

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
EM SEMENTES DE SOJA INDUZ TOLERÂNCIA AO
ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO**

**Reginaldo de Oliveira
Engenheiro Agrônomo**

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
EM SEMENTES DE SOJA INDUZ TOLERÂNCIA AO
ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO**

Reginaldo de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Rogério Falleiros Carvalho

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

2019

O48p

Oliveira, Reginaldo de

Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio em sementes de soja induz tolerância ao estresse por déficit hídrico / Reginaldo de Oliveira. -- Jaboticabal, 2019
65 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Rogério Falleiros Carvalho

1. Memória de estresse. 2. Germinação. 3. Sinalização.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM SEMENTES DE SOJA INDUZ TOLERÂNCIA AO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO

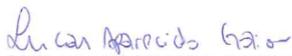
AUTOR: REGINALDO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. LUCAS APARECIDO GAION
UNIMAR / Marília/SP



Profa. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Reginaldo de Oliveira, natural de Terra Nova do Norte-MT, possui graduação em agronomia pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Câmpus de Alta Floresta, em 2017. Durante a graduação, foi bolsista do Programa de Bolsas para iniciação científica (PIBIC) no ano de 2013 a 2014, e bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de 2015 a 2016. Em março de 2017, ingressou no Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal) pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, onde desenvolve trabalho voltado para fisiologia de estresses abiótico, orientado pelo Prof. Dr. Rogério Falleiros Carvalho.

AGRADECIMENTOS

À DEUS fonte de toda sabedoria e inteligência, por iluminar sempre os melhores caminhos a seguir.

Aos meus pais, Pedro Cicero de Oliveira e Eneci Rissardi, por sempre me incentivarem a ir além do que imaginaria poder chegar.

Aos meus familiares, avós; Otacílio Muniz de Oliveira e Durvalina Fernandes de Oliveira, tios; pelas orações, torcida e exemplo de humildade.

Ao meu orientador professor Dr. Rogério Falleiros Carvalho, pela atenção, paciência e por ter dedicado todo seu conhecimento e prol da minha formação.

À professora Dra. Durvalina Maria Mathias dos Santos e Dra Priscila Lupino Gratão, pelos ensinamentos e acolhida no Laboratório de Fisiologia Vegetal.

Á Soninha pelas inúmeras vezes que me ajudou e ensinou durante a execução das análises laboratoriais e pela sua rica amizade.

Á Syngenta, na pessoa do Alexandre José Silva, por conceder as sementes utilizadas no trabalho.

À Emilaine da Rocha Prado, pela parceria e apoio incondicional em todos os momentos que precisei.

Aos orientados do professor Dr. Rogério Falleiros Carvalho e meus contemporâneos, Lucas, Victor, Joel, Rafael, Clebson e Carol, pela amizade e por terem compartilhado um pouco de “ciência” durante as apresentações e discussões em grupo.

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Leticia Alves e Ricardo Borjas.

Ao programa de pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, pela acolhida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"Preferi a sabedoria aos cetros e aos tronos, e em comparação com ela julguei as riquezas como algo sem valor. Nem a comparei com a pedra mais preciosa, pois diante dela o ouro é como um pouco de areia. Ao seu lado, a prata deve ser considerada como barro" (**Sabedoria 6:8-9**).

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Origem e importância da soja.....	3
2.2. Estresse por déficit hídrico e espécies reativas de oxigênio	4
2.3. Peróxido de hidrogênio e sinalização em plantas	7
2.4. Aplicação exógena de H ₂ O ₂ em sementes.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Cultivar de soja, pré-tratamento e condições de crescimento.....	13
3.2. Avaliações de germinação e desempenho de plântulas sob estresse	13
3.3. Pré-tratamento de sementes para a análise do desenvolvimento de plantas sob estresse hídrico.....	14
3.4. Umidade no solo, conteúdo relativo de água na folha e potencial hídrico foliar	16
3.5. Análises biométricas de crescimento	17
3.6. Quantificação de prolina	17
3.7. Teores de clorofilas e carotenoides.....	18
3.8. Caracterização do estresse oxidativo.....	18
3.9. Peróxido de hidrogênio	18
3.10. Delineamento experimental	19
3.11. Forma de análise dos resultados.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Efeito do H ₂ O ₂ na germinação e no crescimento das plântulas.....	20
4.2. Efeito do pré-tratamento de sementes na soja sob restrição hídrica	23
4.3. Efeito do pré-tratamento no teor de prolina.....	28
4.4. Efeito do pré-tratamento no conteúdo de pigmentos.....	30

4.5. Efeito do pré-tratamento nos teores H_2O_2 e MDA	31
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS	40
APÊNDICES	53

PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM SEMENTES DE SOJA INDUZ TOLERÂNCIA AO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO – Atualmente, devido às mudanças no regime de chuvas, a escassez de água em diversas regiões agrícolas é cada vez mais frequente. Dessa forma, o déficit hídrico se torna uma questão preocupante, especialmente no cultivo da soja, uma das mais importantes espécies agrônômicas. Concomitantemente, pesquisas indicam o importante papel do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como molécula sinalizadora, capaz de induzir respostas de tolerância ao déficit hídrico. Assim, buscamos neste estudo, avaliar as respostas de plantas de soja (*Glycine max* L.) submetidas ao déficit hídrico após pré-tratamento com concentrações de H_2O_2 em sementes. Para tal, sementes de soja foram embebidas em concentrações de H_2O_2 (0, 10, 50, 100 e 200 mM) seguido de secagem e, posteriormente foram submetidas ao estresse osmótico com polietileno glicol (PEG -0,2 MPa) e cloreto de sódio (NaCl -0,2 MPa). Avaliou-se germinação, crescimento, acúmulo de prolina, teor de H_2O_2 e malondialdeído (MDA) na fase de plântulas. Para as avaliações em planta, as sementes foram embebidas apenas com 10 mM de H_2O_2 ou água e, condicionadas ao déficit hídrico pela interrupção da irrigação 36 dias após a semeadura. Posteriormente, foi avaliado a umidade do solo, as relações hídricas (teor relativo de água e potencial hídrico foliar), crescimento, acúmulo de prolina, conteúdo de pigmentos, teor de H_2O_2 e MDA. As avaliações foram realizadas em 4 períodos de estresse (0, 4 e 8 dias de restrição hídrica e, 4 dias de reidratação após o estresse máximo de 8 dias). O pré-tratamento com 10 e 50 mM de H_2O_2 melhorou a germinação de sementes, crescimento e acúmulo de massa seca das plântulas sob estresse osmótico e salino. Em plantas, com 36 dias, o tratamento com 10 mM de H_2O_2 promoveu melhorias ao prolongar o tempo para diminuição do potencial hídrico em plantas sob estresse além de induzir o crescimento de raízes em ambas as condições hídricas, porém não evitou a diminuição do crescimento da parte aérea, a redução dos pigmentos e aumento do estresse oxidativo. Dessa forma, demonstramos os efeitos positivos do uso de H_2O_2 no pré-tratamento de sementes de soja seguido de secagem para induzir tolerância ao déficit hídrico em plântulas. Todavia, em plantas, mais estudos são necessários para compreensão do efeito do H_2O_2 .

Palavras-chave: Memória de estresse, germinação, sinalização

SEED-PRIMING WITH HYDROGEN PEROXIDE IN SEEDS OF SOYBEAN PROMOTES TOLERANCE TO DROUGHT STRESS

ABSTRACT - Currently, due to changes in the rainfall regime, water scarcity in several agricultural regions is becoming more frequent. Thus, the water deficit becomes a matter of concern, especially in the cultivation of soybean, one of the most important agronomic species. Meanwhile, researches indicate the important role of hydrogen peroxide (H_2O_2) as a signaling molecule, able to induce tolerance responses to water deficit. Thus, the purpose of this study was evaluating the responses of soybean plants (*Glycine max* L.) submitted to water stress after seed priming with H_2O_2 concentrations in seeds. Thus, soybean seeds were placed to soak in H_2O_2 solutions (0, 10, 50, 100 and 200 mM) followed by drying and subsequent exposition to osmotic stress with polyethylene glycol (PEG -0.2 MPa) and (NaCl -0.2 MPa). Germination, growth, proline accumulation and oxidative stress were evaluated in the seedling stage. For the plant evaluations, the seeds were only soaked with 10 mM H_2O_2 or water and, conditioned to the water deficit by the interruption of irrigation 36 days after sowing. Subsequently, soil moisture, water relations (relative water content and leaf water potential), growth, proline accumulation, pigment content and oxidative stress were evaluated. The evaluations were carried out in 4 stress periods (0, 4 and 8 days of water restriction and 4 days of rehydration after 8 days of maximum stress). Seed priming with 10 and 50 mM H_2O_2 improved germination of seeds, growth and dry mass accumulation of seedlings under osmotic and saline stress. In plants with 36 days, treatment with 10 mM H_2O_2 promoted improvements by prolonging the time to decrease the water potential in plants under stress, induce root growth in both water conditions from four days and reduce the content of proline and H_2O_2 in relation to the control, although it did not avoid the decrease of the growth, reduction of the photosynthetic pigments and increase of the oxidative stress. Thus, we demonstrated the positive effects of H_2O_2 use on pre-treatment of soybean seeds followed by drying to induce tolerance to water deficit in seedlings. However, in plants, further studies are required to obtain conclusive answers.

Keywords: Stress memory, germination, signaling

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma oleaginosa de grande interesse econômico em muitos países, cujos grãos, ricos em proteínas e óleo, são utilizados na alimentação humana e animal (Clemente e Cahoon, 2009; Jumrani e Bhatia, 2018). Entretanto, as plantas estão expostas a ambientes adversos, marcados por grande multiplicidade de fatores estressores, como o estresse por déficit hídrico (Nakagawa et al., 2018), considerado o mais importante e severo dos estresses abióticos em regiões agrícolas.

O déficit hídrico pode causar danos irreversíveis, desde a germinação da semente até estádios fenológicos mais avançados do ciclo da soja. Quando o estresse ocorre na germinação, o estabelecimento das plântulas é prejudicado, se acontecer em outras fases do crescimento, haverá redução na atividade fotossintética, acarretando perdas na produtividade (Silva et al. 2018; Bakhshandeh e Gholamhossieni, 2018). Adicionalmente, o estresse por déficit hídrico promove um desajuste nos mecanismos de defesa da planta, resultando na produção descontrolada de espécies reativas de oxigênio (ERO), causadoras do estresse oxidativo (Shao et al., 2008; Peng et al., 2016).

Para minimizar os danos causados pelo estresse hídrico em soja, as principais alternativas têm sido realizar a semeadura em épocas seguras e/ou utilizar sistemas de irrigação. Todavia, além do custo elevado, a técnica da irrigação quando mal manejada, pode elevar os índices de salinidade do solo, que também é prejudicial para a cultura (Pankova, 2016). Devido a esses fatores, a busca por novas alternativas tem sido constante. Alguns estudos têm destacado a importância do pré-tratamento em sementes para indução de tolerância aos mais diversos tipos de estresses, como por exemplo, salinidade em arroz (Wang et al., 2010; Zhang et al., 2014), déficit hídrico em pepino (Paul e Roychoudhury, 2017) e encharcamento em soja (Andrade et al., 2018). Nesta técnica, a germinação é induzida na presença de soluções específicas que posteriormente é interrompida, evitando assim a protrusão da radícula (Varier et al., 2010; Paparella et al., 2015; Wojtyla et al., 2016b). Esses pesquisadores têm discutido que tal estratégia induz, durante a absorção de água pela

semente, uma série de mecanismos bioquímicos capazes de melhorar o crescimento de plantas sob condição de estresse.

Atualmente o uso de H_2O_2 para esse propósito (indução de tolerância a estresses), tem sido frequente, devido à sua importância nos processos fisiológicos e ação como molécula sinalizadora de estresse (Niu e Liao, 2016; Amooaghaie e Tabatabaie, 2017). De fato, o pré-tratamento em sementes com H_2O_2 é capaz de induzir mecanismos de tolerância que podem ser expressos em plantas sob estresse, processo denominado de “memória de estresse” (Wojtyla et al., 2016a). Os principais mecanismos induzidos pelo H_2O_2 envolvem interações com hormônios controladores da germinação e aumento significativo de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que desempenham um papel defensivo contra estresses oxidativos (Kiliane et al., 2014; Guler e Pehlivan, 2016; Talbi et al., 2015; Javed et al., 2018).

No entanto, nestes estudos a secagem posterior à embebição (pré-tratamento) não é realizada, impossibilitando o uso desta técnica para espécies agrônômicas importantes como a soja que é semeada por máquinas. Neste sentido, há evidências de que mesmo após serem secas (retornando ao estado inicial de umidade), as sementes pré-tratadas também mantêm maior tolerância ao estresse, descrita como “memória de pré-tratamento” (Chen e Arora, 2013).

O princípio desta técnica, denominada de “dry back” (Hegarty, 1978; Lima e Meiado, 2018) é propiciar aumento no teor de umidade da semente para que haja as devidas alterações fisiológicas, sendo secas novamente para que possa facilitar a semeadura convencional. No entanto, a associação desta técnica ao pré-tratamento de sementes de soja com H_2O_2 ainda é pouco conhecida, tornando necessário um aprofundamento nas pesquisas, envolvendo também espécies de interesse comercial, como a cultura da soja.

Desta maneira, expectativas são geradas sobre o pré-tratamento de sementes com H_2O_2 para assegurar satisfatória germinação e indução de tolerância às plantas durante o estresse por déficit hídrico. Assim, objetivou-se estudar as respostas fisiológicas e bioquímicas de plântulas e plantas de soja submetidas ao estresse hídrico, após pré-tratamento com H_2O_2 .

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem e importância da soja

Evidências históricas e geográficas indicam que a soja cultivada (*Glycine max*) é originária da China (Guo et al., 2010). Pertencente a terceira maior família das angiospermas, apresenta a seguinte classificação taxonômica: reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae, gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* e forma cultivada *Glycine max* (L) Merrill (Sedyama, 2009).

Atualmente é considerada a principal leguminosa de interesse econômico mundial, devido a sua grande participação na produção de óleos e proteína destinados à alimentação humana e animal (Dubey et al., 2018). No ranking de produção mundial, o Brasil é o segundo maior produtor, seguido dos EUA (Conab, 2017; Usda, 2017). Neste cenário, é esperado que o Brasil ocupe a liderança, pois possui disponibilidade de área para expansão do cultivo de soja.

No Brasil, o cultivo da soja ganhou importância devido sua alta capacidade produtiva e demanda na alimentação animal. Por ser considerada uma planta de dias curtos, sua adaptação é dependente do fotoperíodo (Camara et al., 1997), além da disponibilidade hídrica adequada. A demanda de água na soja é variável, de acordo com cada cultivar, estágio fenológico e condições climáticas, que, de maneira geral, encontra-se entre 450 a 800 mm durante o ciclo todo (Farias, 2007).

Essas características, fizeram com que o cultivo da soja fosse restrito a determinadas regiões, as quais coincidiam com o clima de sua região de origem. Todavia, tais características foram melhoradas ao longo do tempo por meio de seleção e melhoramento genético, e novas cultivares de soja mais adaptadas e tolerantes às diferentes latitudes e condições climáticas foram lançadas. Isso possibilitou o plantio de aproximadamente 34 milhões de hectares no ano de 2017, abrangendo latitudes de 30 ° S a 2 ° S (Abraão e Costa, 2018).

No entanto, por ser altamente dependente das condições climáticas, a produção desta cultura é afetada de forma negativa por fatores abióticos, a

exemplo, o déficit hídrico, considerado um dos fatores mais importantes que limita o desempenho e a produtividade das plantas em todo o mundo (Boyer, 1982; Ribas-Carbo et al., 2005).

O estresse por déficit hídrico tem sido cada vez mais frequente e pode diminuir o rendimento médio das culturas em até 40% (Pathan et al., 2007; Akpinar et al., 2013). Este cenário é ainda mais preocupante, caso seja considerada a disponibilidade de alimentos para uma população global, estimada para 8,3 bilhões de pessoas em 2030 (Dubey et al., 2018).

As previsões apontam que instabilidades no regime hídrico incidam com maior frequência nas regiões produtoras de soja mundialmente (Wijewardana et al., 2018) prejudicando o rendimento da cultura.

No Brasil, destaca-se como causa principal de reduções na produtividade da soja, o veranico, caracterizado por pequenos intervalos de estiagem cada vez mais presente devido às mudanças no clima (Gava, 2018).

2.2. Estresse por déficit hídrico e espécies reativas de oxigênio

O crescimento das plantas é adversamente afetado por uma série de fatores abióticos que causam estresse às plantas, tais como, seca, salinidade do solo, baixa e alta temperatura, encharcamento, e toxicidade por metais pesados (Mohammadi et al., 2012).

O déficit hídrico, ou seja, disponibilidade hídrica insuficiente para o desenvolvimento e realização dos processos metabólicos vitais pelas plantas, tem como causa principal os baixos índices de pluviosidade e a indisponibilidade de outras fontes de água (irrigação) que, conseqüentemente, acarreta em déficit hídrico no solo e planta (Carmody et al., 2016; Nachimuthu et al., 2017).

As primeiras fases do desenvolvimento da soja, germinação e estabelecimento de plântulas, são momentos cruciais do desenvolvimento da planta (Bakhshandeh e Gholamhossieni, 2018), por coincidência, esses são os períodos em que há maior probabilidade de ocorrer estresse por déficit hídrico na soja, pois a semeadura ocorre em períodos de instabilidades de chuva, compreendido pelos meses de setembro a novembro nas regiões de produção de soja no Brasil (Pires et al., 2016).

Além disso, o estresse por déficit hídrico, duradouro ou temporário, pode limitar o desenvolvimento das plantas cultivadas mais que qualquer outro fator abiótico ambiental (Shão et al., 2008), haja vista que a água é o principal componente dos processos fisiológicos da planta (Nachimuthu et al., 2017). Conseqüentemente, sua limitação afeta negativamente a fotossíntese, além de comprometer o crescimento, fortemente impulsionado pelo gradiente de potencial hídrico celular (Silva et al., 2018).

Em condições anormais de suprimento hídrico, mudanças morfológicas importantes são observadas nas plantas de soja, por exemplo, redução da área foliar que diminui a superfície transpirante, e aumento no crescimento de raízes para explorar uma maior área de solo em busca de água (Gonçalves et al., 2017; Jumrani e Bhatia, 2018).

Adicionalmente, outros processos importantes podem ser impactados de forma negativa durante os períodos de deficiência hídrica. Neste sentido, Ishibashi et al. (2011) verificaram que a interrupção da irrigação por 4 e 8 dias seguidos na soja, resultou em diminuição no teor relativo de água foliar, taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática, considerados processos fundamentais do metabolismo primário, envolvidos no desenvolvimento da planta (Leisner et al., 2017).

Assim, os efeitos negativos do déficit hídrico, independente da fase, podem diminuir os índices de produtividade da soja. Estudo recente demonstrou que em condições hídricas deficitárias, nas fases vegetativa e reprodutiva, as reduções na produção de grãos foram de 28 e 74%, respectivamente (Jumrani e Bhatia et al., 2018).

Desse modo, para minimizar os danos ocasionados pela seca, uma das técnicas utilizadas no cultivo da soja é a irrigação (Adeboye et al., 2015), entretanto, por apresentar um elevado custo de implantação e manutenção, seu uso é restrito. De fato, estima-se que, nos principais países produtores, menos de 5% das áreas ocupadas por soja seja irrigada (Sinclair, 2017). Outro ponto a ser considerado é o manejo inadequado da irrigação que pode acarretar em outro estresse, como salinidade dos solos (Deinlein et al., 2014).

Ambos, seca e salinidade, promovem estresse secundário semelhante (oxidativo), causando alterações nos processos fisiológicos e bioquímicos das

plantas como, diminuição do teor relativo de água na folha, redução dos pigmentos fotossintéticos e, aumento no teor de MDA (Chaves et al., 2009; Kaushal et al 2016).

A deficiência hídrica, além de comprometer as atividades fisiológicas normais da célula, pode induzir uma produção excessiva de ERO em vários compartimentos celulares, como nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomas. As principais ERO produzidas nesses locais são: ânion superóxido (O^{2-}), radical hidroxila ($\cdot OH$), oxigênio singleto (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Fang e Xiong, 2015).

Em condições normais, de 1 a 2% do O_2 consumido pela planta é convertido em ERO, entretanto, nestes patamares, à medida que são geradas há a eliminação por um conjunto de enzimas do sistema antioxidante de resposta, sendo assim incapazes de causar algum tipo de dano as células (Foyer e Noctor, 2005).

Todavia, em situações de estresse ambiental como seca e salinidade, o equilíbrio entre a produção e eliminação de ERO fica comprometido. Um dos processos que mais contribui para esse desequilíbrio, provocado por esses estresses, é o fechamento estomático. Esse evento desencadeia uma cascata de reações que facilita a produção de pelo menos duas ERO, iniciada pelo comprometimento da entrada de CO_2 que favorece a possível reação com as clorofilas no estado triplet formando o 1O_2 , além disso, a baixa concentração do CO_2 favorece o processo de fotorrespiração pela enzima Ribulose 1, 5-bisfosfato (RuBP), contribuindo substancialmente (>70%) para produção de H_2O_2 (Noctor et al., 2002; Das e Roychoudhury, 2014; Breusegem et al., 2018).

De maneira geral, as ERO produzidas podem afetar negativamente muitos processos na planta, por exemplo, inibição da expressão de genes e indução do estresse oxidativo (Schlicke et al., 2014).

Por outro lado, estudos recentes têm mostrado que as ERO não são responsáveis somente por ações deletérias às plantas (DAS; Roychoudhury, 2014), mas também agem como moléculas de sinalização, que transmitem respostas ambientais, prevenindo as plantas de diversos estresses (Sewelam et al., 2016). Assim, algumas ERO podem ser benéficas e coordenar o

crescimento normal e a aclimação aos estresses, a depender de sua concentração e natureza reativa (Carmody et al., 2016).

Dentre as ERO, o H_2O_2 tem sido amplamente estudado como molécula de sinalização por apresentar algumas características importantes comparado à outras ERO que o torna apto para sinalização, por exemplo: trata-se de uma molécula pequena e relativamente estável, possui passagem facilitada pelas membranas e é gerado rapidamente por muitos estímulos ambientais, apresentando reatividade seletiva (Sewelam et al., 2016; Andrade et al., 2018). Além disso, pode mediar a transdução de sinal intracelular por meio da oxidação de proteínas específicas (Paulsen e Carroll, 2010). Tal característica pode interferir em muitos processos fisiológicos e bioquímicos capazes de induzir aumento de tolerância ou aclimação aos estresses (Wojtyla et al., 2016a).

2.3. Peróxido de hidrogênio e sinalização em plantas

O H_2O_2 pode ser gerado no metabolismo das plantas por via enzimática direta e, indireta por oxidases como NADPH oxidase que produz o ânion superóxido, dismutado a H_2O_2 pela superóxido dismutase. Outros processos fisiológicos também contribuem para a formação do H_2O_2 celular, tais como: a transferência de elétrons em cloroplastos e mitocôndrias e na oxidação do glicolato nos peroxissomas (Niu e Liao, 2016; Khan et al., 2018).

O fato de possuir passagem facilitada por canais específicos (aquaporinas) da membrana plasmática, (Rodrigues et al., 2017), e alcançar relativamente longas distâncias ($8,4 \text{ cm min}^{-1}$) de onde é produzido até seu alvo (Gilroy et al., 2014; Gilroy et al., 2016), faz do H_2O_2 sinalizador primário (Sewelam et al., 2016), capaz de controlar respostas locais e sistêmicas de defesa (Choi et al., 2017; Si et al., 2018). Além disso, o H_2O_2 também pode atuar como mensageiro secundário, a jusante de outras biomoléculas (hormônios) em resposta à diferentes estímulos ambientais (Wojtyla et al., 2016a).

Em condições normais, o H_2O_2 produzido em diferentes partes da planta, medeia vários processos fisiológicos durante todas as fases de

desenvolvimento das plantas como: carbonilação de proteínas específicas e ativação de enzimas chave durante a germinação de sementes (Barba-Espin et al., 2011; Ishibashi et al., 2017), aceleração do crescimento de raízes primárias e laterais (Hernandez-Barrera et al., 2015) e fechamento estomático (Ge et al., 2015).

Por outro lado, em condições desfavoráveis provocadas por estresses abióticos, diferentes estudos apontam o papel central do H_2O_2 nas vias de sinalização melhorando as respostas das plantas em condições de seca (Ishibashi et al., 2011), salinidade (Bagheri et al., 2019), metais pesados (Hasanuzzaman et al., 2017) e encharcamento (Andrade et al., 2018).

O limiar de resposta entre sinalizador e causador de danos, depende da quantidade de H_2O_2 intracelular, que em baixas concentrações atua como uma molécula de sinalização, e embora possa ser rapidamente removido por enzimas antioxidantes, em concentrações ao redor de 1-10 mM, os mecanismos de eliminação são menos eficazes, permitindo que o H_2O_2 atue como um sinalizador (Sies, 2017; Cerny et al., 2018).

Neste sentido, foi demonstrado por Ishibashi et al. (2011) que a pulverização foliar de 1 mM de H_2O_2 elevou a taxa fotossintética, a condutância estomática, a síntese de oligossacarídeos e a expressão de genes em resposta ao estresse hídrico em soja. Terzi et al. (2014), também trabalhando com aplicações foliares de H_2O_2 (10 mM), observaram aumento no potencial hídrico foliar, na concentração de hormônio (ABA) e nos níveis de açúcares solúveis, prolina e poliaminas, enquanto a peroxidação lipídica e a condutância estomática diminuíram durante o estresse osmótico imposto por polietilenoglicol. Além disso, o H_2O_2 aplicado em milho na condição de deficiência hídrica promoveu aumento no crescimento de raízes e atividade de antioxidantes (Ahmad et al., 2013), protegendo as plantas do estresse.

Os efeitos tóxicos do níquel na fotossíntese e crescimento de plantas de mostarda (*Brassica juncea* L.) foram inibidos pela aplicação de 50 μ M de H_2O_2 , por meio do aumento da atividade das enzimas nitrato redutase e ATP-sulfurilase e diminuição da peroxidação lipídica e vazamento de eletrólitos (Khan et al., 2016). Aplicações com 50 μ M de H_2O_2 sobre raízes de canola (*Brassica napus* L.) por 24 horas, também induziu aumento significativo na atividade de enzimas antioxidantes e outros compostos não enzimático que

promoveram diminuição do estresse oxidativo provocado por cádmio (0,5 e 1,0 mM de CdCl₂) durante 48 (Hasanuzzaman et al., 2017).

A aplicação do H₂O₂ também pode ser uma opção de manejo eficiente para superar o estresse causado por alta salinidade. Nesse sentido, recentemente foi demonstrado que o H₂O₂ (1mM) aplicado via foliar reduziu a peroxidação lipídica (conteúdo de MDA) em plantas de pistache por meio do aumento da atividade de enzimas antioxidantes (APX e CAT) e de substâncias protetoras como o ácido ascórbico e carotenoides (Bagheri et al., 2019).

Considerando as respostas mediadas pelo H₂O₂ no metabolismo das plantas em relação à modulação de expressão gênica, aumento da atividade enzimática e de compostos promotores de maior tolerância em situações de estresse, fica evidente o potencial do H₂O₂ como uma importante ferramenta, capaz de auxiliar na proteção das plantas aos estresses.

2.4. Aplicação exógena de H₂O₂ em sementes

Na agricultura, a semente constitui a unidade básica principal para formação de uma nova planta. Entretanto, os estresses ambientais em momentos inesperados têm afetado negativamente a germinação e o crescimento das plantas na maioria das espécies anuais cultivadas de interesse econômico (Bakhshandeh e Gholamhossieni, 2018; Andrade et al., 2018).

Todavia, durante e após a embebição da semente, muitos processos ativos são desencadeados (modificações genéticas e bioquímicas), inclusive os que protegem as plantas para estresses subsequentes, constituindo uma “memória de estresse”, na qual pode ser expressa durante outras fases do desenvolvimento da planta (Chen e Arora, 2013; Kubala et al., 2015; Wojtyla et al., 2016b).

De maneira interessante, as ERO também podem ter função reguladora na expressão gênica durante a germinação e, essa interação faz parte de uma rede de sinalização integrada, envolvida em muitos aspectos da fisiologia das sementes (Bailly, 2008).

Neste sentido, alguns estudos tem comprovado a função importante das ERO durante a germinação, especialmente o H₂O₂, descrito como um

sinalizador para germinação, que atua a jusante ou a montante de outras biomoléculas (ABA e GA), exercendo também forte controle na oxidação seletiva de proteínas e mRNA, reguladores chave para uma adequada germinação (Wojtyla et al., 2016a).

Além disso, o H_2O_2 gerado durante a germinação pela atividade respiratória mitocondrial (β -oxidação) e por ação de enzimas como NADPH oxidases, peroxidases extracelulares e oxalatos oxidases, auxilia na mobilização de reservas para o rápido crescimento do eixo embrionário (Verma et al., 2015; Wojtyla et al., 2016). Esses eventos mediados pelo H_2O_2 certamente contribuem para aumento do vigor das sementes, característica agrônômica desejável que determina maior uniformidade e rápida emergência sob condições adversas no campo (Ashraf e Foolad, 2005).

Deste modo, considerando que a germinação e o crescimento de plântulas são fases importantes para o estabelecimento de plantas e, ainda, que o déficit hídrico tem afetado a soja cada vez mais de forma negativa (Mohammadi et al., 2012; Jumrani e Bhatia, 2018), melhorar esses processos (germinação e emergência) sob condições de estresse trará benefícios à produção agrícola (Bakhshandeh e Gholamhossieni, 2018).

O pré-tratamento de sementes tem sido usado extensivamente com objetivo de melhorar a germinação e proteger as plântulas subsequentemente do estresse biótico e abiótico. Os principais métodos de pré-tratamento são por imersão em substâncias aquosas, diferentes potenciais osmóticos, baixa e alta temperatura, envolvimento em matriz sólida e inoculação de agentes biológicos (Ashraf e Foolad, 2005). Dentre estas, a exposição prévia das sementes por embebição controlada (imersão) em soluções específicas, possibilita a ocorrência de reações metabólicas pré-germinativas (Sneideris et al., 2015) capazes de aumentar tolerância em plantas aos estresses.

Além disso, conduzir a embebição até a fase dois da germinação (antes da protrusão da radícula) é fundamental para alcançar melhores resultados, haja vista as mudanças fisiológicas e bioquímicas que nela ocorre (Kubala et al., 2015), podendo ser realizada a secagem posterior a embebição sem que haja prejuízos à germinação das sementes (Chen e Arora, 2013).

De maneira interessante, a embebição de sementes com H_2O_2 tem revelado possíveis e importantes eventos mediados pelo H_2O_2 que podem melhorar as respostas das plantas aos estresses (Figura 1).



Figura 1. A embebição parcial da semente durante o pré-tratamento com H_2O_2 controla processos celulares que promovem melhorias desde a germinação, resultando em plantas mais tolerantes aos estresses. Adaptado de Wojtyla et al. (2016a).

Dessa maneira, o uso do H_2O_2 exógeno, objetivando aumento de tolerância em plantas, não se restringe apenas as aplicações foliares (Barba-Espin et al., 2010; Hossain et al., 2015), uma vez que tem sido amplamente utilizado no pré-tratamento de sementes.

Estudos recentes demonstraram que o pré-tratamento de sementes feito com H_2O_2 , sem realização de secagem, resultou em aumento da velocidade e porcentagem de germinação de sementes de arroz pela embebição em 10 mM H_2O_2 (Chen et al., 2016), incremento na atividade da α -amilase em sementes de coentro e cenoura após a embebição em 25 e 50 mM de H_2O_2 , resultando em maiores taxas de germinação e crescimento inicial de plântulas (Pannong et al., 2018).

O pré-tratamento com 10 mM de H_2O_2 (Gondim et al., 2011) em plantas de milho também tornou as plantas mais aclimatadas, diminuindo os efeitos deletérios do estresse salino. De maneira semelhante, Andrade et al. (2018) observaram que os efeitos do pré-tratamento por embebição das sementes de soja em 70 mM de H_2O_2 proporcionou aumento da atividade enzimática, induzindo tolerância às plantas em condição de encharcamento.

Em tais estudos, reforça-se que houve variabilidade na concentração responsiva de H_2O_2 em função da espécie, isso indica a existência de uma faixa crítica onde ocorre maior probabilidade de respostas nas plantas, a depender da espécie e método de tratamento adotado (Wojtyla et al., 2016a).

Ademais, embora tem sido demonstrado que o H_2O_2 , além de melhorar os processos de germinação (Barba-Espín et al. 2012), pôde desencadear tolerância a diferentes estresses e espécies vegetais, tais como salinidade em

alfafa (Amooaghaie e Tabatabaie, 2017), encharcamento em soja (Andrade et al. 2018) e toxicidade por cádmio em canola (Hasanuzzaman et al. 2018), nenhum desses autores realizou a secagem da semente até seu estado inicial de umidade. Assim, até o presente momento, pouco é conhecido se os efeitos benéficos do pré-tratamento de sementes de soja com H_2O_2 , seguido de secagem até a umidade de armazenamento, são mantidos durante e após a germinação das sementes.

Nesta perspectiva, para que esta técnica seja bem-sucedida em culturas de grande importância econômica, a secagem da semente logo após o pré-tratamento faz-se necessária, possibilitando a semeadura por máquinas (Wojtyla et al., 2016b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivar de soja, pré-tratamento e condições de crescimento

O experimento foi realizado com sementes de soja do cultivar 6410 IPRO, pré-tratadas pelo processo de embebição controlada com soluções de H₂O₂ (Sigma Aldrich 30%) ou água deionizada (controle relativo).

Por meio de testes preliminares (Figura 1 do Apêndice), foram realizados ajustes metodológicos necessários para determinação do tempo ideal de embebição (determinação da fase II da germinação) e a concentração de H₂O₂, a qual foi baseada em uma amplitude de concentrações que proporcionaram resultados positivos em trabalhos de pré-tratamento de sementes, por meio de levantamento bibliográfico. Ambos os ensaios foram consolidados com base no teste padrão de germinação (Brasil, 2009). Como consequência, foi determinado o tempo máximo de embebição (9 horas) por não ter afetado negativamente a taxa de germinação das sementes, bem como as concentrações de H₂O₂, pois nenhuma diferença entre as concentrações foi observada no teste padrão de germinação (Figuras 1a, b, c e d do Apêndice).

3.2. Avaliações de germinação e desempenho de plântulas sob estresse

Inicialmente, as sementes foram pré-tratadas por embebição, nas seguintes concentrações de H₂O₂: 10, 50, 100 e 200 mM, ou água deionizada (tratamento controle). A embebição foi realizada em caixas gerbox escuras com dimensões de 11x11cm, contendo 20 sementes por caixa, sobre duas folhas de papel germiteste, adicionando 2,5 vezes a massa deste com solução de H₂O₂ ou água, à temperatura de 25°C por um período de 9 horas. Em seguida, as sementes foram retiradas e lavadas em água deionizada. Após isto, foi realizado o procedimento de secagem; acondicionando as sementes sobre papel toalha em bandejas de plástico e conduzidas para estufa de circulação forçada a 25°C, até que retornassem à umidade padrão de armazenamento, (aproximadamente 12%).

Para as análises de germinação e crescimento de plântulas, foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, 50 por repetição, distribuídas em rolos de papel germiteste umedecidos com 2,5 vezes a massa do papel não hidratado com soluções a -0,2 MPa de polietileno glicol (PEG 6000) ou cloreto de sódio (NaCl), e acondicionadas em câmara de germinação com fotoperíodo de 16h a 25 ± 2 °C (BRASIL, 2009). As soluções estressoras foram preparadas de acordo com a equação de Van't Hoff, descrita por Braga et al. (1999). A porcentagem de germinação final foi avaliada no oitavo dia, sendo os resultados expressos em porcentagem de sementes germinadas.

Para avaliação do crescimento e acúmulo de massa seca de plântulas, 100 sementes de cada tratamento, 20 por repetição, foram colocadas para germinar em duas fileiras de 10 sementes cada, e transferidas para crescer nas mesmas condições descritas para o teste de germinação. As avaliações foram feitas 8 dias após a semeadura.

O comprimento da raiz primária e hipocótilo das plântulas foi medido com paquímetro digital, e os valores foram expressos em cm por plântula. Para obtenção da massa seca, raízes e hipocótilos, o material vegetal foi separado e acondicionados em sacos de papel e levados para secagem em estufa de ventilação forçada a temperatura de 60 °C por 72 horas. A massa seca foi determinada com auxílio de uma balança analítica (Denver Instrument Company AA-200) com precisão de 0,0001 g, e expressa em mg por plântula.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado pelo somatório de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo total de dias entre semeadura e germinação, seguindo fórmula proposta por Maguire (1962). Para calcular o potencial de germinação (PG) e, índice de vigor de plântulas (IVP), seguiu metodologia descrita por Ruttanaruangboworn et al. (2017), em que: $PG = \sum (Gd / Td)$, GD é o número de sementes germinadas no dia d, e Td é o número de dias após o início do teste, e $IVP = PG \times \text{peso seco de plântulas}$.

3.3. Pré-tratamento de sementes para a análise do desenvolvimento de plantas sob estresse hídrico

O experimento realizado sob condição de estresse por PEG e NaCl na germinação e crescimento de plântulas possibilitou a escolha da concentração

de 10 mM de H₂O₂ a ser utilizada para avaliar os efeitos em plantas sob estresse por restrição hídrica. Para tal, sementes da mesma cultivar de soja foram pré-tratadas de acordo como item 3.2. Dessa forma, após serem pré-tratadas e secas, foram semeadas 3 sementes de cada tratamento por vaso, com capacidade para 3,8 L, preenchido com 3,6 kg do substrato resultante da mistura de Latossolo vermelho Amarelo Eutrófico, mais areia na proporção de 3:1. A análise química desse substrato apresentou as seguintes características: pH (CaCl₂) 4.7; M.O. = 20 g dm⁻³; P = 43 mg dm⁻³; S = 26 mg dm⁻³; Ca = 20 mmolc dm⁻³; Mg = 13 mmolc dm⁻³; K = 2.3 mmolc dm⁻³; H + Al = 32 SMP; S.B. = 35.0 mmolc dm⁻³; CTC = 66.0; V = 52%. Em seguida, realizou-se adubação de base aplicando o equivalente a 7 g por vaso do adubo formulado N-P-K 4-20-20. Após a germinação, foi efetuado desbaste de plântulas, deixando duas por vaso para que pudessem ser cultivadas em casa de vegetação.

As plantas oriundas de sementes pré-tratadas por embebição em 10 mM de H₂O₂ ou água se desenvolveram sem restrição hídrica até 36 dias após a semeadura, estando no estágio de desenvolvimento V4 (quarto nó, terceiro trifólio expandido e a quarta folha trifoliolada aberta) (Fehr et al.,1971), quando foi suspensa a irrigação de um grupo de plantas por até 8 dias. No outro, com os mesmos tratamentos, a irrigação foi mantida. Foram realizadas quatro coletas para avaliações: uma no primeiro dia de imposição do estresse, outras duas com 4 e 8 dias. Após a coleta de 8 dias, as plantas que estavam sob estresse foram reidratadas por 4 dias, e então uma quarta e última coleta foi realizada (Figura 3). Em cada momento, realizaram-se avaliações não destrutivas (biométricas) e coleta de material vegetal para as análises bioquímicas.

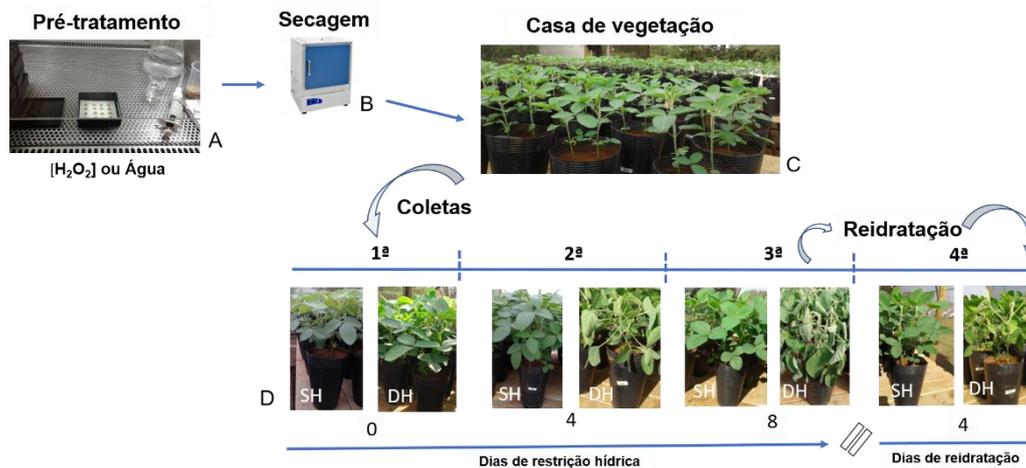


Figura 3. Esquema simplificado da condição experimental. Pré-tratamento com concentrações de H_2O_2 ou água por 9 horas (A), secagem das sementes até umidade de armazenamento (B), estresse hídrico por interrupção da irrigação (C), e avaliações sequenciais (D) em plantas irrigadas (SH) e sob restrição hídrica (DH).

3.4. Umidade no solo, conteúdo relativo de água na folha e potencial hídrico foliar

A umidade foi determinada através da coleta do solo com um furador (diâmetro de 0,5 cm de diâmetro) até uma profundidade de 10 cm, sendo retiradas duas amostras de solo por vaso. Após a coleta, o solo foi pesado para obtenção da massa úmida e transferido para estufa de circulação de ar forçada por 24 h a 105 °C, obtendo assim a massa seca. A partir da massa seca, estimou-se a porcentagem de umidade do solo, por meio da expressão matemática: $U\% = [(Massa\ úmida\ do\ solo) - (massa\ seca\ do\ solo)] / (massa\ úmida\ do\ solo) \times 100$.

Para avaliar o teor relativo de água na folha, foram coletados 15 discos foliares (5 mm diâmetro) de uma mesma folha, do penúltimo trifólio completamente desenvolvido. Os discos foram pesados para obtenção da massa fresca (MF), e em seguida foram acondicionados em placas de petri com água deionizada por 6h, e novamente pesados, obtendo assim a massa túrgida (MT). Em seguida, foram transferidos para as mesmas placas e secos a 60 °C por 48 h. O teor relativo de água na folha foi obtido pela expressão matemática: $TRA\ (\%) = (MF-MS) / (MT-MS) \times 100$.

Medições do potencial hídrico foliar foram realizadas entre 4h e 6h da manhã, com auxílio de bomba de pressão do tipo Scholander (Scholander et

al.1965). A folha escolhida em cada coleta foi o último trifólio completamente expandido de cada planta.

3.5. Análises biométricas de crescimento

A partir do dia zero (início da imposição do déficit hídrico), as análises de crescimento foram realizadas a cada quatro dias. A altura foi mensurada com auxílio de uma régua graduada (mm) da região do colo da planta ao ápice da haste principal, e o diâmetro do caule medido na região do colo com auxílio de um paquímetro digital graduado (mm).

A área foliar total foi obtida com a digitalização das folhas e, subsequente análise das imagens por meio do sistema de análise de imagem Delta - T Devices LTD. Para determinação do comprimento das raízes, foi utilizado o sistema de análise de imagem Delta - T Devices LTD. Para tanto, o sistema radicular permaneceu em solução de azul de metileno por, aproximadamente, dois minutos, e as leituras de imagem foram feitas utilizando digitalizador Hewlett Packard modelo 5C. A imagem de cada sistema radicular foi analisada pelo software Delta-T Scan.

A massa de matéria seca das raízes e da parte aérea foi obtida após secagem do material vegetal em estufa de ventilação forçada (60 °C), até atingir massa constante.

3.6. Quantificação de prolina

O teor de prolina foi determinado segundo metodologia proposta por Bates et al. (1973). Inicialmente, 0,5 g de material vegetal (penúltimo trifólio) foram macerados em 10 mL de ácido sulfosalicílico a 3% (p / v). Posteriormente foi feita uma mistura reacional de 3 mL, sendo 1 mL do extrato após maceração, 1 mL de ácido ninidrina e 1 mL de ácido acético glacial a 99,5% (v / v). A mistura foi agitada e, em seguida levada para um equipamento com água a 100°C durante 60 minutos. Transcorrido este tempo, as amostras foram transferidas para o gelo afim de cessar a reação, e então, após 10 minutos, foram retiradas e adicionados 2 mL de tolueno para separação de fases. O sobrenadante foi coletado e sua absorbância lida a 520 nm, em

espectrofotômetro (Beckman Colter DU 640 - USA). As leituras foram plotadas em uma planilha com curva padrão de prolina, e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol prolina g}^{-1}$ de massa fresca.

3.7. Teores de clorofilas e carotenoides

A partir do penúltimo trifólio foram retirados 0,025 g de amostras, que foram colocadas em tubos eppendorf acrescidos com 1,5 mL de acetona a 80%. Os tubos foram envolvidos com papel alumínio e acondicionados em caixa envoltas com papel alumínio por 48 horas à temperatura de 8 °C. O processo de extração foi realizado em triplicatas. Após este período, alíquotas de 0,5 mL foram tomadas, e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de: Clorofila *a* em 663 nm (A662); Clorofila *b* em 647 nm (A645) e Carotenoides (caroteno [c]+ xantofilas [x]) em 470 nm (A470). Para o cálculo da concentração de clorofilas (Chl) e carotenoides (Car) foram utilizadas fórmulas descritas por Lichtenthaler (1987): $\text{Chl } a+b = 7,05 A_{661,6} + 18,09 A_{644,8}$. O conteúdo de clorofilas total (Chl *a+b*) e carotenoides foi expresso em μg do pigmento por grama de massa fresca ($\mu\text{g/g}$).

3.8. Caracterização do estresse oxidativo

A peroxidação lipídica (MDA) foi realizada por meio do teste do TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) com os produtos finais do processo da peroxidação de lipídios e, as leituras feitas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm, obtendo valores de MDA, os quais foram calculados conforme a equação descrita por Heath e Packer (1968). A quantidade de MDA foi expressa em nmol g^{-1} de massa de matéria fresca.

3.9. Peróxido de hidrogênio

O conteúdo de H_2O_2 foi determinado através da reação com iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva et al. (2001). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390 nm. A quantidade de H_2O_2 foi expressa em $\mu\text{mol/g}$ de massa fresca.

3.10. Delineamento experimental

Para o teste preliminar de tempo de embebição e concentrações de H_2O_2 na germinação foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo cinco tratamentos (0, 10, 50, 100 e 200 mM de H_2O_2), com quatro repetições cada. Para os experimentos de germinação e crescimento de plântulas, utilizou-se DIC, com cinco tratamentos, cada um com quatro repetições, testados separadamente, em dois estresses (PEG e NaCl). Para o crescimento de planta, foi utilizado delineamento de blocos casualizado (DBC), em arranjo fatorial do tipo 2 x 2, com duas concentrações de H_2O_2 (0 ou 10 mM) e duas condições de disponibilidade hídrica (bem irrigado e déficit hídrico), com cinco repetições cada tratamento.

3.11. Forma de análise dos resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste F, e quando significativos, a comparação de médias foi feita pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico AgroEstat (www.agroestat.com). Os gráficos foram construídos por meio do software Sigma Plot versão 10.0.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do H₂O₂ na germinação e no crescimento das plântulas

A germinação das sementes de soja sob estresse osmótico induzido por PEG e NaCl foi controlada pelo pré-tratamento de semente com H₂O₂ ou água (Figura 4a, b). Em PEG, não houve diferença estatística entre os tratamentos, entretanto a germinação de sementes previamente tratadas com as menores concentrações de H₂O₂ (10 e 50 mM) apresentaram taxas de germinação acima de 91%, enquanto os demais tratamentos (controle, 100 e 200 mM de H₂O₂) mantiveram suas taxas de germinação abaixo de 80%. Sob estresse induzido por NaCl, a porcentagem de germinação das sementes pré-tratadas com 10 e 50 mM foi maior quando comparadas ao controle, 100 e 200 mM de H₂O₂.

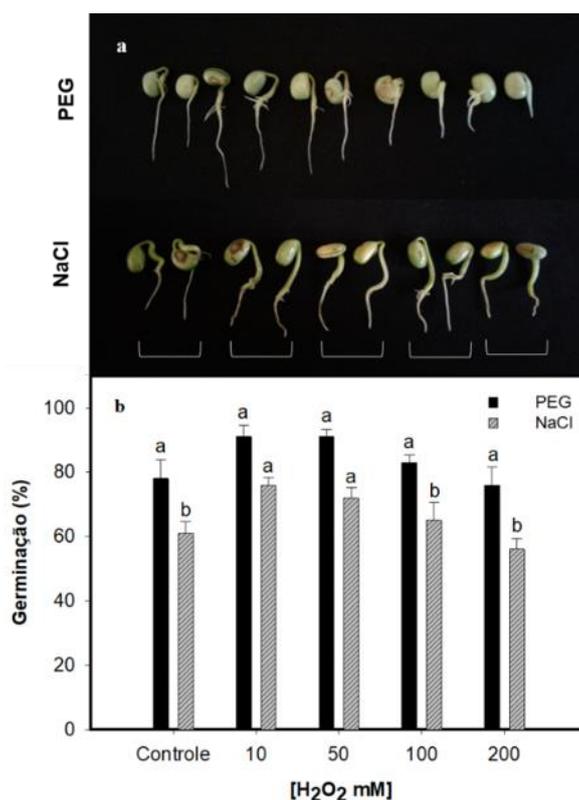


Figura 4. Efeito do pré-tratamento com H₂O₂ na germinação (a, b) da soja sob estresse hídrico promovido por PEG (- 0,2 MPa), e NaCl (- 0,2 MPa). Barras representam a média \pm erro padrão. Letras diferentes na mesma condição de estresse indicam que houve diferenças significativas, pelo teste SNK, a 5% ($p \leq 0,05$).

Na condição de estresse induzido por PEG, a velocidade e o potencial de germinação das sementes pré-tratadas com 10 mM de H₂O₂ foram maiores que nos demais tratamentos (Tabela 1). Além disso, o vigor das plântulas pré-tratadas com 10 mM de H₂O₂ foi maior comparado às demais condições de estudo (controle, 50, 100 e 200 mM de H₂O₂).

Em relação ao estresse induzido por NaCl, não houve diferença significativa entre os tratamentos para IVG e PG (Tabela 1). Por outro lado, observou-se que, quanto ao índice de vigor de plântulas a concentração 10 mM de H₂O₂ promoveu maior vigor comparado aos demais tratamentos (controle, 50, 100 e 200 mM de H₂O₂).

Tabela 1. Efeito do pré-tratamento de sementes nas características da germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), potencial de germinação (PG) e vigor de plântulas (IVP) de soja sob estresse osmótico (-0,2MPa). Valores na coluna representam a média \pm erro padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma condição de estresse indicam que houve diferença significativa, pelo teste de SNK, a 5% ($p \leq 0,05$).

Tratamento	IVG	PG	IVP
	------(PEG)-----		
Controle	2,96 \pm 0,07 c	7,41 \pm 0,56 b	0,006 \pm 0,004 c
10	4,63 \pm 0,13 a	13,97 \pm 0,95 a	0,15 \pm 0,009 a
50	3,78 \pm 0,19 b	10,86 \pm 0,68 b	0,11 \pm 0,01 b
100	3,07 \pm 0,28 c	9,01 \pm 1,36 b	0,08 \pm 0,009 c
200	3,17 \pm 0,29 c	9,06 \pm 1,13 b	0,08 \pm 0,01 c
	------(NaCl)-----		
Controle	3,98 \pm 0,20 a	11,35 \pm 1,49 a	0,10 \pm 0,01 c
10	4,39 \pm 0,21 a	11,87 \pm 1,16 a	0,16 \pm 0,01 a
50	4,46 \pm 0,24 a	13,50 \pm 0,97 a	0,12 \pm 0,003 b
100	4,37 \pm 0,54 a	13,89 \pm 1,60 a	0,12 \pm 0,01 b
200	4,02 \pm 0,07 a	12,79 \pm 0,27 a	0,08 \pm 0,001c

Quanto ao crescimento e ao acúmulo de massa seca, as menores concentrações de H₂O₂ (10 e 50 mM) induziram respostas de tolerância aos estresses nas plântulas (Figura 5). Em PEG, as raízes das plântulas nos tratamentos 10 e 50 mM de H₂O₂ foram maiores comparadas às demais soluções e ao controle (Figura 5a). Além disso, nas concentrações 10 e 50 mM

H₂O₂, houve incremento de massa seca de raízes em 75 e 60%, respectivamente, comparado ao controle (Figura 5b). Todavia, com o aumento das concentrações do H₂O₂ (100 e 200 mM), houve redução no crescimento e, conseqüentemente, diminuição do acúmulo de massa seca de raízes e de hipocótilos.

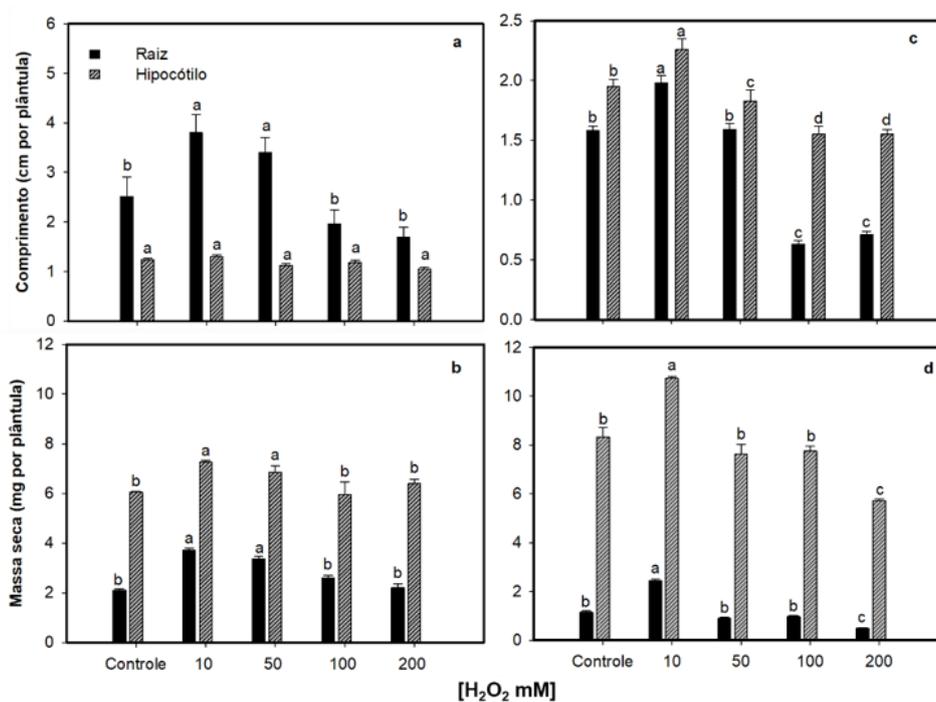


Figura 5. Comprimento de raízes, hipocótilos (a) e massa seca (b) de plântulas de soja submetidas a estresse hídrico por PEG (- 0,2MPa) e (c, d) por NaCl (- 0,2 MPa). Barras representam a média \pm erro padrão. Letras diferentes na mesma condição de estresse indicam que houve diferença significativa, pelo teste de SNK, a 5% ($p \leq 0,05$).

Em estresse promovido por NaCl, o comprimento das raízes de plântulas oriundas de sementes pré-tratadas com 10 mM de H₂O₂ foi maior comparado às demais condições (controle, 50, 100 e 200 mM) (Figura 5c). O acúmulo de massa seca das raízes e do hipocótilo foi maior nas plântulas pré-tratadas com 10 mM de H₂O₂ em relação aos demais tratamentos (Figura 5d). O pré-tratamento de sementes com concentrações acima de 50 mM de H₂O₂ foi prejudicial ao crescimento e ao acúmulo de massa seca das plântulas.

O teor de prolina foi menor em plântulas pré-tratadas com H₂O₂ comparado ao controle, em ambos os estresses (Tabela 2). De maneira semelhante, sob estresse por PEG, o conteúdo de H₂O₂ foi menor em plântulas

pré-tratadas em relação ao controle, enquanto em NaCl, não foi verificado diferença entre os tratamentos para o acúmulo de H₂O₂ nas plântulas.

O teor de MDA foi menor no tratamento de 10 mM de H₂O₂ comparado aos demais tratamentos (controle, 50, 100 e 200 mM de H₂O₂) na condição de estresse por PEG (Tabela 2). Em plântulas sob estresse induzido por NaCl, o teor de MDA foi menor nos tratamentos de 10 e 50 mM de H₂O₂ em comparação ao controle, 100 e 200 mM de H₂O₂.

Tabela 2. Efeito do pré-tratamento de sementes nas características bioquímicas de plântulas de soja sob estresse osmótico (-0,2MPa). Valores na coluna representam a média \pm erro padrão. Média seguida de letra diferente na mesma condição de estresse indica que houve diferença, pelo teste de SNK, a 5% de probabilidade.

Tratamento	Prolina (ug/mg)	H ₂ O ₂ (nmol g ⁻¹ MF)	MDA (nmol g ⁻¹ MF)
	------(PEG)-----		
Controle	18,27 \pm 0,39 a	4,92 \pm 0,43 a	52,96 \pm 3,16 a
10	14,54 \pm 0,15 b	2,94 \pm 0,10 b	39,57 \pm 0,66 b
50	13,86 \pm 0,35 b	3,50 \pm 0,42 b	59,81 \pm 1,35 a
100	13,63 \pm 0,69 b	3,50 \pm 0,25 b	52,49 \pm 0,96 a
200	12,94 \pm 0,18 b	315 \pm 0,25 b	57,74 \pm 6,25 a
	------(NaCl)-----		
Controle	11,99 \pm 0,15 a	4,40 \pm 0,39 a	37,69 \pm 2,59 a
10	6,80 \pm 0,25 b	3,30 \pm 0,37 a	31,78 \pm 0,56 b
50	7,46 \pm 0,53 b	5,99 \pm 1,30 a	31,51 \pm 1,52 b
100	7,06 \pm 0,08 b	4,62 \pm 0,55 a	34,42 \pm 0,87 a
200	6,87 \pm 0,05 b	4,69 \pm 0,40 a	37,24 \pm 0,89 a

4.2. Efeito do pré-tratamento de sementes na soja sob restrição hídrica

As condições hídricas no solo e nas plantas são demonstradas na Figura 6. A umidade do solo cultivado com plantas bem irrigadas (SH) foi, em média, 19% ao longo do tempo de avaliação (Figura 6a). Por outro lado, nas plantas condicionadas ao déficit hídrico (DH), a umidade do solo decresceu significativamente após a interrupção da irrigação, para 7,5%, aos 4 dias, chegando a 6% aos 8 dias. Após a irrigação ser reestabelecida por quatro dias,

a umidade do solo que continham plantas sob estresse foi maior comparado ao solo de plantas que foram mantidas sob irrigação constante.

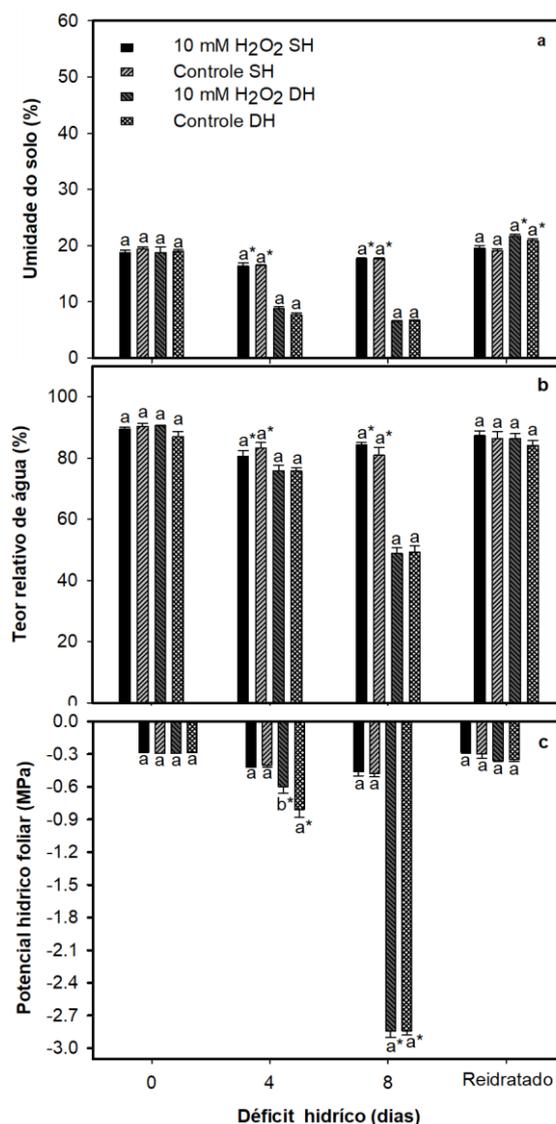


Figura 6. Umidade do solo (a), teor relativo de água na planta (b) e potencial hídrico foliar (c) sob suficiência hídrica (SH) e déficit hídrico (DH). As avaliações foram realizadas no dia zero (0), antes de a irrigação ser interrompida, e aos 4 e 8 dias após a interrupção. Reidratado representa a avaliação feita 4 dias após a reidratação das plantas que estavam sob estresse. Barras representam a média mais erro padrão \pm . Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de SNK, a 5% ($p \leq 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre o mesmo tratamento na condição ideal (SH) e estressante (DH).

Pela análise do teor relativo de água foliar (TRA), foi verificado que não houve diferença entre os tratamentos (Figura 6b). Por outro lado, ao longo das avaliações, observou-se o efeito da condição hídrica: o TRA nas plantas

mantidas bem irrigadas foi, em média, 85%, enquanto nas plantas sob restrição hídrica, observou-se diminuição de 7,5 e 48% aos quatro e oito dias após a interrupção da irrigação, respectivamente. Após 4 dias de reidratação, o TRA das plantas submetidas ao déficit hídrico foi reestabelecido, e não se verificou diferença entre os tratamentos e condição hídrica.

No que se refere ao potencial hídrico foliar (PH), foi observado que não houve diferença entre os tratamentos na condição irrigada (Figura 6c). Entretanto, comparando-se os tratamentos aos quatro dias sob restrição hídrica, verificou-se que o PH das plantas pré-tratadas com H₂O₂ foi maior comparado com plantas-controle. Após o período de reidratação, não houve diferença do PH, independentemente do tratamento.

As plantas apresentaram altura semelhante na mesma condição hídrica, independentemente do tratamento (Figura 7a). Por outro lado, a altura das plantas submetidas à restrição hídrica (H₂O₂ DH, controle DH) foi diminuída quando comparada com plantas irrigadas (H₂O₂ SH, controle SH). Além disso, após reidratadas, a altura das plantas sob estresse não foi recuperada em relação aos respectivos-controle.

O diâmetro do caule das plantas bem irrigadas e sob estresse foi semelhante até o quarto dia, em todos tratamentos (Figura 7b). Entretanto, após o oitavo dia, verificou-se o efeito da condição hídrica, e o diâmetro do caule das plantas irrigadas foi maior que o observado em plantas sob restrição hídrica.

A partir do quarto dia de imposição do déficit hídrico, o comprimento de raiz das plantas irrigadas foi superior ao verificado na condição de restrição hídrica (Figura 7c). Entretanto, ao comparar os tratamentos em ambas as condições (SH e DH), após o oitavo dia, o comprimento das raízes das plantas pré-tratadas com H₂O₂ foi superior ao tratamento controle. Após a reidratação, houve retomada do crescimento das raízes, porém as diferenças supracitadas foram mantidas.

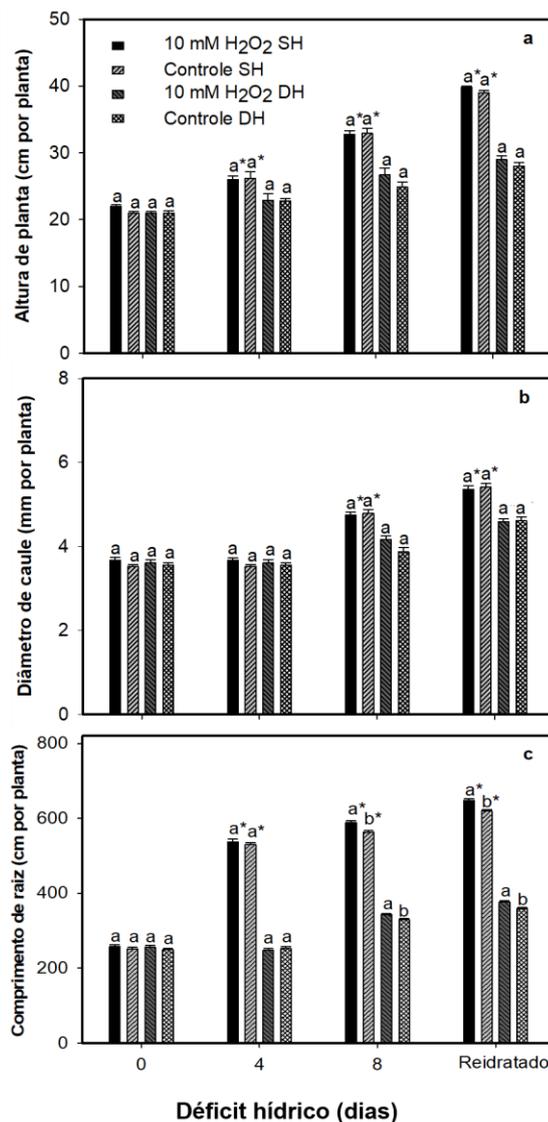


Figura 7. Altura (a), diâmetro de caule (b), comprimento de raiz (c) de plantas de soja sob suficiência hídrica (SH) e déficit hídrico (DH). As avaliações foram realizadas no dia zero (0), antes de a irrigação ser interrompida, e aos 4 e 8 dias após a interrupção. Reidratado representa a avaliação feita 4 dias após a reidratação das plantas que estavam sob estresse. Barras representam a média mais erro padrão \pm . Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de SNK, a 5% ($p \leq 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre o mesmo tratamento na condição ideal (SH) e estressante (DH).

O número de ramificações final não diferiu entre os tratamentos na mesma condição hídrica (Figura 8a). No entanto, plantas bem irrigadas apresentaram maior número de ramos comparadas com plantas sob estresse. De maneira semelhante, a área foliar média também foi maior na condição irrigada, a partir do quarto dia de imposição do estresse (Figura 8b). Após a

reidratação, observou-se a retomada do aumento da área foliar, porém não o suficiente para superar a diferença entre plantas na condição hídrica adequada e sob restrição hídrica, independentemente do tratamento.

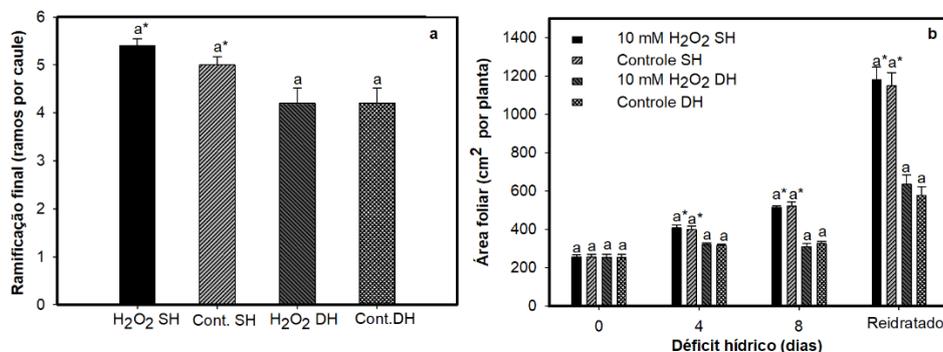


Figura 8. Ramificação (a) e área foliar (b) de plantas de soja sob suficiência hídrica (SH) e déficit hídrico (DH). As avaliações foram realizadas no dia zero (0), antes de a irrigação ser interrompida, e aos 4 e 8 dias após a interrupção. Reidratado representa a avaliação feita 4 dias após a reidratação das plantas que estavam sob estresse. Barras representam a média mais erro padrão \pm . Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de SNK, a 5% ($p \leq 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre o mesmo tratamento na condição de ideal (SH) e estressante (DH).

As variações observadas no crescimento das plantas, ao longo dos dias, sob as diferentes condições hídricas, também refletiram no ganho e acúmulo de biomassa vegetal; conseqüentemente, verificou-se redução no acúmulo de massa seca de plantas sob estresse comparado com plantas não estressadas, independentemente do tratamento (Figura 9).

Em relação às folhas, foi observado redução na massa seca de 17% e 32%, no quarto e oitavo dia, respectivamente, quando comparadas plantas sob estresse com plantas irrigadas (Figura 9a). A partir do quarto dia, a massa seca do caule foi menor em plantas sob estresse, em relação às bem irrigadas (Figura 9b). Nas raízes, a redução média na massa seca foi de 33%, no quarto dia, e 15% no oitavo dia de imposição do estresse, comparada às plantas irrigadas (Figura 9c). De maneira geral, mesmo após a reidratação das plantas sob estresse, as diferenças foram mantidas.

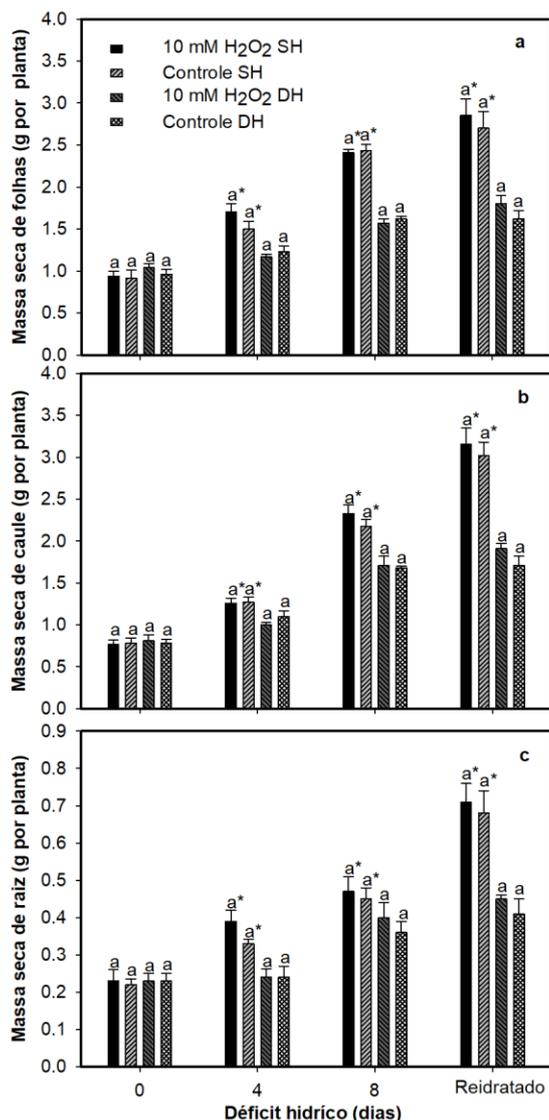


Figura 9. Massa seca de raízes (a), caules (b) e folhas (c) de plantas de soja sob suficiência hídrica (SH) e déficit hídrico (DH). As avaliações foram realizadas no dia zero (0), antes de a irrigação ser interrompida, e aos 4 e 8 dias após a interrupção. Reidratado representa a avaliação feita 4 dias após a reidratação das plantas que estavam sob estresse. Barras representam a média mais erro padrão \pm . Letras minúsculas iguais sobre as barras indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de SNK, a 5% ($p \leq 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre o mesmo tratamento na condição de ideal (SH) e estressante (DH)

4.3. Efeito do pré-tratamento no teor de prolina

O teor de prolina em folhas e raízes não apresentou alteração significativa antes da imposição do estresse (Figura 10). Contudo, as análises realizadas após quatro e oito dias de restrição hídrica mostraram aumento

significativo desse osmólito nas raízes e folhas, em plantas sob estresse, comparadas com plantas irrigadas.

A partir do oitavo dia, houve diferença entre os tratamentos na condição de restrição hídrica, e o teor de prolina foi menor nas raízes de plantas pré-tratadas com H_2O_2 em relação às plantas-controle (Figura 10b). No entanto, em relação às folhas não se verificou diferença no conteúdo de prolina até o oitavo dia, na mesma condição hídrica.

Após a reidratação, houve decréscimo do teor de prolina em ambos os tratamentos que estavam sob estresse (Figura 10a, b). De maneira interessante, a concentração de prolina nas raízes e nas folhas de plantas pré-tratadas com H_2O_2 foi menor que no controle.

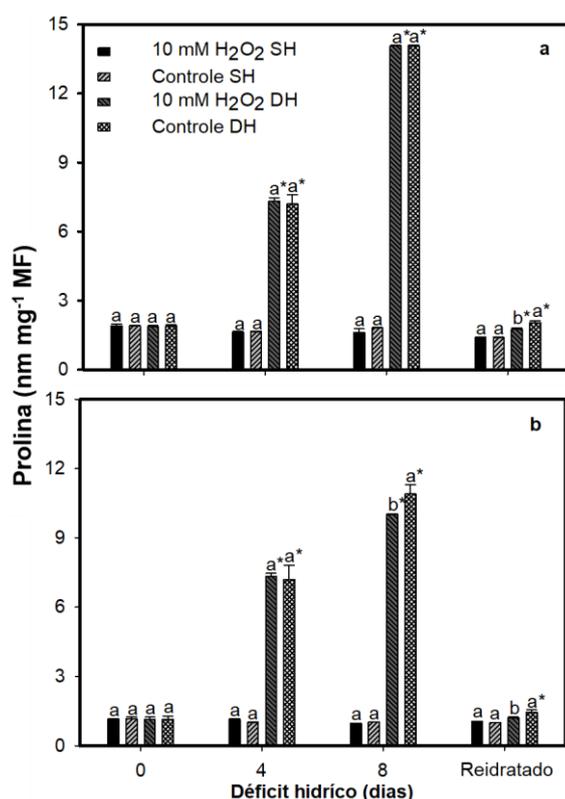


Figura 10. Teor de prolina nas folhas (a) e raízes (b) de plantas sob suficiência hídrica (SH) e déficit hídrico (DH). As avaliações foram realizadas no dia zero (0), antes de a irrigação ser interrompida, e aos 4 e 8 dias após a interrupção. Reidratado representa a avaliação feita 4 dias após a reidratação das plantas que estavam sob estresse. Barras representam a média mais erro padrão \pm . Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de SNK, a 5% ($p \leq 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre o mesmo tratamento na condição ideal (SH) e estressante (DH).

4.4. Efeito do pré-tratamento no conteúdo de pigmentos

O conteúdo de clorofila total e de carotenoides apresentou resposta semelhante entre os tratamentos, antes da imposição do estresse (Figura 11). A partir do quarto dia, o conteúdo desses pigmentos em plantas irrigadas foi maior comparado às plantas sob restrição hídrica (Figura 11a, b). Após a reidratação, o conteúdo de clorofila total e de carotenoides permaneceu inferior em plantas que estavam sob déficit hídrico, comparadas às plantas irrigadas, independentemente do tratamento.

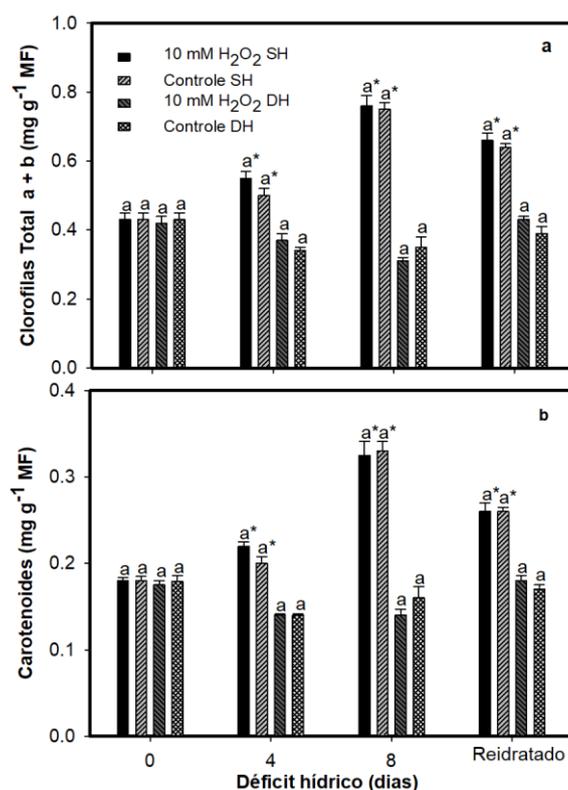


Figura 11. Teores de pigmentos, clorofilas totais (a) e carotenoides (b) em plantas sob suficiência hídrica (SH) e déficit hídrico (DH). As avaliações foram realizadas no dia zero (0), antes de a irrigação ser interrompida, e aos 4 e 8 dias após a interrupção. Reidratado representa a avaliação feita 4 dias após a reidratação das plantas que estavam sob estresse. Barras representam a média mais erro padrão \pm . Letras minúsculas iguais sobre as barras indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de SNK, a 5% ($p \leq 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre o mesmo tratamento na condição de ideal (SH) e estressante (DH).

4.5. Efeito do pré-tratamento nos teores H_2O_2 e MDA

No que diz respeito aos indicadores de estresse, o conteúdo de H_2O_2 e MDA foi alterado em função do pré-tratamento e da condição hídrica (Figura 12). As avaliações feitas no quarto e oitavo dia, demonstraram que o conteúdo de H_2O_2 em folhas foi maior em plantas-controle comparado às pré-tratadas com H_2O_2 , em ambas as condições hídricas (12a). Após a reidratação, não houve diferença entre os tratamentos em relação ao teor de H_2O_2 . Porém, em condição hídrica adequada, o conteúdo de H_2O_2 foi menor nas plantas pré-tratadas (H_2O_2 SH), comparado ao respectivo controle (Controle SH). O aumento do subproduto da peroxidação lipídica (MDA) nas folhas foi alterado somente após o período de restrição hídrica máximo de oito dias, independentemente do tratamento (Figura 12c). Nessas condições, o conteúdo de MDA aumentou 220% nas folhas de plantas sob estresse, comparado às plantas bem irrigadas.

Nas raízes, não houve diferença entre os tratamentos antes da imposição do estresse (Figura 12b). Todavia, a avaliação realizada no quarto dia demonstrou que o conteúdo de H_2O_2 nas raízes de plantas-controle foi maior comparado ao de plantas pré-tratadas com H_2O_2 , em ambas as condições hídricas. Além disso, o acúmulo de H_2O_2 foi maior em plantas sob restrição hídrica, comparado às plantas irrigadas, independentemente do tratamento. No oitavo dia, o conteúdo de H_2O_2 foi maior nas raízes de plantas sob estresse, comparado às irrigadas. Por outro lado, com a reidratação, o conteúdo de H_2O_2 nas raízes foi semelhante entre os tratamentos, na mesma condição hídrica. Porém, houve maior acúmulo em plantas reidratadas (H_2O_2 DH, controle DH) em comparação às plantas mantidas irrigadas (H_2O_2 SH, controle SH).

Até o quarto dia após a imposição do estresse, não houve diferença no conteúdo de MDA entre os tratamentos. Entretanto, no oitavo dia houve aumento de MDA em 129% nas raízes de plantas sob estresse comparado às plantas irrigadas (Figura 12d). Quando reidratadas, houve redução no acúmulo de MDA nas raízes e não houve diferenças entre os tratamentos e a condição hídrica.

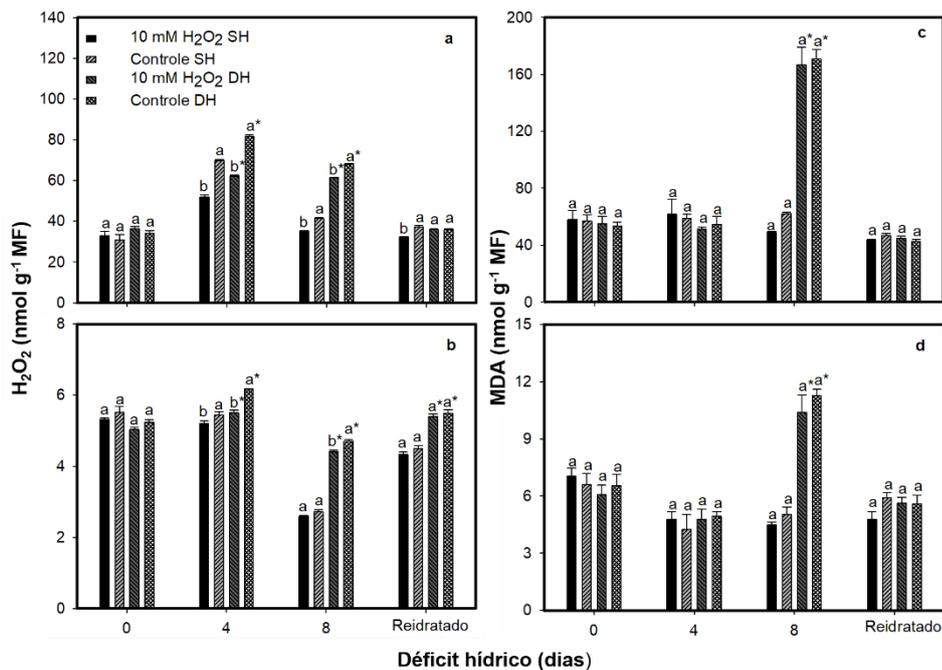


Figura 12. Conteúdo de H_2O_2 em folhas (a), raízes (b) e MDA de folhas (c) e raízes (d) em plantas de soja sob suficiência hídrica (SH) e déficit hídrico (DH). As avaliações foram realizadas no dia zero (0), antes de a irrigação ser interrompida, e aos 4 e 8 dias após a interrupção. Reidratado representa a avaliação feita 4 dias após a reidratação das plantas que estavam sob estresse. Barras representam a média mais erro padrão \pm . Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de SNK, a 5% ($p \leq 0,05$). Asteriscos indicam diferença entre o mesmo tratamento na condição de ideal (SH) e estressante (DH).

5. DISCUSSÃO

O pré-tratamento de sementes com H_2O_2 tem sido uma importante ferramenta para indução de tolerância em plantas ao estresse ambiental. Nesse contexto, estudos recentes têm demonstrado o envolvimento do H_2O_2 mediando respostas de tolerância a diversos tipos de estresse, em especial o hídrico (Awad-Allah et al. 2012; Andrade et al. 2018). Entretanto, estes estudos foram baseados no pré-tratamento seguido de semeadura, e algumas questões ainda eram desconhecidas, a exemplo: se os efeitos do H_2O_2 são mantidos mesmo após a secagem da semente. Dessa forma, buscou-se no presente estudo avaliar as respostas de plantas de soja ao déficit hídrico, obtidas de sementes pré-tratadas com H_2O_2 seguido de secagem.

Ao estudar a germinação e o crescimento das plântulas submetidas ao estresse por baixo potencial osmótico, provocado por PEG e NaCl, foi observado que sementes pré-tratadas com soluções de H_2O_2 melhoraram a germinação e o crescimento das plântulas comparadas ao controle (Figura 4). Resultados semelhantes com aplicação de H_2O_2 no aumento de germinação, foram observados em outras espécies (Liu et al., 2010; Gondin et al., 2011; Chen et al., 2016).

Além disso, verificou-se aumento no PG e IVG de sementes pré-tratadas com H_2O_2 no estresse provocado por PEG, sobretudo na concentração de 10 mM (Tabela 1). De fato, tem sido demonstrado que o H_2O_2 , em baixas concentrações, induz o aumento na velocidade de germinação de diferentes espécies (Pannom et al., 2018). Por outro lado, diferentemente do observado em PEG, o PG e IVG em NaCl não foi alterado pelo pré-tratamento de sementes com H_2O_2 . Contudo, a germinação final foi superior com 10 e 50 mM de H_2O_2 (Figura 4b). Esses resultados, que mostram melhoria na germinação final, sem alteração no desempenho inicial (IVG e PG), podem ser atribuídos ao fato de que o NaCl retarda a germinação de sementes de soja (Shu et al., 2017).

Quanto ao vigor de plântulas, as menores concentrações de H_2O_2 melhoraram as respostas das plântulas aos estresses (Tabela 1). Sob ambas as condições (PEG e NaCl), as plântulas obtidas com os tratamentos 10 e 50 mM de H_2O_2 foram mais vigorosas em relação às plântulas tratadas com água,

ou 100 e 200 mM de H_2O_2 (Figura 4a). Barba-Espin et al. (2011) verificaram que os níveis da carbonilação de proteínas específicas, que nutrem o embrião e favorecem o crescimento inicial das plântulas, aumentaram substancialmente em sementes embebidas com H_2O_2 em relação a sementes tratadas com água. Neste sentido, nas plântulas crescidas sob 10 e 50 mM de H_2O_2 , a massa seca das radículas foi incrementada em 75 e 60%, respectivamente, comparada ao controle (Figura 5b).

Entretanto, conforme o aumento das concentrações do H_2O_2 (Figura 5), verificou-se diminuição do acúmulo de massa seca nas raízes e hipocótilos além de redução no crescimento das plântulas, evidenciando o duplo papel do H_2O_2 , sinalizador em baixas concentrações, e causador de dano oxidativo em alta concentração (Dat et al., 2000; Bailly et al. 2008; Amooaghaie e Tabatabaie, 2017).

Isso indica também que o pré-tratamento de sementes com H_2O_2 apresenta uma faixa crítica de resposta, a depender da espécie de planta e do método de pré-tratamento utilizado (Wojtyla et al., 2016). Nossos resultados demonstram claramente que, para plântulas de soja, o pré-tratamento com 10 mM de H_2O_2 foi mais eficiente, ao possibilitar maior crescimento das radículas, hipocótilos e maior acúmulo de massa seca destes órgãos, comparado aos demais tratamentos em ambos os estresses (Figura 5).

Além disso, presume-se que o pré-tratamento com essa concentração foi capaz de desencadear mecanismos de defesa que amenizaram os efeitos do estresse por PEG e NaCl, pois as plântulas de sementes pré-tratadas com 10 mM de H_2O_2 apresentaram menor conteúdo do osmoprotetor prolina, juntamente com menores teores de MDA (Tabela 2), o que indica a participação de outro mecanismo de defesa, possivelmente por meio do aumento na atividade do sistema antioxidante enzimático. Nesse sentido, embora não tenhamos explorado o sistema antioxidante, foi mostrado que o aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e APX em plantas de soja condicionadas ao estresse por hipóxia foi relacionado à cascata de sinalização mediada pelo H_2O_2 utilizado no pré-tratamento da semente (Andrade et al., 2018).

Entretanto, em estágio fenológico mais adiantado do ciclo (36 DAP), foram observadas diferentes respostas em função do tratamento e do tempo de

exposição das plantas ao estresse por déficit hídrico. De maneira geral, o estresse causado pela restrição hídrica afetou negativamente as características fisiológicas e morfológicas, uma vez que houve diminuição no TRA, PH, área foliar, altura, comprimento de raiz, diâmetro de caule, número de ramos e, conseqüentemente, no acúmulo de massa seca (Figuras 6, 7, 8, 9). Nessa mesma condição, também ocorreram alterações bioquímicas importantes, como aumento de prolina, H_2O_2 e MDA (Figuras 10, 12) e redução de clorofila total e de carotenoides (Figura 11). Resultados semelhantes, sobre diminuição nos parâmetros de crescimento e alterações bioquímicas, foram observados em outros estudos com plantas de soja sob restrição hídrica (Ishibachi et al., 2011; Gonçalves et al., 2017; Jumrani e Bhatia, 2018; Silva et al., 2018).

Embora não tenham sido constatados em todas as variáveis estudadas e épocas de avaliação, os efeitos negativos da restrição hídrica foram parcialmente amenizados pelo pré-tratamento de sementes com H_2O_2 . Neste sentido, foi verificado aumento no comprimento de raiz e diminuição do conteúdo de H_2O_2 e prolina em plantas obtidas de sementes pré-tratadas com H_2O_2 , em relação às plantas não tratadas (Figuras 7, 10, 12). Tais respostas têm sido atribuídas à cascata de sinalização desencadeada pelo H_2O_2 (Gondim et al., 2011; Hossain et al., 2015; Chen et al., 2016; Andrade et al., 2018), capaz de promover aumento de tolerância às plantas em condição de estresse.

Como esperado, a interrupção da irrigação acarretou em diminuição progressiva na umidade do solo (Figura 6). Porém, após a irrigação ser reestabelecida, foi observada maior umidade no solo em que continham plantas sob restrição hídrica, em relação ao solo com plantas irrigadas (Figura 6 a). Isso pode ser o resultado do maior crescimento das plantas mantidas irrigadas, cuja demanda por água do solo possivelmente foi superior em relação às plantas que tiveram o crescimento diminuído pelo déficit hídrico.

Nas condições de déficit hídrico, que ocorre redução da umidade do solo, as plantas podem sintetizar solutos compatíveis para manter o TRA (Yang et al., 2009). De maneira interessante, a aplicação de H_2O_2 na soja pode promover o aumento no conteúdo de galactinol (osmoprotetor) e inibir o efeito negativo do déficit hídrico sobre o TRA (Ishibashi et al., 2011). Contudo, neste estudo, não se verificou diferença entre os tratamentos, na mesma condição hídrica, para o TRA (Figura 6b). Por outro lado, sob estresse, a diminuição no

PH das plantas pré-tratadas com H_2O_2 foi mais tardia se comparadas às plantas não tratadas (Figura 6c).

Observou-se também que, a partir do quarto dia de imposição do estresse, houve diminuição na altura de plantas sob restrição hídrica, comparada às irrigadas, independentemente do tratamento (Figura 7). Amplamente conhecido, esse efeito é decorrente da diminuição no turgor celular, causado pela redução no TRA e no PH (Figura 6b, c), que afetam diretamente o mecanismo de crescimento das plantas, governado pelo gradiente de potencial hídrico (Silva et al., 2018). De maneira similar, houve diminuição no diâmetro de caule (Figura 7b), porém este órgão mostrou-se mais tolerante às mudanças na condição hídrica, pois diferença significativa só foi observada no estresse máximo de oito dias, quando o teor de umidade do solo estava em 6% e o potencial hídrico foliar em -2,8 MPa (Figura 6a, c), considerado estresse hídrico severo para soja (Mesquita, 2013).

Durante o déficit hídrico, plantas capazes de alterar a distribuição das raízes e explorar regiões do solo com maior disponibilidade de água podem evitar os principais danos causados pelo estresse (Benjamin e Nielsen, 2006; He et al. 2016). Neste estudo, o comprimento das raízes de plantas condicionadas ao déficit hídrico, foi menor que seu respectivo controle irrigado independentemente do tratamento (Figura 7). Porém, comparando-se os tratamentos, nas diferentes condições hídricas, a partir do oitavo dia, o comprimento das raízes de plantas pré-tratadas com H_2O_2 foi maior em relação às plantas não tratadas (Figura 7c, d). Esses resultados podem ser consequência dos efeitos positivos atribuídos ao H_2O_2 no crescimento de raízes adventícias em soja (Su et al., 2006), que, somadas, aumentam o comprimento total das raízes, evidenciando, assim, uma possível participação do H_2O_2 sob essa característica, considerada como estratégia de evitação à seca em plantas (Kooyers, 2015).

O déficit hídrico também acarretou redução do número de ramificação final em plantas sob estresse, comparado às irrigadas, independentemente do tratamento (Figura 8a). A alta sensibilidade das folhas ao déficit hídrico conduz a redução da área foliar. De fato, a área foliar total das plantas sob estresse foi diminuída a partir de quatro dias de restrição hídrica, independentemente do tratamento (Figura 8b). A redução da superfície transpirante pode contribuir

para evitar perda de água por transpiração (Razzaghi et al. 2012), até que as condições hídricas sejam reestabelecidas. Neste sentido, com a reidratação, o crescimento da área foliar foi retomado, porém as diferenças entre as condições hídricas verificadas a partir do quarto dia foram mantidas (Figura 8). Possivelmente, quatro dias de reidratação sejam um período curto para completa recuperação.

Adicionalmente, é sabido que sob déficit hídrico há uma tendência de os estômatos manterem-se fechados na maior parte do dia, reduzindo consideravelmente a taxa de assimilação de CO₂, importante para produção de carboidratos utilizados para o crescimento das plantas (Zangh et al., 2008; Mohammadi et al., 2012; Basu et al., 2016). Neste sentido, foi observado que independentemente do tratamento, a deficiência hídrica diminuiu o crescimento das plantas (Figuras 7, 8) e provocou menor acúmulo de massa seca de raiz, caule e folhas (Figura 8) em plantas sob restrição hídrica, comparado aos seus respectivos controle irrigado. Além disso, embora tenha sido mostrado que plantas de soja acometidas por déficit hídrico na fase vegetativa podem recuperar a biomassa após a retomada das condições hídricas ideais (Jumrani e Bhatia, 2018), evidenciou-se no presente estudo que quatro dias de reidratação foram insuficientes para completa recuperação (Figura 9).

De maneira geral, as plantas utilizam mecanismos enzimáticos (Gratão et al., 2005; Andrade et al., 2018) e não enzimáticos (Rhein et al., 2011; Kiliane et al., 2014; Per et al., 2017) de respostas para superar os danos causados pelo estresse hídrico. No presente estudo, as plantas condicionadas ao estresse apresentaram aumento progressivo de prolina nas raízes e folhas em relação às plantas irrigadas, independentemente do tratamento (Figura 10a, b). De maneira interessante, no estresse máximo de oito dias e em plantas reidratadas, o conteúdo de prolina foi menor em plantas pré-tratadas com H₂O₂ em relação às plantas não tratadas. Isso indica que tais plantas poderiam estar relativamente menos estressadas, pois o aumento de prolina durante o déficit hídrico tem sido relacionado com o nível de estresse causado à planta (Devi e Giridhar, 2015).

A prolina também tem sido considerada um aminoácido com função antioxidante (Per et al., 2017) capaz de proteger a integridade das membranas celulares da ação das ERO. Porém os efeitos protetores do acúmulo de prolina

(Figura 10) não evitou os danos causados pela restrição hídrica, pois evidenciamos redução de pigmentos a partir do quarto dia e aumento do conteúdo de MDA nas folhas no oitavo dia (Figura 11, 12), fortes indicadores do estresse oxidativo.

O déficit hídrico severo também pode reduzir a atividade de algumas enzimas chave no processo de eliminação das ERO (Reddy et al., 2004; Shao et al., 2008; Peng et al., 2016), o que possivelmente contribuiu para o aumento do conteúdo de MDA no estresse máximo de oito dias (Figura 12c, d).

Ainda assim, é importante destacar que, embora o déficit hídrico tenha desencadeado o aumento de H_2O_2 , no quarto e oitavo dia de avaliação, as plantas pré-tratadas com 10 mM de H_2O_2 obtiveram menor acúmulo desse composto, comparadas às plantas não tratadas, em ambas as condições hídricas (Figura 12a, b). Isso pode estar relacionado com aumento da atividade do sistema antioxidante enzimático de resposta, desencadeado pela aplicação do H_2O_2 (Khan et al., 2015; Hasan et al., 2016; Zhang et al., 2018). Nesse sentido, Andrade et al. (2018) observaram aumento da atividade de importantes peroxidases, como CAT e APX em plantas de soja sob estresse hídrico causado por encharcamento, após o pré-tratamento de sementes com H_2O_2 .

Em síntese, sugere-se que o pré-tratamento de sementes de soja com H_2O_2 esteja condicionado à concentração e ao estágio fenológico da planta, e os mecanismos detalhados do efeito do H_2O_2 no aumento de tolerância ao déficit hídrico, na germinação e no crescimento subsequente de plantas, ainda requer mais estudos. Contudo, demonstrou-se que o pré-tratamento de sementes de soja com H_2O_2 pode constituir-se uma ferramenta potencial capaz de melhorar as respostas da soja sob estresse por déficit hídrico, sobretudo no estabelecimento inicial de plântulas.

6. CONCLUSÕES

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, nas concentrações de 10 e 50 mM, melhora a germinação e o crescimento das plântulas de soja sob estresse por déficit hídrico e salino imposto por PEG e NaCl, respectivamente.

Em plantas, o pré-tratamento de sementes com 10 mM de H₂O₂ prolonga o tempo para diminuição do potencial hídrico foliar, induz o crescimento de raízes das plantas sob restrição hídrica, e contribui para diminuição do conteúdo de prolina e H₂O₂, sob determinadas condições hídricas e épocas de avaliação. Entretanto, nas demais variáveis bioquímicas e de crescimento, não se verificou efeito do tratamento com H₂O₂.

7. REFERÊNCIAS

Abass SM, Mohamed HI (2011) Alleviation of adverse effects of drought stress on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by exogenous application of hydrogen peroxide. **Bangladesh Journal of Botany** 40:75-83. doi:org/10.3329/bjb.v40i1.8001

Abrahão GM, Costa MH (2018) Evolution of rain and photoperiod limitations on the soybean growing season in Brazil: The rise (and possible fall) of double-cropping systems. **Agricultural and Forest Meteorology** 256:32-45. doi:10.1016/j.agrformet.2018.02.031

Adeboye OB, Schultz B, Adekalu KO, Prasad K (2015) Crop water productivity and economic evaluation of drip-irrigated soybeans (*Glyxine max* L. Merr.). **Agriculture & Food Security** 4:10. doi:org/10.1186/s40066-015-0030-8

Ahmad I, Basra SM, Afzal I, Farooq M, Wahid A (2013) Stand establishment improvement in spring maize through exogenous application of ascorbic acid, salicylic acid and hydrogen peroxide. **J. Agric. Biol** 15:95-100.

Akpınar BA, Lucas SJ, Budak H (2013) Genomics approaches for crop improvement against abiotic stress. **Sci. World J** 2013:1-9. doi:org/10.1155/2013/361921

Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment** 24:1337-1344. doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x

Amooaghaie R, Tabatabaie F (2017) Osmopriming-induced salt tolerance during seed germination of alfalfa most likely mediates through H₂O₂ signaling and upregulation of heme oxygenase. **Protoplasma** 254:1791-1803. doi:org/10.1007/s00709-016-1069-5

Andrade CA, Souza KRD, Oliveira SM, Silva DM, Alves JD (2018) Hydrogen peroxide promotes the tolerance of soybeans to waterlogging. **Scientia Horticulturae** 232:40-45. doi:org/10.1016/j.scienta.2017.12.048

Ashraf M, Foolad MR (2005) Pre-sowing seed treatment—A shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. **Advances in agronomy** 88:223-271. doi:org/10.1016/S0065-2113(05)88006-X

Awad-allah EF, Gholipour Y, Nonami H (2012) Growth Promotion with Osmotic Adjustment at Low Water Potentials after H₂O₂ Pretreatment in Soybean Seeds. **Environmental Control in Biology** 50:263-276. doi:org/10.2525/ecb.50.263

Bagheri M, Gholami M, Baninasab B (2019) Hydrogen peroxide-induced salt tolerance in relation to antioxidant systems in pistachio seedlings. **Scientia Horticulturae** 243:207-213. doi:org/10.1016/j.scienta.2018.08.026

Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F (2008) From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes rendus biologies** 331:806-814. doi:org/10.1016/j.crv.2008.07.022

Bakhshandeh E, Gholamhossieni M (2018) Quantification of soybean seed germination response to seed deterioration under PEG-induced water stress using hydrotimic concept. **Acta Physiologiae Plantarum** 40:126. doi: 10.1007/s11738-018-2700-1

Barba-Espín G, Diaz-Vivancos P, Job D, Belghazi M, Job C, Hernández JA (2011) Understanding the role of H₂O₂ during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. **Plant, cell & environment** 34:1907-1919. doi:org/10.1111/j.1365-3040.2011.02386.x

Barba-Espín G, Hernández JA, Diaz-Vivancos P (2012) Role of H₂O₂ in pea seed germination. **Plant signaling & behavior** 7:193-195. doi:org/10.4161/psb.18881

Basu S, Ramegowda V, Kumar A, Pereira A (2016) Plant adaptation to drought stress. **F1000Research** 5:1-10. doi:10,12688 / f1000research.7678.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and soil** 39:205-207.

Benjamin JG, Nielsen DC (2006) Water deficit effects on root distribution of soybean, field pea and chickpea. **Field crops research** 97:248-253. doi:org/10.1016/j.fcr.2005.10.005

Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. **Science** 218:443-448. doi: 10.1126/science.218.4571.443

Braga LF, Sousa MP, Braga JF, Sá ME (1999) Efeito da disponibilidade hídrica do substrato na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes** 21:95-102.

Bramley H, Turner NC, Turner DW, Tyerman SD (2009) Roles of morphology, anatomy, and aquaporins in determining contrasting hydraulic behavior of roots. **Plant Physiology** 150:348-364. doi: org/10.1104/pp.108.134098

Brasil (2009) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS 398p.

Breusegem FV, Foyer C, Mann G (2018) Reactive oxygen species are crucial "pro-life" survival signals in plants. **Free Radical Biology & Medicine** 122:1-3. doi: org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.582

Camara GMS, Sedyama T, Dourado-neto DE, Bernardes MS (1997) Influência do fotoperíodo e da temperatura do ar no crescimento, florescimento e maturação da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Scientia Agricola**, 54:149-154. doi:org/10.1590/S0103-90161997000300017

Carmody M, Waszczak C, Idänheimo N, Saarinen T, Kangasjärvi J (2016) ROS signalling in a destabilised world: a molecular understanding of climate change. **Journal of plant physiology** 203:69-83. doi: 10.1016/j.jplph.2016.06.008

Černý M, Habánová H, Berka M, Luklová M, Brzobohatý B (2018) Hydrogen Peroxide: Its Role in Plant Biology and Crosstalk with Signalling Networks. **International journal of molecular sciences** 19:9:2812. doi: 10.3390/ijms19092812

Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany** 103:4:551-560. doi: 10.1093/aob/mcn125

Chen BX, Li WY, Gao YT, Chen ZJ, Zhang WN, Liu QJ, Chen Z (2016). Involvement of polyamine oxidase-produced hydrogen peroxide during coleorhiza-limited germination of rice seeds. **Frontiers in plant science** 7:1219. doi: 10.3389/fpls.2016.01219

Chen K, Arora R (2013). Priming memory invokes seed stress-tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 33-45. doi: org/10.1016/j.envexpbot.2012.03.005

Chen BX, Li WY, Gao YT, Chen ZJ, Zhang WN, Liu QJ, Chen Z (2016) Involvement of polyamine oxidase-produced hydrogen peroxide during coleorhiza-limited germination of rice seeds. **Frontiers in plant science** 7:1219. doi: 10.3389/fpls.2016.01219

Choi W G, Miller G, Wallace L, Harper J, Mittler, R, Gilroy S (2017) Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca²⁺, ROS and electrical signals. **The Plant Journal** 90:4:698-707. doi: 10.1111/tpj.13492

Clemente T, Cahoon E B (2009) Soybean oil: genetic approaches for modification of functionality and total content. **Plant physiology**, 151:3:1030-1040. doi: org/10.1104/pp.109.146282

Conab (2016) - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: V. 3 - SAFRA 2015/16 - N. 12, 12º levantamento**. Brasília 182pg. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/1305_92934803e5c32864b0ca922bb93bfc34. Acesso em: 20 de abril de 2019.

Creelman RA, Mason HS, Bensen RJ, Boyer JS, Mullet JE (1990) Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings: analysis of growth, sugar accumulation, and gene expression. **Plant Physiology** 92:205-214. doi:org/10.1104/pp.92.1.205

Czarnocka W, Karpiński S (2018) Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. **Free Radical Biology and Medicine** 122:4-20. doi:org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011

Dapanage M, Bhat S (2018) Physiological responses of commercial sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) varieties to moisture deficit stress tolerance. **Indian Journal of Plant Physiology** 23:40-47. doi:org/10.1007/s40502-017-0328-6

Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science** 2:53. doi:org/10.3389/fenvs.2014.00053

Dat J, Vandenameele S, Vranová E, Van MM, INZÉ D, Van-Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS** 57:779-795. doi:org/10.1007/s000180050041

Deinlein U, Stephan AB, Horie T, Luo W, Xu G, Schroeder JI (2014) Plant salt-tolerance mechanisms. **Trends in plant science** 19:371-379. doi: 10.1016/j.tplants.2014.02.001

Devi MKA, Giridhar P (2015) Variations in physiological response, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities, proline and isoflavones content in soybean varieties subjected to drought stress. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: **Biological Sciences** 85:35-44. doi:org/10.1007/s40011-013-0244-0

Dubey A, Kumar A, Abd-Allah EF, Hashem A, Khan ML (2018) Growing more with less: Breeding and developing drought resilient soybean to improve food security. **Ecological Indicators**. doi: 10.1016/j.ecolind.2018.03.003

Fang Y, Xiong L (2015) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences** 72:673-689. doi: 10.1007/s00018-014-1767-0

Farias JRB, Nepomuceno AL, Neumaier N (2007) **Ecofisiologia da soja**. Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E).

Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, 11:929-931. doi:org/10.2135/cropsci1971.0011183X001100060051x

Foyer CH (2018) Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**. doi:org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003

Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell** 17:1866-1875. doi: 10.1105 / tpc.105.033589

Gava R, Lima SFD, Santos OFD, Anselmo JL, COTRIM MF, KÜHN IE (2018) Water depths for different soybean cultivars in center pivot. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 22:10-15. doi:org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n1p10-15

Ge XM, Cai HL, Lei X, Zou X, Yue ME, He JM (2015) A proteína G heterotrimérica medeia o fechamento estomático induzido por etileno via síntese de peróxido de hidrogênio em Arabidopsis. **Plant J** 82:138-150. doi: 10.1111 / tpj.12799

Gilroy S, Białasek M, Suzuki N, Górecka M, Devireddy AR, Karpiński S, Mittler R (2016) ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. **Plant Physiology** 171:1606-1615. doi: 10.1104/pp.16.00434

Gilroy S, Suzuki N, Miller G, Choi WG, Toyota M, Devireddy AR, Mittler RA (2014) tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. **Trends in plant Science** 19:623-630. doi: org/10.1016/j.tplants.2014.06.013

Gonçalves CG, SILVA SAC, Pereira MRR, Gasparino EC, Martins D (2017) Morphological modifications in soybean in response to soil water management. **Plant Growth Regulation** 83:105-117. doi:org/10.1007/s10725-017-0287-y

Gondim FA, Gomes-filho E, MARQUES EC, PRISCO JT (2011) Efeitos do H₂O₂ no crescimento e acúmulo de solutos em plantas de milho sob estresse salino. **Revista Ciência Agronômica** 42:373-381.

Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional plant biology** 32:481-494. doi:org/10.1071/FP05016

Guler NS, Pehlivan N (2016) Exogenous low-dose hydrogen peroxide enhances drought tolerance of soybean (*Glycine max* L.) through inducing antioxidant system. **Acta Biologica Hungarica** 67:169-183. doi:org/10.1556/018.67.2016.2.5

Guo J, Wang Y, Song C, Zhou J, Qiu L, Huang H, Wang Y (2010) A single origin and moderate bottleneck during domestication of soybean (*Glycine max*): implications from microsatellites and nucleotide sequences. **Annals of Botany** 106:505-514. doi: 10.1093/aob/mcq125

Hasan SA, Irfan M, Masrahi YS, Khalaf MA, Hayat S (2016) Growth, photosynthesis, and antioxidant responses of *Vigna unguiculata* L. treated with hydrogen peroxide. **Cogent Food & Agriculture** 2:1155331. doi:org/10.1080/23311932.2016.1155331

Hasanuzzaman M, Nahar K, Gill SS, Alharby HF, Razafindrabe BH, Fujita M (2017) Hydrogen peroxide pretreatment mitigates cadmium-induced oxidative stress in *Brassica napus* L.: an intrinsic study on antioxidant defense and glyoxalase systems. **Frontiers in plant science** 8:115. doi: 10.3389/fpls.2017.00115

He J, Du YL, Wang T, Turner NC, Yang RP, Jin Y, Li FM (2017) Conserved water use improves the yield performance of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under drought. **Agricultural Water Management** 179:236-245. doi:org/10.1016/j.agwat.2016.07.008

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics** 125:189-198. doi:org/10.1016/0003-9861(68)90654-1

Hegarty TW (1978) The physiology of seed hydration and dehydration, and the relation between water stress and the control of germination: a review. **Plant, Cell & Environment** 1:101-119. doi:org/10.1111/j.1365-3040.1978.tb00752.x

Hernández-Barrera A, Velarde-Buendía A, Zepeda I, Sanchez F, Quinto C, Sánchez-Lopez R, Cardenas L (2015) Hyper, a hydrogen peroxide sensor, indicates the sensitivity of the Arabidopsis root elongation zone to aluminum treatment. **Sensors** 15:855-867. doi: 10.3390 / s150100855

Hossain MA, Bhattacharjee S, Armin SM, Qian P, Xin W, LI HY, Burritt DJ, Fujita M, TRAN LP (2015) Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. **Frontiers in plant science** 6:420. doi: 10.3389/fpls.2015.00420

Ishibashi Y, Yamaguchi H, Yuasa T, Iwaya-Inoue M, Arima S, Zheng SH (2011) Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. **Journal of plant physiology** 168:1562-1567. doi: 10.1016/j.jplph.2011.02.003

Ishibashi Y, Aoki N, Kasa S, Sakamoto M, Kai K, Tomokiyo R, Watabe G, Yuasa T, Iwaya-Inoue M (2017) The interrelationship between abscisic acid and reactive oxygen species plays a key role in barley seed dormancy and germination. **Frontiers in plant science** 8:275. doi:org/10.3389/fpls.2017.00275

Javed R, Yücesan B, Gurel E (2018) Hydrogen peroxide-induced steviol glycosides accumulation and enhancement of antioxidant activities in leaf tissues of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sugar Tech** 20:100-104.

Jumrani K, Bhatia VS (2018) Combined effect of high temperature and water-deficit stress imposed at vegetative and reproductive stages on seed quality in soybean. **Indian journal of plant physiology** 23:227-244. doi: 10.1007/s40502-018-0365-9

Kaushal M, Wani SP (2016) Rhizobacterial-plant interactions: strategies ensuring plant growth promotion under drought and salinity stress. **Agriculture, Ecosystems & Environment** 231:68-78. doi: 10.1016/j.agee.2016.06.031

Khan MIR, Khan NA, Masood A, Per TS, Asgher M (2016) Hydrogen peroxide alleviates nickel-inhibited photosynthetic responses through increase in use-efficiency of nitrogen and sulfur, and glutathione production in mustard. **Frontiers in plant science** 7:44. doi:10.3389/fpls.2016.00044

Khan TA, Yusuf M, Fariduddin Q (2015) Seed treatment with H₂O₂ modifies net photosynthetic rate and antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) plants. **Israel Journal of Plant Sciences** 62:167-175. doi:org/10.1080/07929978.2015.1060806

Khan TA, Yusuf M, Fariduddin Q (2018) Hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism: Signalling and its effect under abiotic stress. **Photosynthetica** 1-12. doi:org/10.1007/s11099-018-0830-8

Kiliane RB, Abdelly C, Savouré A (2014) How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry** 80:278-284. doi:org/10.1016/j.plaphy.2014.04.007

Knorr MT (2017) Quarenta anos de expansão da soja no Brasil, 1975-2015. Confins. **Revue franco-brésilienne de géographie/Revista franco-brasilera de geografia**. doi: 10.4000/confins.12592

Kooyers NJ (2015) The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. **Plant Science** 234:155-162. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.02.012

Kubala S, Garnczarska M, Wojtyła Ł, Clippe A, Kosmala A, Żmieńko A, Quinet M (2015) Deciphering priming-induced improvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) germination through an integrated transcriptomic and proteomic approach. **Plant Science** 231:94-113. doi:org/10.1016/j.plantsci.2014.11.008

Leisner CP, Yendrek CR, Ainsworth EA (2017) Physiological and transcriptomic responses in the seed coat of field-grown soybean (*Glycine max* L. Merr.) to abiotic stress. **BMC plant biology** 17:242. doi:org/10.1186/s12870-017-1188-y

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Methods in enzymology. **Academic Press** 350-382. doi:org/10.1016/0076-6879(87)48036-1

Lima AT, Meiado MV (2018) Effects of seed hydration memory on initial growth under water deficit of cactus from two populations that occur in different ecosystems in Northeast Brazil. **Plant Species Biology** 33:268-275. doi:org/10.1111/1442-1984.12219

Lima RAF, Santos DMM, Carlin SD (2011) Nitrate reductase enzyme activity and free proline contents in sugarcane roots under water and acid stress in soil. **Semina: Ciências Agrárias** 32:1345-1360. doi:org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1345

Liu Y, Ye N, Liu R, Chen M, Zhang J (2010) H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. **Journal of experimental botany** 61:2979-2990. doi:org/10.1093/jxb/erq125

Maguire JD (1962) Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science** 2:176-177. doi:10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x

Mesquita RO (2013) **Determinantes fisiológicos e moleculares da resposta diferencial à seca em soja**.143p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - UFV, Viçosa.

Mohammadi PP, Moieni A, Hiraga S, Komatsu S (2012) Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. **Journal of proteomics** 75:1906-1923. doi:org/10.1016/j.jprot.2011.12.041

Munawarti A, Semiarti E, Holford P (2013) Tolerance of accessions of glagah (*Saccharum spontaneum*) to drought stress and their accumulation of proline. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences** 8:1-11. doi:10.3844/ajabssp.2013.1.11

Nachimuthu VV, PANDIAN BA, ROBIN S (2017) Role of Reactive Oxygen Species in Water-Deficit Stress Response. In: Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress. **Springer**, Singapore 283-295. doi:10.1007/978-981-10-5254-5

Nakagawa AC, Itoyama H, Ariyoshi Y, Ario N, Tomita Y, Kondo Y, Ishibashi Y (2018) Drought stress during soybean seed filling affects storage compounds through regulation of lipid and protein metabolism. **Acta Physiologiae Plantarum** 40:111. doi:org/10.1007/s11738-018-2683-y

Niu L, Liao W (2016) Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. **Frontiers in plant science** 7:230. doi: 10.3389/fpls.2016.00230

Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, Novitskaya L, Foyer CH (2002) Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?. **Annals of Botany** 89:841-850. doi: 10.1093 / aob / mcf096

Pankova EI (2016) Salinization of Irrigated Soils in the Middle-Asian Region: Old and New Issues. **Arid Ecosystems** 6:241-248. doi.org/10.1134/S2079096116040077

Panngom K, Chuesaard T, Tamchan N, Jiwchan T, Srikongsritong K, Park G (2018) Comparative assessment for the effects of reactive species on seed germination, growth and metabolisms of vegetables. **Scientia Horticulturae** 227:85-91. doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.026

Paparella S, Araújo SS, Rossi G, Wijayasinghe M, Carbonera D, Balestrazzi A (2015) Seed priming: state of the art and new perspectives. **Plant Cell Reports** 34:1281-1293. doi.org/10.1007/s00299-015-1784-y

Pathan MS, Lee JD, Shannon JG, Nguyen HT (2007) Recent advances in breeding for drought and salt stress tolerance in soybean. In: **Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops**. Springer 739-773. doi.org/10.1007/978-1-4020-5578-2_30

Paul S, Roychoudhury A (2017) Seed priming with spermine and spermidine regulates the expression of diverse groups of abiotic stress-responsive genes during salinity stress in the seedlings of indica rice varieties. **Plant Gene** 11:124-132. doi.org/10.1016/j.plgene.2017.04.004

Paulsen CE, CARROLL KS (2010) Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. **ACS chemical biology** 5:47-62. doi: 10.1021/cb900258z

Peng D, Wang X, Li Z, Zhang Y, Peng Y, Li Y, Yan Y (2016) NO is involved in spermidine-induced drought tolerance in white clover via activation of antioxidant enzymes and genes. **Protoplasma** 253:1243-1254. doi:10.1007/s00709-015-0880-8

Per TS, Khan NA, Reddy PS, Masood A, Hasanuzzaman M, Khan MIR, Anjum NA (2017) Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: phytohormones, mineral nutrients and transgenics. **Plant physiology and biochemistry** 115:126-140. doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.018

Pires GF, Abrahão GM, Brumatti LM, Oliveira LJ, Costa MH, Liddicoat S, Ladle RJ (2016) Increased climate risk in Brazilian double cropping agriculture systems: Implications for land use in Northern Brazil. **Agricultural and forest meteorology** 228:286-298. doi.org/10.1016/j.agrformet.2016.07.005

Razzaghi F, Plauborg F, Jacobsen SE, Jensen CR, Andersen MN (2012) Effect of nitrogen and water availability of three soil types on yield, radiation use efficiency and evapotranspiration in field-grown quinoa. **Agricultural water management** 109:20-29. doi.org/10.1016/j.agwat.2012.02.002

Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of plant physiology** 161:1189-1202. doi:org/10.1016/j.jplph.2004.01.013

Ribas-Carbo M, Taylor NL, Giles L, Busquets S, Finnegan PM, Day DA, Hipólito MHL, Berry JA, Flexas J (2005) Effects of water stress on respiration in soybean leaves. **Plant Physiology** 139:466-473. doi:org/10.1104/pp.105.065565

Rodrigues O, Reshetnyak G, Grondin A, Saijo Y, Leonhardt N, Maurel C, Verdoucq L (2017) Aquaporins facilitate hydrogen peroxide entry into guard cells to mediate ABA- and pathogen-triggered stomatal closure. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 114:9200-9205. doi:org/10.1073/pnas.1704754114

Ruttanaruangboworn A, Chanprasert W, Tobunluepop P, Onwimol D (2017) Effect of seed priming with different concentrations of potassium nitrate on the pattern of seed imbibition and germination of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Integrative Agriculture** 16:605-613. doi:org/10.1016/S2095-3119(16)61441-7

Schauberger B, Archontoulis S, Arneith A, Balkovic J, Ciais P, Deryng D, Elliott J, Folberth C, Khabarov N, Müller C, Pugh TAM, Rolinski S, Schaphoff S, Schmid E, Wang X, Schlenker W, Frieler K (2017) Consistent negative response of US crops to high temperatures in observations and crop models. **Nature communications** 8:13931. doi: 10.1038/ncomms13931

Schlicke H, Hartwig AS, Firtzlaff V, Richter AS, Glässer C, Maier K, Finkemeier I, Grimm B (2014) Induced deactivation of genes encoding chlorophyll biosynthesis enzymes disentangles tetrapyrrole-mediated retrograde signaling. **Molecular plant** 7:1211-1227. doi:org/10.1093/mp/ssu034

Scholander PF, Hammel HT, Hemmingsen EA, Bradstreet ED (1964) Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 52:119-125. doi:org/10.1073/pnas.52.1.119

Sediyama, T (2009) **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina, Paraná: 314 p.

Sewelam N, Kazan K, Schenk PM (2016) Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. **Frontiers in plant science** 7:187. doi: 10.3389/fpls.2016.00187.

Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes rendus biologiques** 331:215-225. doi: 10.1016/j.crv.2008.01.002

Shu K, Qi Y, Chen F, Meng Y, Luo X, Shuai H, Yang F (2017) Salt stress represses soybean seed germination by negatively regulating GA biosynthesis while positively mediating ABA biosynthesis. **Frontiers in plant science** 8:1372. doi: 10.3389/fpls.2017.01372

Si T, Wang X, Zhao C, Huang M, Cai J, Zhou Q, Jiang D (2018) The Role of Hydrogen Peroxide in Mediating the Mechanical Wounding-Induced Freezing Tolerance in Wheat. **Frontiers in plant science** 9:327. doi: 10.3389/fpls.2018.00327

Sies H (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. **Redox biology** 11:613-619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035

Silva AJD, Magalhães-Filho JR, Sales CRG, Pires RCDM, Machado EC (2018) Source-sink relationships in two soybean cultivars with indeterminate growth under water deficit. **Bragantia** 77:23-35. doi:org/10.1590/1678-4499.2017010

Sinclair TR (2017) Soybean. In: **Water-Conservation Traits to Increase Crop Yields in Water-deficit Environments**. Springer, Cham, p. 17-26. doi:org/10.1007/978-3-319-56321-3_4

Singh A (2015) Soil salinization and waterlogging: A threat to environment and agricultural sustainability. **Ecological indicators** 57:128-130. doi:org/10.1016/j.ecolind.2015.04.027

Sneideris LC, Gavassi MA, Campos ML, D'amico-Damiao V, Carvalho RF (2015) Effects of hormonal priming on seed germination of pigeon pea under cadmium stress. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 87:1847-1852. doi:org/10.1590/0001-3765201520140332

Su GX, Zhang Wh, Liu YL (2006) Involvement of hydrogen peroxide generated by polyamine oxidative degradation in the development of lateral roots in soybean. **Journal of Integrative Plant Biology** 48:426-432. doi:org/10.1111/j.1744-7909.2006.00236.x

Talbi S, Romero-Puertas MC, Hernández A, Terrón L, Ferchichi A, Sandalio LM (2015) Drought tolerance in a Saharian plant *Oudneya africana*: role of antioxidant defences. **Environmental and Experimental Botany** 111:114-126. doi:org/10.1016/j.envexpbot.2014.11.004

Terzi R, Kadioglu A, Kalaycioglu E, Saglam A (2014) Hydrogen peroxide pretreatment induces osmotic stress tolerance by influencing osmolyte and abscisic acid levels in maize leaves. **Journal of plant interactions** 9:559-565. doi: 10.1080/17429145.2013.871077

USDA (2017). **World Agricultural Supply and Demand Estimates**. United States Dep. Agric. VanWey, L.K.; Spera, S.; de Sa, R.; Mahr, D., Mustard, J.F., 2013. Socioeconomic development and agricultural intensification in Mato Grosso. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* doi:org/10.1098/rstb.2012.0168. 20120168

Variar A, Vari AK, Dadlani M (2010) The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, p. 450-456. Disponivel em :<<https://www.jstor.org/stable/24109568>>.

Verma G, Mishra, S, Sangwan N, Sharma, S (2015) Reactive oxygen species mediate axis-cotyledon signaling to induce reserve mobilization during germination and seedling establishment in *Vigna radiata*. **Journal of plant physiology**184:79-88. doi:org/10.1016/j.jplph.2015.07.001

Villela FA, Filho LD, Sequeira EL (1991) Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 26:1957–1968.

Wang L, Yang L, Yang F, Li X, Song Y, Wang X, Hu X (2010) Involvements of H₂O₂ and metallothionein in NO-mediated tomato tolerance to copper toxicity. **Journal of plant physiology** 167:1298-1306. doi:org/10.1016/j.jplph.2010.04.007

Wijewardana C, Reddy KR, Alsajri FA, Irby JT, Krutz J, Golden B (2018) Quantifying soil moisture deficit effects on soybean yield and yield component distribution patterns. **Irrigation Science** 36:241-255. doi:org/10.1007/s00271-018-0580-1

Wojtyla L, Lechowska K, Kubala S, Garnczarska M (2016a) Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. **Frontiers in plant science** 7:66. doi: 10.3389/fpls.2016.00066

Wojtyla L, Lechowska K, Kubala S, Garnczarska M (2016b) Molecular processes induced in primed seeds—increasing the potential to stabilize crop yields under drought conditions. **Journal of plant physiology** 203:116-126. doi:org/10.1016/j.jplph.2016.04.008

Yan M (2015) Seed priming stimulate germination and early seedling growth of Chinese cabbage under drought stress. **South African Journal of Botany** 99:88-92. doi:org/10.1016/j.sajb.2015.03.195

Yang SL, Lan SS, Gong M (2009) Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. **Journal of plant physiology** 166:1694-1699. doi: 10.1016/j.jplph.2009.04.006

Zhang D, Chen L, Li D, Lv B, Chen Y, Chen J, Liang J (2014) OsRACK1 is involved in abscisic acid-and H₂O₂-mediated signaling to regulate seed germination in rice (*Oryza sativa*, L.). **Plos One** 9:e97120. doi:org/10.1371/journal.pone.0097120

Zhang Y, Yu SHI, Gong HJ, Zhao HL, Li HL, Hu YH, Wang YC (2018) Beneficial effects of silicon on photosynthesis of tomato seedlings under water stress. **Journal of Integrative Agriculture** 17:2151-2159. doi:org/10.1016/S2095-3119(18)62038-6

Zhang M, Zhai Z, Tian X, Duan L, Li Z (2008) Brassinolide alleviated the adverse effect of water deficits on photosynthesis and the antioxidant of soybean (*Glycine max* L.). **Plant growth regulation** 56:257-264. doi:org/10.1007/s10725-008-9305-4

APÊNDICES

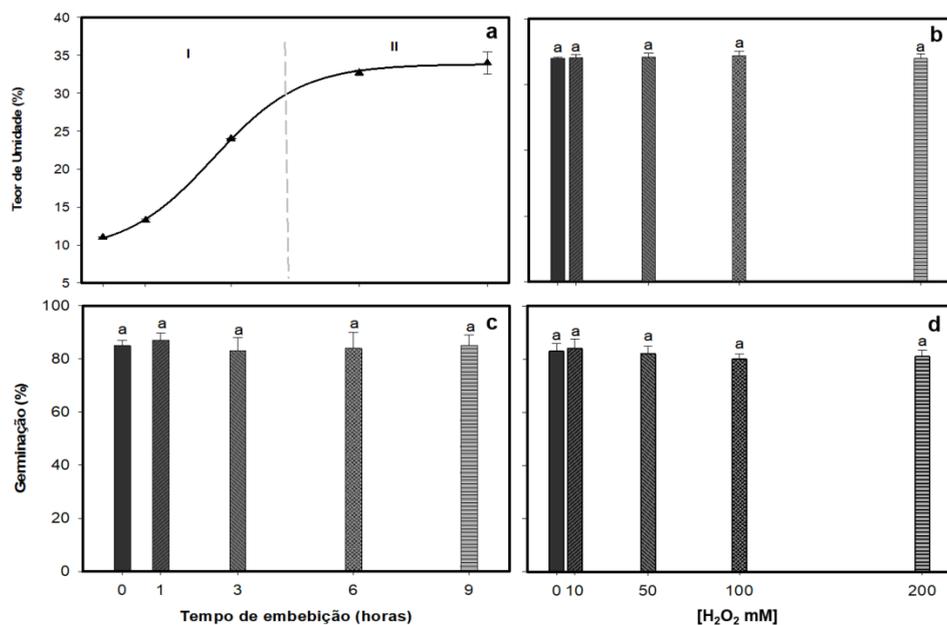


Figura 2. Aumento no teor de umidade da semente em função do tempo de embebição (a), umidade após 9h em diferentes concentrações de H_2O_2 (b), germinação em função do tempo de embebição (c) e das concentrações de H_2O_2 testadas (d). Barras representam a média \pm erro padrão (SE). Letras iguais indicam que não houve diferença pelo teste de SNK a 5% ($p \leq 0,05$). O final da fase I e começo da fase II da germinação (a) é marcado pela intersecção da linha vertical à linha de tendência (RUTTANARUANGBOWORN et al., 2017), cada ponto representa a média \pm erro padrão (SE) de cinco repetições com 20 sementes.