

INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS - AGRONOMIA

**MECANISMOS DA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT  
HÍDRICO E À ALTA TEMPERATURA EM CULTIVARES  
DE SOJA**

Autor: Roberto Gomes Vital

Orientador: DSc. Alan Carlos Costa

Rio verde - GO  
Abril – 2019

INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS - AGRONOMIA

**MECANISMOS DA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT  
HÍDRICO E À ALTA TEMPERATURA EM CULTIVARES  
DE SOJA**

Autor: Roberto Gomes Vital

Orientador: DSc. Alan Carlos Costa

Tese apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, Área de concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

Rio Verde - GO  
Abril – 2019

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

VITAL, ROBERTO GOMES  
V V836m Mecanismos da tolerância ao déficit hídrico e a  
alta temperatura em cultivares de soja / ROBERTO  
GOMES VITAL; orientador Alan Carlos Costa; co-  
orientadora Caroline Müller. -- Rio Verde, 2019.  
90 p.

Tese (Doutorado em Programa de pós graduação em  
Ciências Agrárias - Agronomia) -- Instituto Federal  
Goiano, Campus Rio Verde, 2019.

1. Glycine max (L.). 2. limitação hídrica. 3.  
mecanismos de tolerância. 4. ondas de calor. I.  
Carlos Costa, Alan , orient. II. Müller, Caroline, co-  
orient. III. Título.

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS-GRONOMIA**

**MECANISMOS DA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT  
HÍDRICO E À ALTA TEMPERATURA EM  
CULTIVARES DE SOJA**

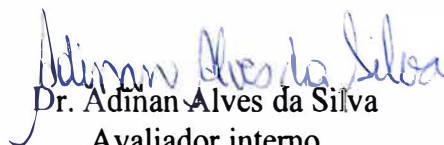
Autor: Roberto Gomes Vital  
Orientador: Dr. Alan Carlos Costa

TITULAÇÃO: Doutorado em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de  
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 11 de abril de 2019.



Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto  
Avaliador externo  
UFG – Campus Jataí



Dr. Adinan Alves da Silva  
Avaliador interno  
IF Goiano – Campus Rio Verde



Prof. Dr. Adriano Jakelaitis  
Avaliador interno  
IF Goiano – Campus Rio Verde



Prof. Dr. Marconi Batista Teixeira  
Avaliador interno  
IF Goiano – Campus Rio Verde



Prof. Dr. Alan Carlos Costa  
Presidente da banca  
IF Goiano – Campus Rio Verde

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Sebastião Carlos Lopes e Marly Vital Gomes (*in memoriam*), por todo amor, carinho, incentivo, confiança e apoio incondicional.

A minha irmã, Daniella Gomes Vital, pela amizade e apoio.

A minha namorada Fábria Barbosa, que foi meu ponto de apoio durante todo esse percurso do mestrado e doutorado, você foi essencial para essa conquista.

Ao meu orientador Professor Alan Carlos Costa, pela orientação durante esses três anos e meio do doutorado, pelos ensinamentos transmitidos e profissionalismo.

A minha coorientadora pós-doutora Caroline Müller, que, com paciência e dedicação, auxiliou na condução desse estudo, pela precisão nos conhecimentos transmitidos, pelos conselhos repassados tanto a nível pessoal como profissional, meus sinceros agradecimentos, você faz parte dessa conquista.

A meu coorientador Adinan Alves da Silva, pelas contribuições na fase de correção da tese.

A família Ecofisiologia, que participa da minha história, composta por Priscila, Ailton, Ariana, Camila, Daniela, Gabriel, Luciana, Yasmim, Erick, Robson, Verônica, pelos momentos agradáveis que passamos juntos, pela disponibilidade e dedicação nas análises realizadas.

Gostaria de agradecer também aos membros da banca; Prof. Dr. Alan Carlos Costa (orientador), Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto (avaliador externo), Dr. Adinan Alves da Silva (avaliador interno), Prof. Dr. Adriano Jakelaitis (avaliador interno) e Prof. Dr. Marconi Batista Teixeira (avaliador interno) pelas contribuições e por terem aceito o convite, meu muito obrigado.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, pela oportunidade de realização do

doutorado. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e as demais agências de fomento, pelo apoio financeiro para a execução dos projetos de pesquisa.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia do IF Goiano – Campus Rio Verde, pela dedicação e ensinamentos repassados durante toda a minha jornada acadêmica.

E por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que este estudo se tornasse realidade, MUITO OBRIGADO.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

ROBERTO GOMES VITAL, filho de Marly Vital Gomes e Sebastião Carlos Gomes Lopes, nasceu dia 06 de julho de 1981, na cidade de Palmeiras de Goiás, Goiás.

Em fevereiro de 2000, ingressou no curso de bacharelado em Agronomia na Universidade Federal de Goiás - graduando em março de 2005.

Em janeiro de 2010, ingressou no curso de Especialização em Bovinocultura de leite na Universidade Estadual de Goiás, especializando-se em julho de 2011.

Em fevereiro de 2013, iniciou no curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias-Agronomia, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, obtendo o título de mestre em agosto de 2015.

Em setembro de 2015, iniciou no curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	xi
RESUMO GERAL .....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO GERAL.....	5
REFERÊNCIAS.....	8
OBJETIVOS .....	12
3. CAPÍTULO I .....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
3.1. INTRODUÇÃO .....	16
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.2.1. Material vegetal e condições experimentais .....	18
3.2.2. Avaliações.....	19
3.2.2.1. Temperatura foliar .....	19
3.2.2.2. Relações hídricas .....	19
3.2.2.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	19
3.2.2.4. Concentração de pigmentos cloroplastídicos.....	20
3.2.2.5. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE) .....	20



3.2.2.6. Análises biométricas .....	21
3.2.3. Análise estatística .....	21
3.3. RESULTADOS .....	21
3.3.1. Temperatura foliar .....	22
3.3.2. Relações hídricas .....	22
3.3.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	23
3.3.4. Concentração de pigmentos cloroplastídicos.....	28
3.3.5. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE) .....	29
3.4. DISCUSSÃO .....	34
3.5. CONCLUSÕES .....	38
3.6. REFERÊNCIAS.....	39
4. CAPÍTULO II .....	55
RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	57
4.1 INTRODUÇÃO .....	57
4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	60
4.2.1. Material vegetal e condições experimentais .....	60
4.2.2.1. Caracterização morfoanatômica foliar.....	61
4.2.2.2. Avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT, APX e POX.....	62
4.2.2.3. Perfil metabólico.....	63
4.2.2.4. Análise estatística .....	65
4.3. RESULTADOS .....	65
4.3.1 Caracterização anatômica foliar.....	65
4.3.2. Atividade das enzimas do sistema antioxidante .....	67
4.3.3. Perfil metabólico.....	69
4.4. DISCUSSÃO .....	76
4.5. CONCLUSÃO .....	80
4.6. REFERÊNCIAS.....	81
6. CONCLUSÃO GERAL.....	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

## CAPÍTULO I.

- Figura 1. Temperatura foliar ( $^{\circ}\text{C}$ ) de plantas de soja a  $25^{\circ}\text{C}$ , cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresses combinados (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 22
- Figura 2. Potencial hídrico foliar na antemanhã ( $\Psi_{\text{wam}}$ , A), potencial osmótico foliar ( $\Psi_{\text{sfoliar}}$ , B) e potencial osmótico radicular ( $\Psi_{\text{sradicular}}$ , C) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição do déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresses combinados (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 23
- Figura 3. Taxa fotossintética ( $A$ ; A) e eficiência instantânea de carboxilação ( $A/C_i$ ; B) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresses combinados (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 5$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 24
- Figura 4. Condutância estomática ( $g_s$ ; A, B), transpiração ( $E$ ; C, D), relação entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ; E, F) e eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ; G, H) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresses combinados (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 25
- Figura 5. Eficiência instantânea do uso da água ( $A/E$ ) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico

(DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT), por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 26

Figura 6. Fluorescência inicial ( $F_0$ ; A), rendimento quântico potencial ( $F_v/F_m$ ; B) e efetivo ( $Y_{II}$ ; C) do fotossistema II, coeficientes de dissipação fotoquímica ( $qP$ ; D), taxa de transporte de elétrons (ETR; E) e rendimento quântico de dissipação regulada ( $Y_{NPQ}$ ; F) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP (A e B) e ( $n = 5$ )  $\pm$  EP (C, D, E e F). Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 27

Figura 7. Relação entre a taxa aparente de transporte de elétrons e assimilação de  $CO_2$  ( $ETR/A$ ) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 5$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 28

Figura 8. Concentração da clorofila *a* (Cl*a*; A), clorofila *b* (Cl*b*; B), razão Cl*a*/Cl*b* (C), clorofila totais (Cl*t*; D), e carotenoides (Crt; E e F) em plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 29

Figura 9. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 30

Figura 10. Altura de planta (AP; A e B), diâmetro do caule (DC; C), número de folhas (NF; D), área foliar (AF; E), e volume radicular (VR; F) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP (A, B e E) e ( $n = 5$ )  $\pm$  EP (C, D e F). Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 31

Figura 11. Massa seca das folhas (MSF; A), caule (MSC; B), parte aérea (MSPA; C), raízes (MSR; D), total (MST; E) e razão entre massa seca de raiz/massa seca da parte aérea (MSR/MSPA; F) em plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP (D e F) e ( $n = 5$ )  $\pm$  EP (A, B, C, e E). Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 33

## CAPÍTULO II.

Figura 1. Alterações anatômicas foliares de plantas de soja, cultivares Desafio, 7011, 7209 e 7739, cultivadas por oito dias sob imposição dos tratamentos: controle (A-D), déficit hídrico (DH) (E-H), alta temperatura (AT) (I-L) e estresse combinado (DH + AT) (M-P). (AdEp) epiderme adaxial. (AbEp) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas pretas indicam colapso das células. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ . ..... 66

Figura 2. Espessura foliar total (LT, A), Epiderme adaxial (AdEp, B), Epiderme abaxial (AbEp, C), espessura dos parênquimas paliçádico (PP, D) parênquima esponjoso (SP, E) e espessura do mesofilo (MS, E), em plantas de soja cultivadas em condições ótimas (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT), por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 5$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 67

Figura 3. Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD, A), catalase (CAT, B), peroxidase do ascorbato (APX, C) e peroxidases totais (POX, D), em plantas de soja cultivadas em condições ótimas (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT), por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP (B, e D) e ( $n = 5$ )  $\pm$  EP (A e C). Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 68

Figura 4. Concentrações dos aminoácidos arginina (A), histidina (B), glicina (C), asparagina (D), glutamato (E), methionina (F), isoleucina (G), leucina (H), Tirosina (I) e triptofano (J) em plantas de soja cultivadas em condições ótimas (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 70

Figura 5. Concentrações dos aminoácidos lisina (A), serina (B), alanina (C), glutamina (D), treonina (E) e prolina (F) em plantas de soja cultivadas em condições ótimas (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 5$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 72

Figura 6. Concentrações de pentaeritritol (A), ribose (B), frutose (C), myo-inositol (D), e maltose (E) em plantas de soja cultivadas em condições ótimas (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 5$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 73

Figura 7. Concentrações de ácido málico (A), ácido aminobutírico (B), ácido cítrico (C), pinitol (D), glicose (E), D-(+)-Chiro-inositol (F) e sacarose (G) em plantas de soja cultivadas em condições ótimas (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 5$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ). ..... 75

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E UNIDADES

<i>A</i>	Taxa fotossintética	( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
<i>Cl a</i>	Clorofila <i>a</i>	( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )
<i>Cl b</i>	Clorofila <i>b</i>	( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )
<i>Crt</i>	Carotenoides	
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono	
<i>E</i>	Taxa transpiratória	( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
ETR	Taxa de transporte de elétrons	
$F_0$	Fluorescência inicial	
FSII	Fotossistema II	
$F_v/F_m$	Rendimento quântico potencial do fotossistema II	
$Y_{II}$	Rendimento quântico efetivo do fotossistema II	
qP	coeficiente de dissipação fotoquímica	
$g_s$	Condutância estomática	( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
SOD	Dismutase do superóxido	$\text{U min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$
CAT	Catalase	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$
APX	Peroxidase do ascorbato	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$
POX	Peroxidase	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$
$\Psi_w$	Potencial hídrico	MPa
$\Psi_{\text{sfoliar}}$	Potencial osmótico foliar	MPa
$\Psi_{\text{sradicular}}$	Potencial osmótico radicular	MPa
TLE	Taxa de liberação de eletrólitos	%
<i>ETR/A</i>	Relação entre taxa aparente de transporte de elétrons e assimilação de $\text{CO}_2$	
$Y_{\text{NPQ}}$	Rendimento quântico de dissipação regulada	
<i>A/Ci</i>	Eficiência instantânea de carboxilação	
<i>A/g<sub>s</sub></i>	Eficiência intrínseca do uso da água	
LT	Espessura foliar total	
AdEp	Epiderme adaxial	
AbEp	Epiderme abaxial	
PP	Parênquimas paliçádico	
SP	Parênquima esponjoso	
MS	Espessura do mesofilo	



## RESUMO GERAL

VITAL, ROBERTO GOMES. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, abril de 2019. **Mecanismos da tolerância ao déficit hídrico e à alta temperatura em cultivares de soja** Orientador: Dsc. Alan Carlos Costa. Coorientadores: Dsc<sup>a</sup>. Caroline Müller, Dsc. Adinan Alves Silva.

O aumento na frequência das instabilidades climáticas, como episódios de temperatura alta e déficit hídrico, podem limitar o crescimento, desenvolvimento e produtividade de diversas culturas, principalmente quando combinados. A soja é uma das culturas mais importantes no mundo e em contínua expansão no Brasil. Os efeitos de estresses combinados podem exacerbar a ocorrência de danos morfofisiológicos, bioquímicos e metabólicos, ocasionando a morte destas plantas. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho determinar alterações morfofisiológicas, bioquímicas e metabólicas que sejam indicadoras da dupla tolerância ao estresse combinado de déficit hídrico e temperatura elevada em cultivares de soja. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial, sendo quatro cultivares de soja: NS7209 IPRO (Nidera), NS7011 IPRO (Nidera), Desafio 8473 RSF (Brasmax Sementes) e 7739 M IPRO (Monsoy Sementes). E ainda, quatro condições de cultivo: controle (plantas a 100% da capacidade de campo (CC) e temperatura de 25°C), condição de déficit hídrico (DH-plantas a 40% CC e temperatura de 25°C), alta temperatura (AT-plantas a 100% da CC e temperatura de 40°C) e uma condição de estresses combinados (AT+DH-plantas a 40% CC e submetida a temperatura de 40°C). Foram realizadas avaliações das relações hídricas, temperatura foliar, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, biometria da parte aérea e raiz, concentração de pigmentos cloroplastídicos, da taxa de liberação de eletrólitos, da atividade de enzimas antioxidantes, aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos e anatomia foliar. De modo geral, o déficit hídrico afetou negativamente a fotossíntese e fluorescência da clorofila *a* de plantas de soja. No entanto, esse efeito foi

exacerbado quando imposto juntamente com a alta temperatura. Sob condição combinada de alta temperatura e déficit hídrico, as cultivares Desafio e 7739 demonstraram que o ajustamento osmótico foi um fator importante na manutenção dos processos fotossintéticos. O maior nível do aminoácido prolina e a maior atividade das enzimas APX e POX sugerem estratégia de tolerância ao estresse combinado. Os polióis pinitol e *D-chiro-inositol* também podem ter amenizado os danos oxidativos celulares nas plantas de soja sob estresse combinado.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Glycine max* (L.), limitação hídrica, mecanismos de tolerância, ondas de calor



## ABSTRACT

VITAL, ROBERTO GOMES. Goiano Federal Institute – Rio Verde Campus– GO, abril de 2019. **Tolerance mechanisms to water déficit and high temperature in soybean cultivars** Adviser: Dsc. Alan Carlos Costa. Co-adviser: Dsc<sup>a</sup>. Caroline Müller, Dsc. Adinan Alves Silva.

The increase in climatic instabilities frequency, such as high temperature and water deficit episodes, can limit the growth, development and productivity of several crops, especially when combined. Soy is one of the most important crops in the world and in continuous expansion in Brazil. The effects of combined stresses may exacerbate morphophysiological, biochemical and metabolic damages occurrence, causing the death of these plants. Therefore, the objective of this work was to determine morphological, biochemical and metabolic changes that are indicative of double tolerance to the combined stress of water deficit and high temperature in soybean cultivars. The experimental design was a randomized block, in a factorial scheme, with four soybean cultivars; NS7209 IPRO (Nidera), NS7011 IPRO (Nidera), Challenge 8473 RSF (Brasmax Seeds) and 7739 M IPRO (Monsoy Seeds), and four treatments: Control (well-100% field capacity (FC) 25 °C), WD (water deficit, 40% field capacity (FC), 25 °C), HT (100% FC, 40 °C) and WD-HT as a combined stresses (WD 40% FC, 40 °C). The water content, foliar temperature, gas exchange, chlorophyll a fluorescence, morphology, chloroplast pigment concentration, electrolyte release rate, antioxidant enzyme activity, amino acids, organic and sugar acids, and leaf anatomy, 8 days after the treatments imposition were evaluated. In general, the water deficit negatively affected the photosynthesis and chlorophyll a fluorescence variables in all cultivars. However, the negative effect was exacerbated when water and thermal stresses were imposed together. Under high temperature and water deficit combined condition,

cultivars Desafio and 7739 showed that the osmotic adjustment was an important factor in the photosynthetic processes maintenance. The increase in proline level and the higher activity of APX and POX enzymes suggest a strategy of double stress tolerance. Polyols such as pinitol and D-chiro-inositol may also have mitigated cellular oxidative damage in soybean plants under combined stress.

**KEY WORDS:** *Glycine max* (L.), water limitation, tolerance mechanisms, heat waves

## INTRODUÇÃO GERAL

O complexo soja (composto pela soja em grãos e seus derivados) representou 14,10 % de toda a exportação brasileira sendo o principal produto exportado em 2017, representando US\$ 30,69 bilhões (CONAB 2018). Os grãos da soja processados pela agroindústria são uma das principais fontes de proteína e óleo para alimentação humana e animal (Watanabe et al., 2018). Atualmente, o Brasil configura-se como o segundo maior produtor mundial com produção estimada de 113,5 milhões de toneladas na safra de 2018/2019 (CONAB, 2019), participando com cerca de 32,79% da produção mundial de soja em grão (USDA, 2019), atrás apenas dos Estados Unidos, cuja safra está estimada em 123,66 milhões de toneladas.

A manutenção da produtividade, assim como da qualidade das sementes e do rendimento de grãos é dependente das condições climáticas às quais as plantas estão expostas (St-marseille et al., 2019). Dentre as alterações ambientais que prejudicam o desenvolvimento da soja destacam-se as causadas por déficit hídrico e altas temperaturas, intensificadas nos últimos anos devido ao aquecimento global (Schauberger et al., 2019; Peña-gallardo et al., 2019; Djanaguiraman et al., 2019). Aumentos periódicos da temperatura em fases críticas de desenvolvimento da soja associados com menor precipitação têm sido relatados, principalmente na região Centro-Oeste do Brasil, uma das maiores produtoras de grãos de soja do país (Conab, 2019). Os aumentos mais drásticos na temperatura têm acontecido através da ocorrência de ondas de calor, em que a temperatura do ar supera as temperaturas registradas no histórico da região (Hatfield e Prueger, 2015), propiciando quedas bruscas na produtividade das culturas (Auffhammer e Schlenker, 2014; Hatfield, 2016). Neste cenário, a compreensão dos mecanismos utilizados pelas plantas para tolerar estresses combinados de déficit hídrico e térmico é crucial para identificar cultivares de soja com dupla tolerância, e conseqüentemente, diminuir as perdas de produtividade da cultura.

As plantas respondem aos estresses térmico e por déficit hídrico por meio de ajustes fisiológicos, metabólicos e morfológicos para se adaptarem as condições impostas. O controle estomático (Haworth et al., 2018), a eficiência do uso da água (EUA) e o ajustamento osmótico são exemplos de ajustes importantes na manutenção do turgor celular e crescimento das plantas (Blum, 2016). Diversos estudos têm evidenciado mecanismos que atuam na redução da perda de água em plantas, dentre

estes, destacam-se a atuação do ABA no aumento do controle estomático (Kuromori et al., 2018) e o ajustamento osmótico através do aumento na concentração de solutos como, açúcares, glicerol, prolina, glicina betaína, açúcares álcoois, dentre outros (Hatzig et al., 2014; Harsh et al., 2016). O aminoácido prolina, por exemplo, pode dobrar sua concentração em resposta ao déficit hídrico e permitir a tolerância ao estresse não somente por ajustes osmóticos, mas também por atuar como protetor das membranas celulares. (Delatorre-herrera et al., 2010; Silvente et al., 2012). Hossain et al. (2015), analisando genótipos de soja tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico observaram aumento significativo de prolina nas folhas e raízes das cultivares, em adição a raízes mais longas no genótipo tolerante. Por outro lado, em condições de altas temperaturas, a prolina tem sido descrita como tóxica (Wei-tao et al., 2011), favorecendo o acúmulo de açúcares, como sacarose como componente do ajustamento osmótico em situação combinada de alta temperatura e déficit hídrico (Rizhsky et al., 2004).

Além dos mecanismos associados a manutenção do turgor celular, a capacidade de manter a performance fotossintética também é uma característica desejável para a caracterização de cultivares de soja tolerantes aos estresses térmico e por déficit hídrico combinado. A disponibilidade de água no solo é geralmente reduzida à medida que aumenta a temperatura e, a capacidade da planta reduzir a perda de água a um mínimo é crucial para a sua sobrevivência (Hatfield, 2016). Nestas condições, o fechamento estomático é uma resposta que antecede qualquer comprometimento bioquímico da fotossíntese, particularmente por reduzir a fixação de CO<sub>2</sub>, no ciclo de Calvin (Siddiqui et al., 2015). No entanto, em função do estresse térmico maiores alterações na fixação de CO<sub>2</sub> pode ocorrer em virtude da redução na solubilidade de CO<sub>2</sub> o que favorece a fixação de O<sub>2</sub> e a fotorrespiração (Sicher, 2015). Adicionalmente, a permeabilidade das membranas dos tilacoides é aumentada com a temperatura, desestabilizando a cadeia transportadora de elétrons (Bokszczanin et al., 2013) e as estruturas dos complexos proteicos, além de comprometer o gradiente de íons necessários para a fotossíntese (Kalaji et al., 2016). O desbalanço energético promove, ainda, aumento da produção de compostos oxidantes causando danos em lipídeos e proteínas das membranas (Niu e Xiang, 2018). Plantas tolerantes a estas condições podem induzir a termoestabilidade das membranas, relacionada como a manutenção dos níveis ácidos graxos e, por consequência, redução do extravasamento de eletrólitos (Larkindale e Huang, 2004).

As plantas tolerantes aos estresses hídrico e térmico combinados ativam, ainda, mecanismos enzimáticos na proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROs), constituindo o sistema de defesa antioxidante. O mecanismo enzimático é constituído de enzimas importantes na rota de detoxificação de EROS, tais como a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX) e as peroxidases (POD) (Hasanuzzaman et al., 2013). Existem várias evidências da importância de um sistema antioxidativo na tolerância das plantas aos estresses térmico e hídrico (Koffler et al., 2014; Nahar et al., 2015). O aumento da concentração de EROS atua diretamente no processo de peroxidação lipídica que resulta no dano celular e no aumento do extravasamento de eletrólitos (Dallagnol et al. 2011). Mirzai et al., (2013), por exemplo, trabalhando com duas variedades de canola expostas ao déficit hídrico, observaram aumentos nas atividades das enzimas SOD, POD, CAT e APX na cultivar tolerante. Em condições de alta temperatura (38°C), Zhao et al. (2015) observaram que em capim-de-pé-de-galinha também aumentaram a expressão das enzimas SOD, CAT e POD conferindo tolerância ao calor.

Neste contexto, é evidente que os estresses térmico e hídrico combinados podem provocar perturbações nas características das plantas, retardando o crescimento e desenvolvimento e, conseqüentemente, afetando a produtividade (Gerganova et al., 2016). No ambiente natural, estes estresses podem ocorrer simultaneamente e, até o momento, são escassas as informações na literatura sobre as alterações nos processos fisiológicos, bioquímicos, morfológicos, metabólicos em plantas expostas aos estresses combinados. Portanto, são prementes os estudos relacionados à ocorrência dos estresses térmico e déficit hídrico combinados, que permitam a identificação de mecanismos associados à dupla tolerância em plantas de soja, possibilitando a seleção de cultivares tolerantes e um planejamento mais adequado do plantio da soja em regiões propensas a ocorrer tais eventos. Além disso, esse estudo pode gerar informações as quais poderão ser utilizadas em programas de melhoramento genético da soja.

## REFERÊNCIAS

AUFFHAMMER, M., SCHLENKER, W. Empirical studies on agricultural impacts and adaptation. **Energy Economics**, v. 46, p. 555-561, 2014

BLUM, A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant, Cell and Environmental**, p. 1-7, 2016.

BOKSZCZANIN, K. L., FRAGKOSTEFANAKIS, S., BOSTAN, H., BOVY, A., CHATURVEDI, P., CHIUSANO, M. L., LI, H. Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 315, 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Perspectivas para a agropecuária safra 2018/2019**, Brasília, v.6, n.9, p.1-104, 2018.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra brasileira. Grãos - Safra 2018/19**, Brasília, v.6, n.6, p.1-69, 2019.

CHEN, K., CHEN, L., FAN, J., FU, J. Alleviation of heat damage to photosystem II by nitric oxide in fall fescue. **Photosynthesis research**, v.116, p.21-31, 2013.

DALLAGNOL LJ, RODRIGUES FA, DAMATTA FM, MIELLI MVB, PEREIRA SC. Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice-Bipolaris oryzae interaction. **Phytopathology** 101:92-104, 2011.

DELATORRE-HERRERA, J., DELFINO, I., SALINAS, C., SILVA, H.; CARDEMIL, L. Irrigation restriction effects on water use efficiency and osmotic adjustment in Aloe Vera plants (*Aloe barbadensis* Miller). **Agricultural Water Management**, v.97, p. 1564-1570, 2010.

DJANAGUIRAMAN, M., SCHAPAUGH, W., FRITSCHI, F., NGUYEN, H., PRASAD, P.V.V. Reproductive success of soybean (*Glycine max* L. Merril) cultivars and exotic lines under high daytime temperature. **Plant, Cell and Environmental**, v.42, p.321-336, 2019.

FAROUK, S., ARAFA, S. A. A. Mitigation of salinity stress in canola plants by sodium nitroprusside application. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 3, p. 0802, 2018.

GERGANOVA, M., POPOVA, A. V. STANOEVA, D., VELITCHKOVA, M. Tomato plants acclimate better to elevated temperature and high light than to treatment with each factor separately. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 104, p. 234-241, 2016.

HARSH, A., SHARMA, Y. K., JOSHI, U., RAMPURIA, S., SINGH, G., KUMAR, S., SHARMA, R. Effect of short-term heat stress on total sugars, proline and some antioxidant enzymes in moth bean (*Vigna aconitifolia*). **Annals of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 1, p. 57-64, 2016.

HATFIELD, J. L. Increased temperatures have dramatic effects on growth and grain yield of three maize hybrids. **Agricultural & Environmental Letters**, v. 1, n. 1, 2016.

HATFIELD, J. L., PRUEGER, J. H. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. **Weather and climate extremes**, v. 10, p. 4-10, 2015.

HATZIG, S., ZAHARIA, L. I., ABRAMS, S., HOHMANN, M., LEGOAHEC, L., BOUCHEREAU, A., SNOWDON, R. J. Early osmotic adjustment responses in drought-resistant and drought-sensitive oilseed rape. *Journal of integrative plant biology*, v. 56, n. 8, p. 797-809, 2014.

HAWORTH, M., MARINO, G., BRUNETTI, C., KILLI, D., DE CARLO, A., CENTRITTO, M. The Impact of Heat Stress and Water Deficit on the Photosynthetic and Stomatal Physiology of Olive (*Olea europaea* L.) — A Case Study of the 2017 Heat Wave. **Plants**, v. 7, n. 4, p. 76, 2018

HOSSAIN, M. M., LAM, M. D., ZHANG, J. Responses in gas exchange and water status between drought-tolerant and -susceptible soybean genotypes with ABA application. **The Crop Journals**, v.3, p. 500-506, 2015.

HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., ALAM, M.M., FUJITA, M. Exogenous nitric oxide alleviates high temperature induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by modulating the antioxidant defense and glyoxalase system. **Australian Journal of Crop Science**, v.6, p.1314-1323, 2012.

HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., ALAM, M.M., ROYCHOWDHURY, R., FUJITA M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.9643–9684, 2013.

HASANUZZAMAN, M., HOSSAIN, M. A., FUJITA, M. Nitric oxide modulates antioxidant defense and the methylglyoxal detoxification system and reduces salinity-induced damage of wheat seedlings. *Plant Biotechnology Reports*, v. 5, n. 4, p. 353, 2011

KALAJI, H. M., JAJOO, A., OUKARROUM, A., BRESTIC, M., ZIVCAK, M., SAMBORSKA, I. A., LADLE, R. J. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta physiologiae plantarum**, v. 38, n. 4, p. 102, 2016.

KOFFLER B. E., LUSCHIN-EBENGREUTH N., STABENTHEINER E., MÜLLER M., ZECHMANN B. Compartment specific response of antioxidants to drought stress in *Arabidopsis*. **Plant Science**, 227, 133–144, 2014.

KUROMORI, T., SEO, M., SHINOZAKI, K. ABA transport and plant water stress responses. **Trends in plant science**, 2018.

LARKINDALE J., HUANG B. Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. **Journal Plant Physiology**, v. 161, p. 405–413, 2004.

MISSÃO, M. R. SOJA: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais**, v. 3, n.1 - p.7-15, 2006.

MIRZAI, M., MOEINI, A., GHANATI, F. Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 15, p.593-602 .2013.

NAHAR, K.; HASANUZZAMAN, M.; ALAM, M.; FUJITA, M. Glutathione-induced drought stress tolerance in mung bean: coordinated roles of the antioxidant defence and methylglyoxal detoxification systems. **AOB Plants**, p. 1-18, 2015.

NIU, Y., XIANG, Y. An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 915, 2018.

PEÑA-GALLARDO, M., VICENTE-SERRANO S.M., QUIRINGB, SVOBODAC, S., HANNAFORDD, M. J., HANNAFORDD, M., MARTÍN-HERNÁNDEZA, N., DOMÍNGUEZ-CASTRO F., EL KENAWY. Response of crop yield to different time-scales of drought in the United States: Spatio-temporal patterns and climatic and environmental driver. **Agricultural and Forst Meteoroly**, v.264, p.40-55, 2019.

RIZHSKY, L., LIANG, H. J., SHUMAN, J., SHULAEV, V., DAVLETOVA, S., MITTLER, R. When defense pathways collide: the response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1683–1696, 2004.

SCHAUBERGER, B., ROLINSKI, S., SCHAPHOFF, S., MULLER, C. Global historical soybean and wheat yield loss estimates from ozone pollution considering water and temperature as modifying effects. **Agricultural and Forest Meteorology**, v.265, p.1-15, 2019.

SICHER, R.C. Temperature shift experiments suggest that metabolic impairment and enhanced rates of photorespiration decrease organic acid levels in soybean leaflets exposed to supra-optimal growth temperatures. **Metabolites**, v.5, p. 443-454, 2015.

SIDDIQUI, M. H.; MUTAHHAR Y., AL-KHAISHANY A., MOHAMMED, A., AL-QUTAMI, A.; MOHAMED H., WHAIBI, A., GROVER, A., HAYSSAM, M., MONA, S., AL-WAHIBI, A., BUKHARI, N. A. Response of different genotypes of Faba Bean plant to drought stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 10214-10227, 2015.

SIDDIQUI, M.H., ALAMRI, S.A., AL-KHAISHANY, Y.Y., AL-QUTAMI, M.A., ALI, H.M., KHAN, M.N. Sodium nitroprusside and indole acetic acid improve the tolerance of tomato plants to heat stress by protecting against DNA damage. **Journal of Plant Interactions**, v.12, p.177-186, 2017.

SILVENTE, S., SOBOLEV, A. P., LARA, M. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. **Plos one**, v. 7, p. 1-11, 2012.



ST-MARSEILLE, A., BOURGEOIS, G., BRODEUR, J., MIMÉE, B. Simulating the impacts of climate change on soybean cyst nematode and the distribution of soybean. **Agricultural and Forest Meteorology**, v.364, p.178-187, 2019.

USDA. PSD Online – Word Agricultural production Online Database. United States Department of Agriculture. Disponível em: [apps.fas.usda.gov/PSDOnline/Circulars/2019/03/production.pdf](https://apps.fas.usda.gov/PSDOnline/Circulars/2019/03/production.pdf) Acesso em 26 de março de 2019.

WATANABE, D., LOŠÁK, T., VOLLMANN, J. From proteomics to ionomics: soybean genetic improvement For better food safety. **Genetika**, v.50, n.1, p.333-350, 2018.

WEI-TAO, L.V., LIN, B., HUA, X.J. Proline Accumulation is inhibitory to Arabidopsis seedlings during heat stress. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1921-1933, 2011.

ZHAO, X., HUANG, L., ZHANG, X., LI, Z., PENG, Y. Effects of heat acclimation on photosynthesis, antioxidant enzyme activities, and gene expression in orchardgrass under heat stress. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13564-13576, 2014.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Determinar alterações morfofisiológicas, bioquímicas e metabólicas que sejam indicadoras da dupla tolerância ao estresse combinado de déficit hídrico e temperatura elevada em cultivares de soja.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito do estresse combinado por alta temperatura e déficit hídrico nas relações hídricas.
2. Avaliar o efeito do estresse combinado por alta temperatura e déficit hídrico nas características de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, pigmentos cloroplastídicos.
3. Determinar a atividade de enzimas do sistema antioxidante de cultivares de soja submetidas aos estresses combinados de alta temperatura e déficit hídrico.
4. Determinar o ajustamento metabólico de cultivares de soja aos estresses combinado por altas temperaturas e déficit hídrico.
5. Avaliar alterações nos parâmetros morfológicos de cultivares de soja submetidas aos estresses combinados por alta temperatura e déficit hídrico.
6. Quantificar alterações na anatomia foliar de cultivares de soja submetidas aos estresses combinados de alta temperatura e déficit hídrico.
7. Determinar indicadores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e metabólicos em plantas de soja da tolerância aos estresses combinados de alta temperatura e déficit hídrico.
8. Determinar níveis de tolerância de cultivares comerciais de soja expostas aos estresses combinados de alta temperatura e déficit hídrico.

### 3. CAPÍTULO I

## **CARACTERÍSTICAS FOTOSSINTÉTICAS INDICADORAS DE TOLERÂNCIA AOS ESTRESSES COMBINADOS POR DÉFICIT HÍDRICO E ALTA TEMPERATURA EM CULTIVARES DE SOJA**

## RESUMO

Condições de seca combinadas com temperatura alta têm comprometido o desenvolvimento e rendimento de culturas de importância mundial, como a soja. Os efeitos combinados desses estresses podem exacerbar a ocorrência de danos no metabolismo vegetal, resultando em perdas na produtividade e, até mesmo, a morte destas plantas. Sendo assim, objetivou-se neste estudo identificar características fotossintéticas indicadoras de tolerância diferencial de cultivares de soja aos estresses combinados por alta temperatura e déficit hídrico. Foram avaliadas quatro cultivares comerciais de soja: NS7209 IPRO (Nidera), NS7011 IPRO (Nidera), Desafio 8473 RSF (Brasmax Sementes) e 7739 M IPRO (Monsoy Sementes), expostas a quatro condições de cultivo; Controle (plantas a 100% da CC, 25°C), déficit hídrico (plantas a 40% da CC, 25°C), alta temperatura (AT, plantas a 100% CC, 40°C) e os estresses combinados (plantas a 40% da CC; 40°C).. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento e os tratamentos impostos quando alcançaram o estágio de desenvolvimento V3 (terceira folha trifoliolada aberta). Oito dias após a imposição dos tratamentos foram realizadas avaliações dos potenciais hídrico e osmótico, trocas gasosas, fluorescência da clorofila  $a$ , pigmentos fotossintéticos, taxa de liberação de eletrólitos e análises biométricas. As condições de estresse afetaram diferencialmente as cultivares avaliadas, intensificando os danos quando ambos os estresses déficit hídrico e alta temperatura foram aplicados combinados. Sob condição combinada de alta temperatura e déficit hídrico, as cultivares Desafio e 7739 apresentaram maior tolerância morfofisiológica ao estresse, enquanto as cultivares 7011 e 7209, maior sensibilidade. Na condição combinada as cultivares Desafio e 7739 demonstraram que o ajustamento osmótico foi um fator importante na manutenção dos processos fotossintéticos, com potencial para ser caracterizado como um mecanismo de dupla tolerância ao déficit hídrico e à alta temperatura em plantas de soja.

**Palavras-chaves:** adaptação fisiológica, *Glycine max* L., ondas de calor, seca.

## ABSTRACT

Drought conditions combined with high temperatures have compromised the development and yield of economically important crops, such as soybeans. The combined effects of these stresses may exacerbate the damage occurrence to plant metabolism, resulting in productivity losses and even plant death. Thus, the objective of this study was to identify photosynthetic characteristics indicative of the differential tolerance of soybean cultivars submitted to high temperature and water deficit combined. Four commercial soybean cultivars were evaluated: NS7209 IPRO (Nidera), NS7011 IPRO (Nidera), Challenge 8473 RSF (Brasmax Sementes) and 7739 M IPRO (Monsoy Seeds), exposed to four cultivation conditions: Control (100% of field capacity, 25 °C), WD (40% of field capacity, 25 °C), high temperature (HT, 100% of field capacity, 40 °C) and the combined stresses (40% of field capacity, 40 °C). The plants were grown in a growth chamber and the treatments were imposed in the V3-development leaves stage. After eight days, water and osmotic potentials, gas exchange, chlorophyll a fluorescence, photosynthetic pigments, electrolyte release rate and biometric analysis were performed. The stress conditions differentially affected the cultivars, intensifying the damages when both water deficit and high temperature were applied combined. Under the combined condition, the cultivars Desafio and 7739 showed higher morphophysiological tolerance to stresses, and the cultivars 7011 and 7209, higher sensitivity. In his condition, the cultivars Desafio and 7739 demonstrated that the osmotic adjustment was an important factor in the maintenance of photosynthetic processes, with potential to be characterized as a mechanism of double tolerance to water deficit and high temperature in soybean plants.

**Keywords:** physiological adaptation, *Glycine max* L., heat waves, dry.

### 3.1. INTRODUÇÃO

Estresses abióticos podem afetar negativamente o crescimento e o desenvolvimento das culturas (Kollist et al., 2018). As plantas respondem a estas condições ambientais através de modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (Siddiqui et al., 2015; Zhou et al., 2015; Natali et al., 2018; Qaseem et al., 2018). A fim de entender quais processos metabólicos são modificados e mecanismos de defesa são ativados, diversos estudos têm se concentrado nas respostas de plantas cultivadas a um único fator de estresse. No entanto, no campo, as culturas estão frequentemente sujeitas à combinação de fatores adversos (Qaseem et al., 2018). Entre os estresses abióticos, a seca e a temperatura alta são duas ameaças iminentes para a expansão das culturas e agricultura sustentável em todo o mundo. Ressalta-se que, atualmente, são ainda incipientes os trabalhos relacionados com mecanismos de tolerância aos efeitos sinérgicos entre o estresse térmico por calor e o déficit hídrico em cultivares de soja.

Plantas tolerantes à seca podem não ser, necessariamente, tolerantes ao estresse térmico por altas temperaturas, de modo que o oposto também pode ocorrer (Jagadish et al., 2011; Feller, 2016), bem como a exacerbação dos danos provocado pelos estresses combinados (Pradhan et al., 2012; Elferjani e Soolanayakanahally, 2018). Por exemplo, Nankishore e Farrell (2016) reportaram reduções na condutância estomática e no teor de pigmentos cloroplastídicos em tomateiro exposto aos estresses térmico e seca combinados. Enquanto nos tomateiros expostos apenas ao tratamento térmico, os mesmos parâmetros permaneceram semelhantes aos das plantas controle.

As plantas lidam com os estresses por seca e alta temperatura por meio de ajustes fisiológicos e morfológicos, para se adaptarem às condições impostas. A melhoria na eficiência do uso da água e o ajustamento osmótico são exemplos de respostas importantes na manutenção do turgor celular e crescimento das plantas (Blum, 2016). A eficiência do uso da água é definida como a produção de matéria seca vegetal (biomassa), pela quantidade de água transpirada (Wei et al., 2017). Assim, plantas que têm maior eficiência no uso da água demonstram um fechamento parcial dos estômatos, de modo que a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) seja suficiente para a máxima taxa fotossintética, enquanto a perda de água pela transpiração é significativamente reduzida (Li et al., 2017). Adicionalmente, plantas tolerantes a seca e ao calor podem demonstrar maior estabilidade das membranas celulares, relacionada com a manutenção dos níveis

de ácidos graxos e, por consequência, redução do extravasamento de eletrólitos (Niu e Xiang, 2018) A transpiração via estômatos, também pode desempenhar um papel decisivo na refrigeração das mesmas, sendo uma alternativa para tolerar ambientes mais quentes e secos (Zhou et al., 2015; Feller, 2016).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das plantas mais cultivadas no mundo, e representa parcela significativa das exportações brasileiras (Morando et al., 2014). A expansão no cultivo da soja está relacionada com a demanda mundial por alimentos, tanto para alimentação animal, quanto humana (Artuzo et al., 2018). Estudos já descreveram as respostas fisiológicas e de crescimento da soja à seca e o estresse térmico, aplicados individualmente. Mohamed e Latif (2017), observaram reduções no comprimento e na massa seca da parte aérea e da raiz, nos pigmentos fotossintéticos e no teor relativo de água de genótipos de soja expostos ao déficit hídrico. A alta temperatura, por sua vez, promoveu decréscimos nas taxas fotossintéticas, concentração de carboidratos e na massa seca de folhas de plantas de soja, após três dias de exposição ao estresse (Siebers et al., 2015).

O potencial produtivo da soja também é bastante afetado pelas alterações nas condições climáticas, particularmente as causadas pelo déficit hídrico e o aumento da temperatura (Valdés-López et al., 2016; Shaheen et al., 2016). Esses fatores de estresse ambientais afetam negativamente o processo fotossintético e, conseqüentemente reduzem a produtividade da planta. A queda do potencial hídrico foliar desencadeada pela seca, de modo geral, promove o fechamento estomático com decréscimo na assimilação de CO<sub>2</sub> (Iahive et al., 2018). Adicionalmente, altas temperaturas associadas ao déficit hídrico limitam diversos outros processos metabólicos nas plantas, tais como a germinação de sementes e o crescimento, a eficiência respiratória (Siebers et al., 2015), a estabilidade de proteínas (Hasanuzzaman et al., 2013) e, conseqüentemente, a produtividade vegetal. De fato, perdas consideráveis na produção de grãos de até 54% já foram registradas em decorrência do período de veranico (Siebers et al., 2015), quando seca e calor ocorrem concomitantemente no ambiente. Ponderando que os modelos climáticos preveem aumento da ocorrência de altas temperaturas e de eventos de seca, é importante a elucidação dos mecanismos de tolerância da soja em relação aos fenômenos climáticos extremos, garantindo assim, melhor produtividade da cultura.

No contexto apresentado, fica evidente que os estresses térmico e hídrico combinados podem provocar perturbações no metabolismo vegetal, com prejuízos aos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução (Pradhan et al., 2012;

Gerganova et al., 2016). Portanto, é premente a identificação de mecanismos associados à dupla tolerância em plantas de soja, possibilitando melhor planejamento do plantio de genótipos mais resistentes à seca e alta temperatura, nas regiões propensas a ocorrer tais estresses ambientais. Diante do exposto, trabalharam-se com as seguintes hipóteses, (I) plantas de soja têm maior tolerância aos estresses por déficit hídrico e alta temperatura impostos de forma isolada, do que de forma combinada; (II) cultivares de soja possuem tolerância diferencial aos estresses por déficit hídrico e alta temperatura combinados. Assim, objetivou-se neste estudo identificar características fotossintéticas indicadoras de tolerância diferencial de cultivares de soja aos estresses combinados por alta temperatura e déficit hídrico.

## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1. Material vegetal e condições experimentais**

O experimento foi conduzido em câmara climatizada de crescimento de plantas (Instalafrio, Pinhais, PR, Brasil), com umidade relativa de ~65%, irradiância de ~650  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde. As plantas de *Glicine max* (L.) Merrill, cultivares NS7209 IPRO (Nidera), NS7011 IPRO (Nidera), Desafio 8473 RSF (Brasmax Sementes) e 7739 M IPRO (Monsoy Sementes), foram cultivadas em vasos de polietileno contendo 8 Kg de solo Latossolo Vermelho distroférico misturado com areia na proporção de 2:1. A correção do substrato foi realizada com calcário dolomítico PNRT 100, para 60% da saturação da base, a partir da análise físico-química do substrato, e a adubação realizada conforme recomendação para a cultura (Sousa e Lobato, 1996). Foram cultivadas duas plantas por vaso.

Para obtenção dos dados foram utilizados dois lotes de plantas (40 plantas em cada lote). O primeiro lote foi submetido a temperatura de 25°C/20°C (dia/noite), com fotoperíodo de 12 horas e submetidas as duas tensões hídricas, sendo: 100 e 40% da capacidade de campo (CC), no estágio de desenvolvimento vegetativo V3 (terceira folha trifoliolada aberta). O controle de água de solo foi mantido pelo método gravimétrico. Nesse lote, duas condições foram caracterizadas: controle (plantas a 100% da capacidade de campo e com temperatura de 25°C) e a condição de déficit hídrico-DH (plantas a 40% da capacidade de campo e com temperatura de 25°C). O segundo lote se diferiu do primeiro pela aplicação da alta temperatura, as plantas foram mantidas à



25°C/20°C, com o fotoperíodo de 12 horas até o desenvolvimento V3. Neste momento foram impostos o déficit hídrico de 40% CC, e o estresse térmico mediante o aumento gradual da temperatura ambiente, a partir das 9h até atingir 40±0,5°C às 12h, condição mantida por cinco horas. Após esse período, ocorreu uma redução gradual da temperatura até retornar ao valor de 20°C às 19h, permanecendo assim até novo ciclo no dia seguinte. Assim, outras duas condições foram caracterizadas: alta temperatura-AT (plantas a 100% da capacidade de campo e expostas a 40°C) e a condição de estresses combinados-AT+DH (plantas a 40% da capacidade de campo e submetidas a 40°C). Em ambos os lotes, os tratamentos foram impostos por oito dias. Ao final desse período, foram realizadas as avaliações descritas a seguir.

### **3.2.2. Avaliações**

#### **3.2.2.1. Temperatura foliar**

A temperatura foliar das plantas de soja foi avaliada às 9h, com a câmara a 25°C. Foi utilizado para a determinação da temperatura foliar um termômetro por infravermelho digital (Instrutherm, Modelo TI-920, São Paulo – SP, Brasil), à aproximadamente uma distância de 15 cm do limbo foliar.

#### **3.2.2.2. Relações hídricas**

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_{am}$ ) foi mensurado na antemanhã usando uma bomba de pressão do tipo Scholander (Modelo 3005-1412, Soilmoisture Equipment Corp., Goleta, CA, USA). O potencial osmótico foliar ( $\Psi_s$ ) e radicular ( $\Psi_{sradicular}$ ) foi determinado utilizando um osmômetro de pressão de vapor (VAPRO 5600), conforme Pask et al. (2012). Os valores de potencial osmótico foram calculados a partir da equação de Van't Hoff:  $\Psi_s = -R \times T \times Cs$ , em que R é a constante universal dos gases (0,08205 L atm mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>), T é a temperatura em °K ( $T \text{ °K} = T \text{ °C} + 273$ ) e Cs a concentração do soluto (M), normalmente expressos em atmosferas, e convertidos em MPa (0,987 ≈ 1 atm = 0,1 MPa).

#### **3.2.2.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a***

As trocas gasosas das plantas foram mensuradas para estimar as variáveis de taxa fotossintética ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), taxa transpiratória ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e a relação entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ), em folhas completamente expandidas no terço médio da planta. A partir desses dados foi possível calcular a eficiência do uso da água ( $EUA = A/E$ ), a eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ) e a eficiência instantânea de carboxilação; ( $A/C_i$ ) (Machado et al., 2005). As medições foram realizadas utilizando analisador de gases ao infravermelho (LI-6400XTR, Licor<sup>®</sup>, Lincoln, Nebraska, EUA), utilizando radiação fotossinteticamente ativa ( $PAR$ ) constante ( $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração atmosf\u00e9rica de  $\text{CO}_2$  ( $C_a$ ) ( $\sim 430 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ), temperatura ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) e umidade ( $\sim 65\%$ ) ambientes. A partir da avalia\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia da clorofila  $a$ , foram obtidos a fluoresc\u00eancia inicial ( $F_0$ ), os rendimentos qu\u00e2nticos potencial ( $F_v/F_m$ ) e efetivo de convers\u00e3o fotoqu\u00edmica do fotossistema II (FSII) ( $Y_{II}$ ), coeficiente de dissipa\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica ( $qP$ ), taxa de transporte de el\u00e9trons ( $ETR$ ) e rendimento qu\u00e2ntico de dissipa\u00e7\u00e3o regulada ( $Y_{NPQ}$ ). Foi calculado a rela\u00e7\u00e3o entre a taxa aparente de transporte de el\u00e9trons e assimila\u00e7\u00e3o de  $\text{CO}_2$  ( $ETR/A$ ).

#### 3.2.2.4. Concentra\u00e7\u00e3o de pigmentos cloroplast\u00eddicos

A concentra\u00e7\u00e3o de pigmentos cloroplast\u00eddicos foi determinada por meio da extra\u00e7\u00e3o com dimetilsulf\u00f3xido (DMSO) saturado com carbonato de c\u00e1lcio, mediante ajustes da metodologia descrita por Ronen e Galun (1984). Discos foliares ( $5 \text{ mm}^2$ ) foram incubados em 5 mL da solu\u00e7\u00e3o de DMSO a  $65^\circ\text{C}$  por 24 horas. Ap\u00f3s atingirem a temperatura ambiente, as amostras foram lidas a 665,1, 649,1 e 480,0 nm em espectrofot\u00f4metro UV-VIS (Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA). O conte\u00fado de clorofilas  $a$  ( $Ca = 12,47.A_{665,1} - 3,62.A_{649,1}$ ),  $b$  ( $Cb = 25,06.A_{649,1} - 6,50.A_{665,1}$ ) e carotenoides totais [ $\text{Carot} = (1000A_{480} - 1,29Ca - 53,78Cb)/220$ ] foram calculados de acordo com Wellburn, (1994). A concentra\u00e7\u00e3o de pigmentos foi expressa em  $\mu\text{g cm}^2$ . As folhas foram coletadas entre 08h e 10h.

#### 3.2.2.5. Taxa de libera\u00e7\u00e3o de eletr\u00f3litos (TLE)

A permeabilidade da membrana foi avaliada em discos foliares ( $1,96 \text{ cm}^2$ ) pela taxa de liberação de eletrólitos (TLE), obtida com o auxílio de um condutivímetro digital portátil (CD-850, Instruthern, São Paulo, Brasil), de acordo com a metodologia descrita por Vasquez-Tello et al. (1990) e Pimentel et al. (2002). Inicialmente os discos foliares foram imersos em 30 mL de água deionizada em frascos de vidro âmbar e mantidos em repouso. Após 24 h, a condutividade livre da solução (CL,  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) foi mensurada. Posteriormente, os frascos foram colocados em estufa a  $100^\circ\text{C}$  por 1 hora para obtenção da condutividade total (CT,  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) da solução. A TLE foi calculada com a seguinte fórmula:  $\text{TLE (\%)} = [(\text{CL}/\text{CT}) \times 100]$ . A coleta dos discos foliares foi realizada às 08h.

#### **3.2.2.6. Análises biométricas**

As plantas foram mensuradas para a determinação das seguintes variáveis biométricas: altura da planta (AP, m), diâmetro do caule (DC, mm), número de folhas (NF), área foliar (AF,  $\text{m}^2$ ) e volume radicular (ml). Para a medição da altura de plantas foi utilizada uma régua graduada; o diâmetro de caule foi obtido utilizando paquímetro digital; para o cálculo da área foliar foi utilizado o software ImageJ e o volume radicular foi mensurado pelo deslocamento da coluna d'água em uma proveta, após a imersão do sistema radicular.

Folhas, caules e raízes foram acondicionados em sacos de papel e levados a estufa de circulação forçada de ar ( $65^\circ\text{C}$ ), até peso constante para obtenção da massa seca das folhas (MSF, g) e massa seca dos caules (MSC, g), massa seca das raízes (MSR). Foi calculada a massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST) e razão entre massa seca de raiz/massa seca da parte aérea (MSR/MSPA). As coletas foram realizadas entre 12 e 16 horas.

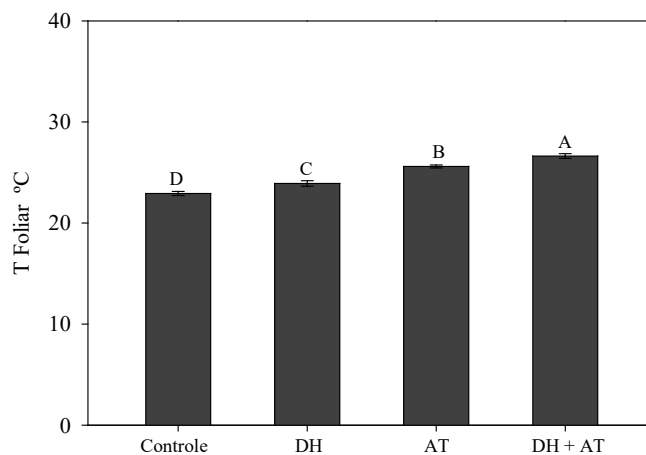
#### **3.2.3. Análise estatística**

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com 5 repetições, em esquema fatorial, sendo quatro cultivares de soja e quatro condições de cultivo. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey ( $p > 0,05$ ) por meio do software estatístico SISVAR.

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Temperatura foliar

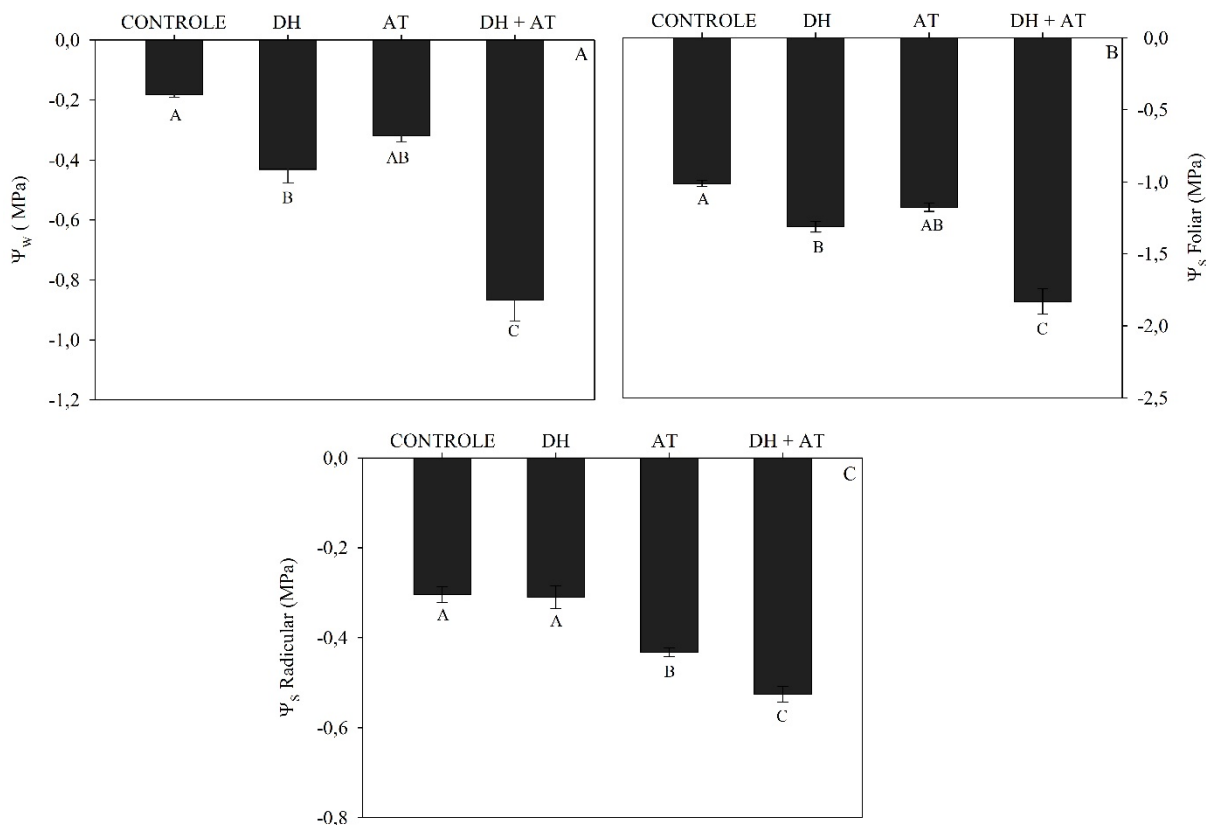
A temperatura foliar diferiu somente entre as condições de cultivo (Fig. 1). Acréscimos foram registrados em todas as condições de estresse, com incremento de 3,71°C na condição combinada de DH+AT, em relação ao controle.



**Figura 1.** Temperatura foliar (°C) de plantas de soja a 25°C, cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresses combinados (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

#### 3.3.2. Relações hídricas

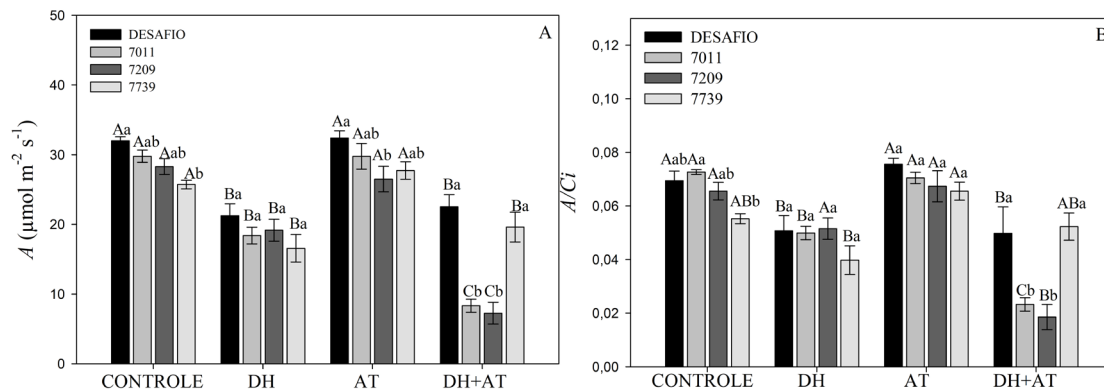
Os valores de potencial hídrico foliar de antemanhã ( $\Psi_{wam}$ ), potencial osmótico foliar ( $\Psi_{sfoliar}$ ) e potencial osmótico radicular ( $\Psi_{sradicular}$ ) diferiram apenas em função das condições de crescimento (Fig. 2). Menores valores de  $\Psi_{wam}$  e  $\Psi_{sfoliar}$  foram obtidos nas plantas sob condição de DH+AT (Fig. 2A e B). O  $\Psi_{sradicular}$  foi menor nas plantas expostas a condição de estresse combinado seguidas das plantas submetidas ao estresse térmico, conforme observado na Fig. 2C.



**Figura 2.** Potencial hídrico foliar na antemanhã ( $\Psi_{wam}$ , A), ypotencial osmótico foliar ( $\Psi_{sfoliar}$ , B) e potencial osmótico radicular ( $\Psi_{sradicular}$ , C) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição do déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresses combinados (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

### 3.3.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

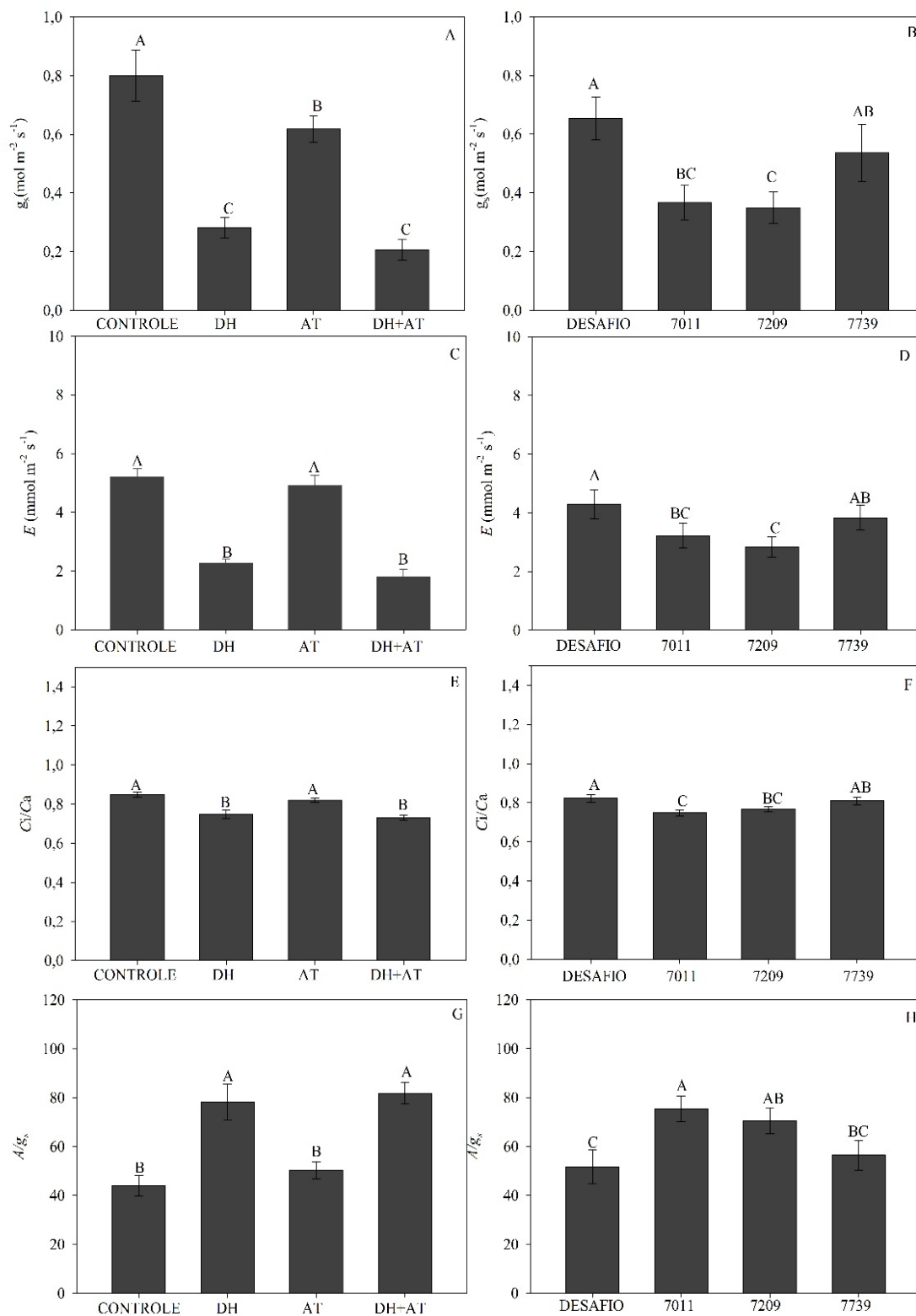
As trocas gasosas foram afetadas diferentemente, de acordo com os tratamentos impostos. Para a taxa fotossintética ( $A$ ) (Fig. 3A) e eficiência instantânea de carboxilação ( $A/C_i$ ) (Fig. 3B), foi observado interação significativa entre as condições de cultivo e as cultivares. O DH e DH+AT promoveram reduções na  $A$  em todas cultivares de soja avaliadas, quando comparadas aos seus respectivos controles. Em contrapartida, as cultivares Desafio e 7739 obtiveram maiores  $A$  quando submetidas ao estresse combinado, em comparação com as demais cultivares (Fig. 3A). O mesmo foi observado para a  $A/C_i$  diante do estresse DH+AT. Já para as plantas submetidas somente ao DH apenas na cultivar 7209 a  $A/C_i$  não diferiu da condição controle (Fig. 3B). A condição de estresse isolado por AT não promoveu redução das variáveis  $A$  e  $A/C_i$ , conforme observado na Fig. 3A e B.



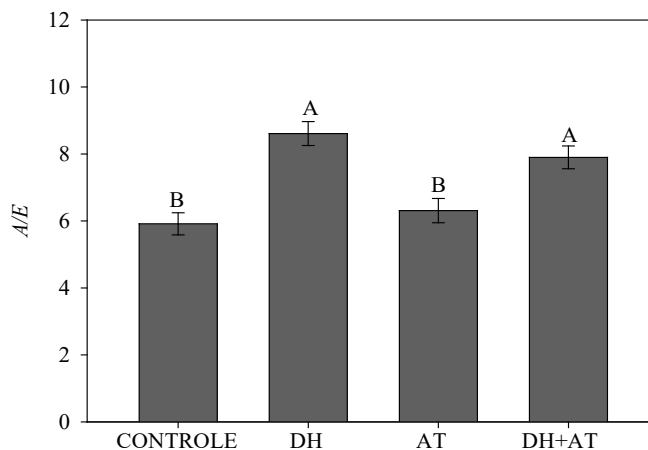
**Figura 3.** Taxa fotossintética ( $A$ ; A) e eficiência instantânea de carboxilação ( $A/C_i$ ; B) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresses combinados (DH+AT) por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 5$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

A condutância estomática ( $g_s$ ), taxa transpiratória ( $E$ ), relação entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) e eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ), apresentaram diferenças significativas independentes entre as condições de cultivo e as cultivares (Fig. 4). Em relação às condições de cultivo, observou-se redução na  $g_s$ ,  $E$  e  $C_i/C_a$  principalmente sob DH e estresses combinados (Fig. 4A; 4C e 4E). O DH e o DH+AT promoveram ainda maiores valores na eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ) (Fig. 4G) e eficiência instantânea no uso da água ( $A/E$ ) (Fig. 5).

As cultivares, Desafio e 7739 apresentaram maiores valores de  $g_s$ ,  $E$  e  $C_i/C_a$  (Fig. 4B; 4D e 4F). Enquanto a cultivar 7209 apresentou menores valores de  $g_s$  e  $E$ , (Fig. 4B e 4D) e a cultivar 7011 menores valores de  $C_i/C_a$  (Fig. 4F). Maiores valores de  $A/g_s$  foram registrados para as cultivares 7011 e 7209 (Fig. 4H).



**Figura 4.** Condutância estomática ( $g_s$ ; A, B), transpiração ( $E$ ; C, D), relação entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ; E, F) e eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ; G, H) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresses combinados (DH+AT) pelo período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).



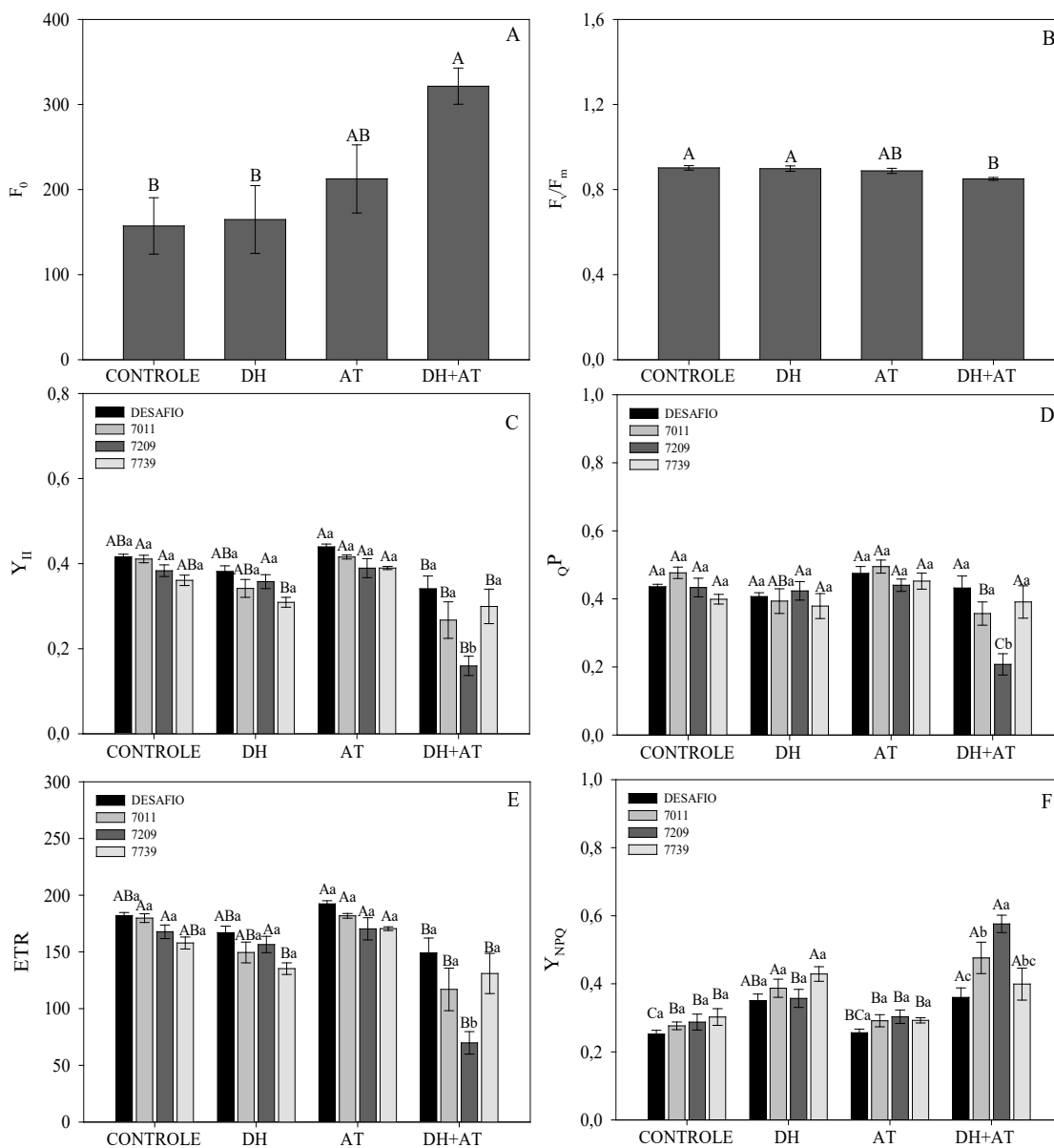
**Figura 5.** Eficiência instantânea do uso da água ( $A/E$ ) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT), pelo período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

A fluorescência mínima ( $F_0$ ) e o rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) apresentaram diferenças significativas apenas entre as condições de cultivo. A  $F_0$  diferiu do controle apenas no estresse combinado, apresentando valor superior aos demais tratamentos (Fig. 6 A). Sob condições de estresse combinado a  $F_v/F_m$  foi menor do que no controle (Fig. 6 B).

O rendimento quântico efetivo do fotossistema II ( $Y_{II}$ ), o coeficiente de dissipação fotoquímica (qP), a taxa de transporte de elétrons (ETR) e o rendimento quântico de dissipação regulada ( $Y_{NPQ}$ ) apresentaram interação significativa entre as condições de cultivo e cultivares. Valores de  $Y_{II}$  e de ETR se mantiveram diante da AT e DH semelhantes ao controle, porém foram reduzidas diante do estresse combinado para as cultivares 7011 e 7209 (Fig. 6 C e E).

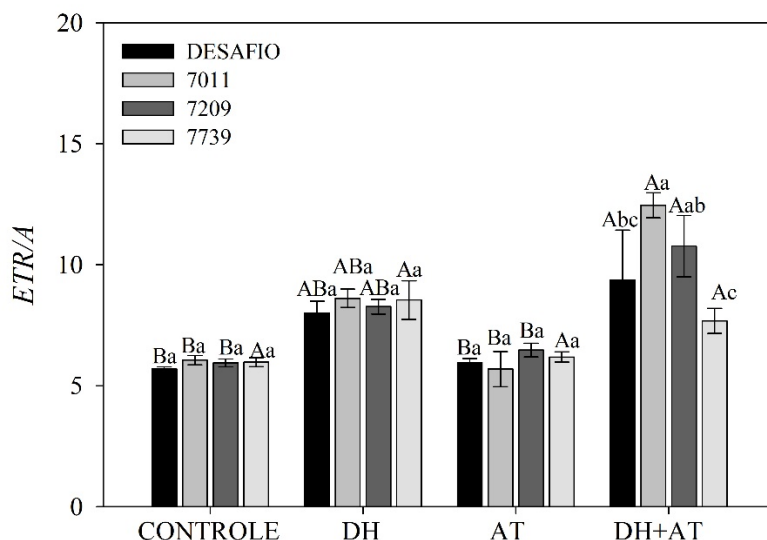
O qP apresentou valores semelhante nas condições DH, AT e controle, no entanto, sob estresse combinado as cultivares 7011 e 7209 apresentaram reduções significativas (Fig. 6 D). O  $Y_{NPQ}$  não diferiu entre as condições de AT e controle (Fig. 6 F), e aumentou para as cultivares Desafio, 7011 e 7739. Quando expostas ao estresse combinado, todas as cultivares apresentaram aumento do  $Y_{NPQ}$ , em relação aos seus respectivos controles, mas de forma mais pronunciada para 7209 e 7011 (Fig. 6 F).





**Figura 6.** Fluorescência inicial ( $F_0$ ; A), rendimento quântico potencial ( $F_v/F_m$ ; B) e efetivo ( $Y_{II}$ ; C) do fotossistema II, coeficientes de dissipação fotoquímica ( $qP$ ; D), taxa de transporte de elétrons (ETR; E) e rendimento quântico de dissipação regulada ( $Y_{NPQ}$ ; F) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) pelo período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP (A e B) e ( $n = 5$ )  $\pm$  EP (C, D, E e F). Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

Para a relação entre taxa aparente de transporte de elétrons e assimilação de  $CO_2$  ( $ETR/A$ ), houve interação significativa entre condições de cultivo e cultivares. Maiores valores de  $ETR/A$  foram observados no estresse combinado para as cultivares 7011, 7209 e Desafio, do que nas condições Controle e AT (Fig. 7).

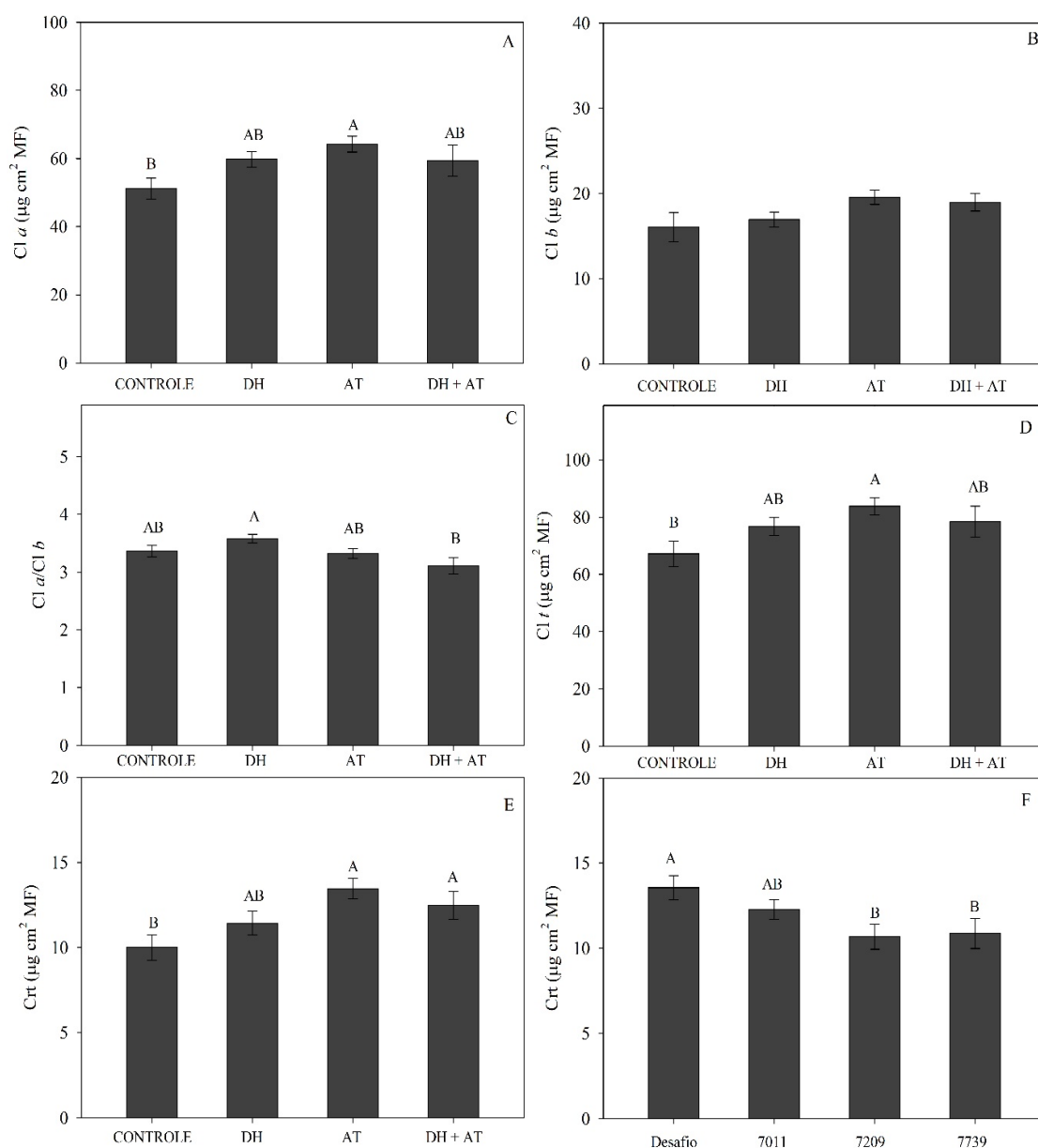


**Figura 7.** Relação entre a taxa aparente de transporte de elétrons e assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $ETR/A$ ) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) pelo período de oito dias. Barras representam média ( $n = 5$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

### 3.3.4. Concentração de pigmentos cloroplásticos

As concentrações de clorofilas *a* ( $Cl_a$ ), razão  $Cl_a/Cl_b$  e clorofilas totais ( $Cl_t$ ) apresentaram diferenças significativas apenas entre condições de cultivo (Fig. 8A, C, D). As concentrações de  $Cl_a$  e  $Cl_t$  aumentaram sob AT (Fig. 8A e D), enquanto a concentração de clorofilas *b* não diferiu para as condições impostas (Fig. 8B). Para a razão  $Cl_a/Cl_b$ , o DH promoveu valores superiores em relação ao estresse combinado (Fig. 8C).

A concentração de carotenoides ( $Crt$ ), apresentou diferenças significativas para condições de cultivo e cultivares de forma independente (Fig. 8E e F). Para as condições foi observado aumento diante da AT e estresse combinado, em relação ao controle (Fig. 8E). Em relação aos cultivares, foi verificado maiores valores de  $Crt$  na cultivar Desafio do que nas cultivares 7209 e 7739 (Fig. 8F).

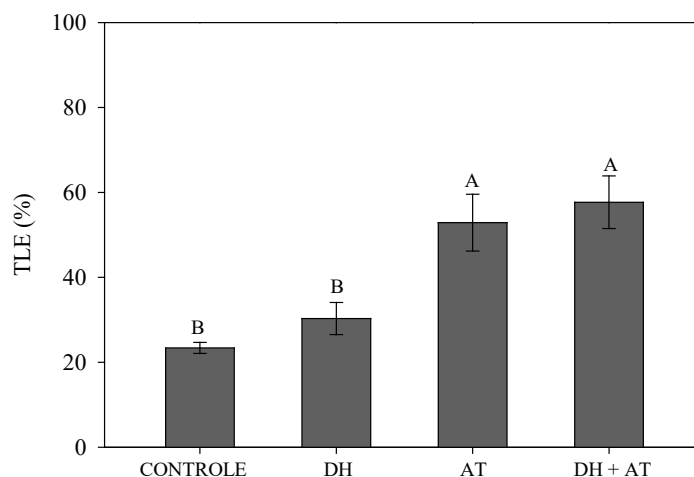


**Figura 8.** Concentração da clorofila *a* (Cl*a*; A), clorofila *b* (Cl*b*; B), razão Cl*a*/Cl*b* (C), clorofila totais (Cl*t*; D), e carotenoides (Crt; E e F) em plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) pelo período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

### 3.3.5. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE)

A taxa de liberação de eletrólitos (TLE) apresentou diferenças significativas apenas entre as condições de cultivo. O DH não promoveu alterações significativas em

relação ao controle, entretanto para a AT e estresse combinado foram observados incrementos na TLE (Fig. 9).



**Figura 9.** Taxa de liberação de eletrólitos (TLE) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) pelo período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

### 3.3.6. Análises biométricas

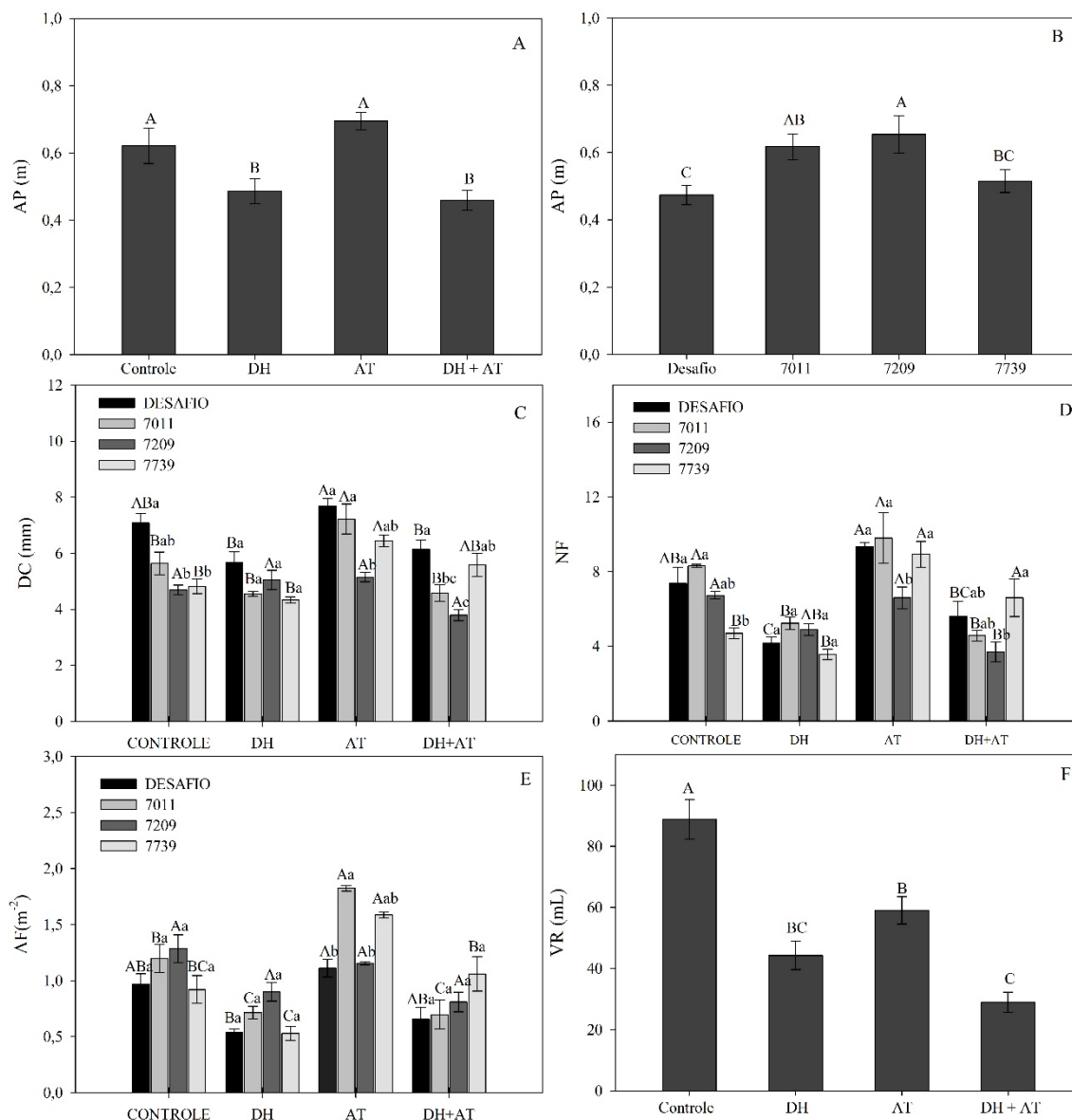
A altura de planta (AP) diferiu para as condições de cultivo e cultivares de forma independente (Fig. 10A e B). Para as condições de cultivo, foi observada diminuição na altura de plantas submetidas ao DH e ao estresse combinado (Fig. 10A). Em relação aos cultivares, foram verificadas maiores alturas de plantas para 7209 e 7011 (Fig. 10B). Para o diâmetro de caule (DC), número de folhas (NF) e área foliar (AF) houve interação significativa entre as condições e cultivares (Fig. 10C, D e E). As cultivares 7011 e 7739 apresentaram aumento de DC sob AT, por outro lado, para as cultivares Desafio e 7209 não houve diferença entre as condições de estresses em relação ao controle (Fig. 10C).

Na cultivar 7739, o número de folhas (NF) foi maior nas condições de AT e estresse combinado, em relação ao controle. Entretanto o NF reduziu nas cultivares Desafio sob DH, na 7209 na condição de estresse combinado, e na cultivar 7011 sob DH e estresse combinado, em comparação aos seus respectivos controles (Fig. 10D).

As cultivares 7011 e 7739 apresentaram maiores áreas foliares (AF) quando submetidas a AT, em comparação com a condição controle, porém, a AF reduziu

quando a cultivar 7011 foi exposta ao DH. A AF das cultivares 7209 e Desafio não diferiram entre as condições (Fig. 10E).

O volume radicular apresentou diferença significativa apenas entre as condições de cultivo, havendo redução em todos os estresses quando comparado ao controle (Fig. 10F)



**Figura 10.** Altura de planta (AP; A e B), diâmetro do caule (DC; C), número de folhas (NF; D), área foliar (AF; E), e volume radicular (VR; F) de plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) pelo período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20 \pm EP$  (A, B e E) e ( $n = 5 \pm EP$  (C, D e E). Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

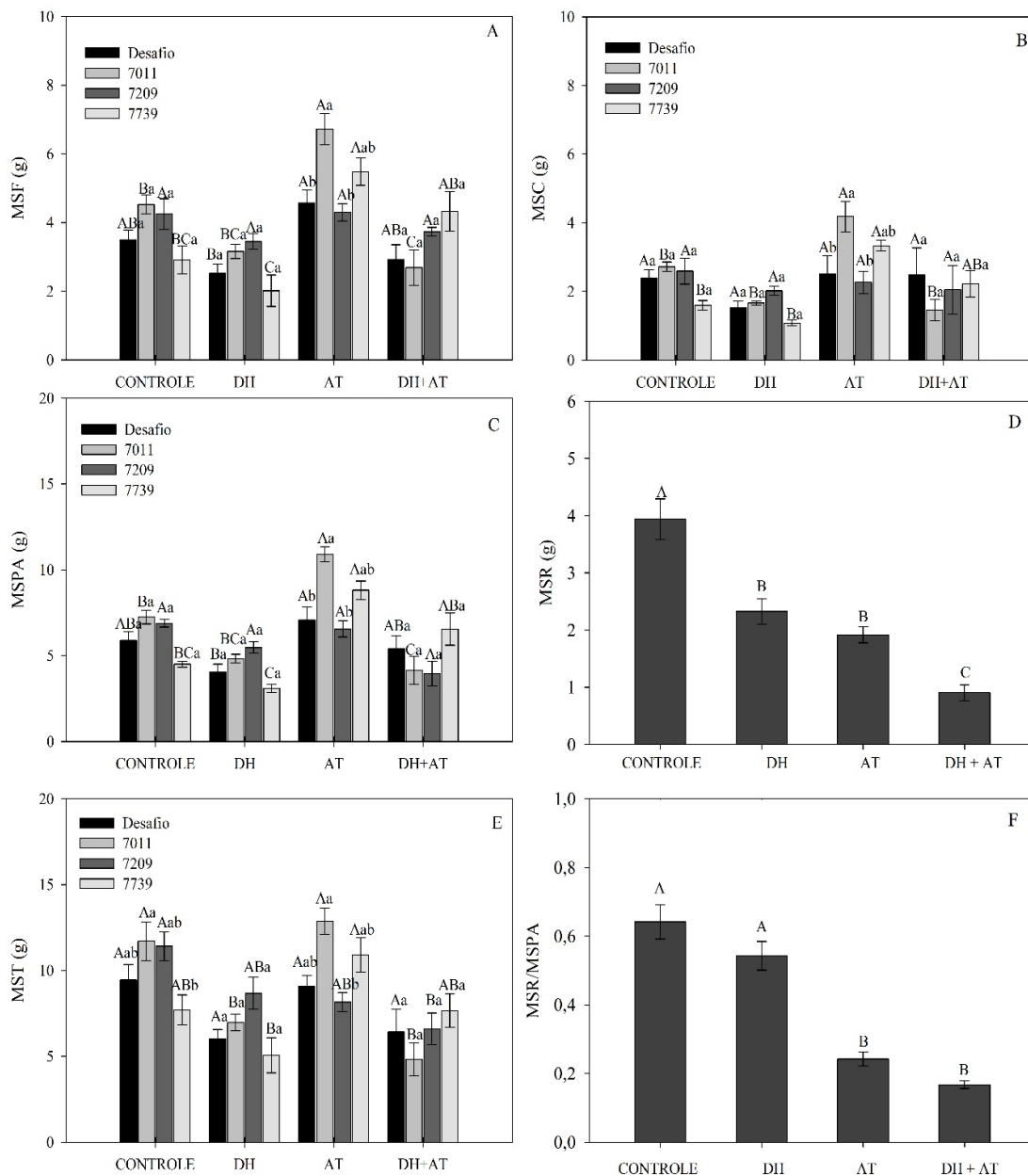
Para a massa seca de folhas (MSF), massa seca de caule (MSC), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST), houve interação significativa entre as condições de cultivo e cultivares (Fig. 11A, B, C e E).

A MSF para a cultivar 7011 e 7739 apresentou acréscimo na AT, enquanto reduções foram verificadas para a cultivar 7011 no estresse combinado (Fig. 11A). Os valores de MSF para a cultivar 7209 não diferiu entre as condições (Fig. 11A). Os valores de MSC para a cultivar Desafio e 7209 não diferiu entre as condições, já para a cultivar 7011 e 7739 a AT promoveu acréscimo na MSC (Fig. 11B).

Os valores de MSPA para a cultivar 7209 não diferiu entre os as condições de cultivo. Para a cultivar 7011 a AT promoveu acréscimo na MSPA, enquanto o estresse combinado promoveu redução quando comparado à condição controle. Para a cultivar 7739 a AT promoveu acréscimo na matéria seca da parte aérea (Fig. 11C).

Os valores de MST para a cultivar Desafio não diferiram entre as condições de cultivo. Para a cultivar 7011, o DH e o estresse combinado promoveu redução na MST quando comparado ao controle. Para a cultivar 7209 apenas o estresse combinado promoveu redução na MST, enquanto para a cultivar 7739 as condições não diferiram em relação ao controle (Fig. 11E).

A massa seca de raiz (MSR) e a razão MSR/MSPA apresentaram diferença significativa apenas entre condições. Reduções na MSR foram observadas em todos os estresses quando comparado ao controle (Fig. 11D), enquanto para a MSR/MSPA houve redução apenas na AT e estresse combinado (Fig. 11F).



**Figure 11.** Massa seca das folhas (MSF; A), caule (MSC; B), parte aérea (MSPA; C), raízes (MSR; D), total (MST; E) e razão entre massa seca de raiz/massa seca da parte aérea (MSR/MSPA; F) em plantas de soja cultivadas em condições ótimas de água e temperatura (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) pelo período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP (D e F) e ( $n = 5$ )  $\pm$  EP (A, B, C, e E). Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

### 3.4. DISCUSSÃO

A identificação de mecanismos adaptativos ou estratégias fisiológicas de plantas diante de estresses combinados é essencial para selecionar cultivares tolerantes (Rampino et al., 2006). Por exemplo, menor  $\Psi_{\text{wam}}$  tem sido relacionado como estratégia de tolerância ao DH, por desencadear o acúmulo de solutos osmoticamente compatíveis, a fim de evitar a perda de água, como de fato foi observado neste estudo, pela diminuição do  $\Psi_{\text{S foliar}}$  e  $\Psi_{\text{S radicular}}$  das plantas de soja, sob DH e DH+AT. O ajustamento osmótico (AO) induz o aumento da turgidez das células da parte aérea e raízes, mantendo o crescimento da planta e melhor exploração e captação de água no solo (Turner, 2018). O aumento de 3,71°C na temperatura foliar das plantas de soja sob estresse combinado ocorreu, pelo menos em parte, em função da queda da transpiração e redução na  $g_s$ , principalmente sob déficit hídrico. A  $g_s$  é um fator determinante para a taxa fotossintética ( $A$ ) e para o metabolismo de carbono na planta (Urban et al., 2017). Declínios na  $g_s$  devido a reduções no potencial hídrico e na condutividade hidráulica da raiz, representam mecanismo de evitação ao estresse, de forma a conservar água nos tecidos foliares (Goufo et al., 2017). Esse ajuste fisiológico ajuda a manter a pressão de turgor, no entanto, reduções no desempenho fotossintético podem ocorrer (Zandalinas et al., 2016).

A diminuição na taxa fotossintética ( $A$ ), sobretudo nas cultivares de soja 7011 e 7209, ocorreu em consequência do fechamento estomático induzido pelo estresse combinado e DH, que também resultou em decréscimo na taxa transpiratória ( $E$ ). Resultado similar foi observado para  $A/C_i$  e razão  $C_i/C_a$  nas mesmas cultivares. Menor concentração de  $\text{CO}_2$  dentro da câmara subestomática devido ao fechamento estomático, reduz a eficiência de carboxilação da enzima Rubisco (Nunes et al., 2017). Junglos et al. (2016) também reportaram reduções na  $A$ ,  $g_s$ , e  $A/C_i$  em mudas de *Campomanesia adamantium* sob restrição hídrica. O estresse térmico, por outro lado, não afetou a fotossíntese das cultivares de soja estudadas, sugerindo que a seca é um fator de estresse mais limitante da fotossíntese e, em última análise, pode diminuir o rendimento da soja, como de fato foi observado em tomate (Zhou et al., 2017).

A manutenção da  $g_s$  nas plantas de soja expostas a AT permitiu a estabilidade nos valores de  $E$ . Esse mecanismo é uma estratégia de termotolerância que permite a regulação da temperatura foliar pela transpiração durante o período de alta temperatura (Zhou et al., 2015; Feller, 2016). O resfriamento da folha é importante na manutenção



da faixa ideal de temperatura para os processos fisiológicos (Walbot, 2011; Hasanuzzaman et al., 2013), além de prevenir danos causados às células por meio do calor, tais como a desnaturação de proteínas e perda da integridade da membrana (Chaves et al., 2016). Por outro lado, sob condições combinadas de alta temperatura e restrição hídrica, é desejável a manutenção das taxas fotossintéticas, com a menor perda possível de água pela transpiração, ou seja, aumento na eficiência de uso da água, conforme foi observado pelos parâmetros  $A/E$  e  $A/g_s$  nas plantas de soja expostas ao DH e DH+AT. A  $A/E$  e  $A/g_s$  são parâmetros importantes na resposta de plantas aos desequilíbrios osmóticos (Lamaoui et al., 2018) e sob essas condições, o fechamento estomático tem efeito mais inibitório para a transpiração do que para a difusão de  $CO_2$  nos tecidos foliares (Sikuku et al., 2010).

Associado às alterações fotossintéticas, o estresse combinado promoveu também alterações substanciais nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*. A fluorescência da clorofila é uma ferramenta amplamente utilizada para determinar a atividade fotossintética de forma não invasiva (Ahmed et al., 2013). Normalmente, o aumento na fluorescência inicial ( $F_o$ ) representa danos nos centros de reações ou na dissipação de energia via complexo antena (Kumar et al., 2014), resultando na menor transferência de energia para o FSII, como observado nas plantas de soja sob estresse combinado. Todavia os danos nas clorofilas do complexo antena não foram suficientes para ocasionar maiores decréscimos no  $F_v/F_m$  e nas concentrações de clorofila *a* e clorofilas totais. A estabilidade e manutenção dos pigmentos é requerida para melhor eficiência no processo fotossintético, sendo uma das características de tolerância a seca e calor, além de contribuir para a manutenção na produção vegetal (Nankishore e Farrell, 2016).

A ativação de mecanismos de proteção, tais como o acúmulo de carotenoides e aumento de NPQ, alivia a pressão de excitação do FSII e evita danos oxidativos no aparato fotossintético. Por outro lado, as reduções nos valores de  $Y_{II}$ ,  $qP$  e ETR, sobretudo nas cultivares 7011 e 7209 sugere que o estresse combinado afetou a utilização de energia luminosa e reduziu a atividade de transporte fotossintético de elétrons, e pode ter contribuído na redução da  $A$ . A maior sensibilidade do aparato fotossintético das cultivares 7011 e 7209 aos estresses combinados demonstra que esses genótipos sofrem limitações difusiva e fotoquímica da fotossíntese, podendo refletir numa menor produção de grãos. Já a manutenção da eficiência fotoquímica das plantas de soja sob alta temperatura, demonstrada pelos valores de  $Y_{II}$ ,  $qP$  e ETR, assim como na taxa fotossintética, sugere que a fixação de carbono foi o principal dreno de energia

absorvida. Além de ser uma resposta adaptativa, esse mecanismo pode ser essencial na sobrevivência de plantas aos períodos esporádicos de temperaturas mais elevadas (Nankishore e Farrell 2016).

Corroborando com as alterações na eficiência fotossintética, o aumento na relação entre taxa aparente de transporte de elétrons e assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $ETR/A$ ) nas cultivares 7011, 7209 e Desafio sob estresse combinado, representa um desequilíbrio entre o fluxo de elétrons (ETR) e a assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) durante a fotossíntese. Isso pode estar relacionado ao aumento da fotorrespiração e um fluxo de elétrons para outras vias de dissipação de excesso de energia, como o ciclo água-água, o fluxo cíclico de elétrons (Baker et al., 2007) e a reação de Mehler, como observado em plantas de sorgo sob estresse térmico (Yan et al., 2013). A reação de Mehler é uma via que pode induzir danos oxidativos celulares em plantas sob estresses abióticos (Sharma et al., 2012). Nesse sentido, o incremento da TLE nas plantas de soja sob estresse combinado e AT reflete a extensão do dano em membranas celulares (Djanaguiranan et al., 2018). Aparentemente, a AT desempenhou papel predominante no aumento da TLE, indicando danos na membrana celulares das plantas de soja. De fato, a AT aumenta a fluidez de membranas, ao afetar o arranjo dos seus lipídios. Esse efeito promove alterações na permeabilidade e no agrupamento de proteínas inseridas na membrana, na termodinâmica de macromoléculas intracelulares (ácidos nucleicos e proteínas) (Ruelland e Zachowski, 2010). A manutenção da estabilidade das membranas é um fator importante na tolerância a estresses. Zhang et al. (2016) observaram que plantas de *Arabidopsis* foram mais tolerantes ao estresse térmico, pela capacidade de manter a integridade das membranas dos cloroplastos.

Em resposta aos estresses fotoquímicos, o aumento na produção de pigmentos fotoprotetores, como os carotenoides e a ativação de mecanismos de dissipação regulada de energia ( $Y_{NPQ}$ ), são formas de dissipação térmica que atenuam danos na maquinaria fotossintética e protegem membranas (Hendrickson et al, 2004; Kramer et al., 2004). No entanto, esses mecanismos fotoprotetores ao serem ativados podem reduzir a capacidade de fixação de carbono (Kromdijk et al., 2016; Li et al., 2019), como observado com maior intensidade para as cultivares 7011 e 7209 sob estresse combinado. Resultados similares foram observados em plantas de milho expostas ao DH, em que o aumento do  $Y_{NPQ}$  acompanhou diminuições na fotossíntese e no crescimento das plantas (Li et al., 2019).

De fato, o DH prejudica o crescimento das plantas pela perda de turgor das células, resultando em alterações nos processos de diferenciação, divisão e alongamento celular (Fahad et al., 2017). Nesse sentido, a redução da altura das plantas de soja demonstrou sensibilidade ao DH e DH+AT. Esse resultado demonstra que a combinação de fatores de estresse intensifica danos fisiológicos, afetando a fotossíntese e o desenvolvimento das plantas (Carmo-Silva, 2012; Pradhan et al., 2012). O diâmetro do caule (DC) e a área foliar (AF) também são características que dependem do turgor para desenvolver (Medeiros et al., 2012). O menor DC nas cultivares 7011 e 7209 pode ter implicado em menor capacidade de transporte de água para a parte aérea, prejudicando assim a expansão foliar (Pittermann, 2010).

A AF, NF, massa seca de folhas (MSF) e massa seca da parte aérea (MSPA) da cultivares de soja foram mais afetados pelo DH e estresse combinado. Durante o déficit hídrico é esperado que ocorra menor expansão da lâmina foliar, abscisão e redução no crescimento da parte aérea (Ullah et al., 2018). Resultados similares também foram observados para o volume radicular (VR) e massa seca de raiz (MSR) das plantas de soja, que reduziram sob estresse combinado. A alta temperatura inibe o crescimento da raiz principalmente por alterar a fotossíntese, a respiração radicular e a absorção de nutrientes (Valdés-López et al., 2016). O déficit hídrico também pode afetar o crescimento de raízes em virtude da menor pressão de turgor das células no solo seco (Guimarães-Dias et al., 2012). A tolerância ao estresse térmico e por seca combinados tem sido associada à manutenção das relações hídricas da planta, através do ajuste osmótico das raízes e pela manutenção do crescimento da raiz em profundidade. Isso permite a busca ativa de água no perfil do solo e ajuste da transpiração, resfriando a superfície foliar (Lipiec et al., 2013).

O aumento na AF nas cultivares 7011 e 7739, sob condições de alta temperatura, está diretamente associada aos maiores incrementos da MSF. Isso sugere que a maior alocação de biomassa nas folhas pode ser uma estratégia adaptativa ao estresse térmico para maximizar o crescimento da superfície transpiratória da folha e o resfriamento da planta (Mason et al., 2017). Adicionalmente, as cultivares supracitadas também aumentaram os valores de massa seca do caule (MSC) e massa seca da parte aérea (MSPA). A redução na MSR e a MSR/MSPA das plantas de soja, por sua vez, demonstrou sensibilidade das plantas aos estresses hídrico e térmico combinados. A menor relação MSR/MSPA é frequentemente associada a menor capacidade de absorção de água, além de reduzir a tolerância aos estresses como a seca (Wang et al.,

2018). Os resultados morfológicos das cultivares de soja avaliadas permitiu identificar que as repostas das plantas são dinâmicas e variadas, exigindo coordenação entre desenvolvimento da parte aérea e da raiz para se aclimatar em um ambiente estressante.

### 3.5. CONCLUSÕES

O déficit hídrico afeta negativamente a fotossíntese e fluorescência da clorofila *a* de plantas de soja. No entanto, esse efeito é exacerbado quando imposto juntamente com a alta temperatura. As cultivares 7011 e 7209 demonstraram ser fotossinteticamente mais sensíveis aos estresses combinados, em relação às cultivares Desafio e 7739.

O aumento no conteúdo de clorofilas nas plantas de soja sob alta temperatura, demonstrou ser uma estratégia importante para manter a taxa fotossintética nesta condição. Ainda, o maior acúmulo de carotenoides e incrementos na dissipação do excesso de energia na forma de calor em plantas expostas aos estresses combinados, demonstra a ativação de mecanismos protetores do fotossistema II.

Sob condição combinada de alta temperatura e déficit hídrico, as cultivares Desafio e 7739 demonstraram que o ajustamento osmótico foi um fator importante na manutenção dos processos fotossintéticos, com potencial para ser caracterizado como mecanismo de dupla tolerância a esses estresses.

Os estresses por déficit hídrico e combinado afetaram negativamente tanto o crescimento da parte aérea, quanto das raízes da cultivares de soja.

Os parâmetros biométricos não demonstraram respostas eficientes para separar os níveis de tolerância entre os cultivares de soja.

A manutenção das características fotossintéticas são bons indicadores na seleção de cultivares de soja potencialmente tolerantes ao déficit hídrico combinado com alta temperatura.

### 3.6. REFERÊNCIAS

AHMED, I. M., DAI, H., ZHENG, W., CAO, F., ZHANG, G., SUN, D., WU, F. Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 63, p. 49-60, 2013.

ARTUZO, F. D., FOGUESATTO, C. R., SOUZA, Â. R. L. D., SILVA, L. X. D. Costs management in maize and soybean production. **Revista Brasileira de Gestão de Negócios**, v. 20, n. 2, p. 273-294, 2018.

BAKER, N. R., HARBINSON, J., KRAMER, D. M. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, n. 9, p. 1107-1125, 2007.

BLUM, A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant, Cell and Environmental**, p. 1-7, 2016.

CARMO-SILVA, A. E., GORE, M. A., ANDRADE-SANCHEZ, P., FRENCH, A. N., HUNSAKER, D. J., SALVUCCI, M. E. Decreased CO<sub>2</sub> availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. **Environmental and Experimental Botany**, v. 83, p. 1-11, 2012.

CHAVES, M. M., COSTA, J. M., ZARROUK, O., PINHEIRO, C., LOPES, C. M., PEREIRA, J. S. Controlling stomatal aperture in semi-arid regions —The dilemma of saving water or being cool?. **Plant Science**, v. 251, p. 54-64, 2016.

DJANAGUIRAMAN, M., BOYLE, D. L., WELTI, R., JAGADISH, S. V. K., & PRASAD, P. V. V. Decreased photosynthetic rate under high temperature in wheat is due to lipid desaturation, oxidation, acylation, and damage of organelles. **BMC plant biology**, v. 18, n. 1, p. 55, 2018.

ELFERJANI, R., SOOLANAYAKANAHALLY, R. Canola responses to drought, heat, and combined stress: shared and specific effects on carbon assimilation, seed yield, and oil composition. **Frontiers in plant science**, v. 9, 2018.

FAHAD, S., BAJWA, A. A., NAZIR, U., ANJUM, S. A., FAROOQ, A., ZOHAIB, A., SADIA, NASIM, W., ADKINS, S., SAUD, S., IHSAN, M. Z. ALHARBY, H., WU, C., WANG, D., HUANG, J. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1147, 2017.

FELLER, U. Drought stress and carbon assimilation in a warming climate:reversible and irreversible impacts. **Journal Plant Physiology**, 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GERGANOVA, M., POPOVA, A. V. STANOEVA, D., VELITCHKOVA, M. Tomato plants acclimate better to elevated temperature and high light than to treatment with each factor separately. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 104, p. 234-241, 2016.

GOUFO, P., MOUTINHO-PEREIRA, J. M., JORGE, T. F., CORREIA, C. M., OLIVEIRA, M. R., ROSA, E. A., ANTÓNIO, C., TRINDADE, H. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) metabolomics: osmoprotection as a physiological strategy for drought stress resistance and improved yield. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 586, 2017.

GUIMARÃES-DIAS, F., NEVES-BORGES, A. C., VIANA, A. A. B., MESQUITA, R. O., ROMANO, E., GROSSI-DE-SÁ, M. D. F., ALVES-FERREIRA, M. Expression analysis in response to drought stress in soybean: Shedding light on the regulation of metabolic pathway genes. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 222-232, 2012.

HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., ALAM, M., ROYCHOWDHURY, R., FUJITA, M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9643-9684, 2013.

HENDRICKSON, L., CHOW, W.S., FURBANK, R.T. Low temperature effects on grapevine photosynthesis: the role of inorganic phosphate. **Functional Plant Biology**, v.31, p.789-801, 2004.

JAGADISH, K. S. V., CAIRNS, J. E., KUMAR, A., SOMAYANDA, I. M., CRAUFURD, P. Q. Does susceptibility to heat stress confound screening for drought tolerance in rice? *Funct. Plant Biology*, v. 38, p. 261–269, 2011.

JUNGLOS, F. S., JUNGLOS, M. S., DRESCH, D. M., PEREIRA, N. S., KODAMA, F. M., SCALON, S. D. P. Q. Recovery of the photosynthetic capacity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) after water deficit. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 2, p. 541-546, 2016.

KOLLIST, H., ZANDALINAS, S. I., SENGUPTA, S., NUHKAT, M., KANGASJÄRVI, J., MITTLER, R. Rapid responses to abiotic stress: priming the landscape for the signal transduction network. **Trends in plant science**, 2018.

KRAMER, D. M., JHONSON, G., KIIRATS, O., EDWARDS, G. E. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. **Photosynthesis Research**, n.79, p.209-218, 2004.

KROMDIJK, J., GŁOWACKA, K., LEONELLI, L., GABILLY, S. T., IWAI, M., NIYOGI, K. K., LONG, S. P. Improving photosynthesis and crop productivity by accelerating recovery from photoprotection. **Science**, v. 354, n. 6314, p. 857-861, 2016.

KUMAR, K.S., DAHMS, H., LEE, J., KIM, H., LEE, W.C., SHIN, K. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 104, p. 51-71, 2014.

LAHIVE, F., HADLEY, P., & DAYMOND, A. J. The impact of elevated CO<sub>2</sub> and water deficit stress on growth and photosynthesis of juvenile cacao (*Theobroma cacao* L.). **Photosynthetica**, p. 1-10, 2018.

LAMAOU, M., JEMO, M., DATLA, R., & BEKKAOU, F. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 26, 2018.

LI, Y., LI, H., LI, Y., ZHANG, S. Improving water-use efficiency by decreasing stomatal conductance and transpiration rate to maintain higher ear photosynthetic rate in drought-resistant wheat. **The Crop Journal**, v. 5, n. 3, p. 231-239, 2017.

LI, Y., SONG, H., ZHOU, L., XU, Z., ZHOU, G. Tracking chlorophyll fluorescence as an indicator of drought and rewatering across the entire leaf lifespan in a maize field. **Agricultural Water Management**, v. 211, p. 190-201, 2019.

LIPIEC, J., DOUSSAN, C., NOSALEWICZ, A., KONDRACKA, K. Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. **International Agrophysics**, v. 27, n. 4, p. 463-477, 2013.

MACHADO, E.C.; SCHMIDT, P.T.; MEDINA, C.L.; RIBEIRO, R.V. Respostas da fotossíntese a fatores ambientais em três espécies de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p. 1161-1170, 2005.

MASON, C. M., GOOLSBY, E. W., DAVIS, K. E., BULLOCK, D. V., DONOVAN, L. A. Importance of whole-plant biomass allocation and reproductive timing to habitat differentiation across the North American sunflowers. **Annals of botany**, v. 119, n. 7, p. 1131-1142, 2017.

MEDEIROS, D. B., SILVA, E. C. D., SANTOS, H. R. B., PACHECO, C. M., MUSSER, R. D. S., NOGUEIRA, R. J. M. C. Physiological and biochemical responses to drought stress in Barbados cherry. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, n. 3, p. 181-192, 2012.

MOHAMED, H. I., LATIF, H. H. Improvement of drought tolerance of soybean plants by using methyl jasmonate. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 3, p. 545-556, 2017.

MORANDO, R., SILVA, A. O., CARVALHO, L. C., PINHEIRO, M. P. M. A. Déficit hídrico: efeito sobre a cultura da soja. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 3, n. especial, p.114-129, 2014.

NANKISHORE, A., FARRELL, A.D. The response of contrasting tomato genotypes to combined heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**. Guyana, v.202, p.75-82, 2016.

NATALI, L., VANGELISTI, A., GUIDI, L., REMORINI, D., COTROZZI, L., LORENZINI, G., NALI, C., PELLEGRINI, E., TRIVELLINI, A., VERNIERI, P., LANDI, M., CAVALLINI, A., GIORDANI, T. How *Quercus ilex* L. saplings face combined salt and ozone stress: a transcriptome analysis. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 872, 2018.

NIU, Y., & XIANG, Y. An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 915, 2018.

NUNES, D. P., SCALON, S. D. P. Q., DRESCH, D. M., GORDIN, C. R. B. Photosynthetic and enzymatic metabolism of *Schinus terebinthifolius* Raddi seedlings under water deficit. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 6, p. 676-682, 2017.

PITTERMANN, J. The evolution of water transport in plants: an integrated approach. **Geobiology**, v. 8, n. 2, p. 112-139, 2010.

PIMENTEL, C., SARR, B., DIOUF, O., ABOUD, A.C.S., MACAULEY, H. R. Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivados em campo. **Revista Universidade Rural Série Ciências da Vida**, v.22, p.07-14, 2002.

PASK, A. J. D., PIETRAGALLA, J., MULLAN, D. M., REYNOLDS, M. P. Physiological breeding II: a field guide to wheat phenotyping. **Cimmyt**, 2012.

PRADHAN, G.P., PRASAD, P, V.V., FRITZ, A.K., KIRKHAM, M.B., GILL, B.S. Effects of drought and high temperature stress on synthetic hexaploid wheat. **F. Plant Biology**, v.39, p.190-198, 2012.

QASEEM, M. F., QURESHI, R., MUQADDASI, Q. H., SHAHEEN, H., KOUSAR, R., RÖDER, M. S. Genome-wide association mapping in bread wheat subjected to independent and combined high temperature and drought stress. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0199121, 2018.

RAMPINO, P., PATALEO, S., GERARDI, C., MITA, G., PERROTTA, C. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. **Plant, cell & environment**, v. 29, n. 12, p. 2143-2152, 2006.

RONEN, R.; GALUN, M. Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. **Environmental and Experimental Botany**, v.24, n.3, p. 239-245, 1984.

RUELLAND, E., ZACHOWSKI, A. (2010). How plants sense temperature. **Environmental and experimental botany**, v. 69, n. 3, p. 225-232, 2010.

SHARMA, P., JHA, A. B., DUBEY, R. S., & PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of botany**, v. 2012, 2012.

SHAHEEN, T., RAHMAN, M., SHAHID RIAZ, S. M., ZAFAR, Y., RAHMAN, M. soybean production. abiotic and Biotic **Stresses in Soybean Production**. v .1 p 177 – 196, 2016.

SIDDIQUI, M. H., MUTAHHAR Y., AL-KHAISHANY A., MOHAMMED, A., AL-QUTAMI, A., MOHAMED H., WHAIBI, A., GROVER, A., HAYSSAM, M., MONA, S., AL-WAHIBI, A., BUKHARI, N. A. Response of different genotypes of Faba Bean plant to drought stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 10214-10227, 2015.

SIEBERS, M.H., YENDREK, C.R., DRAG, D., LOCKE, A.M., ACOSTA, L.R., LEAKEY, A.D.B., AINSWORTH, E.A., BERNACCHI, C.J., ORT, D.R. Heat waves



imposed during early pod development in soybean (*Glycine max*) cause significant yield loss despite a rapid recovery from oxidative stress. **Global Change Biology**, v.21, p.3114-3125, 2015.

SIKUKU, P. A., NETONDO, G. W., ONYANGO, J. C., MUSYIMI, D. M. Effects of water deficit on physiology and morphology of three varieties of nerica rainfed rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Agricultural and Biological Science**, v.5, n.1, 2010.

SOUSA, D. D., LOBATO, E. **Correção do solo e adubação da cultura da soja. Planaltina: Embrapa-CPAC**, n.33, p.30, 1996.

TURNER, N. C Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress. **Journal of experimental botany**, v. 69, n. 13, p. 3223-3233, 2018.

ULLAH, H., LUC, P. D., GAUTAM, A., DATTA, A. Growth, yield and silicon uptake of rice (*Oryza sativa*) as influenced by dose and timing of silicon application under water-deficit stress. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 64, n. 3, p. 318-330, 2018.

URBAN, J., INGWERS, M. W., MCGUIRE, M. A., TESKEY, R. O. Increase in leaf temperature opens stomata and decouples net photosynthesis from stomatal conductance in *Pinus taeda* and *Populus deltoides* x *nigra*. **Journal of experimental botany**, v. 68, n. 7, p. 1757-1767, 2017.

VALDÉS-LÓPEZ, O., BATEK, J., GOMEZ-HERNANDEZ, N., NGUYEN, C. T., ISIDRA-ARELLANO, M. C., ZHANG, N., JOSHI, T., XU, D., HIXSON, K. K., WEITZ K. K., ALDRICH, J. T., PASA-TOLIC, L., STACEY, G. Soybean roots grown under heat stress show global changes in their transcriptional and proteomic profiles. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 517, 2016.

VASQUEZ-TELLO, A.Y., ZUILY-FODIL, A.T., PHAM THI, J., VIEIRA, S. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. **Journal of Experimental Botany**, v.41, p.827-832, 1990.

WALBOT, V. How plants cope with temperature stress. **BMC biology**, v. 9, n. 1, p. 79, 2011.

WANG, Y., MENG, B., ZHONG, S., WANG, D., MA, J., SUN, W. Aboveground biomass and root/shoot ratio regulated drought susceptibility of ecosystem carbon exchange in a meadow steppe. **Plant and Soil**, v. 432, n. 1-2, p. 259-272, 2018.

WEI, T., DONG, Z., ZHANG, C., ALI, S., CHEN, X., HAN, Q., ZHANG, F., JIA Z., ZHANG, P., REN, X. Effects of rainwater harvesting planting combined with deficiency irrigation on soil water use efficiency and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) yield in a semiarid area. **Field Crops Research**, v. 218, p. 231-242, 2017.

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, n. 3, p. 307-313, 1994.

YAN, K., CHEN, P., SHAO, H., SHAO, C., ZHAO, S., BRESTIC, M. Dissection of photosynthetic electron transport process in sweet sorghum under heat stress. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62100, 2013.

ZANDALINAS, S. I., RIVERO, R. M., MARTÍNEZ, V., GÓMEZ-CADENAS, A., & ARBONA, V. ZANDALINAS, Sara I. et al. Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration modulated by a reduction in abscisic acid levels. **BMC plant biology**, v. 16, n. 1, p. 105, 2016.

ZHANG, L., KONDO, H., KAMIKUBO, H., KATAOKA, M., & SAKAMOTO, W. VIPP1 has a disordered C-terminal tail necessary for protecting photosynthetic membranes against stress. **Plant physiology**, v. 171, n. 3, p. 1983-1995, 2016.

ZHOU, R., YU, X., KJAER, K. H., ROSENQVIST, E., OTTOSEN, C. O., WU, Z. Screening and validation of tomato genotypes under heat stress using Fv/Fm to reveal the physiological mechanism of heat tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 118, p. 1-11, 2015.

ZHOU, R., YU, X., OTTOSEN, C. O., ROSENQVIST, E., ZHAO, L., WANG, Y., WU, Z. Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. **BMC plant biology**, v. 17, n. 1, p. 24, 2017.

## 4. CAPÍTULO II

# **METABOLISMO E ANATOMIA FOLIAR DE PLANTAS DE SOJA SOB ALTA TEMPERATURA E DÉFICIT HÍDRICO**

## RESUMO

O efeito de estresses abióticos combinados em plantas é comumente encontrado no ambiente natural. Entre esses, a ocorrência de períodos de seca associados com as altas temperaturas, são fatores que limitam a produtividade de plantas de interesse agrônomo, como a soja. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar mecanismos anatômicos, bioquímicos e metabólicos associados com a tolerância de cultivares de soja aos estresses por alta temperatura e déficit hídrico. Foram avaliadas as respostas de quatro cultivares comerciais de soja: NS7209 IPRO (Nidera), NS7011 IPRO (Nidera), Desafio 8473 RSF (Brasmax Sementes) e 7739 M IPRO (Monsoy Sementes), expostas a quatro condições de cultivo: controle (100% CC, 25°C), déficit hídrico (DH, 40% CC e 25°C), alta temperatura (AT, 100% CC e 40°C) e estresses combinados (40% CC e 40 °C). As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento e os tratamentos foram impostos, quando as mesmas atingiram o estágio de desenvolvimento V3 (terceira folha trifoliolada aberta). Oito dias após a imposição dos tratamentos foram realizadas coletas de material vegetal para análises anatômicas, enzimáticas e do perfil metabólico. O estresse combinado afetou negativamente de forma mais evidente a anatomia foliar da cultivar 7011, sugerindo maior sensibilidade ao déficit hídrico e ao estresse em altas temperaturas. Além disso, observou maior atividade das enzimas APX e POX nas plantas de soja sob estresse combinado. Mediante o perfil metabólico múltiplas alterações foram identificadas. Em geral, aminoácidos osmoprotetores, como a prolina, apresentaram maiores incrementos nas suas concentrações. Esse efeito, associado ao aumento de alguns açúcares e polióis foram eficientes na melhoria da tolerância aos estresses pelas cultivares 7209 e 7739.

**Palavras-chaves:** Anatomia, estresse combinado, ajuste metabólico, ondas de calor.

## ABSTRACT

The effect of combined abiotic stresses on plants is commonly found in the natural environment. Among these, the occurrence of drought periods associated with high temperatures are factors that limit the productivity of important plants, such as soybean. Thus, the aim of this work was to characterize anatomical, metabolic and biochemical mechanisms of soybean plants in response to water deficit and high temperature conditions. Four commercial soybean cultivars were evaluated: NS7209 IPRO (Nidera), NS7011 IPRO (Nidera), Challenge 8473 RSF (Brasmax seeds) and 7739 F IPRO (Monsoy seeds), and four growing conditions were used: Control (100% FC, 25 °C), WD (40% FC, 25 °C), high temperature (HT, 100% FC, 40 °C) and the combined stresses (40% FC - 40 °C). The plants were cultivated in a growth chamber and the treatments imposed in the V3- development stage. Eight days after treatments imposition, leaf material were collected for anatomical, enzymatic and metabolic profile analyzes. The combined stress negatively affected the leaf anatomy of cultivar 7011, suggesting a higher sensitivity to water deficit and high temperature stress. Also, it was observed higher antioxidant enzymes activity, as APX and POX, in soybean plants under combined stress. Through the metabolic profile, multiple alterations were identified. In general, osmoprotective amino acids, such as proline, showed larger increases in their concentrations. This effect, associated to the increase of sugars and polyols, were efficient in improving double tolerance to water deficit and high temperature by cultivars 7209 and 7739.

**Keywords:** Anatomy, combined stress, metabolic adjustment, heat waves

## 4.1 INTRODUÇÃO

No ambiente natural, plantas cultivadas estão frequentemente expostas a um ou mais fatores ambientais que podem prejudicar o seu desempenho fisiológico e produtividade. Dentre esses fatores, a ocorrência simultânea de altas temperaturas e o déficit hídrico afeta diretamente o crescimento e desenvolvimento vegetal, por causa da intensificação dos danos aos processos celulares, fisiológicos e metabólicos (Das et al., 2017), principalmente em genótipos susceptíveis. Apesar da importância, estudos que analisam combinações de estresses sobre plantas cultivadas ainda são relativamente escassos, em comparação às pesquisas de estresses isolados.

O déficit hídrico altera processos fisiológicos e bioquímicos das plantas (Hossain et al., 2015), o que se deve, pelo menos em parte, a redução no potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) na folha (Ping et al., 2015), e modifica o controle estomático afetando a absorção de  $\text{CO}_2$  no processo fotossintético. A alta temperatura pode exacerbar esse efeito da seca pelo aumento da evapotranspiração (Feller et al., 2016) e ainda, aumento da fluidez dos lipídeos das membranas celulares, resultando na inativação de enzimas nos cloroplastos e mitocôndrias, bem como no comprometimento da integridade da própria membrana (Bokszczanin et al., 2013). Ambos estresses por seca e alta temperatura afetam o equilíbrio entre produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Fang e Xiong, 2015; Klumpen et al., 2017), as quais acumulam e em excesso, causam danos oxidativos das estruturas celulares e prejuízos ao metabolismo da planta inteira (Zhang et al., 2019).

Como respostas adaptativas aos fatores de estresse, as plantas desenvolveram mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante e que são altamente conservados e ajustados para o restabelecimento da homeostase celular (Zhao et al., 2014). Esse mecanismo é constituído de enzimas importantes na rota de detoxificação de EROS como a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX), peroxidases (POX) a peroxidase da glutatona (GPX) e a redutase da glutatona (GR) (Hasanuzzaman et al., 2013). Devi et al. (2012) reportaram uma regulação positiva das enzimas CAT e POX em folhas de genótipos de trigo tolerantes a seca. Maior tolerância ao estresse térmico foi evidenciada em plantas de caju com aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e APX (Ferreira-Silva et al., 2011).

Sob condições de estresses combinados, as respostas de defesa desencadeadas nas plantas parecem estar direcionadas, principalmente, ao estresse mais prejudicial

(Pandey et al., 2015), porém, algumas respostas de defesa podem ser comuns, ou ainda, específicas aos dois fatores de estresse (Sewelam et al., 2014; Ramegowda e Senthilkumar, 2015). Zandalinas et al. (2017), por exemplo, observaram respostas distintas da desintoxicação de EROs em duas variedades de citrus sob condições combinadas de AT e DH. Neste estudo, as enzimas SOD, CAT, APX e GR estão relacionadas com a maior tolerância da variedade Carrizo ao estresse combinado. Por outro lado, na variedade Cleóprata, apenas a SOD foi aumentada, o que contribuiu no aumento do estresse oxidativo e maior sensibilidade destas plantas ao estresse combinado.

O ajuste nos níveis de metabólitos primários, tais como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos, também representam estratégias adaptativas importantes na tolerância das plantas a fatores de estresse. Zhang et al. (2014) reportaram que os mecanismos de tolerância a seca de plantas de *Medicago truncatula* estão relacionados aos maiores níveis de mio-inositol e a prolina, que são compostos importantes na eliminação de EROs e osmorregulador celular, respectivamente. Já Safronov et al. (2017) observaram que plantas de tamareira sob estresse térmico e déficit hídrico combinado aumentaram os níveis de galactose, lactose e prolina, sugerindo uma mudança do metabolismo para mecanismos de ajuste osmótico das células. A identificação de metabólitos que estejam associados ao ajustamento metabólico frente a estresses combinados em culturas economicamente importante, como a soja, ainda são poucos. Estudos nesse sentido podem fornecer informações que contribuam no melhoramento de plantas, além da seleção de genótipos mais resilientes a fenômenos climáticos estressantes, como a seca e ondas de calor.

Além dos ajustes bioquímicos e metabólicos, mudanças na anatomia foliar também podem refletir diretamente na adaptação e sobrevivência de plantas de soja sob condições de estresse combinado. Salem-Fnayou et al. (2011) observaram em plantas de videira sob estresse térmico, parênquima paliçádico com células pequenas, compactas e uma espessura significativamente reduzida, que pode afetar a captação de luz para os processos fotossintéticos. Em plantas de soja sob déficit hídrico, por sua vez, não foram observadas mudanças nas características morfoanatômicas da folha, e pode ter ocorrido pelo maior investimento no crescimento das raízes e no controle estomático, de forma a evitar o estresse (Stolf et al., 2009).

A cultura da soja (*Glycine max*) é o quarto cultivo mais importante no mercado mundial (Siebers et al., 2015; Sentelhas et al., 2015), mas pode ter sua produção e qualidade de grãos, severamente reduzidos pelos estresses ambientais. Dessa forma, as

recorrentes variações climáticas ameaçam não só a segurança alimentar, mas também a economia agrícola em todo mundo (Ochuodho et al., 2016), por comprometer diretamente o desenvolvimento e produtividade de importantes culturas (Mutava et al., 2015). Considerando que os modelos climáticos preveem aumento da ocorrência de altas temperaturas e períodos de seca, é importante a elucidação dos mecanismos metabólicos de dupla tolerância da soja em relação a esses fatores de estresse, de forma a garantir maior produtividade da cultura.

Diante do exposto, avaliaram-se neste trabalho as hipóteses de que a combinação dos estresses por déficit hídrico e alta temperatura induzem: (I) alterações adaptativas na anatomia foliar, (II) defesas antioxidantes enzimáticas e (III) ajustamento metabólico de cultivares de soja. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho identificar mecanismos anatômicos, bioquímicos e metabólicos associados à tolerância de cultivares de soja aos estresses por temperatura alta e déficit hídrico.

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1. Material vegetal e condições experimentais**

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento (Instalafrio, Pinhais, PR, Brasil), com umidade relativa de ~65%, irradiância de ~650  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde. As plantas de *Glycine max* (L.) Merrill, cultivares NS7209 IPRO (Nidera), NS7011 IPRO (Nidera), Desafio 8473 RSF (Brasmax Sementes) e 7739 M IPRO (Monsoy Sementes), foram cultivadas em vasos de polietileno contendo 8 Kg de solo Latossolo Vermelho distroférico misturado com areia na proporção de 2:1. A correção do substrato foi realizada com calcário dolomítico PNRT 100, para 60% da saturação da base, a partir da análise físico-química do substrato, e a adubação realizada conforme recomendação para a cultura (Sousa & Lobato, 1996). Foram cultivadas duas plantas por vaso.

Para obtenção dos dados foram utilizados dois lotes de plantas (40 plantas em cada lote). O primeiro lote foi submetido a temperatura de 25°C/20°C (dia/noite), com fotoperíodo de 12 horas e submetidas a duas tensões hídricas, sendo: 100 e 40% da capacidade de campo (CC), no estágio de desenvolvimento vegetativo V3 (terceira folha trifoliolada aberta). O controle de água de solo foi mantido pelo método gravimétrico. Nesse lote, duas condições foram caracterizadas: controle (plantas a 100%



da capacidade de campo e com temperatura de 25°C) e a condição de déficit hídrico-DH (plantas a 40% da capacidade de campo e com temperatura de 25°C). O segundo lote se diferiu do primeiro pela aplicação da alta temperatura, as plantas foram mantidas à 25°C/20°C, com o fotoperíodo de 12 horas até o desenvolvimento V3. Neste momento foram impostos o déficit hídrico de 40% CC, e o estresse térmico mediante o aumento gradual da temperatura ambiente, a partir das 9h até atingir 40±0,5°C às 12h, condição mantida por cinco horas. Após esse período, ocorreu a redução gradual da temperatura até retornar ao valor de 20°C às 19h, permanecendo assim até novo ciclo no dia seguinte. Assim, outras duas condições foram caracterizadas: alta temperatura-AT (plantas a 100% da capacidade de campo e expostas a 40°C) e a condição de estresses combinados-AT+DH (plantas a 40% da capacidade de campo e submetidas a 40°C). Em ambos os lotes, os tratamentos foram impostos por 8 dias. Ao final desse período, foram realizadas as avaliações descritas a seguir.

#### **4.2.2. Avaliações**

##### **4.2.2.1. Caracterização morfoanatômica foliar**

Para as análises morfoanatômicas foram coletadas amostras foliares de 3 cm<sup>2</sup> da região central da última folha totalmente expandida de todas as repetições (n=5), de cada condição de cultivo (n=4). As amostras foram fixadas em Karnovsky (1965), por 24 horas. Após este período, o material vegetal foi pré-lavado em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) e desidratado em série etílica crescente (30% a 100%), pré-infiltrado e infiltrado em historesina (Leica, Alemanha), conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram seccionadas transversalmente em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logenscientific, China) a 5 µm de espessura e os cortes corados com azul de toluidina - coloração policromática (0,05% tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) (O'Brien et al., 1964). As imagens foram obtidas em microscópio óptico (BX61, Olympus, Tokyo, Japão) com câmera acoplada DP-72 utilizando a opção de campo claro. Posteriormente, foram realizadas observações morfoanatômicas da epiderme adaxial e abaxial, parênquima paliçádico e esponjoso, e mesofilo. As medidas de micromorfometria foram obtidas a partir das imagens capturadas no microscópio e mensuradas no software ImageJ (Processamento e Análise de Imagem em Java, v. 1.47,

EUA). Foram realizadas medições em dez observações por repetição, para cada estrutura avaliada.

#### **4.2.2.2. Avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT, APX e POX**

Para a determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD), da catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidases totais (POX), foram macerados aproximadamente 0,3 g de tecido foliar em almofariz com nitrogênio líquido contendo 2 mL do seguinte meio de extração: tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,8), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 0,1 mM), fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF, 1 mM) e polivinilpirrolidona (PVP, 2%). O extrato enzimático foi centrifugado a 12000 g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante será utilizado como extrato bruto.

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada a partir da metodologia proposta por Del Longo et al. (1993), mediante a mensuração da capacidade da enzima em reduzir fotoquimicamente o azul de nitrotetrazólio (NBT). A mistura de reação consistiu de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8), metionina (13 mM), NBT (0,075 mM), EDTA (0,1 mM) e riboflavina (0,002 mM). A reação foi iniciada após a adição 10 µL do extrato enzimático em 280 µL da mistura da reação e ocorreu a 25°C, sob exposição de uma lâmpada com 15-W. Após 10 min de exposição à luz, a mesma foi interrompida e a produção de formazana azul, resultado da fotoredução do NBT, foi determinada a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977) em um leitor de microplacas (modelo VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). As amostras controle foram mantidas no escuro durante 10 min e medida a absorbância a 560 nm. Os valores obtidos do branco das amostras foram subtraídos dos valores das amostras de cada uma das repetições de cada tratamento exposto à luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

A atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada pela velocidade da degradação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 240 nm em um espectrofotômetro UV-VIS (modelo Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA) durante 3 min a 25°C. A reação foi iniciada após adição de 10 µL do extrato bruto enzimático em 990 µL do meio de reação contendo tampão de fosfato de potássio (25 mM, pH 7,0) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 mM). O coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Anderson et al., 1995) foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

Para a atividade da APX (EC 1.11.1.11) foi utilizada a metodologia proposta por Nakano e Asada (1981). A reação foi iniciada após a adição de 50 µl do extrato enzimático bruto em 1,95 ml do meio de reação contendo tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) e ascorbato (0,8 mM). A atividade da APX foi medida pela taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm durante um minuto a 25°C em um espectrofotômetro UV-VIS (modelo Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA). O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Nakano e asada, 1981) foi utilizado para calcular a atividade da APX.

A atividade das peroxidases totais (POX) (EC 1.11.1.7) foi determinada adicionando-se 100 µl do extrato bruto enzimático no meio de reação contendo tampão de fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM, em um volume de 2 mL (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm no espectrofotômetro UV-VIS (modelo Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA) durante 1 min a 25°C. Foi utilizado o coeficiente de extinção de 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Chance e Maehley, 1955) para calcular a atividade da POX, que foi expressa em µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de massa fresca. A atividade das enzimas foi expressa com base em proteína, cuja concentração foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976).

#### **4.2.2.3. Perfil metabólico**

##### *Procedimento de extração*

Aproximadamente 40 mg de material vegetal liofilizado foram adicionadas a 1 mL de metanol/clorofórmio/água (12:5:3) e incubado a 75°C, durante 30 min. Foi adicionado a mistura de 0,1% de penta-eritritol e 0,1% de 3-nitrotirosina. Após o arrefecimento, as amostras foram centrifugadas a 11.400 g e 800 µL do sobrenadante foram removidos. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio e 500 µL de água deionizada. As amostras foram centrifugadas e deixadas em repouso durante 10 min para permitir a separação de fases. As amostras foram então centrifugadas a 11.400 g durante 3 min e 700 µl da fase superior (a fração solúvel água-metanol) foram coletados e armazenados a -20°C.

##### *GC-MS de carboidratos e ácidos orgânicos*

Para análise de carboidratos e ácidos orgânicos, técnica de cromatografia gasosa (GC) acoplada a espectrometria de massas (MS) foi utilizada, seguindo método descrito por Merchant et al. (2006). Foi utilizada de cada amostra, alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de extrato seco em um evaporador rotativo, ao qual se adicionou 450  $\mu\text{L}$  de piridina em cada, seguido de 50  $\mu\text{L}$  de bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA): trimetilcloroacetamida (TMCS) (10: 1) para a derivatização e posterior análise por GC-MS.

As amostras foram incubadas durante 35 minutos a 75°C e analisadas por GC-MS. A análise foi realizada em um cromatógrafo de gás Agilent 6890 com o detector seletivo de massa QQQ 7000. A amostra foi injetada com uma injeção dividida de 20:1 em uma coluna HP-5 (30 m, 0,25 mm de ID, 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura da película), com gás transportador hélio a 1 mL/min. O programa de temperatura possui um conjunto inicial de temperatura do forno de 60°C durante 2 minutos, aumentando para 220°C a 10°C  $\text{min}^{-1}$  por 5 minutos e depois a 300°C a 10°C  $\text{min}^{-1}$  a 5 minutos. O software Mass Hunter foi utilizado para a integração máxima.

Uma curva padrão foi determinada a partir de uma solução contendo ~500  $\mu\text{g/mL}$  de cada analito. Foram tomadas alíquotas apropriadas para produzir concentrações padrão resultantes de 0,5; 1; 5; 10; 20 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , após a derivatização usando o método descrito anteriormente. O peso seco da amostra foi utilizado para o cálculo e os resultados expressos em  $\mu\text{g/g}$  de massa seca.

#### *Análise de aminoácidos por LC-MS*

Para a análise dos aminoácidos, o extrato foi avaliado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), em um sistema LC 1290 Infinity (Agilent, EUA) acoplado a um detector seletivo de massa QTOF 6520 (Agilent, EUA). Amostras de 3,5  $\mu\text{L}$  foram injetadas em uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1 x 150 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) e a separação realizada por eluição em gradiente com água e metanol. Foi feita a diluição das amostras conforme a necessidade. O QTOF foi ajustado para operar em uma faixa de massa baixa <1700 AMU e a aquisição de dados foi feita no modo de varredura (60-1700  $m/z$ ) e a ionização foi o modo íon positivo. Os resultados de LC-MS foram identificados com base em seus tempos de retenção em relação aos padrões, bem como a sua massa de fórmula. Os picos foram integrados e suas quantidades relativas foram calculadas pelo software Mass Hunter da Agilent. Uma curva padrão foi determinada a partir de uma solução contendo ~500  $\mu\text{g/mL}$  de cada analito. As

alíquotas apropriadas foram tomadas para produzir concentrações padrão resultantes de 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; 10 e 20  $\mu\text{g} / \text{mL}$  em solução de 1 mL em água ultrapura. O peso seco da amostra foi utilizado para o cálculo e os resultados expressados em  $\mu\text{g/g}$  de massa seca.

#### 4.2.2.4. Análise estatística

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com 5 repetições, em esquema fatorial sendo quatro cultivares de soja e quatro condições de cultivo. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey ( $p > 0,05$ ) por meio do software estatístico SISVAR.

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1 Caracterização anatômica foliar

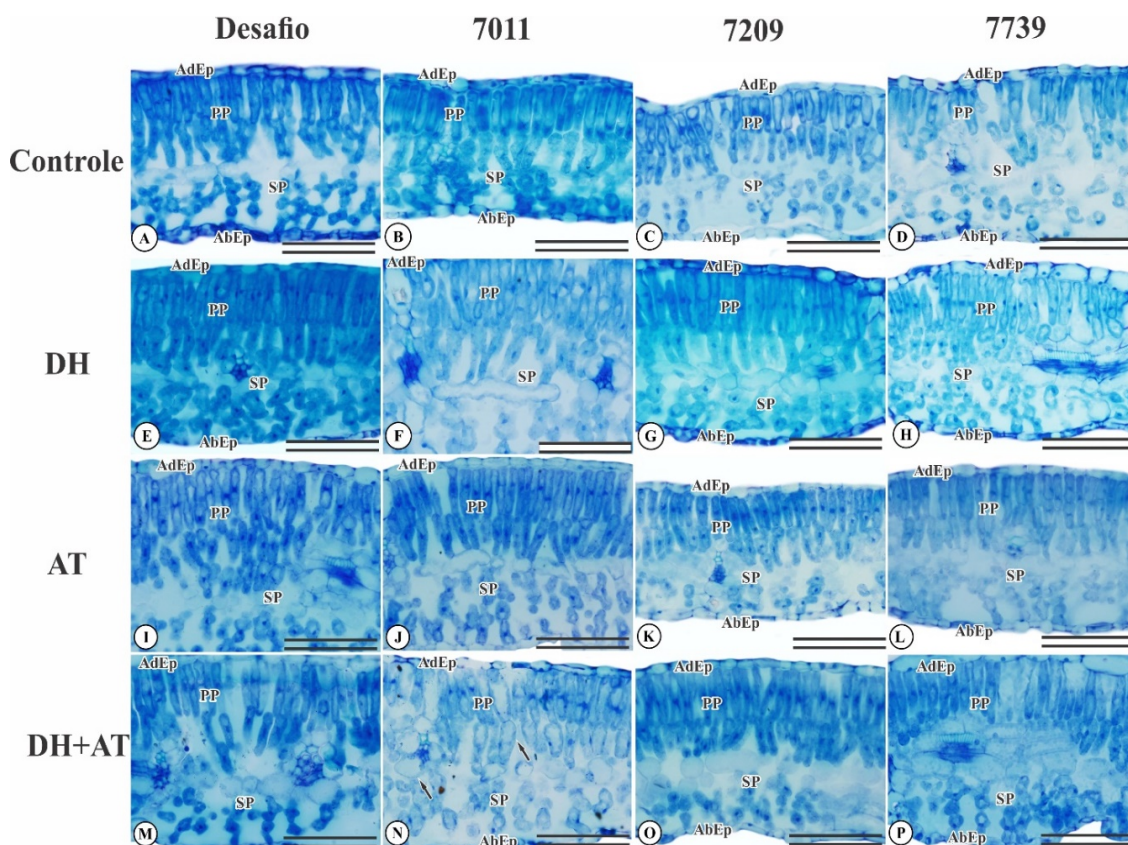
A soja (*Glycine max* (L.) possui mesofilo heterogêneo com organização dorsiventral. O parênquima paliçádico é composto por duas a três camadas de células alongadas e estreitas, voltadas para a superfície adaxial da folha, justapostas, com espaços intercelulares reduzido que ocorrem abaixo da epiderme na face adaxial (Fig. 1). O parênquima esponjoso é formado por células isodiamétricas, de formato irregular com espaços intercelulares localizados acima da epiderme na face abaxial (Fig. 1).

A exposição das plantas ao DH promoveu redução nos espaços intercelulares nas cultivares Desafio, 7209 e 7739 (Fig. 1E, G e H) em relação aos seus respectivos controles (Fig. 1A, C e D). A cultivar 7011 exposta ao déficit hídrico (Fig. 1F) não apresentou alteração visual em comparação ao controle (Fig. 1B), entretanto observou-se maior espessura foliar total, maiores espessuras dos parênquimas esponjoso e paliçádico, e também do mesofilo, em relação as demais cultivares (Fig. 2 A, D, E e F).

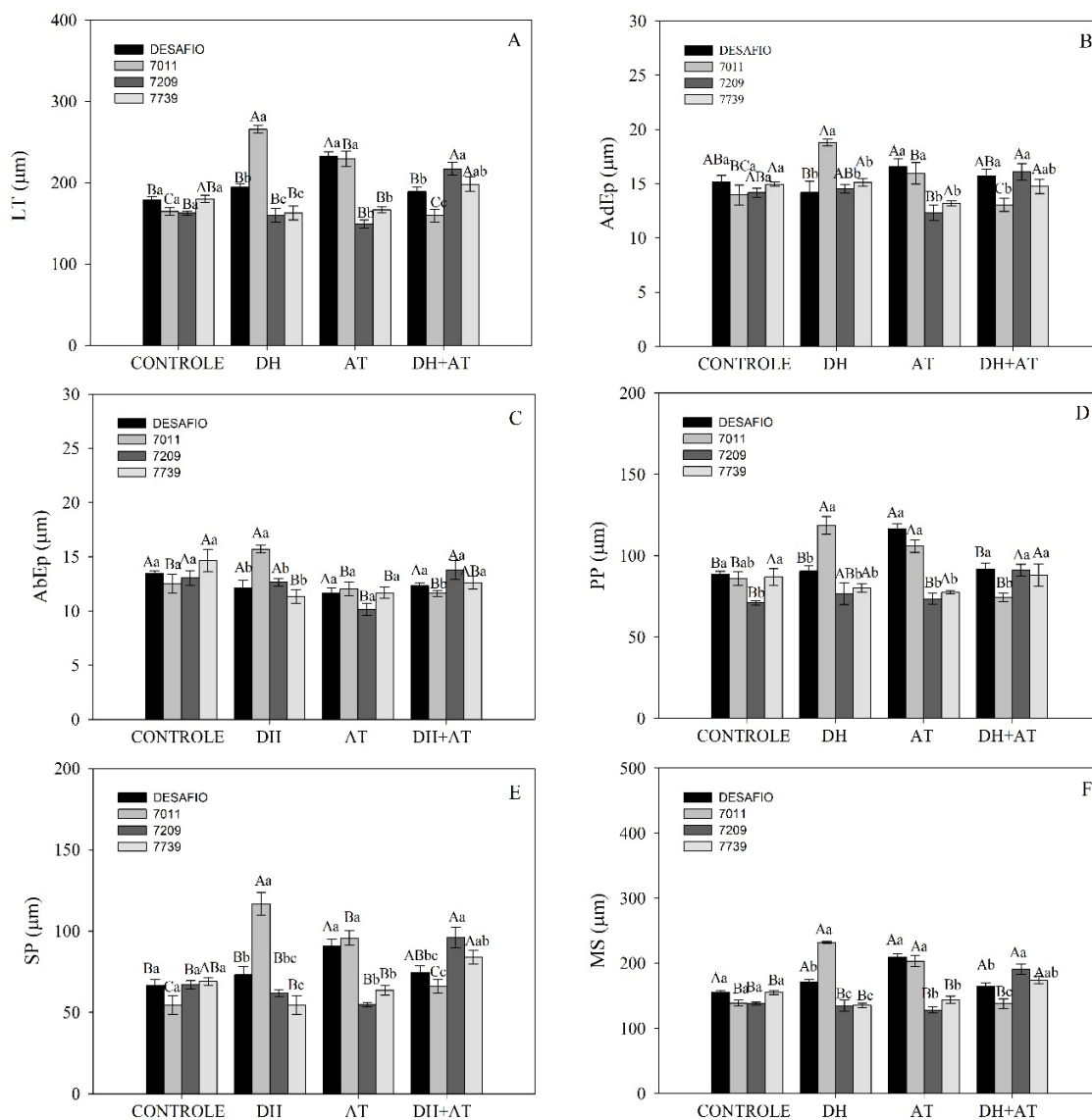
A AT resultou em maiores espessuras foliar total, dos parênquimas esponjoso e paliçádico, e do mesofilo nas cultivares Desafio e 7011, em relação às demais cultivares (Fig. 2A, D, E e F). A combinação dos estresses por DH + AT promoveu colapso das células do parênquima paliçádico e esponjoso na cultivar 7011, quando comparada com as outras condições (Fig. 1N-J), além de resultar em menores espessura foliar total, espessuras do parênquima paliçádico e do mesofilo (Fig. 2 A, D, E e F), diante das demais cultivares. Nas demais cultivares, o estresse combinado promoveu

expansão das células do mesofilo com aumento da espessura dos parênquimas paliçádico e lacunoso (Fig. 1 M, O e P), quando comparadas às cultivares submetidas apenas à AT (Fig. 1I, K e L).

A epiderme adaxial das cultivares Desafio, 7209, 7739 não diferiram entre os estresses e seus respectivos controles, no entanto a cultivar 7011 apresentou maior espessura da epiderme adaxial no estresse por DH (Fig. 2B). Com relação a epiderme abaxial, não houve alterações para a cultivar Desafio entre as condições de cultivo. A cultivar 7011 apresentou maior espessura da epiderme abaxial na condição de déficit hídrico, enquanto esta mesma característica reduziu na 7209 sob déficit hídrico, comparado à condição controle (Fig. 2C).



**Figura 1.** Alterações anatômicas foliares de plantas de soja, cultivares Desafio, 7011, 7209 e 7739, cultivadas por oito dias sob imposição dos tratamentos: controle (A-D), déficit hídrico (DH) (E-H), alta temperatura (AT) (I-L) e estresse combinado (DH + AT) (M-P). (AdEp) epiderme adaxial. (AbEp) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas pretas indicam colapso das células. Barra de escala =100  $\mu$ m.



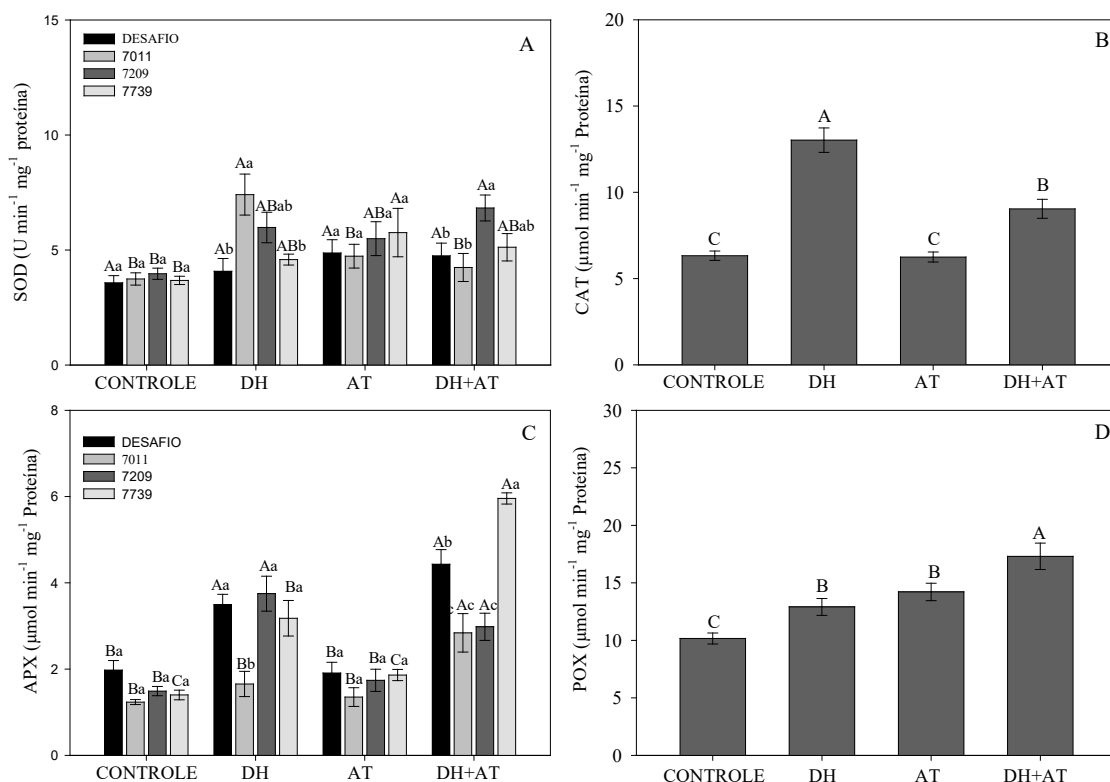
**Figura 2.** Espessura foliar total (LT, A), Epiderme adaxial (AdEp, B), Epiderme abaxial (AbEp, C), espessura dos parênquimas paliçádico (PP, D) parênquima esponjoso (SP, E) e espessura do mesofilo (MS, E), em plantas de soja cultivadas em condições ótimas (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT), por um período de oito dias. Barras representam média ( $n = 5$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

#### 4.3.2. Atividade das enzimas do sistema antioxidante

Para a atividade das enzimas do sistema antioxidante, dismutase do superóxido (SOD) (Fig. 3A) e peroxidase do ascorbato (APX) (Fig. 3C), houve interação

significativa entre condições de cultivo e cultivares. O estresse combinado promoveu aumento na atividade da SOD apenas na cultivar 7209, em relação ao controle, no entanto, sem diferir dos estresses por DH e AT isolados. A atividade da APX se manteve igual ao controle no estresse por AT para todas as cultivares. Entretanto, a condição DH promoveu incremento da atividade dessa enzima nas cultivares Desafio, 7209 e 7739, e para todas as cultivares no estresse combinado, comparado aos seus respectivos controles. Menor atividade da APX foi observada para a cultivar 7011 no DH e estresse combinado. A cultivar 7739 demonstrou maior atividade da APX do que as demais cultivares, na condição de estresse combinado

Para as enzimas antioxidantes catalase (CAT) (Fig. 3B) e peroxidases totais (POX) (Fig. 3D), ocorreram diferenças significativas apenas entre as condições de cultivo. Maiores incrementos na atividade da CAT foram observados nas plantas expostas ao DH, seguido pelo estresse combinado. Controle e AT não diferiram estatisticamente. A atividade da POX aumento para todas as condições de estresse, em relação ao controle, entretanto, de forma mais intensa no estresse combinado (Fig. 3D).



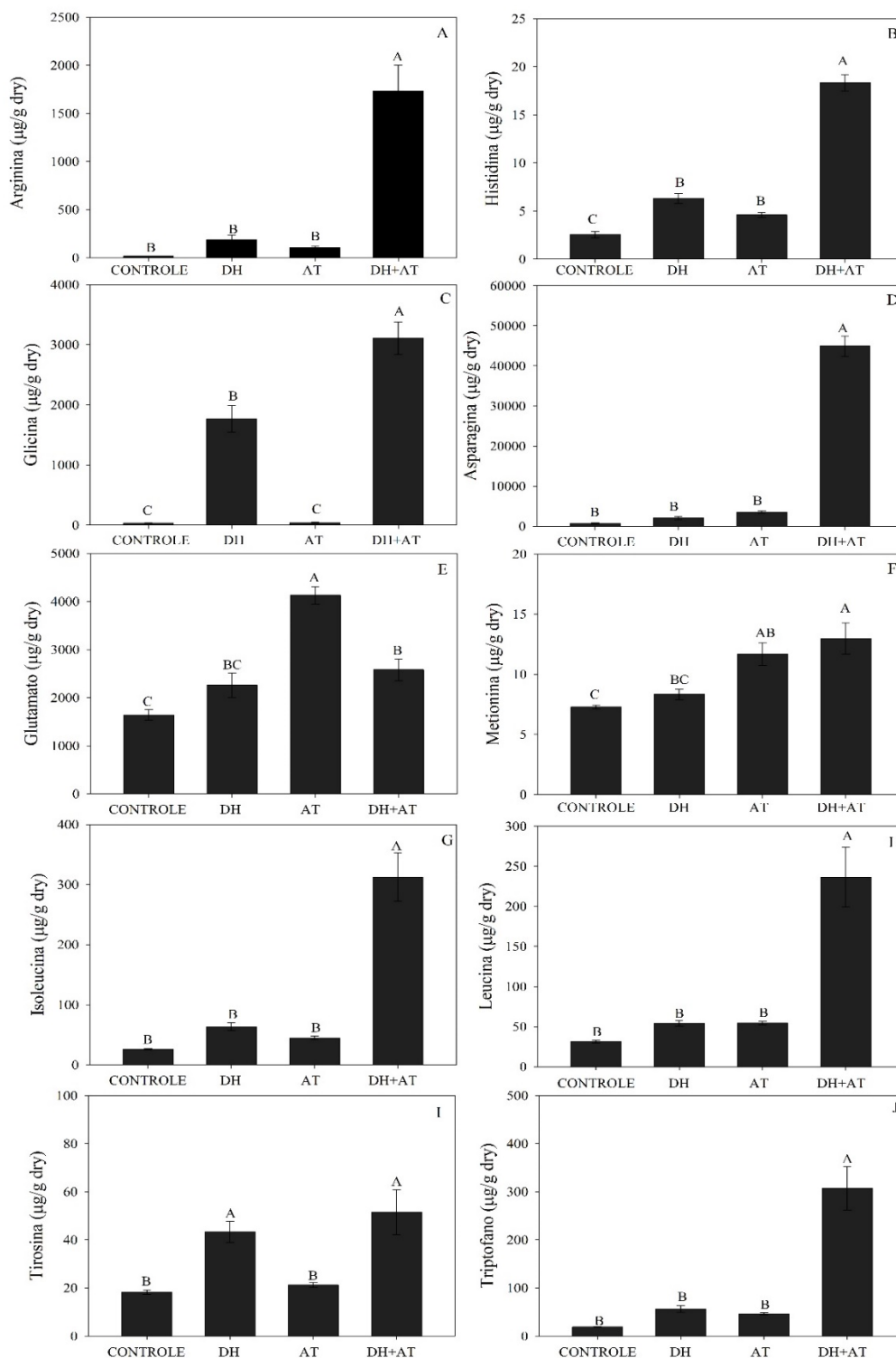
**Figura 3.** Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD, A), catalase (CAT, B), peroxidase do ascorbato (APX, C) e peroxidases totais (POX, D), em plantas de soja cultivadas em condições ótimas (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT), pelo período de oito dias. Barras



representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP (B, e D) e ( $n = 5$ )  $\pm$  EP (A e C). Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

#### 4.3.3. Perfil metabólico

As concentrações dos aminoácidos arginina, histidina, glicina, asparagina, glutamato, metionina, isoleucina, leucina, tirosina e triptofano diferiram apenas para a condição de cultivo, sendo que o estresse combinado ocasionou concentrações mais elevadas desses aminoácidos em relação ao controle (Fig. 4). Sob imposição apenas do DH observou aumento dos níveis de histidina, glicina e tirosina, enquanto para a condição AT, aumento nas concentrações dos aminoácidos histidina, glutamato e metionina foram observados, ambos em relação a condição controle (Fig. 4).

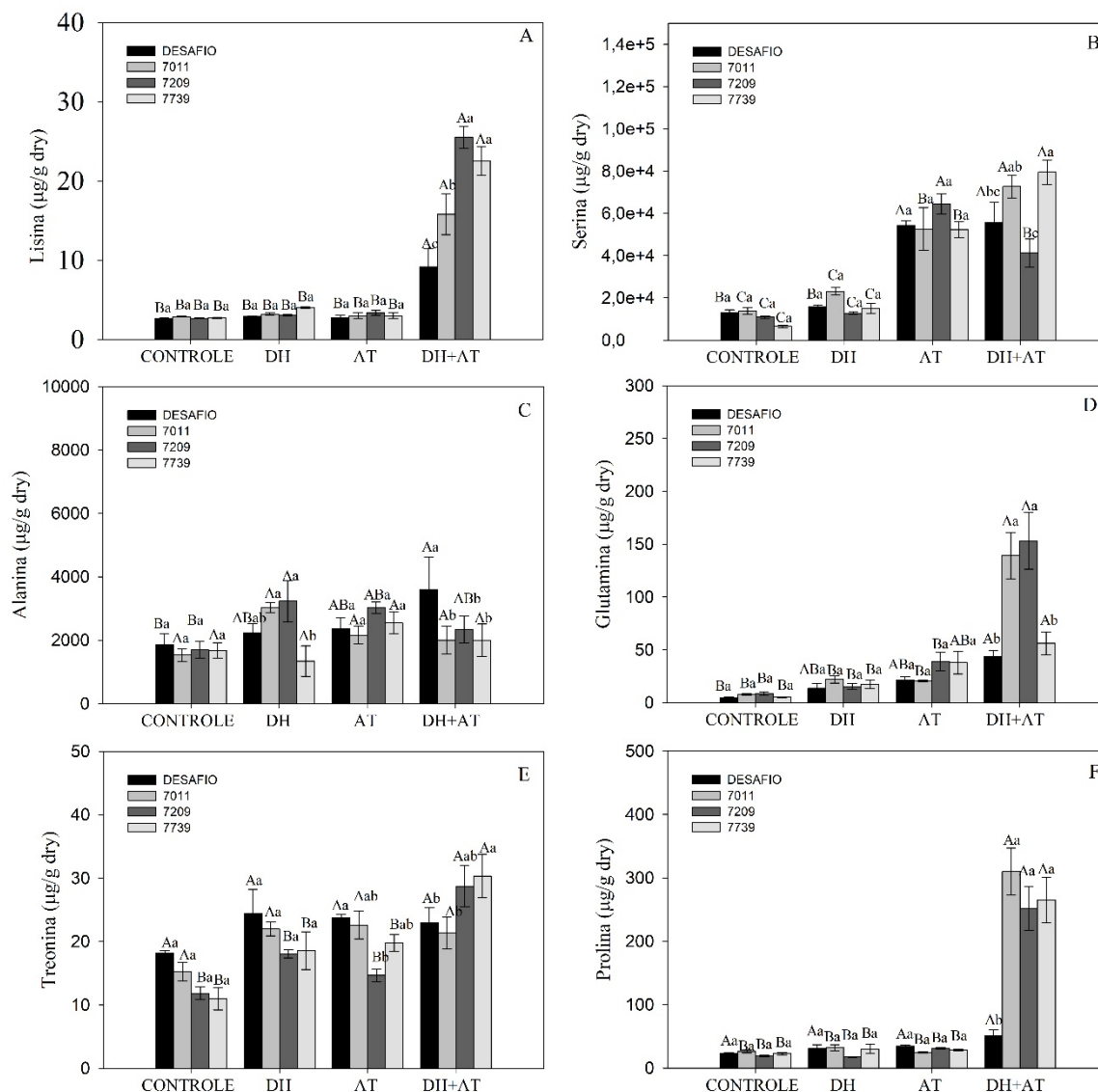


**Figura 4.** Concentrações dos aminoácidos arginina (A), histidina (B), glicina (C), asparagina (D), glutamato (E), methionina (F), isoleucina (G), leucina (H), Tirocina (I) e triptofano (J) em plantas de soja cultivadas em condições ótimas (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) pelo período de oito dias. Barras representam média ( $n = 20$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

As concentrações dos aminoácidos lisina, serina, alanina, glutamina, treonina e prolina apresentaram interação significativa entre cultivares e condição de cultivo (Fig. 5). O estresse combinado ocasionou aumento da concentração de lisina em todas as cultivares em relação a todas as demais condições, no entanto de forma mais pronunciada nas cultivares 7209 e 7739 (Fig. 5). Houve incremento da concentração de serina nas condições de estresse por alta temperatura e estresse combinado, em ambas as cultivares (Fig. 5B).

Em relação à concentração de alanina, as cultivares demonstraram comportamentos distintos. A cultivar Desafio diante do estresse combinado apresentou incremento na concentração desse aminoácido em relação ao controle, entretanto para as cultivares 7011 e 7739 não foi verificada diferenças em relação as demais condições. Enquanto para a cultivar 7209 os níveis foram aumentados quando as plantas foram submetidas ao DH em relação ao controle (Fig. 5C).

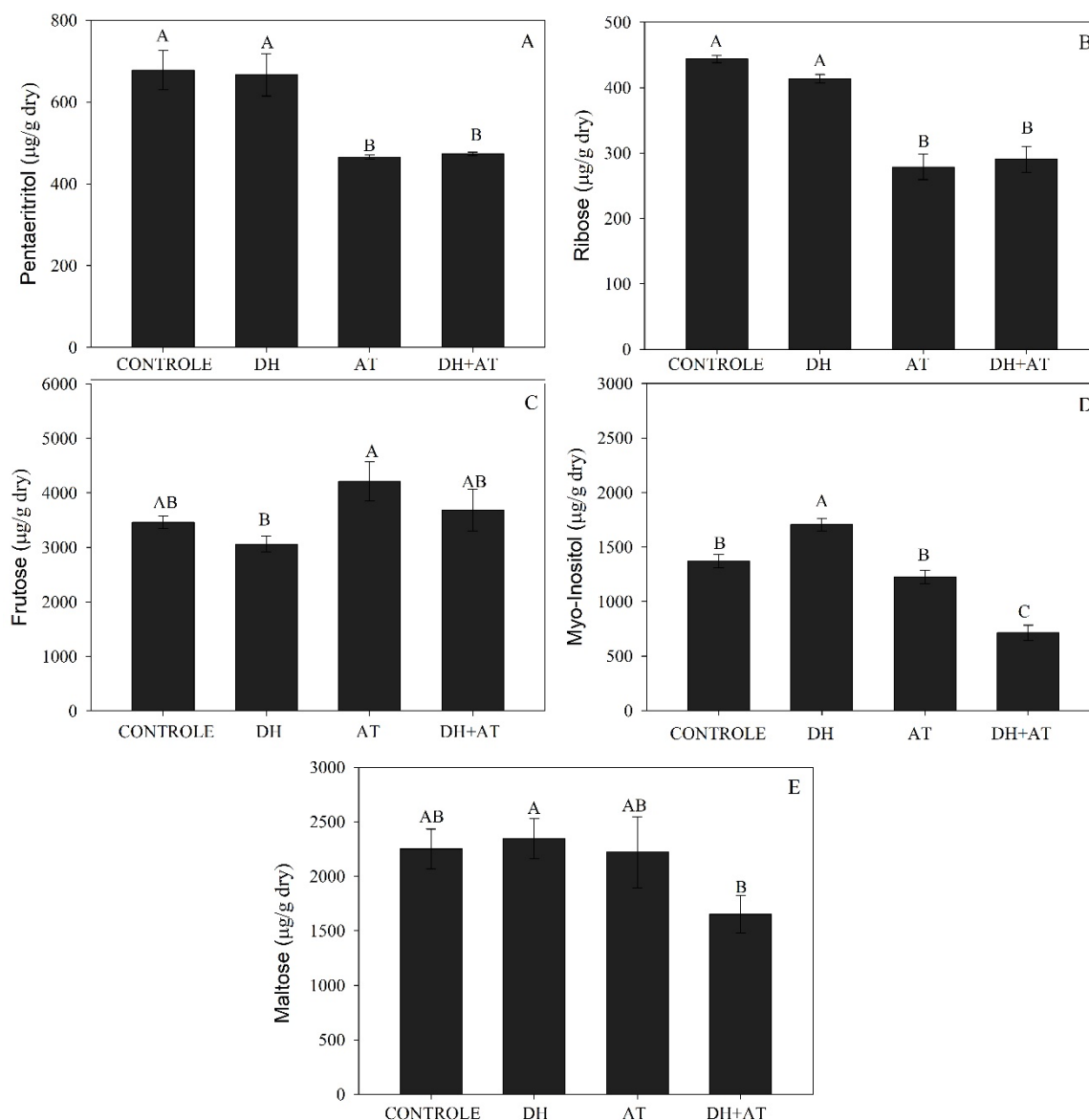
O estresse combinado ocasionou aumento da concentração de glutamina em relação ao controle, no entanto de forma mais pronunciada nos cultivares 7011 e 7209 (Fig. 5D). As cultivares Desafio e 7011 não demonstraram alterações nos níveis de treonina nas condições de estresse, enquanto incrementos foram verificados nas cultivares 7209 e 7739 na condição de estresse combinado (Fig. 5E). O estresse combinado ocasionou aumento da concentração de prolina nas cultivares 7011, 7209 e 7739 em relação a todas outras condições de cultivo, enquanto para a cultivar Desafio os níveis de prolina não diferiram entre as condições (Fig. 5F).



**Figure 5.** Concentrações dos aminoácidos lisina (A), serina (B), alanina (C), glutamina (D), treonina (E) e prolina (F) em plantas de soja cultivadas em condições ótimas (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) pelo período de oito dias. Barras representam média ( $n = 5$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

As concentrações de Pentaeritritol, ribose, frutose, myo-inositol, e maltose diferiram apenas para as condições de cultivo (Fig. 6). A AT e o estresse combinado proporcionaram a diminuição das concentrações do pentaeritritol e da ribose em relação ao controle (Fig. 6A e 6B), enquanto o Myo-inositol houve incremento para o déficit hídrico e decréscimo para o estresse combinado quando comparado ao controle (Fig. 6D).

Maior concentração de frutose foi observada em plantas submetidas a AT em relação a condição DH (Fig. 6C), entretanto o DH promoveu maior concentração de maltose em relação ao estresse combinado (Fig. 6E).

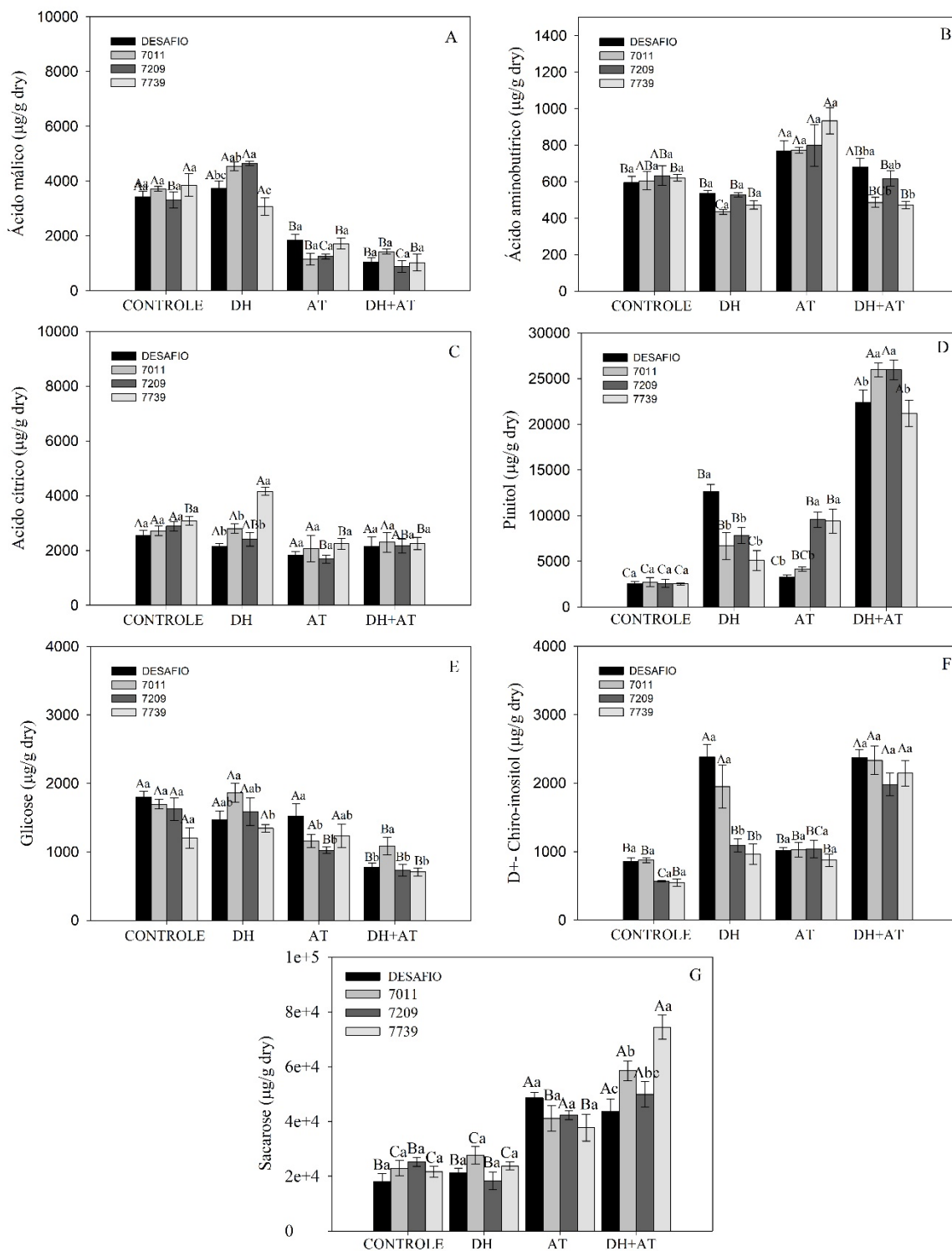


**Figura 6.** Concentrações de pentaeritritol (A), ribose (B), frutose (C), myo-inositol (D), e maltose (E) em plantas de soja cultivadas em condições ótimas (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) pelo período de oito dias. Barras representam média ( $n = 5$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

A concentração de ácido málico, ácido aminobutírico, ácido cítrico, pinitol, glicose, D-(+)-Chiro-inositol e sacarose apresentaram interação significativa entre cultivares e condições de cultivo (Fig. 7). O Ácido málico diminuiu para todas as

cultivares nas condições de AT e AT+DH (Fig. 7A), diferentemente do ácido aminobutírico que aumentou para o estresse por AT nas cultivares Desafio e 7739 e reduziu para a cultivar 7011 diante do DH, quando comparado ao controle (Fig. 7B). O ácido cítrico aumentou apenas na condição de DH para a cultivar 7011 e reduziu para a cultivar 7209 quando comparado aos seus respectivos controles (Fig. 7C).

Diante da condição de DH a concentração do pinitol aumentou para as cultivares Desafio, 7011 e 7209, e para a condição AT foi observado incrementos para as cultivares 7209 e 7739, em contrapartida quando exposto ao estresse combinado maiores valores foram observados para todas as cultivares (Fig. 7D). A concentração de glicose diminui para a cultivar 7209 diante somente de AT, entretanto diante do estresse combinado esse decréscimo ocorreu para todas as cultivares em relação aos seus respectivos controles (Fig. 7E). A concentração de D-+-Chiro-inositol aumentou quando exposto somente ao DH para as cultivares Desafio, 7011 e 7209, já no estresse combinado esse aumento foi para todas as cultivares (Fig. 7F). Os níveis de sacarose foram incrementados para todas as cultivares submetidas as condições de AT e AT+DH em relação as plantas cultivadas na condição controle (Fig. 7G).



**Figura 7.** Concentrações de ácido málico (A), ácido aminobutírico (B), ácido cítrico (C), pinitol (D), glicose (E), D-(+)-Chiro-inositol (F) e sacarose (G) em plantas de soja cultivadas em condições ótimas (Controle) e sob imposição de déficit hídrico (DH), alta temperatura (AT) e estresse combinado (DH+AT) pelo período de oito dias. Barras representam média ( $n = 5$ )  $\pm$  EP. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

#### 4.4. DISCUSSÃO

Em condições de campo, plantas cultivadas frequentemente enfrentam uma combinação de estresses por déficit hídrico e alta temperatura. Neste estudo, a interação entre essas tensões promoveu alterações nas características morfoanatômicas, no sistema antioxidante de defesa e no metabolismo de cultivares de soja, em comparação aos estresses isolados. De fato, estresses combinados afetam vários aspectos do funcionamento celular em plantas, como observado em tomateiro (Nankishore et al., 2016), *Arabidopsis thaliana* (Vile et al., 2012) e tamareira (Safronov et al., 2017).

Nas cultivares de soja, 7209 e 7739, o aumento das células do mesofilo, sob efeitos dos estresses combinados pode estar relacionado com o aumento na captura de energia luminosa e absorção de CO<sub>2</sub>, necessários para o processo fotossintético (Polizel et al., 2011), como observado em oliveiras (Guerfel et al., 2009) e em folhas de soja (Makbul et al., 2011) sob déficit hídrico. Esses mecanismos visam minimizar os danos celulares a fim de que haja absorção, canalização e dispersão da luz (Castro et al., 2009). Em contrapartida, o colapso das células do parênquima observados na cultivar 7011 demonstra sensibilidade desta cultivar em lidar com o estresse combinado. Zhang et al. (2005) relataram danos anatômicos severos nas células do mesofilo de *Vitis vinifera* em decorrência do estresse térmico, que resultaram no aumento da permeabilidade da membrana plasmática.

É esperado que o estresse combinado comprometa a homeostase celular devido aos efeitos nocivos do aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). O equilíbrio entre geração e eliminação de EROs é crítico para a sobrevivência, tolerância e crescimento das plantas sob tais condições de estresse (Zandalinas et al., 2017), sendo a manutenção nos níveis de EROs influenciada pela atividade de enzimas antioxidantes (Caverzan et al., 2016). Entre as cultivares estudadas, a maior atividade da enzima antioxidante SOD foi observada somente na cultivar 7209 sob estresse combinado. Esse efeito pode estar relacionado a uma resposta de proteção contra os danos oxidativos, como observado em genótipos de citros sob estresse por seca e calor (Zandalinas et al., 2017). Em contraste, a atividade da CAT e da APX foi maior sob DH e DH+AT. O aumento na atividade da CAT é importante para a remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido na fotorrespiração durante o déficit hídrico (Sofa et al., 2015). Sob essa condição ambiental, a fotorrespiração funciona como um dissipador de energia, impedindo a



super-redução e fotoinibição da cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese (de Pinto et al., 2013).

Além da CAT, a APX também auxilia na remoção do  $H_2O_2$ , sendo esta reação um processo crucial para a tolerância de plantas de *Arabidopsis* à seca e ao calor combinados (Koussevitzky et al., 2008). Similar a enzima SOD, a maior atividade da POX nas plantas de soja sob estresse combinado pode estar relacionado as possíveis estratégias de adaptação exclusivas para esta combinação de estresses, sugerindo melhor capacidade de eliminar EROs e reduzir danos oxidativos (Zhang et al., 2019). Além do sistema antioxidante, os mecanismos de adaptação ao estresse combinado também envolveram mudanças no metabolismo das cultivares de soja. O estresse combinado ativou respostas de proteção ao desencadear aumentos nas concentrações dos aminoácidos arginina, histidina, glicina, asparagina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, triptofano, lisina, serina, glutamina e prolina, os quais não foram observados quando expostos somente ao estresse por seca ou calor. De modo geral, a manutenção nos níveis de aminoácidos aumenta a tolerância ao estresse nas plantas, devido a regulação de mecanismos fisiológicos, como por exemplo, o ajustamento osmótico, a desintoxicação das EROs e a regulação do pH intracelular (Krasensky e Jonak, 2012).

A arginina, é um importante aminoácido na construção de proteínas e, um metabólito essencial na distribuição de nitrogênio através do seu catabolismo. Peremarti et al. (2009) observaram maior expressão na enzima arginina descarboxilase que está envolvida no metabolismo da arginina, promovendo maior tolerância ao estresse hídrico em arroz transgênico. Esse aminoácido ainda atua como precursor na síntese de poliaminas e aminoácidos como a prolina (Oliveira et al., 2018; Siddappa et al., 2018). As poliaminas são compostos importantes no desenvolvimento das plantas (Wimalasekera et al., 2011) e, sob condições estressantes têm efeito antioxidante devido a combinação de suas propriedades de ligação aniônica e catiônica na eliminação de radicais livres, inibindo a peroxidação lipídica (Groppa e Benavides, 2008). Já o aumento nos níveis de prolina de forma mais evidente nas cultivares de soja 7011, 7209 e 7739 pode ter ocorrido como estratégia de defesa contra o estresse combinado. A prolina se acumula principalmente no citosol, reduzindo a acidose citoplasmática. Esse efeito conserva a razão  $NADP^+/NADPH$  em níveis adequados para o metabolismo celular (Liang et al., 2014). Quando ocorre a adaptação e/ou um alívio do estresse, como observado nas características morfoanatômicas das cultivares 7209 e 7739, a degradação metabólica controlada da prolina nas mitocôndrias produz ATP, importante

para reparar danos induzidos pelo estresse (Liang et al., 2014) e estabilização de estruturas subcelulares (Lehmann et al., 2010; Liang et al., 2013).

A glicina também é considerada um osmólito orgânico que é altamente acumulado em resposta ao estresse hídrico (Das et al., 2017), a fim de evitar a perda de água. Plantas de *Solanum lycopersicum* expostas ao estresse combinado de calor e salinidade acumularam os osmoprotetores glicina e trealose em grandes quantidades ao invés de prolina, que é um osmoprotetor predominante acumulado em plantas expostas ao estresse salino. O aumento nos níveis dos aminoácidos aromáticos, tirosina e triptofano nas plantas de soja também foram observados em plantas de trigo (Bowne et al., 2012), soja (Das et al., 2017) e grão de bico (Khan et al., 2019), sob condições de seca. Esses aminoácidos podem atuar como fonte alternativa de energia metabólica (Khan et al., 2019), além de desempenhar papéis importantes no transporte de íons, abertura estomática, na manutenção do equilíbrio hídrico e eliminação de EROs (Ford et al., 2011; Bowne et al., 2012). O efeito antioxidante dos aminoácidos aromáticos pode ter contribuído na eliminação de EROs nas plantas de soja, evitando a intensificação de danos decorrentes do estresse combinado. O incremento nos níveis de histidina nas plantas de soja também pode ter desempenhado um papel semelhante na redução do estresse oxidativo, que ajudou a manter a estrutura da membrana das cultivares de soja, semelhante ao observado para uma variedade de grão de bico tolerante à seca (Khan et al., 2019). Zemanová et al. (2014) também relacionaram o aumento nos níveis de histidina com a redução de danos oxidativos em plantas de *Noccaea caerulea* sob estresse com cádmio.

O incremento nos níveis dos aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina e leucina nas plantas de soja pode ter funcionado como fonte alternativa de energia respiratória para o ciclo TCA durante o estresse, como já foi observado em plantas de *Arabidopsis* (Taylor et al., 2004), cevada (Malatrasi et al., 2006) e trigo (Bowne et al., 2012). Resultados similares também foram observados em plantas de *Eucalyptus globulus* expostos aos estresses combinados por seca e calor (Correia et al., 2018). Já o aumento nos níveis de asparagina nas plantas sob estresse combinado pode ter atuado na manutenção da pressão osmótica (Lea et al., 2007) e no transporte de nitrogênio, como forma de adaptação ao estresse (Zemanová et al., 2017). A asparagina é um dos metabólitos requeridos no transporte de nitrogênio via floema e xilema, e permite o crescimento ativo das raízes e folhas durante o período de estresse (Yadav et al., 2016).

A alta temperatura, por sua vez, induziu o aumento nos níveis de metionina nas plantas de soja, o qual é um importante metabólito na construção de proteínas e um doador de S-adenosilmetionina (AdoMet) para reações de metilação. A metilação ocorre em processos de síntese de clorofilas e plastoquinonas, além de proteínas das membranas do tilacoide e do estroma, incluindo as subunidades da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Ravanel et al., 2004). Diversos estudos relataram a termotolerância de plantas em virtude do aumento na produção de proteínas de choque térmico (HSP), ricas em metionina. Essas proteínas são importantes na proteção e funcionamento do transporte de elétrons no FSII durante o estresse térmico (Shakeel et al., 2011; Kim et al., 2012).

A glutamina, além do seu papel na nutrição e no metabolismo é uma eficiente molécula de sinalização relacionada à regulação metabólica, estimulando respostas de defesa nas plantas sob condições de estresse (Forchhammer, 2007). Dessa forma, maiores níveis desse aminoácido nas cultivares 7011 e 7209 pode ter melhorado a tolerância das plantas contra o estresse combinado. Kan et al. (2015) observaram que o aumento nos níveis de glutamina em plantas de arroz induziu rapidamente a expressão dos genes envolvidos na regulação das respostas de defesa a estresses.

O aumento da lisina em todas cultivares de soja expostas ao estresse combinado, sobretudo nas cultivares 7209 e 7739, pode ter contribuído para a síntese de metabólitos importante em resposta ao estresse, como a prolina, o GABA e a arginina (Galili et al., 2001). O GABA é um aminoácido não proteico, rapidamente acumulado sob diferentes condições ambientais (Brikis et al., 2018; Podlešáková et al., 2019). O incremento nos níveis de GABA na cultivar 7739 sob alta temperatura pode estar associado a eliminação de EROs (Song et al., 2010; Liu et al., 2011). Renault et al. (2010) observaram aumento na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do GABA em *Arabidopsis*, as quais foram importantes na eliminação de EROs e tolerância ao estresse salino.

Os maiores níveis de açúcares, polióis e ácidos orgânicos em plantas são essenciais para o fornecimento de energia e na manutenção de várias funções fisiológicas durante estresses (Bowne et al., 2012; Conde et al., 2014) De modo geral, os açúcares que se acumulam em resposta ao estresse funcionam como osmoprotetores, osmorreguladores e ainda, fornecem proteção às membranas e proteínas, e eliminam EROs (Singh et al., 2015, Keunen et al., 2013). Nas cultivares de soja desse estudo, o estresse combinado resultou em aumento nos níveis de sacarose. Este açúcar é o

principal produto da fotossíntese, sendo utilizado na distribuição de carbono para tecidos não fotossintéticos (Lin et al., 2016). Sob condições de estresse, o acúmulo de sacarose tem como função a osmoproteção e a estabilização da membrana, por meio da interação com a bicamada lipídica (Lokhande e Suprasanna, 2012). Em contraste, a estabilização nos níveis de maltose e frutose, seguido da diminuição da glicose pode refletir em um fluxo alterado de carbono nas plantas de sob estresse combinado (Kempa et al., 2008). Essa alteração pode afetar diretamente a taxa metabólica do ciclo do ácido cítrico e assim, intermediários como o ácido málico podem apresentar níveis reduzidos, conforme observado neste estudo. O ácido málico é o ácido orgânico mais abundantemente produzido nas plantas (Passarinho et al. 2006) e está envolvido em uma variedade de papéis, como o tamponamento do pH celular e na resposta estomática ao ABA (Barchet et al., 2013).

A redução nos níveis de ribose sob AT e AT+DH também é um indicativo de alterações no metabolismo de aminoácidos e na biossíntese de ácidos nucleicos (Das et al., 2017). Similar à sacarose, também foram observados nas cultivares de soja aumento nos níveis dos polióis pinitol e *D-chiro-inositol* sob estresse combinado. Os polióis têm como funções a estabilização de macromoléculas e eliminação de radicais hidroxilas, prevenindo desse modo danos oxidativos na membranas e enzimas (Krasensky e Jonak, 2012). O pinitol, *D-chiro-inositol* e *myo-inositol* contribuem também no ajustamento osmótico e sobretudo, atuam como osmoprotetores da membrana do cloroplasto (Streeter et al., 2001). Dessa forma, atuam na melhoria da tolerância à seca e ao estresse salino em diferentes espécies (Liu et al., 2008; Ahn et al., 2018), incluindo a soja (Streeter et al., 2001).

#### 4.5. CONCLUSÃO

A combinação de estresses afetou negativamente de forma mais evidente a anatomia foliar da cultivar 7011, sugerindo maior sensibilidade aos estresses.

O maior incremento na atividade das enzimas APX e POX nas plantas de soja sob estresse combinado pode ser uma estratégia de tolerância.

O aumento nos níveis de prolina nas cultivares de soja 7011, 7209 e 7739 demonstrou ser um importante mecanismo osmoprotetor contra o estresse combinado.

O aumento nos níveis de lisina e GABA na cultivar 7739 atenuou os danos do estresse combinado, ao atuarem como osmorreguladores e na eliminação de EROs.

Adicionalmente, os polióis pinitol e *D-chiro-inositol* mitigaram danos oxidativos celulares nas plantas de soja sob estresse combinado.

#### 4.6. REFERÊNCIAS

AHN, C. H., HOSSAIN, M. A., LEE, E., KANTH, B. K., PARK, P. B. Increased salt and drought tolerance by D-pinitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 504, n. 1, p. 315-320, 2018.

ALDESUQUY, H. S., BAKA, Z. A., EL-SHEHABY, O. A., GHANEM, H. E. GROWTH. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities as a Selection Criterion for the salt tolerance of wheat cultivars irrigated by seawater. **Phyton**, v. 53, p. 153-165, 2013.

ANDERSON, D., PRASAD, K., STEWART, R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p. 1247–57, 1995.

AZOOZ, M. M. Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 11, n. 4, p. 343-350, 2009.

BARCET, G. L., DAUWE, R., GUY, R. D., SCHROEDER, W. R., SOOLANAYAKANAHALLY, R. Y., CAMPBELL, M. M., MANSFIELD, S. D. Investigating the drought-stress response of hybrid poplar genotypes by metabolite profiling. **Tree physiology**, v. 34, n. 11, p. 1203-1219, 2013.

BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry** 44, 276–87, 1971.

BOKSZCZANIN, K. L., FRAGKOSTEFANAKIS, S., BOSTAN, H., BOVY, A., CHATURVEDI, P., CHIUSANO, M. L., LI, H. Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 315, 2013.

BOWNE, J. B., ERWIN, T. A., JUTTNER, J., SCHNURBUSCH, T., LANGRIDGE, P., BACIC, A., ROESSNER, U. Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. **Molecular plant**, v. 5, n. 2, p. 418-429, 2012.

BRADFORD, M.N. 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. 248–54, 1976.

BRIKIS, C. J., ZAREI, A., CHIU, G. Z., DEYMAN, K. L., LIU, J., TROBACHER, C. P., SHELP, B. J. Targeted quantitative profiling of metabolites and gene transcripts associated with 4-aminobutyrate (GABA) in apple fruit stored under multiple abiotic stresses. **Horticulture research**, v. 5, n. 1, p. 61, 2018.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: Estrutura e Função de Órgãos Vegetativos**. Lavras: UFLA. 234 p., 2009.

CAVERZAN, A., CASASSOLA, A., BRAMMER, S. P. Antioxidant responses of wheat plants under stress. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, p. 1-6, 2016.

CHANCE, B., MAEHLEY, A.C., Assay of catalases and peroxidases. **Method. Enzymol.** v2, P. 764-775. 1995.

CONDE, A., REGALADO, A., RODRIGUES, D., COSTA, J. M., BLUMWALD, E., CHAVES, M. M., GERÓS, H. Polyols in grape berry: transport and metabolic adjustments as a physiological strategy for water-deficit stress tolerance in grapevine. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 3, p. 889-906, 2014.

CORREIA, B., HANCOCK, R. D., AMARAL, J., GOMEZ-CADENAS, A., VALLEDOR, L., & PINTO, G. C. Combined drought and heat activates protective responses in *Eucalyptus globulus* that are not activated when subjected to drought or heat stress alone. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 819, 2018

DAS, A., RUSHTON, P., ROHILA, J. Metabolomic profiling of soybeans (*Glycine max L.*) reveals the importance of sugar and nitrogen metabolism under drought and heat stress. **Plants**, v. 6, n. 2, p. 21, 2017.

DEL LONGO, O.T., GONZALEZ, C.A., PASTORI, G.M., TRIPPI, V.S. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell and Physiology**, 34, 1023–8, 1993.

DE PINTO, M. C., LOCATO, V., SGOBBA, A., DEL CARMEN ROMERO-PUERTAS, M., GADALETA, C., DELLEDONNE, M., & DE GARA, L. S-nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signaling in tobacco Bright Yellow-2 cells. **Plant Physiology**, v. 163, n. 4, p. 1766-1775, 2013

DEVI, R., KAUR, N., GUPTA, A. K. Potential of antioxidant enzymes in depicting drought tolerance of wheat (*Triticum aestivum L.*). **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 49. P257-265, 2012.

FANG, Y., XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, n. 4, p. 673-689, 2015.

FELLER, U. Drought stress and carbon assimilation in a warming climate:reversible and irreversible impacts. **Journal Plant Physiology**, 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA-SILVA, S. L., VOIGT, E. L., SILVA, E. N., MAIA, J. M., DE VASCONCELOS FONTENELE, A., SILVEIRA, J. A. G. High temperature positively

modulates oxidative protection in salt-stressed cashew plants. **Environmental and experimental botany**, v. 74, p. 162-170, 2011.

FORCHHAMMER, K. Glutamine signalling in bacteria. **Front Biosci**, v. 12, n. 358, p. 70, 2007.

FORD, K. L., CASSIN, A., BACIC, A. F. Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. **Frontiers in plant science**, v. 2, p. 44, 2011.

GALILI, G., TANG, G., ZHU, X., GAKIERE, B. Lysine catabolism: a stress and development super-regulated metabolic pathway. **Current opinion in plant biology**, v. 4, n. 3, p. 261-266, 2001.

GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K., Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309–14, 1977.

GROPPIA, M. D., BENAVIDES, M. P. Polyamines and abiotic stress: recent advances. **Amino acids**, v. 34, n. 1, p. 35, 2008.

GUERFEL, M., BACCOURI, O., BOUJNAH, D., CHAÏBI, W., & ZARROUK, M. Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 119, n. 3, p. 257-263, 2009.

HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., ALAM, M. M., ROYCHOWDHURY, R., FUJITA, M. Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**. v.14, p.9643-9684, 2013.

HOSSAIN, M. M., LAM, M. D., ZHANG, J. Responses in gas exchange and water status between drought-tolerant and -susceptible soybean genotypes with ABA application. **The Crop Journals**, v.3, p. 500-506, 2015.

KAN, C. C., CHUNG, T. Y., JUO, Y. A., HSIEH, M. H. Glutamine rapidly induces the expression of key transcription factor genes involved in nitrogen and stress responses in rice roots. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 731, 2015.

KAR, M., MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

KARNOVSKY, M.J.A. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**. v.27, p.137-138, 1965.

KEMPA, S., KRASENSKY, J., DAL SANTO, S., KOPKA, J., JONAK, C. A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. **PloS one**, v. 3, n. 12, p. e3935, 2008.

KEUNEN, E. L. S., PESHEV, D., VANGRONSVELD, J., VAN DEN ENDE, W. I. M., CUYPERS, A. N. N. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during

abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, cell & environment**, v. 36, n. 7, p. 1242-1255, 2013.

KHAN, N., BANO, A., RAHMAN, M. A., RATHINASABAPATHI, B., BABAR, M. A. UPLC-HRMS-based untargeted metabolic profiling reveals changes in chickpea (*Cicer arietinum*) metabolome following long-term drought stress. **Plant, cell & environment**, v. 42, n. 1, p. 115-132, 2019.

KIM, Y. M., HAN, Y. J., HWANG, O. J., LEE, S. S., SHIN, A. Y., KIM, S. Y., KIM, J. I. Overexpression of Arabidopsis translationally controlled tumor protein gene AtTCTP enhances drought tolerance with rapid ABA-induced stomatal closure. **Molecules and cells**, v. 33, n. 6, p. 617-626, 2012.

KLUMPEN, E., HOFFSCHRÖER, N., ZEIS, B., GIGENGACK, U., DOHMEN, E., PAUL, R. J. Reactive oxygen species (ROS) and the heat stress response of *Daphnia pulex*: ROS-mediated activation of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and heat shock factor 1 (HSF-1) and the clustered expression of stress genes. **Biology of the Cell**, v. 109, n. 1, p. 39-64, 2017.

KOUSSEVITZKY, S., SUZUKI, N., HUNTINGTON, S., ARMIJO, L., SHA, W., CORTES, D., MITTLER, R. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 49, p. 34197-34203, 2008.

KRASENSKY, J., & JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 4, p. 1593-1608, 2012.

LEA, P. J., SODEK, L., PARRY, M. A., SHEWRY, P. R., & HALFORD, N. G. Asparagine in plants. **Annals of Applied Biology**, v. 150, n. 1, p. 1-26, 2007.

LEHMANN, S., FUNCK, D., SZABADOS, L., RENTSCH, D. Proline metabolism and transport in plant development. **Amino acids**, v. 39, n. 4, p. 949-962, 2010

LIANG, X., ZHANG, L., NATARAJAN, S. K., & BECKER, D. F. Proline mechanisms of stress survival. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 9, p. 998-1011, 2013.

LIANG, X., DICKMAN, M. B., BECKER, D. F. Proline biosynthesis is required for endoplasmic reticulum stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 40, p. 27794-27806, 2014.

LIN, X. Y., YE, Y. Q., FAN, S. K., JIN, C. W., ZHENG, S. J. Increased sucrose accumulation regulates iron-deficiency responses by promoting auxin signaling in Arabidopsis plants. **Plant physiology**, v. 170, n. 2, p. 907-920, 2016.

LIU, L. X., XU, S. M., WANG, D. L., WOO, K. C. Accumulation of pinitol and other soluble sugars in water-stressed phyllodes of tropical *Acacia auriculiformis* in northern Australia. **New Zealand Journal of Botany**, v. 46, n. 2, p. 119-126, 2008.



LIU, C., ZHAO, L., YU, G. The dominant glutamic acid metabolic flux to produce  $\gamma$ -amino butyric acid over proline in *Nicotiana tabacum* leaves under water stress relates to its significant role in antioxidant activity. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, n. 8, p. 608-618, 2011.

LOKHANDE, V. H., SUPRASANNA, P. Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance. In: **Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change**. p. 29-56, 2012

MAKBUL, S., SARUHAN GÜLER, N., DURMUS, N., GÜVEN, S. Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. **Turkish Journal of Botany**. v.35, p.369-377, 2011.

MALATRASI, M., CORRADI, M., SVENSSON, J. T., CLOSE, T. J., GULLI, M., MARMIROLI, N. A branched-chain amino acid aminotransferase gene isolated from *Hordeum vulgare* is differentially regulated by drought stress. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, n. 6, p. 965-976, 2006.

MERCHANT, A., RICHTER, A., POPP, M. ADAMS, M. Targeted metabolite profiling provides a functional link among eucalypt taxonomy, physiology and evolution. **Phytochemistry**, 67, 402-408, 2006.

MUTAVA, R.N., PRINCE, S.J., SYED, N.H., SONG, L., VALLIYODAN, B., CHEN, W., NGUYEN, H.T. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: A comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. **Plant Physiol. Biochem.** v.86, p. 109–120, 2015.

NAKANO, Y., ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant, Cell and Physiology**, v.22, p. 867–80, 1981.

NANKISHORE, A.; FARRELL, A.D. The response of contrasting tomato genotypes to combined heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**. Guyana, v.202, p.75-82, 2016.

O'BRIEN, T. P., FEDER, N., MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue **O. Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OCHUODHO, T. O., LANTZ, V. A., OLALE, E. Economic impacts of climate change considering individual, additive, and simultaneous changes in forest and agriculture sectors in Canada: A dynamic, multi-regional CGE model analysis. **Forest Policy and Economics**, v.63, p. 43-51, 2016.

OLIVEIRA, L. F., NAVARRO, B. V., CERRUTI, G. V., ELBL, P., MINOCHA, R., MINOCHA, S. C., DOS SANTOS, A. L. W., FLOH, E. I. S. Polyamine-and Amino Acid-Related Metabolism: The Roles of Arginine and Ornithine are Associated with the Embryogenic Potential. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 5, p. 1084-1098, 2018

PANDEY, P., RAMEGOWDA, V., SENTHIL-KUMAR, M. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations:

physiological and molecular mechanisms. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 723, 2015.

PASSARINHO, J. A., LAMOSAS, P., BAETA, J. P., SANTOS, H., RICARDO, C. P. Annual changes in the concentration of minerals and organic compounds of *Quercus suber* leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 127, n. 1, p. 100-110, 2006.

PEREMARTI, A., BASSIE, L., CHRISTOU, P., CAPELL, T. Spermine facilitates recovery from drought but does not confer drought tolerance in transgenic rice plants expressing *Datura stramonium*S-adenosylmethionine decarboxylase. **Plant molecular biology**, v. 70, n. 3, p. 253-264, 2009.

PING, M.A.; TUAN-HUI, B, A.I.; FENG-WANG, M.A. Effects of progressive drought on photosynthesis and partitioning of absorbed light in apple trees. **Journal of Integrative Agriculture**, Yangling, v.14, n.4, p.681-690, 2015.

PODLEŠÁKOVÁ, K., UGENA, L., SPÍCHAL, L., DOLEŽAL, K., DE DIEGO, N. Phytohormones and polyamines regulate plant stress responses by altering GABA pathway. **New biotechnology**, 2018.

POLIZEL, A. M., MEDRI, M. E., NAKASHIMA, K., YAMANAKA, N., FARIAS, J. R. B., OLIVEIRA, M. C. N., MARIN, S. R. R., ABDELNOOR, M. A., MARCELINO-GUIMARÃES, F. C., FUNGANTI, R., RODRIGUES, F. A., STOLF-MOREIRA, R., BENEVENTI, M. A., ROLLA, A. A. P., NEUMAIER, N., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, J. F. C., NEPOMUCENO, A. L. Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with rd29A:AtDREB1A for the improvement of drought tolerance. **Genetics and Molecular Research**. v.10, p.3641-3656, 2011.

RAMEGOWDA, V., & SENTHIL-KUMAR, M. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: mechanistic understanding from drought and pathogen combination. **Journal of plant physiology**, v. 176, p. 47-54, 2015.

RAVANEL, S., BLOCK, M. A., RIPPERT, P., JABRIN, S., CURIEN, G., RÉBEILLÉ, F., & DOUCE, R. Methionine metabolism in plants chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import s-adenosylmethionine from the cytosol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 21, p. 22548-22557, 2004.

RENAULT, H., ROUSSEL, V., EL AMRANI, A., ARZEL, M., RENAUULT, D., BOUCHEREAU, A., DELEU, C. The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 20, 2010.

SALEM-FNAYOU, A. B., BOUAMAMA, B., GHORBEL, A., MLIKI, A. Investigations on the leaf anatomy and ultrastructure of grapevine (*Vitis vinifera*) under heat stress. **Microscopy research and technique**, v. 74, n. 8, p. 756-762, 2011.

SAFRONOV, O., KREUZWIESER, J., HABERER, G., ALYOUSIF, M. S., SCHULZE, W., AL-HARBI, N., ARAB, L., ACHE, P., STEMPFL, T., KRUSE, J., MAYER, K. X., HEDRICH, R., RENNENBERG, H., SALOJÄRVI, J.,

KANGASJÄRVI, J. Detecting early signs of heat and drought stress in *Phoenix dactylifera* (date palm). **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0177883, 2017.

SENTELHAS, P.C., BATTISTI, R., CÂMARA, G.M.S., FARIAS, J.R.B., HAMPF, A.C., NENDEL, C. The soybean yield gap in Brazil – magnitude, causes and possible solutions for sustainable production’, **The Journal of Agricultural Science**. v. 153, p. 1394–1411, 2015.

SEWELAM, N., OSHIMA, Y., MITSUDA, N., OHME-TAKAGI, M. A step towards understanding plant responses to multiple environmental stresses: a genome-wide study. **Plant, cell & environment**, v. 37, n. 9, p. 2024-2035, 2014.

SHAKEEL, S., HAQ, N. U., HECKATHORN, S. A., HAMILTON, E. W., LUTHE, D. S. Ecotypic variation in chloroplast small heat-shock proteins and related thermotolerance in *Chenopodium album*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 898-908, 2011.

SIDDAPPA, S., BASRUR, V., RAI, V. R., MARATHE, G. K. Biochemical and functional characterization of an atypical plant l-arginase from Cilantro (*Coriandrum sativum* L.). **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 844-856, 2018.

SIEBERS, M.H., YENDREK, C.R., DRAG, D., LOCKE, A.M., ACOSTA, L.R., LEAKEY, A.D.B., AINSWORTH, E.A., BERNACCHI, C.J., ORT, D.R. Heat waves imposed during early pod development in soybean (*Glycine max*) cause significant yield loss despite a rapid recovery from oxidative stress. **Global Change Biology**, v.21, p.3114-3125, 2015.

SINGH, V. P., SINGH, S., KUMAR, J., & PRASAD, S. M. Investigating the roles of ascorbate-glutathione cycle and thiol metabolism in arsenate tolerance in ridged *Luffa* seedlings. **Protoplasma**, v. 252, n. 5, p. 1217-1229, 2015.

SOFO, A., SCOPA, A., NUZZACI, M., VITTI, A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 13561-13578, 2015.

SONG, H., XU, X., WANG, H., WANG, H., TAO, Y. Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid alleviates oxidative damage caused by aluminium and proton stresses on barley seedlings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 9, p. 1410-1416, 2010.

SOUSA, D. D., LOBATO, E. **Correção do solo e adubação da cultura da soja. Planaltina: Embrapa-CPAC**, n.33, p.30, 1996.

STOLF, R., MEDRI, M. E., PIMENTA, J. A., BOEGER, M. R. T., DIAS, J., LEMOS, N. G., FARIAS, J. R. B. Morpho-anatomical and micromorphometrical evaluations in soybean genotypes during water stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1321-1331, 2009.

STREETER, J. G., LOHNES, D. G., & FIORITTO, R. J. Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, n. 4, p. 429-438, 2001.

TAYLOR, N. L., DAY, D. A., MILLAR, A. H. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 394, p. 1-10, 2004.

VILE, D., PERVENT, M., BELLUAU, M., VASSEUR, F., BRESSON, J., MULLER, B., SIMONNEAU, T. Arabidopsis growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects?. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 4, p. 702-718, 2012.

WIMALASEKERA, R., TEBARTZ, F., SCHERER, G. F. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. **Plant Science**, v. 181, n. 5, p. 593-603, 2011.

YADAV, B. S., LAHAV, T., REUVENI, E., CHAMOVITZ, D. A., FREILICH, S. Multidimensional patterns of metabolic response in abiotic stress-induced growth of *Arabidopsis thaliana*. **Plant molecular biology**, v. 92, n. 6, p. 689-699, 2016.

ZANDALINAS, S. I., BALFAGÓN, D., ARBONA, V., GÓMEZ-CADENAS, A. Modulation of antioxidant defense system is associated with combined drought and heat stress tolerance in citrus. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 953, 2017.

ZEMANOVÁ, V., PAVLÍK, M., PAVLÍKOVÁ, D., TLUSTOŠ, P. The significance of methionine, histidine and tryptophan in plant responses and adaptation to cadmium stress. **Plant, Soil and Environment**, v. 60, n. 9, p. 426-432, 2014.

ZEMANOVÁ, V., PAVLÍK, M., & PAVLÍKOVÁ, D. Cadmium toxicity induced contrasting patterns of concentrations of free sarcosine, specific amino acids and selected microelements in two *Noccaea species*. **PLoS one**, v. 12, n. 5, p. e0177963, 2017.

ZHANG, J-H.; HUANG, W.-D.; LIU, Y-P.; PAN, Q-H. Effects of temperature acclimation pretreatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) under cross-temperature stresses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 8, p. 959-970, 2005.

ZHANG, J. Y., CRUZ DE CARVALHO, M. H., TORRES-JEREZ, I. V. O. N. E., KANG, Y. U. N., ALLEN, S. N., HUHMAN, D. V., UDVARDI, M. K. Global reprogramming of transcription and metabolism in *Medicago truncatula* during progressive drought and after rewatering. **Plant, cell & environment**, v. 37, n. 11, p. 2553-2576, 2014.

ZHANG, C., SHI, S., LIU, Z., YANG, F., YIN, G. Drought tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties is associated with enhanced antioxidative protection and declined lipid peroxidation. **Journal of plant physiology**, v. 232, p. 226-240, 2019.

ZHAO, X., HUANG, L., ZHANG, X., LI, Z., & PENG, Y. Effects of heat acclimation on photosynthesis, antioxidant enzyme activities, and gene expression in orchard grass under heat stress. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13564-13576, 2014.

## 6. CONCLUSÃO GERAL

- O déficit hídrico afetou negativamente a fotossíntese de plantas de soja, no entanto, esse efeito foi exacerbado quando imposto juntamente com a alta temperatura. Sob condição combinada de alta temperatura e déficit hídrico, as cultivares Desafio e 7739 demonstraram que o ajustamento osmótico foi um fator importante na manutenção dos processos fotossintéticos. A combinação de estresses afetou negativamente a anatomia foliar da cultivar 7011, sugerindo maior sensibilidade aos estresses. O maior nível do aminoácido prolina e a maior atividade das enzimas APX e POX sugerem estratégia de tolerância ao estresse combinado. Os polióis pinitol e *D-chiro-inositol* também amenizaram os danos oxidativos celulares nas plantas de soja sob estresse combinado.