

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO- UNAERP
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EFEITOS DO ESTRESSE SALINO EM GENÓTIPOS DE SOJA:
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, BIOQUÍMICOS E
MOLECULARES

LUCAS DE FARIA NOGUEIRA

RIBEIRÃO PRETO
2020

LUCAS DE FARIA NOGUEIRA

Efeitos do estresse salino em genótipos de soja: Avaliação de parâmetros biométricos, bioquímicos e moleculares.

Dissertação apresentada à Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para a obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sonia Marli Zingaretti

RIBEIRÃO PRETO
2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

N778e Nogueira, Lucas de Faria, 1994
Efeitos do estresse salino em genótipos de soja: avaliação
de parâmetros biométricos, bioquímicos e moleculares / Lucas
de Faria Nogueira. - - Ribeirão Preto, 2020.
46 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Marli Zingaretti.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2020.

1. Metabolismo antioxidante. 2. Tolerância. 3. ERO. 3. RT-qPCR.
I. Título.

CDD 660

LUCAS DE FARIA NOGUEIRA

**EFEITOS DO ESTRESSE SALINO EM GENÓTIPOS DE SOJA: AVALIAÇÃO DE
PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES**

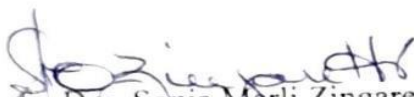
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

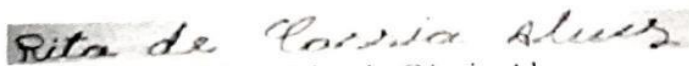
Data da defesa: 29 de julho de 2020

Resultado: Aprovado

BANCA EXAMINADORA


Prof.ª. Dra. Sonia Marli Zingaretti
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Prof.ª. Dra. Adriana Aparecida Lopes
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Prof.ª. Dra. Rita de Cássia Alves
Instituto Nacional do Semiárido - INSA

**RIBEIRÃO PRETO
2020**

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos Renan Gonçalves da Silva e Joice de Oliveira Leite Silva, pela amizade, carinho, ensinamentos e conselhos e pelos bons momentos de alegria e por toda ajuda em experimentos e na escrita. Vocês são pessoas que vou levar para a vida toda.

Às pessoas que contribuíram no meu mestrado, Marilena Heredia, Simone Cristina Zampollo Torres, Juliana da Silva Coppede, muito obrigado por toda a ajuda em experimentos, e principalmente por me acalmar nos momentos de desespero e angústia.

Às pessoas que contribuíram no meu mestrado, Priscila Lupino Gratão, Mirela Vantini Checchio, Sônia Maria Carregari, muito obrigado por toda a ajuda nos experimentos.

À minha família: mãe Sonia, avó Josefina, e tias Cida, Fátima, Maria José, por sempre terem cuidado de mim, e apoio durante toda minha vida. Por todos os conselhos, paciência e gentileza. Tia Cida: “Eu terminei” obrigado por tudo.

Aos meus colegas de Laboratório Mariana, Thiago e Everton pelos conhecimentos compartilhados e ajuda nos momentos de dificuldades.

À minha orientadora Sonia Marli Zingaretti pela orientação, incentivo, por todo conhecimento, compreensão e aprendizado proporcionado.

À Universidade de Ribeirão Preto pela oportunidade de realização do curso de mestrado, em especial à Unidade de Biotecnologia pela estrutura para o desenvolvimento do projeto.

A todos os docentes do Programa de pós-graduação em Biotecnologia por todo ensinamento proporcionado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos: MUITO OBRIGADO!

Resumo

A salinidade é um dos principais fatores limitantes na produção da soja. O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos regulados no estresse salino é fundamental para o desenvolvimento de estratégias que objetivam a obtenção de genótipos mais tolerantes. Nesse estudo, com base numa seleção preliminar, dois genótipos de soja foram comparados quanto aos efeitos da salinidade nas respostas do metabolismo antioxidante e no crescimento. Os experimentos foram conduzidos em sistema hidropônico, consistindo de um screening envolvendo os genótipos BRS 511, BRS 232 e Desafio RR, submetidos a 0 e 100 mM de NaCl; e um segundo experimento, no qual os genótipos BRS 232 e Desafio RR foram submetidos a 0, 75 e 150 mM de NaCl. Após 7 dias de exposição ao estresse salino, peroxidação lipídica, atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), o perfil de expressão por RT-qPCR dos genes *alternative oxidase (AOX)* e *thioredoxina (TRX)*, massa seca, pigmentos fotossintéticos, crescimento e acúmulo de Na e K foram avaliados. Inicialmente, selecionamos os genótipos contrastantes (BRS 232 e Desafio RR) com base no crescimento e acúmulo de Na e K nas folhas e raízes. Plantas do genótipo BRS 232 tiveram o crescimento prejudicado e acumularam mais Na em 100 mM de NaCl. Plantas do genótipo Desafio RR (tolerante) com 150 mM de NaCl tiveram o crescimento menos afetado, o que pode ser atribuído as alterações de respostas antioxidantes, como o aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e a expressão positiva dos genes *AOX* e *TRX*. Os resultados indicam que o entendimento do controle do estresse oxidativo por mecanismos antioxidantes, pode ser fundamental para a seleção e o desenvolvimento de genótipos de soja mais tolerantes ao estresse salino.

Palavras-chave: Metabolismo antioxidante, tolerância, ERO, RT-qPCR

ABSTRACT

Salinity is one of the main limiting factors in soybean production. The knowledge of the biochemical and genetic mechanisms regulated in saline stress is essential for the development of strategies that aim to obtain more tolerant genotypes. In this study, based on a preliminary selection, two soybean genotypes were compared regarding the effects of salinity on the responses of antioxidant metabolism and growth. The experiments were conducted in a hydroponic system, consisting of a screening involving the genotypes BRS 511, BRS 232 and Desafio RR, submitted to 0 and 100 mM NaCl; and a second experiment, in which the BRS 232 and Desafio RR genotypes were subjected to 0, 75 and 150 mM NaCl. After 7 days of exposure to salt stress, lipid peroxidation, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activity, the RT-qPCR expression profile of the *alternative oxidase (AOX)* and *thioredoxin (TRX)* genes, dry matter, pigments photosynthetic, growth and accumulation of Na and K were evaluated. Initially, we selected the contrasting genotypes (BRS 232 and Desafio RR) based on the growth and accumulation of Na and K in the leaves and roots. Plants of the BRS 232 genotype had impaired growth and accumulated more Na in 100 mM NaCl. Plants of the Desafio RR genotype (tolerant) with 150 mM NaCl had less affected growth, which can be attributed to changes in antioxidant responses, such as increased activity of the enzymes SOD, CAT and the positive expression of the *AOX* and *TRX* genes. The results indicate that the understanding of the control of oxidative stress by antioxidant mechanisms, may be fundamental for the selection and development of soybean genotypes more tolerant to salt stress.

Keywords: Antioxidant metabolism, tolerance, ROS, RT-qPCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da salinidade nos genótipos de soja BRS 232, BRS 511 e Desafio RR depois de 7 de tratamento.....	19
Figura 2. Morfologia das folhas após 7 dias de tratamento com NaCl, (A) genótipo BRS 232, (B) genótipo Desafio RR.	21
Figura 3. Efeito da salinidade em parâmetros de crescimento nos genótipos BRS 232 e Desafio RR	22
Figura 4. Efeito da salinidade nos pigmentos fotossintéticos	23
Figura 5. Carboidratos solúveis totais nos genótipos BRS 232 e Desafio RR.....	24
Figura 6. Conteúdo relativo de água das folhas	25
Figura 7. Efeitos do estresse oxidativo em folhas dos genótipos BRS 232 e Desafio RR .	26
Figura 8. Atividade de enzimas do metabolismo antioxidante em folhas dos genótipos BRS 232 e Desafio RR.....	27
Figura 9. Expressão relativa dos genes AOX2 e TRX em folhas dos genótipos BRS 232 e Desafio RR	28
Figura 10. Comparação morfológica, bioquímica e aspecto genéticos entre folhas de soja dos genótipos BRS 232 e Desafio RR sob estresse salino de 7 dias	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers específicos usados no RT-qPCR.....	17
Tabela 2. Wt% dos elementos quantificados por EDS	20
Tabela 3. Correlação de Pearson dos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e genéticos ...	30

LISTA DE ABREVIACOES

APX – Peroxidase de ascorbato (EC 1.11.1.1)

AOX - Oxidase alternativa

ATP – Adenosina trifosfato

CAT – Catalase (EC1.11.1.6)

CRA – Conteúdo relativo de gua

RNA –cido ribonucléico

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FAO – Food and Agriculture Organization

GPX – Peroxidase de glutathiona (EC 1.11.1.9)

GR – Redutase de glutathiona

MDA – Aldeído Malnico, cido malondialdeído, malondialdeído

mETC - Cadeia de transporte de elétrons mitocondriais

MF – Massa fresca

MS– Massa seca

pH – Potencial de hidrogênio

PRX- Peroxiredoxina

SOD - Dismutase de superóxido (EC 1.15.1.1)

TBA – cido tiobarbitúrico

TRX –Tioredoxina (EC 1.8.1.9)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Soja	7
2.2 Estresse Salino	8
2.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO).....	9
2.4 Estresse Oxidativo	10
2.5 Mecanismos de defesa antioxidante	10
2.6 Oxidase alternativa	11
2.7 Tioredoxina	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo Geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1 Material Biológico	12
4.2 Experimento I (Screening: seleção de genótipos contrastantes)	13
4.3 Massa seca.....	13
4.4 Conteúdo relativo de água.....	13
4.5 Eficiência do fotossistema II	13
4.6 Quantificação de elementos por EDS	14
4.7 Experimento II.....	14
4.8 Morfologia e taxa de alongamento	14
4.9 Pigmentos fotossintéticos.....	15
4.10 Carboidratos solúveis totais.....	15
4.11 Conteúdo de H ₂ O ₂ e peroxidação lipídica	15
4.12 Atividade de enzimas antioxidantes	16
4.12.1 Atividade da Superóxido dismutase	16
4.12.2 Atividade da Catalase	16

4.13	Extração do RNA e RT-qPCR.....	17
4.14	Análise dos resultados.....	17
5.	RESULTADOS	18
5.1	Experimento I: Seleção dos genótipos.....	18
5.2	Experimento II:.....	20
5.3	Morfologia foliar	20
5.4	Parâmetros biométricos.....	21
5.5	Conteúdo de pigmentos fotossintéticos.....	22
5.6	Conteúdo de carboidratos solúveis totais.....	23
5.7	Conteúdo relativo de água.....	24
5.8	Conteúdo de H ₂ O ₂ e peroxidação lipídica.....	25
5.9	Atividade de enzimas antioxidantes	26
5.10	RT-qPCR, expressão relativa dos genes <i>AOX2</i> e <i>TRX</i>	27
5.12	Correlação de Pearson.....	28
6.	DISCUSSÃO	31
7.	CONCLUSÃO.....	35

1. INTRODUÇÃO

O cultivo da soja (*Glycine max* L.) tem grande importância na economia mundial, devido a sua alta demanda como fonte de proteína na alimentação e na produção de óleo vegetal e biocombustíveis. Em 2018, a produção mundial total de soja foi de 348,7 milhões de toneladas, sendo o Brasil um dos maiores produtores com 117,8 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2020). No Brasil, a comercialização da soja é a atividade econômica de maior crescimento, e as exportações para China tornaram-se uma importante fonte de reservas cambiais e de crescimento econômico (GIRAUDO, 2019).

A demanda pelo cultivo de soja e o seu aumento dos negócios comerciais estão diretamente relacionada à expansão de áreas cultiváveis. No entanto, determinados fatores ambientais podem limitar essa expansão. A salinidade do solo é um dos principais fatores abióticos que limitam a produtividade das culturas. E sendo um problema que atinge 20% das terras irrigadas em todo o mundo, os danos provocados pelo estresse salino podem causar perdas econômicas anuais de até US \$ 27,3 bilhões (QADIR et al., 2014). As plantas de soja pertencem ao grupo das culturas menos tolerantes à salinidade do solo. Por ser sensível ao estresse salino a sua produção pode sofrer reduções de até 40% em regiões salinas (YASMIN et al., 2020).

O estresse por salinidade prejudica o desenvolvimento e produtividade das plantas, ao induzir o estresse osmótico e o estresse iônico que inibem a captação de água e nutrientes pelas raízes, a germinação, a fotossíntese, induz danos celulares e metabólicos. Os íons Na^+ e Cl^- em excesso afetam negativamente o metabolismo e induzem a toxicidade nas plantas. Nutrientes essenciais também sofrem influências na sua absorção devido a concentração de sal, elementos como cálcio (Ca), potássio (K) e magnésio (Mg) deixam de ser absorvidos, assim prejudicando algumas reações bioquímicas, a exemplo do Mg, que quando ausente, pode acarretar problemas na síntese de clorofilas e dessa forma podendo agravar os danos no aparato fotossintético (NAJAR et al., 2018; LIN et al., 2018).

Como um dos efeitos da salinidade é o desajuste osmótico que leva a baixa retenção de água nas plantas, genótipos com maior capacidade de tolerância ao estresse tendem a acumular açúcares como tentativa de ajuste osmótico, estabilizar pigmentos fotossintéticos, manter as funções de transporte de elétrons na reação de luz e absorção de água sob estresse salino (CHA-UM et al., 2009; YANG et al., 2020).

O estresse salino induz o vazamento de elétrons por causar super-redução na cadeia de transporte de elétrons mitocondriais (mETC), dessa forma gerando uma das principais

fontes de superóxido (O_2^-), e com isso aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e radical hidroxila (OH^-) (JACOBY et al., 2011).

Nas plantas, as ERO funcionam como parte integrante de diversas vias hormonais, fisiológicas e como moléculas de sinalização, no entanto, o seu excesso é altamente tóxico e leva a distúrbios metabólicos, degradação de proteínas e danos celulares. Os complexos I e III da mETC se tornam os principais locais produtores de ERO durante o estresse. Nas plantas, a mETC contém uma via respiratória alternativa que consiste na oxidase alternativa (AOX) e a desidrogenase do tipo II NAD(P)H. A via de respiração alternativa atua como desvio da mETC e não contribui para o bombeamento de prótons e na síntese de ATP. Dessa forma, a AOX pode prevenir o excesso de redução do pool de ubiquinona, evitando a formação de ERO nas mitocôndrias, assim como converte o O_2 diretamente em água (SAKO et al., 2020). Em situações em que ocorrem a elevada formação de EROs, as plantas recorrem para a sua eliminação através de vias antioxidantes, podendo ser elas mediadas por enzimas com a superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidase (GPOX; EC 1.11.1.7), ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11), tioredoxina (TRX; EC 1.8.1.9), entre outras (GRATÃO et al, 2015; CALDERÓN et al., 2018).

Sabendo da importância dessas alterações nas plantas frente aos efeitos desencadeados pela salinidade no desenvolvimento da soja, as tentativas de melhoramento da tolerância dessa cultura à salinidade são essenciais para o fornecimento de matéria-prima e produção sustentável de alimentos. Portanto, nesse estudo, investigamos através de um experimento preliminar (screening) os efeitos do estresse salino em três genótipos de soja e posteriormente, mostramos através da comparação dos dois genótipos contrastantes (BRS 232 e Desafio RR) que o estresse oxidativo no genótipo tolerante é regulado por componentes do metabolismo antioxidante.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Soja

A soja cultivada (*Glycine max*) é originária da China e é uma Fabaceae, do gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* e a forma cultivada *Glycine max* (L) Merrill (ANDERSON et al., 2019). Devido a sua grande utilidade na produção de óleos, na alimentação e como

bicombustível é considerada uma das principais plantas de interesse econômico mundial (Woyann et al., 2019).

No ranking de produção mundial, o Brasil é o segundo maior produtor, estando atrás apenas dos EUA. Em 2018, a sua produção no Brasil chegou a 117,8 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2020). No Brasil, o cultivo da soja ganhou importância devido sua alta capacidade produtiva e demanda na exportação para China. Por esse motivo é considerada como fonte de reservas cambiais e atividade de crescimento econômico para o Brasil (GIRAUDO, 2019).

Por ser considerada uma planta de dias curtos, sua adaptação é dependente do fotoperíodo e da disponibilidade hídrica adequada (NICO et al., 2019). Entretanto, é variável a demanda de água, dependendo de cada genótipo, condições climáticas e estágio fenológico (FRUKH et al., 2019; FIDANTEMIZ et al., 2019). E nesse sentido os programas de melhoramento têm trabalhado para produzir genótipos mais adaptados as diversas condições de cultivo. Utilizando-se de seleção e melhoramento genético surgiram novos genótipos mais tolerantes às diferentes latitudes e condições climáticas. Possibilitando dessa forma o seu plantio em diversas regiões (LI et al., 2020).

Por ainda ser altamente dependente das condições climáticas, a produção desta cultura é afetada de forma negativa por fatores abióticos, como a salinidade, que é considerada um dos fatores mais limitantes no desempenho e a produtividade das plantas em todo o mundo (ZHAN et al., 2019). Segundo Sabagh et al., (2019), estresse salino pode diminuir o rendimento médio das culturas em até 40%.

2.2 Estresse Salino

As condições ambientais podem ser extremamente desfavoráveis para agricultura. Os agentes estressores interferem em todas as etapas do ciclo das plantas, podendo atingir a germinação, crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas (DUBEY et al., 2019, SABAGH et al., 2019).

O estresse salino afeta severamente a maioria das culturas agrícolas. Estima-se que anualmente US\$ 27,3 bilhões são perdidos em decorrência desse estresse, sendo a principal perda econômica um reflexo da redução dos lucros pelo baixo rendimento. As perdas econômicas provocadas podem diferir entre os países e regiões, entretanto, são especialmente agravadas nas áreas áridas e semiáridas (QADIR et al., 2014; MUNNS & GILLIHAM, 2015).

A salinidade pode ser considerada como um dos processos de degradação mais prejudiciais que afetam o solo, e está entre as principais causas de desertificação (ROMERO-MUNAR et al., 2019). Apesar de ser um processo natural, a salinização do solo pode ser intensificada pela atividade agrícola, principalmente pela irrigação com águas salinas. Outros fatores que podem agravar o problema são mudanças edafoclimáticas, como a elevação da temperatura que promove um aumento na evapotranspiração e reduções na lixiviação do sal (JIANG et al., 2019)

O estresse salino é considerado como o estresse de maior complexidade, por ser um indutor direto e indireto de outros estresses, como o hídrico, iônico, nutricional e oxidativo (RIAZ et al., 2019).

Em decorrência da concentração de sal o solo tem seu potencial osmótico reduzido, o que acarreta na incapacidade da planta de regular o potencial hídrico de suas células, levando a perda de turgor celular e também prejuízos em processos metabólicos dependentes de água, em especial a fotossíntese e respiração celular (BAI et al., 2019).

Além disso, o excesso de íons, principalmente Na^+ e Cl^- , afetam negativamente o metabolismo das plantas, e o desequilíbrio de íons nos tecidos induz a toxicidade nas plantas (SHABALA, 2000; MARSCHNER, 2011; ROMERO-MUNAR, 2019). Os íons Na^+ podem se acumular a níveis que incitem efeitos citotóxicos causando desequilíbrios osmóticos nos tecidos, células e compartimentos subcelulares. O acúmulo e os danos são maiores nos tecidos aéreos, pois os íons sódio são entregues como solutos no fluxo de transpiração (MUNNS & GILLIHAM, 2015).

A absorção de nutrientes essenciais também sofre influência da concentração de sal (IQBAL et al., 2015). Elementos como magnésio (Mg), cálcio (Ca), potássio (K) e fósforo (P) deixam de serem absorvidos e conseqüentemente algumas reações bioquímicas são prejudicadas. A exemplo do Mg, um dos principais elementos estruturais da clorofila, quando ausente, pode acarretar na diminuição desse pigmento e dessa forma podendo agravar os danos ao aparato fotossintético (NEMATİ et al., 2011; NAJAR et al., 2018).

2.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Espécies reativas de oxigênio (ERO) é o termo utilizado para os derivados de oxigênio molecular que ocorrem normalmente na vida aeróbica. Sendo o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e hidroxila (OH^-) as formas mais comuns encontradas nas células (SIES & JONES, 2020).

As EROs em níveis normais atuam como sinalizadores celulares e sistêmicos em animais e plantas (STIER et al., 2019; GUTIÉRREZ et al., 2019; KÜTÜK et al., 2019).

Nas plantas, as ERO funcionam como parte integrante de diversas vias hormonais, fisiológicas e de desenvolvimento, além de participarem de forma crucial nas respostas de defesa e aclimação aos diferentes estresses bióticos e abióticos (FICHMAN et al., 2019; SMIRNOFF & ARNAUD, 2019).

2.4 Estresse Oxidativo

O aumento na produção de ERO e a ineficiência na sua eliminação por vias do sistema antioxidante provocam severos danos celulares e prejuízos em processos metabólicos e fisiológicos, ocasionando uma forma de estresse comumente conhecido como “estresse oxidativo” (GRATÃO et al., 2015).

Em geral, a produção excessiva de ERO é proveniente de alterações na homeostase redox de organelas como as mitocôndrias e cloroplastos, que podem estar sofrendo prejuízos na respiração aeróbica, no transporte de elétrons durante a atividade fotossintética, assim como danos no aparato fotossintético (LIMA et al., 2018; MA et al., 2018; STIER et al., 2019).

As mitocôndrias e cloroplastos são organelas fundamentais no estresse oxidativo, atuando como umas das principais produtoras de superóxido decorrentes de vazamentos da cadeia de transporte de elétrons (ETC) (ANTONUCC et al., 2019; HUANG et al., 2019). Contudo, pode ser regulado pelas oxidases terminais de cadeia de elétrons, como a oxidase alternativa (AOX) e oxidase terminal da plastoquinona (PTOX) (NOCTOR et al., 2018; FOYER, 2018; MURIK et al., 2019; HE et al., 2019; FANELLO et al., 2020).

Os efeitos do estresse oxidativo ocorrem inicialmente pela degradação em cadeia da membrana plasmática, pelos efeitos deletérios nas estruturas e atividades de enzimas, assim como, danos as principais organelas celulares e aos ácidos nucleicos (SIES & JONES, 2020). Outras consequências dos efeitos das ERO são em processos metabólicos e fisiológicos necessários para a produção e sobrevivência das plantas que são severamente comprometidos, acarretando em drásticas perdas agronômicas (DING et al., 2018).

2.5 Mecanismos de defesa antioxidante

A eliminação de ERO pelo sistema antioxidante, que pode ser mediado por meios enzimáticos e não enzimáticos, pode restabelecer a homeostase redox (GRATÃO et al.,

2012). Sendo assim, um aumento na atividade dos sistemas antioxidantes poderia implicar na redução dos efeitos nocivos oriundos das ERO (SAIRAM et al., 2002; ELKELISH et al., 2019).

Algumas enzimas chaves regulam processos importantes no metabolismo redox, sendo as principais, a oxidase alternativa (AOX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR), peroxirredoxina (PRX), tioredoxina (TRX). Estas participam da eliminação ERO, como a SOD que dismuta o superóxido em peróxido de hidrogênio, e as peroxidases que convertem o H₂O₂ em água e oxigênio. Entretanto, essas enzimas também desempenham outras funções vitais (GRATÃO et al, 2015; BARCELOS et al., 2018; DING et al., 2018; BORJAS-VENTURA et al., 2020).

2.6 Oxidase alternativa

A enzima oxidase alternativa (AOX) é uma oxidase terminal de cadeia de elétrons, sendo uma das principais vias de redução de superóxido (O₂), através da regulação de vazamentos da cadeia de transporte de elétrons (DING et al., 2018; BOROVIK & GRABELNYCH, 2018).

Nesse processo, a AOX também atua como facilitador para a sinalização de moléculas que transmitem o status metabólico das mitocôndrias para o núcleo, portanto, são capazes também de influenciar a expressão gênica nuclear. Dessa forma, a sinalização mediada por AOX e as suas atividades metabólicas são essenciais nas respostas aos estresses bióticos e abióticos (ZHEN-HUA et al., 2012; VICENTINI et al., 2019; ÜNLÜ et al., 2019).

A AOX além de estar envolvida da manutenção da homeostase redox, regula importantes processos celulares, como sinalização para expressão de genes de defesa e na regulação da respiração e fotossíntese (DEL-SAZ et al., 2016).

2.7 Tioredoxina

As tioredoxinas (TRXs) são proteínas pequenas que contêm um grupo dissulfeto ativo redox dentro de seu domínio catalítico, sendo amplamente distribuídas na maioria das células está envolvida em uma variedade de reações redox celulares, e por meio do fornecimento de elétrons do NADPH regulam uma variedade de vias de sinalização

metabólica e participam do reparo de proteínas, além de atuarem como peroxidases na defesa antioxidante (DA FONSECA-PEREIRA et al., 2019; LI et al., 2019).

As tioredoxinas desempenham papel importante nas respostas de defesa das plantas contra os estresses (NIETZEL et al., 2017), atuando com os sistemas de glutathione/GRX, as TRX são reguladoras do status de dissulfeto de tiol (NOCTOR et al., 2018; WEN et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Seleção de genótipos de soja contrastantes (sensível e tolerante) em relação ao estresse salino, através da identificação de possíveis mecanismos de resposta mediados por alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares.

3.2 Objetivos específicos

- i. Identificar as respostas associadas à capacidade de tolerância da soja frente ao estresse salino;
- ii. Analisar os mecanismos antioxidantes, mediante determinação da atividade enzimática e expressão dos genes *AOX2* e *TRX*;
- iii. Correlacionar as informações de alterações biométricas e bioquímicas com os dados de atividade enzimática e de expressão gênica

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação na Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto – SP, Brasil, e conduzidos em condições controladas, temperatura de $25,8 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $75 \pm 10\%$. As sementes de soja dos genótipos BRS 232, BRS 511 e Desafio RR foram germinadas em bandejas com substrato orgânico Carolina Soil (70% turfa de Sphagno + 30% vermiculita + calcário). As plantas foram mantidas em substrato durante 22 dias até sua transferência para o sistema hidropônico.

4.2 Experimento I (Screening: seleção de genótipos contrastantes)

Plantas com crescimento similar foram transferidas para o sistema hidropônico instalado em recipientes plásticos com capacidade para 24 L. Nesse sistema, realizou-se a aclimação das plantas em solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1950) por 7 dias. Após esse período, as plantas foram expostas aos tratamentos com NaCl, acrescido à solução nutritiva, por um período de 7 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3x2, consistindo de três genótipos de soja e duas concentrações de NaCl (0 mM e 100 mM), com três repetições. O sistema foi mantido sob aeração constante por borbulhamento. A solução nutritiva foi monitorada e o pH ajustado a cada dois dias para $6,0 \pm 0,5$ com NaOH. As plantas foram avaliadas após os 7 dias de estresse (DAS) quanto ao crescimento (massa seca total), conteúdo relativo de água (CRA), eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m) e quantificação de elementos químicos por microscopia (EDS).

4.3 Massa seca

Foi mensurada a massa fresca (g) das plantas em balança analítica. Para determinação da massa seca total (g), obtivemos o peso seco (g) das amostras secas em estufa a $65 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 72 horas. Os valores foram expressos em percentagem de massa seca $Ms\% = [(massa\ seca / massa\ fresca)] \times 100$.

4.4 Conteúdo relativo de água

De cada planta, 10 discos foliares com 1cm de diâmetro foram excisados e pesados na balança analítica para obtenção do peso fresco (PF), peso túrgido (PT) e, após 24 horas em estufa ($65 \pm 0,5^\circ\text{C}$) o peso seco (PS). O conteúdo relativo de água (CRA) foi calculado de acordo com a fórmula: $CRA = [(PF - PS) / (PT - PS)] \times 100$, conforme proposto por Barrs e Wheaterley (1962) e expresso em percentagem.

4.5 Eficiência do fotossistema II

A fluorescência da clorofila foi medida por um fluorômetro portátil OS30p (Opti-Sciences), em plantas selecionadas aleatoriamente (terceira folha totalmente expandida). A eficiência do fotossistema II (F_v/F_m) foi obtido após 30 min de adaptação ao escuro de

pontos distintos das folhas. Os valores de fluorescência máxima (F_m) e mínima da clorofila (F_0) foram utilizados para o cálculo do rendimento quântico máximo de PSII $[(F_m - F_0)/F_m]$ (MAXWELL & JOHNSON, 2000).

4.6 Quantificação de elementos por EDS

A espectroscopia de raios X dispersiva em energia (EDS) é um método padrão para identificar e quantificar composições elementares (SU et al., 2008). Para a quantificação dos elementos químicos nas plantas, segmentos de um centímetro da raiz e folha foram desidratados em estufa de ventilação forçada à temperatura de 65°C por 48 horas e analisados em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, UK) acoplado a uma sonda de raios-X (X-ray EDS).

4.7 Experimento II

Após as análises preliminares (experimento I), os dois genótipos contrastantes em relação à tolerância ao estresse salino (100 mM) foram selecionados e comparados seguindo outra metodologia experimental. O experimento (DIC), esquema fatorial 2x3, avaliou um genótipo sensível ao estresse (BRS 232) e outro tolerante (Desafio RR), em três concentrações de NaCl (0 mM, 75mM, 150 mM). As condições experimentais relativas à germinação das sementes, cultivo e sistema hidropônico implementado foram as mesmas utilizadas no primeiro experimento. Portanto, as plantas dos genótipos BRS 232 e Desafio RR foram novamente avaliadas ao final de 7 DAS.

4.8 Morfologia e taxa de alongamento

Os efeitos do estresse salino no desenvolvimento das folhas foram avaliados por imagem fotográfica. Seguindo o proposto por Cahnet et al, (1989), mensuramos a taxa de alongamento caulinar (TAC), calculada pela fórmula: $[(\text{comprimento final do caule} - \text{comprimento inicial do caule}) / 7 \text{ DAS}]$; e a taxa de alongamento da raiz (TAR), calculada pela fórmula: $[(\text{comprimento final da raiz} - \text{comprimento inicial raiz}) / 7 \text{ DAS}]$. As taxas de TAC e TAR foram expressas em cm. Os parâmetros de massa seca (folhas, caule, raízes e total) e CRA foram novamente mensurados para todos os tratamentos, conforme metodologia já descrita anteriormente (4.2 e 4.3).

4.9 Pigmentos fotossintéticos

Amostras de folhas (250 mg) frescas recentemente coletadas foram acondicionadas aos tubos contendo 15 mL de acetona a 80% (v/v), protegidos da luz e armazenados a 4°C por 24 horas. Após esse período a absorbância da solução (2 mL) foi quantificada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 647, 663 e 470 nm. Foram calculados os teores de clorofilas totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), 'a', 'b' e de carotenóides totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) através de equações estabelecidas por Lichtenthaler (1987).

4.10 Carboidratos solúveis totais

O teor de carboidratos solúveis foi estimado pelo método da antrona (DUBOIS et al., 1956). Amostras de folhas (100 mg) foram homogeneizadas em almofariz contendo 10 mL de etanol 80%. Na sequência, em tubos de 15 mL foram aquecidas em banho-maria a 80°C por 30 minutos. Após a centrifugação (3.000 rpm por 15 min) foi retirado 0,1 mL do sobrenadante e transferido para um novo tubo, o volume foi completado para 1 mL com a adição de 0,9 mL de água *Milli-Q*. Em seguida, 3 mL do reagente antrona (0,2% em ácido sulfúrico) foi adicionado. As amostras foram novamente aquecidas por 15 minutos em banho-maria à 80°C e rapidamente resfriadas em banho de gelo. O teor de carboidratos foi determinado pela leitura da absorbância (620 nm) no espectrofotômetro (HUSSAIN et al., 2019).

4.11 Conteúdo de H₂O₂ e peroxidação lipídica

Um total de 0,3 g de tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido em presença de 20% (w/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizado em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA), 0,1% (w/v). Posteriormente o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi adicionado a uma solução de 20% de TCA e 5% de ácido tiobarbitúrico (TBA) e incubado a 95°C por 30 min. A reação foi interrompida por resfriamento em banho de gelo por 15 min e centrifugado a 10.000 rpm a 4°C por 10 min. A concentração de equivalentes de malondialdeído (MDA) foi calculada utilizando um coeficiente de extinção de $1,55 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, com leituras entre 535 e 600 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol} / \text{mg}$ de tecido fresco (SHIMIZU et al., 2006).

O conteúdo de H₂O₂ foi estimado de acordo com Alexieva et al. (2001). Após maceração, homogeneização das amostras e coleta do sobrenadante, 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,50) e 1 M de solução de iodeto de potássio foram adicionados à

solução final, seguindo pela incubação em gelo por 1 h sob ausência de luz. O conteúdo de H_2O_2 foi determinado usando uma curva de concentração de H_2O_2 como padrão e a absorvância em 390 nm.

4.12 Atividade de enzimas antioxidantes

Foi macerado 1g de tecido foliar com nitrogênio líquido e homogeneizado em 3mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo ácido etilenodiaminotetraacético 1 mM (EDTA), 3 mM de DL-ditiotreitol e PVPP insolúvel a 5% (p/v). O homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 30 min. O sobrenadante foi fracionado em alíquotas e armazenado a -80°C para posterior determinação da atividade de SOD e CAT (GRATÃO et al. 2015). A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4.12.1 Atividade da Superóxido dismutase

A atividade da SOD (SOD; EC 1.15.1.1) foi determinada de acordo com Giannopolitis & Ries (1977). De uma alíquota foi adicionada (50 μL) da amostra a uma mistura de 5 mL de tampão fosfato de sódio (50 mmol L^{-1}), pH 7,8, metionina (13 mmol L^{-1}), NBT (75 mmol L^{-1}), EDTA (0,1 mmol L^{-1}) e riboflavina (2 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A reação para a formação do composto azul produzidos pela fotorreação de NBT foi conduzida em uma câmara de reação sob iluminação interna por 15 minutos (lâmpadas fluorescentes de 15W a 25°C). Após 15 min o material foi homogeneizado e as leituras das absorvâncias realizadas em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos em U SOD mg^{-1} proteína.

4.12.2 Atividade da Catalase

A atividade da CAT (CAT; EC 1.11.1.6) foi analisada segundo proposto por Gratão et al. (2015). A determinação se deu pelo monitoramento da decomposição de H_2O_2 a 240 nm ao longo ao longo de 1 min. A reação consistiu pela mistura de 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7.5), contendo 25 mL de H_2O_2 (solução a 30%). A atividade de CAT foi expressa como $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ proteína, como descrito por Cia et al. (2012).

4.13 Extração do RNA e RT-qPCR

O RNA foi extraído dos tecidos foliares (110 mg) usando o kit Spectrum™ Plant Total RNA (Sigma-Aldrich, USA) e tratado com DNase I livre de RNase (Sigma-Aldrich, USA) de acordo com as recomendações dos fabricantes. Após a extração, o RNA total foi quantificado em NanoPhotometer P360 e sua qualidade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%). O cDNA da primeira fita foi sintetizado a partir do RNA total usando o kit RevertAid (Thermo Fisher Scientific, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

O Kit Master Mix KAPA SYBR FastqPCR (2X) Universal (Kapa Biosystems, USA) foi utilizado para a reação de RT-qPCR, utilizando-se 10 ng de cDNA e 200 nM de cada primer específico (Tabela 1). A reação foi realizada em um termociclador Stratagene MX3005P (Califórnia, USA) com as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s.

A reação RT-qPCR foi feita em triplicata. Após a verificação da eficiência de amplificação dos primers, os resultados da expressão genica foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os primers específicos para os genes *Alternative oxidase (AOX2)*, *Tioredoxina (TRX)* e o gene normalizador *Actina* foram selecionados de acordo com a literatura e estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Primers específicos usados no RT-qPCR.

Gene	Forward e Reverse primer	Amp ¹	Tm ²	Referência
<i>Actin</i>	F: GAGCTATGAATTGCCTGATGG	118	58,0	MARCOLINO-GOMES et al. (2015)
	R: CGTITCATGAATTCCAGTAGC		55,0	
<i>AOX2</i>	F: GGGAGAGTTATCGTTCAAAC	107	50,6	SUN et al. (2017)
	R: TGGAATTCTCAGGAGCTTCA		53,4	
<i>TRX</i>	F: CAAATTCATAGAGCCAGCGA	115	59,3	ARFAOUI et al. (2018)
	R: CGCCTCCACATTAACCTCCT		59,0	

¹Amp: tamanho do amplicon (bp); ²Tm: temperatura demelting dos primers (C°).

4.14 Análise dos resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre médias foram avaliadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$), em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados são representados por letras diferentes acima das

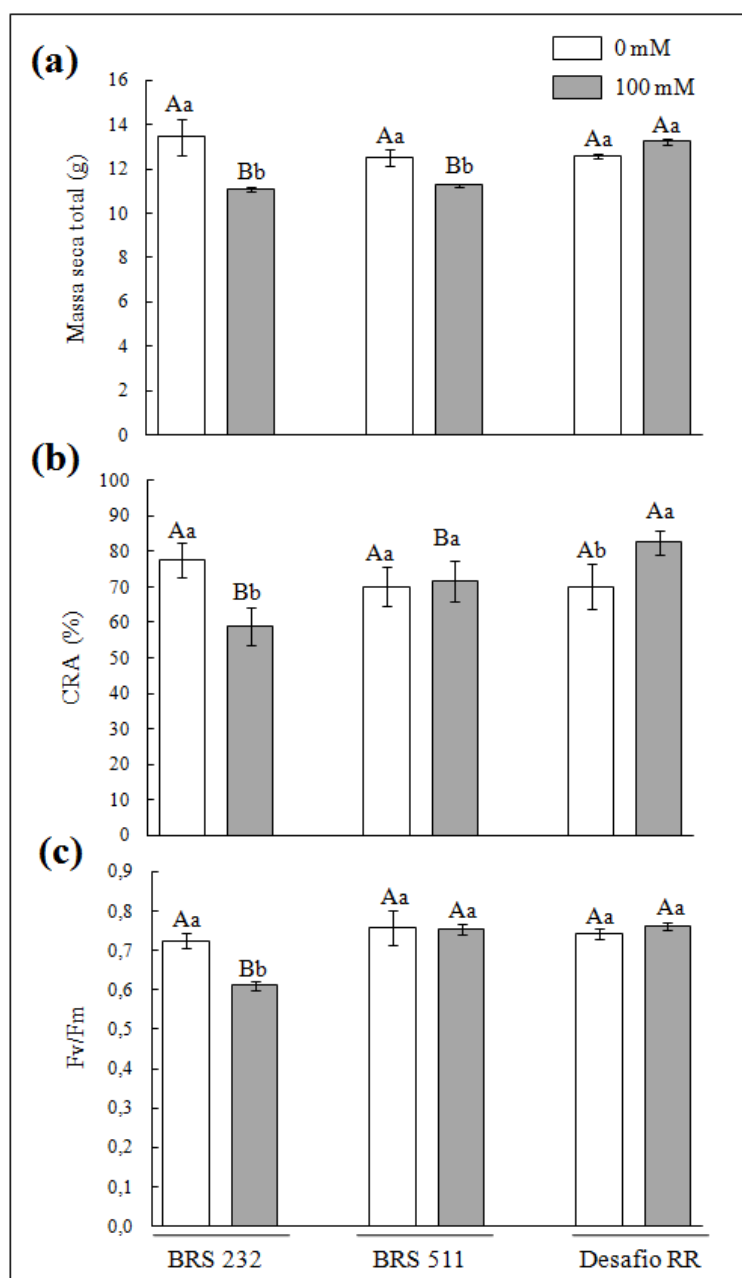
barras. A correlação de Pearson foi realizada para os parâmetros fisiológicos, bioquímicos e genéticos avaliados no segundo experimento. Essas análises foram realizadas através do software AgroEstat – Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomico, versão 1.1.0 (BARBOSA & MALDONADO, 2014).

5. RESULTADOS

5.1 Experimento I: Seleção dos genótipos

No experimento preliminar (100 Mm NaCl, 7 DAS) observamos diferenças quanto aos parâmetros de crescimento e fisiológico entre os genótipos de soja BRS 232, BRS 511 e Desafio RR. O genótipo BRS 232 teve o pior desempenho na produção de massa seca total, com uma redução significativa de 17%. O genótipo BRS 511 apresentou uma redução de 10% e o genótipo Desafio RR um aumento de 5% na massa seca total (Figura 1a). O genótipo BRS 232 também apresentou uma significativa redução do conteúdo relativo de água (CRA) (Figura 1b) e do rendimento quântico do fotossistema II (F_v/F_m) (Figura 1c). Essas reduções foram respectivamente, de 24% e 15,7% em relação à média dos valores obtidos para as plantas controle do genótipo BRS 232. Tais diferenças não foram significativas na avaliação dos genótipos BRS 511 e Desafio RR (Figura 1A, B e C).

Figura 1. Efeito da salinidade nos genótipos de soja BRS 232, BRS 511 e Desafio RR depois de 7 de tratamento.



Massa seca total (a), conteúdo relativo de água CRA (b) e Fv/Fm (c). Letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os genótipos e letras minúsculas mostram diferenças entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Cada barra representa a média de três réplicas independentes com barras de erro.

Na quantificação/distribuição dos elementos químicos pela análise EDS, verificamos diferenças expressivas entre os genótipos em 7 DAS. Houve um aumento do acúmulo de Na e Cl nas folhas e raízes do genótipo BRS 232, e uma diminuição considerável de K nas raízes desse genótipo em comparação aos demais (Tabela 1). Os

níveis de C foram aumentados nas raízes das plantas dos três genótipos, no entanto, esse aumento significativo nas folhas foi melhor observado somente no genótipo Desafio RR (64,33 para 72,78). Nesse genótipo também foi constatado o aumento de Ca nas raízes, bem como, de N e K nas folhas (Tabela 1).

Tabela 2. Wt% dos elementos quantificados por EDS

			C	N	Na	Mg	Cl	K	Ca
Wt% Raízes	BRS 232	0 mM	63.44 Bb	6.69 Bb	0.12 ABb	0.12 Aa	0.18 Bb	4.88 Aa	0.31 Ba
		100 mM	65.57 Ca	11.36 Ca	3.15 Aa	0.05 Bb	2.78 Aa	3.33 Cb	0.34 Ca
	BRS 511	0 mM	63.19 Cb	9.09 Ab	0.10 Bb	0.07 Ab	0.37 Ab	4.64 Ba	0.53 Aa
		100 mM	73.96 Ba	12.42 Aa	2.35 Ba	0.15 Aa	1.84 Ba	3.70 Bb	0.48 Ba
	Desafio RR	0 mM	63.89 Ab	9.20 Ab	0.18 Ab	0.11 Ab	0.37 Ab	4.82 Aa	0.55 Ab
		100 mM	74.50 Aa	12.10 Ba	2.16 Ca	0.17 Aa	1.57 Ca	4.27 Ab	0.67 Aa
Wt% Folhas	BRS 232	0 mM	63.37 Ba	6.81 Bb	0.49 Ab	2.60 Aa	2.20 Ab	5.10 Aa	0.41 Ba
		100 mM	56.44 Cb	7.07 Ca	4.36 Aa	0.90 Cb	5.68 Aa	4.59 Bb	0.34 Bb
	BRS 511	0 mM	62.22 Cb	6.90 Bb	0.42 ABb	2.48 Aa	1.89 Bb	4.22 Ba	0.53 Aa
		100 mM	65.07 Ba	8.46 Ba	3.81 Ba	1.53 Bb	3.04 Ba	2.72 Cb	0.42 Ab
	Desafio RR	0 mM	64.33 Ab	8.24 Ab	0.37 Bb	2.23 Ba	1.96 Bb	3.55 Cb	0.45 ABa
		100 mM	72.78 Aa	10.13 Aa	3.64 Ba	1.98 Ab	2.95 Ba	4.96 Aa	0.49 Aa

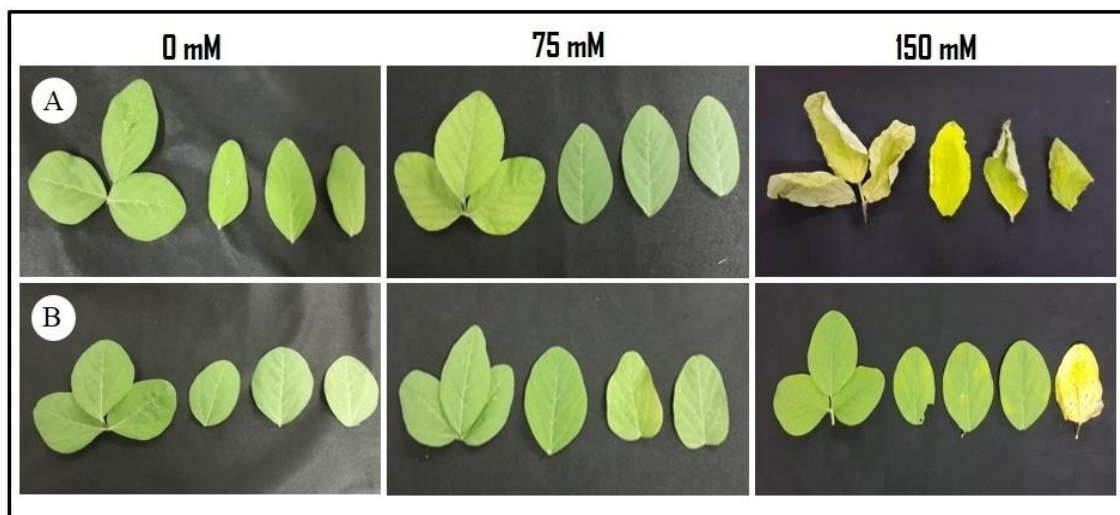
Letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os genótipos e letras minúsculas mostram diferenças entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Cada barra representa a média de três réplicas independentes.

5.2 Experimento II:

5.3 Morfologia foliar

Visualmente, ambos os genótipos, no tratamento com 75 mM de NaCl não apresentaram alterações na morfologia das folhas. Entretanto, no tratamento com 150 mM de NaCl o genótipo BRS 232 apresentou uma elevada alteração na morfologia (folhas com amarelecimento mais intenso e ondulações). Na mesma condição, tais alterações não foram observadas com a mesma intensidade no genótipo Desafio RR (Figura 2).

Figura 2. Morfologia das folhas após 7 dias de tratamento com NaCl, (A) genótipo BRS 232, (B) genótipo Desafio RR.

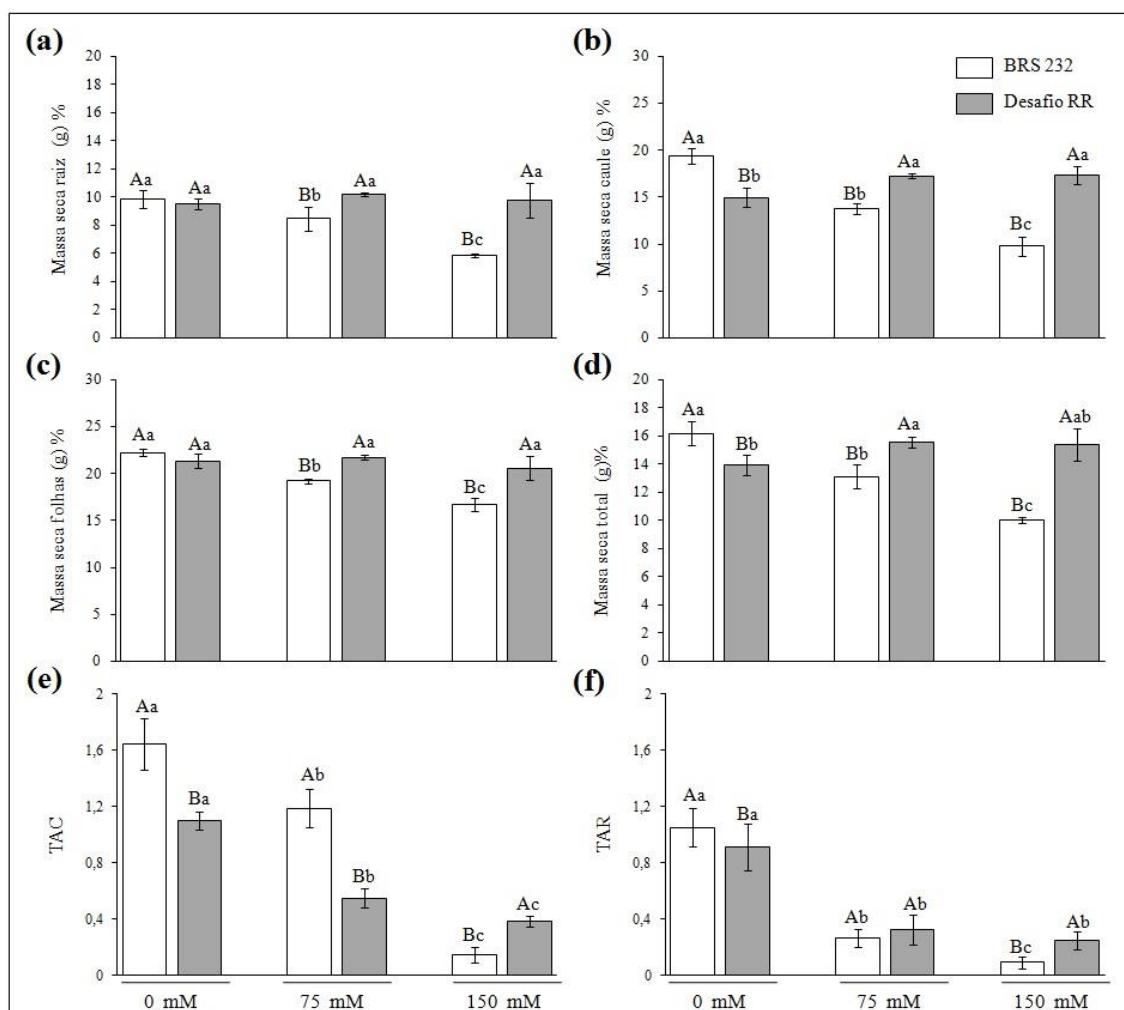


5.4 Parâmetros biométricos

Com base nos resultados preliminares (screening) os genótipos BRS 232 (menos tolerante a 100 mM NaCl) e Desafio RR (mais tolerante a 100 mM NaCl) foram comparados nesse experimento. Para investigar os efeitos do estresse salino (75 mM NaCl e 150 mM NaCl) no crescimento das plantas desses genótipos, avaliamos o teor de massa seca das plantas, assim como, as taxas de alongamento caulinar e radicular. Observamos valores superiores e significativos dos teores de massa seca das raízes, caule e folhas no genótipo Desafio RR em relação ao genótipo BRS 232, nas doses de 75 mM e 150 mM (Figura 1A e 1C). O genótipo BRS 232 na condição de 150 mM apresentou uma redução significativa no teor de massa seca total, 38% em relação ao controle, entretanto, no genótipo Desafio RR houve um aumento de 11% (Figura 3D).

Os genótipos apresentaram uma redução significativa na taxa de alongamento do caule (TAC) em relação ao controle nas duas condições de estresse salino (Figura 3E). Na dose de 150 mM, o genótipo BRS 232 mostrou uma redução de 90% em relação ao controle e o genótipo Desafio RR uma redução de 64%, portanto, no estresse mais severo o genótipo Desafio RR obteve uma taxa TAC significativamente superior ao genótipo BRS 232 (Figura 1E). O crescimento das raízes também foi prejudicado nas condições estressantes. No entanto, a taxa de alongamento radicular (TAR) do genótipo Desafio RR em 150 mM foi estatisticamente superior ao valor médio do genótipo BRS 232. A redução foi de 91% no genótipo BRS 232 e 72% no genótipo Desafio RR em relação ao controle (Figura 3F).

Figura 3. Efeito da salinidade em parâmetros de crescimento nos genótipos BRS 232 e Desafio RR



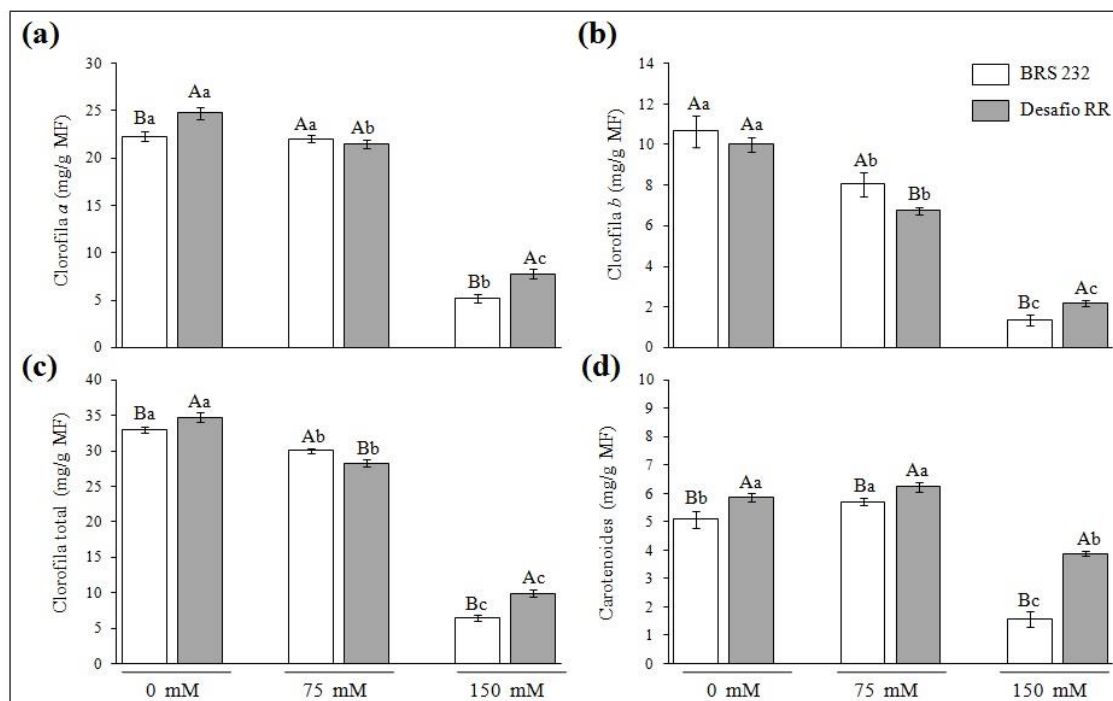
Massa seca raiz (a), massa seca caule (b), massa seca folhas (c), massa seca total (d), taxa de alongamento caulinar (e) e taxa de alongamento radicular (f). Letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os genótipos e letras minúsculas mostram diferenças entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Cada barra representa a média de três réplicas independentes com barras de erro.

5.5 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos.

Os efeitos do estresse salino severo no conteúdo de clorofilas *a* e *b* foram drásticos em ambos os genótipos (Figura. 4A e B). Desse modo, o conteúdo de clorofilas totais foi consideravelmente reduzido na concentração de 150 mM. Nas plantas dos genótipos BRS 232 e Desafio RR, a redução em relação ao controle foi de 69% e de 33%, respectivamente (Figura 4C). Resultado similar é mostrado para a quantificação de carotenoides. Na dose de 150 mM ambos os genótipos tiveram redução significativa de carotenoides, entretanto,

no genótipo Desafio RR o valor médio de 3,88 (mg/g MF) foi estatisticamente superior aos 1,57 (mg/g MF) do BRS 232 (Figura 4D).

Figura 4. Efeito da salinidade nos pigmentos fotossintéticos

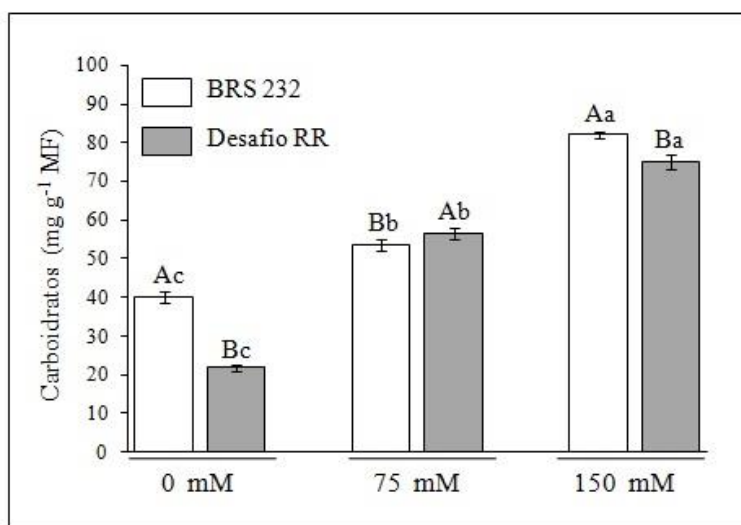


Clorofila *a* (a), clorofila *b* (b), clorofila total (c), carotenoides (d). Letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os genótipos e letras minúsculas mostram diferenças entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Cada barra representa a média de três réplicas independentes com barras de erro

5.6 Conteúdo de carboidratos solúveis totais

Em relação aos níveis de açúcares solúveis totais (carboidratos) nas folhas, apesar do genótipo BRS 232 apresentar 82,12 (mg.g⁻¹ MF), valor significativamente superior ao valor médio de 74,97 (mg g⁻¹ FW) nas plantas do genótipo Desafio RR, na concentração de 150 mM, houve um aumento expressivo de 242% desse conteúdo de açúcares no genótipo Desafio RR nessa mesma condição estressante (Figura 5).

Figura 5. Carboidratos solúveis totais nos genótipos BRS 232 e Desafio RR

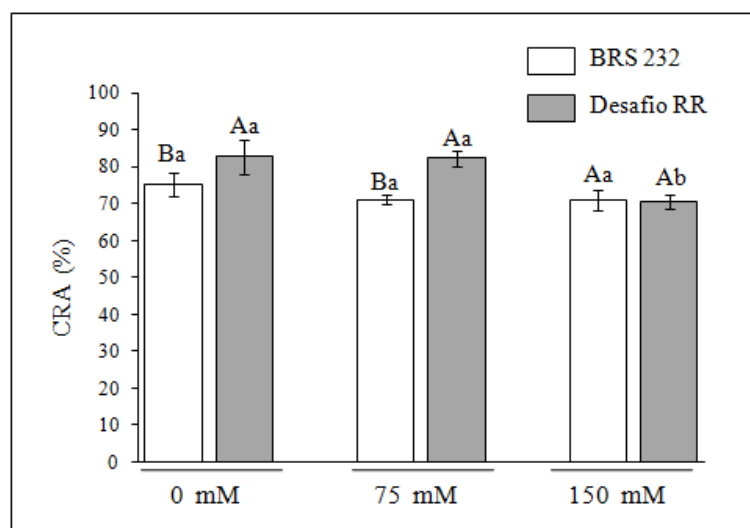


Letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os genótipos e letras minúsculas mostram diferenças entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Cada barra representa a média de três réplicas independentes com barras de erro

5.7 Conteúdo relativo de água

Apesar da redução de 14% no conteúdo relativo de água (CRA) nas folhas no genótipo Desafio, na dose de 150 mM não observou-se diferença significativa entre os genótipos. No entanto, nas plantas do genótipo Desafio, o CRA de 82,35% na dose de 75 mM foi significativamente superior aos 71,27% do BRS 232 (Figura 6).

Figura 6. Conteúdo relativo de água das folhas

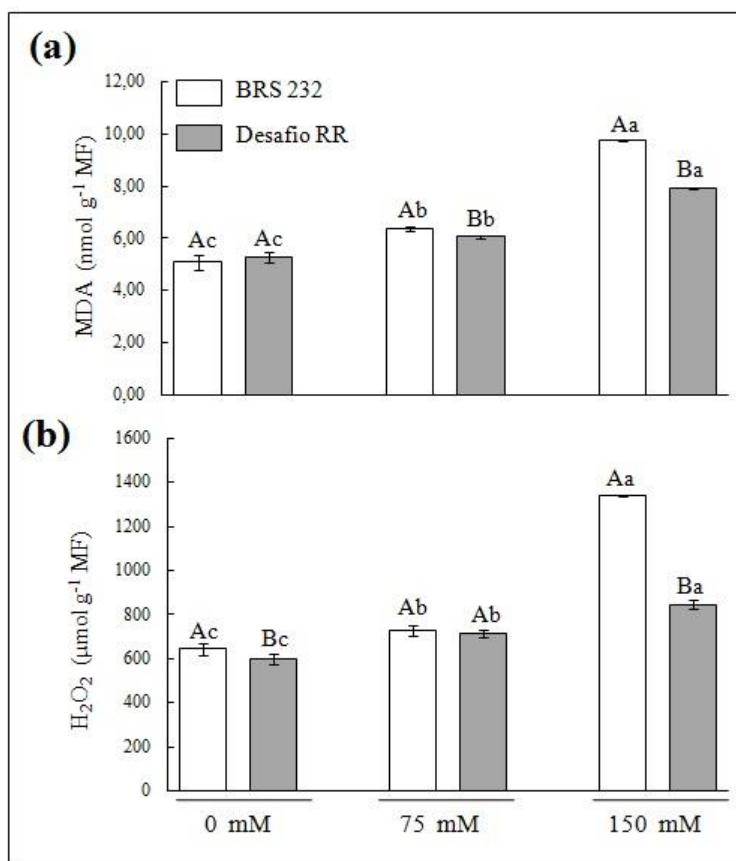


Letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os genótipos e letras minúsculas mostram diferenças entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Cada barra representa a média de três réplicas independentes com barras de erro

5.8 Conteúdo de H_2O_2 e peroxidação lipídica

Para o melhor entendimento dos efeitos da salinidade nos genótipos contrastantes, BRS 232 e Desafio RR, o nível de estresse oxidativo sofrido pelas plantas foi investigado pelas medidas do conteúdo de malondialdeído (MDA) através da análise de peroxidação lipídica e pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas. Em ambos os genótipos verificou-se o aumento significativo de MDA nos tratamentos com NaCl. Na dose de 150 mM, o conteúdo de MDA no genótipo BRS232 ($9,72 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW}$) foi significativamente superior ao observado no genótipo Desafio RR ($7,93 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW}$) (Figura 7A). Houve, respectivamente, um aumento considerável de 91% e 51% de MDA em relação ao controle, nos genótipos BRS 232 e Desafio RR (Figura 3A). Além disso, sob estresse mais severo (150 mM NaCl) observou-se um aumento significativo de 108% do conteúdo de H_2O_2 nas plantas do genótipo BRS 232 e de apenas 41% no genótipo Desafio RR em comparação ao controle. As diferenças entre os genótipos (para H_2O_2) em 150 mM também foi bastante contrastante (Figura 7B).

Figura 7. Efeitos do estresse oxidativo em folhas dos genótipos BRS 232 e Desafio RR

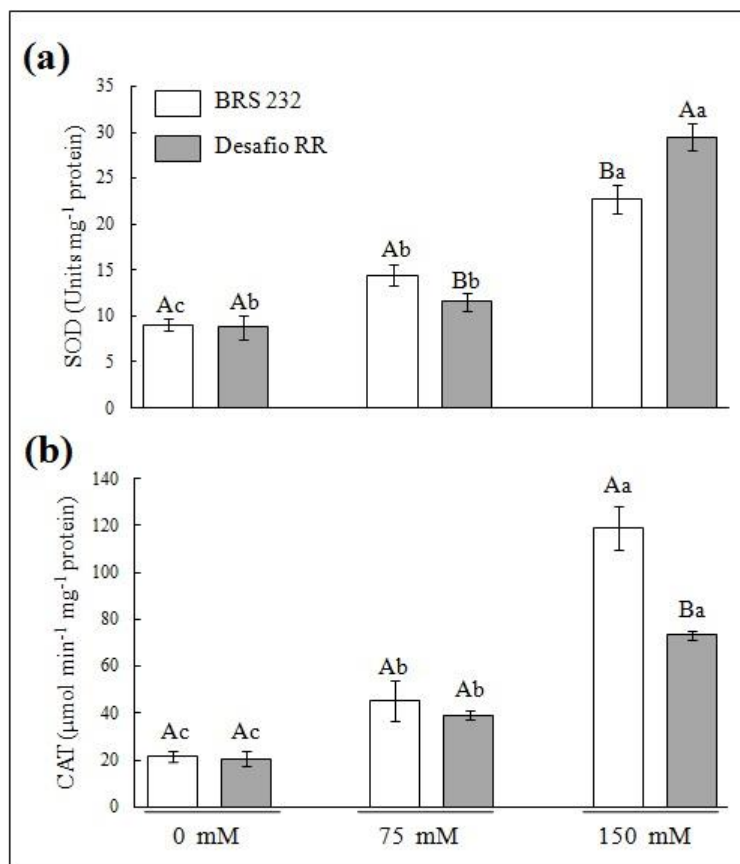


Conteúdo de MDA (a) e conteúdo de H₂O₂ (b). Letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os genótipos e letras minúsculas mostram diferenças entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Cada barra representa a média de três réplicas independentes com barras de erro

5.9 Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade de enzimas envolvidas com o metabolismo antioxidante também foi afetada pelas diferentes condições de estresse salino. Observamos o aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) nas folhas de ambos os genótipos à medida que aumentamos a severidade do estresse salino (Figura 8A e 8B). Na dose de 150 mM, a atividade da SOD nas plantas do genótipo Desafio RR foi significativamente superior ao observado no BRS 232 (Figura. 8A). Por outro lado, na mesma condição de estresse, essa superioridade é mostrada para a atividade da enzima CAT no genótipo BRS 232 (Figura 8B).

Figura 8. Atividade de enzimas do metabolismo antioxidante em folhas dos genótipos BRS 232 e Desafio RR



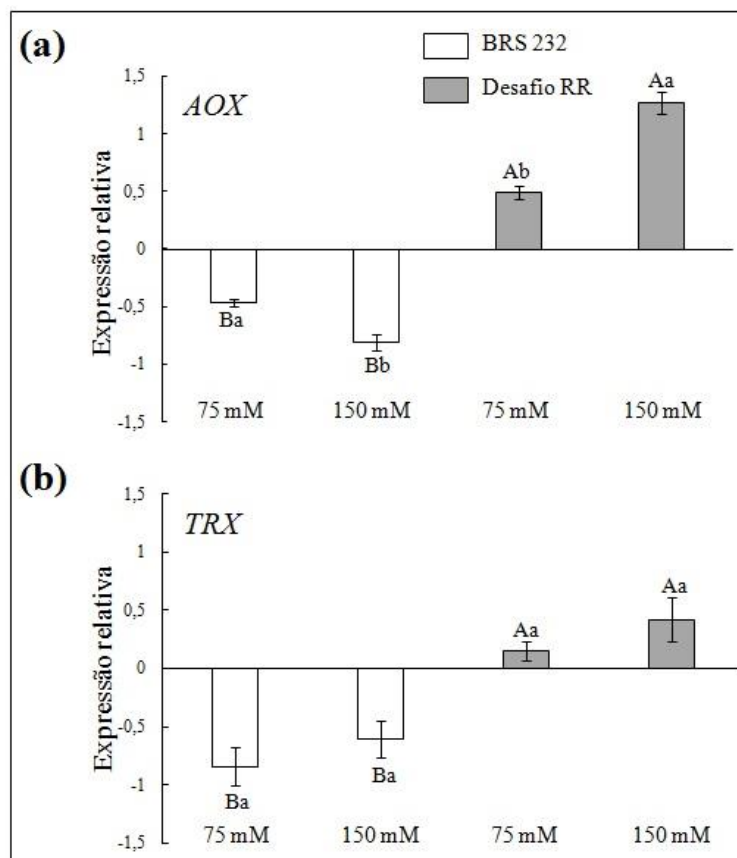
Atividade da SOD (a) e atividade da CAT (b). Letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os genótipos e letras minúsculas mostram diferenças entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Cada barra representa a média de três réplicas independentes com barras de erro

5.10 RT-qPCR, expressão relativa dos genes *AOX2* e *TRX*

As plantas de ambos os genótipos no tratamento de 75 mM NaCl não apresentaram alterações no fenótipo foliar. Entretanto, em 150 mM, nas plantas do genótipo BRS 232 ficou evidente a acentuada alteração de alguns aspectos morfológicos das folhas, como a ocorrência do amarelecimento num maior número de folhas e o enrolamento das margens foliares (Fig. 5A). As folhas desses genótipos foram utilizadas na análise da expressão dos genes *Oxidase alternativa (AOX2)* e *Tioredoxina (TRX)* por RT-qPCR. A expressão relativa destes genes foi diferencial entre os genótipos analisados (Figura 9A e 9B). Os dois genes antioxidantes foram regulados positivamente nas plantas do genótipo Desafio RR nas condições de estresse salino impostas. O gene *AOX2* nesse genótipo foi induzido, 0,49-fold e 1,27-fold nas respectivas doses de 75 e 150 mM NaCl. Por outro lado, no

genótipo BRS 232 foi observado a expressão negativa deste gene (Fig. 5B). O gene *TRX* também foi induzido no genótipo Desafio RR, 0,15-fold (75 mM NaCl) e 0,42-fold (150 mM NaCl), e reprimido no BRS 232 (Figura 9).

Figura 9. Expressão relativa dos genes *AOX2* e *TRX* em folhas dos genótipos BRS 232 e Desafio RR



Expressão relativa dos genes do metabolismo antioxidante, *oxidase alternativa* (*AOX25.11*) (a), *Tioredoxina* (*TRX*) (b). Letras maiúsculas demonstram diferenças significativas entre os genótipos e letras minúsculas mostram diferenças entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Cada barra representa a média de três réplicas independentes com barras de erro.

5.12 Correlação de Pearson

Os parâmetros avaliados no experimento II foram analisados por correlação. No genótipo Desafio RR altas correlações positivas ($p \leq 0,01$) foram observadas entre alguns parâmetros de crescimento e fisiológicos, como TAC e CHT, bem como, para as atividades das enzimas antioxidantes (CAT e SOD) e a expressão do gene *AOX2* (Tabela 3). Essa correlação também acontece entre as quantificações de SOD, CAT e *AOX2*, e os

parâmetros de estresse oxidativo (MDA e H₂O₂). No genótipo BRS 232 é possível observar altas correlações negativas ($p \leq 0,01$) entre essas medidas de estresse oxidativo e a quantificação dos pigmentos fotossintéticos (CH e CAROT), bem como, entre a medida de MDA e o teor de massa seca total das plantas (MS). Ademais, avaliando o genótipo mais suscetível ao estresse salino (BRS 232), também ocorre correlação negativa significativa ($p \leq 0,01$) entre a expressão do gene *AOX2* e o acúmulo de MDA, H₂O₂ e atividade das enzimas SOD e CAT (Tabela 3).

Tabela 3. Correlação de Pearson dos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e genéticos

	CRA	CH	CAROT	TAC	TAR	MS	CARB	MDA	H ₂ O ₂	SOD	CAT	AOX2	TRX
CRA	X	0,886**	0,890**	0,645 ^{NS}	0,631 ^{NS}	-0,370 ^{NS}	-0,733*	-0,857**	-0,819**	-0,923**	-0,873**	-0,798**	-0,566 ^{NS}
CH	0,427 ^{NS}	X	0,913**	0,854**	0,756*	-0,454 ^{NS}	-0,901**	-0,997**	-0,952**	-0,978**	-0,986**	-0,959**	-0,719*
CAROT	0,347 ^{NS}	0,960**	X	0,601 ^{NS}	0,454 ^{NS}	-0,228 ^{NS}	-0,663 ^{NS}	-0,897**	-0,794*	-0,952**	-0,875**	-0,808**	-0,634 ^{NS}
TAC	0,493 ^{NS}	0,974**	0,884**	X	0,907**	-0,713*	-0,982**	-0,873**	-0,936**	-0,769*	-0,905**	-0,941**	-0,664 ^{NS}
TAR	0,742*	0,704*	0,523 ^{NS}	0,826**	X	-0,640 ^{NS}	-0,945**	-0,768*	-0,879**	-0,688*	-0,793*	-0,848**	-0,594 ^{NS}
MS	0,596 ^{NS}	0,889**	0,769*	0,944**	0,924**	X	0,676*	0,465 ^{NS}	0,613 ^{NS}	0,346 ^{NS}	0,572 ^{NS}	0,577 ^{NS}	0,141 ^{NS}
CARB	-0,552 ^{NS}	-0,974**	-0,892**	-0,991**	-0,841**	-0,961**	X	0,914**	0,972**	0,834**	0,936**	0,963**	0,679*
MDA	-0,566 ^{NS}	-0,977**	-0,913**	-0,985**	-0,811**	-0,935**	0,991**	X	0,958**	0,967**	0,985**	0,966**	0,720*
H ₂ O ₂	-0,455 ^{NS}	-0,997**	-0,965**	-0,972**	-0,712*	0,890**	0,976**	0,980**	X	0,923**	0,975**	0,978**	0,672*
SOD	-0,704*	-0,923**	-0,844**	-0,945**	-0,866**	-0,949**	0,970**	0,971**	0,926**	X	0,957**	0,914**	0,699*
CAT	-0,571 ^{NS}	-0,965**	-0,918**	-0,956**	-0,785*	-0,936**	0,980**	0,982**	0,967**	0,979**	X	0,973**	0,692*
AOX	0,599 ^{NS}	0,887**	0,746*	0,943**	0,905**	0,937**	-0,946**	-0,935**	-0,888**	-0,909**	-0,8836**	X	0,787*
TRX	0,620 ^{NS}	0,248 ^{NS}	0,027 ^{NS}	0,405 ^{NS}	0,707*	0,458 ^{NS}	-0,406 ^{NS}	-0,361 ^{NS}	-0,248 ^{NS}	-0,460 ^{NS}	-0,319 ^{NS}	0,515 ^{NS}	X

NS: Não significativo; * ($p \leq 0.05$) e ** ($p \leq 0.01$): significância pelo teste de Tukey. Valores sombreados para a correlação do genótipo Desafio RR, valores em células não sombreadas para o genótipo BRS 232.

CRA: conteúdo relativo de água; CH: clorofila total; CAROT: carotenoides; TAC: taxa de alongamento caulinar; TAR: taxa de alongamento radicular; MS: massa seca total; CARB: carboidratos; MDA: malondialdeído; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; SOD: atividade da superóxido dismutase; CAT: atividade da catalase; AOX2: *Alternative oxidase* expressão; TRX: *Tioredoxina* expressão.

6. DISCUSSÃO

O estresse salino durante o estágio de crescimento vegetativo pode reduzir drasticamente a produção de matéria seca e o rendimento da soja (YASMIN et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Essa redução pode ser influenciada por diversos fatores, como a variabilidade genética do material vegetal. Ou seja, diferentes genótipos de soja podem apresentar respostas distintas em relação à capacidade de tolerância ao estresse salino. Nosso primeiro objetivo foi investigar alguns efeitos da salinidade em sistema hidropônico (100 mM NaCl), comparando-se os genótipos BRS 232, BRS 511 e Desafio RR (screening). A massa seca total das plantas, eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m), conteúdo relativo de água (CRA) e composição elementar nas folhas e raízes (Figura 1 e Tabela 2), indicam que as plantas do genótipo BRS 232 foram mais sensíveis ao estresse salino, principalmente devido à redução da massa seca, F_v/F_m e maior acúmulo de Na nas folhas e raízes (Figura 1 e Tabela 1). Por outro lado, no genótipo Desafio RR encontramos possíveis características de tolerância.

A tolerância à salinidade de uma planta pode ser determinada com base na concentração de Na^+ da folha, e também na capacidade da planta de manter altos níveis celulares de K^+ (SHABALA & CUIN, 2008). Nesse sentido, o genótipo Desafio RR apresentou resultados satisfatórios para o balanço de Na/K nas folhas e raízes, diferentemente do observado para o genótipo mais suscetível ao estresse (BRS 232). Além disso, verificamos um aumento significativo do elemento Cl no genótipo BRS 232, principalmente nas folhas (Tabela 1). Íons Na^+ e Cl^- em excesso nas folhas atuam como inibidores da fotossíntese e do metabolismo de carboidratos, podendo provocar danos oxidativo e induzir a morte celular (LIN et al., 2018; NAJAR et al., 2018).

A relação dos parâmetros F_v/F_m , balanço dos elementos Na/K e a diminuição dos níveis de Mg nas folhas das plantas do genótipo suscetível (Tabela 1), pode representar um provável dano no aparato fotossintético. O F_v/F_m reduzido unicamente no genótipo BRS 232 pode estar relacionado com a alta concentração de Na^+ e Cl^- nas folhas, e diminuição do K e Mg e danos estruturais nas clorofilas (CHAVES et al., 2009; SADAK et al., 2020). A função fisiológica da fotossíntese possivelmente foi afetada e contribuiu para a formação de ERO. A redução da massa seca total (Figura 1) pode ser explicada pela redução na eficiência fotossintética e danos aos demais processos metabólicos (SHARMA et al., 2018; NAJAR et al., 2018).

O íon Na^+ tem efeito adverso sobre o desenvolvimento das plantas, inibindo a atividade de várias enzimas do metabolismo antioxidante, respiratório e fotossintético (NAJAR et al., 2018; ZHONG et al., 2016). Sendo assim, a manutenção do crescimento normal das raízes e a parte aérea sob condições de estresse pode demonstrar uma possível tolerância ao estresse salino (FLOWERS & HAJIBAGHERI, 2001; SONG et al., 2017). Dessa forma, mesmo com o aumento dos níveis de Na nas folhas, observado em 100 mM NaCl (Tabela 1), a massa seca das plantas e as taxas de alongamento (TAR e TAC) avaliadas no experimento com 150 mM NaCl foram significativamente superiores no genótipo Desafio RR (Figura 3), corroborando com os possíveis indicativos de tolerância.

A relação dos conteúdos de clorofila e carotenoides estão diretamente ligada a capacidade da planta de se desintoxicar de ERO induzidas sob estresse (BORJAS-VENTURA et al., 2020). Apesar da considerável redução dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *b*, carotenoides) em ambos os genótipos no tratamento com 150 mM NaCl, o genótipo Desafio RR apresenta valores médios estatisticamente superiores ao BRS 232 (Figura. 4A - D).

O ajuste osmótico, como tentativa de minimizar a perda de água é considerado um dos principais processos de adaptação para a maioria dos vegetais frente à salinidade. Muitas espécies de plantas acumulam carboidratos, como osmólito compatível quando submetidas aos estresses ambientais (BLUM, 2017; BOROVNIK et al., 2019). O conteúdo de carboidratos solúveis totais teve um acréscimo significativo nos dois genótipos nas concentrações de 75 e 150 mM de NaCl (Figura 6). Comparando-se os dois genótipos, o BRS 232 apresentou valores médios significativamente superiores na dose de 150 mM. Com base nos valores de CRA, aumento do conteúdo de carboidratos em BRS 232 e o acentuado incremento de açúcares no genótipo Desafio RR (242% em relação ao controle) submetido a 150 mM, constata-se que tais alterações metabólicas nessas plantas são importantes para a manutenção do nível de água da folha e ajustamento osmótico nas células (ZHONG et al., 2016). A alta correlação negativa ($p \leq 0,01$) entre os conteúdos de clorofilas totais e carboidratos em ambos os genótipos (Tabela 3), indica que o estresse salino pode induzir a redução da concentração de clorofilas totais e o aumento do teor de carboidratos solúveis nesses genótipos. Dessa forma, os açúcares disponíveis atuam na osmoregulação e também são destinados como forma de substrato/energia e proteção em outros processos metabólicos (SCHEIBE, 2019).

O H_2O_2 produzido em resposta à atividade da SOD ou de outros mecanismos celulares, teve um aumento significativo em ambos os genótipos no tratamento com 150 mM NaCl. Esse aumento foi mostrado principalmente no genótipo BRS 232 (Figura 7B).

Vale ressaltar que o H₂O₂ também tem um papel fundamental de sinalização celular (AN et al, 2020; LIU et al., 2020a), porém, quando avaliamos os valores de MDA no mesmo tratamento, nota-se o aumento do estresse oxidativo nas plantas de soja, principalmente no genótipo BRS 232 (Figura 7A). A correlação positiva ($p \leq 0,01$) entre H₂O₂ e o MDA em ambos os genótipos pode indicar que o peróxido produzido realmente está provocando danos à membrana das células (GRATÃO et al., 2015; CHUNG et al., 2019).

O aumento das atividades enzimáticas de SOD e CAT, que tem como funções dismutar o superóxido em H₂O₂, o qual será reduzido em água e oxigênio pela ação das peroxidases como a catalase (Figura 9) é similarmente proporcional aos níveis de expressão dos genes *AOX2* e *TRX* no genótipo Desafio RR (Figura 9, Figura 10) sob 75 e 150 mM NaCl. Os resultados de RT-qPCR comprovam que nesse genótipo, o investimento na expressão de *AOX2* pode estar contribuindo para a regulação do processo de formação de ERO e redução do dano celular. Esse gene atua em uma das principais vias da redução de superóxido (O₂), através do controle de vazamento de elétrons da cadeia transportadora (mETC), evitando sua formação e contribuindo para a conversão diretamente em água (SCHEIBE, 2019; BOROVNIK & GRABELNYCH, 2018). A enzima AOX pode também estar envolvida em outros importantes processos celulares, como na otimização da performance fotossintética e da respiração (DEL-SAZ et al., 2016; DING et al., 2018). Além disso, sabe-se que algumas moléculas sinalizadoras, como óxido nítrico, jasmonato e íons de Ca podem induzir genes *AOX* por várias vias de sinalização, dependentes e independentes de ERO (FENG et al., 2013). Curiosamente os níveis de Ca nas raízes e folhas do genótipo Desafio RR foram aumentados, com diferença significativa entre os três genótipos avaliados em 100 mM NaCl (Tabela 2).

Acredita-se que a AOX está diretamente ligada e regula as mais diversas vias antioxidantes, assim como seu papel no metabolismo do carbono e na regulação de alguns fitohormônios fundamentais em respostas fisiológicas ao estresse (DING et al., 2018; MURIK et al., 2019, SELINSKI et al., 2018, SOARES et al., 2019). Estudos sugerem sua relação com o malato e com as enzimas SOD, CAT e APX durante o estresse osmótico, por temperatura e em exposição ao glifosato (DINAKAR et al., 2016; SOARES et al., 2019). A sua relação com a produção de brassinosteróides já foi relatada em estresse salino (LI et al., 2018; WEI et al., 2015; YAO et al., 2017; ZHU et al., 2018).

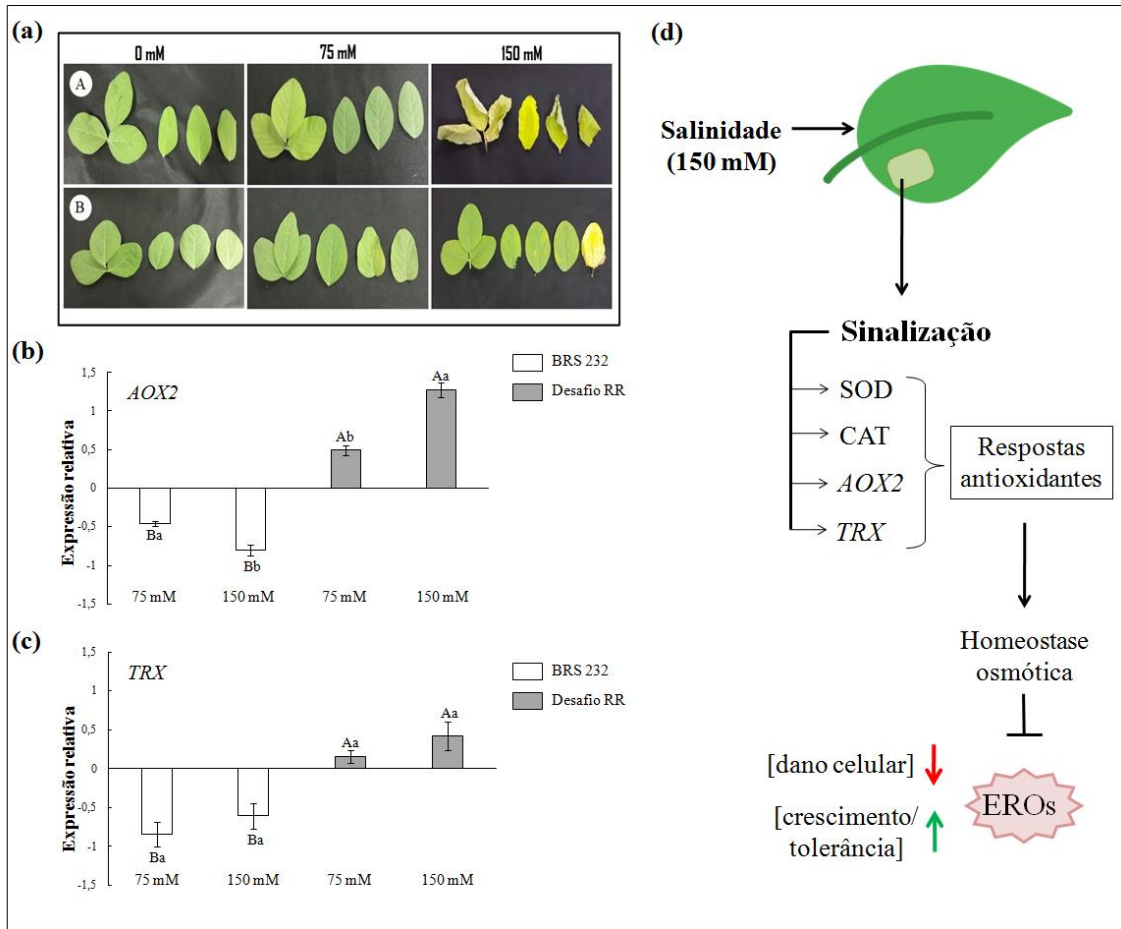
Ademais, as tioredoxinas (TRXs) regulam uma variedade de vias de sinalização metabólica e estão envolvidas na defesa antioxidante, regulação de transcrição e reparo de proteínas (LI et al., 2019). Sendo amplamente distribuídas na maioria das células e estão envolvidas em uma variedade de reações redox celulares e como doadoras de elétrons para

peroxiredoxina (Prx) e glutathiona peroxidase (GPX) para reduzir H_2O_2 para H_2O (DOS SANTOS & REY, 2006; VANACKER et al., 2018).

A indução do gene *TRX* no genótipo Desafio RR e repressão no genótipo BRS 232 também explica o balanço de H_2O_2 nas células foliares dessas plantas (Figura. 5B – C). As atividades *TRX* são importantes para a tolerância ao estresse por déficit hídrico e na desintoxicação de ROS (VANACKER et al., 2018), e em ervilha, a expressão de *TRX* foi induzida em resposta ao estresse salino em curto prazo (MARTÍ et al., 2011). Essa indução, também já verificada para algumas *TRXs* em *Arabidopsis thaliana* submetida a estresses biótico e abiótico (LALOI et al., 2004; MEYER et al., 2005; SHIN et al., 2020), indica, por exemplo, que *TRX1* esta envolvida nas respostas de defesa da soja em apenas nos genótipos altamente resistentes ao estresse biótico (SHIN et al., 2020). Ressalta-se que mais respostas acerca do papel dos genes *AOX* e *TRX* em soja frente ao estresse salino precisam ser investigadas.

Efeitos da salinidade no desenvolvimento das folhas são relatados, as injúrias induzidas por sais podem ocorrer por efeitos tóxicos e de deficiência de nutrientes (SIVRITEPE et al., 2003, GÓMEZ et al., 2019; LIU et al., 2020b). Se a concentração excede os níveis de tolerância da planta, o amarelecimento e morte de folhas mais velhas são observados (LIU et al., 2020b; MUNNS & TESTER, 2008). Mudanças verificadas no fenótipo foliar dos genótipos submetidos a 150 mM NaCl (Figura. 2A), corroboram com muitos indicativos de tolerância do genótipo Desafio RR. Nesse genótipo, vias distintas de sinalização estão modulando as respostas antioxidantes mediadas por SOD, CAT, *AOX2* e *TRX*, contribuindo sobremaneira para a homeostase osmótica nas células foliares. A correlação positiva ($p \leq 0,01$) entre o teor de carboidratos, H_2O_2 , MDA e componentes antioxidantes (SOD, CAT, *AOX* e *TRX*) (Tabela 3), indicam que o estresse oxidativo induzido pela salinidade (150 mM) nas plantas do genótipo Desafio RR está sendo aliviado por mecanismos bioquímicos e moleculares que contribuem para sua melhor capacidade de crescimento/tolerância ao estresse (Figura 10).

Figura 10. Comparação morfológica, bioquímica e aspecto genéticos entre folhas de soja dos genótipos BRS 232 e Desafio RR sob estresse salino de 7 dias



Fenótipo das folhas (a); expressão relativa dos genes do metabolismo antioxidante, *oxidase alternativa (AOX2)* (b), *tioredoxina (TRX)* (c) e um modelo da resposta antioxidante no genótipo Desafio RR sob estresse de 150 mM de NaCl (d); A) genótipo BRS 232; B) genótipo Desafio RR ; Setas vermelhas indicam redução e setas verdes aumento.

7. CONCLUSÃO

Os genótipos BRS 232 e Desafio RR são contrastantes em relação ao estresse salino. A concentração de 150 mM NaCl afetou mais severamente o desenvolvimento do genótipo BRS 232, com folhas fenotipicamente alteradas e crescimento prejudicado. Em plantas do genótipo Desafio RR, potencialmente mais tolerante ao estresse salino, verificamos melhor distribuição dos elementos químicos e, manutenção de funções fisiológicas importantes para a fotossíntese sob o estresse salino. Além disso, sob condições de estresse salino, o genótipo Desafio RR demonstrou eficiente controle do estresse oxidativo (menor conteúdo de H₂O₂ e MDA) em função da modulação da atividade de enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e maior expressão dos genes *AOX2* e *TRX*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001
- AN, Yuyan et al. PP2A and microtubules function in 5-aminolevulinic acid-mediated H₂O₂ signaling in *Arabidopsis* guard cells. **Physiologia Plantarum**, v. 168, n. 3, p. 709-724, 2020.
- ANDERSON, Edwin J. et al. Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Breeding: History, Improvement, Production and Future Opportunities. In: **Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes**. Springer, Cham, 2019. p. 431-516.
- ANTONUCCI, Salvatore et al. Selective mitochondrial superoxide generation in vivo is cardioprotective through hormesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 134, p. 678-687, 2019.
- ARFAOUI, Arbia; EL HADRAMI, Abdelbasset; DAAYF, Fouad. Pre-treatment of soybean plants with calcium stimulates ROS responses and mitigates infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant physiology and biochemistry**, v. 122, p. 121-128, 2018.
- ASHRAF, M. P. J. C.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant science**, v. 166, n. 1, p. 3-16, 2004.
- BAI, Xinfu et al. Effects of moderate soil salinity on osmotic adjustment and energy strategy in soybean under drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 139, p. 307-313, 2019.
- BARBOSA, J. C.; MALDONADO JUNIOR, W. AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. **Jaboticabal, FCAV/UNESP. 396p**, 2014.
- BARCELOS, J. P. Q. et al. Impact of foliar nickel application on urease activity, antioxidant metabolism and control of powdery mildew (*Microsphaera diffusa*) in soybean plants. **Plant pathology**, v. 67, n. 7, p. 1502-1513, 2018.
- BARRS, H. D.; WEATHERLEY, P. E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian journal of biological sciences**, v. 15, n. 3, p. 413-428, 1962.

BLUM, Abraham. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant, Cell & Environment**, v. 40, n. 1, p. 4-10, 2017.

BORJAS-VENTURA, Ricardo et al. Global warming: Antioxidant responses to deal with drought and elevated temperature in *Stylosanthes capitata*, a forage legume. **Journal of Agronomy and Crop Science**, 2020.

BOROVNIK, Olga A.; GRABELNYCH, Olga I. Mitochondrial alternative cyanide-resistant oxidase is involved in an increase of heat stress tolerance in spring wheat. **Journal of plant physiology**, v. 231, p. 310-317, 2018.

BOROVNIK, Olga A. et al. Effect of Cold Acclimation and Deacclimation on the Content of Soluble Carbohydrates and Dehydrins in the Leaves of Winter Wheat. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 15, n. 2, 2019.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAHN, M. D.; ZOBEL, R. W.; BOULDIN, D. R. Relationship between root elongation rate and diameter and duration of growth of lateral roots of maize. **Plant and Soil**, v. 119, n. 2, p. 271-279, 1989.

CALDERÓN, Aingeru et al. Lack of mitochondrial thioredoxin o1 is compensated by antioxidant components under salinity in *Arabidopsis thaliana* plants. **Physiologia plantarum**, v. 164, n. 3, p. 251-267, 2018.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany**, v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009.

CHUNG, Yong Suk et al. Silicon Confers Soybean Resistance to Salinity Stress Through Regulation of Reactive Oxygen and Reactive Nitrogen Species. **Frontiers in plant science**, v. 10, 2019.

CIA, M. C. et al. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and-sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, n. 3, p. 313-324, 2012.

DEL-SAZ, Néstor Fernández et al. Salinity tolerance is related to cyanide-resistant alternative respiration in *Medicago truncatula* under sudden severe stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 39, n. 11, p. 2361-2369, 2016.

DING, Chang-Qing et al. Genome-wide identification and characterization of ALTERNATIVE OXIDASE genes and their response under abiotic stresses in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. **Planta**, v. 248, n. 5, p. 1231-1247, 2018.

DINAKAR, Challabathula et al. Alternative oxidase pathway optimizes photosynthesis during osmotic and temperature stress by regulating cellular ROS, malate valve and antioxidative systems. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 68, 2016.

DOS SANTOS, Christina Vieira; REY, Pascal. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. **Trends in plant science**, v. 11, n. 7, p. 329-334, 2006.

DUBEY, Anamika et al. Growing more with less: breeding and developing drought resilient soybean to improve food security. **Ecological Indicators**, v. 105, p. 425-437, 2019.

DUBOIS, Michel et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ELKELISH, Amr A. et al. Selenium protects wheat seedlings against salt stress-mediated oxidative damage by up-regulating antioxidants and osmolytes metabolism. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 137, p. 144-153, 2019.

FANELLO, Diego Darío et al. Plasticity of root growth and respiratory activity: Root responses to above-ground senescence, fruit removal or partial root pruning in soybean. **Plant Science**, v. 290, p. 110296, 2020.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020 Disponível <http://faostat.fao.org> Acesso em: 06 de julho de 2020.

FENG, Hanqing et al. Expression and signal regulation of the alternative oxidase genes under abiotic stresses. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 45, n. 12, p. 985-994, 2013.

FICHMAN, Yosef; MILLER, Gad; MITTLER, Ron. Whole-plant live imaging of reactive oxygen species. **Molecular plant**, v. 12, n. 9, p. 1203-1210, 2019.

FIDANTEMIZ, Yavuz F. et al. Effect of water table depth on soybean water use, growth, and yield parameters. **Water**, v. 11, n. 5, p. 931, 2019.

FLOWERS, T. J.; HAJIBAGHERI, M. A. Salinity tolerance in *Hordeum vulgare*: ion concentrations in root cells of cultivars differing in salt tolerance. **Plant and soil**, v. 231, n. 1, p. 1-9, 2001.

FRUKH, Arajmand et al. Modulation in growth, biochemical attributes and proteome profile of rice cultivars under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 146, p. 55-70, 2020.

FOYER, Christine H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and experimental botany**, v. 154, p. 134-142, 2018.

GIANNOPOLITIS, Constantine N.; RIES, Stanley K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GIRAUDO, Maria Eugenia. Dependent development in South America: China and the soybean nexus. **Journal of Agrarian change**, v. 20, n. 1, p. 60-78, 2019.

GRATÃO, Priscila L. et al. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 79-96, 2012.

GRATÃO, Priscila L. et al. Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. **Biometals**, v. 28, n. 5, p. 803-816, 2015.

GÓMEZ, Rodrigo et al. Manipulation of oxidative stress responses as a strategy to generate stress-tolerant crops. From damage to signaling to tolerance. **Critical reviews in biotechnology**, v. 39, n. 5, p. 693-708, 2019.

GUTIÉRREZ, Jorge S. et al. Oxidative status and metabolic profile in a long-lived bird preparing for extreme endurance migration. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

HE, Qiang et al. Alternative respiration pathway is involved in the response of highland barley to salt stress. **Plant cell reports**, v. 38, n. 3, p. 295-309, 2019.

HOAGLAND, Dennis Robert et al. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California agricultural experiment station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

HUANG, Shaobai et al. Mitochondrial complex II of plants: subunit composition, assembly, and function in respiration and signaling. **The Plant Journal**, v. 98, n. 3, p. 405-417, 2019.

HUSSAIN, S. et al. Distribution and effects of ionic titanium application on energy partitioning and quantum yield of soybean under different light conditions. **PHOTOSYNTHETICA**, v. 57, n. 2, p. 572-580, 2019.

JIANG, Qingsong et al. Characterising dryland salinity in three dimensions. **Science of The Total Environment**, v. 682, p. 190-199, 2019.

KÜTÜK, Sinem Gökçe et al. Curcumin enhances cisplatin-induced human laryngeal squamous cancer cell death through activation of TRPM2 channel and mitochondrial oxidative stress. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

LALOI, Christophe et al. The Arabidopsis cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. **Plant Physiology**, v. 134, n. 3, p. 1006-1016, 2004.

LI, Xinming et al. A fast and specific fluorescent probe for thioredoxin reductase that works via disulphide bond cleavage. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 2745, 2019.

LI, Yanman et al. The alternative oxidase pathway is involved in the BR-induced salt resistance in mustard. **Acta physiologiae plantarum**, v. 40, n. 9, p. 171, 2018

LI, Ying-hui et al. Identification of loci controlling adaptation in Chinese soya bean landraces via a combination of conventional and bioclimatic GWAS. **Plant biotechnology journal**, v. 18, n. 2, p. 389-401, 2020.

LIN, J. et al. Transcriptome profiling of genes involved in photosynthesis in *Elaeagnus angustifolia* L. under salt stress. **Photosynthetica**, v. 56, n. 4, p. 998-1009, 2018.

LICHTENTHALER, Hartmut K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 350-382. 1987.

LIMA, Cristina Silva et al. Antioxidant protection and PSII regulation mitigate photo-oxidative stress induced by drought followed by high light in cashew plants. **Environmental and experimental botany**, v. 149, p. 59-69, 2018.

- LIU, Ailin et al. Transcriptomic reprogramming in soybean seedlings under salt stress. **Plant, cell & environment**, v. 42, n. 1, p. 98-114, 2019.
- LIU, Tao et al. H₂O₂ and NO are involved in trehalose-regulated oxidative stress tolerance in cold-stressed tomato plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 171, p. 103961, 2020a.
- LIU, Cuiyu et al. Effects of Salt Stress on Growth, Photosynthesis, and Mineral Nutrients of 18 Pomegranate (*Punica granatum*) Cultivars. **Agronomy**, v. 10, n. 1, p. 27, 2020b.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MA, Yinli et al. Hydrogen sulfide may function downstream of hydrogen peroxide in salt stress-induced stomatal closure in *Vicia faba*. **Functional plant biology**, v. 46, n. 2, p. 136-145, 2019.
- MANSOUR, M. M. F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum**, v. 43, n. 4, p. 491-500, 2000.
- MARCOLINO-GOMES, Juliana et al. Transcriptome-wide identification of reference genes for expression analysis of soybean responses to drought stress along the day. **PLoS one**, v. 10, n. 9, p. e0139051, 2015.
- MARSCHNER, Horst. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Academic press, 2011.
- MARTÍ, María C. et al. Response of mitochondrial thioredoxin PsTrx o 1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3863-3874, 2011.
- MAXWELL, Kate; JOHNSON, Giles N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.
- MEYER, Yves; REICHHELD, Jean Philippe; VIGNOLS, Florence. Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. **Photosynthesis Research**, v. 86, n. 3, p. 419-433, 2005

MUNNS, Rana; GILLIHAM, Matthew. Salinity tolerance of crops—what is the cost?. **New phytologist**, v. 208, n. 3, p. 668-673, 2015.

MUNNS, Rana; TESTER, Mark. Mechanisms of salinity tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 651-681, 2008.

MURIK, Omer et al. Downregulation of mitochondrial alternative oxidase affects chloroplast function, redox status and stress response in a marine diatom. **New Phytologist**, v. 221, n. 3, p. 1303-1316, 2019.

NAJAR, Rim et al. Effect of salt stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Medicago truncatula*. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 153, n. 1, p. 88-97, 2018.

NEGRÃO, Sónia; SCHMÖCKEL, S. M.; TESTER, M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. **Annals of botany**, v. 119, n. 1, p. 1-11, 2017.

NICO, Magalí; MIRALLES, Daniel Julio; KANTOLIC, Adriana Graciela. Natural post-flowering photoperiod and photoperiod sensitivity: Roles in yield-determining processes in soybean. **Field Crops Research**, v. 231, p. 141-152, 2019.

NIETZEL, Thomas et al. Redox regulation of mitochondrial proteins and proteomes by cysteine thiol switches. **Mitochondrion**, v. 33, p. 72-83, 2017.

NOCTOR, Graham; REICHHELD, Jean-Philippe; FOYER, Christine H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, p. 3-12, 2018.

OTTOW, Eric A. et al. *Populus euphratica* displays apoplastic sodium accumulation, osmotic adjustment by decreases in calcium and soluble carbohydrates, and develops leaf succulence under salt stress. **Plant Physiology**, v. 139, n. 4, p. 1762-1772, 2005.

PAGLIARANI, Chiara et al. Priming xylem for stress recovery depends on coordinated activity of sugar metabolic pathways and changes in xylem sap pH. **Plant, cell & environment**, 2019.

PARVIN, Khursheda et al. Exogenous vanillic acid enhances salt tolerance of tomato: Insight into plant antioxidant defense and glyoxalase systems. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 150, p. 109-120, 2020.

QADIR, Manzoor et al. Economics of salt-induced land degradation and restoration. In: **Natural resources forum**. p. 282-295. 2014.

RIAZ, Muhammad et al. A Comprehensive Review on Rice Responses and Tolerance to Salt Stress. In: **Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance**. Woodhead Publishing. p. 133-158, 2019.

ROMERO-MUNAR, Antònia et al. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Confer Salt Tolerance in Giant Reed (*Arundo donax* L.) Plants Grown Under Low Phosphorus by Reducing Leaf Na⁺ Concentration and Improving Phosphorus Use Efficiency. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 843, 2019.

SABAGH, Ayman EL et al. Sustainable soybean production and abiotic stress management in saline environments: a critical review. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 2, p. 228, 2019.

SADAK, Mervat Sh et al. Physiological and biochemical responses of soybean (*Glycine max* L.) to cysteine application under sea salt stress. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 44, n. 1, p. 1-10, 2020.

SAIRAM, Raj Kumar; RAO, K. Veerabhadra; SRIVASTAVA, G. C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**, v. 163, n. 5, p. 1037-1046, 2002.

SCHEIBE, Renate. Maintaining homeostasis by controlled alternatives for energy distribution in plant cells under changing conditions of supply and demand. **Photosynthesis research**, v. 139, n. 1-3, p. 81-91, 2019.

SELINSKI, Jennifer et al. Alternative oxidase is positive for plant performance. **Trends in plant science**, v. 23, n. 7, p. 588-597, 2018.

SHABALA, S. Ionic and osmotic components of salt stress specifically modulate net ion fluxes from bean leaf mesophyll. **Plant, Cell & Environment**, v. 23, n. 8, p. 825-837, 2000.

SHABALA, Sergey; CUIN, Tracey A. Potassium transport and plant salt tolerance. **Physiologia plantarum**, v. 133, n. 4, p. 651-669, 2008.

SHARMA, Sucheta; SHARMA, Anju; SINGH, Dhanwinder. Effect of sodium selenate on photosynthetic efficiency, antioxidative defence system and micronutrients in maize (*Zea mays*). **Biologia**, v. 73, n. 2, p. 137-144, 2018.

SHIMIZU, Naoto et al. Reactive oxygen species (ROS) generation and ROS-induced lipid peroxidation are associated with plasma membrane modifications in host cells in response to AK-toxin I from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, n. 1, p. 6-15, 2006.

SHIN, Jin Seok et al. Lon domain-containing protein 1 represses thioredoxin y2 and regulates ROS levels in *Arabidopsis* chloroplasts. **FEBS letters**, v. 594, n. 6, p. 986-994, 2020.

SIVRITEPE, N.; SIVRITEPE, H. O.; ERIS, A. The effects of NaCl priming on salt tolerance in melon seedlings grown under saline conditions. **Scientia horticulturae**, v. 97, n. 3-4, p. 229-237, 2003.

SMIRNOFF, Nicholas; ARNAUD, Dominique. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. **New Phytologist**, v. 221, n. 3, p. 1197-1214, 2019.

SIES, Helmut; JONES, Dean P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1-21, 2020.

SOARES, Cristiano et al. Plants facing oxidative challenges—A little help from the antioxidant networks. **Environmental and Experimental Botany**, v. 161, p. 4-25, 2019.

SONG, Yong et al. Genotypic variation in salinity tolerance and its association with nodulation and nitrogen uptake in soybean. **Plant Production Science**, v. 20, n. 4, p. 490-498, 2017.

STIER, Antoine et al. Oxidative stress and mitochondrial responses to stress exposure suggest that king penguins are naturally equipped to resist stress. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 8545, 2019.

SU, Tong-fu et al. Characterization of original and expanded leaf-roots of tobacco by terahertz spectroscopy and X-ray microanalysis. **Materials Letters**, v. 62, n. 17-18, p. 2779-2782, 2008.

SUN, Xin et al. Implications of terminal oxidases in the regulation of soybean photosynthetic performance under different light intensities. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 12, p. 266, 2017.

ÜNLÜ, Ercan Selçuk; ÜNÜVAR, Ömer Can; AYDIN, Meryem. Identification of alternative oxidase encoding genes in *Caulerpa cylindracea* by de novo RNA-Seq assembly analysis. **Marine genomics**, v. 46, p. 41-48, 2019.

VANACKER, H el ene et al. Redox regulation of monodehydroascorbate reductase by thioredoxin y in plastids revealed in the context of water stress. **Antioxidants**, v. 7, n. 12, p. 183, 2018.

VICENTINI, Tatiane M. et al. Aluminum directly inhibits alternative oxidase pathway and changes metabolic and redox parameters on *Jatropha curcas* cell culture. **Plant physiology and biochemistry**, v. 136, p. 92-97, 2019.

WEI, Lijie et al. Ethylene is involved in brassinosteroids induced alternative respiratory pathway in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings response to abiotic stress. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 982, 2015.

WEN, Chuangyu et al. ROS-mediated inactivation of the PI3K/AKT pathway is involved in the antigastric cancer effects of thioredoxin reductase-1 inhibitor chaetocin. **Cell death & disease**, v. 10, n. 11, p. 1-16, 2019.

YANG, Hongli et al. Overexpression of BnaAOX1b Confers Tolerance to Osmotic and Salt Stress in Rapeseed. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 9, n. 10, p. 3501-3511, 2019.

YAO, Yuan et al. ETHYLENE RESPONSE FACTOR 74 (ERF74) plays an essential role in controlling a respiratory burst oxidase homolog D (RbohD)-dependent mechanism in response to different stresses in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 213, n. 4, p. 1667-1681, 2017.

YASMIN, Humaira et al. Halotolerant rhizobacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Bacillus subtilis* mediate systemic tolerance in hydroponically grown soybean (*Glycine max* L.) against salinity stress. **PLoS One**, v. 15, n. 4, p. e0231348, 2020.

ZHAN, Jie et al. Prospective sustainable production of safe food for growing population based on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) crops under Cd soil contamination stress. **Journal of cleaner production**, v. 212, p. 22-36, 2019.

ZHANG, Wenxiao et al. The salt-induced transcription factor GmMYB84 confers salinity tolerance in soybean. **Plant Science**, v. 291, p. 110326, 2020.

ZHEN-HUA, ZHANG et al. Responses of different rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to salt stress and relation to carbohydrate metabolism and chlorophyll content. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 1, p. 19-27, 2012.

ZHONG, Min et al. Effects of exogenous putrescine on glycolysis and Krebs cycle metabolism in cucumber leaves subjected to salt stress. **Plant Growth Regulation**, v. 79, n. 3, p. 319-330, 2016.

ZHU, Tong et al. Mitochondrial alternative oxidase-dependent autophagy involved in ethylene-mediated drought tolerance in *Solanum lycopersicum*. **Plant biotechnology journal**, v. 16, n. 12, p. 2063-2076, 2018.