic adjustments of rice under drought stress by integrating transcriptome data and genome-scale metabolic network. **Plant Sci** 242: 224–239
- Muscolo A, Junker A, Klukas C, Weigelt-Fischer K, Riewe D, Altmann T (2015) Phenotypic and metabolic responses to drought and salinity of four contrasting lentil accessions. **J Exp Bot** 66: 5467–5480

Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam MM, Rahman A, Mahmud JA, Suzuki T, Fujita M (2017) Insights into spermine-induced combined high temperature and drought tolerance in mung bean: osmoregulation and roles of antioxidant and glyoxalase system. **Protoplasma** 254: 445–460

Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiol** 147: 1251-1263

Nouri MZ, Moumeni A, Komatsu S (2015) Abiotic stresses: insight into gene regulation and protein expression in photosynthetic pathways of plants. **Int J Mol Sci** 28;16:20392-416. doi: 10.3390/ijms160920392.

Obata T, Fernie AR (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. **Cell Mol Life Sci** 69: 3225–3243

Ogbaga CC, Stepien P, Dyson BC et al. (2016) Biochemical analyses of sorghum varieties reveal differential responses to drought. **PLoS ONE** 11: e0154423. doi:10.1371/journal.pone.0154423

Osakabe K, Shinozaki K, Tran LP (2014) Responses of plants to water stress. **Front Plant Sci** 5: 86. doi: 10.3389/fpls.2014.00086

Pan L, Zhang X, Wang J et al. (2016) Transcriptional profiles of drought-related genes in modulating metabolic processes and antioxidant defenses in *Lolium multiflorum*. **Front Plant Sci** 7:519. doi: 10.3389/fpls.2016.00519

Peng D, Wang X, Li Z et al. (2016) NO is involved in spermidine-induced drought tolerance in white clover via activation of antioxidant enzymes and genes. **Protoplasma** 253: 1243–54. doi: 10.1007/s00709-015-0880-8

Perlikowski D, Czyżniejewski M, Marczak L, Augustyniak A, Kosmala A (2016) Water deficit affects primary metabolism differently in two *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms with a distinct capacity for photosynthesis and membrane regeneration. **Front Plant Sci** 7: 1063. doi: 10.3389/fpls.2016.01063

Pires MV, Pereira Júnior AA, Medeiros DB et al. (2016) The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched-chain amino acids following water shortage in *Arabidopsis*. **Plant Cell Environ** 39: 1304–1319

Ren J, Sun LN, Zhang QY, Song XS (2016) Drought tolerance is correlated with the activity of antioxidant enzymes in *Cerasus humilis* seedlings. **Biomed Res Int**, 9851095. doi.org/10.1155/2016/9851095

Reynolds MP, Quilligan E, Aggarwal PK et al. (2016) An integrated approach to maintaining cereal productivity under climate change. **Glob Food Sec** 8: 9–18

Rodrigues FA, Fuganti-Pagliarini R, Marcolino-Gomes J et al. (2015) Daytime soybean transcriptome fluctuations during water deficit stress. **BMC Genom** 16: 505. doi: 10.1186/s12864-015-1731-x

Sanchez DH, Lippold F, Redestig H et al. (2008b) Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. **Plant J** 53:973-87

Sanchez DH, Siahpoosh MR, Roessner U, Udvardi M, Kopka J (2008a) Review Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity. **Physiol Plant** 132: 209-219

Sánchez-Rodríguez E, Romero L, Ruiz JM (2016) Accumulation of free polyamines enhances the antioxidant response in fruits of grafted tomato plants under water stress. **J Plant Physiol** 190:72-8. doi: 10.1016/j.jplph.2015.10.010

Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. **Science** 148: 339-345

Seeve CM, Cho IJ, Hearne LB et al. (2017) Water-deficit-induced changes in transcription factor expression in maize seedlings. **Plant Cell Environ** 40: 686–701

Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, Majumder AL (2015) Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. **Front Plant Sci** 6:656. doi: 10.3389/fpls.2015.00656

Sharma S, Verslues PE (2010) Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. **Plant Cell Environ** 33: 1838-1851

Shin JH, Vaughn JN, Abdel-Haleem H et al. (2015) Transcriptomic changes due to water deficit define a general soybean response and accession-specific pathways for drought avoidance. **BMC Plant Biol** 15:26. doi: 10.1186/s12870-015-0422-8

Silvente S, Sobolev AP, Lara M (2012) Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. **PLoS One** 7: e38554. doi: 10.1371/journal.pone.0038554

Singh B, Bohra A, Mishra S, Joshi R, Pandey S (2015a) Embracing new-generation ‘omics’ tools to improve drought tolerance in cereal and food-legume crops. **Biol Plant** 59: 413–428

Singh D, Laxmi A (2015) Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. **Front Plant Sci** 6:895. doi: 10.3389/fpls.2015.00895

Singh M, Kumar J, Singh S, Singh VP, Prasad SM (2015b) Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Rev Environ Sci Biotechnol** 14: 407–426

Suguiyama VF, Silva EA, Meirelles ST, Centeno DC, Braga MR (2014) Leaf metabolite profile of the Brazilian resurrection plant *Barbacenia purpurea* Hook (Velloziaceae) shows two time-dependent responses during desiccation and recovering. **Front Plant Sci** 5: 1-13

Sun CX, Li MQ, Gao XX, Liu LN, Wu XF, Zhou JH (2016) Metabolic response of maize plants to multi-factorial abiotic stresses. **Plant Biol** 18: 120–129

Szabados L, Savoure A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. **Trends Plant Sci** 15: 89–97

- Sziderics AH, Oufir M, Trognitz F et al. (2010) Organ-specific defence strategies of pepper (*Capsicum annuum* L.) during early phase of water deficit. **Plant Cell Rep** 29: 295-305
- Tiburcio AF, Altabella T, Bitrián M, Alcázar R (2014) The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress **Planta** 240: 1-1
- Tripathi P, Rabara RC, Reese RN (2016) A toolbox of genes, proteins, metabolites and promoters for improving drought tolerance in soybean includes the metabolite coumestrol and stomatal development genes. **Genomics** 17:102. doi 10.1186/s12864-016-2420-0
- Valliyodan B, Ye H, Song L, Murphy M, Shannon JG, Nguyen HT (2017) Genetic diversity and genomic strategies for improving drought and waterlogging tolerance in soybeans. **J Exp Bot** 68: 1835–1849
- Vanková R, Dobrá J, Storchová H (2012) Recovery from drought stress in tobacco: an active process associated with the reversal of senescence in some plant parts and the sacrifice of others. **Plant Signal Behav** 7: 19-21
- Wheeler T, von Braun J (2013) Climate change impacts on global food security. **Science** 341: 508-513
- Worley B, Powers R (2013) Multivariate analysis in metabolomics. **Curr Metabolomics** 1: 92-107
- Xia J, Wishart DS (2016) Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Curr Protoc Bioinformatics**. 55:14. doi: 10.1002/cpbi.11
- Xue X, Liu A, Hua X (2009) Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. **BMB Rep** 42: 28–3
- Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X (2012) Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **Analyst** 137: 293-300
- Zuther E, Koehl K, Kopka J (2007) Comparative metabolome analysis of the salt response in breeding cultivars of rice. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (Eds) **Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops**. Springer, Dordrecht pp 285-315

CONCLUSÕES GERAIS

A partir do conjunto de resultados das análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares obtido para os quatro genótipos de soja nas condições experimentais avaliadas, foi possível concluir que:

A linhagem 11644 é o genótipo de soja mais sensível ao déficit hídrico por apresentar menor eficiência no uso da água, mecanismos antioxidativos e de ajustamento osmótico menos robustos e ainda, expressão de genes menos hábil em responder ao estresse. O cultivar Embrapa 48 demonstrou ser um genótipo tolerante ao déficit hídrico, confirmando o que já se encontra estabelecido na literatura. A linhagem 11377 apresenta respostas de tolerância, porém, em nível inferior às dos demais genótipos considerados tolerantes. A linhagem 13241 foi o genótipo de soja mais resistente ao déficit hídrico ao apresentar respostas superiores às dos demais, utilizando estratégias de evitação e tolerância no enfrentamento do estresse. Esse genótipo pode ser utilizado para a melhoria da tolerância à seca em soja, por meio de cruzamentos e outras abordagens do Melhoramento Genético de Plantas.

Sendo a produtividade a característica mais importante de uma planta cultivada, a fim de validar todo o potencial de resistência ao déficit hídrico apresentado pela linhagem 13241, estudos adicionais com esse genótipo durante o estágio reprodutivo são ainda necessários.

DADOS SUPLEMENTARES

Anexo 1: Tabela 1. Análise de perfil metabólico de folhas de 3 genótipos de soja: linhagem 11644, cultivar Embrapa 48 e linhagem 13241, no tratamento Controle e após déficit hídrico de $-1,5 \pm 0,2$ MPa (DH) e 3 dias de reidratação (RH). Médias com diferentes letras maiúsculas, dentro de uma mesma disponibilidade hídrica, entre genótipos e letras minúsculas, entre disponibilidades hídricas, para um mesmo genótipo, são significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média ($n=3$).

	11644			EMBRAPA 48			13241		
<u>ÁCIDOS ORGÂNICOS</u>	C	DH	RH	C	DH	RH	C	DH	RH
3-oxo-glutarato	0,01 Aa	0,02 Aa	0,33 Aa	0,09 Aa	0,11 Aa	0,08 Aa	0,08 Aa	0,07 Aa	0,09 Aa
Ácido cafeico	0,04 Cb	0,10 Ca	0,06 Cb	0,10 Bb	0,12 Ba	0,11 Bb	0,15 Ab	0,24 Aa	0,16 Ab
Ácido chiquímico-3-fosfato	0,04 Bb	0,10 Ba	0,07 Bb	0,07 Bb	0,13 Ba	0,07 Bb	0,08 Ab	0,16 Aa	0,10 Ab
Ácido cinâmico	0,01 Bc	0,10 Bb	0,14 Aa	0,07 Ab	0,14 ABa	0,07 Bb	0,07 Ab	0,17 Aa	0,08 Bb
Ácido fenilpirúvico	0,08 Bb	0,17 Aa	0,09 Ab	0,13 Aa	0,15 Aa	0,07 Ab	0,08 Ba	0,08 Ba	0,07 Aa
Ácido galacturônico	0,01 Bb	0,35 Aa	0,40 Aa	0,07 Bb	0,24 Aa	0,01 Bb	0,28 Aa	0,30 Aa	0,07 Bb
Ácido glucônico	0,06 ABb	0,16 Aa	0,12 Aab	0,04 Bb	0,13 Aa	0,10 ABa	0,13 Aa	0,08 Aab	0,01 Bb
Ácido glucorônico	0,07 Bb	0,07 Ab	0,11 Aa	0,10 Aa	0,08 Aa	0,10 Aa	0,11 Aa	0,09 Ab	0,09 Aab
Ácido hidroxipirúvico	0,07 Ab	0,09 Ba	0,09 Aa	0,08 Ab	0,10 Aa	0,08 Bb	0,08 Ab	0,09 ABa	0,08 ABb
Ácido homovanílico	0,07 Ab	0,14 Aa	0,20 Aa	0,05 Ba	0,05 Ba	0,04 Ba	0,13 Ab	0,20 Aa	0,21 Aa
Ácido láctico	0,07 Bb	0,12 Aa	0,10 Aa	0,10 Aa	0,10 Aa	0,07 Bb	0,09 ABa	0,11 Aa	0,08 ABb
Ácido maleâmico	0,09 Aa	0,12 Aa	0,10 Aa	0,04 Bb	0,15 Aa	0,12 Aa	0,04 Bb	0,14 Aa	0,05 Bb
Ácido nicotínico	0,05 Ba	0,01 Ba	0,07 Ba	0,07 Ba	0,07 Ba	0,07 Ba	0,14 Aa	0,12 Aa	0,15 Aa
Ácido oxalomálico	0,01 Bb	0,24 Aa	0,25 Aa	0,03 Bb	0,30 Aa	0,03 Bb	0,27 Aa	0,38 Aa	0,03 Bb
Ácido quínico	0,04 Ba	0,04 Aa	0,04 Ca	0,27 Aa	0,04 Ac	0,39 Ba	0,03 Bb	0,03 Ab	0,89 Aa
Ácido ribônico	0,003 Bb	0,06 Aa	0,09 Aa	0,09 Aa	0,07 Aa	0,09 Aa	0,06 Aab	0,01 Bb	0,07 Aa
Ácido tartrônico	0,18 ABb	0,07 Bb	0,41 Aa	0,26 Aa	0,03 Bb	0,08 Bb	0,06 Bb	0,31 Aa	0,07 Bb
Ácido treônico	0,06 Ba	0,05 Ca	0,04 Ba	0,80 Aa	0,36 Bb	0,05 Bc	0,06 Bb	0,90 Aa	0,96 Aa
Ácido Vanílico	0,06 Bb	0,21 Aa	0,08 Ab	0,09 Bb	0,09 Ba	0,09 Aa	0,26 Aa	0,08 Bb	0,09 Ab
Ácido-3-dehidrochiquímico	0,01 Bab	0,004 Ab	0,07 Aa	0,14 Aa	0,01 Ac	0,09 Ab	0,19 Aa	0,02 Ac	0,08 Ab
Ácido-N-acetil murâmico	0,03 Cb	0,11 Ca	0,03 Cb	0,08 Bb	0,14 Ba	0,07 Bb	0,11 Ab	0,24 Aa	0,16 Ab
Ácido-N-acetil-neurâmico	0,06 Ba	0,05 Ca	0,06 Aa	0,08 Bb	0,23 Ba	0,07 Ab	0,17 Ab	0,38 Aa	0,12 Ab
Ácido-trans-ferúlico	0,06 Ab	0,06 Bb	0,13 Aa	0,07 Aa	0,07 ABa	0,06 Ba	0,11 Aa	0,13 Aa	0,08 ABa

Ascorbato	0,08 Ba	0,10 Aa	0,02 Bb	0,12 Aa	0,11 Aab	0,07 Ab	0,01 Cb	0,11 Aa	0,08 Aa
Citrato	0,04 Aa	0,05 Aa	0,00 3Bb	0,03 Ab	0,06 Aab	0,12 Aa	0,09 Ab	0,05 Ab	0,19 Aa
Desidroascorbato	0,02 Bb	0,05 Bab	0,14 Ba	0,03 Bb	0,21 Aa	0,28 Aa	0,35 Aa	0,20 Ab	0,03 Cc
Fosfoenolpiruvato	0,04 Bb	0,38 Aa	0,09 Bb	0,16 Aa	0,05 Bb	0,03 Cb	0,05 Bb	0,05 Ba	0,26 Ab
Fumarato	0,09 Bb	0,00 5Cc	0,13 Aa	0,11 ABa	0,03 Bb	0,08 Ba	0,14 Aa	0,07 Ab	0,07 Bb
Glutarato	0,01 Ba	0,06 Ba	0,04 Ba	0,08 Aa	0,20 Aa	0,20 Aa	0,10 Aa	0,08 Aa	0,16 Aa
Isocitrato	0,02 Bc	0,09 Ab	0,14 Aa	0,10 Aa	0,07 Aa	0,09 Ba	0,13 Aa	0,10 Aa	0,09 Ba
Malonato	0,10 ABb	0,07 Ac	0,12 Aa	0,11 Aa	0,09 Ab	0,08 Bb	0,09 Ba	0,04 Ba	0,06 Bb
Oxaloacetato	0,07 Bb	0,09 Aa	0,10 Aa	0,09 ABa	0,10 Aa	0,07 Bb	0,09 Aa	0,10 Aa	0,07 Bb
Succinato	0,03 Bb	0,09 Aa	0,05 Aab	0,14 Aa	0,09 Ab	0,07 Ab	0,05 Ba	0,08 Aa	0,09 Aa
<u>AMINOÁCIDOS</u>									
Alanina	0,05 Ab	0,09 Aa	0,08 Aab	0,09 Ab	0,10 Aa	0,08 Aab	0,07 Ab	0,10 Aa	0,08 Aab
Asparagina	0,09 Aa	0,06 Ba	0,10 Ba	0,12 Aa	0,23 Aa	0,08 Ba	0,06 Ab	0,18 ABb	0,44 Aa
β-alanina	0,02 Bb	0,13 Aa	0,03 Cb	0,16 Aa	0,15 Aa	0,08 Bb	0,05 Bb	0,07 Bb	0,26 Aa
Cisteína	0,06 Ab	0,15 Aa	0,16 Aa	0,06 Ab	0,18 Aa	0,07 Bb	0,06 Aab	0,13 Aa	0,05 Bb
Citrulina	0,03 Ab	0,17 Aa	0,12 Ab	0,02 Aa	0,16 Ab	0,05 Aa	0,02 Ab	0,13 Aa	0,06 Ab
Glutamina	0,02 Bb	0,13 Aa	0,04 Bb	0,09 Aa	0,07 Ba	0,12 Aa	0,06 ABb	0,16 Aa	0,09 Ab
Glutamato	0,09 Ab	0,17 Aa	0,06 Ab	0,12 Aa	0,05 Bb	0,08 Aab	0,04 Bb	0,14 Aa	0,07 Ab
Histidina	0,09 Aa	0,10 Aa	0,09 Aa	0,07 Aa	0,43 Aa	0,06 Aa	0,38 Aa	0,12 Aa	0,09 Aa
Isoleucina	0,06 Ab	0,74 Aa	0,05 Bb	0,06 Ab	0,77 Aa	0,05 Bb	0,03 Ac	0,78 Aa	0,16 Ab
Leucina	0,08 Ab	0,99 Ba	0,06 ABb	0,07 Ab	1,08 Aa	0,04 Bb	0,05 Ac	1,09 Aa	0,14 Ab
Ornitina	0,07 Ab	0,27 Aa	0,08 Ab	0,06 Aa	0,08 Ca	0,04 Aa	0,08 Ab	0,17 Ba	0,07 Ab
Valina	0,08 Ab	0,60 Aa	0,09 Ab	0,05 Ab	0,59 Aa	0,06 Ab	0,05 Ab	0,60 Aa	0,07 Ab
<u>AÇÚCARES E POLÍÓIS</u>									
Alose	0,01 Cb	0,06 Ba	0,27 Ab	0,08 Bb	0,27 Aa	0,07 Bb	0,19 Ab	0,28 Aa	0,05 Bc
Arabitol	0,05 Bb	0,05 Ab	0,14 Aa	0,11 Aa	0,05 Aa	0,09 Aa	0,04 Ba	0,07 Aa	0,09 Aa
Eritritol	0,03 Bb	0,17 Ba	0,06 Bb	0,23 ABb	0,33 ABa	0,07 ABb	0,07 Ab	0,35 Aa	0,31 Ab
Eritrose	0,03 Bb	0,16 Aa	0,06 Bb	0,11 Aa	0,11 Ba	0,08 Ba	0,10 Aa	0,10 Ba	0,14 Aa
Frutose	0,09 Ab	0,12 Bb	0,18 Aa	0,08 Aa	0,11 Ba	0,06 Ba	0,13 Ab	0,20 Aa	0,06 Bc
Frutose-1-fosfato	0,04 Bb	0,06 Ab	0,15 Aa	0,11 Aa	0,08 Aa	0,08 Ba	0,05 ABa	0,07 Aa	0,06 Ba
Frutose-2,6-bifosfato	0,003 Ab	0,57 Aa	0,02 Ab	0,14 Ab	0,45 Aa	0,12 Ab	0,01 Aa	0,21 Ba	0,03 Aa

Frutose-6-fosfato	0,07 Bb	0,09 Ba	0,07 Bb	0,10 Ab	0,11 Aa	0,07 Ab	0,07 ABb	0,10 ABa	0,08 ABb
Fucose	0,04 Bb	0,08 Aa	0,10 Aa	0,10 Aa	0,10 Aa	0,06 Bb	0,06 Bb	0,09 Aab	0,10 Aa
Galactinol	0,08 Ba	0,06 Ba	0,06 Ba	0,11 Ba	0,08 Ba	0,08 Ba	0,16 Aa	0,12 Aa	0,16 Aa
Galactitol	0,07 Ab	0,13 Aa	0,10 Ab	0,08 Ab	0,14 Aa	0,07 Ab	0,07 Ab	0,11 Aa	0,09 Ab
Galactose	0,05 Bab	0,02 Bb	0,08 Aa	0,10 Aa	0,11 Aa	0,03 Bb	0,03 Bb	0,10 Aa	0,08 Aa
Gliceraldeído-3-fosfato	0,07 Bb	0,11 Aa	0,12 Aa	0,09 ABb	0,13 Aa	0,05 Bc	0,11 Aa	0,08 Bb	0,05 Bc
Glicerol	0,04 Ab	0,04 Bb	0,11 Aa	0,06 Ab	0,10 Aa	0,09 Aab	0,06 Ab	0,14 Aa	0,11 Aa
Glicerol-3-fosfato	0,08 Ab	0,12 Ab	0,44 Aa	0,08 Aa	0,12 Aa	0,06 Ba	0,09 Aa	0,16 Aa	0,06 Ba
Gulose	0,05 Ab	0,13 Aa	0,08 Ab	0,10 Ab	0,11 Aa	0,07 Ab	0,09 Ab	0,10 Aa	0,08 Ab
Isomaltose	0,09 Bb	0,12 Ba	0,07 Bb	0,08 Bb	0,13 Ba	0,07 Bb	0,09 Ab	0,16 Aa	0,08 Ab
Maltose	0,04 Ab	0,17 Aa	0,14 Aa	0,08 Aa	0,04 Ba	0,06 Aa	0,08 Ab	0,17 Aa	0,11 Aab
Maltotriitol	0,08 Aa	0,10 ABa	0,07 Ba	0,08 Ab	0,11 Aa	0,11 Aa	0,09 Aa	0,09 Ba	0,10 Aa
Maltotriose	0,17 Ba	0,01 Bb	0,04 Bb	0,31 Aa	0,09 Ab	0,20 Ab	0,13 Ba	0,06 Bb	0,05 Bb
Manose	0,00 4Bb	0,03 Bb	0,12 Aa	0,008 ABb	0,13 Aa	0,00 5Bb	0,06 Ab	0,14 Aa	0,11 Aab
Myo-inositol	0,10 Ba	0,03 Bb	0,07 Bab	0,18 Aa	0,05 Bb	0,04 Bb	0,11 Bb	0,22 Aa	0,12 Ab
Rafinose	0,06 Ab	0,10 Aa	0,08 Aab	0,11 Aa	0,10 Aa	0,07 Aa	0,07 Ab	0,16 Aa	0,10 Aab
Ramnose	0,04 Ba	0,05 Ba	0,05 Ba	0,29 Aa	0,19 Ab	0,04 Bc	0,07 Bb	0,26 Aa	0,30 Aa
Ribose-5-fosfato	0,00 3Ab	0,09 Bb	0,30 Aa	0,10 Aa	0,10 Ba	0,07 Ba	0,05 Ab	0,26 Aa	0,04 Ab
Ribulose	0,03 Bb	0,18 Aa	0,02 Bb	0,21 Aa	0,16 Aa	0,03 Bb	0,06 Bc	0,16 Ab	0,29 Aa
Sorbitol	0,07	0,07	0,10	0,08	0,12	0,07	0,08	0,11	0,09
Trelose	1,00 Aa	0,51 Bb	0,09 Bc	0,13 Bb	0,10 Bb	1,43 Aa	0,07 Ba	0,09 Ba	0,06 Ba
Xilitol	0,38 Ba	0,02 Aa	0,03 Ba	1,20 Aa	0,03 Ab	0,05 Bb	0,05 Bb	0,03 Ab	1,05 Aa
Xilose	0,01 Bab	0,04 Bb	0,01 Ba	0,37 Aa	0,07 Ab	0,54 Aa	0,01 Bb	0,04 Bb	0,43 Aa
<u>POLIAMINAS</u>									
Cadaverina	0,01 Ab	0,68 Aa	0,02 Bb	0,10 Aa	0,34 Aa	0,02 Ba	0,03 Ab	0,48 Aa	0,70 Aa
Espermidina	0,08 Ab	0,13 Aa	0,09 Ab	0,06 Ab	0,13 Aa	0,10 Ab	0,08 Ab	0,16 Aa	0,08 Ab
Espermina	0,08 Ab	0,14 Ba	0,08 Ab	0,08 Ab	0,16 Ba	0,08 Ab	0,09 Ab	0,21 Aa	0,06 Ab
Putrescina	0,01 Ab	0,53 Aa	0,14 Ab	0,03 Aa	0,04 Ba	0,02 Aa	0,03 Aa	0,27 ABa	0,28 Aa
<u>OUTROS</u>									
Esfingosina	0,05 Ab	0,13 Aa	0,07 Ab	0,08 Ab	0,11 Aa	0,08 Ab	0,04 Ab	0,16 Aa	0,06 Ab
Fitol	0,06 Ba	0,04 Ba	0,07 Ba	0,13 Aa	0,08 Bb	0,12 Aab	0,10 ABb	0,16 Aa	0,07 ABb

Guanosina	0,09 ABa	0,05 Bb	0,10 Aa	0,08 Ba	0,06 Ba	0,06 Ca	0,10 Aa	0,09 Aab	0,08 Bb
Secologanina	0,77 Aa	0,18 Ab	0,03 Bc	0,10 Bb	0,04 Bb	1,01 Aa	0,18 Ba	0,14 ABa	0,16 Ba
Timidina	0,05 Ba	0,02 Aa	0,05 Ba	0,13 Aa	0,06 Ab	0,07 ABb	0,07 Bab	0,05 Ab	0,11 Aa
Uridina	0,08 Bb	0,13 Aa	0,05 Bb	0,17 Aa	0,11 ABb	0,07 Bc	0,06 Bb	0,08 Bb	0,12 Aa

Anexo 2: Tabela2. Genes selecionados para a análise da expressão diferencial via PCR Real-Time em genótipos de soja contrastantes para a tolerância ao déficit hídrico.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Proteína
Gm12g22880	TGAGCAAGGATGAC CCAATG	GCCCAATAATGTCTTGC AAAGC	Fator de transcrição da família NAC
Gm16g02390	AAGCCAATGGAGCC AAGTCA	GTGCCTCCATTTTCTGA TTCCT	Fator de transcrição da família HD-ZIP
Gm05g35050	GGGCCCATGATCCA ATGAG	TGGATAAGCAAACACG CTATGAGT	Fator de transcrição da família HD-ZIP
Gm08g176300	TGGTGTCGACGGTG ATGAAG	TCTGCAGCTCCGATTTC CA	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase 3 (NCED3)
Gm11g055700	GGATGGTGCTCTTAT GTTGCAAT	ACAACGCTTGCTCATGT CAACT	Epoxidase da zeaxantina (ZEP)
Gm01g43460	GCTATCGCTCACTTT ATTTTATTTGCT	CGTGAAAAGTTAGAAG AGAGAATGAAATT	Proteína fosfatase 2 C (PP2C)
Gm08g288600	GTGCCACCGAGAGA TTTCGT	GGTGCCCCCATTGTTCA GT	Sintase da trealose-6- fosfato (TPS)
Gm19g131500	CGGTCGAATTTTCA GTCCTATTATG	CGAAAAGACTGTTATG GCCAAAC	Redutase da pirrolina- 5-carboxilato (P5CR)
Gm03g137900	TATCATGTAGTGGA GAAAAGGGTTGT	GACTTCCCCACCCCATG ACT	Sintase da rafinose (RS1)
Gm20g094500	GTTCTCTTTTCTGG TGCTGATTCT	CACCACCGACACCGTTA CAG	Sintase do galactinol (GolS6)
Gm04g248300	TCTAGCAATTGA CGGAAAGATG	AGAAGCACATATGGTC AGCAGAGA	Peroxidase do L- ascorbato plastidial
Gm12g073100	GCCACTGTGGGTTT CTCAA	AACCCAACTCCAATCAT CATCAC	Peroxidase do L- ascorbato citosólica
Gm02g141800	TTCAGAACGATCTTC AGCTACTGAGT	CCAGAGAAGTATGACA CACGACCTT	Redutase da glutatona dependente de NADPH (GR)
Gm07g163600	AAGGTGGTGAGCTC ATTGAAATATC	GCAGCATTGCATGTTGA AGAG	Subunidade 7 do Complexo Citocromo b6f - PetM
Gm16g165500	AATTGTGACAGGAA AGGGACCTT	CATAGGCCCAGGCATTA TTGTT	Light-Harvesting Chlorophyll a/b Binding Protein 1 (LHBC1)
Gm18g036400	GGCCACCAAATCAT AAACATTACA	GGTTTGGGTGCTCATTT CTTTT	Rubisco ativase (RCA)

Anexo 3: Heatmap da expressão relativa de genes responsivos ao déficit hídrico em genótipos de soja.

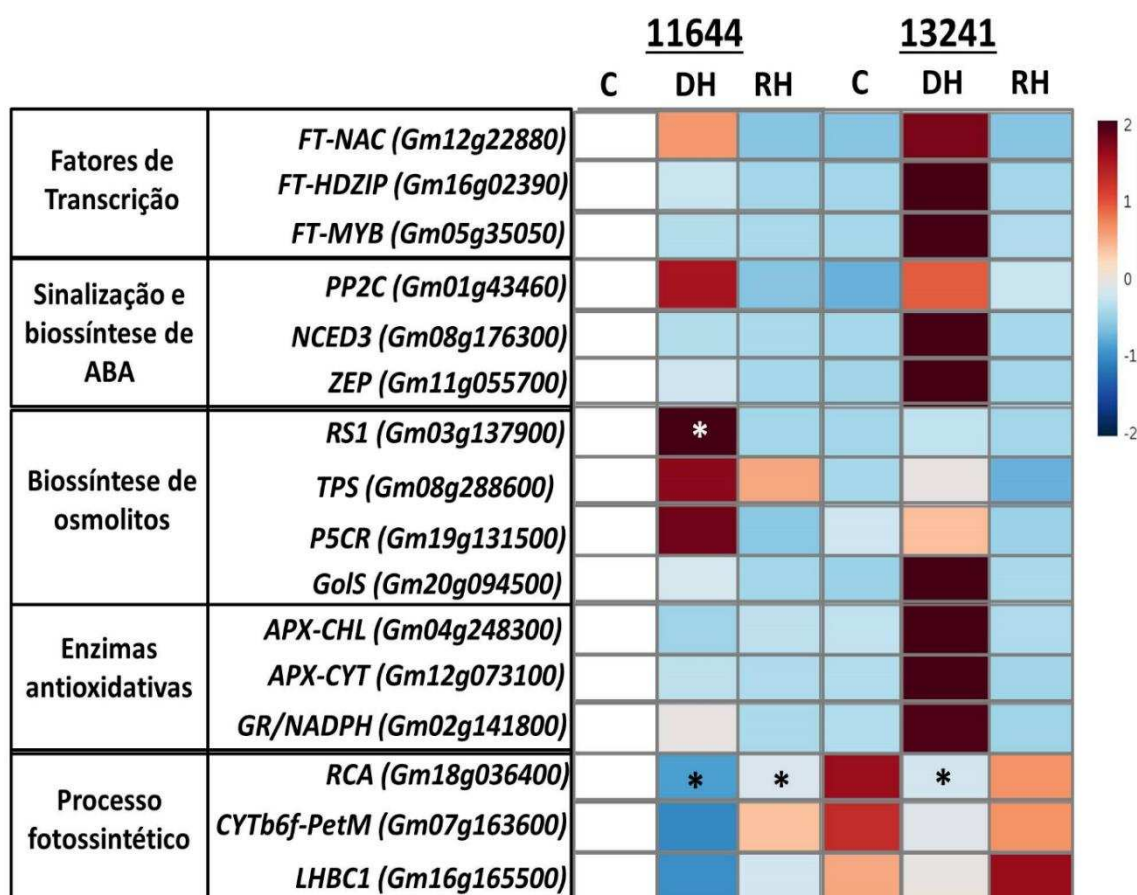


Figura 1. Heatmap representando a variação na expressão relativa normalizada de genes responsivos ao déficit hídrico, em folhas de duas linhagens de soja: 11644 (sensível) e 13241 (tolerante), em três disponibilidades hídricas: controle (C), déficit hídrico (DH) e reidratação (RH). Os resultados foram comparados ao controle da linhagem 11644 (normalizado para 1). Os valores representam as médias de n=3. Os asteriscos denotam valores significativamente diferentes do controle da linhagem 11644 para um mesmo gene, de acordo com o teste de Dunnett ($P < 0,05$). Gráficos de barra com a expressão relativa normalizada apresentados na Figura 3 do Capítulo 2.