

CILEIMAR APARECIDA DA SILVA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E MORFOANATÔMICAS INDUZIDAS  
PELO DEFICIT HÍDRICO EM DUAS CULTIVARES DE SOJA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

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

T

S586a  
2017 Silva, Cileimar Aparecida, 1983-  
Alterações fisiológicas e morfoanatômicas induzidas pelo  
déficit hídrico em duas cultivares de soja / Cileimar Aparecida  
Silva. – Viçosa, MG, 2017.  
vi, 36f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Cleberson Ribeiro.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.30-36.

1. Soja - Efeito da seca. 2. Análise foliar. 3. Plantas -  
Anatomia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Fisiologia  
Vegetal. II. Título.

CDD 22.ed. 635.655

CILEIMAR APARECIDA DA SILVA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E MORFOANATÔMICAS INDUZIDAS  
PELO DEFICIT HÍDRICO EM DUAS CULTIVARES DE SOJA**

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

APROVADA: 23 de fevereiro de 2017.



Eduardo Euclides de Lima e Borges



Juraci Alves de Oliveira



Genaina Aparecida de Souza  
(Coorientadora)



Cleberson Ribeiro  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por mais esta oportunidade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal por proporcionarem condições para o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPEMIG pela bolsa concedida.

Ao Professor Cleberson Ribeiro pela orientação, ao Professor Edgard Picoli e a Genaina Souza pela coorientação.

Aos Professores Wagner Otoni, Eduardo Borges e Juraci Alves pelo incentivo, amizade, disposição em ajudar e pelo exemplo de simplicidade.

As amigas e companheiras de bancada, Tassia Caroline e Roberta Carolina com quem compartilhei buscas, dúvidas, descobertas, tristezas e risadas, e que tanto me ajudaram.

Aos amigos Alexmiliano, Leonardo, Renan, Bruno, Maicon, Carla Dias e Paola, pela demonstração de amor e carinho nos momentos mais difíceis, vocês foram imprescindível.

A Genaina Souza e Thaline Pimenta agradeço o apoio, ensinamentos e, principalmente, a amizade. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Amo vocês!!!

A Vó Maria e Tia Iza, pelas orações e por serem exemplos de vida e perseverança.

Aos meus pais, João e Vera, por me concederem a oportunidade de estudar. Amo vocês!!!

Aos meus irmãos Henrique, Gustavo, e minhas cunhadas, pela grande torcida.

E aos demais amigos e familiares que contribuíram para realização deste trabalho

## **BIOGRAFIA**

CILEIMAR APARECIDA DA SILVA, filha de João Guadalupe da Silva e Vera Lúcia da Silva, nasceu em 06 de maio de 1983, em Viçosa (Minas Gerais, Brasil). Ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa (MG) no ano de 2009, onde participou de estágios e bolsas de iniciação científica na EPAMIG, departamento de Fitopatologia e no Solos. Gradou-se Engenheira Agrônoma em julho de 2014 e em março de 2015, iniciou os estudos do curso de mestrado em Fisiologia Vegetal na mesma universidade, com ênfase estresse abiótico plantas, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2017.

# SUMÁRIO

Resumo.....	v
Abstract .....	vi
1. Introdução: .....	1
2. Objetivos .....	4
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos .....	4
3. Material e Métodos .....	4
3.1. Material vegetal.....	4
3.2. Condições de cultivo .....	4
3.3. Potencial hídrico foliar .....	6
3.4. Análises de crescimento.....	6
3.5. Pigmentos cloroplastídicos .....	6
3.6. Trocas gasosas.....	7
3.7. Peroxidação lipídica.....	7
3. 8. Análises Enzimáticas .....	7
3.8.1. Extração.....	7
3. 8.2. Atividade da SOD .....	8
3. 8.3. Atividade da CAT .....	8
3. 8.4. Atividade da POX .....	9
3.8.5. Atividade da APX .....	9
3. 8.6. Concentração de proteína.....	9
3.9. Glutathiona total.....	9
3.10. Prolina .....	10
3.11. Medidas alométricas das raízes .....	10
3.12. Parâmetros morfoanatômicos.....	10
3. 13. Análises estatísticas.....	11
4. Resultados .....	12
5. Discussão .....	23
6. Conclusão.....	29
7. Referências bibliográficas .....	30

## RESUMO

SILVA, Cileimar Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Alterações fisiológicas e morfoanatômicas induzidas pelo deficit hídrico em duas cultivares de soja.** Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Genaina Aparecida de Souza e Edgard Augusto de Toledo Picoli.

A tolerância à seca em plantas é uma característica complexa, resultado de um conjunto de mecanismos que atuam concomitantemente para evitar ou tolerar períodos de deficit hídrico. Esta pesquisa, teve como objetivo, caracterizar as respostas morfológicas, anatômicas e fisiológicas em folhas e raízes de duas cultivares de soja, EMBRAPA 48 e BRS16. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva com adição de polietilenoglicol (PEG6000), para simular o deficit hídrico. Quando as plantas atingiram o estágio vegetativo V2 foram aplicados os seguintes tratamentos: controle (sem adição de PEG), deficit moderado (potencial osmótico de -0,3 MPa) e deficit hídrico severo (potencial osmótico de -0,6 MPa). Após 10 dias de tratamento o experimento foi finalizado, com as plantas no estágio vegetativo V3. Amostras de folhas e raízes foram congeladas para posteriormente serem avaliadas as atividades enzimáticas, peroxidação lipídica e teor de prolina. A amostras de folha, raízes, pecíolo foram fixadas em FAA<sub>50</sub> para as avaliações anatômicas. A cultivar E48, apresentou maior redução no diâmetro do caule, concentração de pigmentos fotossintéticos, teor de prolina (raízes e folha), e glutatona. A cultivar BRS16 apresentou maior relação massa seca das raiz/parte aérea. As cultivares não apresentaram alterações na taxa fotossintética e transpiratória após os tratamentos. Para eficiência no uso da água e concentração de carbono interno, houve aumento e redução, respectivamente, para ambas as cultivares. A peroxidação lipídica e a atividade da enzimas CAT, POX, SOD e APX foi maior nas amostras da cultivar E48, principalmente no deficit hídrico severo. A anatomia das folha evidenciou que a E48 apresentou maior densidade estomática, maior diâmetro polar e equatorial dos estômatos no deficit hídrico mas severo. A BRS16 apresentou aumento no parênquima lacunoso, já a E48 apresentou maior redução na espessura o limbo, maior espessura do parênquima paliçádico e epiderme adaxial, menor área dos feixes vascular do pecíolo e menor área de seção transversal do pecíolo. As alterações induzidas pelo deficit hídrico nas folhas e raízes das cultivares, confirmam modificações fisiológicas e morfoanatômica distinta para ambas as cultivares, tanto pra a parte aérea quanto no sistema radicular.

## ABSTRACT

SILVA, Cileimar Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Physiological and morphological changes induced by water deficit in two soybean cultivars.** Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-advisers: Genaina Aparecida de Souza and Edgard Augusto de Toledo Picoli.

Drought tolerance in plants is a complex feature, resulting from a set of mechanisms that act concomitantly to avoid or tolerate periods of water deficit. This study aimed to characterize the morphological, anatomical and physiological responses in leaves and roots of two soybean cultivars, EMBRAPA 48 and BRS16. The plants were grown in nutrient solution with addition of polyethylene glycol (PEG6000), to simulate the water deficit. When the plants reached the vegetative stage V2, the following treatments were applied: control (without addition of PEG), moderate deficit (osmotic potential of -0.3 MPa) and severe water deficit (osmotic potential of -0.6 MPa). After 10 days of treatment the experiment was finished, with the plants in the vegetative stage V3. Samples of leaves and roots were frozen for later evaluation of enzymatic activities, lipid peroxidation and proline content. The leaf samples, roots, petiole were fixed at FAA50 for anatomical evaluations. The cultivar E48 showed a greater reduction in stem diameter, concentration of photosynthetic pigments, proline content (roots and leaf), and glutathione. The cultivar BRS16 showed higher dry root / shoot mass ratio. The cultivars showed no changes in the photosynthetic and transpiratory rate after the treatments. For efficiency in water use and internal carbon concentration, there was increase and reduction, respectively, for both cultivars. Lipid peroxidation and the activity of the CAT, POX, SOD and APX enzymes were higher in the E48 cultivar, especially in the severe water deficit. Leaf anatomy showed that E48 presented greater stomatal density, greater polar and equatorial diameter of the stomata in the more severe water deficit. BRS16 showed increase in the lacunal parenchyma, whereas E48 presented a greater reduction in limb thickness, greater thickness of the palisadic parenchyma and adaxial epidermis, smaller area of the vascular bundles of the petiole and smaller cross-sectional area of the petiole. The changes induced by the water deficit in the leaves and roots of the cultivars confirm physiological and morpho-anatomical changes for both cultivars, both for the aerial part and for the root system.

## 1. Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a mais importante leguminosa cultivada no mundo, além de ser uma das principais fontes de óleo e proteína para a alimentação humana e animal (Embrapa, 2016). A produção de soja está entre as atividades econômicas que mais cresceram nas últimas décadas, sendo o quarto grão mais produzido e consumido no mundo, e a principal oleaginosa cultivada anualmente (Hirakuri e Lazzarotto, 2014). Além disso, nos últimos anos, vem sendo utilizada como importante cultura para a produção de biodiesel (Embrapa, 2016).

A soja tem se destacado como a principal cultura brasileira, entre cereais, leguminosas e oleaginosas, em função do seu retorno econômico ao produtor (IBGE, 2016). O clima adequado para o cultivo, os avanços tecnológicos e as novas formas de manejo da cultura da soja contribuíram para que o país se tornasse o segundo maior produtor mundial dessa oleaginosa (Embrapa, 2016). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas.

O aquecimento global aumenta a frequência e a severidade de eventos extremos, como secas e inundações. Estas alterações climáticas são, atualmente, observadas em várias regiões do mundo, influenciando negativamente a produtividade da soja (Silvente, 2012). Assim como o excesso de água, o déficit hídrico pode causar efeitos drásticos aos ecossistemas naturais e agrícolas (Hasanuzzaman e Fujita, 2011). A redução no teor de água do solo é detectada pelo sistema radicular que, posteriormente, envia sinais químicos para a parte aérea, para iniciar respostas adaptativas que irão induzir alterações fisiológicas em diferentes vias metabólicas (Rahnama et al., 2011). As respostas ao déficit hídrico irão depender da intensidade e duração do estresse, bem como da espécie e do seu estágio de desenvolvimento (Rahnama et al., 2011). Geralmente, as respostas ao déficit hídrico se caracterizam pelo fechamento estomático, redução da expansão celular, redução da taxa fotossintética, aumento na taxa transpiratória, ajustamento osmótico, modificações na eficiência do uso da água, alteração na partição de assimilados e ativação dos mecanismos de defesa contra danos oxidativo (Shinozaki e Yamagusho-Shinozaki, 2007).

Um dos principais efeitos da restrição hídrica sobre as plantas é a redução do crescimento, devido ao menor alongamento das células da folha e do caule (Jaleel et

al., 2009). Portanto, a redução na área foliar pode ser considerada um importante mecanismo de defesa contra a seca, pois com menor área foliar há uma menor transpiração (Tardieu et al., 2011). Algumas características do sistema radicular, como comprimento da raiz, volume e o número de raízes aumentam a área explorada do solo contribuindo para o aumento da capacidade da planta em absorver água e reduzir os efeitos da restrição hídrica sob a parte aérea (Lowlor, 2002). Adicionalmente, o estresse por seca pode reduzir os teores de clorofilas a e b e carotenoides, promovendo assim redução na taxa fotossintética, por afetar a inibição do transporte de elétrons, o fechamento estomático e alterar a taxa respiratória (Anderegg et al., 2012).

A seca também pode induz o estresse oxidativo nas plantas devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas moléculas são altamente reativas podendo causar dano as membranas (peroxidação de lipídios), danos ao DNA, oxidação de proteínas e inibição enzimática (Miller et al. 2010). Por essas razões, seus níveis na planta são regulados por mecanismo de defesa antioxidativo, que pode ser enzimático e/ou não enzimático (DaCosta e Huang, 2007). O sistema de defesa antioxidativo enzimático compreende várias enzimas, dentre as principais, tem-se a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), as peroxidases totais (POXs), a peroxidase do ascorbato (APX), a redutase da glutathione (GR) e a peroxidase da glutathione (GPX) (Huang et al., 2013). Estas enzimas operam em diferentes compartimentos subcelulares, em ação conjunta contra o estresse oxidativo (Sharma, 2012).

Além dos mecanismos antioxidantes enzimáticos, os não enzimáticos também desempenham papéis importantes. A glutathione (GSH) e o ascorbato (Asc) são compostos antioxidativos não enzimáticos, que apresentam a taxa biossintética estimulada em resposta ao estresse, promovendo aumento na capacidade de defesa da célula (Koffler et al., 2013). GSH e Asc estão localizados em diferentes compartimentos celulares como citosol, retículo endoplasmático, vacúolo, mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomas, bem como no apoplasto, o que favorece a atuação desses metabolitos na defesa intracelular contra danos oxidativos induzidos pelas EROS (Koffler et al., 2013). A peroxidação lipídica das membranas celulares induzidas pelas EROs resulta na formação de hidroperóxidos de lipídeos, um dos eventos mais significativos do estresse oxidativo, pois causa redução da fluidez, modificações de permeabilidade iônica e de outras funções associadas às membranas (Queiroz et al., 1998).

O aumento no teor de moléculas osmoprotetoras e osmorreguladoras é, também, considerado um dos mecanismos de resistência das plantas ao estresse por seca (Fang e Xiong, 2014). A prolina é um aminoácido que está presente em pequenas quantidades em plantas sobre condições ótimas, porém, plantas expostas ao deficit hídrico podem acumular este osmoprotetor nas células, protegendo as membranas de efeitos deletérios, prevenindo a desnaturação de proteínas e, assim, preservando a estrutura e a atividade de enzimas (Fang e Xiong, 2014).

Alterações anatômicas podem ocorrer em plantas sob deficit hídrico como forma de adaptação ao estresse. Tecidos expostos a ambientes com baixa disponibilidade hídrica têm mostrado redução no tamanho das células, espessamento da parede celular (Tenhaken, 2015), alteração na relação dos tecidos condutores xilema/floema, folhas menores e mais espessas, maior quantidade de tricomas epidérmicos, estômatos menores e em maior densidade, epiderme com cutícula mais espessa, tecido paliádico mais espesso e maior razão na espessura do tecido paliádico / lacunoso (Fang e Xiong., 2014). Portanto, espécies cultivadas tolerantes à seca, geralmente apresentam mecanismos morfofisiológicos que permitem a manutenção na produção sob limitado suprimento de água (Fahad et al., 2014). Os mecanismos de tolerância à seca envolvem a maximização da absorção de água por sistema radicular profundo e denso e maior produção de ácido abscísico (ABA) (Sreenivasulu et al., 2012). Além disso, minimização da perda de água (pelo fechamento dos estômatos), redução da área foliar, ajustamento osmótico, manutenção da taxa transpiratória, redução de danos aos cloroplastos e eficiente sistema de remoção das espécies reativas de oxigênio conferem a tolerância ao deficit hídrico (Urano et al., 2010; Ahmad et al., 2015).

Sendo assim, a resposta ao deficit hídrico pelas plantas é complexa envolvendo mudanças genéticas, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Portanto, compreender como as plantas respondem ao deficit hídrico, identificando os mecanismos de tolerância à seca é crucial para o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes ao deficit hídrico, e também fundamental para predizer os impactos da seca sobre a produção dessa cultura. Adicionalmente, verifica-se que o sistema radicular tem sido menos estudado que a parte aérea em condições de deficiência. Para simular uma condição de seca, plantas pode ser cultivadas em solução nutritiva, com restrição hídrica controlada pela adição do agente osmótico polietilenoglicol (PEG), permitindo melhor acesso ao sistema radicular (Soliman e Hendawy, 2013). Trabalhos

envolvendo as cultivares Embrapa 48 e BRS 16 no estágio reprodutivo, já foram realizados em cultivo de solo (Gomes, 2009; Santos et al, 2009; Embrapa, 2016), entretanto, são escassas as informações sobre as alterações fisiológicas e morfoanatômicas dessas cultivares após deficiência hídrica na fase vegetativa.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Comparar as respostas morfológicas, anatômicas e fisiológicas em duas cultivares de soja no estágio vegetativo (V2-V3), submetidas a diferentes níveis de potencial hídrico, induzido por polietilenoglicol 6000 (PEG 6000).

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar, após exposição das cultivares de soja ao deficit hídrico os seguintes parâmetros fisiológicos, morfológicos e anatômicos:

- Crescimento em raízes e folhas, e o aparato fotossintético;
- Quantificação da atividade das enzimas antioxidativas, da taxa de peroxidação lipídica e da concentração de prolina, em raízes e folhas;
- Alterações morfológicas e anatômicas, em folhas e raízes.

## **3. Material e métodos**

### **3.1. Material vegetal**

As cultivares de soja, EMBRAPA 48 (E48) e BRS16 foram utilizadas nos experimentos. As sementes foram obtidas do Banco de Germoplasma do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Essas cultivares são classificadas como cultivares convencionais de ciclo-precoce e crescimento determinado (Embrapa, 2016).

### **3.2. Condições de cultivo**

As sementes de ambas as cultivares de soja foram cultivadas em casa de vegetação, com sistema de monitoramento de temperatura e umidade, mantidas a 30°C e 70 % respectivamente. As sementes foram selecionadas visivelmente quanto ao tamanho e forma. Posteriormente elas foram semeadas em bandejas contendo substrato

comercial específico para plantas (Plantmax®). Dez dias após a germinação, as plântulas foram padronizadas e transplantadas para vasos de dois litros, contendo solução nutritiva de Clark (Clark, 1975) pH 5,5, sob aeração constante. Cada vaso conteve três plantas e 4 repetições, divididas em 3 tratamentos, totalizando 36 plantas por cultivar. Os tratamentos de déficit hídrico foram simulados com a utilização de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) foi iniciado quando as plantas atingiram o estágio vegetativo de desenvolvimento V2 (primeiro trifólio completamente expandido). Três tratamentos foram estabelecidos: 1) Controle (solução nutritiva de Clark); 2) déficit hídrico moderado (solução nutritiva de Clark + 160 g/L de PEG 6000 ou 16 % PEG 6000, representando o potencial osmótico de -0,3 MPa) e 3) déficit hídrico severo (solução nutritiva de Clark + 235 g/L de PEG 6000 ou 23,5 % PEG 6000, simulando o potencial osmótico de -0,6 MPa). A solução nutritiva foi trocada a cada 5 dias.

O experimento foi encerrado após 10 dias de tratamento, com as plantas no estágio vegetativo de desenvolvimento V3 (segundo trifólio completamente expandido). Em seguida, foram realizadas análise de crescimento, potencial hídrico foliar, teor de pigmentos e trocas gasosas. Amostras de raízes e folhas foram coletadas e armazenadas em ultrafreezer a -80°C para as análises de teor de prolina, peroxidação lipídica, sistema antioxidativo enzimático e não enzimático. Adicionalmente, amostras de folhas, caule, pecíolos e raízes, foram fixadas em FAA<sub>50</sub> (formaldeído, ácido acético, etanol 50 %, na proporção de 5: 5: 90 v/v (Johansen, 1940)), por 48 h sob vácuo, e armazenados em solução de álcool etílico 70% para as análises morfoanatômicas.



**Imagem 1.** Vista geral do experimento no estágio vegetativo V3

### **3.3. Potencial hídrico foliar**

O potencial hídrico foliar ( $\psi_w$ ) foi avaliado ao final do experimento, no período da manhã, em folhas completamente expandidas do segundo trifólio, com auxílio de bomba de pressão do tipo Scholander (Scholander et al., 1965).

### **3.4. Análises de crescimento**

Área foliar total, foi obtida com o medidor de área foliar LI-3100C. Diâmetro do caule, obtido na altura do coleto e massa seca das raízes e parte aérea foram avaliadas ao final do experimento. A massa seca foi obtida pesagem do material vegetal após pela secagem do material vegetal em estufa de circulação forçada a 70°C por 72 h.

### **3.5. Pigmentos cloroplásticos**

Teores de pigmentos (clorofilas a, b e carotenóides) foram determinados em quatro discos foliares de 0,6 cm de diâmetro, retirados de folhas completamente expandidas do segundo trifólio (formada após ao déficit hídrico), imersos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO), saturada com carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Após 24

horas, as absorvâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-5100), nos comprimentos de onda de 665,1; 649,1 e 480nm, para determinação da clorofila a, clorofila b e carotenoides, respectivamente. O cálculo das concentrações das clorofilas a, b e carotenóides foi baseado na metodologia descrita por Wellburn (1994), e os resultados expressos em  $\mu\text{g cm}^{-2}$ .

### **3.6. Trocas gasosas**

A taxa de assimilação líquida do  $\text{CO}_2$  (A), condutância mesofilica ( $g_s$ ), taxa transpiratória (E) e concentração interna carbono ( $C_i$ ) foram realizadas em folhas completamente expandidas do segundo trifólio a partir do ápice, com analisador de gases a infravermelho (IRGA; modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA). As medições foram realizadas entre 08:00 e 11:00 da manhã, em casa de vegetação, utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ( $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), concentração atmosférica de  $\text{CO}_2$ , temperatura e umidade ambiente. A eficiência instantânea do uso da água (EUA) foi calculada pela razão A/E.

### **3.7. Peroxidação lipídica**

Amostras de 100 mg de material vegetal provenientes de raízes e folhas completamente expandidas após a deficiência hídrica foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) 1% e centrifugadas a 10000 g a  $4^\circ\text{C}$  por 15 minutos (Gomes-Junior et al., 2006). Alíquota de 150  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionada a 750  $\mu\text{L}$  de solução de TBA 0,5% em TCA 20% e incubada em banho úmido a  $95^\circ\text{C}$ . Após 30 min, a reação foi paralisada em banho de gelo, os tubos centrifugados a 3000 g por 10 min e as absorvâncias determinadas a 532 e 600 nm. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi estimada utilizando-se as absorvâncias e coeficiente de absorvidade de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Heath e Packer, 1968). A concentração de MDA foi expressa em  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ MF}$ .

## **3. 8. Análises enzimáticas**

### **3.8.1. Extração**

As atividades das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POX) e peroxidase do ascorbato (APX) foram determinadas a partir de amostras de 100 mg de raízes ou folhas, maceradas em nitrogênio líquido e

homogeneizadas em 2 mL de meio de extração. O meio de extração para as enzimas SOD, CAT e POX foi composto de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto et al., 1999). Já o meio de extração para a determinação APX foi composto de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, ácido ascórbico 1 mM, PMSF 1 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM e PVPP 1 % (p/v) (Peixoto et al., 1999). O extrato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 12000 g por 15 min a 4°C. Alíquota do sobrenadante foi utilizado para avaliação da atividade enzimática.

### **3. 8.2. Atividade da SOD**

Alíquota de 10 µL de extrato bruto foi adicionada a 190 µL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8) contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Giannopolitis e Ries, 1977). A reação foi realizada em câmara com luz fluorescente de 15W a 25°C por 10 minutos. Em seguida, a iluminação foi interrompida e a absorvância da formazana azul resultante da fotorredução do NBT foi determinada em leitor de microplaca a 560 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA). O branco da reação consistiu da mistura amostra vegetal e meio de reação mantida no escuro nas mesmas condições de temperatura e tempo. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). O resultado foi expresso em U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

### **3. 8.3. Atividade da CAT**

Alíquota de 10 µL de extrato bruto foi adicionada a 190 µL de um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5mM (Havir e Mchale, 1987). A absorvância foi obtida em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA) no comprimento de onda de 240 nm, após 1 minuto. A atividade enzimática foi determinada pela absorvância e coeficiente de absorvância de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e o resultado expresso em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

### **3. 8.4. Atividade da POX**

Alíquota de 5 µL de extrato bruto foi adicionada a 195 µL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pela medida da absorvância em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA), no comprimento de onda de 420 nm, a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se a absorvância e o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Chance e Maehley, 1955) e expressa em µmol de purpurogalina min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

### **3.8.5. Atividade da APX**

Alíquota de 10 µL de extrato bruto foi adicionada a 190 µL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,0), ácido ascórbico 0,8 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,0 mM (Nakano e Asada, 1981). A atividade enzimática foi determinada pela medida da absorvância em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA) no comprimento de onda de 290 nm, a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se a absorvância e o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e expressa em µmol de ácido ascórbico min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

### **3. 8.6. Concentração de proteína**

Alíquotas de 5 µL de extrato bruto foi adicionado a 195 µL do reagente de Bradford (Bradford, 1976), e a absorvância obtida em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA) no comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão foi preparada utilizando-se quantidades conhecidas de albumina do soro bovino (BSA) na faixa de 0 a 16 µg L<sup>-1</sup>.

## **3.9. Glutaciona total**

O teor de glutaciona total (GSH + GSSG) foi determinado de acordo como o método descrito por Griffith (1980). Amostras de 100 mg de massa fresca de raiz ou folha completamente expandida foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas em 2 mL de meio de extração constituído de HCl 0,1 M e EDTA 1 mM seguida de filtração em 4 camadas de gaze e centrifugação a 12000 g a 4°C, por 10 min. Alíquota de 20 µL do sobrenadante foi adicionada a 170 µL de meio de reação

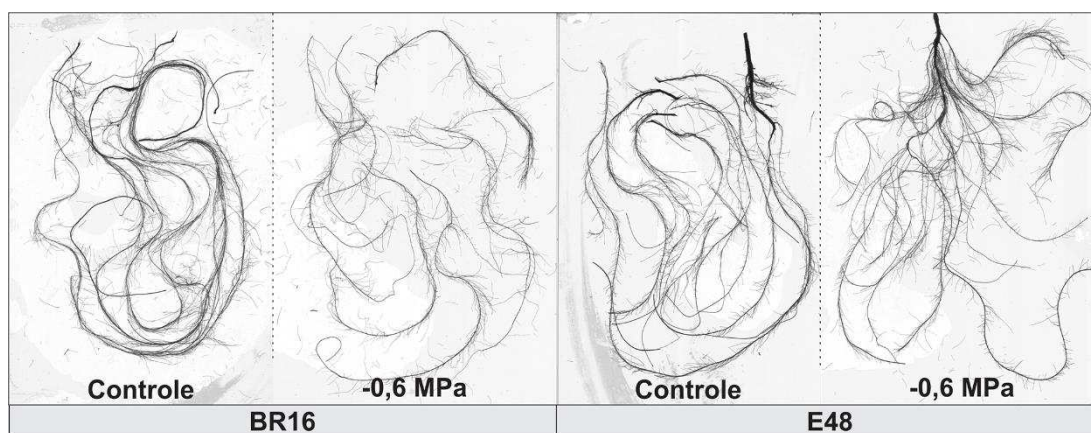
constituído de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,5, NADPH 0,15 mM, HCl 0,1 M e EDTA 6,3 mM e DTNB 0,6 mM [ácido 5,5'-ditio-bis (2- nitrobenzóico)]. Após incubação a 30°C durante 5 min, 10 µL da enzima redutase da glutaciona (50 U mL<sup>-1</sup>) foram adicionados, sendo a absorvância da reação monitorada, a 412 nm, durante 1 minuto. O teor de glutaciona total foi determinados por meio de uma curva de calibração com padrões autênticos de glutaciona.

### 3.10. Prolina

Amostras de 100 mg de raiz ou folha, foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido sulfossalicílico 3% (p/v), e centrifugada a 22000 g a 4°C, por 20 min. Alíquota de 200 µL do extrato foi adicionada a 200 µL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina, 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico 6M) e a mistura incubada a 100°C por 1 hora. A reação foi paralisada em banho de gelo e a absorvância do sobrenadante determinada em espectrofotômetro a 520 nm. A concentração de prolina foi calculada com base na curva-padrão de prolina (Bates, 1973).

### 3.11. Medidas alométricas das raízes

As raízes dos dois cultivares foram armazenadas em frasco contendo solução de álcool 30% e posteriormente avaliadas no equipamento WinRHIZO Pro 2007a (Régent Instr. Inc.), acoplado a um scanner profissional Epson XL 10000 equipado com unidade de luz adicional (TPU). A definição de 400 (dpi) foi utilizada para as medidas de morfologia de raiz (diâmetro, volume e área) (Costa et al., 2002).



**Imagem 2.** Imagens do sistema radicular, obtidas no equipamento WinRHIZO Pro 2007a (Régent Instr. Inc.), acoplado a um scanner.

### **3.12. Parâmetros morfoanatômicos**

Amostras de folhas e pecíolos do segundo trifólio completamente expandido (com 0,5 cm a partir do ápice) foram coletadas para avaliação em microscopia de luz, sendo duas amostras por repetição. As amostras foram fixadas em FAA<sub>50</sub> por 48 horas em vácuo e armazenadas em solução de álcool etílico 70 %. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin–Leica Microsystems Nussloch, Heidelberg, Germany) conforme recomendação do fabricante. Cortes transversais (espessura de 5 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (model RM 2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) com auxílio de navalhas de vidro. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina pH 4,0 (O'Brien e McCully 1981) por 15 min e as lâminas montadas com resina sintética (Permout®<sup>®</sup>, Fisher. As imagens foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan), acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

Medições em 10 campos distintos das imagens de cada amostra foram feitas por meio do software Image-Pro<sup>®</sup> Plus (version 4.1, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA). Foram avaliadas características anatômicas espessuras da lâmina foliar, parênquimas paliçádico e lacunoso, epiderme nas faces abaxial e adaxial. No pecíolo foram avaliadas área do pecíolo e área do feixe vascular do pecíolo.

Folíolos centrais de folha totalmente expandida após a deficiência hídrica, foram diafanizadas com metanol 95% (v/v) por 48 h, seguido por ácido láctico 100%. As amostras foram acondicionadas em banho-maria a temperatura de 95°C, até que as lâminas foliares apresentassem aspecto totalmente translúcido (Zsögön et al., 2015). Os cortes foram montados em lâminas de vidro, e as imagens das epidermes adaxial e abaxial foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) para determinação da densidade estomática. As imagens obtidas foram digitalizadas e armazenadas, para medições no programa Image-Pro Plus versão 4.5.

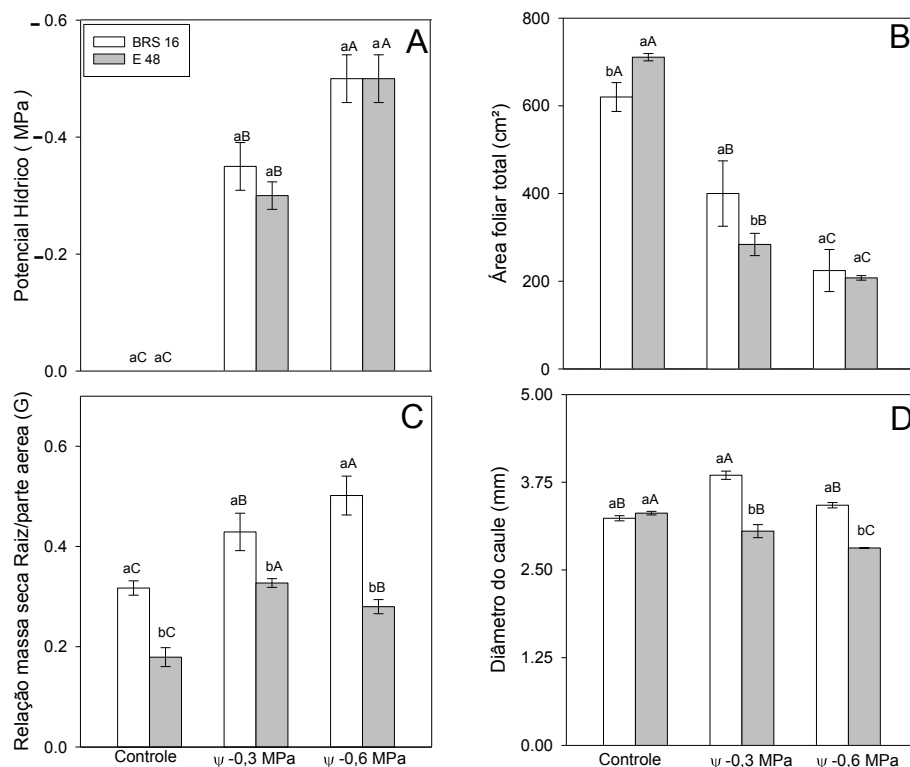
### **3. 13. Análises estatísticas**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial de 3x2x1, com 4 repetições; sendo 3 tratamentos (controle, deficit hídrico moderado e severo), duas cultivares de soja (BRS16 e E48) e um estágio fenológico. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa SigmaPlot. Os testes de médias (teste t e teste de Tukey) foram aplicados em nível de 5% de probabilidade.

#### **4. Resultados**

O potencial hídrico foliar ( $\psi_w$ ) de ambas as cultivares reduziu após exposição as soluções contendo PEG 6000. Plantas do tratamento controle (sem adição de PEG 6000) apresentaram valor de  $\psi_w$  próximo a zero, enquanto plantas que receberam 16% e 23,5% de PEG 6000 apresentaram  $\psi_w$  próximo a -0,3 e -0,6 MPa, respectivamente. Não houve diferença no  $\psi_w$  foliar entre as cultivares. Assim, o potencial hídrico da solução refletiu diretamente no potencial hídrico da folha (Fig. 1A). Ambas as cultivares tiveram redução da área foliar após exposição ao deficit hídrico. No tratamento controle, a cultivar E48 apresentou área foliar significativamente maior que a cultivar BRS16, inversamente ao encontrado no tratamento -0,3 MPa. No tratamento - 0,6 MPa não foi observada diferença significativa entre as cultivares (Fig. 1B).

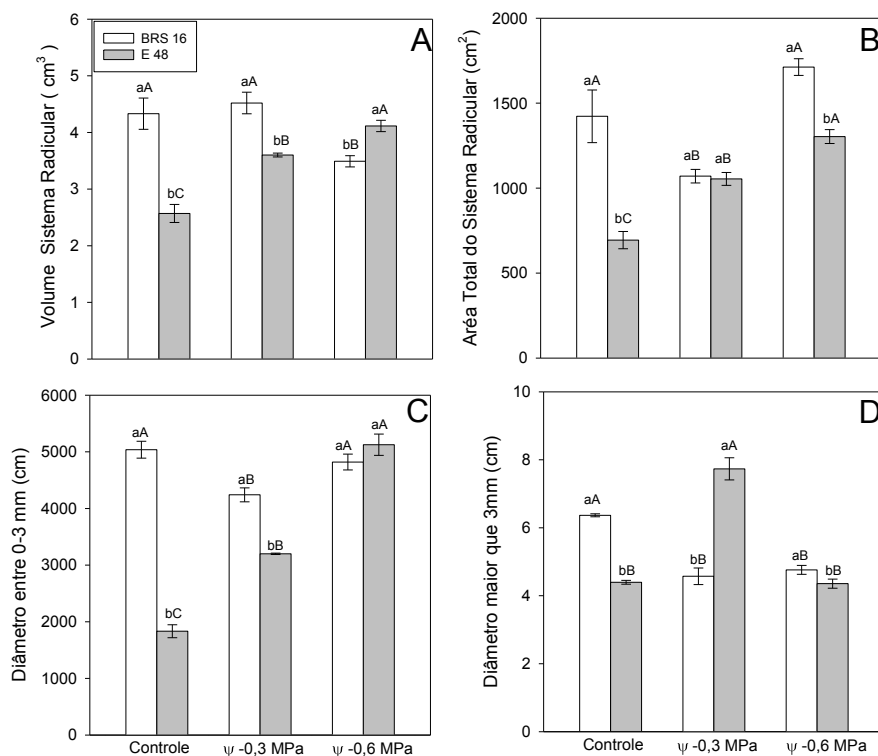
Para razão massa seca da raiz/parte aérea, houve aumento significativo para ambas as cultivares, quando submetidas aos tratamentos com deficit hídrico. A cultivar E48 apresentou maior razão de massa seca raiz/parte aérea que a cultivar BRS16, em todos os tratamentos (Fig. 1C). Para diâmetro do caule não houve diferença entre as cultivares no tratamento controle, porém, após exposição ao deficit hídrico, a cultivar E48 apresentou redução significativa nesse parâmetro. Já a cultivar BRS16 apresentou acréscimo no diâmetro do caule após tratamento com -0,3 MPa. A cultivar E48 apresentou diâmetro do caule significativamente menor nas condições de deficit hídrico (Fig. 1D).



**Figura 1.** Potencial hídrico foliar (A), área foliar total (B), massa seca raiz/parte aérea (C) e diâmetro do caule (D) no estágio vegetativo (V3) de duas cultivares de soja, BRS16 e E48, após 10 dias de exposição a diferentes potenciais hídricos, simulados com PEG 6000 em solução nutritiva. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos para uma mesma cultivar e pela mesma letra minúscula entre linhagens no mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média, n= 4.

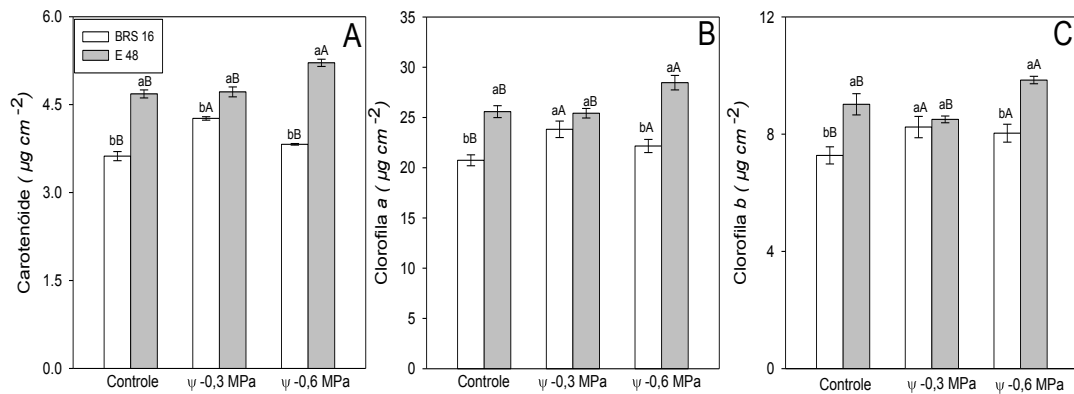
Para volume e área total do sistema radicular e comprimento de raízes com diâmetro entre 0–3 mm aumentou significativamente para a cultivar E48 após exposição aos tratamentos com déficit hídrico, enquanto para o comprimento de raízes com diâmetro maior que 3 mm houve aumento apenas no tratamento -0,3 MPa. Para a cultivar BRS16, a área total do sistema radicular e comprimento de raízes com diâmetro entre 0–3 mm reduziram significativamente no tratamento -0,3 MPa, já o volume do sistema radicular reduziu significativamente no tratamento -0,6 MPa e o comprimento de raízes com diâmetro maior que 3 mm reduziu após exposição aos dois tratamentos. A cultivar E48 apresentou maior volume do sistema radicular e comprimento de raízes com diâmetro entre 0–3 mm que a cultivar BRS16 para os tratamentos -0,6 e -0,3 MPa, respectivamente. Por outro lado, a cultivar BRS16 apresentou maiores valores para todos os parâmetros no tratamento controle e adicionalmente, maior volume do sistema radicular e comprimento de raízes com

diâmetro entre 0– 3 mm no tratamento -0,3 MPa e maior área total do sistema radicular no tratamento -0,6 MPa (Fig. 2).



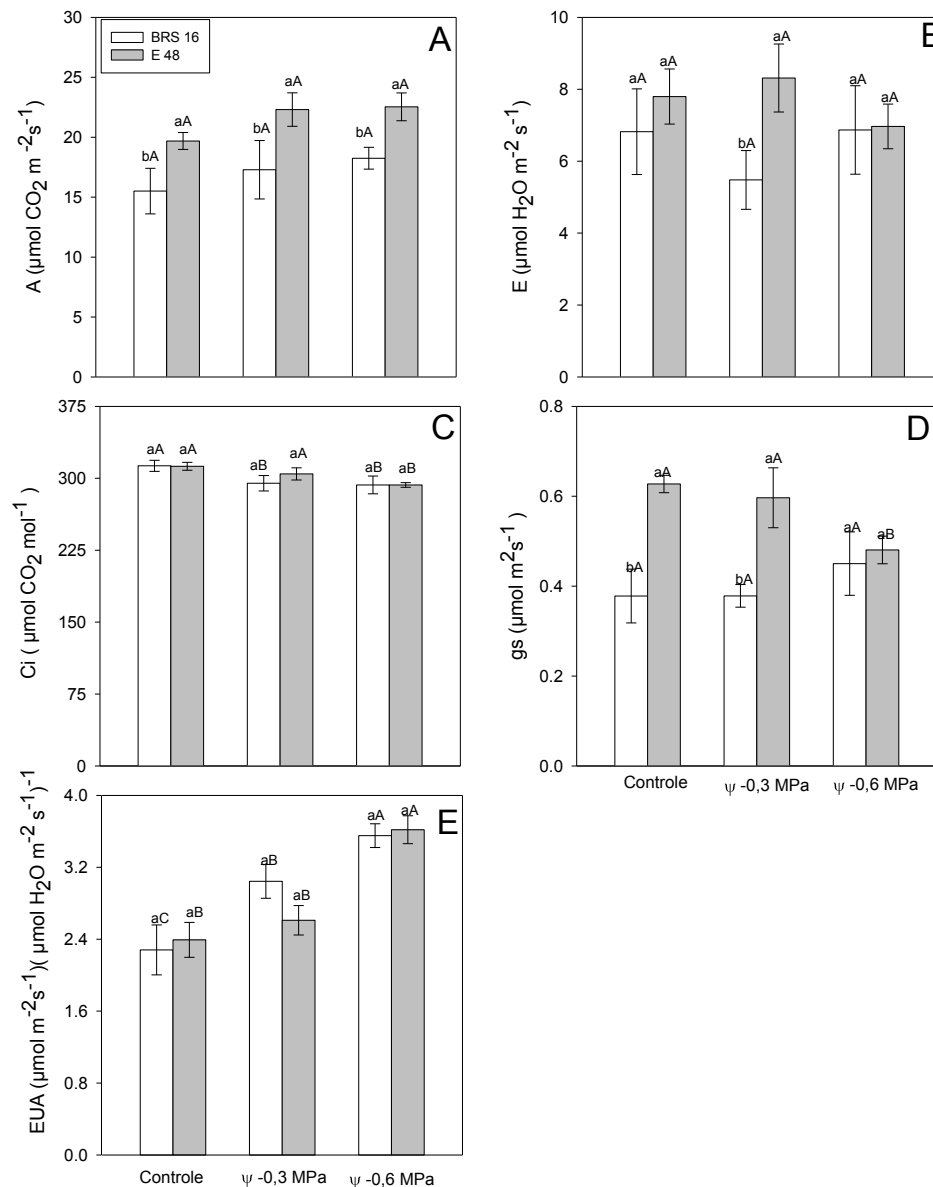
**Figura 2.** Avaliação do volume do sistema radicular (A), área total do sistema radicular (B), comprimento de raízes com diâmetro entre 0-3 mm (C) comprimento de raízes com diâmetro maior que 3 mm, no estágio vegetativo (V3) de duas cultivares de soja, BRS16 e E48, após 10 dias de exposição a diferentes potenciais hídricos, simulados com PEG 6000 em solução nutritiva. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos para uma mesma cultivar e pela mesma letra minúscula entre linhagens no mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média, n= 4.

Avaliando-se teor de carotenóides, clorofila *a* e *b* houve aumento significativo para a cultivar E48 após deficit hídrico de -0,6 MP, já para a cultivar BRS16 o teor de carotenóides foi maior apenas no tratamento - 0,3 MPa e o teor de clorofilas *a* e *b* aumentou significativamente após a exposição aos tratamentos com deficiência hídrica. Os teores dos pigmentos cloroplastídicos foram maiores nos tratamentos controle e -0,6 MPa da cultivar E48 (Fig. 3).



**Figura 3.** Teor dos pigmentos cloroplastídicos carotenóides (A), clorofila *a* (B) e clorofila *b* (C) no estágio vegetativo (V3) de duas cultivares de soja, BRS16 e E48, após 10 dias de exposição a diferentes potenciais hídricos, simulados com PEG 6000 em solução nutritiva. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos para uma mesma cultivar e pela mesma letra minúscula entre linhagens no mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média,  $n=4$ .

Na análise das taxas fotossintética e transpiratória, constatamos que as cultivares não apresentaram alterações significativas após a exposição ao deficit hídrico. Independente do tratamento, a cultivar E48 teve maior taxa fotossintética do que BRS16. Entretanto, houve diferença entre as taxa respiratória das cultivares, com maiores valores para a cultivar E48 no tratamento -0,3 MPa (Fig. 4A e 4B). A concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) reduziu na cultivar E48 apenas no tratamento -0,6 MPa, já a cultivar BRS16 teve redução significativa nos dois tratamentos com deficiência hídrica (Fig. 4C). A condutância mesofílica ( $g_s$ ), reduziu apenas no tratamento -0,6 MPa para a cultivar E48. Por outro lado, a cultivar E48 apresentou os maiores valores de  $g_s$  nos tratamentos controle e -0,3 MPa (Fig. 4D). Avaliando a eficiência no uso da água (EUA), houve aumento em ambas as cultivares após exposição ao deficit hídrico (Fig. 4E).

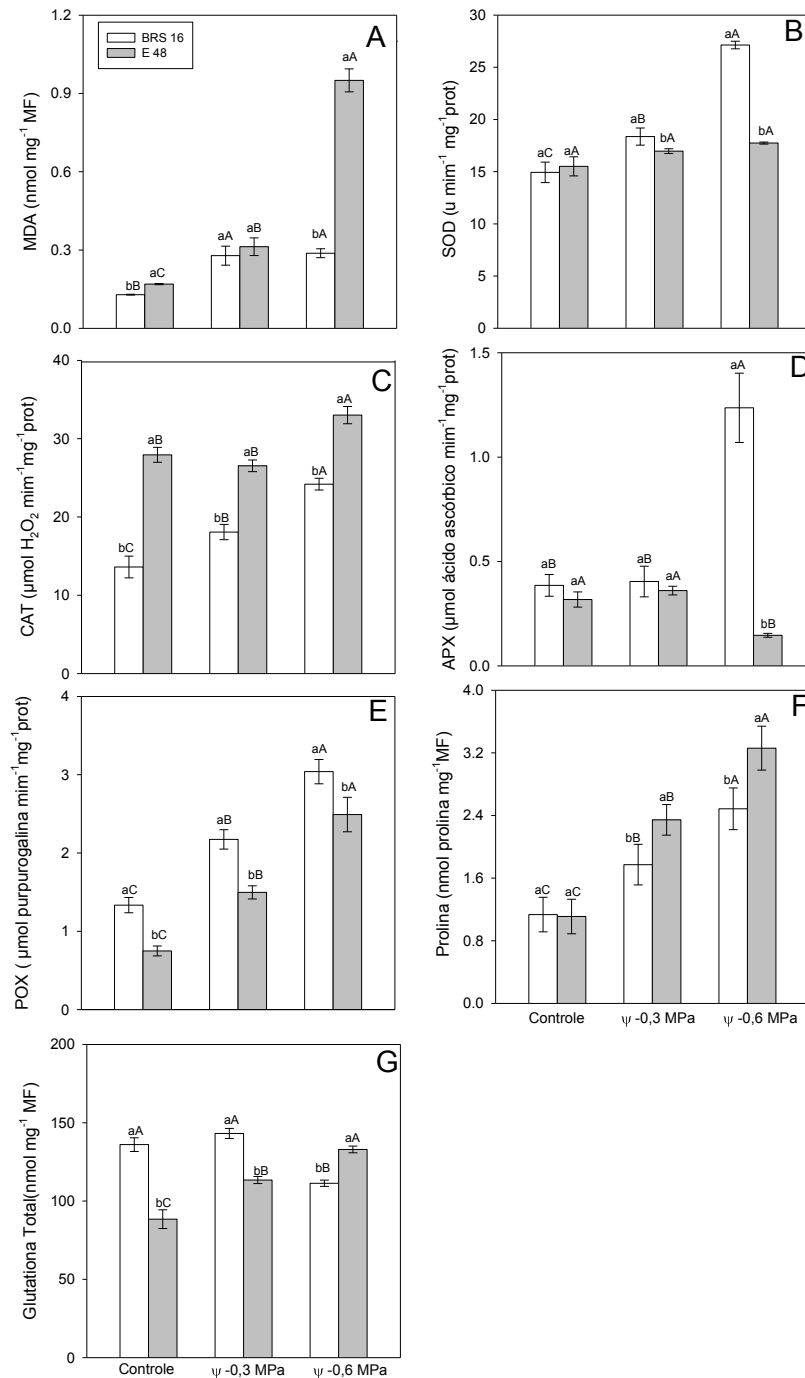


**Figura 4.** Taxa fotossintética líquida (A), taxa transpiratória (B), concentração interna de  $\text{CO}_2$  (C), condutância estomática (D) e eficiência no uso da água (E) no estágio vegetativo (V3), de duas cultivares de soja, BRS16 e E48, após 10 dias de exposição a diferentes potenciais hídricos, simulados com PEG 6000 em solução nutritiva. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos para uma mesma cultivar e pela mesma letra minúscula entre linhagens no mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média,  $n=4$ .

A concentração MDA-TBA (peroxidação de lipídios) em células foliares aumentou em ambas as cultivares após tratamentos com déficit hídrico. Além disso, a cultivar E48 teve maior concentração de MDA-TBA no tratamento  $-0,6$  MPa que a cultivar BRS16 (Fig. 5A). A atividade das enzimas SOD, CAT e POX aumentou significativamente para a cultivar BRS16 após exposição ao déficit hídrico  $-0,3$  e  $-0,6$

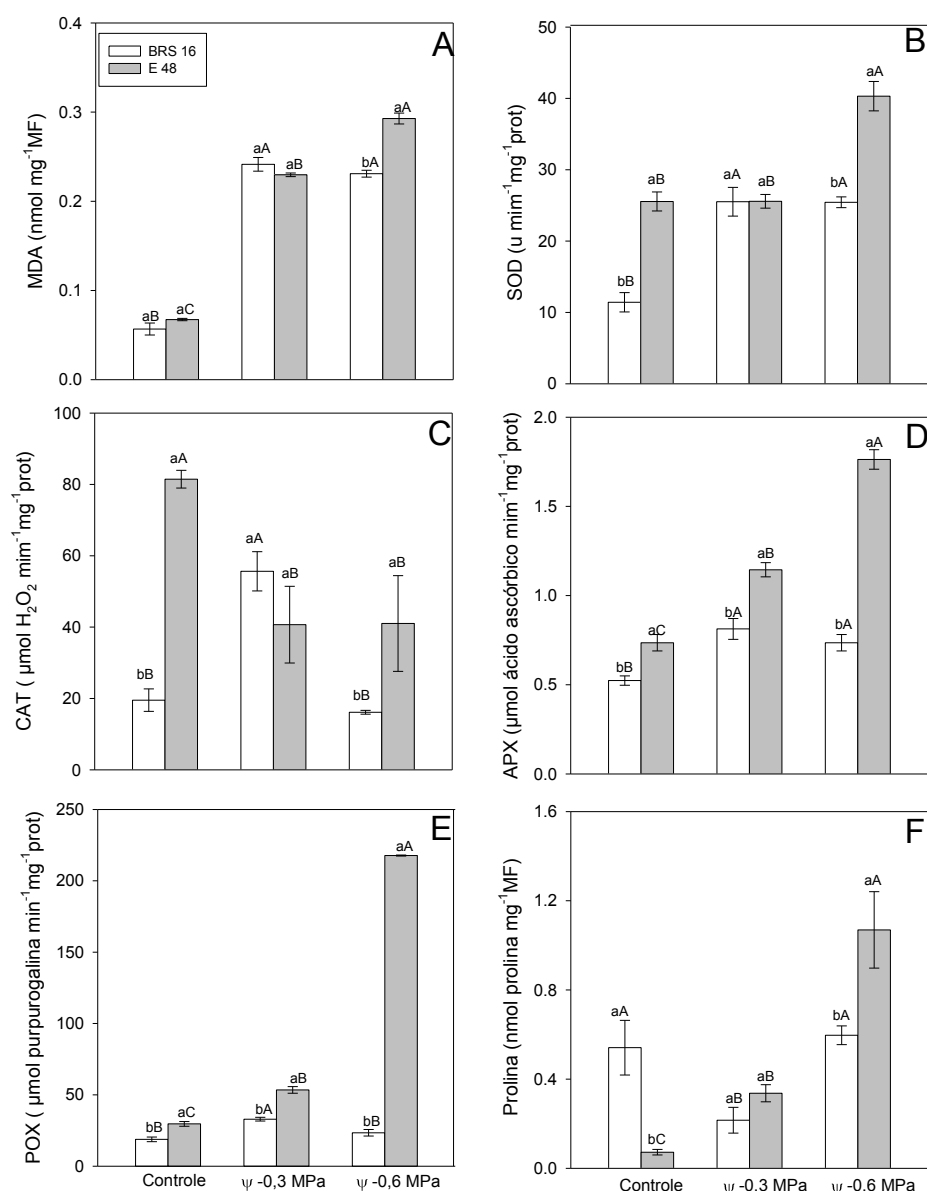
MPa enquanto a atividade da APX aumentou apenas no tratamento -0,6 MPa. Para a cultivar E48 apenas a atividade enzimática da CAT e POX aumentou após déficit hídrico, enquanto a atividade da APX reduziu após tratamento -0,6 MPa. Entre as cultivares, a atividade da CAT foi maior para E48 e da POX maior para BRS16. Além disso, a cultivar BRS16 apresentou maior atividade da SOD e APX para o tratamento -0,6 MPa (Fig. 5B, C, D e E).

A concentração de prolina aumentou significativamente em ambas as cultivares após exposição ao déficit hídrico, sendo maior na cultivar E48 (Fig. 5F). A concentração de glutatona total aumentou na cultivar E48 após tratamentos com déficit hídrico e diminuiu na cultivar BRS16 após tratamento -0,6 MPa. A cultivar E48 apresentou maior teor de glutatona total que BRS16 para o tratamento -0,6 MPa (Fig. 5G).



**Figura 5.** Avaliação em folhas da concentração de MDA-TBA (peroxidação de lipídios) (A), atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) (B), catalase (CAT) (C), peroxidase do ascorbato (APX) (D), peroxidase total (POX) (E), concentração de prolina (F) e concentração de glutathiona total (G) no estágio vegetativo (V3), de duas cultivares de soja, BRS16 e E48, após 10 dias de exposição a diferentes potenciais hídricos, simulados com PEG 6000 em solução nutritiva. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos para uma mesma cultivar e pela mesma letra minúscula entre linhagens no mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média, n= 4.

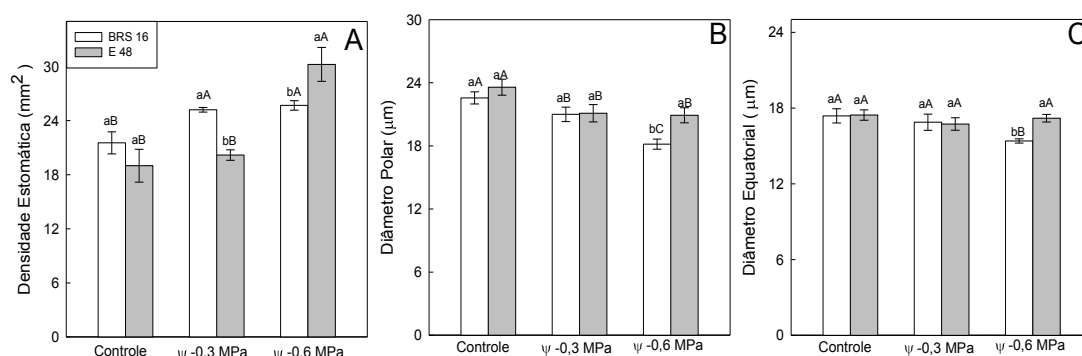
A concentração de MDA-TBA (peroxidação lipídica) no sistema radicular aumentou significativamente em ambas as cultivares após exposição ao déficit hídrico. Entre as cultivares, a E48 apresentou a maior concentração de MDA-TBA no tratamento -0,6 MPa (Fig. 6A). A atividade das enzimas SOD, APX e POX aumentou significativamente na cultivar BRS16, enquanto a atividade da CAT diminuiu na cultivar E48 após exposição ao déficit hídrico. Para BRS16, a atividade das enzimas SOD, CAT e POX aumentou após o tratamento -0,3 MPa. Entre as cultivares, E48 apresentou maior atividade da enzima APX e POX em todos os tratamentos e maior atividade de SOD e CAT nos tratamentos controle e -0,6 MPa (Fig. 6B, C, D e E). A concentração de prolina aumentou significativamente na cultivar E48 após exposição ao déficit hídrico e para BRS16 houve redução significativa após tratamento de -0,6 MPa. Entre as cultivares observamos que a E48 apresentou maior concentração de prolina no tratamento -0,6 MPa e a cultivar BRS16 apresentou maior concentração no tratamento controle (Fig. 6F).



**Figura 6.** Avaliação em raízes da concentração de MDA-TBA (peroxidação de lipídios) (A), atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) (B), catalase (CAT) (C), peroxidase do ascorbato (APX) (D), peroxidase total (POX) (E) e concentração de prolina (F) no estágio vegetativo (V3) de duas cultivares de soja, BRS16 e E48, após 10 dias de exposição a diferentes potenciais hídricos, simulados com PEG 6000 em solução nutritiva. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos para uma mesma cultivar e pela mesma letra minúscula entre linhagens no mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média, n= 4.

A densidade estomática aumentou significativamente para ambas as cultivares após exposição ao déficit hídrico. Entre as cultivares, no tratamento controle não houve diferença significativa, no tratamento -0,3 MPa a cultivar BRS16 teve maior densidade

estomática, já no tratamento -0,6 MPa a cultivar E48 obteve maior densidade estomática (Fig.7A). Para diâmetro polar e equatorial dos estômatos ambas as cultivares apresentaram redução no diâmetro polar com a exposição das plantas ao deficit hídrico, no entanto no tratamento mais severo a cultivar E48 apresentou maior diâmetro polar. Para o diâmetro equatorial a cultivar E48 não reduziu significativamente com a exposição ao deficit hídrico, já para a cultivar BRS16 houve redução apenas no tratamento -0,6 MPa. Apenas no tratamento -0,6 MPa teve diferença entre as cultivares, no qual observamos que a cultivar E48 apresentou maior diâmetro equatorial (Fig.7C).

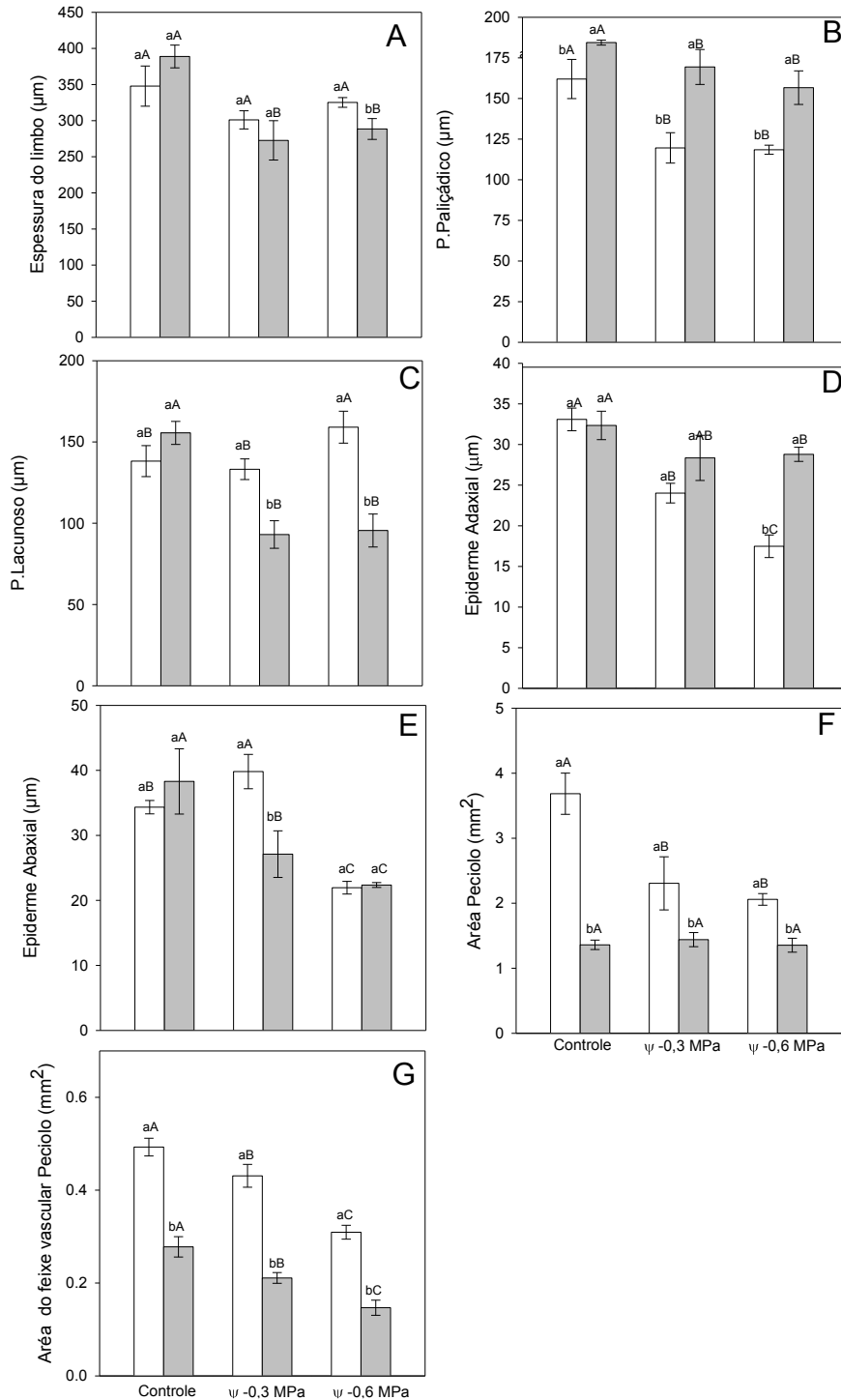


**Figura 7.** Densidade estomática (A), diâmetro polar (B) e diâmetro equatorial (C) no estágio vegetativo (V3) de duas cultivares de soja, BRS16 e E48, após 10 dias de exposição a diferentes potenciais hídricos, simulados com PEG 6000 em solução nutritiva. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos para uma mesma cultivar e pela mesma letra minúscula entre linhagens no mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média, n= 4.

Avaliando-se a anatomia das as folhas, observamos que a espessura do limbo reduziu na cultivar E48 após exposição ao deficit hídrico. A espessura do limbo foi maior na cultivar BRS16 após tratamento deficit -0,6 MPa (Fig. 8A). A espessura do parênquima paliçádico observamos uma redução significativa na cultivar BRS16 após os tratamentos -0,3 e -0,6 MPa e na E48 apenas após tratamento -0,6 MPa. A cultivar E48 apresentou maior espessura do parênquima paliçádico em todos os tratamentos (Fig. 8B). A espessura do parênquima lacunoso reduziu apenas para a cultivar E48 após tratamento com deficit hídrico. Entre as cultivares, BRS16 apresentou maior espessura do parênquima lacunoso após deficit hídrico (Fig. 8C).

A espessura da epiderme abaxial e adaxial das folhas reduziu em ambas cultivares após deficit hídrico. A espessura da epiderme adaxial foi maior na cultivar E48 após os tratamentos -0,3 e -0,6 MPa, enquanto a espessura da epiderme abaxial

foi maior na cultivar BRS16 após tratamento  $-0,3$  MPa (Fig. 8D e E). Houve redução na área do pecíolo apenas na cultivar BRS16 após exposição ao déficit hídrico e ambas as cultivares apresentaram redução na área do feixe vascular do pecíolo após déficit hídrico. A área do pecíolo e área do feixe vascular do pecíolo foi maior para a cultivar BRS16 em todos os tratamentos (Fig. 8F e G).



**Figura 8.** Espessura do limbo foliar (A), parênquima paliçádico (B), parênquima lacunoso (C), epiderme adaxial (D) e abaxial (E), área do pecíolo (F) e área do feixe

vascular do pecíolo (G) no estágio vegetativo (V3) de duas cultivares de soja, BRS16 e E48, após 10 dias de exposição a diferentes potenciais hídricos, simulados com PEG 6000 em solução nutritiva. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos para uma mesma cultivar e pela mesma letra minúscula entre linhagens para o mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média, n= 4.

## 5. Discussão

O estresse por seca em plantas é caracterizado pela perda contínua de água através da transpiração e da evaporação para a atmosfera, enquanto a absorção de água é diminuída devido à redução no teor de água no solo. A falta de água em determinados estádios fenológicos da cultura de soja pode comprometer os parâmetros de crescimento, e conseqüentemente a produção de grãos (Masoumi et al., 2010).

O aumento da razão massa seca raiz/parte aérea sugere a alocação de carboidratos em resposta ao déficit hídrico. Essa maior razão para a cultivar BRS16 em todos os tratamentos mostra o maior investimento em formação de raiz. Maior investimento em tecido radicular é uma tentativa para aumentar a condutividade hidráulica das plantas através do aumento na área de absorção de água (Peña-Valdivia et al., 2010). Outras modificações ocorrem para aumentar a expressão de genes relacionado ao transporte de água entre as células, como os que codificam as aquaporinas. Em *Arabidopsis*, a expressão do gene *AtPIP*, que codifica essas proteínas de transporte de água aumentou sob condição de seca. Nas raízes, esse gene é regulado durante a seca, impedindo o retorno de água das raízes para o solo e conseqüentemente, a perda de água para o meio (Alexandersson et al., 2010).

Aumentos no volume do sistema radicular, área total do sistema radicular, raízes com diâmetro entre 0-3 e maior que 3 mm para a cultivar E48 após tratamentos com déficit hídrico evidenciam sua tolerância a seca. Aumentos nesses parâmetros já foram reportados como características de tolerância a seca em soja (Comas et al., 2013; Fenta et al., 2014). Adicionalmente, maior densidade e desenvolvimento de raízes contribuem para maior rendimento na produção de sementes de soja em condições de seca (He et al., 2016). Por outro lado, a redução no número de raízes com diâmetro entre 0-3 e maior que 3 mm na cultivar BRS16 deve-se a diminuição no diâmetro das células do córtex e dos tecidos vasculares (xilema e floema) da raiz, resultante da inibição da atividade das células do câmbio ou da redução no conteúdo de DNA promovido pela diminuição da divisão e expansão celular (Selim e El-Nady 2011).

O decréscimo no diâmetro do caule na cultivar E48 se deve à redução de água nos tecidos que, conseqüentemente, afeta o crescimento (divisão) e a expansão de células meristemáticas e células jovens (Munawartil et al., 2014). Quando há falta de água, o alongamento celular pode ser inibido pela interrupção do fluxo de água do xilema para as células de alongamento (Gunes et al., 2008). Por outro lado, a redução na taxa de divisão celular pode reduzir a síntese de novos elementos de vaso e, conseqüentemente, diminuir a área envolvida com o transporte de água pelo caule.

A redução na concentração dos pigmentos fotossintéticos pode limitar diretamente o potencial fotossintético e, conseqüentemente, a produção primária (Terzi et al. al., 2010). Entretanto, no presente trabalho, no tratamento com deficit houve aumento na concentração dos pigmentos cloroplastídicos, principalmente na cultivar E48, após deficit hídrico. O aumento na concentração dos pigmentos fotossintéticos, sem grande limitação na taxa transpiratória, explicam a manutenção da taxa fotossintética por meio da captura constante de energia luminosa em ambas cultivares, após deficiência hídrica; e a maior fotossíntese da cultivar E48 frente a cultivar BRS16. Além disso, o aumento da concentração de clorofila sob estresse pode ser associado a tolerância ao estresse osmótico e a seca, podendo ser utilizado como critério de seleção para cultivares tolerantes, como já relatado em *Prunus* spp. (Sorkheh et al., 2012). Adicionalmente, os maiores teores de carotenóides foram obtidos na cultivar E48, após os tratamentos com deficit hídrico. As clorofilas tem a função de captação de energia luminosa, enquanto os carotenóides auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios, podendo igualmente funcionar como elementos fotoprotetores através da dissipação térmica do excesso de energia (Rong-Hua et al., 2006).

A redução na superfície foliar observada em ambas cultivares após tratamento com PEG a -0,3 e -0,6 MPa, é conseqüência da redução do tamanho das células e do aumento na espessura do tecido vascular e da parede celular (Guerfel et al., 2009). Essas alterações promovem redução da superfície transpiratória, permitindo a planta sobreviver sob condições de deficiência hídrica (Stolf-Moreira et al., 2010).

A condutância estomática e a concentração interna de carbono foi semelhante para ambas as cultivares no estresse mais severo. A limitação hídrica reduz o potencial osmótico das células pela síntese de substâncias osmoticamente ativas ou pela

concentração no citoplasma (Nakayama et al., 2007). Em resposta a essa alteração, muitas plantas diminuem a  $g_s$  e a transpiração.

O fechamento dos estômatos é o principal mecanismo através dos quais as plantas percebem a restrição de água no solo. Sendo este, a primeira e imediata resposta ao déficit hídrico que regula a redução das perdas de água da planta para a atmosfera. No entanto, o fechamento dos estômatos também é a principal causa da diminuição da fotossíntese devido às taxas de assimilação de carbono serem reduzidas (Mak et al., 2014). Sendo assim, o fechamento estomático ajuda a manter maior potencial hídrico foliar e, portanto, o teor de água da folha, induzindo redução na fotossíntese e por fim crescimento da planta. No entanto, nossos resultados são opostos, pois mostram que as cultivares avaliadas não alteraram a taxa fotossintética com a deficiência hídrica.

A limitação hídrica promove fechamento estomático, resultando em menor assimilação de  $CO_2$  e portanto menor concentração de  $C_i$  nas folhas. A redução no  $C_i$  causa desequilíbrio na atividade fotoquímica do fotossistema II e no requerimento de elétrons para a fotossíntese, podendo aumentar os danos às moléculas de clorofilas dos centros de reação (Flagella et al., 1995). Entretanto, neste trabalho o fechamento estomático interferiu sobre a  $C_i$ , para ambas as cultivares, apenas no tratamento de deficiência hídrica mais severa, já a taxa transpiratória e a taxa fotossintética de ambas as cultivares não apresentou modificações com a exposição a deficiência hídrica.

O aumento da eficiência no uso da água (EUA) nas duas cultivares, nas condições de maior estresse hídrico, podem estar associadas ao maior controle da abertura estomática, bem como a síntese de substâncias osmoticamente ativas, como a prolina cuja concentração aumentou na raiz da cultivar E48 e nas folhas de ambas as cultivares. Aumento no teor prolina sob estresse já foi comprovada e seu acúmulo tem papel importante na proteção da estrutura proteica, regulação do status redox, ajuste osmótico e atividade das enzimas do estresse antioxidativo (Alam et al., 2009).

O sistema antioxidativo das plantas é outro mecanismo de tolerância a seca, pois controlam os teores das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Sharma et al., 2012). As EROs são fundamentais na sinalização a estresses bióticos ou abióticos, regulando diversas respostas em nível celular (Sharma et al., 2012). A cultivar E48 apresentou maior atividade da enzima CAT em raiz e folha e em praticamente todas as condições testadas. Esta enzima é responsável pela conversão do  $H_2O_2$  em oxigênio e água (Møller, 2001). O  $H_2O_2$  é produzido nos cloroplastos e peroxissomas durante a

fotossíntese e na mitocôndria durante a respiração (Sofó et al., 2015). O aumento na produção de  $H_2O_2$  foi relatado sob condições de estresse biótico e/ou abiótico tais como patógenos, ferimentos, irradiação UV, exposição a luz intensa e seca (Sharma et al., 2012). O aumento na disponibilidade de  $H_2O_2$  induz genes responsivos para a síntese de CAT justificando o aumento na sua atividade. Sob condições de seca, geralmente associada a altas temperaturas, as condições para fotossíntese são afetadas, e a fotorespiração possibilita a continuidade na assimilação de carbono, porém há formação  $H_2O_2$  como subproduto, sendo assim a CAT tem papel fundamental na fotorespiração, sob condições de seca, pois atua na remoção do  $H_2O_2$  produzido (Sofó et al., 2015). Nestas condições, a fotorespiração funciona como dissipador de energia, evitando a inibição da cadeia de transporte de elétrons e a fotoinibição (De Pinto et al., 2013). Portanto, o aumento na atividade da CAT tem papel fundamental na fotossíntese sob condições de estresse, e pode explicar a manutenção das taxas fotossintéticas observadas nos dois cultivares, principalmente na E48.

A atividade da enzima POX aumentou em ambas as cultivares após o déficit hídrico, sendo maior no sistema radicular da cultivar E48 e em folhas da cultivar BRS16. A peroxidase é uma classe de enzimas presente em tecidos animais, vegetais e microorganismos que catalisa a oxidoredução do  $H_2O_2$  com redutores como o ascorbato e a glutatona e participa de processos fisiológicos, tais como lignificação, suberização, formação de componentes da parede celular, catabolismo de auxinas e senescência (War et al., 2012). Esta enzima também está envolvida nos processos de defesa das plantas, pois elimina o  $H_2O_2$  produzido durante estresse. Essas características sugere a importância da peroxidase na tolerância ao estresse oxidativo em plantas sobre estresse por seca (War et al., 2012).

As atividades da APX e CAT vem sendo associadas, uma vez que o substrato de ambas é o mesmo. Podemos observar, principalmente na raiz da cultivar E48, que a redução na atividade da CAT foi acompanhada de aumento na atividade da APX, demonstrando que em condições nas quais a CAT não é capaz de metabolizar eficientemente o  $H_2O_2$ , a APX auxilia na remoção. Aumento na concentração citossólica de  $H_2O_2$  é extremamente danoso, pois o  $H_2O_2$  atravessa a membrana celular por simples difusão ou através das aquaporinas para locais distantes de sua produção (Sofó et al., 2015). Em condições de seca, a expressão de genes que sintetizam a APX é rigorosamente regulado explicando o aumento na atividade dessa enzima (De Pinto et al., 2013). O aumento na expressão de genes que codificam APX são importantes

também na manutenção da homeostase do ascorbato (AsA) e glutathiona (GSH), antioxidantes não-enzimáticos que auxiliam na manutenção do status redox da célula. Além disso, o AsA está envolvido em outras funções, como crescimento e regulação de compostos antioxidantes ligados à membrana (Chen et al., 2012). Plantas de tabaco submetidas ao déficit hídrico simulado por PEG 6000 também tiveram aumento na atividade de APX, sendo encontrado aumento na expressão dos genes envolvidos com a síntese da APX, bem como em sua atividade (Kausar et al. 2012).

A atividade da SOD aumentou em ambas cultivares, sendo maior nas raízes da E48 e nas folhas da BRS16. A SOD é considerada a primeira barreira de combate as EROs, pois além de estar presente em vários compartimentos celulares, converte o radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, evitando assim a formação do radical hidroxila (Gill e Tuteja, 2010). Portanto, a atividade da SOD é fundamental para a manutenção da concentração do radical hidroxila em níveis que não danifiquem a membrana e demonstra sua importância na tolerância a seca (Zhang et al, 2010).

Os resultados das atividades enzimáticas de SOD, CAT, POX e APX indicam sua atuação conjunta no combate ao estresse causado pelo déficit hídrico, no qual a E48 foi mais eficaz na remoção das EROS, principalmente no sistema radicular. Além disso, a cultivar E48 apresentou maiores atividades enzimáticas, tanto em folha quanto em raiz, na maioria dos tratamentos controles, demonstrando que, em condições normais, este cultivar já apresenta carga endógena enzimática para combater um possível estresse oxidativo, caracterizando mecanismo de tolerância para esse cultivar.

O aumento do teor de glutathiona total nas folhas da cultivar E48 e sua redução nas folhas da BRS16, após imposição ao déficit hídrico, evidencia mais um mecanismo de tolerância da E48, visto que esse metabólito atua ativamente contra o estresse oxidativo. Além das defesas antioxidativas enzimáticas, vários tióis protéicos e não protéicos contribuem para a tolerância de plantas a estresses abióticos (Colville e Kranner, 2010). Nesse contexto, a molécula de glutathiona (GSH) é um tiol não protéico com propriedades antioxidativas, atuando na proteção de plantas sob estresse por salinidade (Zagorchev et al., 2013), seca (Pyngrope et al., 2013) e calor (Kumar et al., 2012) já foram comprovados. A GSH atua como doadora de elétrons para que o sistema de defesa enzimático elimine as EROs do interior das células (Koffler et al., 2014). GSH está presente em vários compartimentos celulares e nos cloroplastos tem papel fundamental, pois protege o aparelho fotossintético de possíveis danos oxidativos (Gill e Tuteja, 2010).

As concentrações de prolina nas raízes da cultivar E48 e nas folhas de ambas cultivares aumentaram após déficit hídrico. Este soluto osmoticamente ativo auxilia nas respostas das plantas ao estresse oxidativo (Rejeb et al., 2014). A prolina está associada a redução nos níveis de  $H_2O_2$  e MDA e ao aumento na atividade de enzimas antioxidativas. Portanto, a prolina pode atuar como molécula de regulação e/ou sinalização capaz de alterar a expressão de genes relacionados a enzimas antioxidantes envolvidos à resposta ao estresse em plantas (Carvalho et al., 2013). Além disso, a prolina promove o reajuste osmótico, contribuindo para a redução do potencial hídrico das plantas, e permite que estas continuem absorvendo água (Recchia, 2011).

A cultivar E48 apresentou maior taxa de peroxidação lipídica nas raízes e folhas após déficit hídrico de -0,6 MPa, embora tenha demonstrado bom funcionamento do aparato antioxidante. Resultados semelhantes para as mesmas cultivares e agente estressor foram encontrados por Gomes (2009). Os mecanismos antioxidantes são essenciais no combate as EROs, visto que estas afetam as membranas biológicas através da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é estimada pelos níveis de MDA e está associada a oxidação de ácidos graxos insaturados que desestrutura a membrana e pode resultar no extravasamento de eletrólitos (Alonso et al., 1997). A concentração de MDA em acesso de *Arabidopsis* transformada para tolerância a seca não variou, enquanto no acesso selvagem houve acréscimo (Khan e Komatsu, 2016) diferindo dos nossos resultados. Esse fato supõe que a tolerância da cultivar E48 ao estresse hídrico possa estar relacionada a outras rotas fisiológicas e não apenas à produção MDA.

A eficiência dos mecanismos antioxidantes, dos ajustes metabólicos e da sinalização molecular permitem que as plantas modifiquem características anatômicas como resultado da sua capacidade de tolerar o estresse. O índice estomático, o tamanho e número médio dos estômatos e das células epidérmicas variam na soja em resposta ao estresse por seca (Boughalleb et al., 2014). A densidade estomática aumentou em ambas cultivares após a exposição ao déficit hídrico. A cultivar E48 mostrou resposta mais lenta ao estresse para esta característica. O controle estomático é importante na otimização do uso da água em condições de seca. O aumento no número de estômatos e redução em seu tamanho pode aumentar a eficiência no uso da água, visto que haverá menor abertura estomática para promover a entrada de  $CO_2$  e a saída de  $H_2O$ , tornando o processo de abertura mais eficiente (Pearce et al., 2006), o resultado desta pesquisa

mostra que a cultivar BRS16 apresentou menor tamanho dos estômatos no estresse mais severo, pois apresentou menor diâmetro polar e equatorial.

Uma vez que a folha é o principal órgão de dreno de água, várias modificações estruturais podem ocorrer a fim de economizar água. Essas alterações irão variar de acordo com a espécie (Al-Khalifah et al., 2006). As espécies *Cenchrus ciliaris*, *Ctenanthe setosa* e *Triticum aestivum* apresentaram redução na espessura do mesófilo quando foram submetidas a deficiência hídrica (El-Afry et al., 2012). Os resultados desta pesquisa mostraram redução na espessura do limbo para cultivares tolerante após déficit hídrico. A redução nas dimensões da folha é consequência da redução do tamanho das células e decorrente da menor turgescência necessária para a expansão (Ogbonnaya et al., 1998). Esta alteração pode ser interpretada como um mecanismo de tolerância das folhas para manter o turgor (Burghardt et al., 2008).

Algumas espécies têm a capacidade de dobramento do limbo, reduzindo assim sua espessura como estratégia de tolerância a deficiência hídrica (Farrant et al., 1999). Deficit hídrico prolongado, cerca de 30 dias, reduziu a espessura do limbo e espessura do mesófilo de *A. gombiformis*, (Al-Khalifah, et al., 2006). Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho no qual observamos reduções na espessura do limbo foliar, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, epiderme adaxial, epiderme abaxial e área de feixe vascular para ambas cultivares. Já para área do pecíolo apenas a cultivar BRS16 apresentou redução.

A redução na área do tecido vascular em ambas as cultivares sugere maior capacidade das plantas em manter o transporte de água e redução da possibilidade de cavitação sob deficiência hídrica, uma vez que a embolia é uma das principais causas de morte das plantas durante a seca (Choa et al., 2016).

## **6. Conclusão**

Os tratamentos mostram que as duas cultivares responderam de forma distinta para a exposição aos diferentes níveis de deficit hídrico, simulado pela adição de polietilenoglicol (PEG6000). A adição do PEG6000, promoveu a redução do potencial hídrico para ambas as cultivares. Assim, observamos a cultivar BRS16 apresentou maior relação massa seca raízes/parte aérea. As cultivares não apresentaram alterações na taxa fotossintética e transpiratória após os tratamentos. Para eficiência no uso da

água e concentração de carbono interno, houve aumento e redução, respectivamente, para ambas as cultivares.

A peroxidação lipídica e a atividade das enzimas CAT, POX, SOD e APX foi maior nas amostras da cultivar E48, principalmente no déficit hídrico severo. A anatomia das folhas evidenciou que a cultivar E48 apresentou maior densidade estomática, e maior diâmetro polar e equatorial no tratamento mais severo. A cultivar BRS16 apresentou aumento no parênquima lacunoso, já a cultivar E48 apresentou maior redução na espessura do limbo, maior espessura do parênquima paliçádico e epiderme adaxial, menor área dos feixes vascular do pecíolo e menor área de seção transversal do pecíolo.

## 7. Referências bibliográficas

Alexandersson, E., Danielson, J.Å.H., Råde, J., Moparthi, V.K., Fontes, M., Kjellbom P., Johanson U. Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *Plant J*, v.61, p. 650–660, 2010.

Al-Khalifah, N.S., Khan, P.R., Al-Abdulkader, A.M., Nasroun, T. Impact of water stress on the sapwood anatomy and functional morphology of *Calligonum comosum*, *I.A.W.A. J*, v. 27, p. 299-312, 2006.

Anderegg, W.R.L., Berry, J.A., Field, C.B. Linking definitions, mechanisms, and modeling of drought-induced tree death. *Trends Plant Science*, v.17, p. 693–700, 2012.

Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, v.39, n. 1, p.205-207, 1973.

Beauchamp, C., Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, v. 44, p.276-287, 1971.

Boughalleb, F., Abdellaoui, R., Haddad, Z., Neffati M. Anatomical adaptations of the desert species *Stipa lagascae* against drought stress. *Biologia*, v.70, p.1042-1052, 2014.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p. 248-254, 1976.

Burghardt, M., Burghardt, A., Gall, J., Rosenberger, C., Riederer M. Ecophysiological adaptations of water relations of *Teucrium chamaedrys* L. to the hot and dry climate of xeric limestone sites in Franconia, Southern Germany. *Flora*, v.203, p.3–13, 2008.

Carvalho, K., Campos, M.K.F., Domingues, D.S., Pereira, L.F.P. and Vieira, L.G.E. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrímelo. *Molecular Biology Reports*, v. 40, p. 3269-3279, 2013.

Chance, B., Maehley, A.C. Assay of catalases and peroxidases. *Method. Enzymol*, v.2, p.764-775, 1955.

Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C., Yu, D. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochim. Biophys*, v.1819, p.120–128, 2012.

Choa, B.; Badel, E.; Burlett, R.; Delzon, S.; Cochard, H.; Jansen, S. Noninvasive measurement of vulnerability to drought-induced embolism by X-ray microtomography. *Plant Physiology*, v.170, p.273-282, 2016.

Clark, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agri. Food Chemistry*, v.23, p.458-460, 1975.

Colville, L., Kranner, I. Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. *Plant Growth Regulation*, v. 62, n.3, p. 241-255, 2010.

Comas, L.H., Becker, S.R., Cruz, V.M.V., Byrne, P.F., Dierig, D. A. Root traits contributing to plant productivity under drought. *Front. Plant Sci.* v.4, p.442-460, 2013.

Costa, C., Dwyer, L. M., Zhou, X., Dutilleul, P., Hamel, C., Reid, L.M., Smith, D.L. Root morphology of contrasting maize genotypes. *Agronomy Journal, Madison*, v. 94, p. 96-101, 2002.

DaCosta, M., Huang, B. Changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation for bentgrass species in responses to drought stress. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* v. 132, p.319–326, 2007.

El-Afry, M.M., El-Nady, M.F., Abdelmonteleb, E.B. Anatomical studies on drought-stressed wheat plants (*Triticum aestivum* L.) treated with some bacterial strains. *Acta Biol. Szeg*, 56, 165-174, 2012.

Embrapa, 2016. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Soja na alimentação. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/soja-na-alimentacao>> Acesso em: 15/02/2017.

Embrapa, 2016. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Soja. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1>> Acesso em: 15/02/2017.

Fang, Y., Xiong, L., General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2014

Farrant, J.M., Cooper, K., Kruger, L. A., Sherwin, H. W. The effect of drying rate on the survival of three desiccation-tolerant angiosperm species. *Annals of Botany*, v. 84, p.371-379, 1999.

Fenta, B. A., Beebe, S. E., Kunert, K. J., Burrige, J. D., Barlow, K. M., Lynch, P. J., et al. Field phenotyping of soybean roots for drought stress tolerance. *Agronomy* v.4, p. 418–435, 2014.

Flagella, Z., Pastore, D., Campanile, R.G., Di Fonzo, N. The quantum yield or photosynthetic electron transport evaluated by chlorophyll fluorescence as an indicator of drought tolerance in durum wheat. *J. Agric. Sci. Cambridge*, v.125, p. 325–329, 1995.

Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v.59, p.309–314, 1977.

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

Gomes, W.S. Caracterização fisiológica e expressão de genes relacionados a resistência ao déficit hídrico em soja. 2009. 35p. Dissertação. (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa-UFV. 2009.

Gomes-Junior, R.A., Moldes, C.A., Delite, F.S., Pompeu, G.B., Gratão, P.L., Mazzafera, P., Lea, P.J., Azevedo, A.R. Antioxidante metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*, v. 65, p. 1330–1337. 2006.

Griffith, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, v. 106, p. 207–212, 1980.

Gunes, A., Pilbeam, D.J., Inal, A., Bagci, E.G., Coban, S. Influence of silicon on antioxidant mechanisms and lipid peroxidation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, v. 2, p. 105–113, 2008.

Hasanuzzaman, M., Fujita, M. Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biol. Trace Elem. Res.* V. 143, p.1758–1776, 2011.

Havir, E.A., Mchale, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol*, v. 84, p. 450–455, 1987.

He, S.P, Yan, Q.J, Song, G.Y, Xu M.L. Progress in morphological and physiological and biochemical indexes of drought resistance identification of maize. *Agricultural Research in the Arid Areas*, v. 13, p.67–73, 2016.

Heath, R.L., Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast: I- Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.125, p 189–198, 1968.

Hirakuri, M. H., Lazzarotto, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)*, v. 349, 2014.

Huang, C.J., Zhao, S.Y., Wang, L.C., Anjum, S.A., Chen, M., Zhou, H.F., Zou, C.M. Iteration in chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities in hybrid ramie (*Boehmeria nivea* L.) under drought stress. *Aust. J Crop Sci*, v.7, p.594–599, 2013.

IBGE. Banco de dados agregados Pesquisas: Produção Agrícola Municipal. 2016. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/estProdAgr\\_20\\_503.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_20_503.pdf)>. Acesso em: novembro 2016.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R., Panneerselvam, R. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal Agricultural Biology*, v. 11, p. 100–105, 2009.

Johansen, D.A. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Co. 1940.

Kar, M., Mishra D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol*, v.57, p. 315-319, 1976.

Kausar, R., Hossain, Z., Makino, T., Komatsu, S. Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. *Mol Biol Rep*, v.39, p. 10573–10579, 2012.

Khan, N.M., Komatsu, S. Proteomic analysis of soybean root including hypocotyl during recovery from drought stress. *Journal of Proteomics*, 144, p.39–50, 2016.

Koffler, B.E., Bloem, E., Zellnig, G., Zechmann, B. High resolution imaging of subcellular glutathione concentrations by quantitative immunoelectron microscopy in different leaf areas of *Arabidopsis*. *Micron*, v.45, p.119–128, 2013.

Koffler, B.E., Luschin-Ebengreuth, N., Maria Müller, M., Stabentheiner, E., Zechmann, B. Compartment specific response of antioxidants to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Science*, v. 227, p.133–144, 2014.

Kumar, S., Asif, M.H., Chakrabarty, D., Tripathi, R.D., Dubey, R.S, Trivedi, P.K. Differential expression of rice lambda class GST gene family members during plant growth, development, and in response to stress conditions. *Plant Mol Biol Rep*, v.31, p. 569-580, 2012.

Lowlor, D.W.G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ*, v.25, p. 275–294, 2002.

Mak, M., Babla, M., XU, S. C., O’Carrigan, A., Liu, X. H., Gong, Y. M., Holford, P., Chen, Z. H. Leaf mesophyll  $K^+$ ,  $H^+$  and  $Ca^{2+}$  fluxes are involved in drought-induced decrease in photosynthesis and stomatal closure in soybean. *Environmental and Experimental Botany*, v. 98, n. 1 p. 1-12, 2014.

MAPA, 2016. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Soja. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>> Acesso em: 28/01/2017.

Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ*, v. 33, p.453–467, 2010.

Møller, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:561-591, 2001.

Munawarti, A., Taryono, T., Semiarti, E., Sisindari, S. morphological and biochemical responses of glagah (*Saccharum spontaneum* L.) Accessions to Drought Stress. *The Journal of Tropical Life Science*, V.4, 61-66, 2014.

Nakano, Y., Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, v. 22, p.867–880, 1981.

Ogbonnaya, C.I., Nwalozie, M.C., Roy-Macauley H., Annerose, D.J.M. Growth and water relations of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) under water deficit on a sandy soil. *Ind. Crops Prod*, v.8, p. 65–76, 1998.

Pearce, D.W., Millard, S., Bray, D.F., Rood, S.B. Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid environment. *Tree Physiology*, Oxford, v. 26, p. 211-218, 2006.

Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'ana R, Mosquim , P.R., Moreira, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev Bras Fisiol Veg*, v. 11, p.137-143, 1999.

Peña-Valdivia, C.B., Sánchez-Urdaneta, A.B., JRangel, J.M., Muñoz, J.J., García-Nava, R., Velázquez, R.C., Anatomical root variations in response to water deficit: wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Biol. Res.*v. 43, p. 417-427, 2010.

Pyngrope, S., Bhoomika, K., Dubey, R.S. 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*, v.250, p.585–600, 2013.

Queiroz, C.G.S., Alonso, A., Mares-Guia, M., Magalhães, A. C. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biology Plant*, v. 41, p. 403-413, 1998.

Rahnama, A., Munns, R., Poustini, K., Watt, M. A screening method to identify genetic variation in root growth responses to a salinity gradient. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, p. 69–77, 2011.

Recchia, G. H. Identificação de genes diferencialmente expressos em feijoeiro envolvido na resistência ao estresse hídrico. 2011. 152 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo – USP, Piracicaba. 2011.

Rejeb, K. B., Abdelly, C., Savouré, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry, Review*, p. 1-7, 2014

Rong-Hua, L.I., Peu-Gio, G.U.O., Baum, M., Grandos, S., Ceccarelli, S. Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China*, v. 10, p.751-757, 2006.

Santos, E.L., Cattelan, A. J., Prete, C.E.C., Neumaier, N., Oliveira, M. C.N , Farias, J. R. B., A.L. Nepomuceno. Níveis de disponibilidade hídrica sobre componentes de produção e rendimento de cultivares de soja. *Sci Technol*, v. 07, p.1 – 11, 2014.

Scholander, P.F., Hammel, H. T., Bradstreet, E.D., Hemingsen, E. A. Sap pressure in vascular plants. *Science*, v.148, p.339-345, 1965.

Selim, H., El-Nady, M. Physio-anatomical responses of drought stressed tomato plants to magnetic field. *Acta Astro*, v.2, 1–9, 2011.

Sharma, I. Arsenic induced oxidative stress in plants. *Biologia*, v. 67: 447-453, 2012.

Sharma, P., Jha, A.B, Dubey, R.S., Pessarakli, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot*, 26 pages, 2012.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221 - 227, 2007.

Silvente, S., Anatoly, P.S., Lara, M. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. *PLoS One*, 2012. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038554>.

Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., e Vitti, A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *Int. J. Mol. Science*, v.16, p.13561–13578, 2015.

Soliman, H. L. A.; Hendawy, M. H. Selection for drought tolerance genotypes in durum wheat (*Triticum durum* Desf) under in vitro conditions. *Middle-East Journal of Scienti±c Research*, v.14, p.69-78, 2013.

Sorkheh, K., Shiran, B., Khodambashi, M., Rouhi, V., Mosavei, S., Sofo, A. Exogenous proline alleviates the effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress in wild almond species. *Russian Journal Plant Physiology*, v. 59, p. 788–798, 2012.

Sreenivasulu, N., Mir, R.R., Zaman-Allah, M., Trethowan, R., Varshney, R.K. Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 125, p. 625–645, 2012.

Stolf-Moreira, R., Medri, M. E., Neumaier, N., Lemos, N. G., Brogin, R. L., Oliveira, M. C. N., FariaS, J. R. B., Abdelnoor, R. V., Marcelino, F. C., Nepomuceno, A. L. Cloning and quantitative expression analysis of drought-induced genes in soybean. *Genetics and Molecular Research*, v. 9, p. 858-867, 2010.

Tanaka, K., Mitsuhashi, H., Kondo, N., Sugahara, K. Further evidence for inactivation of fructose 1,6-bisphosphate at the beginning of SO<sup>-2</sup> fumigation: increase in fructose-1,6-bisphosphate and decrease in fructose-6-phosphate in SO<sup>-2</sup> fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiol*, v. 23, P. 1467-1470, 1982.

Tardieu, F., Granier, C., Muller, B. Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator ? *Curr Opin Plant Biol*, v. 14, p.283–289, 2011.

Tenhaken, R. Cell wall remodeling under abiotic stress. *Plant Science*. Review article, 2015 doi: 10.3389/fpls.2014.00771

Terzi, R. et al. Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photosystem II and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Tubitak*. v. 34, p. 01-10, 2010.

Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., Shinozaki, K . ‘Omics’ analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, v.13, p.132-138, 2010.

War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma H.C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, v.7, p. 1306-1320, 2012.

Wellburn, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, v.144, p.307-313, 1994.

Zagorchev, L., Seal, E.C, Kranner, I, Mariela Odjakova, M. A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *Int J Mol Science*, v.14, p. 7405-7432, 2013.

Zhang, H.X., Zhang, F.Q., Xia, Y., Wang G.P., Shen Z.G. Excess copper induces production of hydrogen peroxide in the leaf of *Elsholtzia haichowensis* through apoplastic and symplastic CuZn-superoxide dismutase, *J. Hazard. Mater*, V.178,p. 834-843, 2010.

Zsögön, A., Negrini, A.C.A., Peres, L.E.P., Nguyen, H.T., and Ball, M.C. A mutation that eliminates bundle sheath extensions reduces leaf hydraulic conductance, stomatal conductance and assimilation rates in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Phytol*. v.205, 618–26, 2015.