



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VITOR CAMARGO DO NASCIMENTO JUNIOR

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS
DE SOJA TOLERANTES À SECA**

Londrina
2016

VITOR CAMARGO DO NASCIMENTO JUNIOR

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS
DE SOJA TOLERANTES À SECA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Egidio Cavenaghi
Prete

Coorientador: Dr. Marco Antonio Nogueira

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Nascimento Junior, Vitor Camargo do.

Fixação biológica de nitrogênio em genótipos de soja tolerantes à seca / Vitor Camargo do Nascimento Junior. - Londrina, 2016.
118 f.

Orientador: Cássio Egidio Cavenaghi Prete.

Coorientador: Marco Antonio Nogueira.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Genótipos de soja - Teses. 2. Fixação biológica de nitrogênio - Teses. 3. Tolerância genética à seca - Teses. 4. Restrição hídrica - Teses. I. Prete, Cássio Egidio Cavenaghi. II. Nogueira, Marco Antonio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

VITOR CAMARGO DO NASCIMENTO JUNIOR

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA
TOLERANTES À SECA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Cássio Egidio Cavenaghi
Prete
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Adonis Moreira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Antonio Eduardo Pípolo
EMBRAPA Soja

Dra. Diva de Souza Andrade
Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR

Prof. Dr. Marcelo Augusto de Aguiar e Silva
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Claudemir Zucareli
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 22 de fevereiro de 2016

DEDICO

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus que mora em nossos corações.

Aos meus pais, Vítor e Maria Luiza, aos meus irmãos, Silvana e Marcelo, à minha filha Mariana e à Nina Moreira, pelos longos anos de compreensão e apoio incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cássio Egidio Cavenaghi Prete não só pela constante orientação e apoio, mas sobretudo por sua amizade e generosidade.

Ao meu coorientador Dr. Marco Antonio Nogueira pela orientação, apoio, amizade e oportunidade de treinamento e estágio na Embrapa Soja.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia que, com sabedoria e dedicação, tornaram tudo possível.

Aos funcionários do Departamento de Agronomia e do Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, em especial, à secretária Weda Westin.

Aos colaboradores do Laboratório de Fitotecnia e do Laboratório de Solos, em especial ao José Vicentini Neto, ao Idael Jerônimo da Silva, ao João Machado dos Santos, pelos cuidados e apoio na realização dos ensaios em casa de vegetação e pelo apoio durante as análises químicas.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Agronomia pelo apoio e amizade, em especial, à Gisele Aquino, ao Gustavo Freiria, ao Rodrigo Hoshino e à Nátali Maidl.

Aos pesquisadores, colegas e funcionários do Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja pelo apoio e amizade, à Dra. Mariangela Hungria, à Walkyria Neiverth, ao Artur Rondina, ao Amaral Chibeba e, em especial, à Paula Cerezini.

À Embrapa Soja pelo apoio, pela cessão das sementes de soja para o experimento, pelo estágio e pelos materiais, equipamentos e reagentes utilizados nas análises químicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

Também agradeço à Universidade Estadual de Londrina, ao Governo do Paraná e ao povo brasileiro por minha capacitação em uma instituição de ensino pública, gratuita e de qualidade.

“A natureza é o único livro que oferece um conteúdo valioso em todas as suas folhas”.

Johann Wolfgang von Goethe

NASCIMENTO JUNIOR, Vitor Camargo do. **Fixação biológica de nitrogênio em genótipos de soja tolerantes à seca**. 2016. 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 2016.

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) assegura sustentabilidade à cultura da soja (*Glycine max* L. Merr.). Porém, restrições hídricas afetam a eficiência dos processos fisiológicos, incluindo a FBN, o rendimento e o desenvolvimento da planta. O objetivo da pesquisa foi avaliar o desempenho de genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância à seca, quanto a atributos relacionados à FBN, à produção e ao estresse oxidativo. O experimento foi realizado em casa de vegetação em delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 5x2, com cinco repetições, considerando-se cinco genótipos de soja (cv. Jackson, cv. BRS 317, R02-1325, R01-416F e R01-581F) e duas disponibilidades hídricas (80% e 30% da capacidade de campo – CC), com avaliações em três tempos: 10 dias, 22 dias e 42 dias de exposição à seca (30% da CC) entre os estádios de florescimento e enchimento de grãos. As sementes foram inoculadas com inoculante comercial contendo $7,2 \times 10^9$ bactérias de *Bradyrhizobium* spp. por grama. Foram avaliados: teor de ureídeos (folíolos, pecíolos e nódulos); teor de N total, de amônio (NH_4^+) e de nitrato (NO_3^-) nas folhas; atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) nos nódulos, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) nas folhas; peroxidação de lipídios nas folhas e nas raízes; número e massa seca de nódulos; massa específica de nódulos; área foliar; massa seca da parte aérea e das raízes; índice de colheita; número de vagens e de sementes; massa de sementes por planta e massa de mil sementes. A restrição hídrica diminuiu a nodulação e aumentou os ureídeos nos nódulos; reduziu o NH_4^+ e aumentou o NO_3^- nas folhas; não reduziu a atividade da GS nos nódulos da R02-1325 e da cv. Jackson; diminuiu os componentes de rendimento, que se intensificou aos 42 dias de exposição à seca. A produção de sementes diminuiu com a seca, porém a cv. Jackson e a R01-581F foram tolerantes por até 10 dias durante o florescimento; e, a cv. BRS 317 por até 22 dias entre o florescimento e a formação das vagens. A R02-1325 foi mais produtiva em condição úmida (80% da CC); e, quando exposta à seca não foi diferente das mais produtivas. A atividade da SOD e da CAT nas folhas caracterizaram a cv. BRS 317, nos tempos de 10 dias e de 22 dias, e a cv. Jackson aos 42 dias, como sensíveis ao estresse oxidativo. As linhagens R02-1325, R01-416F e R01-581F não indicaram respostas oxidativas às espécies reativas de oxigênio (ERO) medida pela atividade da CAT. A cv. BRS 317, a R02-1325 e a R01-581F foram sensíveis à peroxidação de lipídios nas folhas até 22 dias sob seca; e, nas raízes, a cv. BRS 317, a cv. Jackson e a R02-1325 aos 42 dias sob seca. As linhagens R01-581F e R02-1325 apresentaram potencial para uso em programas de melhoramento genético visando tolerância à seca moderada.

Palavras-chave: *Glycine max*. Déficit hídrico. Espécies reativas de oxigênio. Nitrogênio. Nódulos.

NASCIMENTO JUNIOR, Vitor Camargo do. **Biological nitrogen fixation in soybean genotypes tolerant to drought**. 2016. 118 p. Thesis (Doctorate in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina, Paraná, 2016.

ABSTRACT

The biological nitrogen fixation (BNF) process is pivotal to the sustainability of soybean crop (*Glycine max* L. Merr.). However, drought may negatively affect the plant development, the efficiency of physiological processes, including BNF, and crop yield. The objective of this work was to evaluate the performance of soybean genotypes contrasting in BNF tolerance to drought concerning to BNF attributes, yield components and oxidative stress-related enzyme activities. The trial was carried out in greenhouse, in a randomized block design and 5 x 2 factorial arrangements, with five replications, considering five soybean genotypes (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F and R01-581F) and two levels of water availability (80% and 30% of field capacity - FC), assessed in three times up to 10 days, 22 days and 42 days of exposure to drought (30% FC) between flowering and grain filling stages. The seeds were inoculated with commercial inoculant containing 7.2×10^9 bacteria of *Bradyrhizobium* spp. per gram. The assessed variables were: concentration of ureides in folioles, petioles and nodules; concentration of total N, ammonium (NH_4^+) and nitrate (NO_3^-) in leaves; specific activity of the enzyme glutamine synthetase (GS) in nodules, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in leaves; lipid peroxidation in leaves and roots; number and dry weight of nodules; specific mass of nodules; leaf area; dry mass of shoots and roots; harvest index; number of pods and seeds; seed mass per plant and mass of thousand seeds. The water restriction reduced nodulation and increased ureides in nodules; it reduced the NH_4^+ and increased NO_3^- in leaves; it did not reduce the GS activity in nodules in R02-1325 and cv. Jackson; and it decreased yield components it intensified after 42 days of drought exposure. Seed production decreased with drought, but cv. Jackson and R01-581F showed better performance when exposed to 10 days of drought; whereas cv. BRS 317 did up to 22 days. The line R02-1325 had higher yields under 80% of FC; when exposed to drought did not differ from the most productive genotypes. The increased in activity of SOD and CAT in leaves characterized the cv. BRS 317 up to 10 days and 22 days, and the cv. Jackson up to 42 days, as sensitive to reactive oxygen species (ROS). Lines R02-1325, R01-416F and R01-581F did not show oxidative responses to ROS based on the CAT activity. The genotypes cv. BRS 317, R02-1325 and R01-581F were sensitive to lipid peroxidation in leaves up to 22 days; whereas cv. BRS 317, cv. Jackson and R02-1325 in roots up to 42 days under drought. The lines R01-581F and R02-1325 showed best performance and promising potential for breeding programs aiming at tolerance to moderate drought.

Key words: *Glycine max*. Nitrogen. Nodulation. Reactive oxygen species. Water deficit.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 3.1** – Número e massa de nódulos, teor de ureídeos (folíolos, pecíolos e nódulos), teor de N nas folhas e massa de sementes por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F), expostos à condição úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) por 10 dias entre os estádios de florescimento R_1 e R_249
- Figura 3.2** – Número e massa de nódulos, teor de ureídeos (folíolos, pecíolos e nódulos), teor de N nas folhas e massa de sementes por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F), expostos à condição úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) por 22 dias entre os estádios de florescimento (R_1) e formação de vagens (R_4).....51
- Figura 3.3** – Número e massa de nódulos, teor de ureídeos (folíolos, pecíolos e nódulos), teor de N nas folhas e massa de sementes por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F), expostos à condição úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) por 42 dias entre os estádios reprodutivos de florescimento (R_1) e enchimento de grãos (R_6).....53
- Figura 3.4** – Valores relativos de número (A), massa (B) e massa específica (C) de nódulos de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, linhagens R02-1325, R01-416F e R01-581F) obtido na condição de seca (30% da CC) em relação à condição úmida (80% da CC) aos 10 (R_2), 22 (R_4) e 42 (R_6) dias de exposição à restrição hídrica a partir do estádio R_1 54
- Figura 4.1** – Porcentagem de redução média do (A) n° de vagens, n° de sementes e massa de sementes e da (B) massa de sementes, massa seca da parte aérea (MSPA) e área foliar (AF) dos genótipos de soja cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F sob seca (30% da capacidade de campo - CC), comparados à condição úmida (80% da CC), nos tempos de 10 dias até o estádio R_2 , 22 dias até R_4 e 42 dias até R_6 72
- Figura 5.1** – Condutância estomática (A) e temperatura foliar (B) na parte aérea de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos às condição úmida (80% da capacidade de campo - CC) e de seca (30% da CC) por até 42 dias durante os estádios florescimento e enchimento de grãos90

- Figura 5.2** – Concentração de amônio (NH_4^+) em folhas de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R_2 , por (B) 22 dias até R_4 e por (C) 42 dias até R_692
- Figura 5.3** – Concentração de nitrato (NO_3^-) em folhas de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R_2 , por (B) 22 dias até R_4 e por (C) 42 dias até R_693
- Figura 5.4** – Atividade específica da enzima glutamina sintetase (GS) em nódulos de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R_2 , por (B) 22 dias até R_4 e por (C) 42 dias até R_6 95
- Figura 5.5** – Atividade específica da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R_2 , por (B) 22 dias até R_4 e por (C) 42 dias até R_6 97
- Figura 5.6** – Atividade específica da enzima catalase (CAT) em folhas de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R_2 , por (B) 22 dias até R_4 e por (C) 42 dias até R_6 98
- Figura 5.7** – Peroxidação de lipídios em folhas de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R_2 , por (B) 22 dias até R_4 e por (C) 42 dias até R_6100
- Figura 5.8** – Peroxidação de lipídios em raízes de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R_2 , por (B) 22 dias até R_4 e por (C) 42 dias até R_6101

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1** – Resultados da análise química de um substrato contendo terra argilosa e areia na proporção 3:144
- Tabela 3.2** – Determinações realizadas no substrato e na parte aérea de plantas de soja (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostas à condição úmida (80% da CC) ou de seca (30% da CC) nos tempos de 10 dias, 22 dias e 42 dias entre os estádios R₁ e R₆.....47
- Tabela 4.1** – Resultados da análise química de um substrato contendo terra argilosa e areia da proporção 3:1 (terra:areia).....61
- Tabela 4.2** – Temperatura foliar e condutância estomática na parte aérea de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca, expostos à condição úmida (80% da CC) ou seca (30% da CC) durante o tempo de 42 dias entre os estádios de florescimento e enchimento dos grãos.....64
- Tabela 4.3** – Área foliar (cm²) por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca, expostos à condição úmida (80% CC) ou seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R₁ e R₂, pelos tempos de 10 dias até o estádio R₂, 22 dias até R₄ e 42 dias até R₆65
- Tabela 4.4** – Massa seca da parte aérea (g) por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca, expostos à condição úmida (80% CC) ou seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R₁ e R₂, pelos tempos de 10 dias até o estádio R₂, 22 dias até R₄ e 42 dias até R₆65
- Tabela 4.5** – Massa seca de raízes (g) por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca, expostos à condição úmida (80% CC) ou seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R₁ e R₂, pelos tempos de 10 dias até o estádio R₂, 22 dias até R₄ e 42 dias até R₆67

Tabela 4.6 – Número de vagens por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca, expostos à condição úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R ₁ e R ₂ , pelos tempos de 10 dias até o estágio R ₂ , 22 dias até R ₄ e 42 dias até R ₆	67
Tabela 4.7 – Número de sementes por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância à seca, expostos à condição úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R ₁ e R ₂ , pelos tempos de 10 dias até o estágio R ₂ , 22 dias até R ₄ e 42 dias até R ₆	68
Tabela 4.8 – Massa de sementes (g) por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância à seca, expostos à condição úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R ₁ e R ₂ , pelos tempos de 10 dias até o estágio R ₂ , 22 dias até R ₄ e 42 dias até R ₆	69
Tabela 4.9 – Massa de 1000 sementes (g) de genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância à seca, expostos à condição hídrica úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R ₁ e R ₂ , pelos tempos de 10 dias até o estágio R ₂ , 22 dias até R ₄ e 42 dias até R ₆	71
Tabela 5.1 – Resultados da análise química de um substrato contendo terra argilosa e areia na proporção 3:1	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Agricultura de baixa emissão de carbono
APX	Ascorbato peroxidase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CC	Capacidade de campo
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COP	Conferência das Partes
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FBN	Fixação Biológica do Nitrogênio
GOGAT	Glutamato sintase
GS	Glutamina sintetase
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
MDA	Malonaldeído
NBT	Nitroblue tetrazolium chloride
POX	Peroxidase
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
SS	Sacarose sintase
UEL	Universidade Estadual de Londrina
USDA	United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	ORIGEM E EXPANSÃO DA SOJA.....	18
2.2	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA SOJA E OS RISCOS CLIMÁTICOS	20
2.3	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA.....	22
2.4	NITROGÊNIO E IMPORTÂNCIA DA FBN.....	26
2.5	RESTRIÇÃO HÍDRICA EM SOJA	29
2.6	INTERAÇÃO ENTRE FATORES DE ESTRESSE E A FBN	31
2.7	FISIOLOGIA DO ESTRESSE HÍDRICO EM SOJA	34
3	ARTIGO A: DÉFICIT HÍDRICO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA COM DIFERENTES NÍVEIS DE TOLERÂNCIA À SECA	39
3.1	RESUMO	39
3.2	ABSTRACT.....	39
3.3	INTRODUÇÃO	40
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.6	CONCLUSÕES.....	54
4	ARTIGO B: COMPONENTES DE PRODUÇÃO EM GENÓTIPOS DE SOJA COM DIFERENTES NÍVEIS DE TOLERÂNCIA À SECA	56
4.1	RESUMO	56
4.2	ABSTRACT.....	56
4.3	INTRODUÇÃO	57
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.6	CONCLUSÕES.....	72

5	ARTIGO C: ESTRESSE OXIDATIVO E ENZIMA ASSIMILATÓRIAS DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA COM DIFERENTES NÍVEIS DE TOLERÂNCIA À SECA	74
5.1	RESUMO	74
5.2	ABSTRACT.....	75
5.3	INTRODUÇÃO	75
5.4	MATERIAL E MÉTODOS	79
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
5.6	CONCLUSÕES.....	102
6	CONCLUSÕES GERAIS	104
	REFERÊNCIAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo de extrema importância para a sustentabilidade econômica e ambiental dos sistemas de produção de soja (*Glycine max* L. Merrill). No entanto, eventos climáticos extremos, como altas temperaturas e estresses hídricos limitam o desenvolvimento da planta e são os principais fatores abióticos desfavoráveis à nodulação nas raízes, o que afeta negativamente todas as fases da simbiose bactéria-planta, além de limitar o crescimento e a sobrevivência dos organismos microsimbiontes no solo.

A condição de seca, ou seja, a exposição de plantas à restrição hídrica por determinados períodos, promove a queda da produtividade em soja, já que seus reflexos interferem no processo da FBN, que é realizado no interior dos nódulos pelo complexo protéico da nitrogenase, primeiro processo a ser prejudicado, antes mesmo da fotossíntese ou da respiração. Conseqüentemente, períodos de exposição à seca diminuem o acúmulo de biomassa da planta e o rendimento de sementes, principalmente quando ocorre nos estádios mais críticos para a cultura, entre o florescimento e o enchimento de grãos.

A sensibilidade do processo de FBN à seca varia entre os genótipos de soja. O acúmulo de ureídos na região foliar e nos nódulos pode estar associado aos genótipos de soja sensíveis à seca. Conseqüentemente, a degradação dos ureídos em folhas pode aumentar a tolerância à restrição hídrica. Igualmente, genótipos tolerantes à seca apresentam maior número de nódulos grandes, com maior conteúdo relativo de água e maior fixação de N₂, do que genótipos cujos nódulos são menores.

Para minimizar os efeitos negativos da restrição hídrica, práticas adequadas de manejo do solo, entre outras abordagens, como a utilização de genótipos com tolerância à seca, podem manter a eficiência da FBN por determinados períodos. Com esse intuito, as linhagens americanas R02-1325, R01-416F e R01-581F foram desenvolvidas e caracterizadas como FBN tolerantes à seca, além de apresentarem alto potencial produtivo. Essas linhagens são resultantes do cruzamento entre a cultivar de soja Jackson, FBN tolerante à seca, e cultivares de alto rendimento.

Contudo, períodos de seca podem promover alterações na planta e a antecipação de sua senescência. Nessas condições, ocorrem aumentos das

espécies reativas de oxigênio (ERO), que são produzidas durante o metabolismo aeróbico, pela interação de O₂ e elétrons provenientes da cadeia de transporte dos cloroplastos e das mitocôndrias, como a peroxidação lipídica das membranas, que é um dos eventos mais significativos do estresse oxidativo. Os danos provocados podem ser evitados por sistemas antioxidativos em plantas superiores, como as enzimas superóxido dismutase e a catalase.

A partir do desenvolvimento de linhagens de soja com características de tolerância à seca, surge a necessidade de estudos específicos para se identificar mais precisamente os fatores envolvidos na diminuição da FBN em condição de déficit hídrico, pois os efeitos da restrição hídrica sobre a FBN e sobre o rendimento da cultura dependem de sua duração e intensidade. Nesse sentido, linhagens selecionadas com características desejáveis podem ser usadas em estudos fisiológicos para a investigação da base de sua tolerância à seca, inclusive na indicação para a criação de esforços para incorporar essas características em germoplasmas comerciais.

Assim, variedades e linhagens de soja com características de tolerância ou sensibilidade à seca em relação à fixação biológica de nitrogênio, podem ter essas características identificadas, quando expostas à restrição hídrica em diferentes tempos cumulativos entre os estádios reprodutivos de florescimento e de enchimento dos grãos.

Pontanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho de genótipos de soja que apresentam diferentes níveis de tolerância à seca, expostos ou não à restrição hídrica aplicada em períodos reprodutivos da cultura; com avaliações em atributos relacionados à fixação biológica de nitrogênio, aos componentes de produção e ao estresse oxidativo gerado pelo déficit hídrico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORIGEM E EXPANSÃO DA SOJA

A soja é uma planta leguminosa pertencente à família *Fabaceae* (*Leguminosae*), ao gênero *Glycine* e a espécie *Glycine max* (L) Merrill (CASTRO; BERGAMIN; CANCIAN, 1999; SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009). A planta de soja hoje apresenta características muito diferentes de seus ancestrais, que eram rasteiras e se desenvolviam próximo à costa leste da Ásia. A evolução da espécie ocorreu naturalmente por meio de cruzamentos entre plantas selvagens, que posteriormente foram domesticadas e melhoradas por cientistas da China antiga (EMBRAPA, 2004).

A história da origem da soja é um tanto quanto controversa, porém algumas evidências indicam que a planta foi domesticada no século XI a.C., provavelmente ao norte da China, no Vale do Rio Amarelo, berço da civilização chinesa e possível local de sua origem. Antigas referências à soja remetem ao Livro de Odes (antologia de poesias chinesas simples e realistas da vida camponesa e cortesã), que cobre o período entre os séculos XII e XI a.C., em que a palavra *Shu* era apresentada para designar a soja, o que evidencia a possível domesticação da planta durante a dinastia *Shang*, entre os anos de 1500 e 1027 a.C. (QIU; CHANG, 2010).

Entretanto, a referência mais antiga encontrada na literatura sobre a soja foi em um livro de medicina intitulado *Pen-Ts'ao Kang-Mu* (Matéria Médica), escrito pelo Imperador *Shen Nung* entre os anos de 2883 a.C. a 2838 a.C, período em que a soja era considerada um dos cinco grãos sagrados, juntamente com o arroz, o trigo, a cevada e o milheto. Era grande a sua importância para a antiga civilização chinesa, tanto que era celebrada com cerimoniais ritualísticos na época da semeadura e da colheita por imperadores e poetas chineses, que exaltavam as suas virtudes nos serviços à humanidade (BONATO; BONATO, 1987; EMBRAPA, 2004; SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009; QIU; CHANG, 2010).

A partir de registros antigos, sabe-se que a soja expandiu as suas fronteiras lentamente, do norte para o sul da China, como também para o sudeste da Ásia, chegando à Coréia, e desta ao Japão entre os períodos de 200 a.C. e o século

III d.C.; porém, até 1894 a produção de soja ficou praticamente restrita à China (PROBST; JUDD, 1973; EMBRAPA, 2004).

Na Europa, a soja tornou-se conhecida a partir de 1739, ocasião em que foi plantada no Jardim Botânico de Paris (França); e, somente em 1875, teve início uma grande campanha visando o cultivo da soja no continente europeu. (SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009).

Em 1765, a soja foi cultivada no Estado da Pensilvânia, e pela primeira vez citada nos Estados Unidos da América (EUA). A partir de 1880, a soja adquiriu importância como planta forrageira, e em 1915, foi pela primeira vez esmagada para extração do óleo para consumo humano naquele país. Em 1920, a área destinada à produção de grãos era de 76 mil hectares (ha) e a destinada à produção de forragem, pastagem e silagem chegava a 300 mil ha (PROBST; JUDD, 1973; BONATO; BONATO, 1987; HYMOWITZ, 1990; LANGE, 2008; SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009). Em 1940, no auge do seu cultivo como forrageira, foram cultivados nos EUA cerca de dois milhões de hectares de soja para a alimentação animal (EMBRAPA, 2004).

A soja chegou ao Brasil, via Estados Unidos, em 1882. Gustavo D'Utra, professor da Escola de Agronomia da Bahia, realizou os primeiros estudos de avaliação de genótipos da espécie. No entanto, os genótipos vindos da América do Norte não apresentaram boa adaptação numa latitude em torno de 12° S (FREIRE; VERNETTI, 1999; EMBRAPA, 2004; SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009). Em 1891, genótipos de soja foram introduzidos na cidade de Campinas, SP, cujo desenvolvimento foi melhor numa latitude de 22°54' S. Nessa cidade, as primeiras observações foram feitas por Daffert, em 1892; e, em 1900 e 1901, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) promoveu a primeira distribuição de sementes de soja para produtores paulistas (BONATO; BONATO, 1987).

Em 1914, tem-se registro do primeiro cultivo de soja no Rio Grande do Sul, introduzida pelo professor Craig, da atual Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde a cultura encontrou condições para se desenvolver e se expandir dadas as semelhanças climáticas do agroecossistema de origem dos genótipos da região sul dos EUA (BONATO; BONATO, 1987; FREIRE; VERNETTI, 1999; SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009). Inicialmente, foi produzida comercialmente no Brasil nas regiões das missões, principalmente no município de Santa Rosa, RS, considerado o berço nacional da soja. A leguminosa era utilizada

para a alimentação de suínos, como fonte de proteína para complementar a dieta à base de milho, abóbora e mandioca; e, também, utilizada como adubação verde (BONATO; BONATO, 1987). Contudo, a partir de 1941, a área cultivada para grãos superou a cultivada para forragem, cujo cultivo declinou rapidamente, até desaparecer em meados dos anos de 1960, enquanto a área cultivada para a produção de grãos crescia de forma exponencial (EMBRAPA, 2004; SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009).

A soja foi introduzida no Estado do Paraná no ano de 1939, primeiramente no Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuária do Sul, Estação Experimental de Curitiba, do então Ministério da Agricultura. A cultura foi trazida pelos agricultores gaúchos que emigraram para o sudeste e depois para o oeste do Estado. Na região dos Campos Gerais, sua produção cresceu à medida que passou a ocupar as áreas de arroz de sequeiro. No norte e nordeste do Estado, a cultura surgiu como decorrência dos efeitos das geadas de 1953 e 1955, que destruíram os cafezais, levando os agricultores, primeiramente, ao plantio de cereais como cultura intercalar e, devido às dificuldades de transporte e comercialização dessa produção, ao cultivo da soja, cuja colocação era garantida, tanto no mercado interno como externo a preços compensadores (KASTER; QUEIROZ; TERASAWA, 1981; VERNETTI, 1983; SILVA, 1981; FREIRE; VERNETTI, 1999; STOLF, 2005; SANTOS, 2009).

Devido à sua facilidade de cultivo e colheita, a soja foi introduzida como cultura ideal para fazer a rotação com o trigo, utilizando-se, praticamente, os mesmos equipamentos. Dessa forma, a produção brasileira, que participava com 0,5% da produção mundial em 1954, passou a 16% em 1976. A partir do Estado do Rio Grande do Sul, a soja se expandiu para o restante do país, primeiro para Santa Catarina, depois para o Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Centro-Oeste. Na atualidade, devido às pesquisas e ao melhoramento genético, a soja é cultivada em praticamente todo o território nacional, como o principal produto agrícola brasileiro (EMBRAPA, 2004).

2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA SOJA E OS RISCOS CLIMÁTICOS

A soja é uma *commodity*. É uma mercadoria de base em estado bruto (matéria prima), com grande importância internacional, e comercializada em

bolsas de mercadorias específicas. O seu preço é muito volátil em razão de diversas variáveis, inclusive especulativas (SILVA; SAFADI; CASTRO JUNIOR, 2005; DEL CORSO; SILVA; DUCLÓS, 2006; CORONEL; MACHADO; CARVALHO, 2009).

No entanto, uma das atividades econômicas do agronegócio que apresentou maior crescimento nos últimos anos foi o da produção de soja. Atribui-se a isso, entre outros fatores, a consolidação do grão como fonte de proteína vegetal importante, com grandes demandas a partir dos setores da produção animal (LAZZAROTTO; HIRAKURI, 2009). Nesse contexto, o Brasil possui significativa participação na oferta do produto ao mercado. Conforme estimativa de dezembro de 2015, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, o Brasil participa com 31,25% da produção e 44,15% das exportações mundiais de soja em grãos (USDA, 2015).

O complexo agroindustrial da soja foi responsável em 2014 por um saldo positivo na balança do agronegócio acima de 30 bilhões de dólares, e participou com cerca de 35% do total. O Brasil exportou produtos do complexo soja, de janeiro a novembro de 2015, aproximadamente, 68 milhões de toneladas, cerca de 10% a mais que em 2014, cujos principais países importadores são, China, Holanda, Tailândia, Espanha, França, Indonésia, Coreia do Sul, Alemanha, Vietnã e Irã (CONAB, 2015).

A soja se consolidou como a principal cultura do agronegócio brasileiro e destaca o país como segundo maior produtor mundial do grão. Porém, em alguns anos agrícolas, adversidades climáticas como o déficit hídrico provocam quedas na produção. Conforme levantamento divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento, a safra de 2011/12 sofreu redução na produção em 11,9%, passando de 75,32 milhões de toneladas em 2010/11 para 66,37 milhões, com 24,18 milhões de hectares de área plantada. A redução foi motivada por períodos de seca ocorridos, principalmente, no sul do país. No entanto, nas safras seguintes não ocorreram restrições hídricas, e com o aumento da área plantada para 32,09 milhões de hectares, a produção de 2014/15 foi de 96,24 milhões de toneladas, com previsão recorde para 2015/16 ultrapassando cem milhões de toneladas (CONAB, 2015).

As condições climáticas adversas causadas pelo fenômeno La Niña foram os responsáveis pelo resultado negativo da safra 2011/12. O longo período de estiagem causou perdas significativas às lavouras em alguns dos principais estados

produtores, sobretudo ao Rio Grande do Sul, com perdas de 43,8%, seguido pelo Paraná com redução de 29% e Mato Grosso do Sul, com perda de 10,5%. Na região Centro-Oeste as condições climáticas foram mais favoráveis e apresentaram crescimento na produção (CONAB, 2015).

As previsões para a safra de soja 2015/16 são promissoras, com uma área total de 33,19 milhões de hectares, deve alcançar 102,46 milhões de toneladas e produtividade média de 3087 kg ha⁻¹. Cultivada em todas as regiões do Brasil, a soja tem sua principal região produtora no Centro-Oeste, com 45,37% sobre o total da área cultivada com soja no território nacional e 45,71% sobre o total de grãos de soja produzidos, com produtividade estimada em 3119 kg ha⁻¹. Em segundo, a região Sul participa com 34,02% sobre a área total ocupada e 34,40% sobre a produção nacional do grão, com produtividade média de 3122 kg ha⁻¹. O Estado do Paraná, segundo maior produtor nacional, contribui com 16,18% sobre a área plantada e 17,96% sobre a produção de soja do país, com produtividade média de 3416 kg ha⁻¹. O maior produtor nacional é o Mato Grosso, com área ocupada de 27,54%, produção correspondente a 28,37% e produtividade de 3179 kg ha⁻¹. O Rio Grande do Sul, estado que mais sofreu com o período de déficit hídrico em 2011/12, com produtividade de 1555 kg ha⁻¹, é o terceiro maior produtor nacional, com produtividade prevista em 2015/16 de 2800 kg ha⁻¹ e produção de 14,77 milhões de toneladas (CONAB, 2015).

2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA

O sucesso da soja no Brasil está associado parcialmente à eficiência de bactérias específicas fixadoras de nitrogênio molecular (N₂), quando em simbiose com a planta (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). Esse sucesso foi possível por meio de pesquisas entre microbiologistas e melhoristas de plantas, tornando o Brasil líder mundial na substituição de fertilizantes nitrogenados por uma tecnologia sustentável, com consequentes vantagens econômicas, sociais e ambientais ao país (DÖBEREINER, 1997).

O ar atmosférico é constituído por aproximadamente 78% de N₂, muito abundante, porém pouco reativo. O N₂ possui uma ligação tripla covalente de excepcional estabilidade entre os dois átomos de nitrogênio (N≡N), o que não permite que seja assimilado pela grande maioria dos organismos. Entretanto, ele

pode ser fixado por processos industriais, com alto consumo de energia, como ocorre com o processo Haber-Bosch. Contudo, é possível por processos biológicos obter a fixação do N_2 por meio de microrganismos específicos denominados diazotróficos (TAIZ; ZEIGER, 2013), que incluem alguns gêneros de bactérias, cianobactérias e actinobactérias (FINOTO; SEDIYAMA; BARROS, 2009).

O Nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura da soja, considerando-se o alto teor de proteína no grão, cerca de 40%. Para se produzir 1.000 kg de grãos, a cultura demanda cerca de 80 kg de N durante o seu ciclo dos quais 65 kg estão contidos no grão e 15 kg nos restos culturais (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). Finoto, Sedyama e Barros (2009) relatam que a cultura da soja tem potencial de fixar pelas bactérias simbiotes até 450 kg ha^{-1} de N, para uma produtividade de 5.400 kg ha^{-1} . Também, Zilli et al. (2008) verificaram o rendimento de grãos de 3.680 kg ha^{-1} e acúmulo de N em grãos de soja de 210,9 kg ha^{-1} com sementes inoculadas, contra 3.218 kg ha^{-1} e 180,3 kg ha^{-1} , respectivamente, para tratamento com aplicação de 200 kg ha^{-1} de N mineral. Portanto, a cultura é favorecida economicamente pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), que também melhora a qualidade do solo sem poluir o ambiente, principalmente, se aliada a sistemas de manejo que promovam o aumento de matéria orgânica e que mantenham a umidade do solo adequada, tais como: rotação de culturas, cultivo mínimo, adubação verde e sistema de plantio direto (CAMPOS; HUNGRIA; TEDESCO, 2001).

No início de seu desenvolvimento, a planta de soja utiliza o N acumulado nos cotilédones, além do nitrato (NO_3^-) do solo. Após a formação inicial de um conjunto adequado de nódulos nas raízes, inicia-se o processo biológico de fixação de N, que alcança o seu máximo no estágio de florescimento pleno (R_2). As máximas taxas de fixação de N ocorrem no final do florescimento e durante o enchimento de grãos. O N assimilado entre o desenvolvimento da vagem (R_3) e o começo da maturação (R_7) é a fonte predominante de N para as sementes (FEHR; CAVINESS, 1977; ZAPATA et al., 1987).

O processo da FBN é similar ao da fixação industrial do N_2 , em que ocorre a formação da amônia (NH_3) a partir do N_2 . Na FBN a reação geral é: $N_2 + 8 e^- + 8 H^+ + 16 ATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$. As bactérias que fixam o N_2 possuem um complexo enzimático chamado de nitrogenase, que é responsável pela catalisação dessa reação bioquímica, formado por um complexo enzimático: a Fe-

proteína e a MoFe-proteína (NUNES; RAIMONDI; NIEDWIESKI, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Bactérias específicas do gênero *Bradyrhizobium*, ao entrar em contato com as raízes, infectam os pelos radiculares, com consequente formação de nódulos. A relação simbiótica mais importante com a soja ocorre com as espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* (VARGAS; HUNGRIA, 1997; ZILLI et al., 2006), em que as mais recomendadas, e comercializadas em inoculantes líquidos ou turfosos, são as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019, pertencentes à espécie *B. elkanii*, e as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080, pertencentes à espécie *B. japonicum* (CHUEIRE et al., 2003), tendo sido a SEMIA 5080 reclassificada como *B. diazoefficiens* (DELAMUTA et al., 2013). Essas estirpes podem ser utilizadas individualmente ou combinadas duas a duas, a critério do fabricante de inoculantes (ZILLI et al., 2009).

Estabelecida a simbiose, a planta passa a fornecer os fotoassimilados (carbono orgânico e nutrientes) às bactérias; e, em contrapartida, a planta passa a receber produtos nitrogenados, como aminoácidos e ureídos provenientes da FBN (FINOTO; SEDIYAMA; BARROS, 2009).

A formação dos nódulos é o resultado de um processo complexo, que envolve diversas etapas. Os nódulos se desenvolvem nas raízes por intermédio de bactérias inoculadas na semente e presentes no solo. Por meio de estímulos causados por substâncias orgânicas exsudadas pelas raízes, as bactérias se multiplicam na rizosfera da planta. Em contato com os pelos radiculares, ocorre a adesão dessas bactérias à epiderme dos pelos absorventes. Sinais moleculares são estabelecidos entre a bactéria por meio dos genes de nodulação, e pela planta hospedeira por intermédio dos genes nodulinos. Esses sinais têm relação com as substâncias bioquímicas exsudadas pelas raízes, como compostos fenólicos (flavonóides), que ativam os genes da nodulação na bactéria, determinando a infecção radicular e a formação dos nódulos (HUNGRIA; VARGAS; CAMPO, 1997; VARGAS; HUNGRIA, 1997; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001; FAGAN et al., 2007; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Na sequência, há a invaginação da parede celular dos pelos colonizados pelas bactérias, desenvolvendo-se uma estrutura chamada de cordão de infecção, que penetra as células da epiderme das raízes. As bactérias multiplicam-se no interior dos cordões de infecção, que continuam infectando as células, transpassando as camadas iniciais do parênquima cortical, até atingir a

endoderme ou camadas mais profundas, como o periciclo da raiz. No parênquima cortical, com a presença do cordão de infecção, células tetraplóides multiplicam-se e surgem os primórdios do nódulo. Reguladores de crescimento, como auxinas e citocininas, agem nas células tetraplóides, modificando-as em meristemas, formando nódulos cujo interior é ocupado por células bacterianas com formato distinto do original, denominados bacteróides, abrigadas em envelopes membranosos (HUNGRIA; VARGAS; CAMPO, 1997; FINOTO; SEDIYAMA; BARROS, 2009).

Quando ativos, os nódulos apresentam coloração rósea avermelhada em seu interior, indicando a atividade da leghemoglobina, cuja função é regular a difusão do oxigênio (O_2) para o interior dos nódulos. Essa proteína é formada apenas no nódulo, no qual a planta hospedeira produz a porção globina, em resposta à infecção pela bactéria; enquanto que as bactérias simbiotes produzem a porção heme (APPLEBY, 1984; HUNGRIA; VARGAS; CAMPO, 1997; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001; SILVEIRA; COSTA; OLIVEIRA, 2001). Apesar de as bactérias serem aeróbias, o processo de fixação de nitrogênio ocorre em anaerobiose, pois o oxigênio oxida e danifica a nitrogenase (DIXON; WHEELER, 1986).

Os nódulos concentram-se principalmente na coroa da raiz, região situada a cerca de um a três centímetros abaixo do colo da planta, da qual saem as principais ramificações radiculares. A nodulação primária ocorre nessa região e predomina sobre a nodulação das raízes secundárias (HUNGRIA; BOHRER, 2000; ZILLI et al., 2008). Os nódulos tornam-se evidentes entre 10 e 15 dias após a emergência, a partir dos estádios vegetativos V_1 e V_2 , dependendo da cultivar de soja e das estirpes de bactérias, além da influência das condições do ambiente e do manejo do solo da cultura (HUNGRIA; VARGAS; CAMPO, 1997; ARAUJO; HUNGRIA, 1999; FINOTO; SEDIYAMA; BARROS, 2009).

Os nódulos funcionais e ativos apresentam superfície rugosa na área externa e coloração avermelhada na parte interna. Um nódulo tem duração média de 6 a 8 semanas, mas pode chegar até 13 semanas. Os nódulos no sistema radicular estão em constante renovação e em formação durante o ciclo da soja. Porém, a nodulação máxima ocorre na fase reprodutiva, entre os estádios R_2 e R_5 . É nesse período que a soja tem maior necessidade de nutrientes e demais fatores geradores da produção (FINOTO; SEDIYAMA; BARROS, 2009). No entanto, a quantidade de biomassa e o número de nódulos por sistema radicular diferem de

planta para planta, mudando em função das diversas variáveis envolvidas no cultivo da soja, principalmente quando expostos ao estresse hídrico (PURCELL et al., 2004; VIANA, 2007).

O eficiente sistema vascular no interior do nódulo supre as bactérias fixadoras com produtos elaborados nas folhas pela fotossíntese. Em contrapartida, os bacteróides fixam o N_2 por meio da enzima nitrogenase (complexo nitrogenase), reduzindo-o à amônia (NH_3), processo chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Em seguida, a amônia fixada é assimilada na forma de ureídeos (alantoína, ácido alantóico e citrulina). Estes têm sua origem intermediada pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e pela glutamato sintase (GOGAT). Aproximadamente 90% do N presente na seiva do xilema da soja são translocados na forma de ureídeos em direção à parte aérea da planta (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Para a atividade da FBN, os bacteróides precisam dos fotoassimilados desdobrados na presença de O_2 para formar o ATP que gera poder redutor para reduzir o N_2 a NH_3 por meio da nitrogenase, e de um sistema doador de elétrons. Os elétrons provenientes do desdobramento dos fotoassimilados passam pela ferridoxina antes de chegar à nitrogenase, constituída pelos componentes molibdo-ferro-proteína e ferropoteína, formando o complexo nitrogenase. Os dois juntos catalisam a redução do N_2 a NH_3 . Por fim, a amônia é incorporada em compostos orgânicos, iniciando-se a formação de ureídeos que, por meio da transaminação, servem de base para a síntese de aminoácidos e outros compostos nitrogenados (VARGAS; HUNGRIA, 1997; SANJUÁN-PINILLA, 2001; TAIZ, ZEIGER, 2013).

2.4 NITROGÊNIO E IMPORTÂNCIA DA FBN

O nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4^+) são as principais formas de absorção de N pelas plantas. Quando a concentração externa de NH_4^+ é baixa, esse íon é absorvido pelas raízes através do processo ativo e, por processo passivo quando é encontrado em altas concentrações. O processo ativo é intermediado por uma proteína transportadora localizada na membrana celular. Após a absorção, o íon é rapidamente assimilado na forma orgânica, porque o acúmulo de NH_4^+ pode atingir níveis tóxicos, podendo levar as plantas à morte; porém, as concentrações toleradas variam entre as espécies (MATTISON; SCHJOERRING, 2002;

HEINRICHS et al., 2006; TAIZ; ZEIGER, 2013).

O NO_3^- , ao contrário do NH_4^+ , é absorvido pelas raízes apenas por processo ativo por transportadores na membrana celular. O NO_3^- absorvido nas células das raízes pode ser armazenado temporariamente no vacúolo ou reduzido a NH_4^+ , que nesse caso é usado para síntese de glutamina e asparagina, as quais podem ser transportadas às folhas pelo fluxo transpiratório nos vasos do xilema. Em várias espécies, quando a capacidade de assimilação do NO_3^- pelas raízes está saturada, o NH_4^+ liberado dos tecidos radiculares aos vasos do xilema é carregado pelo fluxo transpiratório aos tecidos foliares (HELDT, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2013).

A soja demanda grandes quantidades de N. No Brasil, essa demanda é preferencialmente garantida pela FBN. O N fertilizante é mais facilmente absorvido pela soja, porque já está em uma forma prontamente disponível, ao passo que, no caso do processo biológico, a planta precisa investir um gasto energético inicial na formação dos nódulos. Observa-se que, a partir de 10 a 12 dias após a emergência das plantas de soja, as folhas apresentam coloração verde clara, semelhante ao sintoma de deficiência de N. Nessa fase, as reservas das sementes são investidas em grande parte na formação dos nódulos. Esse fato poderia sugerir a aplicação de uma dose inicial de N mineral, supostamente para promover um maior desenvolvimento inicial. No entanto, a adição de dose inicial de N foi testada por pesquisadores no Brasil e, na presença de um inoculante eficaz e eficiente, é raro ocorrer qualquer efeito significativo sobre o rendimento de grãos com doses de até 30 kg ha^{-1} (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

No Brasil, a inoculação com inoculantes na cultura da soja, contendo bactérias diazotróficas eficientes e específicas, proporciona para o Brasil uma economia em fertilizantes minerais nitrogenados de vários bilhões de dólares por ano, que seriam necessários para manter a atual produtividade da cultura. A soja brasileira tornou-se altamente competitiva no mercado mundial, também por não depender da aplicação N mineral (DÖBEREINER, 1997).

Portanto, não há benefício significativo pela adição de fertilizante nitrogenado nos estádios vegetativos iniciais, porque após as duas primeiras semanas, as etapas de nodulação e de fixação do N_2 são intensificadas até o período de formação e de início de enchimento das vagens (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Igualmente, no estágio de enchimento das vagens, as folhas mais

velhas tornam-se amarelas e senescentes, porque o N é translocado para os grãos. Nesse estágio, é possível sugerir que ocorre deficiência de N, e que a aplicação de uma dose de N no final do florescimento aumentaria os rendimentos. Contudo, observa-se uma formação secundária de nódulos após o florescimento e esses nódulos contribuem, substancialmente, para o fornecimento de N para a planta (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003, HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Reis et al. (2002) demonstraram que, sob plantio convencional ou plantio direto, não ocorreram benefícios à produção de grãos com a adição de 30 a 60 kg ha⁻¹ de N como sulfato de amônio no início do estágio de enchimento das vagens.

Para as cultivares brasileiras, desenvolvidas para ter eficiência na simbiose com estirpes de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, a atividade da nitrogenase se prolonga, frequentemente, até o período de enchimento dos grãos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Nishi e Hungria (1996) adicionaram 400 kg ha⁻¹ de N fertilizante em soja inoculada, com aplicações parceladas na semeadura e no florescimento, divididas em 10 doses durante o desenvolvimento da planta, e a produção de grãos foi igual ou menor que nas plantas inoculadas na semeadura e que não receberam N mineral.

O N mineral tem efeito antagônico na FBN em soja. Hungria, Campo e Mendes (2007) relatam que grandes quantidades de N fertilizante levam ao aumento da massa foliar, bem como promovem folhas mais escuras e maiores, com mais massa seca total que as de plantas que contam com a FBN; contudo, apesar de mais N total acumulado, a produção de grãos não foi alterada. Os autores, após vários ensaios conduzidos, concluíram que a complementação com N mineral na semeadura (20 a 40 kg N ha⁻¹), no início do florescimento (R₁) (50 a 100 kg N ha⁻¹), ou no enchimento dos grãos (R₅) (50 kg N ha⁻¹) resulta em decréscimo na nodulação sem trazer benefícios aos rendimentos, tanto em diferentes sistemas de plantio, como em genótipos de diferentes ciclos de maturação.

Além disso, o uso de N mineral pode resultar em perdas de N pelo processo de desnitrificação, além de poluição atmosférica pela volatilização de amônia, que gera gases de efeito estufa como óxido nítrico e óxido nitroso. Já a poluição de reservatórios de água doce ocorre em decorrência da lixiviação do nitrato e o escoamento superficial, que resultam em acúmulo de formas nitrogenadas nos cursos d'água e lençóis subterrâneos, e pode atingir níveis tóxicos a peixes e ao homem. Doenças, como câncer e problemas respiratórios têm sido

associadas ao consumo de águas contaminadas com nitrato em países da Europa. A experiência desses países deve servir para orientar uma política de uso racional de fertilizantes nitrogenados no Brasil, como tem ocorrido nas Conferências das Partes (COP), a última ocorrida em 2015 em Paris (COP21). Uma das metas do Governo Brasileiro, já há alguns anos, por meio do Plano ABC (agricultura de baixa emissão de carbono), é ampliar o uso da FBN na agricultura, visando a redução da emissão de gases de efeito estufa na atmosfera. A FBN, portanto, possibilita a concretização de uma das metas para uma agricultura moderna, com vistas à obtenção de máximas produtividades, com a melhor relação custo/benefício e impacto ambiental mínimo (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001; AMARAL; CORDEIRO; GALENARI, 2011; BRASIL, 2012).

2.5 RESTRIÇÃO HÍDRICA EM SOJA

As moléculas de água (H_2O) no solo estão sujeitas a uma série de forças que determinam o sentido e velocidade de deslocamento. A energia com a qual o solo retém a água é medida em termos de potencial de água (Ψ_w), que tem unidades de pressão, ou energia por unidade de volume, que equivale à força por unidade de área em Megapascal (MPa). O potencial de pressão negativo é chamado de potencial matricial (Ψ_m). Em solos não saturados, o potencial matricial representa a força de adesão da água às partículas do solo. Quanto menor a umidade, mais fortemente a água será retida pela matriz do solo. Cada solo, dependendo de sua textura e porosidade, possui uma curva de retenção característica que relaciona o conteúdo de água e o potencial matricial. Desta forma, a água no solo se move, principalmente, por fluxo de massa, governado por uma gradiente de potencial matricial (LIBARDI, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Manter a umidade em níveis ideais para que a água não fique retida pela matriz do solo, possibilita que a planta de soja complete seu ciclo em condições favoráveis, já que tem em sua massa fresca cerca de 90% de água. Nos processos fisiológicos e bioquímicos, a água atua em praticamente todos, desempenhando a função de solvente, em que gases, minerais e outros solutos entram nas células e movimentam-se pela planta. Outra função importante da água é a de manutenção da temperatura e de distribuição do calor (EMBRAPA, 2013).

As plantas de soja têm o seu consumo de água determinado pela

demanda evaporativa da atmosfera, propriedades do solo e características dos genótipos (CUNHA; BERGAMASCHI, 1992; BERGONCI et al., 2001). As perdas de água por evaporação e por transpiração constituem a evapotranspiração, essencial para estimar a quantidade de água requerida para irrigação (PEREIRA; VILLA NOVA; SEDYAMA, 1997; SILVA et al., 2005). A evapotranspiração máxima acumulada de uma cultura depende do seu ciclo de desenvolvimento, e varia, principalmente, com as características das plantas, duração do ciclo, umidade do solo e condições atmosféricas, com destaque para a radiação solar, a umidade relativa do ar, a velocidade do vento e a temperatura do ar (CALVACHE; REICHARDT; BACCHI, 1998; KUSS, 2006).

Em condição de campo, déficits hídricos prolongados causam mudanças na condição fisiológica na planta, como o fechamento dos estômatos e o enrolamento dos folíolos, causado pela desidratação dos tecidos. Portanto, a redução da transpiração pode provocar a queda prematura das folhas, flores e legumes, gerando diminuição do rendimento da cultura (EMBRAPA, 2013).

A queda de folhas, flores e vagens ocorre pela formação do ácido abscísico (ABA) e, conseqüentemente, pela produção de etileno. Durante períodos de estresse hídrico, o nível de ABA aumenta, causando o fechamento dos estômatos em poucos minutos para diminuir a transpiração foliar. O fechamento estomático ocorre pela perda de solutos das células-guarda, que ficam desidratadas. Essa perda começa quando o ABA produzido nas células do mesófilo atinge os estômatos, desencadeado pelo déficit hídrico (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2013).

O estresse hídrico pode ser causado tanto por déficit quanto por excesso de água no solo, o que afeta o desenvolvimento da planta. A produtividade das plantas é limitada pela água e depende da quantidade disponível desse recurso e da eficiência do seu uso, uma vez que estresses hídricos afetam a fotossíntese e a condutância estomática (THEISEN et al., 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013). Hungria (1994) sugere que o declínio da atividade fixadora do N_2 , em condições de estresse por temperatura elevada ou baixa umidade do solo está relacionado com o decréscimo da capacidade fotossintética da planta hospedeira ou com a queda na eficiência do complexo da nitrogenase.

Os efeitos da deficiência hídrica sobre o rendimento das culturas dependem da intensidade, duração, época de ocorrência e da interação com outros

fatores determinantes da expressão do rendimento final (QUEIROZ et al., 1996). Quando o déficit hídrico ocorre nos primeiros estádios de desenvolvimento vegetativo, a soja se recupera melhor do que outras culturas, porque pode tolerar curtos períodos, tem sistema radicular com profundidade efetiva de 0,40 m e período de florescimento relativamente longo (FARIAS et al., 2001).

Em soja, os períodos mais sensíveis ao déficit hídrico são os de germinação e de emergência, além dos períodos de florescimento e de formação de grãos, porque envolvem diretamente na constituição dos componentes do rendimento, ou seja, do número de plantas por área, do número de vagens por planta, do número de grãos por vagem e da massa média de grãos (CUNHA; BERGAMASCHI, 1992; EMBRAPA, 2011). A sensibilidade da soja às deficiências hídricas, considerando o rendimento de grãos, tende a aumentar à medida que a cultura avança em seu ciclo, e apresenta a máxima sensibilidade durante o período reprodutivo, principalmente, nos estádios de formação de vagens e de enchimento de grãos (KORTE et al., 1983; KRON; SOUZA; RIBEIRO, 2008).

2.6 INTERAÇÃO ENTRE FATORES DE ESTRESSE E A FBN

Fatores ambientais geradores de estresses podem afetar a capacidade de nodulação e a fixação de N_2 pelas populações de *Bradyrhizobium* em simbiose com o sistema radicular da soja (CASTRO, 2000; SOARES, 2007). Diversos autores sugerem que o sistema de FBN é sensível ao déficit hídrico e tem relação com o acúmulo de ureídeos em tecidos, folhas e nódulos (SINCLAIR; VADEZ; CHENU, 2003; PURCELL et al., 2004; KING; PURCELL, 2005). A base dessa sensibilidade está relacionada ao fato de que os ureídeos são transportados a partir dos nódulos às folhas via xilema e, em condição de déficit hídrico, o catabolismo dos ureídeos é prejudicado, o que pode levar ao seu acúmulo na região foliar. O aumento dos ureídeos das folhas pode resultar em sua re-exportação para os nódulos, junto com água e açúcares via floema. O aumento da concentração de ureídeos nos nódulos inibe a fixação de N_2 em consequência de um efeito retroinibitório, além de diminuir a sua respiração e vigor, e também diminuir o fluxo de água para os nódulos (PURCELL; KING; BALL, 2000).

King e Purcell (2005) avaliaram genótipos de soja tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico em relação à FBN. Os autores verificaram que a cultivar

Jackson, tolerante à baixa umidade no solo, apresentou baixos teores de ureídeos nas folhas; porém, o genótipo KS4895, sensível à seca, manteve teores altos de ureídeos nas folhas ou de asparagina nos nódulos.

O acúmulo de ureídeos nas folhas está associado à suscetibilidade da FBN em soja ao déficit hídrico. Consequentemente, a degradação dos ureídeos em folhas pode ser a chave para o aumento da tolerância da soja em solos secos (VALDEZ; SINCLAIR, 2001).

No entanto, alguns autores divergem sobre a causa do acúmulo de ureídeos na parte aérea ou em nódulos, e sobre a possibilidade de retroinibição dos ureídeos da região foliar para os nódulos, com consequente inibição da atividade da FBN em condição de restrição hídrica (CEREZINI, 2013). Assim, foi encontrada relação entre o aumento de ureídeos nos nódulos e o acúmulo de aminoácidos nas folhas, com redução da atividade da nitrogenase (KING; PURCELL, 2005). No entanto, o acúmulo de ureídeos nas folhas não se relacionou com fatores genéticos ligados à atividade da enzima alantoato amidohidrolase, que metaboliza os ureídeos nas folhas (CHARLSON; KORTH; PURCELL, 2009).

Já Vadez, Sinclair e Serraj (2000) observaram acúmulo de ureídeos nos nódulos em condição de seca, que foi associado a diminuição do suprimento de água, que comprometeu a sua translocação e assim os ureídeos recém-sintetizados não foram exportados; ou então, que os ureídeos se acumularam pelo excesso de ureídeos não metabolizados na região foliar e retornaram para os nódulos via floema. Porém, o déficit hídrico não alterou os teores de ureídeos nas folhas em períodos curtos de exposição à seca, mas o acumulou nos nódulos. Embora, tenha ocorrido o acúmulo de ureídeos na parte aérea em condições severas e cumulativas de seca, o que indicou que a inibição da FBN pode ter ter origem nos nódulos e não no sistema (LADRERA et al., 2007). Alamillo et al. (2010) avaliaram folhas e raízes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e sugeriram que o ácido abscísico (ABA) está envolvido no acúmulo de ureídeos que ocorre na parte aérea das plantas (noduladas ou não), mas não nos nódulos, após 14 dias de seca, quando a atividade da nitrogenase já havia cessado.

Silvente, Sobolev e Lara (2012) observaram alterações do conteúdo de ureídeos nas folhas de genótipo sensível à seca, enquanto que no tolerante a alteração não ocorreu, porém a atividade da nitrogenase permaneceu inalterada para ambos. Eles concluíram que, a inibição da FBN e o acúmulo de ureídeos na

região foliar, motivados pela seca, ocorreram ao mesmo tempo, porém sem uma relação de causa e efeito, porque seguiram velocidades diferentes. Contudo, Cerezini (2013), ao comparar genótipos de soja FBN tolerante e não tolerante à seca, sugeriu que a inibição da FBN motivada pela seca parece se relacionar com falhas no metabolismo do carbono (C) e do nitrogênio (N) na parte aérea e nos nódulos, com conseqüente acúmulo de ureídos nos nódulos, pecíolos e folhas, juntamente com a escassez de substratos de C na forma de malato, em conseqüência à inibição da enzima sacarose sintase (SS).

A restrição hídrica pode diminuir o número e a massa dos nódulos nas raízes de soja. A nodulação é geralmente menor sob seca, tanto em genótipos considerados tolerantes, quanto nos considerados sensíveis ao déficit hídrico, embora o efeito seja menor nos genótipos tolerantes, porque conseguem manter por mais tempo o suprimento de fotoassimilados, maior fluxo de água e menores teores de ureídos nos tecidos (KING; PURCELL, 2001; LADRERA et al., 2007).

Lesk, Rowhani e Ramankutty (2016) recentemente estimaram as perdas globais de produtos agrícolas dos últimos anos, que foram motivadas por catástrofes meteorológicas, e identificaram que a seca e as altas temperaturas foram as causas mais significativas.

Existem algumas estratégias para se evitar os efeitos do déficit hídrico na cultura da soja. Uma delas é o escape ou a evitância da seca. Em países em regiões com períodos de precipitação bem definidos, o uso de genótipos precoces, permite que a planta complete o seu ciclo durante o período em que o fornecimento de água é suficiente, antes do início do período de seca, preferindo-se menor rendimento do que quebra de produção (TURNER; WRIGHT; SIDDIQUE, 2001, MANAVALAN et al., 2009).

Outra estratégia é reduzir o efeito da seca, o que envolve sistemas de produção que possibilitem à planta manter maior conteúdo de água disponível no solo durante períodos de seca, seja por eficiência na absorção de água a partir de raízes ou por redução da evapotranspiração, com o uso de sistemas de produção conservacionistas. Outra estratégia possível é o cultivo de genótipos com tolerância à seca, o que permite que a planta mantenha a turgescência celular e o metabolismo mesmo com baixo potencial de água (NGUYEN; BABU; BLUM, 1997; MANAVALAN et al., 2009).

A linhagem R02-1325 foi desenvolvida e caracterizada por

apresentar característica de tolerância à seca em relação à FBN, além de alto potencial na produção de grãos (DEVI et al., 2014). Similarmente, Chen et al. (2007) relatam que as linhagens R01-416F e R01-581F possuem alto potencial de rendimento de grãos e ao mesmo tempo apresentam característica de tolerância à seca moderada nos componentes da FBN. Essas linhagens são resultantes do cruzamento entre os genótipos de soja cv. Jackson (tolerante à seca) e cv. KS4895 (alto rendimento). A cv. Jackson, desde seu lançamento em 1953, tem sido caracterizada por apresentar FBN tolerante à seca (SERRAJ; SINCLAIR, 1996).

Com o desenvolvimento de genótipos de soja tolerantes à seca, surge a necessidade de estudos para se identificar mais precisamente os fatores envolvidos no aumento ou na diminuição de características relacionadas à FBN em condição de restrição hídrica. No entanto, os efeitos da seca sobre a FBN e o rendimento da cultura da soja dependem de sua duração, intensidade e estágio de ocorrência, principalmente, quando em estádios críticos, como os reprodutivos da planta (FARIAS et al., 2001; LADRERA et al., 2007; KRON; SOUZA; RIBEIRO, 2008).

2.7 FISILOGIA DO ESTRESSE HÍDRICO EM SOJA

O potencial de água na planta pode ser descrito pela seguinte equação: $\Psi_w = \Psi_s + \Psi_m + \Psi_p + \Psi_g$, em que Ψ_w é o potencial total de água de um sistema, Ψ_s é o potencial osmótico, Ψ_m é o potencial mátrico, Ψ_p é o potencial de pressão, e Ψ_g o potencial gravitacional. O componente gravitacional é de apenas 0,01 MPa por metro, e pode ser desconsiderado em tecidos cortados e em plantas de baixo porte. Assim, o potencial de água em um sistema é afetado principalmente pelos efeitos osmóticos, mátricos e de turgor das células; portanto, a equação pode ser simplificada para: $\Psi_w = \Psi_s + \Psi_m + \Psi_p$. Em um sistema em equilíbrio hídrico, o potencial total de água é similar em toda a planta: na parede celular, no citoplasma, nos vacúolos; contudo, os componentes do potencial total de água podem se apresentar distintos. No citoplasma, é devido aos efeitos osmóticos, mátricos e de turgor; no vacúolo, deve-se, principalmente, aos efeitos osmóticos e de turgor ($\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p$); e, na parede celular, deve-se, principalmente, aos efeitos mátricos e, em menor proporção, aos efeitos osmóticos ($\Psi_w = \Psi_s + \Psi_m$) (SALISBURY; ROSS, 2013;

TAIZ; ZEIGER, 2013).

Quando as plantas se encontram em condição de restrição hídrica, a taxa de transpiração foliar torna-se maior que a capacidade de absorção de água pelas raízes, o que se caracteriza pela diminuição dos teores de água nos tecidos, pela perda de turgescência foliar e pelo fechamento dos estômatos (TAIZ; ZEIGER, 2013). A condição de estresse hídrico pode ser temporária, em dias com temperaturas altas, mesmo em plantas irrigadas adequadamente; mas, se a diferença de potencial hídrico se prolonga, a redução na absorção de água pode acarretar um estado de murcha permanente (GUIMARÃES; STONE, 2008).

O déficit hídrico pode provocar o fechamento parcial dos estômatos, reduzir a transpiração e aumentar a temperatura das folhas em exposição à radiação solar (GUIMARÃES et al., 2010). Por isso, é possível correlacionar a temperatura foliar com a taxa transpiratória e fotossintética, além de ser um indicador eficiente das condições hídricas da planta (HIRAYAMA; WADA; NEMOTO, 2006).

Conforme Manavan et al. (2009), progressos significativos no melhoramento para a tolerância à seca não podem ser feitos a menos que a restrição hídrica seja imposta ano após ano para permitir a seleção direta para o rendimento. Por este motivo, um campo com baixa capacidade de retenção de água, e uma uniformidade do solo em condição de seca razoável a cada ano é importante, mas, infelizmente, é muito difícil de se alcançar essa condição.

A fim de permitir medições confiáveis em relação ao uso da água em soja, pode ser importante incluir comodidades, como um abrigo do tipo “rainout”, que permite o abrir e fechar do teto automaticamente e o controle da umidade do solo, o que possibilita a avaliação independente dos componentes de resistência à seca (YUE et al., 2006; PENNISI, 2008, MANAVALAN et al., 2009). Alternativamente, o cultivo em vasos, em casa de vegetação, em ambiente com temperatura e umidade controladas é uma opção viável.

Com os avanços atuais, pode-se estudar características fenotípicas dos genótipos e as respostas à deficiência de água no solo sob condições controladas por determinações não destrutivas das condições hídricas ao longo do tempo, usando equipamentos portáteis e outros equipamentos de precisão para quantificar o uso da água pela planta. A triagem de genótipos em tais instalações controladas tem a vantagem de quantificar as características morfofisiológicas que influenciam a adaptação à seca, que por sua vez complementa os critérios de

seleção de rendimento (CAPITANI et al., 2009, MANAVALAN et al., 2009).

A medição da temperatura foliar, para avaliar as plantas em função de seu estado hídrico, é útil e pode proporcionar resposta eficiente e imediata, por ser uma técnica não destrutiva e não demandar tecidos ou movimentação intensa dentro das parcelas (GUIMARÃES et al., 2010). Mahan et al. (2010) utilizaram sensores infravermelhos de temperatura sem fio e de baixo custo. Eles concluíram que o equipamento fornece resolução e confiabilidade suficientes para avaliar de forma contínua a temperatura do dossel de plantas, e pode ser utilizado para determinar os momentos de irrigação.

Alguns métodos para medir o comportamento dos estômatos frente ao déficit hídrico empregam acoplamento de câmara equipada com sensor na folha. A medição pode ser feita na superfície adaxial ou na abaxial e é avaliada durante as primeiras horas da manhã ou durante o período da tarde, conforme resposta da espécie ou do genótipo da planta (GUIMARÃES; STONE, 2008). Paiva et al. (2005) verificaram em folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) que a resposta dos estômatos ao déficit hídrico é possível de ser determinada com porômetros que medem o fluxo de ar através das folhas, com resultados sensíveis e rápidos. Estes autores observaram a redução da condutância estomática em resposta aos baixos valores de potencial hídrico do solo e vice-versa.

A limitação da expansão na área foliar pode ser a primeira reação fisiológica em plantas submetidas ao déficit hídrico, com consequente limitação ao rendimento da cultura (SANTOS; CARLESSO, 1998; NÓBREGA et al., 2001). Thomas e Costa (1994) verificaram que o número de legumes por planta de soja e a massa de sementes foram os componentes mais afetados pelo déficit hídrico. Observaram também, que o maior índice de área foliar e o maior período de enchimento de grãos proporcionaram maiores rendimentos de sementes no tratamento irrigado.

O déficit hídrico promove alterações na planta e a antecipação de sua senescência. Nessas condições, podem ocorrer aumentos das espécies reativas de oxigênio (ERO), que são produzidas durante o metabolismo aeróbico, pela interação de O₂ e elétrons provenientes da cadeia de transporte dos cloroplastos e das mitocôndrias (BOR; ÖZDEMİR; TÜRKAN, 2003). A suscetibilidade ao estresse oxidativo depende do balanço entre a produção de oxidantes e a capacidade antioxidante da célula (PROCHAZKOVA et al., 2001).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo excesso de produção de espécies reativas de oxigênio. As ERO incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (HO^{\cdot}) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), os quais podem causar danos às macromoléculas celulares. Os danos provocados pelas ERO podem ser evitados por sistemas antioxidativos em plantas superiores, em que se destacam enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX), além de outras peroxidases (POX) e a glutathione redutase (GR). A SOD catalisa a dismutação do superóxido, mantendo baixos níveis desse radical, sendo o H_2O_2 produto de sua reação. A CAT converte o H_2O_2 em oxigênio e água e a APX catalisa a oxidação do ascorbato à monodesidroascorbato (MDHA), usando H_2O_2 como oxidante (JIMÉNEZ et al., 2002). A produção excessiva de ERO nos cloroplastos das plantas sob estresse por seca tem sido descrito e sugerido como um dos principais fatores responsável pelo dano oxidativo em folhas (CAVALCANTI et al., 2004).

As superóxido dismutases desempenham papel chave no sistema de defesa antioxidante pela dismutação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 e O_2 . As SODs são metaloenzimas que ocorrem em três diferentes formas moleculares (isoenzimas), contendo os metais Mn, Fe ou Cu/Zn como grupos prostéticos (FRIDOVICH, 1986).

O aumento de CAT logo após o florescimento em soja sugere que as folhas aumentaram a sua capacidade de catalisar a decomposição do H_2O_2 . Porém, quanto mais se aproxima da senescência, 25 dias após o florescimento, essa habilidade decresce com a queda da atividade da enzima (FU; HUANG; ZHANG, 2000). Garcia (2009) avaliou as condições de senescência em genótipos de soja identificando a ação das enzimas relacionadas a estresses oxidativos na parte aérea e concluiu que o estresse oxidativo não foi o fator determinante na senescência foliar natural das plantas de soja utilizadas no experimento.

Embora vários trabalhos forneçam evidências do papel protetor do sistema enzimático antioxidante CAT-SOD contra o estresse oxidativo em diversas espécies de plantas, a resposta da atividade da CAT aos estresses tem sido contraditório; porém, alguns trabalhos têm demonstrado que a atividade da CAT é aumentada (GROSSET; MILHOLLON; LUCAS, 1994; VAIDYANATHAN et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2004; JUNG, 2004).

A peroxidação de lipídios pode ocorrer a partir do estresse oxidativo resultante do aumento das espécies reativas de oxigênio. Dentre os vários fatores

que geram o estresse oxidativo em plantas, estão incluídas as mudanças drásticas de temperatura e o déficit hídrico (SMIRNOFF, 1993; ELSTNER; OSSWALD, 1994). A produção das ERO pode acarretar o início do processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares, formando hidroperóxidos de lipídios. A peroxidação de lipídios de membrana é um dos eventos mais significativos do estresse oxidativo porque causa a diminuição da fluidez, modificações de permeabilidade iônica e de outras funções associadas às membranas (QUEIROZ et al., 1998). Os eventos bioquímicos resultantes da diminuição da fluidez das membranas incluem a interferência nas funções das proteínas, a redução do suprimento de energia, a perda de compartimentalização, a liberação acentuada de íons e outros eventos que interferem no metabolismo e levam ao desbalanço e perda das funções essenciais (AZIZ; LARHER, 1998). As ERO danificam as proteínas, os lipídios e os ácidos nucleicos, e o grau dos danos gerados depende do equilíbrio entre a formação de uma ERO e a sua remoção pelos sistemas de exatão de antioxidantes (HERNÁNDEZ; ALMANSA, 2002; CAVALCANTI et al., 2004).

O conhecimento sobre a fisiologia do estresse hídrico e sobre a tolerância à seca têm se acumulado por meio de pesquisas que vão desde medições pontuais dos efeitos da restrição hídrica na planta até estudos sobre mecanismos de resposta em nível morfológico, fisiológico e molecular. Assim, com a integração das várias tecnologias e do entendimento básico dos mecanismos envolvidos nos processos de tolerância ao estresse, programas de melhoramento e práticas agronômicas adequadas podem tornar viável a produção de soja sem perdas significativas de produtividade quando expostas à seca, conforme os tempos e os estádios de ocorrência (KU et al., 2013).

3 ARTIGO A: DÉFICIT HÍDRICO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA COM DIFERENTES NÍVEIS DE TOLERÂNCIA À SECA

3.1 RESUMO

A restrição hídrica é o principal fator abiótico limitante ao processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) na cultura da soja (*Glycine max* L. Merr.). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da restrição hídrica nos componentes relativos à FBN em genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância à seca, e no desempenho da produção de sementes, quando expostos ou não à seca. O experimento foi realizado em condições controladas, com tratamentos em arranjo fatorial 5x2, com cinco genótipos de soja (BRS 317, Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) e dois níveis de umidade, condição úmida (80% da CC) e de seca (30% da CC), em um substrato contendo terra argilosa e areia na proporção 3:1. A exposição à restrição hídrica foi iniciada aos 33 dias após a semeadura, entre os estádios R₁ e R₂, com avaliações em tempos distintos após 10 dias de seca em R₂, 22 dias em R₄ e 42 dias em R₆. Foram avaliados: número e massa seca de nódulos; massa específica de nódulos; teores de ureídeos (folíolos, pecíolos e nódulos); N total nas folhas; e a massa de sementes por planta. A exposição à seca diminuiu a nodulação, o N nas folhas e a produção de sementes; e aumentou os teores de ureídeos nos pecíolos e nos nódulos quando avaliados no tempo inicial e no final. A cv. Jackson e a R01-581F apresentaram tolerância quando expostas à seca por até 10 dias durante o florescimento. A cv. BRS 317 apresentou tolerância à seca por até 22 dias durante o florescimento e a formação das vagens. A R02-1325 apresentou maior produção de sementes a 80% da CC e não diferiu das mais produtivas quando exposta à seca.

Palavras-chave: *Glycine max*. Estresse hídrico. Nitrogênio. Nódulos. Ureídeos.

3.2 ABSTRACT

Water restriction is the main limiting abiotic factor to soybean crop (*Glycine max* L. Merr.), causing negative effects on the biological nitrogen fixation (BNF). The objective of this work was to evaluate the effect of water restriction on BNF traits in soybean genotypes with different levels of drought tolerance, and performance in the

production of seeds, when exposed or not to drought. The experiment was carried out under controlled conditions, in a 5 x 2 factorial arrangement, with five soybean genotypes (R01-416F, R01-581F, R02-1325 BRS 317 and Jackson) and two soil moisture levels: wet (80% of field capacity, FC) and dry conditions (30% of FC) in a substrate containing clayey soil and sand in the ratio 3:1. The water restriction exposure was initiated at 33 days after sowing, in initial flowering stages, with assessments in different times up to 10 days of drought in R₂ stage, 22 days in R₄ and 42 days in R₆. The assessed variables were: number and dry weight of nodules; specific mass of nodules; total ureides in folioles, petioles and nodules; total N concentration in leaves; and mass of seeds. The exposure to water restriction decreased nodulation, the leaf N concentration, seed yield, and increased the contents of ureides in petioles and nodules. The genotypes cv. Jackson and R01-581F showed better performance under moderate drought up to 10 days in R₂ stage. The cv. BRS 317 was tolerant to water restriction up to 22 days in R₄. The line R02-1325 showed higher grain yield at 80% of FC and did not differ from the most productive genotypes under drought.

Key words: *Glycine max*. Nitrogen. Nodules. Ureides. Water stress.

3.3 INTRODUÇÃO

A planta de soja (*Glycine max* L. Merr.) tem em sua massa fresca cerca de 90% de água, que atua em praticamente todos os processos fisiológicos e bioquímicos, com importante papel na regulação e distribuição do calor. Períodos prolongados de seca podem causar mudanças na condição fisiológica da planta, como o fechamento dos estômatos, e provocar a queda prematura das folhas, flores e vagens, com conseqüente diminuição do potencial produtivo da cultura. Um dos primeiros processos fisiológicos prejudicados pela restrição hídrica é a fixação biológica do nitrogênio (FBN), cujo declínio está relacionado ao decréscimo da capacidade fotossintética do hospedeiro e/ou a danos ao complexo nitrogenase (SERRAJ; SINCLAIR; PURCELL, 1999; KUSS et al., 2008; EMBRAPA, 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013).

A capacidade de nodulação e a eficiência em fixar o nitrogênio atmosférico (N₂) são dependentes da interação entre as estirpes de bactérias

simbiontes e a planta hospedeira, que são influenciadas pelas condições ambientais. Os nódulos no sistema radicular ficam ativos por semanas, em constante formação e renovação durante o ciclo da cultura, com máxima nodulação entre os estádios reprodutivos de pleno florescimento (R_2) e de enchimento de grãos (R_5) da soja. A partir de R_6 (sementes verdes totalmente formadas), inicia-se o processo gradativo de maturação das sementes, de senescência da planta e dos nódulos (R_7 e R_8), com consequente redução da FBN (PURCELL; SERRAJ; SINCLAIR, 2004; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; FINOTO; SEDIYAMA; BARROS, 2009).

Para realizar a FBN, os bacteróides no interior dos nódulos precisam dos fotoassimilados fornecidos pelo hospedeiro e moléculas de oxigênio (O_2) para formar adenosina trifosfato (ATP) e reduzir o N_2 a amônia (NH_3) por meio do complexo nitrogenase. Por fim, um substrato orgânico recebe a NH_3 produzida para posterior incorporação ao metabolismo da planta na forma de ureídos, que corresponde a 90% do N translocado pela seiva do xilema em direção à parte aérea (TAIZ; ZEIGER, 2013). O metabolismo de ureídos na região foliar pode ser prejudicado em condição de restrição hídrica, resultando em acúmulo nos folíolos, pecíolos, e possível exportação aos nódulos via floema, o que pode inibir a FBN por um efeito retroinibitório (VADEZ; SINCLAIR, 2001; SINCLAIR; VADEZ; CHENU, 2003; PURCELL; SERRAJ; SINCLAIR, 2004; KING; PURCELL, 2005).

A restrição hídrica diminui o número e a massa dos nódulos nas raízes de soja. A nodulação é geralmente menor sob seca, tanto em genótipos considerados tolerantes, quanto nos considerados sensíveis ao déficit hídrico, embora o efeito seja menor nos genótipos tolerantes, porque conseguem manter por mais tempo o suprimento de fotoassimilados, maior fluxo de água e menores teores de ureídos nos tecidos (KING; PURCELL, 2001; LADRERA et al., 2007).

A linhagem R02-1325 foi caracterizada por apresentar tolerância à seca em relação aos componentes da FBN, além de alto potencial produtivo (DEVI et al., 2014). Similarmente, Chen et al. (2007) relataram que as linhagens R01-416F e R01-581F possuem alto potencial de rendimento de grãos e ao mesmo tempo apresentam FBN tolerante à seca. Essas linhagens são resultantes do cruzamento entre os genótipos de soja cv. Jackson (tolerante à seca) e cv. KS4895 (alto rendimento). A cv. Jackson, desde seu lançamento, tem sido caracterizada por apresentar FBN tolerante à seca (SERRAJ; SINCLAIR, 1996).

Com o desenvolvimento de genótipos de soja com características de

tolerância à seca, surge a necessidade de estudos para se identificar mais precisamente os fatores envolvidos na redução da FBN em condição de restrição hídrica. Os efeitos da seca sobre a FBN e o rendimento da cultura da soja dependem de sua duração e intensidade. O estágio em que ocorre a restrição hídrica também pode influenciar nos efeitos sobre a cultura, principalmente nos mais críticos como os estádios de florescimento e de enchimento de grãos (FARIAS et al., 2001; LADRERA et al., 2007; KRON; SOUZA; RIBEIRO, 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da restrição hídrica nos componentes relacionados à fixação biológica de nitrogênio em genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância à seca, e no desempenho na produção de sementes, expostos ou não à seca, em diferentes tempos entre os estádios reprodutivos de florescimento e enchimento de grãos.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no ano agrícola de 2013/2014 em casa de vegetação, em ambiente controlado com registros de temperatura entre 25 °C e 30 °C, e de umidade relativa do ar (UR%) entre 70% e 85% em média durante o ciclo da cultura, no Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR (latitude 23°22' S, longitude 51°12' W e altitude 585 m). A semeadura ocorreu em 29 novembro de 2013 e a colheita em 04 de abril de 2014.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições, em arranjo fatorial 5x2, com cinco genótipos de soja: as linhagens R01-416F, R01-581F e R02-1325, e as variedades Jackson e BRS 317; em duas condições hídricas: suprimento pleno de água a 80% da capacidade de campo (CC) (condição úmida) e de restrição hídrica a 30% da CC (condição seca).

A cv. BRS 317 é uma variedade de soja convencional, com alto potencial produtivo, desenvolvida pela Embrapa Soja e indicada para o cultivo nos Estados do PR, SP, SC e sul do MS. Tem tipo de crescimento determinado, grupo de maturidade 6.6 (Brasil) e ciclo de 122 a 128 dias numa altitude de 500 a 800 m (EMBRAPA, 2010). Não há divulgação da característica de tolerância ou sensibilidade à seca, contudo alguns autores relataram que essa cultivar apresenta FBN sensível à seca (CEREZINI et al, 2014). No entanto, a cv. BRS 317 é indicada

pela FUNDAÇÃO MS como moderadamente tolerante ao déficit hídrico para a região sul do Mato Grosso do Sul (PITOL, 2015). A cultivar Jackson foi desenvolvida nos Estados Unidos em 1953, com grupo de maturidade VII (EUA), e tem sido caracterizada como tolerante à seca em relação à FBN desde seu lançamento. As linhagens R02-1325, R01-416F e R01-581F foram desenvolvidas nos Estados Unidos na Estação Experimental Agrícola do Arkansas, pertencentes ao grupo de maturidade V (EUA). Possuem características de sustentação da FBN em condições de déficit hídrico moderado e alto potencial produtivo (CHEN et al., 2007; DEVI et al., 2014).

A exposição à restrição hídrica (30% da CC) foi iniciada aos 33 dias após a semeadura (DAS), em metade das parcelas experimentais quando os genótipos se encontravam entre os estádios de florescimento R₁ e R₂. As avaliações foram realizadas em três tempos distintos de exposição à condição de 30% da CC (seca), ou seja, aos 43 DAS, após 10 dias de exposição à seca, no estádio R₂ (florescimento pleno); aos 55 DAS, após 22 dias de seca, no estádio R₄ (vagens formadas); e, aos 75 DAS, após 42 dias de seca, no estádio R₆ (grãos formados e verdes) (FEHR; CAVINESS, 1977).

As linhagens se apresentaram mais precoces que as variedades de soja. Assim, os tempos para as avaliações foram determinados quando mais de 50% das parcelas experimentais se encontravam nos respectivos estádios reprodutivos, dentro das condições seca ou úmida. Para a análise estatística cada tempo de avaliação (10 dias, 22 dias e 42 dias) foi considerado um ensaio distinto, cuja avaliação do efeito de tratamento dentro de um tempo de análise foi independente dos demais tempos.

Cada parcela experimental foi representada por um vaso de polietileno com capacidade para 9 L na cor mármore, para minimizar os efeitos da radiação solar. Cada vaso recebeu 8 kg de um substrato na proporção 3:1 (terra:areia), formado pela mistura de Latossolo Vermelho distroférico de textura argilosa coletado na camada 0-20 cm em uma área de cultivo comercial de soja e areia fina lavada de rio. Amostras do substrato foram analisadas para fins de fertilidade (SILVA, 2009), cujos resultados são apresentados na Tabela 3.1.

Para a determinação do pH foi estimada a atividade do íon H⁺ na suspensão do substrato, utilizando-se solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) e leitura por meio de um potenciômetro. A determinação da acidez trocável (Al³⁺) foi com o

extrator cloreto de potássio (KCl) e a leitura realizada por titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH). A acidez potencial ($H^+ + Al^{3+}$) foi determinada com o uso de solução tampão SMP (método de Shoemaker, McLean e Pratt) e leitura por meio de um potenciômetro, com resultado obtido pela conversão do valor da leitura conforme tabela obtida pela resolução de equações de regressão.

Os teores de cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) trocáveis foram extraídos com KCl e determinados por titulação com EDTA. O fósforo (P) e o potássio (K^+) foram determinados em solução extratora Mehlich-1. O teor de P foi obtido por leitura em espectrofotômetro a 630 nm e construção de curva de calibração. O teor de K foi obtido por leitura em fotômetro de chama e construção de curva de calibração. A determinação de carbono (C) foi realizada conforme método Walkley-Black, em que a matéria orgânica foi oxidada por íons dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) em meio fortemente ácido. O excesso de $Cr_2O_7^{2-}$ foi titulado com $FeSO_4$ e o teor de matéria orgânica (MO) calculado pela quantidade de $Cr_2O_7^{2-}$ reduzido. A relação entre o teor de MO e de C é de 1,724.

Tabela 3.1. Resultados da análise química de um substrato contendo terra argilosa e areia na proporção 3:1.

pH	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	Al^{3+}	$H^+ + Al^{3+}$	CTC	V%	C	MO	P
CaCl ₂	----- cmol _c dm ⁻³ -----						----- g kg ⁻¹ -----		mg dm ⁻³	
6,80	8,20	0,83	0,64	0,00	2,54	12,21	79,20	7,00	12,10	47,49

Análise Química do Solo – AQS (SILVA, 2009)

Antes da semeadura, sementes de soja foram inoculadas com inoculante turfoso comercial contendo $7,2 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia por grama (garantia do fabricante), contendo as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium* spp. A partir do estágio V₂ (primeiro trifólio totalmente desenvolvido) as plantas foram desbastadas e duas foram mantidas por vaso.

Foi estabelecida a massa de água aplicada ao tratamento em condição de suprimento pleno como 80% da CC (úmida) e de restrição hídrica, quando aplicada, em 30% da CC (seca) (ALBUQUERQUE, 2010). Assim, diariamente, as disponibilidades hídricas eram determinadas a partir da massa de água (kg) contida em cada vaso, por meio de uma balança eletrônica com capacidade para 15 kg, e, uma vez ao dia, os valores eram restabelecidos para 80% ou 30% da CC pela determinação e reposição do volume perdido de água.

Metade das parcelas experimentais foram mantidas com pleno suprimento de água em 80% da CC durante todo o ciclo da cultura. No entanto, a outra metade das parcelas foi submetida à restrição hídrica com umidade em 30% da CC, entre os 33 DAS e 75 DAS, pelo tempo total de 42 dias. Dos 75 DAS até a colheita aos 127 DAS, as plantas foram mantidas em condição de 80% da CC. Em cada um dos três tempos (10 dias, 22 dias e 42 dias) sob seca, cinco repetições de cada tratamento (cinco genótipos x duas condições hídricas) dentro de cinco blocos foram aleatoriamente amostrados para as análises destrutivas, num total de 50 parcelas experimentais para cada avaliação. Na colheita (127 DAS), durante o estágio R₈ (maturação), 100 parcelas representativas dos cinco genótipos foram amostradas para determinação do rendimento, ou seja, 25 parcelas sob seca por 10 dias, 25 por 22 dias, 25 por 42 dias e 25 sob condição úmida durante todo o ciclo. Foram utilizadas no experimento um total de 250 parcelas experimentais.

O efeito do regime hídrico aplicado (80% CC ou 30% CC) foi avaliado por determinações não destrutivas na parte aérea das plantas e no substrato das parcelas durante os períodos de exposição à restrição hídrica (10 dias, 22 dias e 42 dias) pelas variáveis: condutância estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Leaf Porometer, Model SC-1, Decagon Devices, Inc); temperatura foliar ($^{\circ}\text{C}$) (Termômetro Mira Laser, Incoterm); conteúdo de água no substrato antes da irrigação diária (kg) (Balança digital, capacidade 15 kg, Toledo); teor de água ($\text{m}^3 \text{m}^{-3}$) e temperatura do substrato ($^{\circ}\text{C}$) a 5 cm de profundidade (5TE Soil Moisture Content/Procheck, Decagon Devices, Inc); potencial hídrico do substrato (MPa) (WP4-T Dewpoint Potentiometer, Decagon Devices, Inc). As determinações foliares ocorreram no folíolo central do 3^o trifólio totalmente desenvolvido a partir do ápice do caule principal das plantas.

Nos três tempos avaliados, os vasos foram desmontados, a parte aérea foi separada das raízes que foram lavadas e os nódulos separados. Os nódulos e a parte aérea foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 65 $^{\circ}\text{C}$ até atingirem massa constante. Foram avaliados o número de nódulos e a massa seca de nódulos por planta (g planta^{-1}); a massa específica dos nódulos (mg/nódulo); a concentração de N total na biomassa seca das folhas (g kg^{-1}) pelo método Kjeldahl (TEDESCO et al., 1995); a massa de sementes por planta (g planta^{-1}); e os teores de ureídeos totais nos extratos dos tecidos da biomassa seca dos folíolos, dos pecíolos e dos nódulos ($\mu\text{mol g}^{-1}$).

Para a obtenção do extrato para as análises de ureídeos, após o material ser seco, moído e passado em peneira de 60 ou 100 mesh, o produto resultante foi adicionado em um tubo de ensaio na quantidade de 0,1 g (nódulos) ou 0,3 g (folíolos ou pecíolos), juntamente com 5 mL de tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,0, e 2,5 mL de etanol (relação 2:1, tampão/etanol). O tubo foi aquecido a 80 °C, por cinco minutos, sem ferver, e o seu conteúdo misturado com a ajuda de um vórtex. Após uma hora de descanso, o material foi filtrado em camadas de algodão hidrófilo estéril, e centrifugado em microcentrífuga por cerca de 5 minutos (10.000 g). Alíquotas de 50 µL do extrato limpo e livre de qualquer suspensão foram utilizadas para as análises de ureídeos totais (HUNGRIA, 1994).

Os teores de ureídeos totais (alantoína e ácido alantóico) do extrato dos tecidos foram quantificados pela técnica de Vogels e van der Drift (1970), descrita em Hungria (1994). A técnica baseou-se no princípio da hidrólise seletiva dos ureídeos a glioxilato, o qual foi quantificado colorimetricamente após a reação Rimini-Schryver. Brevemente, alíquotas de 50 µL do extrato em duplicata foram submetidas a uma sequência de hidrólise alcalina e hidrólise ácida para a quantificação dos ureídeos. Obtidos os produtos de hidrólise, estes foram quantificados colorimetricamente após reação com fenilhidrazina e ferricianeto de potássio que formou um cromóforo de coloração rosa, cuja intensidade foi lida a 535 nm em espectrofotômetro. As leituras de absorvância foram convertidas em µmols de ureídeos totais contra uma reta padrão construída para cada conjunto de análises. Os resultados foram expressos em µmols de ureídeos totais por grama de biomassa seca no extrato.

Em R₈ (maturação plena), as sementes dos genótipos expostos à condição úmida (80% da CC) e à condição seca (30% da CC) nos três tempos (10, 22 e 42 dias) foram coletadas para avaliação de massa de sementes por planta (g), que foi determinada a partir da correção a uma umidade de 13%.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A principal rota para as trocas gasosas na planta são os estômatos, cuja abertura influi na taxa de transpiração e no balanço de energia. O fechamento

dos estômatos em resposta ao déficit hídrico ou as altas temperaturas influenciam toda a planta, pois compromete o desempenho fotossintético e o processo de FBN. Paiva et al. (2005) observaram a condutância estomática diminuir em plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) em resposta à restrição hídrica. Nascimento et al. (2011), também observaram a condutância estomática diminuir em 72% e a temperatura foliar aumentar em 12% em feijão caupi (*Vigna unguiculata*) que recebeu 50% da lâmina de água ideal. Assim, à medida que os estômatos se fecham, a transpiração diminui, e ocorre o aumento da temperatura foliar (GUIMARÃES; STONE, 2010; CERZINI et al., 2014). O presente trabalho confirma os resultados desses autores, pois a restrição hídrica reduziu a condutância estomática em 73% e aumentou a temperatura foliar em cerca de 5% (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Determinações realizadas no substrato e na parte aérea de plantas de soja (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostas à condição úmida (80% da CC) ou de seca (30% da CC) nos tempos de 10 dias, 22 dias e 42 dias entre os estádios R₁ e R₆.

Var.	Temperatura Foliar (° C)	Condutância Estomática (mmol m ⁻² s ⁻¹)	Conteúdo de água* (kg)	Teor de água** (m ³ m ⁻³)	Temperatura do Substrato (° C)	Potencial Hídrico (MPa)
Úmida	24,26	584,67	1,34	0,29	26,95	- 0,01
Seca	25,39	156,55	0,30	0,15	28,25	- 1,20

* Conteúdo de água em kg por vaso. ** Teor de água em m³ m⁻³ nos primeiros 5 cm de profundidade. Medições feitas antes da reposição diária de água nos vasos. Var.: Variável. Trat.: Tratamento. CC = Capacidade de campo.

Os 10 dias de exposição à seca (30% da CC) entre os estádios de florescimento R₁ e R₂ não influenciaram o número de nódulos e a massa de nódulos para o cv. Jackson, ou o número de nódulos para a linhagem R02-1325. Para os demais genótipos, a restrição hídrica diminuiu tanto a massa quanto o número de nódulos (Figura 3.1).

No entanto, o tempo de 10 dias de seca não aumentou os teores de ureídeos nos pecíolos e nos nódulos em todos os genótipos, exceto nos nódulos da linhagem R01-416F, que apresentou os maiores teores mesmo sob pleno suprimento de água. Porém, não foram observados efeitos da restrição hídrica para os ureídeos nos folíolos. Apesar do aumento dos ureídeos nos pecíolos e nos nódulos sob restrição hídrica, os teores de N foram menores na biomassa seca das folhas, o que indicou um efeito negativo sobre a FBN, e, conseqüentemente, sobre a

produção de sementes pelas plantas (Figura 3.1).

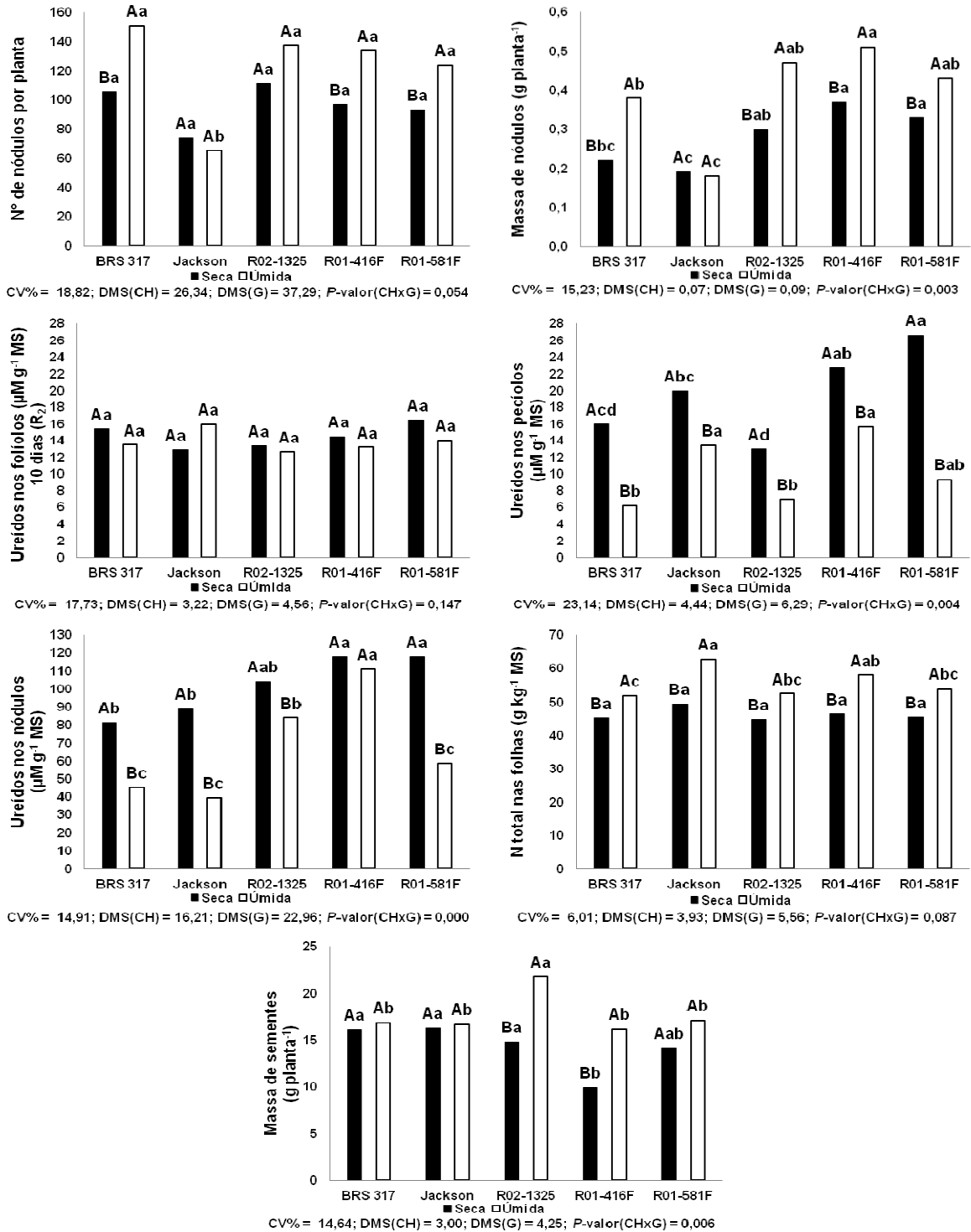
A restrição hídrica durante os estádios R_1 e R_2 por 10 dias reduziu a massa de sementes das linhagens R02-1325 em 32% e R01-416F em 39%, mas não influenciou a cv. BRS 317, a cv. Jackson e a linhagem R01-581F. Entre os genótipos, a linhagem R01-416F sob restrição hídrica apresentou produção de sementes 39% menor que a cultivar tolerante Jackson (Figura 3.1).

No tempo de 22 dias de exposição à seca, durante o estágio reprodutivo em que as vagens estavam formadas (R_4), todos os genótipos submetidos à restrição hídrica tiveram o número e a massa seca de nódulos reduzidos. Entre os genótipos, a cv. Jackson apresentou o menor número de nódulos, correspondendo a 44% e 25% das médias dos demais genótipos, sob restrição hídrica e pleno suprimento de água, respectivamente (Figura 3.2). No entanto, a massa específica de nódulos, que é um indicativo do tamanho dos nódulos, foi superior em porcentagem sob seca quando comparado ao tratamento controle úmido para a cv. Jackson (Figura 3.4).

King e Purcell (2001) sugeriram que nódulos maiores ajudam a conferir tolerância à seca, porque a fração de tecidos fixadores de N_2 é maior do que em nódulos pequenos. Os autores concluíram que a tolerância à seca da cv. Jackson é parcialmente motivada pelas vantagens dos nódulos maiores, mas que essa tolerância também resulta de uma fonte maior e inerente de fotossintatos para os nódulos.

Aos 22 dias de exposição à seca (estádio R_4), os ureídos nos folíolos diminuíram apenas na linhagem R02-1325 sob restrição hídrica. Os teores de ureídos nos pecíolos apresentaram variação entre os genótipos quando expostos à seca, ora aumentando, ora diminuindo, ou sem efeito. Entretanto, os ureídos nos nódulos diminuíram em todos os genótipos expostos à restrição hídrica. O maior teor de ureídos nos nódulos foi observada na linhagem R02-1325, especialmente sob restrição hídrica. O teor de N nas folhas não foi influenciado pela restrição hídrica para os genótipos Jackson e R01-416F, mas diminuiu nos demais genótipos (Figura 3.2).

Figura 3.1. Número e massa de nódulos, teor de ureídos (folíolos, pecíolos e nódulos), teor de N nas folhas e massa de sementes por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F), expostos à condição úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) por 10 dias entre os estádios de florescimento R₁ e R₂.



Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas (condição hídrica, dentro de genótipo) e minúsculas (genótipos, dentro de condição hídrica), não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). CH = Condição hídrica; G = Genótipo; CC = Capacidade de campo.

Diversos autores sugerem que o aumento da concentração de ureídeos nas folhas pode provocar um efeito retroinibitório, com re-exportação e acúmulo dos ureídeos nos nódulos via floema, e que está associado aos genótipos de soja sensíveis à seca (VADEZ; SINCLAIR, 2001; SINCLAIR; VADEZ; CHENU, 2003; PURCELL; SERRAJ; SINCLAIR, 2004; KING; PURCELL, 2005).

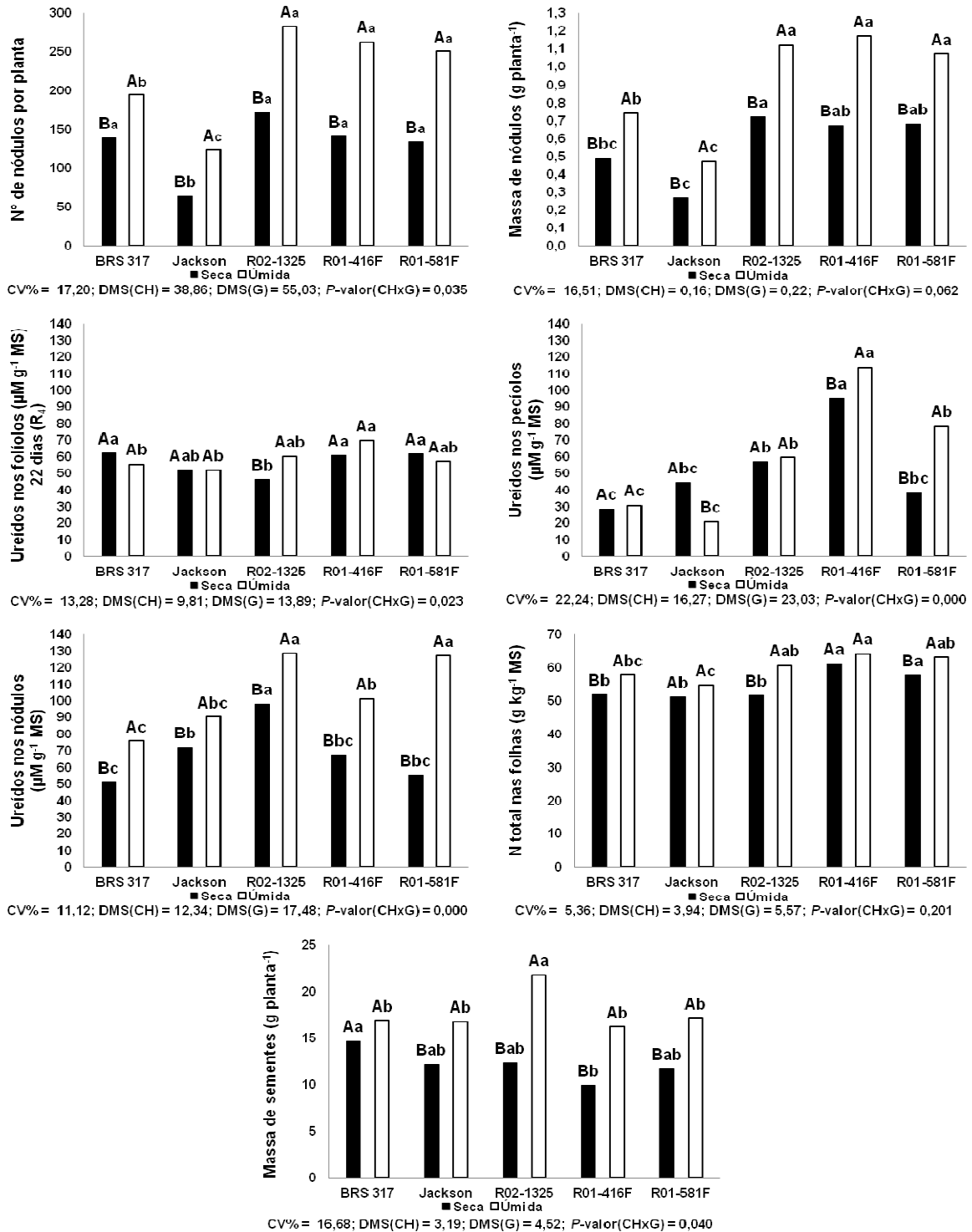
Contudo, Coletto et al. (2014) verificaram o acúmulo de ureídeos em caules e folhas, mas não em nódulos em *P. vulgaris* sob seca. O acúmulo de ureídeos não foi associado à dificuldade de translocação do produto da FBN sob seca, como tem sido sugerido em soja, mas parece ter sido uma resposta geral da planta ao estresse, de forma que o maior acúmulo pode corresponder à maior sensibilidade do genótipo à seca. Aumento da concentração de ureídeos em tecidos da parte aérea parece também estar relacionado ao processo de senescência induzida pela seca, em que ácidos nucleicos são degradados a purinas e pirimidinas que são realocadas na planta na forma de ureídeos (DE LUCA; HUNGRIA, 2014).

A restrição hídrica por 22 dias diminuiu a massa de sementes, exceto para a cv. BRS 317, que apresentou características de tolerância à seca para essa variável. Sob restrição hídrica, a linhagem R01-416F foi 33% menor em relação a cv. BRS 317, e não diferiu dos demais genótipos (Figura 3.2).

No estágio R₆, após 42 dias de restrição hídrica, a cv. Jackson apresentou, em geral, os menores números e massa de nódulos (Figura 3.3), porém sua massa específica se manteve próxima a 100% em relação ao controle úmido (Figura 3.4).

Ainda em R₆, os 42 dias de seca reduziram os teores de ureídeos nos folíolos, exceto a cv. Jackson, e nos pecíolos, exceto a cv. BRS 317 que não foram influenciadas pela condição hídrica. Já o teor de N nas folhas, a massa de sementes, o número de nódulos e a massa seca de nódulos foram reduzidos em todos os genótipos. Entretanto, a restrição hídrica aumentou o teor de ureídeos nos nódulos, exceto em R01-416F, que apresentou o menor teor comparado aos demais genótipos, especialmente quando induzido à seca (Figura 3.3).

Figura 3.2. Número e massa de nódulos, teor de ureídios (folíolos, pecíolos e nódulos), teor de N nas folhas e massa de sementes por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F), expostos à condição úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) por 22 dias entre os estádios de florescimento (R_1) e formação de vagens (R_4).



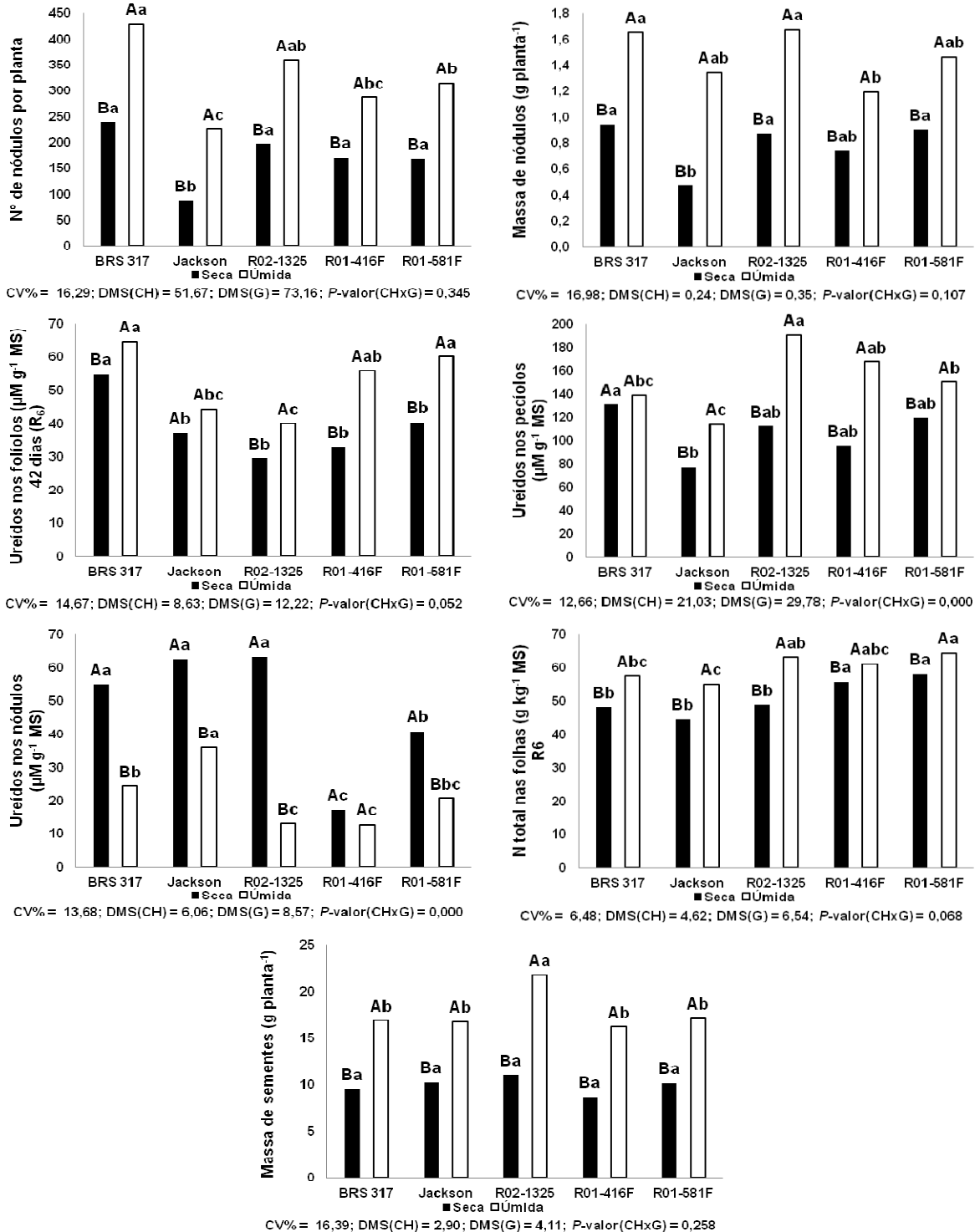
Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas (condição hídrica, dentro de genótipo) e minúsculas (genótipos, dentro de condição hídrica) não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). CH = Condição hídrica; G = Genótipo; CC = Capacidade de campo.

Em R₆, a cv. BRS 317 apresentou o maior teor de ureídios nos folíolos sob restrição hídrica, enquanto nos pecíolos as diferenças foram menos evidentes. As concentrações de ureídios nos nódulos das linhagens R01-581F e R01-416F foram menores que nos demais genótipos sob restrição hídrica. Maiores teores de N nas folhas foram observadas nas linhagens R01-581F e R01-416F, com efeitos mais evidentes sob restrição hídrica (Figura 3.3).

Sinclair, Purcell e King (2007) observaram maior teor de N foliar nas linhagens R01-416F e R01-581F em relação ao parental Jackson, o que indicou que os atributos herdados tornam as linhagens mais tolerantes à seca, e com maior potencial produtivo nessa condição. Esses resultados corroboram as observações obtidas aos 22 e 42 dias sob seca (Figuras 3.2 e 3.3), em que as linhagens R01-416F e R01-581F apresentaram maiores teores foliares de N em relação aos genótipos cv. Jackson, cv. BRS 317 e R01-1325. Entretanto, maiores teores foliares de N não resultaram em maiores produções de grãos, principalmente para a R01-416F, indicando que, embora o teor foliar de N seja importante para o potencial produtivo, outros fatores também interferem na produção de grãos (QUEIROZ et al., 1996) (Figura 3.3).

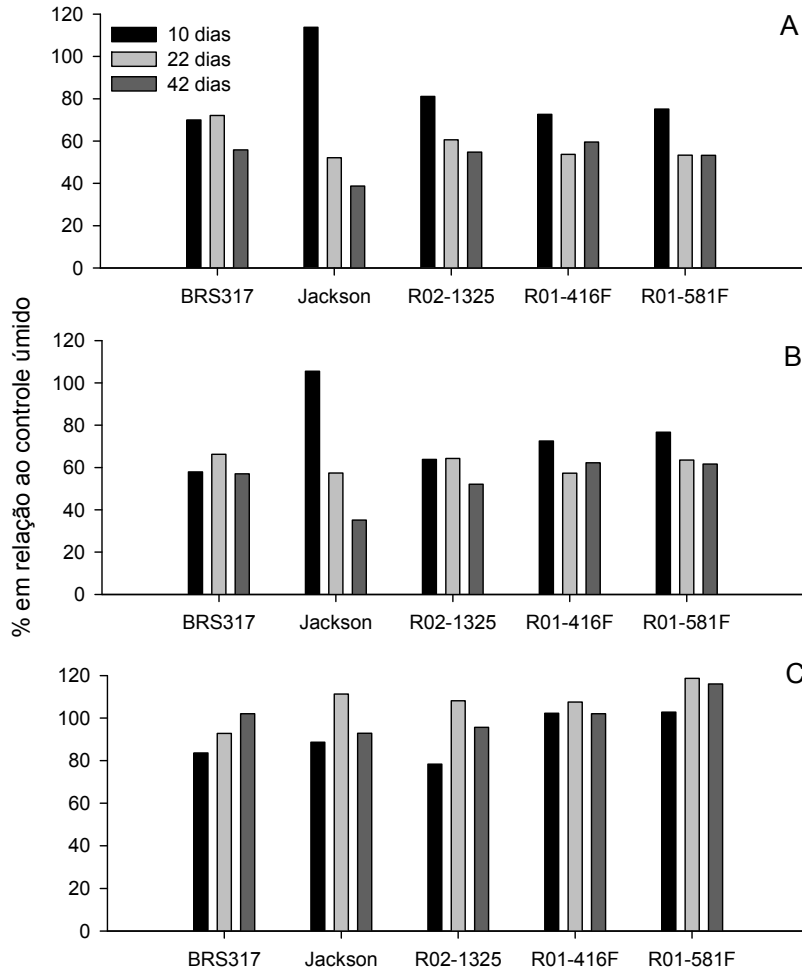
Os resultados obtidos com a variável massa de sementes indicou que a cultivar Jackson e a linhagem R01-581F apresentaram tolerância à restrição hídrica quando aplicada em 30% da CC por até 10 dias durante os estádios de florescimento (Figura 3.1). Igualmente, a cultivar BRS 317, comportou-se como tolerante à seca, porém por até 22 dias sob condição de déficit hídrico a 30% da CC entre os estádios de florescimento e formação das vagens (Figuras 3.1 e 3.2). Entre os genótipos, a linhagem R01-416F apresentou a maior redução na produção de sementes quando exposta à seca nos tempos de 10 dias e 22 dias durante os estádios reprodutivos de florescimento (R₁/R₂) e formação de vagens (R₄). Já a exposição à restrição hídrica por 42 dias (R₆) reduziu o desempenho de todos os genótipos. Contudo, sob condição de pleno fornecimento de água, a maior massa de sementes foi obtida com a linhagem R02-1325 (Figuras 3.1, 3.2 e 3.3). Entre as linhagens, R01-581F e R02-1325 apresentam potencial para uso em programas de melhoramento genético visando tolerância à seca, quando comparadas à R01-416F.

Figura 3.3. Número e massa de nódulos, teor de ureídos (folíolos, pecíolos e nódulos), teor de N nas folhas e massa de sementes por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F), expostos à condição úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) por 42 dias entre os estádios reprodutivos de florescimento (R_1) e enchimento de grãos (R_6).



Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas (condição hídrica, dentro de genótipo) e minúsculas (genótipos, dentro de condição hídrica) não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). CH = Condição hídrica; G = Genótipo; CC = Capacidade de campo.

Figura 3.4. Valores relativos de número (A), massa (B) e massa específica (C) de nódulos de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, linhagens R02-1325, R01-416F e R01-581F) obtido na condição de seca (30% da CC) em relação à condição úmida (80% da CC) aos 10 (R_2), 22 (R_4) e 42 (R_6) dias de exposição à restrição hídrica a partir do estágio R_1 .



3.6 CONCLUSÕES

A restrição hídrica em 30% da capacidade de campo (CC) reduziu a nodulação, o teor de nitrogênio nas folhas e a produção de sementes; e aumentou os teores de ureídeos nos nódulos. Os teores de ureídeos aumentaram nos pecíolos no tempo de exposição à seca por 10 dias no estágio de florescimento.

A produção de sementes identificou a cv. Jackson e a linhagem R01-581F como tolerantes à seca na condição de 30% da CC pelo tempo de exposição de 10 dias durante os estádios reprodutivos de florescimento; a cv. BRS 317 foi considerada tolerante à seca pelo tempo de exposição de 22 dias entre os estádios de florescimento e de formação de vagens.

A linhagem R02-1325 apresentou maior produção de sementes sob

pleno fornecimento de água em 80% da CC e não diferiu das mais produtivas sob seca em 30% da CC.

4 ARTIGO B: COMPONENTES DE PRODUÇÃO EM GENÓTIPOS DE SOJA COM DIFERENTES NÍVEIS DE TOLERÂNCIA À SECA

4.1 RESUMO

A restrição hídrica limita o processo biológico de fixação de nitrogênio (FBN) e, conseqüentemente, reduz o rendimento da cultura da soja (*Glycine max* L. Merr.). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da restrição hídrica em atributos relativos aos componentes de produção de genótipos de soja com distintos níveis de FBN tolerante à seca. O experimento foi realizado em condições controladas, com tratamentos em arranjo fatorial 5x2, sendo cinco genótipos de soja (BRS 317, Jackson, R01-416F, R01-581F e R02-1325) e dois níveis de umidade no substrato: condição úmida (80% da capacidade de campo – CC) e de seca (30% da CC) induzida a partir dos 33 dias após a semeadura entre os estádios de florescimento R₁ e R₂, com avaliações nos tempos de 10 dias em R₂, 22 dias em R₄ e 42 dias em R₆ de exposição à restrição hídrica. As variáveis avaliadas foram: área foliar, massa seca da parte aérea e de raízes, número de vagens e de sementes, massa de sementes por planta e massa de 1000 sementes. A restrição hídrica diminuiu os componentes de produção já nos estádios reprodutivos iniciais e seu efeito se intensificou com o aumento do período de exposição à seca. A cultivar Jackson e a linhagem R01-581F apresentam tolerância à seca por até 10 dias durante o estágio de florescimento. Entretanto, a cultivar BRS 317 apresentou tolerância à seca por até 22 dias entre os estádios de florescimento e de formação de vagens. As linhagens R01-581F e R02-1325 apresentaram maior potencial produtivo do que a R01-416F.

Palavras-chave: *Glycine max*. Componentes de rendimento. Estresse hídrico. Fixação biológica de nitrogênio. Seca.

4.2 ABSTRACT

Water restriction limits the biological process of nitrogen fixation (BNF) and consequently the soybean (*Glycine max* L. Merr.) yield is reduced. The objective of this work was to evaluate the effect of water restriction on attributes related to yield

components of soybean genotypes with distinct levels of BNF drought tolerance. The experiment was conducted under controlled conditions with treatments in a 5 x 2 factorial arrangement, containing five soybean genotypes (cv. BRS 317, Jackson, R01-416F, R01-581F and R02-1325) and two moisture levels in soil: wet (80% of field capacity, FC) and dried (30% of FC) condition initiated in 33 days after sowing in the early flowering stage (R₁). Assessments were performed at different times up to 10 days (R₂ stage), 22 days (R₄) and 42 days (R₆) of exposure to water restriction. The assessed variables were: leaf area, dry mass of shoots and roots, number of pods and seeds, mass of seeds per plant and mass of 1000 seeds. Water restriction decreased the yield components from the early reproductive stages and its effect intensified by increasing the period of exposure. The genotypes cv. Jackson and R01-581F had moderate drought tolerance up to 10 days during the flowering stage. The cv. BRS 317 had moderate drought tolerance up to 22 days during the flowering stage and pod formation. The R01-581F and R02-1325 lines had higher yield potential than R01-416F.

Key words: *Glycine max.* Drought. Biological nitrogen fixation. Yield components. Water stress.

4.3 INTRODUÇÃO

Um dos primeiros processos fisiológicos prejudicados pela exposição da soja (*Glycine max* L. Merr.) à seca é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), cujo declínio está relacionado ao decréscimo da capacidade fotossintética e danos ao complexo nitrogenase (SERRAJ; SINCLAIR; PURCELL, 1999; KUSS et al., 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Períodos longos de déficit hídrico causam mudanças na condição fisiológica na planta, como o aumento da temperatura foliar, o fechamento dos estômatos e o enrolamento dos folíolos causado pela desidratação dos tecidos. A redução da transpiração pode provocar a queda prematura das folhas, flores e vagens, com conseqüente redução do rendimento da cultura (EMBRAPA, 2013). A queda desses componentes da planta sob estresse ocorre pela formação do ácido abscísico (ABA) e pela produção de etileno. Durante períodos de seca, o nível de ABA aumenta e causa o fechamento dos estômatos em poucos minutos para

diminuir a transpiração foliar. Os estômatos se fecham com a perda de solutos das células-guarda, que ficam desidratadas. Essa perda começa quando o ABA produzido nas células do mesófilo atinge os estômatos, desencadeado pelo déficit hídrico (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os efeitos causados pela restrição hídrica sobre o rendimento das culturas dependem da intensidade, duração, época de ocorrência e da interação com outros fatores determinantes da expressão do rendimento final (QUEIROZ et al., 1996). Quando o déficit hídrico ocorre nos primeiros estádios de desenvolvimento vegetativo, a soja se recupera melhor do que outras culturas porque pode tolerar curtos períodos de restrição, tem sistema radicular com profundidade efetiva de 40 cm no campo e período de florescimento relativamente longo (FARIAS et al., 2001).

No entanto, os períodos mais sensíveis ao déficit hídrico em soja são os vegetativos iniciais e os reprodutivos de florescimento e formação das sementes, porque estão diretamente envolvidos nos indicadores dos componentes de produção, entre outros, como o número de plantas por área, o número de vagens por planta, o número de sementes por vagem e a massa média de sementes (CUNHA; BERGAMASCHI, 1992; EMBRAPA, 2013). A sensibilidade da soja ao déficit hídrico, quanto ao rendimento de sementes, aumenta à medida que a cultura avança em seu ciclo, com máxima sensibilidade durante o período reprodutivo, principalmente nos estádios de formação de vagens e de enchimento dos grãos (KORTE et al., 1983; KRON; SOUZA; RIBEIRO, 2008).

A limitação da expansão na área foliar pode ser a primeira reação fisiológica em plantas submetidas ao déficit hídrico, com consequente limitação ao rendimento da cultura (SANTOS; CARLESSO, 1998; NÓBREGA et al., 2001). Thomas e Costa (1994) verificaram que o número de vagens por planta de soja e a massa de sementes foram os componentes mais influenciados pelo déficit hídrico. Observaram também, que o maior índice de área foliar e o maior período de enchimento de grãos proporcionaram maiores rendimentos de sementes no tratamento irrigado.

Fatores ambientais geradores de estresses, como o déficit hídrico, podem afetar negativamente a capacidade de nodulação, aumentar a concentração de ureídeos na região foliar e nos nódulos, e, conseqüentemente, afetar a FBN pelos *Bradyrhizobium* spp. em simbiose com o sistema radicular da soja (CASTRO, 2000;

SOARES, 2007). King e Purcell (2005) avaliaram genótipos de soja tolerantes e suscetíveis ao déficit hídrico em relação à FBN. Os autores verificaram que a cultivar Jackson, tolerante à seca, apresentou menores teores de ureídeos nas folhas; porém, o genótipo KS4895, sensível à seca, manteve maiores teores de ureídeos nas folhas ou de asparagina nos nódulos.

A linhagem R02-1325 foi caracterizada por apresentar FBN tolerante à seca, além de alto potencial produtivo (DEVI et al., 2014). Similarmente, Chen et al. (2007) relataram que as linhagens R01-416F e R01-581F possuem alto potencial de rendimento de grãos e ao mesmo tempo apresentam característica de FBN tolerante à seca moderada. Essas linhagens são resultantes do cruzamento entre os genótipos de soja Jackson (FBN tolerante à seca) e KS4895 (alto rendimento). A cv. Jackson, desde seu lançamento em 1953, foi caracterizada por apresentar FBN tolerante à seca (SERRAJ; SINCLAIR, 1996).

Como existe variabilidade entre os genótipos de soja quanto aos atributos relativos à FBN frente à seca, faz-se necessário promover estudos locais para se identificar mais precisamente os fatores envolvidos na tolerância. No entanto, os efeitos do déficit hídrico sobre a FBN e sobre os componentes de produção em soja também dependem da duração e da intensidade da seca. O estágio de desenvolvimento em que ocorre a restrição hídrica também pode influenciar nos efeitos sobre a cultura, principalmente nos estádios reprodutivos mais críticos (FARIAS et al., 2001; LADRERA et al., 2007; KRON; SOUZA; RIBEIRO, 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de genótipos de soja com distintos níveis de tolerância à seca em relação à FBN, quanto aos componentes de produção, durante diferentes tempos de exposição à restrição hídrica entre os estádios reprodutivos de florescimento e de enchimento de grãos.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado durante a safra agrícola 2013/2014, em casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, com temperatura variando entre 25 °C e 30 °C, UR% entre 70% e 85%, latitude 23°22' S, longitude 51°12' W e altitude 585 m. A semeadura ocorreu em 29 de novembro de 2013 e a colheita em 04 de abril de

2014.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições, em arranjo fatorial 5x2, cujos fatores foram cinco genótipos de soja, as variedades BRS 317 e Jackson e as linhagens R01-416F, R01-581F e R02-1325, combinadas com duas condições hídricas, suprimento pleno de água a 80% da capacidade de campo - CC (condição úmida) e de exposição à restrição hídrica a 30% da CC (condição seca), a partir dos estádios de florescimento, entre R₁ e R₂, 33 dias após a semeadura (DAS), até os tempos de exposição à seca de 10 dias durante o estádio R₂ (43 DAS), de 22 dias em R₄ (55 DAS) e de 42 dias em R₆ (75 DAS) (FEHR; CAVINESS, 1977).

A cv. BRS 317 é uma variedade de soja convencional, com alto potencial produtivo, desenvolvida pela Embrapa Soja e indicada para o cultivo nos Estados do PR, SP, SC e sul do MS. Tem tipo de crescimento determinado, grupo de maturidade 6.6 (Brasil) e ciclo de 122 a 128 dias numa altitude de 500 a 800 m (EMBRAPA, 2010). Embora não haja divulgação da característica de tolerância ou sensibilidade à seca para a cv. BRS-317, alguns autores relataram que essa cultivar é sensível à seca em relação à FBN (CEREZINI et al., 2014). No entanto, a cv. BRS 317 é indicada pela FUNDAÇÃO MS como moderadamente tolerante ao déficit hídrico para a região sul do Mato Grosso do Sul (PITOL, 2015). A cultivar Jackson foi desenvolvida nos Estados Unidos em 1953, com grupo de maturidade VII (EUA), e tem sido caracterizada como tolerante à seca em relação à FBN desde seu lançamento. As linhagens R02-1325, R01-416F e R01-581F foram desenvolvidas nos Estados Unidos na Estação Experimental Agrícola do Arkansas, e lançadas com grupo de maturidade V (EUA). Possuem características de manutenção da FBN em condições de déficit hídrico moderado e alto potencial produtivo (CHEN et al., 2007; DEVI et al., 2014).

As disponibilidades hídricas foram determinadas diariamente a partir da massa de água (kg) contida em cada vaso, correspondente ao volume em litros, e restabelecidas uma vez ao dia com base na reposição do volume perdido pela evapotranspiração. Foi estabelecida a massa de água aplicada ao tratamento em condição de suprimento pleno como 80% da capacidade de campo (CC) e de restrição hídrica, quando aplicada, em 30% da CC (ALBUQUERQUE, 2010).

A exposição à restrição hídrica (30% da CC) foi iniciada aos 33 DAS, em metade das parcelas experimentais quando os genótipos se encontravam entre

os estádios de florescimento R_1 e R_2 . As avaliações foram realizadas em três tempos de exposição à condição de 30% da CC (seca), ou seja, aos 43 DAS, após 10 dias de seca, durante o estádio de florescimento pleno (R_2); aos 55 DAS, após 22 dias sob seca, durante o estádio de vagens formadas (R_4); e, aos 75 DAS, após 42 dias sob seca, durante o estádio de grãos formados e verdes (R_6).

As linhagens se apresentaram mais precoces que as variedades de soja. Assim, os tempos para as avaliações foram determinados quando mais de 50% das parcelas experimentais se encontravam nos respectivos estádios reprodutivos, dentro das condições de seca ou úmida. Cada tempo de avaliação (10 dias, 22 dias e 42 dias) foi considerado um ensaio distinto para fins de análise estatística.

Cada parcela experimental foi constituída por um vaso de polietileno na cor mármore, para minimizar os efeitos da radiação solar, com capacidade para 9 L, preenchido com 8 kg de um substrato na proporção 3:1 (terra:areia), com terra obtida da camada 0-20 cm de um solo comercial cultivado com soja (Latosolo Vermelho distroférico de textura argilosa) e areia fina lavada de rio para evitar a compactação. Amostras do substrato foram analisadas para fins de fertilidade (SILVA, 2009), cujos resultados são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Resultados da análise química de um substrato contendo terra argilosa e areia da proporção 3:1 (terra:areia).

pH	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Al ³⁺	H ⁺ +Al ³⁺	CTC	V%	C	MO	P
CaCl ₂	----- cmol _c dm ⁻³ -----							----- g kg ⁻¹ -----		mg dm ⁻³
6,80	8,20	0,83	0,64	0,00	2,54	12,21	79,20	7,00	12,10	47,49

Análise química do solo – AQS (SILVA, 2009)

Para a determinação do pH foi estimada a atividade do íon H⁺ na suspensão do substrato, utilizando-se solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) e leitura por meio de um potenciômetro. A determinação da acidez trocável (Al³⁺) foi com o extrator cloreto de potássio (KCl) e a leitura realizada por titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH). A acidez potencial (H⁺ + Al³⁺) foi determinada com o uso de solução tampão SMP (método de Shoemaker, McLean e Pratt) e leitura por meio de um potenciômetro, com resultado obtido pela conversão do valor da leitura conforme tabela obtida pela resolução de equações de regressão.

Os teores de cálcio (Ca²⁺) e magnésio (Mg²⁺) trocáveis foram extraídos com KCl e determinados por titulação com EDTA. O fósforo (P) e o

potássio (K^+) foram determinados em solução extratora de Mehlich-1. O teor de P foi obtido por leitura em espectrofotômetro a 630 nm e construção de curva de calibração. O teor de K^+ foi obtido por leitura em fotômetro de chama e construção de curva de calibração. A determinação de carbono (C) foi realizada conforme método Walkley-Black, em que a matéria orgânica foi oxidada por íons dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) em meio fortemente ácido. O excesso de $Cr_2O_7^{2-}$ foi titulado com $FeSO_4$ e o teor de matéria orgânica (MO) calculado pela quantidade de $Cr_2O_7^{2-}$ reduzido. A relação entre o teor de MO e de C é de 1,724.

Antes da semeadura, as sementes de soja foram inoculadas com inoculante turfoso comercial contendo $7,2 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia por grama (garantia do fabricante), contendo as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium* spp. No estágio V_2 (primeiro trifólio totalmente desenvolvido) as plantas foram desbastadas e duas foram mantidas por vaso.

O efeito do regime hídrico aplicado (úmido ou seco) foi avaliado por determinações não destrutivas na parte aérea das plantas durante os estádios R_2 , R_4 e R_6 pelas variáveis: condutância estomática ($mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$) (Leaf Porometer, Model SC-1, Decagon Devices, Inc) e temperatura foliar ($^{\circ}C$) (Termômetro Mira Laser, Incoterm). As determinações foliares ocorreram no folíolo central do 3º trifólio totalmente desenvolvido a partir do ápice do caule principal das plantas.

As plantas foram mantidas com umidade de 80% da CC até os estádios de florescimento (33 DAS) entre R_1 e R_2 , a partir do qual, metade das parcelas de cada genótipo foram expostas à restrição hídrica correspondente a 30% da CC até 75 DAS durante o estágio de pleno enchimento de grãos verdes R_6 , e na sequência, novamente, mantidas sob condição úmida até a colheita. Em cada um dos tempos de exposição à seca (10 dias, 22 dias e 42 dias), cinco repetições de cada tratamento (cinco genótipos x duas condições hídricas) dentro de cinco blocos foram aleatoriamente amostradas para as análises destrutivas correspondentes. Em R_8 , no estágio de maturação (127 DAS), as parcelas experimentais não expostas e as expostas aos tempos de seca foram coletadas para determinação do rendimento, totalizando 250 parcelas.

As variáveis avaliadas foram: área foliar (cm^2), massa seca da parte aérea (g), massa seca de raízes (g), número de vagens, número de sementes, massa de sementes (g) e massa de 1000 sementes (g) por planta.

A área foliar (cm^2) por planta foi determinada utilizando-se

equipamento medidor de área foliar de bancada (Area Meter, LI-3100, LI-COR). A parte aérea e as raízes por planta foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até atingirem massa constante (g). Em R₈, as vagens foram coletadas e contadas; as sementes foram contadas e a massa de sementes (g) corrigida para 13% de umidade.

As massas de sementes foram obtidas a partir de plantas expostas ou não aos diferentes tempos de exposição à seca (10, 22 e 42 dias), após a colheita no estágio de maturação plena (R₈). A massa de 1000 sementes foi obtido pela razão entre massa e número de sementes multiplicado por 1000.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estômatos são a principal rota para as trocas gasosas. Sua abertura influencia na taxa transpiratória e no balanço energético nas plantas. O fechamento dos estômatos em resposta à seca afeta toda a planta porque compromete o desempenho dos processos de fotossíntese e de FBN. Nascimento et al. (2011) observaram a condutância estomática diminuir em 72% e a temperatura foliar aumentar em 12% em plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata*) expostas à seca. O presente ensaio confirma esses dados, pois a restrição hídrica reduziu a condutância estomática em 73% e aumentou a temperatura foliar em cerca de 5% (Tabela 4.2). Assim, à medida que os estômatos se fecharam, a transpiração diminuiu, e a temperatura foliar aumentou, fato também observado por alguns autores (GUIMARÃES; STONE, 2010; CERZINI et al., 2014).

Santos e Carlesso (1998) e Nóbrega et al. (2001) observaram que a limitação da expansão na área foliar pode ser a primeira reação fisiológica em plantas submetidas ao déficit hídrico, com consequente limitação ao rendimento da cultura. O presente trabalho corrobora essas observações, porque a área foliar foi reduzida quando as plantas foram expostas à restrição hídrica. Essa redução foi de 34,3% quando expostas por 10 dias de seca entre os estádios R₁ e R₂, em 44,7% após 22 dias de seca até o estágio R₄ e em 49,5% após 42 dias de seca até R₆, quando comparadas ao controle a 80% da CC (Tabela 4.3).

Tabela 4.2. Temperatura foliar e condutância estomática na parte aérea de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca, expostos à condição úmida (80% da CC) ou seca (30% da CC) durante o tempo de 42 dias entre os estádios de florescimento e enchimento dos grãos.

Variáveis	Temperatura Foliar			Condutância Estomática		
	(° C)			(mmol m ⁻² s ⁻¹)		
Tratamentos	Seca	Úmida	% (+)	Seca	Úmida	% (-)
BRS 317	25,7	24,4	5,6	132,1	562,2	76,5
Jackson	25,7	24,2	6,2	139,1	551,0	74,8
R02-1325	25,3	24,0	5,1	126,3	664,5	81,0
R01-416F	25,5	24,5	4,1	195,4	606,0	67,8
R01-581F	24,8	24,3	2,2	188,9	539,8	65,0
Médias	25,4	24,3	4,6	156,4	584,7	73,0

% (+) = porcentagem de aumento da temperatura das folhas sob seca.

% (-) = porcentagem de redução da condutância estomática das folhas sob seca.

Comparativamente, a área foliar não diferiu entre os genótipos expostos à seca até 10 dias no estágio R₂. No tempo de exposição à seca por 22 dias até R₄, a área foliar foi maior na cv. BRS 317 e diferiu da linhagem R01-416F, que foi menor sob seca. No tempo de 42 dias até R₆, as maiores áreas foliares foram observadas nas cultivares BRS 317 e Jackson, que diferiram das linhagens R02-1325 e R01-416F expostas à seca. A linhagem R01-416F apresentou a menor área foliar sob seca, o que determinou sua desvantagem produtiva (Tabelas 4.3 e 4.9).

A restrição hídrica reduziu a massa seca da parte aérea (MSPA) dos genótipos em 18,8% aos 10 dias de exposição à seca, em 37,1% aos 22 dias e em 45,9% aos 42 dias, quando comparados com o controle úmido. Não houve diferenças para a MSPA (seca ou úmida) entre os genótipos, nos três tempos avaliados de exposição à condição de 30% da CC, exceto a linhagem R01-416F que foi menor na condição úmida em R₆, porque sua senescência natural ocorreu mais cedo (Tabela 4.4).

Sob restrição hídrica, os resultados de área foliar se apresentaram coesos com os de produção de sementes (Tabelas 4.3 e 4.9), enquanto que na condição de pleno fornecimento de água, foram os resultados de massa seca da parte aérea que foram coerentes à produção de sementes, principalmente a linhagem R02-1325 (Tabelas 4.4 e 4.9). Comparativamente, a redução de massa seca da parte aérea foi semelhante à redução percentual de massa de sementes

nos períodos expostos à seca (Figura 4.1).

Tabela 4.3. Área foliar (cm²) por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca, expostos à condição úmida (80% CC) ou seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R₁ e R₂, pelos tempos de 10 dias até o estádio R₂, 22 dias até R₄ e 42 dias até R₆.

Condição	Genótipos				
	BRS 317	Jackson	R02-1325	R01-416F	R01-581F
Hídrica					
10 dias	(cm ² planta ⁻¹)				
Seca	836 Ba	966 Ba	847 Ba	964 Ba	959 Ba
Úmida	1222 Ab	1452 Aab	1289 Aab	1491 Aa	1510 Aa
CV% = 11,42	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) = 0,002	Valor de P (CHxG) = 0,645	
22 dias	(cm ² planta ⁻¹)				
Seca	1574 Ba	1520 Bab	1449 Bab	1136 Bb	1459 Bab
Úmida	2876 Aa	2923 Aa	2379 Ab	2218 Ab	2526 Aab
CV% = 11,37	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) < 0,001	Valor de P (CHxG) = 0,157	
42 dias	(cm ² planta ⁻¹)				
Seca	1893 Ba	1703 Ba	1251 Bbc	1125 Bc	1560 Bab
Úmida	4178 Aa	3516 Ab	2378 Ad	2063 Ad	2782 Ac
CV% = 8,53	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) < 0,001	Valor de P (CHxG) < 0,001	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). CH = Condição hídrica; G = Genótipo. DAS = Dias após a semeadura. CC = Capacidade de campo.

Tabela 4.4. Massa seca da parte aérea (g) por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca, expostos à condição úmida (80% CC) ou seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R₁ e R₂, pelos tempos de 10 dias até o estádio R₂, 22 dias até R₄ e 42 dias até R₆.

Condição	Genótipos				
	BRS 317	Jackson	R02-1325	R01-416F	R01-581F
Hídrica					
10 dias	(g planta ⁻¹)				
Seca	4,48 Ba	4,62 Ba	4,71 Ba	5,15 Ba	5,18 Ba
Úmida	5,55 Aa	5,79 Aa	6,29 Aa	6,02 Aa	6,13 Aa
CV% = 10,28	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) = 0,067	Valor de P (CHxG) = 0,656	
22 dias	(g planta ⁻¹)				
Seca	8,60 Ba	8,26 Ba	9,98 Ba	8,61 Ba	8,76 Ba
Úmida	13,35 Aa	14,13 Aa	14,71 Aa	14,00 Aa	14,03 Aa
CV% = 10,84	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) = 0,149	Valor de P (CHxG) = 0,827	
42 dias	(g planta ⁻¹)				
Seca	16,25 Ba	13,98 Ba	17,51 Ba	16,59 Ba	17,44 Ba
Úmida	32,95 Aa	30,05 Aa	31,73 Aa	25,19 Ab	31,12 Aa
CV% = 8,91	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) < 0,001	Valor de P (CHxG) = 0,001	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). CH = Condição hídrica; G = Genótipo. DAS = Dias após a semeadura. CC = Capacidade de campo.

James, Lawn e Cooper (2008) pesquisaram aspectos da fisiologia das folhas de diferentes genótipos de soja com o intuito de identificar materiais que apresentassem melhor produtividade sob seca intermitente. Os autores relataram

estudos comparativos de outros pesquisadores que indicaram que a soja é mais sensível à seca do que outras espécies de leguminosas produtoras de grãos, em parte porque as plantas entraram em senescência mais rapidamente, de acordo com a intensidade com que foram expostas à seca (SINCLAIR; LUDLOW, 1986; MORGAN, 1992; LIKOSWE; LAWN, 2008). Nesse sentido, Thomas e Costa (1994) identificaram que maior área foliar e maiores períodos de enchimento de grãos ocorreram em condição de pleno fornecimento de água, e que o número de vagens e a massa de sementes por planta de soja foram os componentes mais afetados pelo déficit hídrico.

As raízes, diferentemente da parte aérea, não foram influenciadas pela seca nos estádios reprodutivos iniciais, porque a planta exposta à seca provavelmente deixou de desenvolver parte aérea para investir em raízes. O efeito dos 10 dias de restrição hídrica reduziu apenas a massa seca de raízes da linhagem R02-1325; após 22 dias de seca não houve diferenças entre os genótipos nas condições seca e úmida. No entanto, a seca após 42 dias reduziu a massa de raízes dos genótipos BRS 317, Jackson e R01-581F, comparados ao controle úmido. Na comparação entre os genótipos, não se observaram diferenças aos 22 dias de seca, porém diferenças foram notadas aos 10 dias e aos 42 dias de seca. Em R₂ (10 dias), a linhagem R01-581F apresentou maior massa de raízes em relação a cv. Jackson. Em R₆ (42 dias) as variedades BRS 317 e Jackson apresentaram maiores valores quando comparadas às três linhagens de soja (Tabela 4.5).

O número de vagens por planta sofreu redução média de 26,9% quando os genótipos foram expostos à seca por 10 dias, 38% de redução por 22 dias e 46,9% de redução por 42 dias, quando comparado ao controle úmido (Figura 4.1). No entanto, a cultivar BRS 317, aos 10 dias de exposição à restrição hídrica durante os estádios de florescimento, não apresentou diferença significativa entre as médias de condição seca e úmida, o que pode indicar sua tolerância à seca durante esse tempo (Tabela 4.6).

Na comparação entre os genótipos expostos à seca, a cv. BRS 317 apresentou o maior número de vagens, não diferindo da cv. Jackson, mas foi superior às três linhagens, cuja menor média foi da R02-1325 aos 10 dias em R₂. Aos 22 dias, já em R₄, a cv. BRS 317 apresentou número de vagens significativamente maior que as linhagens R02-1325 e R01-416F sob seca. Em R₆, a cv. Jackson foi superior a R02-1325, que apresentou o menor número de vagens

sob seca. Não houve diferenças significativas para o número de vagens entre os cinco genótipos expostos à condição úmida (Tabela 4.6).

Tabela 4.5. Massa seca de raízes (g) por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca, expostos à condição úmida (80% CC) ou seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R₁ e R₂, pelos tempos de 10 dias até o estádio R₂, 22 dias até R₄ e 42 dias até R₆.

Condição	Genótipos				
Hídrica	BRS 317	Jackson	R02-1325	R01-416F	R01-581F
10 dias	(g planta ⁻¹)				
Seca	2,04 Aab	1,94 Ab	1,98 Bab	2,19 Aab	2,28 Aa
Úmida	2,07 Aab	1,98 Ab	2,28 Aab	2,32 Aa	2,29 Aab
CV% = 8,55	Valor de P (CH) = 0,055		Valor de P (G) = 0,002	Valor de P (CHxG) = 0,346	
22 dias	(g planta ⁻¹)				
Seca	2,85 Aa	3,18 Aa	2,98 Aa	2,92 Aa	3,19 Aa
Úmida	2,64 Ab	3,74 Aa	2,98 Aab	3,35 Aab	2,98 Aab
CV% = 17,46	Valor de P (CH) = 0,453		Valor de P (G) = 0,074	Valor de P (CHxG) = 0,357	
42 dias	(g planta ⁻¹)				
Seca	4,06 Ba	4,73 Ba	2,86 Ab	2,13 Ab	2,73 Bb
Úmida	5,32 Ab	6,87 Aa	3,28 Acd	2,33 Ad	3,73 Ac
CV% = 13,90	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) < 0,001	Valor de P (CHxG) = 0,002	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). CH = Condição hídrica; G = Genótipo. DAS = Dias após a semeadura. CC = Capacidade de campo.

Tabela 4.6. Número de vagens por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca, expostos à condição úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R₁ e R₂, pelos tempos de 10 dias até o estádio R₂, 22 dias até R₄ e 42 dias até R₆.

Condição	Genótipos				
Hídrica	BRS 317	Jackson	R02-1325	R01-416F	R01-581F
10 dias	(n° planta ⁻¹)				
Seca	54,00 Aa	49,50 Bab	34,50 Bc	39,20 Bbc	41,60 Bbc
Úmida	58,20 Aa	64,80 Aa	55,80 Aa	59,10 Aa	61,50 Aa
CV% = 11,73	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) < 0,001	Valor de P (CHxG) = 0,019	
22 dias	(n° planta ⁻¹)				
Seca	47,10 Ba	38,40 Bab	30,30 Bb	30,20 Bb	39,50 Bab
Úmida	58,20 Aa	64,80 Aa	55,80 Aa	59,10 Aa	61,50 Aa
CV% = 11,83	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) = 0,001	Valor de P (CHxG) = 0,012	
42 dias	(n° planta ⁻¹)				
Seca	32,80 Bab	37,90 Ba	24,90 Bb	29,70 Bab	33,70 Bab
Úmida	58,20 Aa	64,80 Aa	55,80 Aa	59,10 Aa	61,50 Aa
CV% = 12,08	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) = 0,002	Valor de P (CHxG) = 0,825	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). CH = Condição hídrica; G = Genótipo. DAS = Dias após a semeadura. CC = Capacidade de campo.

O número de sementes por planta da cv. BRS 317 não diferiu entre as condições hídricas, nos primeiros 10 dias de exposição à seca durante o estádio

de florescimento R₂, indicando sua tolerância à seca nas fases iniciais do período reprodutivo. No entanto, os demais genótipos expostos à seca apresentaram redução quando comparados ao controle úmido (Tabela 4.7).

A restrição hídrica por 22 dias no estágio R₄ e por 42 dias em R₆ reduziu o número de sementes em todos os genótipos. As reduções foram, 26,7% quando o período de seca foi por 10 dias, 37,1% por 22 dias e 48,4% por 42 dias, comparados com o controle úmido (Tabela 4.7 e Figura 4.1).

A avaliação entre os genótipos demonstrou que a cv. BRS 317 apresentou o maior número de sementes em exposição à seca até R₂, sem diferir de R01-581F nesse estágio. Em R₄, novamente o cv. BR 317 apresentou a maior média sob seca, sem diferir das linhagens R01-581F e R02-1325. A exposição à seca por 42 dias (R₆) igualou os genótipos. Na condição úmida, a linhagem R02-1325 apresentou o maior número de sementes em relação aos genótipos Jackson e BRS 317 (Tabela 4.7).

Tabela 4.7. Número de sementes por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância à seca, expostos à condição úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R₁ e R₂, pelos tempos de 10 dias até o estágio R₂, 22 dias até R₄ e 42 dias até R₆.

Condição	Genótipos				
	BRS 317	Jackson	R02-1325	R01-416F	R01-581F
10 dias	(n° planta ⁻¹)				
Seca	114,10 Aa	94,40 Bb	83,70 Bb	79,60 Bb	95,00 Bab
Úmida	115,00 Ab	116,70 Ab	141,40 Aa	119,50 Ab	131,50 Aab
CV% = 11,04	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) = 0,029	Valor de P (CHxG) < 0,001	
22 dias	(n° planta ⁻¹)				
Seca	96,60 Ba	71,50 Bb	73,00 Bab	65,00 Bb	86,50 Bab
Úmida	115,00 Ab	116,70 Ab	141,40 Aa	119,50 Aab	131,50 Aab
CV% = 13,19	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) = 0,017	Valor de P (CHxG) = 0,004	
42 dias	(n° planta ⁻¹)				
Seca	65,70 Ba	70,10 Ba	58,40 Ba	57,90 Ba	70,20 Ba
Úmida	115,00 Ab	116,70 Ab	141,40 Aa	119,50 Aab	131,50 Aab
CV% = 13,13	Valor de P (CH) < 0,001		Valor de P (G) = 0,120	Valor de P (CHxG) = 0,019	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). CH = Condição hídrica; G = Genótipo. DAS = Dias após a semeadura. CC = Capacidade de campo.

A variável massa de sementes indicou que a cv. Jackson e a linhagem R01-581F apresentaram tolerância à restrição hídrica por até 10 dias durante os estádios reprodutivos de florescimento R₁ e R₂. A adaptação ao ambiente favoreceu a cv. BRS 317, comportando-se como tolerante à seca por até 22 dias sob

déficit hídrico. Entre os genótipos, os piores resultados foram observados para a linhagem R01-416F, com redução na produção de sementes nos tempos de 10 dias e 22 dias de seca entre os estádios reprodutivos de florescimento R₂ e formação das vagens R₄. Já a exposição à restrição hídrica por 42 dias em R₆ reduziu a massa de sementes em todos os genótipos. Contudo, sob condição de pleno fornecimento de água, a maior massa de sementes foi obtida com a linhagem R02-1325. Nesse aspecto, as linhagens R01-581F e R02-1325 foram mais eficientes que a R01-416F (Tabela 4.8), o que foi corroborado por Cerezini et al. (2014) ao concluírem que a linhagem R01-581F confirmou a sua tolerância frente à restrição hídrica, devido à sua capacidade para abrandar os efeitos da seca na planta como um todo.

Tabela 4.8. Massa de sementes (g) por planta de genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância à seca, expostos à condição úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R₁ e R₂, pelos tempos de 10 dias até o estádio R₂, 22 dias até R₄ e 42 dias até R₆.

Condição	Genótipos				
	BRS 317	Jackson	R02-1325	R01-416F	R01-581F
10 dias	(g planta ⁻¹)				
Seca	16,09 Aa	16,33 Aa	14,81 Ba	9,92 Bb	14,12 Aab
Úmida	16,85 Ab	16,70 Ab	21,76 Aa	16,17 Ab	17,11 Ab
CV% = 14,64	Valor de P(CH) < 0,001		Valor de P(G) < 0,001	Valor de P(CHxG) = 0,006	
22 dias	(g planta ⁻¹)				
Seca	14,67 Aa	12,17 Bab	12,35 Bab	9,89 Bb	11,65 Bab
Úmida	16,85 Ab	16,70 Ab	21,76 Aa	16,17 Ab	17,11 Ab
CV% = 16,68	Valor de P(CH) < 0,001		Valor de P(G) = 0,011	Valor de P(CHxG) = 0,040	
42 dias	(g planta ⁻¹)				
Seca	9,45 Ba	10,22 Ba	11,02 Ba	8,62 Ba	10,15 Ba
Úmida	16,85 Ab	16,70 Ab	21,76 Aa	16,17 Ab	17,11 Ab
CV% = 16,39	Valor de P(CH) < 0,001		Valor de P(G) = 0,004	Valor de P(CHxG) = 0,258	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). CH = Condição hídrica; G = Genótipo. DAS = Dias após a semeadura. CC = Capacidade de campo.

Pesquisadores têm se esforçado em examinar os efeitos da seca em diferentes estádios de desenvolvimento e as consequências sobre a produção de soja (KU et al., 2013). Brown, Brown e Caviness (1985) avaliaram quatro cultivares de crescimento determinado e verificaram que a seca iniciada em R₂ ou R₄ reduziu de forma significativa os componentes de rendimento. Eck, Mathers e Musick (1987) analisaram os efeitos da seca em vários estádios de crescimento sobre o rendimento de sementes de cultivares de soja e verificaram que a perda de rendimento foi mais grave quando o déficit hídrico foi aplicado durante todo o período de

desenvolvimento da semente, entre R_5 e R_7 , com redução média de 45% a 88%. Também, Desclaux, Huynh e Roumet (2000) analisaram os componentes de rendimento sob estresse hídrico aplicado em diferentes estádios de desenvolvimento, com condição de estresse atingida com a interrupção da irrigação por 4 ou 5 dias até que os níveis de umidade no solo atingissem 30% ou 50% da CC. Eles observaram que o efeito mais grave foi durante o período de formação das sementes. Assim, um dos períodos mais sensíveis para a soja sob seca é o de enchimento de grãos porque está envolvido diretamente com formação dos componentes de rendimento (CUNHA; BERGAMASCHI, 1992; CASAGRANDE, 2001; KUSS et al., 2008; EMBRAPA, 2013). Nesse sentido, períodos cumulativos de seca até o estádio em que as sementes estão formadas, como o de 42 dias até R_6 não selecionaram características de tolerância à seca entre os genótipos. Períodos de até 10 dias no florescimento (R_2) e de até 22 dias de seca na formação de vagens (R_4) apresentaram-se melhores para avaliar genótipos com tolerância à seca com base nos componentes de rendimento (Tabela 4.8).

A variável massa de 1000 sementes serve de parâmetro para se identificar o tamanho do grão. Quando exposta à seca por 10 dias entre os estádios reprodutivos de florescimento (R_1 e R_2), a cv. Jackson apresentou aumento da massa de 1000 sementes (g) em 23,6%, comparado ao controle úmido. Os demais genótipos não diferiram entre a condição seca e úmida. Quando a restrição hídrica perdurou até R_4 , os 22 dias de seca não resultaram em diferenças entre os genótipos nas duas condições hídricas. Porém, o tratamento com 42 dias de seca (R_6) aumentou a massa de 1000 sementes da linhagem R02-1325 em 27,1%, comparado ao controle úmido. As médias não diferiram entre os genótipos na condição úmida, porém quando foram expostos à seca por 10 dias (R_2) a cv. BRS 317 e a linhagem R01-416F apresentaram resultados inferiores em relação a Jackson e a R02-1325. Com o aumento da exposição à seca por 42 dias (R_6), a cv. BRS 317 foi inferior a R02-1325 em 20,5% (Tabela 4.9).

A exposição à seca não afetou a variável massa de 1000 sementes para todos os genótipos, e as linhagens não diferiram em comparação ao seu controle úmido. No entanto, com a exposição à seca, observou-se que a cv. Jackson e a linhagem R02-1325 obtiveram os maiores resultados, principalmente nos estádios iniciais até 22 dias de seca (Tabela 4.9). Vinhal-Freitas et al. (2011) avaliaram a massa de 1000 sementes em soja e concluíram que houve efeito

significativo do tamanho das sementes de soja em relação ao vigor, pois sementes de maior tamanho demonstraram maior qualidade fisiológica nos testes avaliados. No entanto, Perin, Araújo e Teixeira (2002) avaliaram o efeito do tamanho da semente na acumulação de biomassa, nutrientes e na produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e concluíram que não houve efeito do tamanho da semente na produção de grãos, componentes de produção e índice de colheita, porque sementes de maior tamanho anteciparam o crescimento do feijoeiro, mas plantas originadas de sementes pequenas compensaram seu menor crescimento inicial e garantiram a mesma produção de grãos.

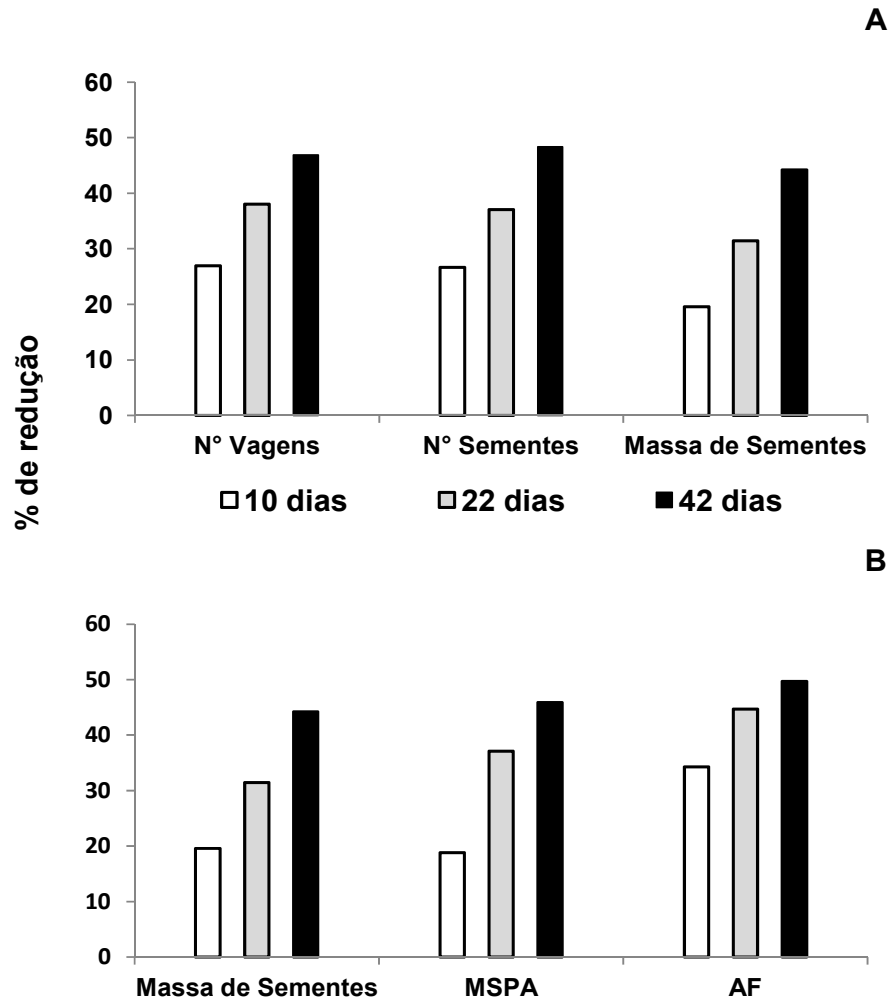
Tabela 4.9. Massa de 1000 sementes (g) de genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância à seca, expostos à condição hídrica úmida (80% CC) ou de seca (30% CC) a partir de 33 DAS nos estádios de florescimento entre R₁ e R₂, pelos tempos de 10 dias até o estádio R₂, 22 dias até R₄ e 42 dias até R₆.

Condição	Genótipos				
Hídrica	BRS 317	Jackson	R02-1325	R01-416F	R01-581F
10 dias	(g)				
Seca	141,84 Ab	178,67 Aa	178,22 Aa	123,70 Ab	148,79 Aab
Úmida	146,81 Aa	144,47 Ba	154,27 Aa	135,79 Aa	129,42 Aa
CV% = 13,10	Valor de P (CH) = 0,034		Valor de P (G) = 0,001	Valor de P (CHxG) = 0,053	
22 dias	(g)				
Seca	153,33 Aa	172,85 Aa	169,53 Aa	155,69 Aa	133,36 Aa
Úmida	146,81 Aa	144,47 Aa	154,27 Aa	135,79 Aa	129,42 Aa
CV% = 15,98	Valor de P (CH) = 0,035		Valor de P (G) = 0,056	Valor de P (CHxG) = 0,782	
42 dias	(g)				
Seca	143,96 Ab	144,99 Aab	196,10 Aa	148,94 Aab	145,63 Aab
Úmida	146,81 Aa	144,47 Aa	154,27 Ba	135,79 Aa	129,42 Aa
CV% = 19,05	Valor de P (CH) = 0,095		Valor de P (G) = 0,041	Valor de P (CHxG) = 0,438	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). CH = Condição hídrica; G = Genótipo. DAS = Dias após a semeadura.

O déficit hídrico reduziu a massa de sementes dos genótipos, com porcentagem média de 19,6% pela exposição à seca por 10 dias, 31,4% pela exposição por 22 dias e 44,2% pela exposição por 42 dias. Conforme Specht, Hume e Kumudini (1999), períodos de seca chegam a reduzir o rendimento em cerca de 40%, fato também observado neste trabalho (Figura 4.1).

Figura 4.1. Porcentagem de redução média do (A) n° de vagens, n° de sementes e massa de sementes e da (B) massa de sementes, massa seca da parte aérea (MSPA) e área foliar (AF) dos genótipos de soja cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F sob seca (30% da capacidade de campo - CC), comparados à condição úmida (80% da CC), nos tempos de 10 dias até o estágio R₂, 22 dias até R₄ e 42 dias até R₆.



4.6 CONCLUSÕES

A restrição hídrica diminuiu os componentes de produção desde os estádios reprodutivos iniciais e seu efeito se intensificou com o aumento do tempo de exposição à seca.

A cv. Jackson e a linhagem R01-581F foram tolerantes à seca por até 10 dias no florescimento e a cv. BRS 317 foi tolerante à seca por até 22 dias de exposição a uma umidade de 30% da CC, entre os estádios de florescimento e de formação das vagens.

As linhagens R02-1325 e R01-581F não diferiram dos genótipos mais produtivos e apresentaram maior potencial que a R01-416F

5 ARTIGO C: ESTRESSE OXIDATIVO E ENZIMA ASSIMILATÓRIA DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA COM DIFERENTES NÍVEIS DE TOLERÂNCIA À SECA

5.1 RESUMO

O déficit hídrico pode limitar a produtividade da cultura da soja (*Glycine max* L. Merr.) como consequência do estresse oxidativo e do prejuízo ao processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da restrição hídrica sobre enzima envolvida na assimilação do N e ao estresse oxidativo em genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância da FBN à seca. O experimento foi realizado em condições controladas, com tratamentos em arranjo fatorial 5x2, com cinco genótipos de soja (BRS 317, Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) e dois níveis de umidade no solo: condição úmida (80% da capacidade de campo – CC) e de seca (30% da CC) iniciada no florescimento entre R₁ e R₂, e mantida por até 10 dias em R₂, até 22 dias em R₄ e até 42 dias em R₆. Avaliaram-se a concentração de amônio (NH₄⁺) e de nitrato (NO₃⁻), a atividade específica das enzimas glutamina sintetase (GS), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e a peroxidação de lipídios em folhas e raízes. A concentração de NH₄⁺ reduziu e a de NO₃⁻ aumentou nas folhas com o aumento do tempo de exposição à seca. A linhagem R02-1325 manteve a atividade da GS nos nódulos quando exposta à restrição hídrica, e foi similar a cv. Jackson. A atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT indicou sensibilidade nas folhas às espécies reativas de oxigênio (ERO) para a cv. BRS 317 aos 10 dias (SOD) e aos 22 dias (CAT) e para a cv. Jackson aos 42 dias (CAT) de exposição à seca. Alguns genótipos apresentaram sensibilidade à peroxidação de lipídios nas folhas: a cv. BRS 317 após 10 dias, as linhagens R02-1325 e R01-581F após 22 dias; e, nas raízes, a cv. BRS 317, a cv. Jackson e a linhagem R02-1325 após 42 dias de exposição à seca. A linhagem R01-416F apresentou tolerância ao estresse oxidativo gerado pela seca. A seca não reduziu a atividade da catalase nas linhagens com FBN tolerante à seca.

Palavras-chave: *Glycine max*. Catalase. Espécies reativas de oxigênio. Peroxidação de lipídios. Superóxido dismutase.

5.2 ABSTRACT

Drought can limit the soybean (*Glycine max* L. Merr.) yield, as a consequence to the oxidative stress and negative effects on the biological nitrogen fixation (BNF) process. The objective of this work was to evaluate the effect of water restriction on enzyme involved in the assimilation of N and oxidative stress in soybean genotypes with different levels of BNF drought tolerance. The experiment was conducted under controlled conditions, with treatments in a 5 x 2 factorial arrangement, with five soybean genotypes (BRS 317, Jackson, R02-1325, R01-416F and R01-581F) and two moisture levels: well-watered (80% of field capacity, FC) or drought (30% of FC) starting at R₁ and kept up to R₂ (10 days), R₄ (22 days) and R₆ (42 days) when plants were assessed. We evaluated the concentration of ammonium (NH₄⁺) and nitrate (NO₃⁻), the specific activity of glutamine synthetase (GS), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and lipid peroxidation in leaves and roots. The NH₄⁺ concentration reduced and the NO₃⁻ concentration increased in soybean leaves with the increase of water restriction period. The line R02-1325 kept the activity of the enzyme glutamine synthetase in the nodules under drought likewise the drought-tolerant genotype Jackson. The enzymes related to oxidative stress, SOD) and CAT in leaves, indicated sensitivity to the reactive oxygen species (ROS) for the cv. BRS 317 after 10 days (SOD) and 22 days (CAT) and cv. Jackson after 42 days (CAT) under drought. Some genotypes showed sensitivity to lipid peroxidation in leaves: cv. BRS 317 after 10 days, R02-1325 and R01-581F line after 22 days; in roots, cv. BRS 317, cv. Jackson and R02-1325 line after 42 exposed to drought. The R01-416F line showed tolerance to oxidative stress caused by drought. The drought did not reduce the activity of catalase in the lines with FBN drought tolerant.

Key words: *Glycine max*. BNF. Catalase. Lipid peroxidation. Reactive oxygen species. Superoxide dismutase.

5.3 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merr.) é uma leguminosa capaz de desenvolver e estabelecer nódulos em seu sistema radicular (CASTRO; BERGAMIN; CANCIAN, 1999; SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009), onde um eficiente

sistema vascular supre as bactérias que fazem a fixação biológica de nitrogênio (FBN) com produtos elaborados nas folhas pela fotossíntese. A amônia (NH_3) fixada pelos bacteroides nos nódulos é assimilada na forma de ureídos (alantoína, ácido alantóico e citrulina), que têm sua origem intermediada pelas enzimas glutamina sintetase (GS; EC 6.3.1.2) e glutamato sintase (GOGAT; EC; 1.4.1.14 e 1.4.7.1). Aproximadamente 90% do nitrogênio (N) presente na seiva do xilema são translocados na forma de ureídos em direção à parte aérea da planta (VARGAS; HUNGRIA, 1997; KERBAUY, 2008). No entanto, o transporte e o metabolismo dos ureídos na região foliar pode ser prejudicado em condição de restrição hídrica, o que pode resultar o seu acúmulo na região foliar, e, possivelmente, nos nódulos, que pode resultar na inibição da FBN por um efeito retroinibitório (VADEZ; SINCLAIR, 2001; SINCLAIR; VADEZ; CHENU, 2003; PURCELL; SERRAJ; SINCLAIR, 2004; KING; PURCELL, 2005).

A atividade das enzimas responsáveis pela redução e assimilação do N_2 ocorre após as fases de infecção e de formação dos nódulos. No processo de FBN, o primeiro produto estável é a NH_3 , transferida do bacteroide para o citosol da planta hospedeira. Cerca de 95% da atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) está localizada no citosol dos nódulos, responsáveis pelas reações de assimilação da NH_3 . Inicialmente, a GS adiciona NH_3 ao ácido glutâmico, com a hidrólise simultânea de adenosina trifosfato (ATP) e a formação da glutamina, que é o produto orgânico inicial da FBN. Devido ao baixo K_m (cinética de Michaelis-Menten) da GS para a NH_3 (200 nM), essa é considerada a via principal de assimilação desse composto nos nódulos. A diminuição da atividade da GS causada por estresses pode limitar a FBN, por prejuízo tanto às bactérias diazotróficas como ao hospedeiro (HUNGRIA, 1994; SALISBURY; ROSS, 2013).

Os principais compostos orgânicos de transporte do N recém fixado são os ureídos alantoína e ácido alantóico. A enzima GS incorpora a NH_3 ao glutamato, produzindo a glutamina no citosol da célula infectada. A glutamina é então convertida a ácido úrico, o qual é translocado para células vizinhas não infectadas. Nestas células, a alantoína é sintetizada nos peroxissomos a partir do ácido úrico e o ácido alantóico é sintetizado a partir da alantoína no retículo endoplasmático. Os ureídeos, uma vez na parte aérea, são rapidamente catabolizados e liberam amônio (NH_4^+), o qual é assimilado na rota GS-GOGAT. A forma de assimilação de N depende da forma em que ele é obtido pela planta. Se o

N é fornecido na forma de nitrato (NO_3^-), a planta primeiramente o reduz a nitrito (NO_2^-) e então para NH_4^+ , que é assimilado em compostos orgânicos, como aminoácidos. Quando a planta absorve NH_4^+ , ele pode ser imediatamente assimilado em compostos orgânicos. O NH_4^+ pode ser produzido na planta a partir do metabolismo de compostos orgânicos, como ocorre na fotorrespiração e na FBN (KERBAUY, 2008; SALISBURY; ROSS, 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013).

As plantas podem estocar NO_3^- em níveis muito altos nos vacúolos ou o transportar via xilema sem que ocorram efeitos nocivos sobre os tecidos vegetais. No entanto, o consumo de plantas com alta concentração de NO_3^- por humanos e animais é nocivo, e a sua assimilação pelas plantas é importante para evitar o seu excesso quando esta é usada como alimento. Ao contrário do NO_3^- , altas concentrações de NH_4^+ são tóxicas para as plantas. O cátion NH_4^+ pode agir no desacoplamento do transporte de elétrons da fotossíntese e da respiração, dissipando o gradiente eletroquímico de H^+ gerado entre os dois lados da membrana, impedindo que ocorra a produção de ATP. Assim, as plantas assimilam o NH_4^+ próximo ao sítio de absorção ou produção, evitando efeitos tóxicos sobre as enzimas do citosol (HELDT, 1997; KERBAUY, 2008; SALISBURY; ROSS, 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Períodos prolongados de seca podem causar mudanças na condição fisiológica da planta, como promover o fechamento dos estômatos, e provocar a queda prematura das folhas, flores e vagens, além de reduzir a expansão foliar e a massa da parte aérea, com conseqüente diminuição do potencial produtivo da cultura. Um dos primeiros processos fisiológicos prejudicados pela restrição hídrica é a FBN, cujo declínio está relacionado ao decréscimo da capacidade fotossintética do hospedeiro e a danos ao complexo nitrogenase (SERRAJ; SINCLAIR; PURCELL, 1999; KUSS et al., 2008; EMBRAPA, 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013).

O déficit hídrico promove alterações na planta e a antecipação de sua senescência. Nessas condições, podem ocorrer aumentos das espécies reativas de oxigênio (ERO), que são produzidas durante o metabolismo aeróbico, pela interação entre o oxigênio molecular (O_2) e elétrons provenientes da cadeia de transporte dos cloroplastos e das mitocôndrias (BOR; ÖZDEMİR; TÜRKAN, 2003). A tolerância ou suscetibilidade ao estresse oxidativo depende do balanço entre a produção de oxidantes e a capacidade antioxidante da célula (PROCHAZKOVA et

al., 2001).

As ERO incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (HO^{\cdot}) e o oxigênio singlete (1O_2), os quais podem causar danos às macromoléculas celulares (TAIZ; ZEIGER, 2013). Os danos provocados pelas ERO podem ser evitados por sistemas antioxidativos em plantas superiores, em que se destacam as enzimas superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) e a catalase (CAT; EC 1.11.1.6). A SOD catalisa a dismutação do superóxido, mantendo baixos níveis desse radical, sendo o H_2O_2 produto de sua reação; já a CAT converte o H_2O_2 em oxigênio e água (JIMÉNEZ et al., 2002).

O aumento de atividade da CAT logo após o florescimento em soja sugere que as folhas aumentam a sua capacidade de catalisar a decomposição do H_2O_2 . Porém, quanto mais se aproxima da senescência, essa habilidade decresce com a queda da atividade da enzima (FU; HUANG; ZHANG, 2000). Garcia (2009) avaliou as condições de senescência em genótipos de soja e identificou a ação de enzimas relacionadas a estresses oxidativos na parte aérea, concluindo que o estresse oxidativo não foi o fator determinante na senescência foliar natural das plantas.

Temperaturas extremas ou estresses hídricos são fatores que causam estresses oxidativos em plantas (ELSTNER; OSSWALD, 1994). A produção de ERO pode iniciar o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares e formar hidroperóxidos de lipídios. Um dos fatos mais relevantes do estresse oxidativo é a peroxidação de lipídios de membrana, porque acarreta a redução da fluidez e alterações de permeabilidade iônica que, conseqüentemente, interferem nas funções das proteínas, reduz o suprimento de energia, provoca a perda de compartimentalização e a liberação acentuada de íons, entre outros eventos que interferem no metabolismo e levam ao desbalanço e perda de funções essenciais (AZIZ; LARHER, 1998; QUEIROZ et al., 1998).

Genótipos com características de FBN tolerante à seca e alto potencial produtivo, como a linhagem R02-1325, foram desenvolvidas na Estação Experimental Agrícola do Arkansas (EUA) (DEVI et al., 2014). Igualmente, as linhagens R01-416F e R01-581F foram caracterizadas por possuírem alto potencial de rendimento de grãos e a característica de FBN tolerante à seca moderada. Essas linhagens são resultantes do cruzamento entre a cv. Jackson (FBN tolerante à seca) e cv. KS4895 (alto rendimento) (CHEN et al., 2007). A cv. Jackson desde seu

lançamento tem sido caracterizada por apresentar FBN tolerante à seca (SERRAJ; SINCLAIR, 1996).

Com os relatos de tolerância à restrição hídrica para determinados genótipos de soja, surge a necessidade de estudos mais específicos para se identificar os fatores envolvidos no mecanismo de tolerância à seca, porque o efeito do déficit hídrico depende de sua duração, intensidade e também de fatores relacionados à atenuação do estresse oxidativo. O estágio de ocorrência de restrição hídrica também pode influenciar nos efeitos sobre a cultura, principalmente em estádios críticos como os de florescimento e de enchimento de grãos (FARIAS et al., 2001; LADRERA et al., 2007; KRON; SOUZA; RIBEIRO, 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da restrição hídrica sobre enzima envolvida na assimilação do nitrogênio e no estresse oxidativo em genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância da FBN à seca, em diferentes tempos de exposição ao déficit hídrico durante estádios reprodutivos da cultura.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no ano agrícola de 2013/2014, entre os meses de novembro e abril, em casa de vegetação com temperatura entre 25 °C e 30 °C, e umidade relativa do ar (UR%) entre 70% e 85% durante o ciclo da cultura, no Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR (latitude 23°22' S, longitude 51°12' W e altitude 585 m).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições, em arranjo fatorial 5x2, com cinco genótipos de soja: as variedades cv. Jackson e cv. BRS 317, e as linhagens R01-416F, R01-581F e R02-1325; e duas condições hídricas: suprimento pleno de água a 80% da capacidade de campo (CC) (condição úmida) e restrição hídrica a 30% da CC (condição seca).

A BRS 317 é uma variedade de soja convencional, com alto potencial produtivo, desenvolvida pela Embrapa Soja e indicada para o cultivo nos Estados do PR, SP, SC e sul do MS. Tem tipo de crescimento determinado, grupo de maturidade 6.6 (Brasil) e ciclo de 122 a 128 dias numa altitude de 500 a 800 m (EMBRAPA, 2010). Não há divulgação da característica de tolerância ou sensibilidade à seca para a cv. BRS-317, contudo alguns autores relataram que essa cultivar é sensível à seca em relação à FBN (CEREZINI et al, 2014). No

entanto, a cv. BRS 317 é indicada pela FUNDAÇÃO MS como moderadamente tolerante ao déficit hídrico para a região sul do Mato Grosso do Sul (PITOL, 2015). A cultivar Jackson foi desenvolvida nos Estados Unidos em 1953, com grupo de maturidade VII (EUA), e é caracterizada como tolerante à seca em relação à FBN desde seu lançamento. As linhagens R02-1325, R01-416F e R01-581F foram desenvolvidas nos Estados Unidos na Estação Experimental Agrícola do Arkansas, e pertence ao grupo de maturação V (EUA). Possuem características de sustentação da FBN em condições de déficit hídrico moderado e alto potencial produtivo (CHEN et al., 2007; DEVI et al., 2014).

A exposição à restrição hídrica (30% da CC) foi iniciada aos 33 dias após a semeadura (DAS), em metade das parcelas experimentais quando os cinco genótipos se encontravam entre os estádios de florescimento R_1 e R_2 . As avaliações foram realizadas em três tempos diferentes de exposição à seca (30% da CC), aos 10 dias (43 DAS) durante o estágio de florescimento pleno (R_2); aos 22 dias (55 DAS) durante o estágio de formação das vagens (R_4); e, aos 42 dias (75 DAS) durante o estágio em que os grãos estavam totalmente formados e ainda verdes (R_6) (FEHR; CAVINESS, 1977).

As linhagens se apresentaram mais precoces que as variedades de soja. Assim, os tempos para as avaliações foram determinados quando mais de 50% das parcelas experimentais, na condição de seca ou úmida, se encontravam nos respectivos estádios reprodutivos. Para a análise estatística foi considerado cada tempo de avaliação (10 dias, 22 dias e 42 dias) um ensaio independente dos demais tempos.

Cada parcela experimental foi representada por um vaso de polietileno com capacidade para 9 L na cor mármore, para minimizar os efeitos da radiação solar. Cada vaso recebeu 8 kg de um substrato na proporção 3:1 (terra:areia), formado pela mistura de Latossolo Vermelho distroférrico de textura argilosa coletado na camada 0-20 cm em uma área de cultivo comercial de soja e areia fina lavada de rio. Amostras do substrato foram analisadas para fins de fertilidade (SILVA, 2009), cujos resultados são apresentados na Tabela 5.1.

Para a determinação do pH, foi estimada a atividade do íon H^+ na suspensão do substrato, utilizando-se solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) e leitura por meio de um potenciômetro. A determinação da acidez trocável (Al^{3+}) foi com o extrator cloreto de potássio (KCl) e a leitura realizada por titulação com solução de

hidróxido de sódio (NaOH). A acidez potencial ($H^+ + Al^{3+}$) foi determinada com o uso de solução tampão SMP (método de Shoemaker, McLean e Pratt) e leitura por meio de um potenciômetro, com resultado obtido pela conversão do valor da leitura conforme tabela obtida pela resolução de equações de regressão.

Os teores de cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) trocáveis foram extraídos com KCl e determinados por titulação com EDTA. O fósforo (P) e o potássio (K^+) foram determinados por meio de solução extratora Mehlich-1. O teor de P foi obtido por leitura em espectrofotômetro a 630 nm e construção de curva de calibração. O teor de K foi obtido por leitura em fotômetro de chama e construção de curva de calibração. A determinação de carbono (C) foi realizada conforme método Walkley-Black, em que a matéria orgânica foi oxidada por íons dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) em meio fortemente ácido. O excesso de $Cr_2O_7^{2-}$ foi titulado com $FeSO_4$ e o teor de matéria orgânica (MO) calculado pela quantidade de $Cr_2O_7^{2-}$ reduzido. A relação entre o teor de MO e de C é de 1,724..

Tabela 5.1. Resultados da análise química de um substrato contendo terra argilosa e areia na proporção 3:1.

pH	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	Al^{3+}	$H^+ + Al^{3+}$	CTC	V%	C	MO	P
CaCl ₂	----- cmol _c dm ⁻³ -----							----- g kg ⁻¹ -----		mg dm ⁻³
6,80	8,20	0,83	0,64	0,00	2,54	12,21	79,20	7,00	12,10	47,49

Análise Química do Solo – AQS (SILVA, 2009)

Antes da semeadura, sementes de soja foram inoculadas com inoculante turfoso comercial contendo $7,2 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia por grama (garantia do fabricante), contendo as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium* spp. A partir do estágio V₂ (primeiro trifólio totalmente desenvolvido) as plantas foram desbastadas e duas foram mantidas por vaso.

Foi estabelecida a massa de água aplicada ao tratamento em condição de suprimento pleno como 80% da CC (úmida) e de restrição hídrica, quando aplicada, em 30% da CC (seca) (ALBUQUERQUE, 2010). Assim, diariamente, as disponibilidades hídricas eram determinadas a partir da massa de água em quilogramas contida em cada vaso, por meio de uma balança eletrônica com capacidade para 15 kg, e, uma vez ao dia, foram restabelecidos a 80% ou 30% da CC pela determinação e reposição do volume perdido pela evapotranspiração.

Metade das parcelas experimentais foram mantidas com pleno

suprimento de água em 80% da CC em todo o ciclo da cultura. No entanto, a outra metade das parcelas foi submetida à restrição hídrica com umidade em 30% da CC, entre os 33 DAS e 75 DAS, pelo tempo total de 42 dias. Em cada um dos três tempos de exposição à seca (10 dias, 22 dias e 42 dias), cinco repetições de cada tratamento (cinco genótipos x duas condições hídricas), dentro de cinco blocos, foram aleatoriamente amostrados para as análises destrutivas, num total de 50 parcelas experimentais por cada tempo. Foram utilizadas neste trabalho um total de 150 parcelas experimentais.

O efeito do regime hídrico (úmido ou seco) foi avaliado por determinações não destrutivas na parte aérea das plantas durante os estádios R₂, R₄ e R₆ pelas variáveis: condutância estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Leaf Porometer, Model SC-1, Decagon Devices, Inc) e temperatura foliar ($^{\circ}\text{C}$) (Termômetro Mira Laser, Incoterm). As determinações foliares ocorreram no folíolo central do 3º trifólio totalmente desenvolvido a partir do ápice do caule principal das plantas.

As variáveis avaliadas foram: concentração de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) nas folhas, atividade específica das enzimas glutamina sintetase nos nódulos, superóxido dismutase e catalase nas folhas, e peroxidação de lipídios nas folhas e nas raízes.

Para avaliação do teor de NH_4^+ e NO_3^- nas folhas, os folíolos foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 65°C até atingirem massa constante. Para obtenção do extrato, o material seco foi moído, passado em peneira de 60 ou 100 mesh, e transferido para um tubo de ensaio na quantidade de 0,3 g, juntamente com 5,0 mL de tampão fosfato de potássio, 0,1 M, pH 7 (6,8 g de KH_2PO_4 e 8,705 g de K_2HPO_4 em 500 mL de solução com água destilada), e 2,5 mL de etanol. A mistura foi aquecida a 80°C por cinco minutos (sem ferver) e agitada em vórtex. Após uma hora, o extrato foi filtrado em algodão hidrófilo estéril e centrifugado em microcentrífuga por cinco minutos (10.000 g) (HUNGRIA, 1994).

Para o teor de NH_4^+ nas folhas, empregou-se o método baseado em Mitchell (1972), com solução de hipoclorito de sódio substituída por dicloroisocianurato de sódio, conforme Felker (1977) e descrito por Hungria (1994), já que o hipoclorito de sódio perde rapidamente seu poder oxidante. Alíquotas de 50 μL do extrato em duplicata foram adicionadas em tubos de ensaio com 450 μL de água destilada. Então, 2,5 mL da solução A (10 g de fenol e 50 mg de nitroprussiato de sódio em 1,0 L de solução com água destilada) e 2,5 mL da solução B (30 g de

NaOH e 0,62 g de dicloroisocianurato de sódio em 1000 mL de solução com água destilada) foram adicionados e misturados em vórtex. Após 30 minutos, formou-se um cromóforo, cuja intensidade foi lida a 630 nm em espectrofotômetro. As leituras de absorvância foram convertidas em nmols de NH_4^+ contra uma curva padrão construída para cada conjunto de análises (NH_4Cl , 5,0 mM, com concentrações finais de 0 a 400 nmols de NH_4^+). Os resultados foram expressos em μmols de amônio por grama de massa seca.

Os teores de NO_3^- nas folhas foram obtidos com base em Cataldo et al. (1975), reduzindo-se as quantidades para $\frac{1}{4}$, conforme descrito em Hungria (1994). Alíquotas de 50 μL do extrato em duplicata foram misturados com 200 μL de solução de ácido salicílico a 5% (5,0 g de ácido salicílico em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado) em um tubo de ensaio. Após 20 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados lentamente 4,75 mL de NaOH, 2 M, para atingir pH superior a 12. A reação foi misturada em vórtex e esfriada em temperatura ambiente. Formou-se um cromóforo, cuja intensidade foi lida a 410 nm em espectrofotômetro. As leituras de absorvância foram convertidas em nmols de NO_3^- contra uma curva padrão construída para cada conjunto de análises (KNO_3 , 5,0 mM, com concentrações finais de 0 a 400 nmols de NO_3^-). Os resultados foram expressos em μmols de nitrato por grama de massa seca.

A atividade específica da enzima glutamina sintetase (GS; EC 6.3.1.2) nos nódulos foi medida em extrato obtido conforme Hungria, Barradas e Wallsgrove (1991). Cerca de 2,0 g de nódulos frescos foram lavados com água destilada e mantidos a 0 °C durante a coleta, armazenados em microtubos de 2,0 mL. Em seguida, foram congelados em nitrogênio líquido (NL_2) e imediatamente preservados a -80 °C até o momento das análises. Uma alíquota de 0,5 g de nódulos foi mascerado com uma pitada de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 5,0 mL de solução de extração, em almofariz e pistilo mantidos a 4 °C sobre gelo picado. O homogeneizado foi transferido para microtubos e centrifugado a 4 °C (20.000 g) por 30 minutos. Na sequência, o sobrenadante passou por coluna de Sephadex[®] G-25 (Sigma-Aldrich) previamente dessalinizada. No processo de extração, o fracionamento do tecido nodular é essencial, porque possibilita a separação da fração bacteroidal da fração contendo o citosol da planta hospedeira.

A solução tampão de homogeneização e de extração (HUNGRIA, 1994) foi baseada na solução de Kendall et al. (1986) para a glutamina sintetase,

que consiste em solução tampão A, pH 7,7 (1,97 g de Tris-base, 50 mM; 0,6162 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM; e 25 mL de etilenoglicol, 10%, em 250 mL de solução) e solução de extração, pH 7,7 (0,184 g de ácido glutâmico, 5,0 mM; 0,125 mL de Triton X-100, 0,05%; e 0,193 g de ditioneitol (DTT), 5,0 mM, em 250 mL de solução. O DTT foi adicionado após o acerto do pH e antes do uso da solução).

Para a determinação da atividade da GS (HUNGRIA, 1994; HUNGRIA; BARRADAS; WALLSGROVE, 1991; CULLIMORE; SIMS, 1980), o γ -glutamil-hidroxamato foi determinado conforme Ferguson e Sims (1971). Após obtenção do extrato dos nódulos e efetuada a dessalinização da coluna de Sephadex[®] G-25 (gel filtrante) com 10 mL do tampão de dessalinização (tampão A, pH 7,7; e 0,1542 g de DTT, 5 mM, em 200 mL de solução), 500 μL foram carregados na coluna, seguidos dois carregamentos (450 μL e 750 μL) do tampão de dessalinização, e finalmente 1000 μL da solução de extração. Na repetição do processo, ao se adicionar 500 μL do extrato da amostra seguinte, foi iniciada a coleta do filtrado, continuando a coleta com a adição de 450 μL do tampão de dessalinização, num total de 950 μL , e assim sucessivamente. Nos carregamentos de 750 μL do tampão de dessalinização e 1000 μL de solução de extração o eluente era desprezado.

Para o ensaio da atividade da enzima glutamina sintetase, foram transferidos 450 μL da solução de ensaio, pH 6,4 (0,3 g de Tris-base; 0,45 g de L-glutamina; 0,13 g de hidroxilamina-HCl; 1,2 mg de adenosina difostato sódica; e 12,5 mg de MnCl_2 ou 15 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, em 50 mL de solução); 50 μL da solução de arsenato de sódio a 6,4%, pH 6,4 (6,4 g de arsenato de sódio em 100 mL de tampão Tris-base); e 20 μL do extrato filtrado de nódulos para microtubos de 2,0 mL. A reação foi incubada por 10 minutos a 30 °C, seguida pela adição de 500 μL de solução de cloreto de ferro III (5,0 g de FeCl_3 , 0,37 M; 2,8 mL de HCl, 0,67 M; e 1,634 g de ácido tricloroacético, 0,2 M, em 50 mL de solução, filtrados em duplo papel de filtro e mantidos em vidro escuro) e centrifugado em microcentrifuga por 10 minutos (10.000 g). Formou-se um cromóforo, cuja intensidade foi lida a 505 nm em espectrofotômetro. As leituras de absorbância foram convertidas em mmols de γ -glutamil hidroxamato contra uma curva padrão construída para cada conjunto de análises (solução de γ -glutamil hidroxamato, 25 mM, com alíquotas de 0 mL a 0,4 mL). Os resultados da atividade da enzima glutamina sintetase foram expressos em

mmols de γ -glutamil hidroxamato formados por minuto por mg de proteínas.

Para obtenção do extrato para avaliar as atividades específicas das enzimas superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) e catalase (CAT; EC 1.11.1.6) nas folhas, foram coletados trifólios do terceiro nó a partir do ápice do caule principal das plantas em cada tempo avaliado de exposição à seca (10 dias em R₂, 22 dias em R₄ e 42 dias em R₆). Os folíolos frescos foram lavados com água destilada e mantidos a 0 °C durante a coleta, embalados em papel alumínio. Em seguida, foram congelados em NL₂ e, imediatamente, preservados a -80 °C até o momento das análises.

A extração enzimática foi realizada com as soluções e os materiais mantidos sobre gelo picado a 4 °C. Amostras de 1,0 g de folíolos em nitrogênio líquido foram maceradas com almofariz e pistilo, e homogeneizadas com 3,0 mL de tampão fosfato de potássio, 0,1 M, pH 7,0, contendo EDTA sódico, 1 mM; DTT, 3 mM e PVPP insolúvel, 0,5% (p/v) (0,186 g de EDTA sódico, 0,2313 g de DTT, e 2,5 g de PVPP, em 500 mL de solução de tampão fosfato de potássio). O homogeneizado foi centrifugado (12.000 g) a 4 °C por 15 minutos, e o sobrenadante coletado e centrifugado (12.000 g) novamente por mais 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C até o momento das análises.

Atividade específica da enzima superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) nas folhas foi obtida com base em Beauchamp e Fridovich (1971) e Giannopolitis e Ries (1977). Para as análises foram preparadas as seguintes soluções:

a) Solução estoque de riboflavina: preparada em ambiente escuro em recipiente forrado com papel alumínio, 0,3763 g de riboflavina, 0,1 M, em 10 mL de água destilada, armazenada em microtubos de 2,0 mL forrados com papel alumínio em freezer;

b) Solução de trabalho de riboflavina, 200 μ M: 20 μ L da solução estoque de riboflavina em 10 mL de água destilada, preparada no escuro em recipiente forrado com papel alumínio, com diluição feita no dia da leitura e mantida refrigerada;

c) Solução estoque de metionina: 0,4849 g de metionina em 50 mL de água destilada, preparada no escuro em recipiente envolto em papel alumínio;

d) Solução estoque de EDTA sódico: 0,3722 g em 100 mL de água destilada;

e) Solução estoque de nitroblue tetrazolium (NBT): 0,0122 g em 15 mL de água destilada, preparados no dia da leitura, em ambiente escuro, em recipiente envolto em papel alumínio;

f) Solução mix de trabalho em recipiente envolto com papel alumínio (volume para 1 amostra): 0,360 mL de água destilada; 1,0 mL de tampão fosfato de potássio, 0,1 M, pH 7,8; 0,400 mL de metionina, 13 mM; 20 μ L de EDTA sódico, 0,1 mM; e 150 μ L de NBT, 75 μ M.

Para as análises, foram preparadas três diferentes reações em tubos de ensaios:

1) Amostra no claro (volume por amostra): 1,930 mL do mix; 50 μ L do extrato enzimático; e 20 μ L da solução de trabalho de riboflavina.

2) Amostra branco no claro (amostra única em triplicata para cada bateria de análises): 1,930 mL do mix; 50 μ L de água destilada; 20 μ L da solução de trabalho de riboflavina.

As amostras no claro e as amostras branco no claro foram agitadas em vórtex e mantidas por 10 minutos em câmara de luz a 25 °C. A câmara de luz utilizada foi uma caixa térmica com seu interior forrado com folha de alumínio e água na temperatura ambiente, com lâmpada fluorescente de 15 W acoplada na tampa da caixa. A amostra branco no claro apresentou cor azul arroxeadada.

3) Amostra branco no escuro (volume por amostra): 1,930 mL do mix; 50 μ L do extrato enzimático; 20 μ L da solução de trabalho de riboflavina, em tubo de ensaio coberto com papel alumínio.

Todo o procedimento da amostra branco no escuro foi realizado em ambiente sem iluminação. Imediatamente, a amostra foi agitada em vórtex e mantida em câmara escura (caixa térmica com seu interior forrado com folha de alumínio) por 10 minutos a 25°C.

Para ambas as amostras, formou-se um cromóforo, cuja intensidade foi lida a 560 nm de absorbância em espectrofotômetro. Uma unidade de SOD (U) é definida como a quantidade de enzima requerida para inibir 50% da fotorredução do NBT em comparação com os tubos sem o extrato de plantas. Os resultados da atividade específica da enzima superóxido dismutase foram expressos em U μ g⁻¹ de proteína, os quais foram obtidos por meio das equações 1 e 2.

$$(1) \quad \frac{BC - (AC-AE)}{BC} \times 100 = \% \text{ de inibição}$$

$$(2) \quad \text{Atividade Específica da SOD} = \frac{U}{\mu\text{g de proteína}} = \frac{\% \text{ de inibição} \times \text{volume da amostra } \mu\text{L}}{50 \% \times \text{concentração de proteína } \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}}$$

Onde, BC é a amostra branco no claro (sem enzima); AC é a amostra no claro; e AE é a amostra branco no escuro. U é uma unidade de SOD requerida para inibir 50% da fotorredução do NBT, portanto o valor de U de uma amostra é a razão entre a % de inibição de uma amostra e o valor de 50% de inibição.

A obtenção do extrato para avaliar a atividade específica da enzima catalase (CAT; EC 1.11.1.6) nas folhas foi baseada em Havir e McHale (1987). Para a análise da atividade, foi preparada solução de trabalho de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), 1,25/100 (v/v), contendo 1,250 mL de H_2O_2 (130 vol., 30%) em 98,750 mL de tampão fosfato de potássio, 0,1 M, pH 7,0, para cada bateria de análises. Individualmente, para cada leitura, foram pipetados 1987,5 μL da solução de trabalho de H_2O_2 em microtubo de 2,0 mL e incubado em banho-maria a 30°C por 2 minutos. Na sequência, uma alíquota de 12,5 μL do extrato enzimático foi adicionado, e o microtubo foi fechado e tombado levemente uma vez, sem agitar, para misturar o extrato com a solução e a reação ser iniciada. Imediatamente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em absorvância de 240 nm, e a atividade determinada pelo monitoramento de degradação de H_2O_2 a cada 10 segundos por 1 minuto, contra um branco sem o extrato. A atividade enzimática da catalase foi calculada pelo coeficiente de extinção molar de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade específica foi determinada pela razão entre o valor da atividade bruta da catalase e a concentração de proteínas em cada amostra. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumido por minuto por mg de proteína.

Para a determinação do teor de proteína foi utilizado o método de Bradford (1976), descrito por Hungria (1994). Brevemente, uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático (nódulos ou folhas) foi adicionada a 5 mL de solução de trabalho de Coomassie brilhante azul G-250 15/100 (v/v) (Solução estoque: 100 mg de comassie brilhante azul G-250 dissolvidos em 50 mL de etanol, 95%, e adicionados a 100 mL de ácido fosfórico, 85%. Solução de trabalho: 15 mL de solução estoque

diluídas em 85 mL de tampão fosfato de potássio, 0,1 M, pH 7). A absorvância foi lida no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro, após dois minutos e antes de 1 hora, contra uma curva padrão construída para o conjunto de análises (padrão: albumina de soro bovino – BSA, 1 mg/mL, com alíquotas de 10 µg a 100 µg de proteína e tampão fosfato de potássio, 0,1 M, pH 7,0).

As determinações de peroxidação de lipídios em raízes e folhas foram realizadas pelo método TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) descrito por Carmak e Horst (1991) e utilizado por Cavalcanti et al. (2004). Foram coletadas amostras de trifólios (terceiro nó a partir do ápice do caule principal) e de raízes frescas dos genótipos de soja nos tempos de 10 dias, 22 dias e 42 dias de exposição à restrição hídrica, durante os estádios R₂, R₄ e R₆, respectivamente, lavadas com água destilada e mantidas a 0 °C durante a coleta, embaladas em papel alumínio. Na sequência, foram congeladas em NL₂ e preservadas a -80 °C até o momento das análises.

No processo de extração, os materiais e soluções foram mantidos em gelo (4 °C). Com auxílio de almofariz e pistilo, 1 g por amostra de tecido vegetal (folhas ou raízes) foi macerado com NL₂ e imediatamente homogeneizado com 3,0 mL de solução 1% de ácido tricloroacético (TCA) em água destilada (5,0 g de TCA em 500 mL de solução com água destilada) por cerca de 3 minutos. O homogeneizado foi transferido para um microtubo de 2,0 mL, cuja concentração do extrato resultante foi de 0,333 g de massa fresca por mL de solução extratora (TCA 1%). O extrato nos tubos foi mantido no gelo até a centrifugação.

Para a análise da peroxidação de lipídios em folhas e raízes, as soluções foram armazenadas em refrigerador e mantidas no gelo ou água gelada durante o uso. O homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos (20.000 g) a 4°C e o sobrenadante coletado e mantido em gelo. Foram utilizados tubos de ensaio com tampas, capazes de suportar altas temperaturas, aos quais foram adicionados 2,5 mL de uma solução de TBARS (2,5 g de ácido tiobarbitúrico - TBA, 0,5%, em 100 g de ácido tricloroacético - TCA, 20%, em 500 mL de solução com água destilada) e 0,5 mL do extrato vegetal. Os tubos foram agitados em vortex e mantidos por 30 minutos em banho-maria a 95 °C. Em seguida, a reação resultante de coloração opaca rósea-alaranjada foi interrompida mantendo os tubos no gelo por 10 minutos. Para a clarificação, as reações foram centrifugadas por 5 minutos (20.000 g) a 4°C em microtubos de 2,0 mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro nas

absorbâncias de 532 nm e 600 nm. O resultado final em absorbância foi obtido ao se subtrair a leitura a 600 nm da obtida a 532 nm.

A quantidade de malonaldeído (MDA), metabólito reativo ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foi calculada usando o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O resultado foi expresso em nmols de TBARS-MDA por g de massa fresca (MF). Foi utilizada a fórmula, conforme lei de Beer-Lambert-Bouguer: Concentração de TBARS-MDA = $(A_{532}-A_{600})/155 \text{ nM TBARS-MDA g}^{-1} \text{ MF}$.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

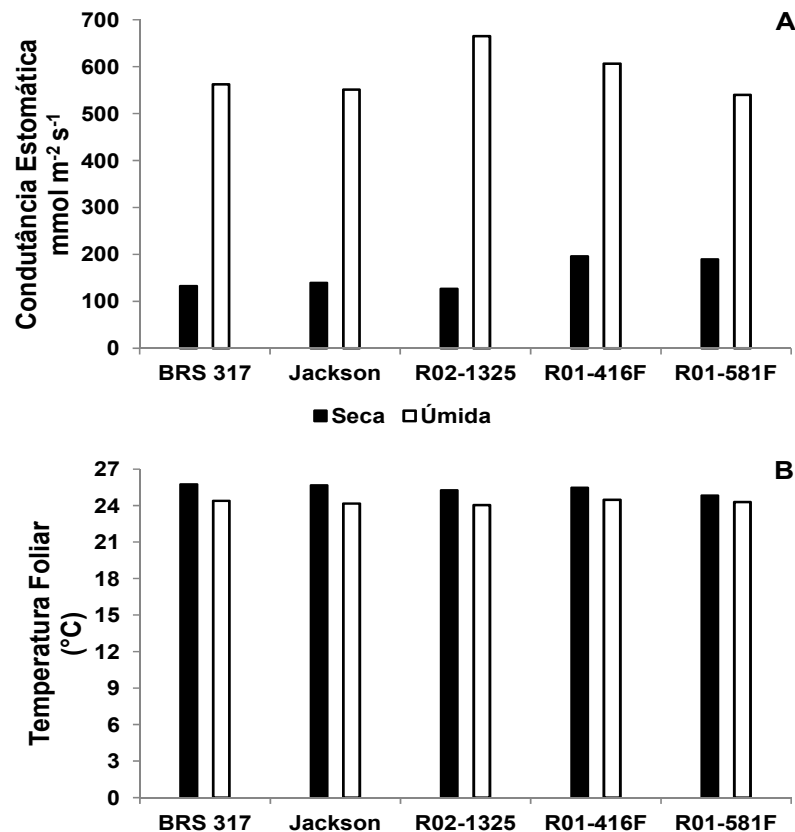
A restrição hídrica provoca o fechamento dos estômatos e afeta os processos fisiológicos da planta, e, conseqüentemente, o desempenho fotossintético e o processo de FBN. Com o fechamento dos estômatos há redução da transpiração e aumento da temperatura foliar (GUIMARÃES; STONE, 2010; TAIZ; ZEIGER, 2013; CERZINI et al., 2014). Neste trabalho, os genótipos de soja expostos à seca apresentaram redução na condutância estomática em 73% e aumento da temperatura foliar em cerca de 5% (Figura 5.1).

O íon NH_4^+ nas folhas é rapidamente assimilado próximo ao local de produção. Isso evita os efeitos tóxicos do NH_4^+ sobre as enzimas do citosol. Após 10 dias de exposição à seca no estágio de florescimento pleno (R_2) a concentração de NH_4^+ nas folhas foi reduzida nos genótipos de soja cv. Jackson (27,2%) e R02-1325 (34,1%); e, aos 22 dias de seca, em R_4 (vagens formadas) o NH_4^+ foi reduzido na linhagem R02-1325 (18,9%). Em R_6 (grãos verdes formados), após 42 dias de seca, o teor de NH_4^+ nas folhas dos cinco genótipos foi reduzida em 39,4%, quando comparado ao controle úmido (Figura 5.2).

Comparativamente, a seca não causou alterações no teor de NH_4^+ entre os genótipos nos estádios R_2 e R_6 ; no entanto, em R_4 , a cv. Jackson apresentou a maior média e diferiu da linhagem R02-1325 em 18,2%. A redução da concentração de NH_4^+ nas folhas sob restrição hídrica pode conferir às plantas maior tolerância à seca, pois as células vegetais evitam a toxicidade do amônio pela rápida conversão do NH_4^+ gerado a partir dos ureídeos transportados via xilema e catabolizados na parte aérea (TAIZ; ZEIGER, 2013), processo que é prejudicado

pela restrição hídrica. Nesse sentido, a cv Jackson e a linhagem R02-1325 sob seca se destacaram nos estádios iniciais (R_2 e R_4). No entanto, com o aumento do período de seca até 42 dias (R_6), e sob o efeito deletério da restrição hídrica, a concentração de amônio foi reduzida nas folhas de todos os genótipos, com maior intensidade no período em que os grãos já estavam formados. Essa redução generalizada também pode ser resultante da força de dreno para a formação de grãos e o declínio da atividade de FBN nesse estágio de desenvolvimento da cultura (Figura 5.2).

Figura 5.1. Condutância estomática (A) e temperatura foliar (B) na parte aérea de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos às condições úmida (80% da capacidade de campo - CC) e de seca (30% da CC) por até 42 dias durante os estádios florescimento e enchimento de grãos.



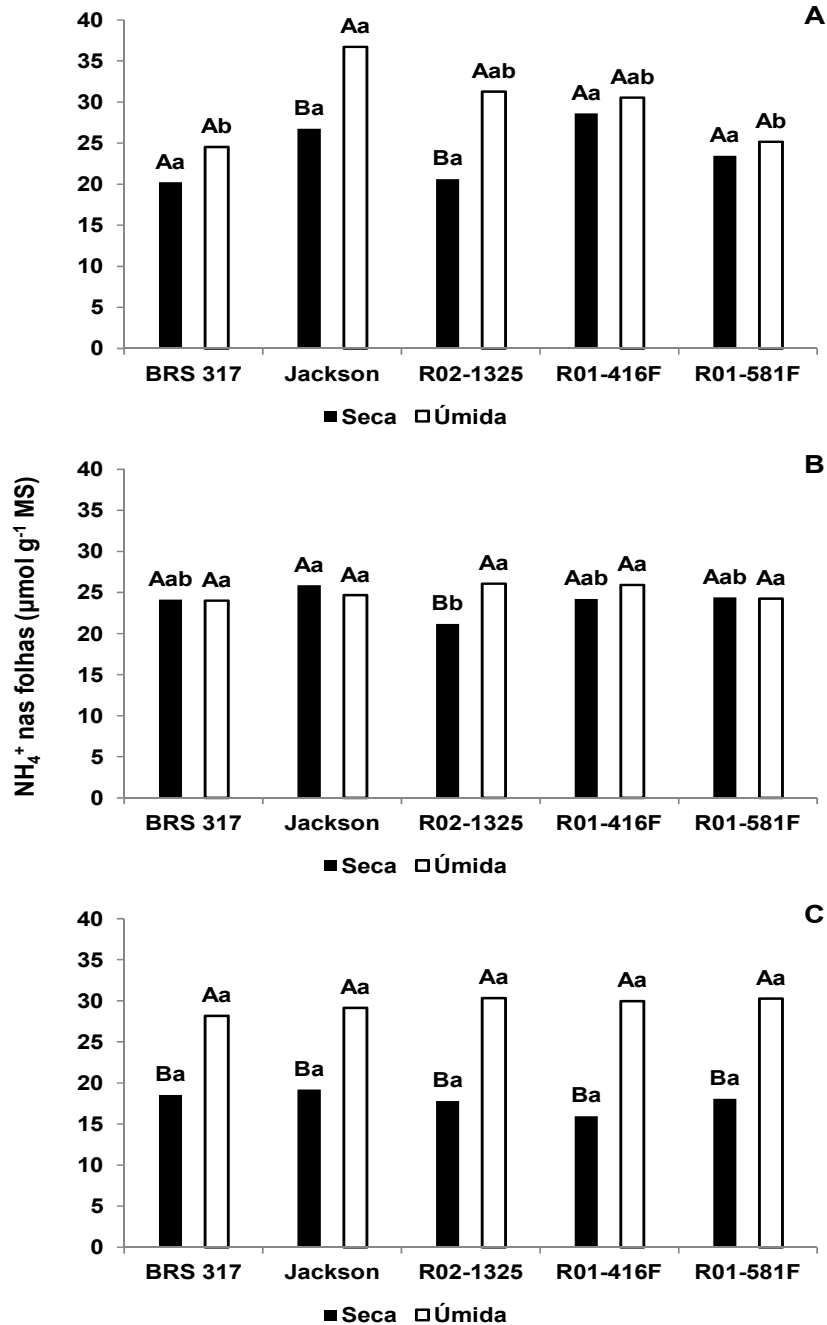
Diferentemente do NH_4^+ , altas concentrações de NO_3^- são armazenadas no vacúolo sem causar toxicidade à planta. A concentração de NO_3^- foi reduzida nas folhas do genótipo Jackson (47,7%) no estágio R_2 , em razão da seca; em R_4 , o teor de NO_3^- aumentou 22,6% na linhagem R02-1325 e 26,5% na R01-581F, em comparação ao controle úmido. Em R_6 , com o aumento do período de

seca, o teor de NO_3^- das folhas aumentou nos cinco genótipos em 46,2% (Figura 5.3). Quando os genótipos foram comparados sob restrição hídrica no estágio R_6 , a linhagem R02-1325 apresentou maiores concentrações de NO_3^- nas folhas, porém sem diferir dos controles cv. Jackson ou cv. BRS 317, mas foi superior às linhagens R01-416F (26,8%) e R01-581F (33,1%) (Figura 5.3).

As concentrações de NH_4^+ e NO_3^- nas folhas se inverteram com o aumento do tempo de restrição hídrica nos estádios reprodutivos, ou seja, as concentrações de NH_4^+ diminuíram e as concentrações de NO_3^- foram incrementadas. Embora o NO_3^- possa ser acumulado nos vacúolos das células sem causar toxicidade à planta, altas concentrações de amônio são tóxicas. O cátion NH_4^+ pode agir no desacoplamento do transporte de elétrons da fotossíntese e da respiração, dissipando o gradiente eletroquímico de H^+ gerado entre os dois lados da membrana, o que impede a produção de ATP (adenosina trifosfato). Assim, as plantas assimilam o NH_4^+ próximo ao sítio de absorção ou produção, evitando os efeitos tóxicos sobre as enzimas do citosol (HELDT, 1997; KERBAUY, 2008; SALISBURY; ROSS, 2013). Silveira, Costa e Oliveira (2001) avaliaram plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata*) expostas ao déficit hídrico por até seis dias e depois reidratadas, e verificaram que os teores de NO_3^- aumentaram em raízes, porém houve redução nas folhas, como também foi reduzida a atividade da glutamina sintetase nos nódulos.

Embora o NO_3^- possa ser acumulado nos vacúolos para posterior uso, para sua assimilação precisa ser reduzido a (NH_4^+), e então incorporado em compostos orgânicos. Esse processo é intermediado pela enzima nitrato redutase (NR). A NR em plantas superiores é uma enzima complexa e extremamente sensível às variações ambientais, ao substrato e ao produto final, e protege o metabolismo de N dessas variações. A atividade dessa enzima aumenta rapidamente na presença de NO_3^- , pelo aumento da luz e temperatura, mas é reduzida com o acúmulo de NH_3 , pelo estresse hídrico ou térmico e pela baixa luminosidade (KRAMER; BOYER, 1995; MARSCHNER, 1995; PIMENTEL, 1998). Assim, com o aumento do período de exposição à seca, redução da condutância estomática e alterações dos teores de NH_4^+ , possivelmente reduziu a atividade da enzima NR, o que resultou no aumento dos teores de NO_3^- .

Figura 5.2. Concentração de amônio (NH_4^+) em folhas de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R_2 , por (B) 22 dias até R_4 e por (C) 42 dias até R_6 .



Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas (condição hídrica, dentro de genótipo) e minúsculas (genótipos, dentro de condição hídrica) não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

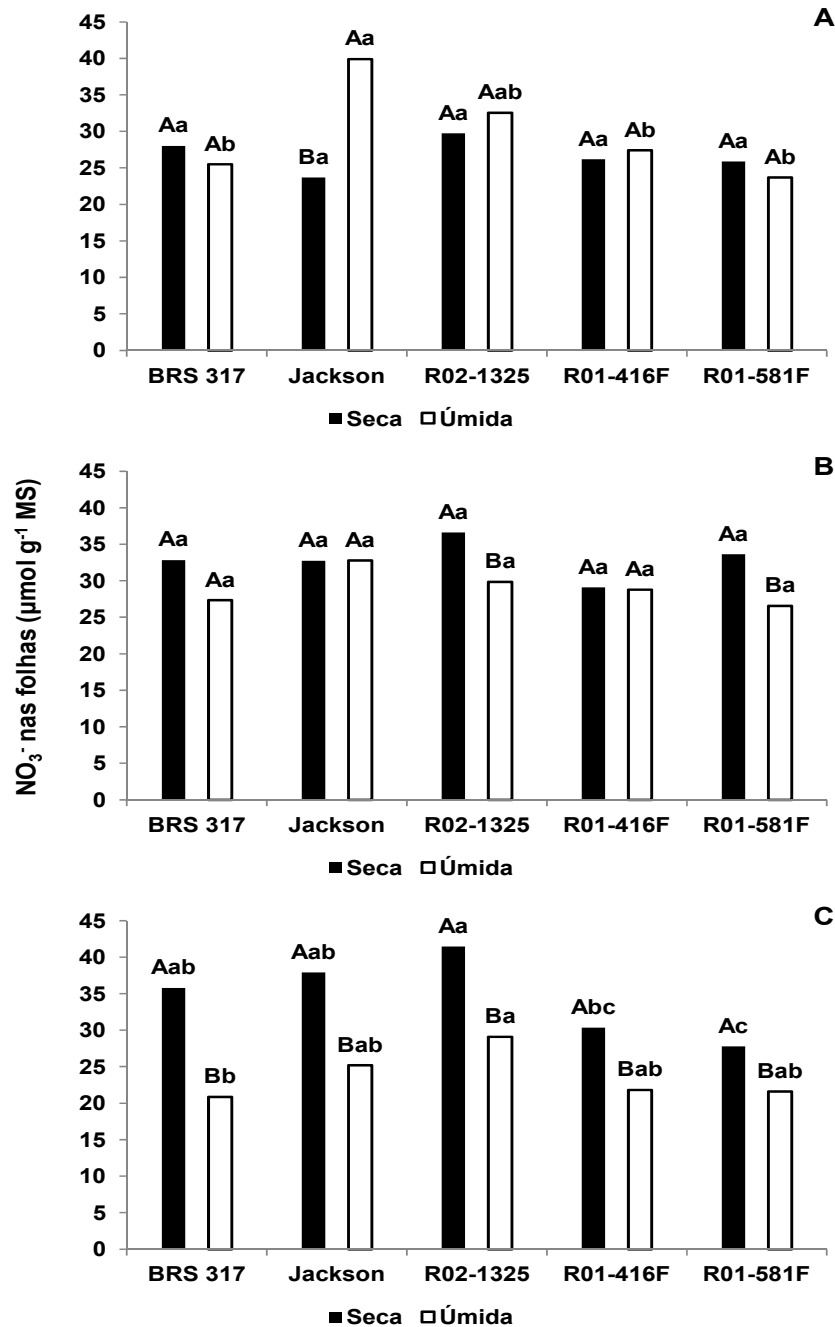
A: CV% = 18,37; valor de P (CH) = 0,002; valor de P (G) = 0,001; valor de P (CHxG) = 0,123.

B: CV% = 9,83; valor de P (CH) = 0,139; valor de P (G) = 0,516; valor de (CHxG) = 0,058.

C: CV% = 8,86; valor de P (CH) < 0,001; valor de P (G) = 0,597; valor de P (CHxG) = 0,125.

CH = Condição hídrica; G = Genótipo; CC = Capacidade de campo. Valores em μmol de NH_4^+ por grama de massa seca (MS).

Figura 5.3. Concentração de nitrato (NO_3^-) em folhas de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R_2 , por (B) 22 dias até R_4 e por (C) 42 dias até R_6 .



Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas (condição hídrica, dentro de genótipo) e minúsculas (genótipos, dentro de condição hídrica) não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

A: CV% = 22,11; valor de P (CH) = 0,087; valor de P (G) = 0,068; valor de P (CHxG) = 0,011.

B: CV% = 15,74; valor de P (CH) = 0,007; valor de P (G) = 0,232; valor de P (CHxG) = 0,295.

C: CV% = 15,05; valor de P (CH) < 0,001; valor de P (G) < 0,001; valor de P (CHxG) = 0,191.

CH = Condição hídrica; G = Genótipo; CC = Capacidade de campo. Valores em μmol de NO_3^- por grama de massa seca (MS).

Sob 10 dias de restrição hídrica no estágio de florescimento (R_2), a

atividade da enzima glutamina sintetase (GS) nos nódulos foi reduzida nos genótipos BRS 317 (25,3%), R01-416F (37%) e R01-581F (55,7%); porém aumentou nos genótipos Jackson (23%) e R02-1325 (37,8%). No estágio R₄, o efeito da seca por 22 dias aumentou a atividade da GS nos genótipos BRS 317 (84,7%), Jackson (52,2%) e R01-416F (123,5%) e não foi influenciada nas linhagens R02-1325 e R01-581F, quando comparada com o controle úmido. Em R₆, após 42 dias de seca, a GS diminuiu na cv. BRS 317 (56,6%) e aumentou na linhagem R02-1325 (64,2%), sem efeito nos demais genótipos (Figura 5.4).

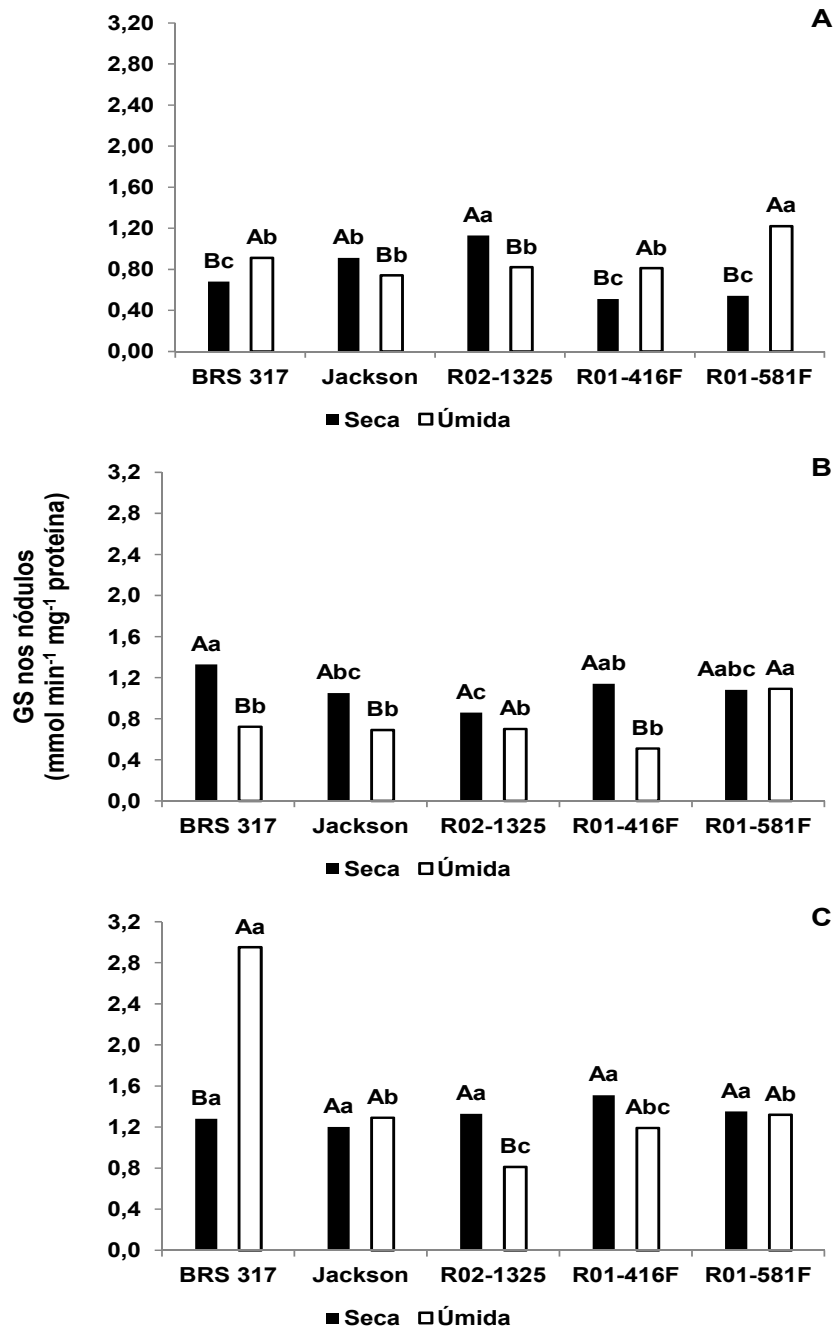
Ao serem comparados os genótipos após 10 dias sob seca, no estágio R₂, a linhagem R02-1325 apresentou maior atividade da GS nos nódulos em relação aos demais genótipos. Aos 22 dias em R₄, a cv. BRS 317 apresentou maior atividade em relação a cv. Jackson e a linhagem R02-1325. Aos 42 dias em R₆, as médias entre os genótipos não diferiram entre si (Figura 5.4).

A atividade específica da GS aumentou com o avanço dos estádios reprodutivos, de 0,83 mmol (R₂) para 0,92 mmol (R₄) e, depois, para 1,42 mmol (R₆) na média das condições hídricas; no entanto, o comportamento da atividade da GS se apresentou muito particular de genótipo para genótipo, de tempo para tempo, seja sob seca ou sob condição úmida. Contudo, a linhagem R02-1325 e a variedade cv. Jackson não tiveram a atividade da GS reduzida em nenhum dos estádios ou tempo de exposição à seca. Em contrapartida, a cv. BRS 317 apresentou redução na GS nos tempos de 10 dias de seca no estágio R₂ e de 42 dias em R₆ (Figura 5.4).

No processo de FBN, o primeiro produto estável é a amônia (NH₃), que tem sua assimilação mediada pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), precursores dos ureídeos que são translocados via xilema para a parte aérea. A diminuição da atividade da GS causada por estresses pode ser um dos fatores limitantes à FBN (HUNGRIA, 1994).

O aumento ou a redução da atividade da GS sob seca pode estar associado à concentração de ureídeos na seiva do xilema em função de vários fatores, como o tempo de exposição e o estágio da planta. Alguns autores avaliaram a cv. Jackson e associaram os baixos teores de ureídeos no exsudato do xilema e nos pecíolos à condição de pleno suprimento de água, mas também houve baixo acúmulo de ureídeos quando essa variedade era exposta à seca (SERRAJ; SINCLAIR, 1997; SERRAJ et al., 1997; SERRAJ; VADEZ; SINCLAIR, 2001).

Figura 5.4. Atividade específica da enzima glutamina sintetase (GS) em nódulos de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R₂, por (B) 22 dias até R₄ e por (C) 42 dias até R₆.



Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas (condição hídrica, dentro de genótipo) e minúsculas (genótipos, dentro de condição hídrica) não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

A: CV% = 14,40; valor de P (CH) < 0,001; valor de P (G) < 0,001; valor de P (CHxG) < 0,001.

B: CV% = 15,86; valor de P (CH) < 0,001; valor de P (G) < 0,001; valor de P (CHxG) < 0,001.

C: CV% = 17,80; valor de P (CH) = 0,017; valor de P (G) < 0,001; valor de P (CHxG) < 0,001.

CH = Condição hídrica; G = Genótipo; CC = Capacidade de campo. Valores em mmol de γ -glutamil hidroxamato formados por minuto por miligrama de proteína.

A primeira barreira enzimática que atua na proteção celular contra o estresse oxidativo é a superóxido dismutase, que atua na dismutação do radical superóxido, e o transforma em peróxido de hidrogênio e oxigênio ($O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$) (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; SILVA, 2013).

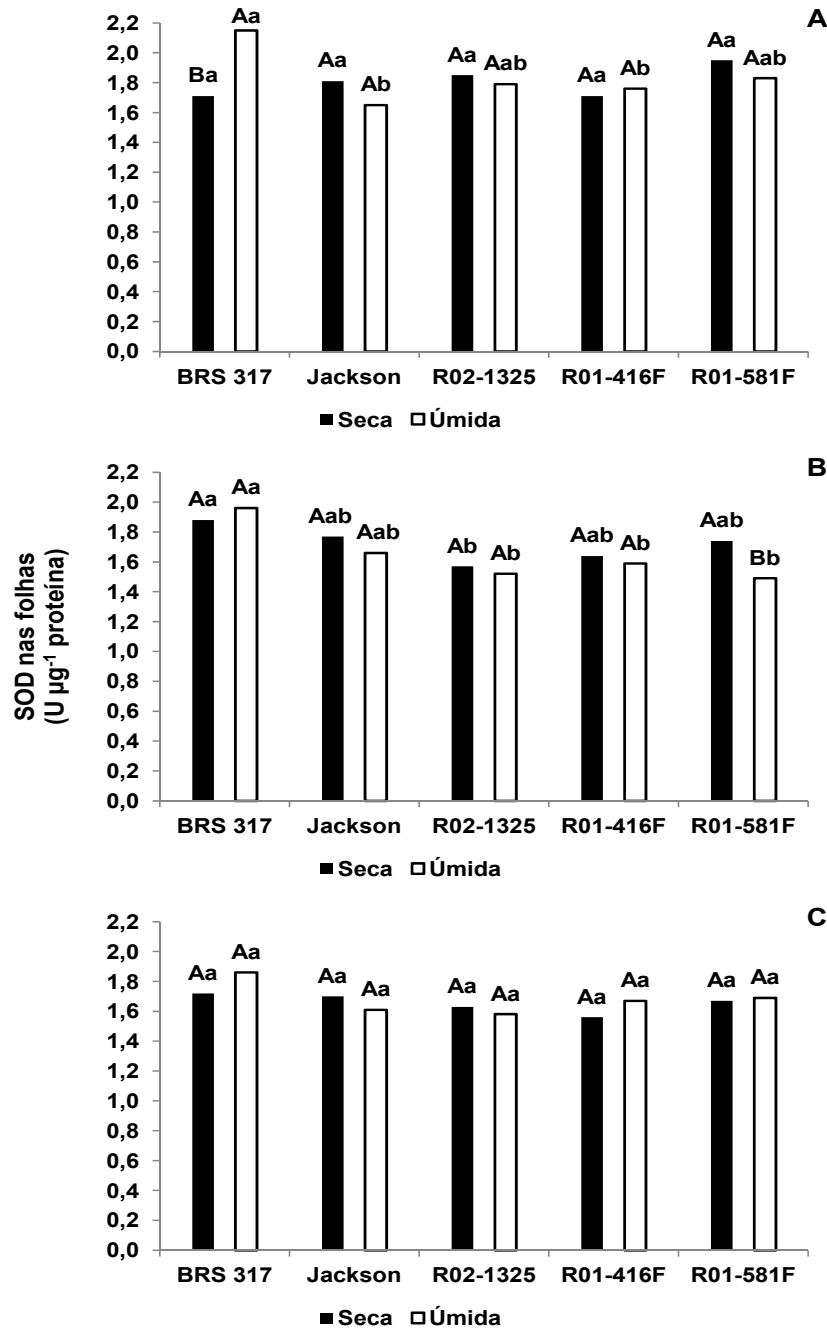
A atividade específica da enzima superóxido dismutase (SOD) sob 10 dias de seca foi reduzida nas folhas do genótipo cv. BRS 317 (20,4%) no estágio R₂; e, aos 22 dias em R₄ aumentou na linhagem R01-581F (16,8%), comparado ao controle úmido. Para os demais genótipos, não houve diferenças entre as médias dos tratamentos seca e úmida, o que ocorreu para todos os genótipos aos 42 dias em R₆ (Figura 5.5).

Ao serem comparadas as médias dos genótipos nos três tempos de exposição à seca, foram observadas diferenças apenas aos 22 dias no estágio R₄, no qual a variedade cv. BRS 317 apresentou a maior atividade da SOD e diferiu apenas da linhagem R02-1325, em que houve redução em 16,5%, quando exposta à seca (Figura 5.5).

A atividade específica da enzima catalase (CAT) nas folhas da cv. Jackson aumentou (236%) quando exposta à seca por 10 dias no estágio R₂, enquanto as médias dos demais genótipos não foram influenciadas pela condição hídrica. No estágio R₄, a atividade da CAT diminuiu nas folhas da cv. BRS 317 (29,1%), aumentou nas linhagens R02-1325 (83,5%) e R01-416F (55%), e não diferiu para a cv. Jackson e a linhagem R01-581F em resposta à seca. Com o aumento do período de exposição à seca em R₆, a atividade da CAT aumentou nas folhas da cv. BRS 317 (63,1%), reduziu na cv. Jackson (46,4%), e não foi alterada nas linhagens (Figura 5.6).

Quando a atividade da CAT foi comparada entre os genótipos sob restrição hídrica, no estágio R₂, a linhagem R01-581F não diferiu da cultivar Jackson, e ambos foram significativamente superiores aos demais genótipos. Em R₄, a cv. BRS 317 e a linhagem R02-1325 apresentaram valores superiores a R01-581F. Em R₆, não houve diferenças entre os genótipos (Figura 5.6).

Figura 5.5. Atividade específica da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R₂, por (B) 22 dias até R₄ e por (C) 42 dias até R₆.



Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas (condição hídrica, dentro de genótipo) e minúsculas (genótipos, dentro de condição hídrica) não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

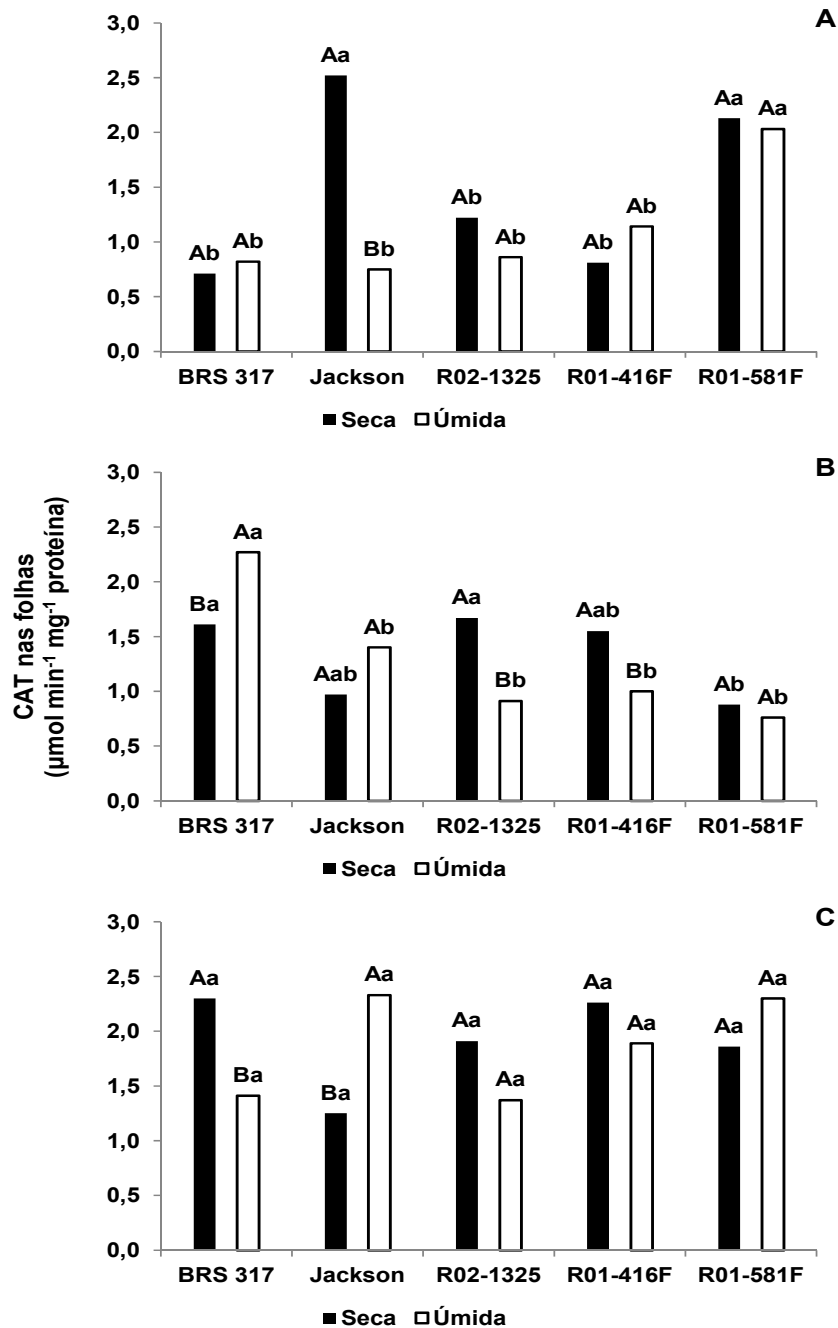
A: CV% = 10,81; valor de P (CH) = 0,598; valor de P (G) = 0,104; valor de P (CHxG) = 0,011.

B: CV% = 10,06; valor de P (CH) = 0,113; valor de P (G) < 0,001; valor de P (CHxG) = 0,294.

C: CV% = 11,94; valor de P (CH) = 0,617; valor de P (G) = 0,249; valor de P (CHxG) = 0,664.

CH = Condição hídrica; G = Genótipo; CC = Capacidade de campo; Valores expressos em U µg⁻¹ proteína: quantidade de enzima requerida para inibir 50% da fotoredução do NBT (Nitroblue tetrazolium) por micrograma de proteína.

Figura 5.6. Atividade específica da enzima catalase (CAT) em folhas de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R₂, por (B) 22 dias até R₄ e por (C) 42 dias até R₆.



Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas (condição hídrica, dentro de genótipo) e minúsculas (genótipos, dentro de condição hídrica) não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

A: CV% = 25,31; valor de P (CH) = 0,001; valor de P (G) < 0,001; valor de P (CHxG) < 0,001.

B: CV% = 30,40; valor de P (CH) = 0,542; valor de P (G) < 0,001; valor de P (CHxG) = 0,001.

C: CV% = 32,67; valor de P (CH) = 0,752; valor de P (G) = 0,440; valor de P (CHxG) = 0,007.

CH = Condição hídrica; G = Genótipo; CC = Capacidade de campo. Valores em μmol de H_2O_2 por minuto por miligrama de proteína.

O aumento da atividade da CAT indica que as folhas aumentaram a sua capacidade de catalisar a decomposição do H_2O_2 em O_2 e H_2O . Fu, Huang e Zhang (2000) sugerem que a atividade da catalase aumenta a partir do florescimento e decresce próximo à senescência. Garcia (2009) avaliou as condições de senescência em genótipos de soja identificando a ação das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo na parte aérea e concluiu que o estresse oxidativo não foi o fator determinante na senescência foliar natural das plantas.

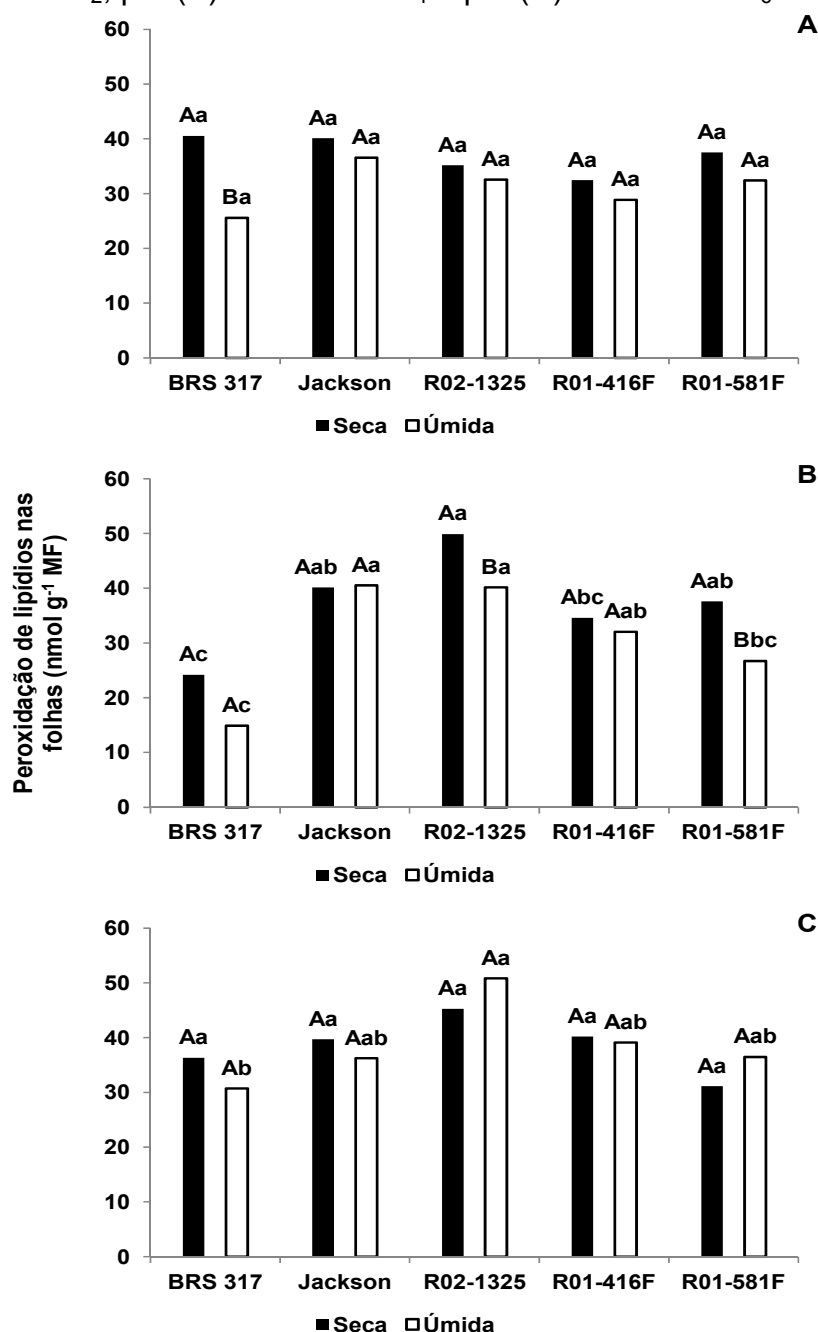
Os resultados da atividade da CAT indicam características de tolerância ao estresse oxidativo sob déficit hídrico nas linhagens. Em R_2 , os genótipos sob seca não apresentaram redução da atividade da enzima catalase. Sob déficit hídrico, a cv. BRS 317 reduziu a atividade da enzima nas folhas em R_4 , e a cv. Jackson apresentou menor atividade enzimática em relação ao seu controle em R_6 . Nenhuma das linhagens apresentou redução da atividade da catalase sob seca nos três períodos avaliados (Figura 5.6).

A peroxidação lipídica foi maior nas folhas (Figura 5.7) do que nas raízes (Figura 5.8). Aos 10 dias sob seca no estágio R_2 , a cv. BRS 317 apresentou aumento dos valores de peroxidação de lipídios nas folhas em 58,7%, em comparação ao controle úmido. Igualmente, após 22 dias sob seca, no estágio R_4 , as linhagens R02-1325 e R01-581F apresentaram aumento da lipoperoxidação foliar em 24,3% e 40,8%, respectivamente. Com o aumento da exposição à seca por 42 dias, os genótipos não diferiram quanto à peroxidação de lipídios entre os tratamentos sob seca e úmido. Na comparação entre os genótipos nas folhas, houve diferenças somente aos 22 dias no estágio R_4 , cujos valores reduziram para a cv. BRS 317 e aumentaram para a R02-1325 sob seca (Figura 5.7).

A peroxidação lipídica acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, com liberação de produtos citotóxicos, como o malonaldeído (MDA), culminando na morte da célula (SALISBURY; ROSS, 2013). Comparativamente, entre a condição úmida e seca, após 10 dias (R_2) e 22 dias (R_4) de restrição hídrica, não houve aumento do valor de MDA nas raízes; porém, houve redução do valor no estágio R_2 para a linhagem R01-416F (35,1%). Com o aumento da exposição à seca em 42 dias (R_6), aumentou a peroxidação de lipídios nas raízes dos genótipos cv. BRS 317 (53%), cv. Jackson (72,6%) e R02-1325 (49,4%). Nesse estágio, não houve efeito da seca nas linhagens R01-416F e R01-581F em relação à lipoperoxidação, quando comparadas à condição de

suprimento normal de água (80% CC) (Figura 5.8).

Figura 5.7. Peroxidação de lipídios em folhas de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R₂, por (B) 22 dias até R₄ e por (C) 42 dias até R₆.



Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas (condição hídrica, dentro de genótipo) e minúsculas (genótipos, dentro de condição hídrica) não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

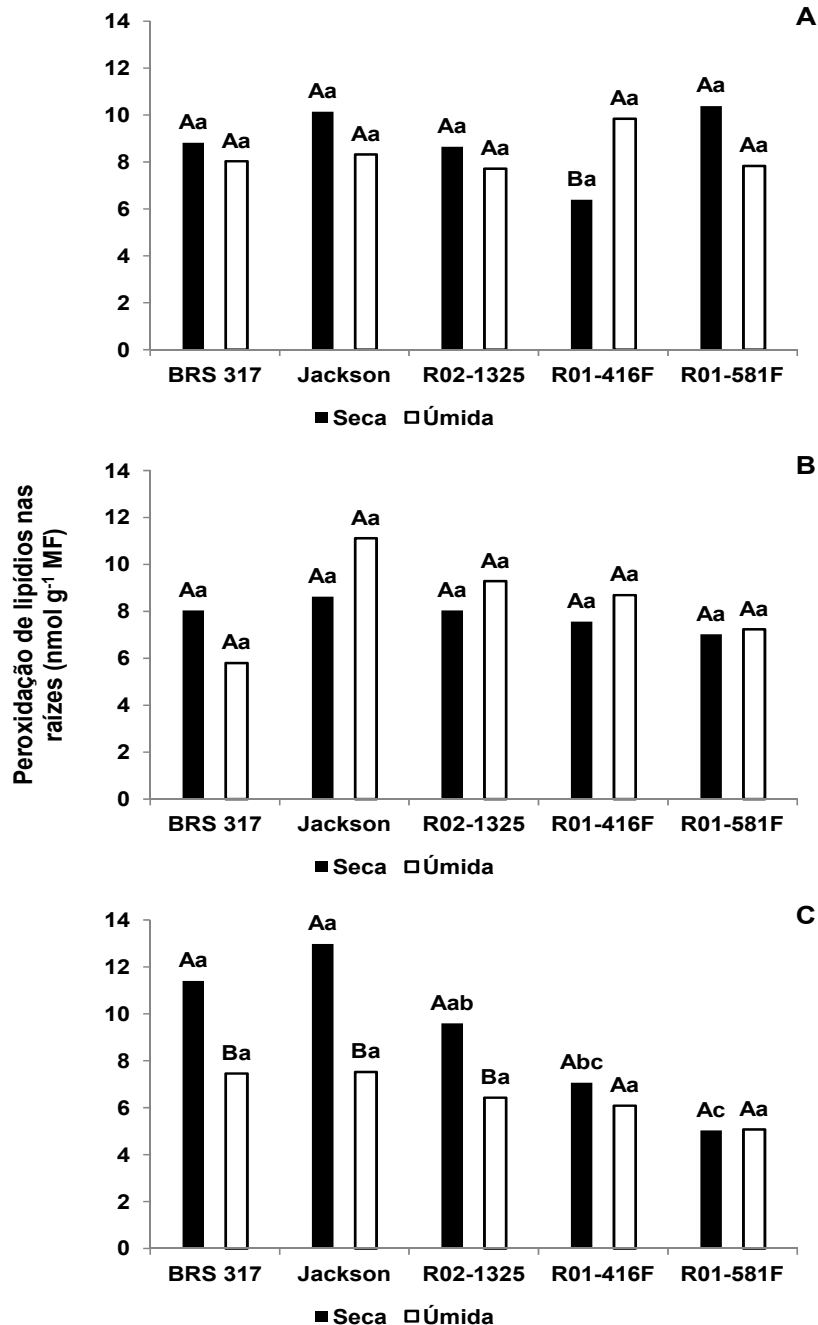
A: CV% = 24,58; valor de P (CH) = 0,017; valor de P (G) = 0,357; valor de P (CHxG) = 0,457.

B: CV% = 21,55; valor de P (CH) = 0,004; valor de P (G) < 0,001; valor de (CHxG) = 0,346.

C: CV% = 23,08; valor de P (CH) = 0,955; valor de P (G) = 0,005; valor de (CHxG) = 0,525.

Resultados em nmols de TBARS-MDA por g de massa fresca. CH = Condição hídrica; G = Genótipo; CC = Capacidade de campo. TBARS = Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. MDA = Malonaldeído. Valores em nmol de TBARS-MDA por grama de massa fresca (MF).

Figura 5.8. Peroxidação de lipídios em raízes de genótipos de soja com diferentes níveis de FBN tolerante à seca (cv. BRS 317, cv. Jackson, R02-1325, R01-416F e R01-581F) expostos à condição úmida (80% CC) e de seca (30% CC) por (A) 10 dias até o estágio R₂, por (B) 22 dias até R₄ e por (C) 42 dias até R₆.



Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas (condição hídrica, dentro de genótipo) e minúsculas (genótipos, dentro de condição hídrica) não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

A: CV% = 29,09; valor de P (CH) = 0,461; valor de P (G) = 0,783; valor de P (CHxG) = 0,091.

B: CV% = 39,78; valor de P (CH) = 0,540; valor de P (G) = 0,261; valor de P (CHxG) = 0,566.

C: CV% = 25,75; valor de P (CH) < 0,001; valor de P (G) < 0,001; valor de P (CHxG) = 0,030.

Resultados em nmols de TBARS-MDA por g de massa fresca. CH = Condição hídrica; G = Genótipo; CC = Capacidade de campo. TBARS = Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. MDA = Malonaldeído.

Quando a comparação foi entre os genótipos nos estádios R₂ e R₄, não houve diferenças sob restrição hídrica; no estádio R₆, com o aumento do período de exposição à seca, a linhagem R01-581F apresentou a menor média em relação aos genótipos cv. BRS 317, cv. Jackson e R02-1325 (Figura 5.8).

A cv. BRS 317 se apresentou sensível às espécies reativas de oxigênio (ERO) aos 10 dias de exposição à seca em R₂ e aos 22 dias em R₄, com a redução da atividade das enzimas SOD (R₂) e CAT (R₄), e aumento da peroxidação de lipídios nas folhas (R₂). A cv. Jackson (FBN tolerante à seca) se apresentou sensível às ERO, como sugerem os dados de redução da atividade da CAT e aumento da peroxidação lipídica nas raízes aos 42 dias de seca no estádio R₆, quando a planta iniciava sua senescência. Igualmente, a cv. BRS 317 e a linhagem R02-1325 apresentaram sensibilidade às ERO aos 42 dias sob seca no estádio R₆ para a peroxidação de lipídios nas raízes. As linhagens R02-1325, R01-416F e R01-581F, consideradas como FBN tolerante à seca moderada, não se apresentaram sensíveis às espécies reativas de oxigênio nos estádios iniciais quando avaliada pela atividade da SOD ou da CAT, mas com base na peroxidação de lipídios nas folhas, as linhagens R02-1325 e R01-581F foram sensíveis às ERO em R₄; e a R02-1325 nas raízes em R₆. A linhagem R01-481F foi tolerante às ERO sob restrição hídrica, com base nos resultados de peroxidação de lipídios e da atividade das enzimas SOD e CAT (Figuras 5.6, 5.7 e 5.8).

5.6 CONCLUSÕES

A concentração de NH₄⁺ foi reduzida enquanto a concentração de NO₃⁻ aumentou em folhas dos genótipos durante os estádios reprodutivos, à medida que aumentou o período de exposição à seca. A maior redução da concentração de NH₄⁺ nas folhas nos períodos iniciais de seca reforça a cv. Jackson e a linhagem R02-1325 como tolerantes à seca, principalmente quando essa característica é associada à vantagem desses genótipos não terem tido redução da atividade da enzima glutamina sintetase nos nódulos.

A redução da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase identificaram genótipos sensíveis às espécies reativas de oxigênio quando expostos à seca nos estádios iniciais, como a cv. BRS 317 aos 10 dias e 22 dias, reforçado pelo aumento da peroxidação de lipídios nas folhas desse

genótipo no estágio R₂, como também para as linhagens R01-581F e R02-1325 em R₄.

A linhagem R01-416F foi tolerante às espécies reativas de oxigênio avaliada pelas atividades de SOD e CAT ou de peroxidação de lipídios. As linhagens R02-1325, R01-416F e R01581F não sofreram reações às ERO com base na atividade da enzima catalase.

CONCLUSÕES GERAIS

A seca diminuiu a nodulação e o teor foliar de N na soja; aumentou os teores de ureídos no estágio inicial e no final, em pecíolos e nódulos, e não reduziu a atividade da enzima glutamina sintetase nos nódulos da linhagem R02-1325 e da cv. Jackson. Com a intensificação do período de exposição à seca, o teor de NH_4^+ reduziu e o de NO_3^- aumentou nas folhas. Essa característica em reduzir o NH_4^+ nos tempos iniciais de exposição à seca pode ser uma característica que confere tolerância à seca aos genótipos R02-1325 e Jackson.

A restrição hídrica diminuiu os componentes de rendimento a partir dos estádios reprodutivos iniciais e seu efeito se intensificou com o aumento do período de seca. A produção de sementes diminuiu com o déficit hídrico, mas os genótipos Jackson e R01-581F apresentaram tolerância à restrição hídrica no tempo de exposição à seca por até 10 dias durante o estágio de florescimento, enquanto a cv. BRS 317 apresentou tolerância à seca por até 22 dias com exposição durante os estádios de florescimento e de formação de vagens. Assim, os melhores períodos para avaliação da tolerância à seca, quanto aos componentes de produção, foram os de 10 dias no estágio R_2 e de 22 dias em R_4 . A linhagem R02-1325 apresentou maior produção de sementes sob pleno suprimento de água em 80% da capacidade de campo (CC) e quando exposta à seca em 30% da CC não diferiu dos genótipos mais produtivos.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) ou da catalase (CAT) foi eficiente em identificar genótipos tolerantes ou sensíveis a ação das espécies reativas de oxigênio quando foram expostos à seca. A cv. BRS 317 foi sensível ao estresse oxidativo nos tempos iniciais de exposição à seca por até 10 dias em R_2 e por até 22 dias em R_4 com base na redução da atividade das enzimas SOD e CAT e aumento da peroxidação de lipídios nas folhas. A cv. Jackson, a cv. BRS 317 e a linhagem R02-1325 foram sensíveis às espécies reativas de oxigênio após 42 dias de exposição à seca, quanto a peroxidação de lipídios nas raízes. As três linhagens expostas à seca foram tolerantes ao estresse oxidativo com a atividade da enzima catalase. A linhagem R01-416F apresentou maior tolerância ao estresse oxidativo quando exposta à seca.

As características relacionadas ao estresse oxidativo não foram determinantes em identificar, comparativamente, genótipos quanto à tolerância à

seca, como foram as características relacionadas à FBN e aos componentes de produção sob restrição hídrica. Nesse sentido, as linhagens R01-581F e R02-1325 apresentam-se como materiais potenciais para a indicação em programas de melhoramento genético visando tolerância à seca moderada.

REFERÊNCIAS

- ABOGADALLAH, G. M. Insights into the significance of antioxidative defense under salt stress. **Plant Signaling & Behavior**, v.5, n.4, p.369-374, 2010.
- ALAMILLO, J. M.; DÍAZ-LEAL, J. L.; SÁNCHEZ-MORAN, M. V.; PINEDA, M. Molecular analysis of ureide accumulation under drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant, Cell and Environment**, v.33, p.1828-1837, 2010.
- ALBUQUERQUE, P. E. P. **Estratégias de manejo de irrigação**: Exemplos de cálculo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 24 p. (Circular técnica, 136).
- ALVES, J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant Soil**, v.252, p.1-9, 2003.
- AMARAL, D. D.; CORDEIRO, L. A. M.; GALERANI, P. R. Plano setorial de mitigação e adaptação às mudanças climáticas para consolidação da economia de baixa emissão de carbono na agricultura – Plano ABC. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.4, n.6, p.1266-1274, 2011.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidases and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-1257, 1995.
- APPLEBY, C. A. Leghemoglobin and rhizobium respiration. **Annual Review of Plant Physiology**, v.35, p.443-478, 1984.
- ARAUJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja coinfectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.9, 1999.
- AZIZ, A.; LARHER, F.; Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassic nappus* L. **Journal of Plant Physiology**, v.153, n.5/6, p.754-762, 1998.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.
- BERGONCI, J. I.; BERGAMASCHI, H.; SANTOS, A. O.; FRANÇA, S.; RADIN, B. Eficiência da irrigação em rendimento de grãos e matéria seca de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.7, 2001.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v.91, p.179-194, 2003.
- BONATO, E. R; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil**: história e estatística. Londrina: Embrapa Soja, 1987. 61 p. (Documentos, 21).

BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, v.164, p.77-84, 2003.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano setorial de mitigação e de adaptação às mudanças climáticas para a consolidação de uma economia de baixa emissão de carbono na agricultura**: plano ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ministério do Desenvolvimento Agrário, coordenação da Casa Civil da Presidência da República. Brasília: MAPA/ACS, 2012. 173 p.

BROWN, E.; BROWN, D.; CAVINESS, C. Response of selected soybean cultivars to soil moisture deficit. **Agronomy Journal**, v.77, n.2, p.274-278, 1985.

CALVACHE, A. M.; REICHARDT, K.; BACCHI, O. O. S. Efeito de épocas de deficiência hídrica na evapotranspiração atual da cultura do feijão cv. imbabello. **Scientia Agricola**, v.55, n.3, 1998.

CAMPOS, B. C.; HUNGRIA, M.; TEDESCO, V. Eficiência da fixação biológica de N₂ por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.583-592, 2001.

CAPITANI, D.; BRILLI, F.; MANNINA, L.; PROIETTI, N.; LORETO, F. In situ investigation of leaf water status by portable unilateral NMR. **Plant Physiology**, v.149, p.1648-1647, 2009.

CARMAK, I.; HORST, J. H. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468, 1991.

CASTRO, I. V. Efeitos ecotoxicológicos dos metais pesados na fixação biológica do azoto em solos contaminados industrialmente. **Silva Lusitana**, v.8, p.165-194, 2000.

CASTRO, P. R. C.; BERGAMIN, M.; CANCIAN, M. A. E. Soja. In: CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R. A. (Ed.). **Ecofisiologia de cultivos anuais**. São Paulo: Editora Nobel, 1999. p.73-90.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.6, p.71-80, 1975.

CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v.163, p.563-571, 2004.

- CEREZINI, P. **Efeito da restrição hídrica na fixação biológica de nitrogênio em soja**. 2013. 57 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.
- CEREZINI, P.; PÍPOLO, A. E.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Gas exchanges and biological nitrogen fixation in soybean under water restriction. **American Journal of Plant Sciences**, v.5, p.4011-4017, 2014.
- CHARLSON, D. V.; KORTH, K. L.; PURCELL, L. C. Allantoate amidohydrolase transcript expression in independent of drought tolerance in soybean. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.847–851, 2009.
- CHEN, P.; SNELLER, C. H.; PURCELL, L. C.; SINCLAIR, T. R.; KING, C. A.; ISHIBASHI, T. Registration of soybean germplasm lines R01-416F and R01-581F for improved yield and nitrogen fixation under drought stress. **Journal of Plant Registration**, v.1, p.166-167, 2007.
- CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, n.5, 2003.
- COLETO, I.; PINEDA, M.; RODINO, A. P.; DERON; A. M.; ALAMILLO, J. M. Comparison of inhibition of N₂ fixation and ureide accumulation under water deficit in four common bean genotypes of contrasting drought tolerance. **Annals of Botany**, v.113, p.1071-1082, 2014.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Central de informações agropecuárias**. 2012. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 27 dez. 2015.
- CORONEL, D. A.; MACHADO, J. A. D.; CARVALHO, F. M. A. de. Analysis of the exports competitiveness of the complex soy Brazilian from 1995 to 2006: an approach of market-share. **Revista de Economia Contemporânea**, Rio de Janeiro, v.13, n.2, 2009.
- CULLIMORE, J. P.; SIMS, A. P. An association between photorespiration and protein catabolism: studies with chlamydomonas. **Planta**, v.150, p.392-396, 1980.
- CUNHA, G. R.; BERGAMASCHI, H. Efeito da disponibilidade hídrica sobre o rendimento das culturas. In: BERGAMASCHI, H. (Coord.). **Agrometeorologia Aplicada à Irrigação**. Porto Alegre: UFRGS - Ed. Universitária, 1992. p.85-97.
- DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; ORMENÕ-ORRILLO, E.; MELO, I. S.; MARTINÉZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. (2013) Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v,63, p.3342–3351, 2013.
- DE LUCA, M. J.; HUNGRIA, M. Plant densities and modulation of symbiotic nitrogen fixation in soybean. **Scientia Agricola**, v.71, p.181-187, 2014.

DEL CORSO, J.; SILVA, W.; DUCLÓS, L. Avaliação do processo de transmissão dos preços da soja praticados nos mercados físico brasileiro e norte-americano. **Revista de Negócios**, Blumenau, v.11, n.3, p.61-72, 2006.

DESCLAUX, D.; HUYNH, T. T.; ROUMET, P. Identification of soybean plant characteristics that indicate the timing of drought stress. **Crop Science**, v.40, n.3, p.716-722, 2000.

DEVI, M. J.; SINCLAIR, T. R.; CHEN, P.; CARTER, T. Evaluation of elite southern maturity soybean breeding lines for drought tolerant traits. **Agronomy Journal**, v.106, p.1947–1954, 2014.

DIXON, R. O. D.; WHEELER, C. T. **Nitrogen fixation in plants**. New York: Chapman and Hall, 1986.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.771-774, 1997.

ECK, H.V.; MATHERS, A. C.; MUSICK, J. T. Plant water stress at various growth stages and growth and yield of soybeans. **Field Crops Research**, v.17, n.1, p.1-16, 1987.

ELSTNER, E. F.; OSSWALD, W. Mechanisms of oxygen activation during plant stress. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**, v.102b, p.131-154, 1994.

EMBRAPA. **Cultivares de soja. Região Central e Sul do Brasil 2010/2011**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 62 p. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/download/FolhetoSoja.pdf>>. Acesso em: 04 mar 2016.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – Paraná 2005**. Sistema de Produção 5. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 224 p.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265p. (Sistema de Produção, 16).

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; VAN LIER, Q. J.; SANTOS, O. S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja - Revisão. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n.1, p.89-106, 2007.

FARIAS, J. R. B.; ASSAD, E. D.; ALMEIDA, I. R.; EVANGELISTA, B. A.; LAZZAROTTO, C.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L. Caracterização de risco climático nas regiões produtoras de soja no Brasil. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.9, n.2, 2001.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Cooperative Extension Service, Agriculture and Home Economics Experiment Station, Iowa State University, Ames, Iowa, 1977.

FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Biochemistry**, v.49, p.1080, 1977.

FERGUSON, A. R.; SIMS, A. P. Inactivation in vivo of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase: its role in the regulation of glutamine synthesis in yeasts. **Journal of General Microbiology**, v.69, p.423-427, 1971.

FINOTO, E. L.; SEDIYAMA, T.; BARROS, H. B. Fixação biológica de nitrogênio e inoculação com *Bradyrhizobium*. In: SEDIYAMA, T. (Ed.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Editora Mecenas, 2009. p.59-69.

FREIRE, J. R. J.; VERNETTI, F. J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.5, p.117-126, 1999.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. In: MEINSTER, A. (Ed.). **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 1986. p.61-97.

FU, J.; HUANG, B.; ZHANG, G. Physiological and biochemical changes during seed filling in relation to leaf senescence in soybean. **Biologia Plantarum**, v.43, p.545-548.

GARCIA, M. P. **Alterações fisiológicas e avaliação do estresse oxidativo durante o desenvolvimento e a senescência de folhas de soja, *Glycine max* L.** 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em fisiologia vegetal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2009.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

GROSSET, D. R.; MILHOLLON, E. P. ; LUCAS, M. C. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. **Crop Science**, v.34, p.706-714, 1994.

GUIMARÃES, C. M.; STONE, L. F. **Métodos de avaliação das condições hídricas das plantas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2008. 8 p. (boletim técnico).

GUIMARÃES, C. M.; STONE, L. F.; LORIEUX, M.; OLIVEIRA, J. P.; ALENCAR, G. C. O; DIAS, R. A. A. Infrared thermometry for drought phenotyping of inter and intra specific upland rice lines. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, p.148-154, 2010.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.

HEINRICHS, R.; GAVA, G. J.; CORAZZA, E. J.; DUETE, R. R. C.; VILLANUEVA, F. C. A.; MURAOK, T. Forma preferencial de absorção de nitrogênio ($^{15}\text{NH}_4^+$ ou $^{15}\text{NO}_3^-$) pelas culturas de soja, feijão, arroz e milho. **Científica**, v.34, n.1, p.25-30, 2006.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry and molecular biology**. New York: Oxford University Press Inc. 1997. 522p.

HERNÁNDEZ, J. A.; ALMANSA, M. S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. **Physiologia Plantarum**, v.115, p.251-257, 2002.

HIRAYAMA, M.; WADA, Y.; NEMOTO, H. Estimation of drought tolerance based on leaf temperature in upland rice breeding. **Breeding Science**, v.56, p.47-54, 2006.

HUNGRIA, M. Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nódulos. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.249-283.

HUNGRIA, M.; BARRADAS, C. A.; WALLSGROVE, R. M. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Experimental Botany**, v.42, p.839-844, 1991.

HUNGRIA, M.; BOHRER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p.45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja. (Circular Técnica / Embrapa Soja, n.17; Circular Técnica / Embrapa Cerrados, n. 34), 2001. 48 p.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; CAMPO, R. J. **A inoculação da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 1997. (Circular Técnica / Embrapa Soja, 35; Circular Técnica / Embrapa Cerrados, 13), 1997. 28 p.

HYMOWITZ, T. Soybeans: the success story. In: JANICK, J.; SIMON, J. (Ed.). **Advances in new crops**. Portland: Timber, 1990, p.159-163.

JAMES, A. T.; LAWN, R. J.; COOPER, M. Genotypic variation for drought stress response traits in soybean. II. Inter-relations between epidermal conductance, osmotic potential, relative water content, and plant survival. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.59, p.670-678, 2008.

JIMÉNEZ, A.; GÓMEZ, J. M.; NAVARRO, E.; SEVILLA, F. Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.515-520, 2002.

JUNG, S. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. **Plant Science**, v.166, p.459-466, 2004.

KASTER, M.; QUEIROZ, E. F.; TERASAWA, F. Introdução da soja no Brasil. No Estado do Paraná. In: MIYASAKA, S. EMEDINA, J. C. (ed.). **A soja no Brasil**. Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, Seção de Divulgação, 1981. p.22-24.

KENDALL, A. C.; WALLSGROVE, R. M.; HALL, N. P.; TURNER, J. C.; LEA, P. J. Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. **Planta**, v.168, p.316-323, 1986.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 446 p.

KING, C. A.; PURCELL, L. C. Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. **Plant Physiology**, n.137, p.1389-1396, 2005.

KING, C. A.; PURCELL, L. C. Soybean nodule size and relationship to nitrogen fixation response to water deficit. **Crop Science**, v.41, p.1099-1107, 2001.

KORTE, L. L.; WILLIAMS, J. H.; SPECHT, J. E.; SORENSEN, R. C. Irrigation of soybean genotypes during reproductive ontogeny I: agronomic responses. **Crop Science**, v.23, n.3, p.521-527, 1983.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic Press, 1995.

KRON, A. P.; SOUZA, G. M.; RIBEIRO, R. V. Water deficiency at different developmental stages of *Glycine max* can improve drought tolerance. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.1, p.43-49, 2008.

KU, Y.-S.; AU-YEUNG, W.-K.; YUNG, Y.-L.; LI, M.-W.; WEN, C.-Q.; LIU, X.; LAM, H.-M. Drought Stress and Tolerance in Soybean. In: BOARD, J. E. (Ed.). **A comprehensive survey of international soybean research**. Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships. New York: In Tech, 2013. p. 209–237.

KUSS, R. C. R. **Populações de plantas e estratégias de irrigação na cultura da soja**. 2006. 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

KUSS, R. C. R.; KÖNIG, O.; DUTRA, L. M. C.; BELLÉ, R. A.; ROGGIA, S.; STURMER, G. R. Populações de plantas e estratégias de manejo de irrigação na cultura da soja. **Ciência Rural**, v.38, p.1133-1137, 2008.

LADRERA, R.; MARINO, D.; LARRAINZAR, E.; GONZÁLEZ, E. M.; ARRESE-IGOR, C. Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean. **Plant Physiology**, v.145, p.539-546, 2007.

LANGE, C. E. Soja. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. (Ed.). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p.779-802.

LAZZAROTTO, J. J., HIRAKURI, M. H. **Evolução e perspectiva de desempenho econômico associados com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2009. (Embrapa Soja. Documentos, 319).

LESK, C.; ROWHANI, P.; RAMANKUTTY, N. Influence of extreme weather disasters on global crop production. **Nature**, v.59, p.84-98, 2016.

LIBARDI, P. L. **Dinâmica da água no solo**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2005. 347 p.

LIKOSWE, A. A.; LAWN, R. J. Response to terminal water deficit stress of cowpea, pigeonpea, and soybean in pure stand and in competition. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.59, p.27–37, 2008.

MAHAN, J. R.; CONATY, W.; NEILSEN, J.; PAYTON, P.; COX, S. B. Field performance in agricultural settings of a wireless temperature monitoring system based on a low-cost infrared sensor. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.71, n.176-181, 2010.

MANAVALAN, L. P.; GUTTIKONDA, S. K.; PHAN TRAN, L. S.; H. T. NGUYEN, H. T. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. **Plant and Cell Physiology**, v.50, n.7, p.1260–1276, 2009.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic Press, 1995.

MATTISON, N.; SCHJOERRING, J. K. Dynamic and steady-state responses of inorganic nitrogen pools and NH₃ exchange in leaves of *Lolium perenne* and *Bromus erectus* to changes in root nitrogen supply. **Plant Physiology**, v.128, p.742-750, 2002.

MITCHELL, H. T. Microdetermination of nitrogen in plant tissues. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v.55, p.1-3, 1972.

MORGAN, J. M. Adaptation to water deficits in three grain legume species. Mechanisms of turgor maintenance. **Field Crops Research**, v.29, p.91-106, 1992.

NASCIMENTO, S. P.; BASTOS, E. A.; ARAÚJO, E. C. E.; FREIRE FILHO, F. R.; SILVA, E. M. Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, p.853-860, 2011.

NGUYEN, H. T.; BABU, R. C.; BLUM, A. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. **Crop Science**, v.37, p.1426-1434, 1997.

NISHI, C. Y. M.; HUNGRIA, M. Efeito da reinoculação da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] em um solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* com as estirpes SEMIA 566, 586, 5019, 5079 e 5080. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, p.359–368, 1996.

NÓBREGA, J. Q.; RAO, T. V. R.; BELTRAO, N. E. M.; FIDELES FILHO, J. Análise de crescimento do feijoeiro submetido a quatro níveis de umidade do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.3, p.437-443, 2001.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**. São Paulo, v.26, n.6, 2003.

PAIVA, A. S.; FERNANDES, E. J.; RODRIGUES, T. J. D.; TURCO, J. E. P. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, v.25, p.161-169, 2005.

PENNISI, E. The blue revolution drop by drop gene by gene. **Science**, v.320, p.170-173, 2008.

PEREIRA, A. R.; VILLA NOVA, N. A.; SEDYAMA, G. C. **Evapotranspiração**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), 1997. 183 p.

PERIN, A.; ARAÚJO, A. P.; TEIXEIRA, M. G. Efeito do tamanho da semente na acumulação de biomassa e nutrientes e na produtividade do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.12, p.1711-1718, 2002.

PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Seropédica: Edur, 1998. 158 p.

PITOL, C. Soja mais produtiva e tolerante à seca. In: LOURENÇÃO, A. L. F. et al. (Eds.). **Tecnologia e Produção: Soja 2014/2015**. Fundação MS. Curitiba: Midiograf, p. 29-37, 2015. 161 p. Disponível em: <http://www.fundacaoms.org.br/base/www/fundacaoms.org.br/media/attachments/187/187/56c302fb1796c6774e2d1cb1da41d1be7491e73dc65ce_02-soja-mais-produtiva.pdf>. Acesso em: 04 mar 2016.

PROBST, A. H.; JUDD, R. W. Origin, U.S. history and development and world distribution. In: CALDWELL, B. E. (Ed.). **Soybeans: improvement, production and uses**. Madison, WI: American Society of Agronomy, 1973. 115 p.

PROCHAZKOVA, D.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C.; SINGH, D. V. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. **Plant Science**, v.161, p.765-771, 2001.

PURCELL, L. C.; KING, C. A.; BALL, R. A. Soybean cultivar differences in ureides and the relationship to drought tolerant nitrogen fixation and manganese nutrition. **Crop Science**, n.40, p.1062-1070, 2000.

PURCELL, L. C.; SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R.; DE, A. Soybean N₂ fixation estimates, ureide concentration, and yield responses to drought. **Crop Science**, v.44, p.484-492, 2004.

QIU, L. J.; CHANG, R. Z. The origin and history of soybean. In: SINGH, G. (Ed.). **Soybean: botany, production, and uses**. Wallingford, UK and Cambridge, USA: CAB International, 2010. p.1-23.

QUEIROZ, C. G. S.; ALONSO, A.; MARESGUIA, M.; MAGALHÃES, A. C. Chilling induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea Arabica* L. roots. **Biology Plantarum**, v.41, n.3, p.403-413, 1998.

QUEIROZ, E. F.; MILION, L. C. B.; MINOR, H. C.; NEUMAIER, N. Um modelo matemático de quantificação do efeito da disponibilidade hídrica em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, n.10, p.683-690, 1996.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 856 p.

REIS, E. H. S.; LARA CABEZAS, W. A. R.; ALVES, B. J. R.; CABALLERO, S. U. Suplementação de nitrogênio mineral na cultura da soja (*Glycine max*) estabelecida em sistema plantio direto e convencional. In: Proceedings of Congresso Brasileiro de Soja. Foz do Iguaçu, 2002. **Anais**. Embrapa Soja, Londrina, 2002. p.215.

SALISBURY, B. F.; ROSS, C. W. **Fisiologia das plantas**. 4.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2013. 774 p.

SANJUÁN-PINILLA, J. M. **Importancia de la biosíntesis bacteriana de leucina para el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium-leguminosa***. 2001. 223 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidad de Granada, Granada, ES, 2009.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v.2, n.3, p.287-294, 1998.

SANTOS, E. L. **Desempenho de cultivares de soja sob déficit hídrico**. 2009. 103 f. Tese. (Doutorado em agronomia, área de fitotecnia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS H. B. Origem, evolução e importância econômica. In: SEDIYAMA, T. (Ed.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Editora Mecenaz, 2009. p.59-69.

SERRAJ, R.; PURCELL, L. C.; BONA, S.; SINCLAIR, T. R. Nitrogen accumulation and nodule activity of field-grown 'Jackson' soybean in response to water deficits. **Field Crops Research**, v.52, p.109-116, 1997.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Processes contributing to N₂-fixation intensity to drought in the soybean cultivar Jackson. **Crop Science**, v.36, p.961-968, 1996.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Soybean cultivar variability for nodule formation and growth under drought. **Plant and Soil**, v.202, p.159-166, 1998.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Variation among soybean cultivars in dinitrogen fixation response to drought. **Agronomy Journal**, v.89, p.963-969, 1997.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R.; PURCELL, L. C. Symbiotic N₂ fixation response to drought. **Journal of Experimental Botany**, v.50, p.143-155, 1999.

SERRAJ, R.; VADEZ, V.; SINCLAIR, T. R. Feedback regulation of symbiotic N₂ fixation under drought stress. **Agronomie, EDP Sciences**, v.21, p.621-626, 2001.

SILVA, F. C. (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009. 627p.

SILVA, J. G. Introdução e evolução da soja no Brasil. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, Seção de Divulgação, 1981. p.26-29.

SILVA, K. O.; MIRANDA, J. H.; DUARTE, S. N.; FOLEGATTI, M. V. Análise de métodos de estimativa de evapotranspiração na otimização de sistemas de drenagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.9, n.2, 2005.

SILVA, L. D. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em genótipos de *Jatropha curcas* L. submetidos ao déficit hídrico**. 2013. 65 p. Dissertação (Mestrado Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2013.

SILVA, W. S.; SAFADI, T.; CASTRO JUNIOR, L. G. de. Uma análise empírica da volatilidade do retorno de *commodities* agrícolas utilizando modelos ARCH: os casos do café e da soja. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.43, n.1, 2005.

SILVEIRA, J. A. G.; COSTA, R. C. L.; OLIVEIRA, J. T. A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium spp.* under moderate nitrate level. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, n.3, p.187-194, 2001.

SILVENTE, S.; SOBOLEV, A. P.; LARA, M. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress, **PLoS ONE**, v.7, n.6, 2012.

SINCLAIR, T. R.; LUDLOW, M. M. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.329–341, 1986.

SINCLAIR, T. R.; PUCELL, L. C.; KING, C. A.; SNELLER, C. H.; CHEN, P.; VADEZ, V. Drought tolerance and yield increase of soybean resulting from improved symbiotic N₂ fixation. **Field Crops Research**, v.101, p.68-71, 2007.

SINCLAIR, T. R.; VADEZ, V.; CHENU, K. Ureide accumulation in response to Mn nutrition by eight soybean genotypes with N₂ fixation tolerance to soil drying. **Crop Science**, n.43, p.592-597, 2003.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, v.125, n.1, p.27-58, 1993.

SOARES, C. S. **Eficiência de estirpes de rizóbio no rendimento e qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.)**. 2007. 87 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2007.

SPECHT, J. E.; HUME, D. J.; KUMUDINI, S. V. Soybean yield potential - a genetic and physiological perspective. **Crop Science**, v.39, p.1560-1570, 1999.

STOLF, R. **Avaliações morfo-anatômicas, ecofisiológicas e expressão gênica diferencial em duas cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], durante períodos de déficit hídrico**. 2005. 175 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed., Porto Alegre: UFRGS - Departamento de Solos, 1995. 174 p. (Boletim Técnico, 5).

THEISEN, G.; ANDRES A.; SILVA, C. A. S.; SILVA, J. J. C. **Ação de regulador do metabolismo de etileno sobre a produtividade de soja cultivada em terras baixas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 15 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 68).

THOMAS, A. L.; COSTA, J. A. Influência do déficit hídrico sobre o desenvolvimento e rendimento da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.1389-1396, 1994.

TURNER, N. C.; WRIGHT, G. C.; SIDDIQUE, K. H. M. Adaptation of grain legumes (pulses) to water limited environments. **Advances in Agronomy**, v.71, p.193-231, 2001.

USDA – **United States Department of Agriculture**. 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 27 dez. 2015.

VADEZ, V.; SINCLAIR, T. R. Leaf ureide degradation and N₂ fixation tolerance to water deficit in soybean. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.354, p.153-159, 2001.

VADEZ, V.; SINCLAIR, T. R.; SERRAJ, R. Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N₂ fixation in soybean. **Physiologia Plantarum**, v.110, p.215-223, 2000.

VAIDYANATHAN, H.; SIVAKUMAR, P.; CHAKRABARTY, R.; THOMAS, G. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) - differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, v.165, p.1411-1418, 2003.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Embrapa: Planaltina, 1997. 524 p.

VERNETTI, F. J. (coord.). **Soja-planta, clima, pragas, moléstias e invasoras**, v.1, Campinas: Fundação Cargil, 1983.

VIANA, J. S. **Cultivares e sistemas de cultivo de soja-verde em areia - PB**. Tese (Doutorado). 2007. 139 p. Universidade Federal da Paraíba, Areia - PB, 2007.

VINHAL-FREITAS, I. C.; NUNES JUNIOR, J. E. G.; PEREIRA SEGUNDO, J.; VILARINHO, M. S. Germinação e vigor de sementes de soja classificadas em diferentes tamanhos. **Agropecuária Técnica**, v.32, n.1, p.108-114, 2011.

VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analysis of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, v.33, p.143-157, 1970.

YUE, B. ; XUE, W. ; XIONG, L. ; YU, X. ; LUO, L. ; CUI, K. ; JIN, D.; XING, Y., ZHANG, Q. Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice:

separation of drought tolerance from drought avoidance. **Genetics**, v.172, p.1213-1228, 2006.

ZAPATA, F.; DANSO, S. K. A.; HARDARSON, G.; FRIED, M. Time course of nitrogen fixation in field-grown soybean using nitrogen-15 methodology. **Agronomy Journal**, v.79, p.172-176, 1987.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.4, p.541-544, 2008.

ZILLI, J. E.; RIBEIRO, K. G.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Influência do tratamento de sementes com fungicidas na nodulação e rendimento de grãos da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, n.4, p.917-923, 2009.

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; ARAUJO, J. L. S.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.5, p.811-818, 2006.