



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WALKYRIA NEIVERTH

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA FIXAÇÃO
BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA TOLERÂNCIA À
SECA**

Londrina
2018

WALKYRIA NEIVERTH

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA FIXAÇÃO
BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA TOLERÂNCIA À
SECA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, área de concentração: Manejo sustentável do solo e Engenharia agrícola, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira
Co-orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno

Londrina
2018

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

Neiverth, Walkyria .

EFEITOS DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA TOLERÂNCIA À SECA / Walkyria Neiverth. - Londrina, 2018.
85 f. : il.

Orientador: Marco Antonio Nogueira.

Coorientador: Alexandre Lima Nepomuceno.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2018.

Inclui bibliografia.

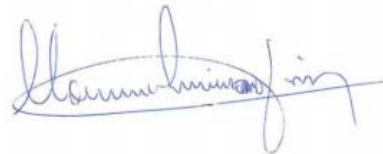
1. Bradyrhizobium - Tese. 2. AREB - Tese. 3. GoIS - Tese. 4. Estresse oxidativo - Tese. I. Nogueira, Marco Antonio. II. Nepomuceno, Alexandre Lima. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

WALKYRIA NEIVERTH

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO
NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA GENETICAMENTE
MODIFICADOS PARA TOLERÂNCIA À SECA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, área de concentração: Manejo sustentável do solo e Engenharia agrícola, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– Embrapa Soja

Mariangela Hungria da Cunha
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– Embrapa Soja

Antônio Eduardo Pípolo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– Embrapa Soja

Artur Berbel Lirio Rondina
Faculdades Integradas de Ourinhos – FIO

Paula Cerezini
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– Embrapa Soja

Londrina, 29 de março de 2018

AGRADECIMENTOS

À coordenação do programa de pós-graduação em Agronomia - PGAGRO.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira pela confiança, apoio e sugestões no decorrer do doutorado.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia de Solos pelo apoio e acolhimento ao longo dos anos, pelo auxílio no desenvolvimento de atividades, como também pelo auxílio financeiro na aquisição de materiais de trabalho. Agradeço em especial aos funcionários da Embrapa, dentre eles o pesquisador Dr. Marco Antonio Nogueira, a pesquisadora Dr^a. Mariangela Hungria, Ligia, Renan e Rinaldo que me auxiliaram no decorrer do experimento.

À equipe de Agrometeorologia, Ecofisiologia e Biotecnologia vegetal, pelo fornecimento dos materiais vegetais, pela área agrícola fornecida para desenvolvimento do experimento, pelo empréstimo de equipamentos de trabalho, apoio e acolhimento ao longo dos anos e pelo auxílio no desenvolvimento de atividades.

À Embrapa, por permitir acesso ao espaço na casa de vegetação, laboratórios e campo, juntamente a materiais, equipamentos e reagentes, para que eu pudesse realizar meu experimento.

Aos meus colegas do doutorado por todos os momentos agradáveis, engraçados e outros difíceis convívios.

Aos meus pais e irmãos, Arno, Marta, Adeline e Andréas, por me acompanharem nesta trajetória sempre me apoiando, transmitindo vibrações positivas mesmo eu acreditando não ser capaz. Por me ensinarem através de seus atos as principais virtudes de um pesquisador: humildade, honestidade e dedicação. Agradeço também por todo amor, carinho e compreensão que dedicaram a mim durante estes anos, sem este apoio seria impossível enfrentar esta jornada.

Ao Silvio (*in memoriam*) por me incentivar a fazer o doutorado e por acreditar na minha capacidade profissional.

Ao Ednilson pelo companheirismo, força e confiança ao longo dos anos, permitindo-me criar forças e coragem para finalizar mais esta etapa.

A Anna Karolina pelo companheirismo, apoio e auxílio em análises estatísticas.

A Deus, meu Senhor, em quem confio integralmente, pela orientação nas decisões, pelo sustento na dificuldade e por atender minhas orações na hora exata. Por colocar todas essas pessoas no meu caminho e me mostrar a importância de cada uma delas através dos desafios e alegrias que apareceram durante essa jornada.

NEIVERTH, Walkyria. **Efeitos da restrição hídrica na fixação biológica do nitrogênio em genótipos de soja geneticamente modificadas para tolerância à seca.** 2018. 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A má distribuição de chuvas e períodos de veranicos cada vez mais frequentes e severos têm estimulado cada vez mais investimentos no desenvolvimento de genótipos de soja (*Glycine max* [L.] Merrill) tolerantes à seca, capazes de manter bom rendimento sob condições de déficit hídrico. Esses genótipos precisam manter processos fundamentais para a sustentabilidade da cultura, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) simbiótica. Este trabalho teve como objetivo analisar a resposta dos genótipos de soja AREB 1Ea2939, DREB 1A P58, DREB 2A P2 193, 2Ia4 Gols, geneticamente modificados para tolerância à seca, genótipo BR 16 (parental) e do genótipo comercial BRS 1010IPRO, quanto à tolerância à seca sobre atributos relativos à FBN, em condições de casa de vegetação (CV) (safra 2014/15) e a campo (safra 2015/16). Em CV o experimento foi desenvolvido sob delineamento em blocos casualizados, com 8 repetições. Os genótipos foram inoculados com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 5019 ou *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe SEMIA 5080. Plantas sob restrição hídrica (RH) foram mantidas a 30% da capacidade de campo por 12 dias a partir do início da floração. A campo o experimento foi desenvolvido sob delineamento em blocos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas, com 4 repetições. Nas parcelas foram aplicadas quatro condições hídricas: restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), somente precipitação (NIRR) e precipitação + irrigação quando necessário (IRR). Nas subparcelas foram distribuídos quatro genótipos de soja: AREB 1Ea2939, 2Ia4 Gols, BR 16 e BRS 1010IPRO. Para ambos os experimentos foram realizadas coletas de material para análises bioquímicas e fisiológicas em diferentes fases de desenvolvimento da planta. Foram analisados a massa da parte aérea seca, teor de N foliar, teor de ureídeos, atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, peroxidação de lipídios, teor de óleo e proteína, massa seca de 100 sementes e rendimento. Observou-se alta sensibilidade da FBN à restrição hídrica. Mesmo a RH afetando negativamente os rendimentos para todos os genótipos, para AREB 1Ea2939 (em CV) e 2Ia4 Gols (a campo) a transgenia aumentou a performance das plantas sob RH. Não houve influência da transgenia sobre a FBN.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium*. AREB. Gols. Ureídeos. Estresse oxidativo.

NEIVERTH, Walkyria. **Effect of water restriction on the biological nitrogen fixation in soybean genotypes genetically modified for tolerance to drought.** 2018. 85 p. Thesis (Doctorate in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

The increasing frequency of uneven distribution and shortage of rain during the rainy season have stimulated the development of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) genotypes tolerant to drought able keep the yield potential under water restriction. Some fundamental processes must be kept for the crop sustainability, like the biological nitrogen fixation (BNF). This work aimed to assess the genotypes AREB 1Ea2939, DREB 1A P58, DREB 2A P2 193, 2la4 Gols, genetically modified for drought tolerance, the genotype BR16 (parental) and the commercial genotype BRS1010 IPRO concerning tolerance to drought for attributes related to the BNF, under greenhouse (season 2014/15) and under field (season 2015/16) conditions. Under greenhouse, the trial was designed under randomized blocks, with eight replications. The plants were inoculated with *Bradyrhizobium elkanii* strain SEMIA 5019 or *Bradyrhizobium diazoefficiens* strain SEMIA 5080. Plants under water restriction were kept at 30% of field capacity for 12 days at the beginning of flowering. Under field, the trial was also under randomized blocks, in a split-plot arrangement, with four replications. In the plots plants were submitted to four water conditions: water restriction in the vegetative stage, water restriction in the reproductive stage, rainfed, and rainfed + supplementation with irrigation when necessary. Four soybean genotypes were distributed in the subplots: AREB 1Ea2939, 2la4 Gols, BR 16 and BRS 1010IPRO. In both trials, plants were assessed for physiological and biochemical traits at different stages of development. Assessment comprised the shoot dry weight, foliar N, ureides in leaves, activity of catalase and superoxide dismutase, lipid peroxidation, concentration of oil and proteins in grains, mass of 100 grains, and yield. The BNF was highly sensitive to water restriction. Although the water restriction negatively affected the yield for all genotypes, the genetic modification in AREB 1Ea2939 (in the greenhouse) and 2la4 Gols (in the field) increased the plant performance under water restriction. The genetic modification did not affect the BNF process.

Keywords: *Bradyrhizobium*. AREB. Gols. Ureides. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

3 ARTIGO 1

- Figura 3.1** - Peroxidação de lipídios (A), atividade de catalase (B) e de superóxido dismutase (C) em folhas de soja geneticamente modificada para tolerância à seca (P58 DREB1A, P2193 DREB2A, AREB 1Ea2939) e no genótipo parental (BR 16) após 12 dias sob restrição hídrica. Letras maiúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. elkanii* 5019 dentro de cada condição hídrica. Letras minúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080 dentro de cada condição hídrica. *diferença entre estirpes para o mesmo genótipo, dentro de cada condição hídrica. “w” e “x” comparam condições hídricas para o mesmo genótipo, inoculado com a estirpe *B. elkanii* 5019. “y” e “z” comparam condições hídricas para o mesmo genótipo, inoculado com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080. 38
- Figura 3.2** - Atividade da glutamina sintetase em nódulos frescos (A) e teor de ureídeos em pecíolos (B) de soja geneticamente modificada para tolerância à seca (P58 DREB1A, P2193 DREB2A, AREB 1Ea2939) e no genótipo parental (BR 16) após 12 dias sob restrição hídrica. Letras maiúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. elkanii* 5019 dentro de cada condição hídrica. Letras minúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080 dentro de cada condição hídrica. * diferença entre estirpes para o mesmo genótipo, dentro de cada condição hídrica. 39
- Figura 3.3** - Número de nódulos (A) e massa de nódulos secos (B) de soja geneticamente modificada para tolerância à seca (P58 DREB1A, P2193 DREB2A, AREB 1Ea2939) e do genótipo parental (BR 16) após 12 dias sob restrição hídrica. Letras maiúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. elkanii* 5019 dentro de cada condição hídrica. Letras minúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080 dentro de cada condição hídrica. * diferença entre estirpes para o mesmo genótipo, dentro de cada condição hídrica. 41
- Figura 3.4** - (A) Desdobramento da interação dupla entre genótipo x condição hídrica para teor de óleo em grãos de soja geneticamente modificada para tolerância à seca (P58 DREB1A, P2193 DREB2A, AREB 1Ea2939) e no genótipo parental (BR 16) que passaram por restrição hídrica por 12 dias no início da fase reprodutiva, ou mantidos sob pleno fornecimento de água. Letras maiúsculas comparam os genótipos para a mesma estirpe de *Bradyrhizobium*; letras minúsculas comparam as estirpes para cada genótipo. (B) Desdobramento interação tripla para teor de proteína em grãos de soja, conforme tratamentos acima. Letras maiúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. elkanii* 5019 dentro de cada condição hídrica. Letras minúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080 dentro de cada condição hídrica. “w” e “x” apontam condições hídricas para o mesmo genótipo, inoculado com a estirpe *B. elkanii* 5019. “y” e “z”

	comparam condições hídricas para o mesmo genótipo, inoculado com a estirpe <i>B. diazoefficiens</i> 5080.....	43
Figura 3.5	- Massa seca total de grãos de soja geneticamente modificada para tolerância à seca (P58 DREB1A, P2193 DREB2A, AREB 1Ea2939) e do genótipo parental (BR 16) que passaram por restrição hídrica por 12 dias no início da fase reprodutiva, ou mantidos sob pleno fornecimento de água. A) Desdobramento da interação genótipos x condição hídrica, em que letras maiúsculas comparam os genótipos na mesma condição hídrica e letras minúsculas comparam condição hídrica no mesmo genótipo. B) Desdobramento da interação estirpes x condição hídrica, em que letras maiúsculas comparam as estirpes na mesma condição hídrica e letras minúsculas comparam a condição hídrica na mesma estirpe	44
 4 ARTIGO 2		
Figura 4.1	- Dados obtidos da estação agroclimática da área experimental, durante a safra 2015/16. Os dados estão apresentados por decêndio em relação à semeadura.....	55
Figura 4.2	- Desdobramento da interação Genótipo x Condição hídrica para teor de clorofila em folhas de soja cultivada sob diferentes condições hídricas: restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR) aos 47, 56 e 100 dias após a semeadura. Letras distintas indicam diferenças entre os genótipos para a mesma condição hídrica e coleta. Coleta 1: <i>p</i> valor G <0,001; DH 0,1201; G x DH <0,001. Coleta 2: <i>p</i> valor G 0,0066, DH <0,001 e G x DH 0,5858. Coleta 3: <i>p</i> valor G <0,001, DH 0,1691 e G x DH <0,001.....	61
Figura 4.3	- Desdobramento da interação Genótipo x Condição hídrica para massa da parte aérea seca de plantas de soja cultivadas sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR) aos 34, 56 e 90 dias após a semeadura. Letras distintas indicam diferenças entre os genótipos para a mesma condição hídrica e coleta. Coleta 1: <i>p</i> valor G <0,001; DH 0,0121; G x DH 0,9851. Coleta 2: <i>p</i> valor G 0,0060, DH 0,5809 e G x DH 0,2315. Coleta 3: <i>p</i> valor G 0,4958, DH <0,001 e G x DH <0,001.....	65
Figura 4.4	- Desdobramento da interação Genótipo x Condição hídrica para concentração de nitrogênio foliar de plantas de soja cultivadas sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR); Em três períodos de coleta: 34, 56 e 90 dias após a semeadura. As letras indicam diferenças entre os genótipos para a mesma condição hídrica e coleta. Coleta 1: <i>p</i> valor G 0,4220; DH 0,3699; G x DH 0,7218. Coleta 2: <i>p</i> valor G <0,001, DH 0,7618 e G x DH 0,0497. Coleta 3: <i>p</i> valor G <0,001, DH 0,0176 e G x DH 0,2045	66
Figura 4.5	- Desdobramento da interação Genótipo x Condição hídrica para (A) número de nódulos e (B) massa de nódulos secos obtidos de	

- plantas de soja cultivadas sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR), 56 e 90 dias após a semeadura. Letras maiúsculas comparam condições hídricas para o mesmo genótipo. Letras minúsculas comparam genótipos para a mesma condição hídrica. *p valor* (número de nódulos) 56 DAS (A): G 0,0849, DH <0,001, G x DH 0,2782; 90 DAS: G <0,001, DH 0,0016, G x DH <0,001. *p valor* (massa de nódulos) 56 DAS: G 0,1712, DH <0,001, G x DH 0,1993; 90 DAS: G <0,001, DH 0,0011, G x DH <0,001 67
- Figura 4.6** - Desdobramento da interação Genótipo x Condição hídrica para teor de ureídeos foliar de plantas de soja cultivadas sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR), aos 34, 56 e 90 dias após a semeadura. Letras distintas indicam diferenças entre os genótipos para a mesma condição hídrica e coleta. Coleta 1: *p valor* G <0,001; DH 0,2546; G x DH 0,0124. Coleta 2: *p valor* G 0,5008, DH 0,0598 e G x DH 0,4914. Coleta 3: *p valor* G <0,001, DH 0,0613 e G x DH <0,001 68
- Figura 4.7** - Desdobramento da interação Genótipo x Condição Hídrica para peroxidação de lipídios em folhas de plantas de soja cultivadas sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR), 34, 56 e 90 dias após a semeadura. Letras distintas indicam diferenças entre os genótipos para a mesma condição hídrica. Coleta 1: *p valor* G 0,0033; DH <0,001; G x DH 0,1865. Coleta 2: *p valor* G <0,001, DH <0,001 e G x DH 0,1668. Coleta 3: *p valor* G 0,0010, DH <0,001 e G x DH <0,001 70
- Figura 4.8** - Desdobramento da interação Genótipo x Condição Hídrica para (A) teor de óleo e (B) teor de proteína em sementes de soja cultivada sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR). Letras maiúsculas comparam condições hídricas para o mesmo genótipo. Letras minúsculas comparam genótipos para a mesma condição hídrica. *p valor* para teor de óleo: G <0,001, DH 0,0040, G x DH G <0,001; *p valor* para teor de proteínas: G <0,001, DH 0,0197, G x DH <0,001 71
- Figura 4.9** - Desdobramento da interação Genótipo x Condição hídrica para (A) massa de 100 sementes e (B) rendimento de grãos em soja cultivada sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR). Letras maiúsculas comparam condições hídricas para o mesmo genótipo. Letras minúsculas comparam genótipos para a mesma condição hídrica. *p valor* para massa de 100 sementes: G <0,001, DH G <0,001, G x DH G <0,001. *p valor* para rendimento: G <0,001, DH <0,001, G x DH <0,001 72

LISTA DE TABELAS

3 ARTIGO 1

- Tabela 3.1** - Estágio de desenvolvimento fenológico dos genótipos de soja geneticamente modificados para tolerância a seca e do respectivo genótipo parental, quando inoculados com *B. elkanii* estirpe SEMIA 5019 ou *B. diazoefficiens* estirpe SEMIA 5080, sob restrição hídrica, em casa de vegetação 31
- Tabela 3.2** - Taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática em genótipos de soja geneticamente modificados para tolerância à seca (P58 DREB1A, P2193 DREB2A, AREB 1Ea2939) e no genótipo parental (BR 16), inoculados com *B. elkanii* 5019 e *B. diazoefficiens* 5080, aos 4 e 10 dias sob restrição hídrica (53 e 59 dias após a semeadura - DAS)..... 36
- Tabela 3.3** - Concentração de macro e micronutrientes em folhas de genótipos de soja sob diferentes condições hídricas e inoculação com *B. diazoefficiens* 5080 ou *B. elkanii* 5019..... 41
- Tabela 3.4** - Principais resultados da análise de correlação de Pearson entre parâmetros avaliados durante a safra de soja 2014/2015, em casa de vegetação. GSN = glutamina sintetase em nódulos. PL = peroxidação de lipídios. SOD = atividade da enzima superóxido dismutase. NN = número de nódulos. MNS = massa de nódulos secos. 45

4 ARTIGO 2

- Tabela 4.1** - Estágio de desenvolvimento fenológico dos genótipos de soja geneticamente modificados para tolerância à seca (AREB 1Ea2939 e 2Ia4 GolS), do respectivo genótipo parental (BR 16) e do genótipo comercial BRS 1010IPRO, submetidos a diferentes condições de hídricas: restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR) 63
- Tabela 4.2** - Efeitos isolados da disponibilidade hídrica e dos genótipos de soja sobre a taxa fotossintética, taxa transpiratória e condutância estomática aos 36, 62 e 92 dias após a semeadura (DAS)..... 64
- Tabela 4.3** - Atividade da enzima CAT e SOD em folhas frescas de plantas de soja cultivadas sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR), 34, 56 e 90 dias após a semeadura. Coleta 1: *p* valor G 0,0139; DH 0,0364; G x DH 0,2121. Coleta 2: *p* valor G 0,1061, DH 0,0229 e G x DH 0,7367. Coleta 3: *p* valor G 0,0125, DH 0,3153 e G x DH 0,6441..... 69
- Tabela 4.4** - Análise de correlação de Pearson entre parâmetros fisiológicos, bioquímicos e de rendimento referente a safra de soja 2015/2016, a campo. CAT = atividade da enzima catalase. SOD = atividade da enzima superóxido dismutase..... 73

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABA	ácido abscísico
AREB	sigla proveniente do inglês: <u>a</u> bsciscic acid (ABA) <u>r</u> esponsive <u>e</u> lement <u>b</u> inding
CAT	catalase
CV	casa de vegetação
DAS	dias após semeadura
DREB	sigla proveniente do inglês: <u>d</u> ehydration <u>r</u> esponsive <u>e</u> lement <u>b</u> inding
EROs	espécies reativas de oxigênio
FBN	fixação biológica de nitrogênio
GoIS	sigla proveniente do inglês: <u>G</u> alactinol <u>s</u> ynthase
gs	condutância estomática
GS	glutamina sintetase
GSN	atividade da enzima glutamina sintetase nos nódulos
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
IRR	condição hídrica com disponibilidade hídrica por irrigação quando necessário
MDA	malondialdeído
MNS	massa de nódulos secos
MPAS	massa da parte aérea seca
MSTG	massa seca total de grãos
M100S	massa de 100 cementes
NIRR	condição hídrica com disponibilidade hídrica somente por precipitação
NN	número de nódulos
O₂⁻	superoxido
PL	peroxidação de lipídeos
RH	restrição hídrica
RH-R	restrição hídrica no período reprodutivo
RH-V	restrição hídrica no período vegetativo
SOD	superóxido dismutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	CULTURA DA SOJA	16
2.1.1	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DA SOJA.....	16
2.2	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	17
2.2.1	IMPORTÂNCIA E CONTRIBUIÇÃO DA FBN PARA A CULTURA DE SOJA E SEUS BENEFÍCIOS SOCIOECONÔMICOS E AMBIENTAIS	17
2.2.2	Características da FBN e importância das bactérias do gênero <i>Bradyrhizobium</i> sp. para a cultura da soja.....	18
2.2.3	Alterações climáticas e influências no processo de FBN e na cultura da soja	19
2.2.4	Interação FBN, linhagens de soja geneticamente modificadas e condições de seca.....	20
2.3	ESTUDOS DE MELHORAMENTO GENÉTICO NO DESENVOLVIMENTO E ADAPTAÇÃO DA SOJA ÀS ALTERAÇÕES AMBIENTAIS E TOLERÂNCIA À SECA	21
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA	23
3	ARTIGO 1: FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA TOLERÂNCIA À SECA	25
3.1	RESUMO	25
3.2	ABSTRACT	26
3.3	INTRODUÇÃO	27
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.4.1	Condução do experimento e delineamento experimental.....	29
3.4.2	Desenvolvimento fenológico e avaliações fisiológicas.....	30
3.4.3	Avaliações e análises bioquímicas da parte aérea e nodulação	30
3.4.4	Teor de óleo, proteínas e produção de sementes	33
3.4.5	Análise estatística.....	33
3.5	RESULTADOS.....	34
3.5.1	Análises Fisiológicas	34
3.5.2	Análises Bioquímicas.....	35
3.5.3	Teores de macro e micronutrientes nas folhas.....	40

3.5.4	Análises quantitativas, teor de óleo e proteína	40
3.5.5	Análises de correlação de Pearson	44
3.6	DISCUSSÃO	45
3.7	CONCLUSÕES	50
4	ARTIGO 2: ATRIBUTOS FISIOLÓGICOS E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA TOLERÂNCIA À SECA	51
4.1	RESUMO.....	51
4.2	ABSTRACT	52
4.3	INTRODUÇÃO	53
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.4.1	Instalação do experimento e delineamento experimental.....	54
4.4.2	Controle das condições hídricas.....	56
4.4.3	Estádios fenológicos, trocas gasosas e teor de clorofila	57
4.4.4	Massa da parte aérea seca, nodulação e análises bioquímicas.....	58
4.4.5	Teor de óleo e proteína nos grãos e produtividade	60
4.4.6	Análise estatística.....	60
4.5	RESULTADOS.....	61
4.5.1	Estádios fenológicos, trocas gasosas e teor de clorofila	61
4.5.2	Massa da parte aérea seca, nodulação e análises bioquímicas.....	65
4.5.3	Teor de óleo e proteína de sementes e rendimento	70
4.5.4	Análises de correlação de Pearson	72
4.6	DISCUSSÃO	73
4.7	CONCLUSÃO	76
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
	REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

Os fatores climáticos influenciam diretamente a produção de grãos, sendo a deficiência hídrica um dos maiores limitantes da produção brasileira, dentre elas, a produção de soja (*Glycine max* [L.] Merrill), uma das principais *commodities* do país. Em anos de seca, mesmo com aumento da área cultivada, pôde-se observar perdas de 4,3% na produção de soja.

Por outro lado, alterações genéticas de plantas de soja e alterações ambientais podem influenciar processos essenciais para o desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, comprometer seu potencial produtivo. Dentre estes processos, destaca-se a fixação biológica de nitrogênio (FBN) simbiótica, processo interativo entre a planta e bactérias do solo (notadamente as do gênero *Bradyrhizobium*), regulado geneticamente. Além da produtividade, a restrição hídrica pode também afetar a FBN.

O processo de FBN simbiótica é utilizado como prática agrícola principalmente em cultivo de leguminosas, sobretudo a soja e o feijoeiro. Este processo permite a disponibilização de N à planta a partir do N₂ atmosférico, tornando desnecessária a utilização de fertilizantes químicos nitrogenados, reduzindo custos financeiros e, principalmente, danos ambientais. Para que o processo seja funcional, do início da infecção até o funcionamento pleno dos nódulos, é necessária a expressão gênica coordenada entre o microssimbionte e a planta hospedeira, sendo ambas moduladas pelas condições ambientais. Qualquer influência negativa em qualquer uma dessas etapas pode levar à limitação do sucesso da FBN para suprir N à cultura.

Uma das opções para amenizar os impactos dos fatores climáticos sobre o rendimento e a FBN é o desenvolvimento de linhagens adaptadas aos estresses ambientais resultante das mudanças climáticas. Essas linhagens poderão ser capazes de suportar condições cada vez mais extremas e propiciar maior estabilidade ao sistema de produção.

Os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar características fisiológicas e bioquímicas, a nodulação e produção de sementes de genótipos de soja geneticamente modificados para a tolerância a seca (AREB 1Ea2939, DREB 1A P58, DREB 2A) e do genótipo BR 16 (parental) quando inoculados com as estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 5019 ou *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA

5080, submetidos à restrição hídrica severa. 2) avaliar atributos fisiológicos e a FBN em genótipos de soja geneticamente modificados para tolerância à seca (AREB 1Ea2939 e 2Ia4 Gols), seu genótipo parental (BR 16) e um genótipo comercial (BRS 1010IPRO), em condições de campo sob fornecimento controlado de água.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DA SOJA

2.1.1 Importância Econômica e Desenvolvimento da Cultura da Soja

A soja, originária da Ásia, teve seus primeiros registros de domesticação na China. De acordo com dados históricos, é conhecida e explorada no oriente há mais de cinco mil anos, sendo uma das primeiras plantas cultivadas no planeta. Sua exploração comercial teve início nos anos de 1900, quando foi utilizada basicamente como forrageira. A partir de 1941, o foco do cultivo da soja mudou e, devido ao alto teor proteico (40%) e de lipídios (20%) de suas sementes houve aumento do interesse da agroindústria, indústria química e alimentícia (EMBRAPA, 2003; HARTMAN et al., 2011).

O cultivo da soja para grãos vem apresentando crescimento exponencial em diversas regiões do mundo. No Brasil, o primeiro registro de cultivo comercial de soja foi em 1914, atingindo, em 1949, valores significativos de produção capazes de incluí-lo, pela primeira vez, nas estatísticas internacionais (EMBRAPA, 2003; HARTMAN et al., 2011).

Atualmente, os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais dessa oleaginosa, seguido pelo Brasil, Argentina e China com, aproximadamente, 119,5, 110,0, 56,0 e 14,2 milhões de toneladas na safra 2017/18, respectivamente, devendo aumentar na próxima safra. Dentre os maiores importadores de soja destacam-se a China e União Europeia (USDA, 2018).

A ampla utilização e atual dependência da soja como matéria-prima na agroindústria, indústria alimentícia e química, dentre eles, produção de biocombustível, tem incentivado cada vez mais investimentos na produção e pesquisa (FAO, 2002; BOLLA, 2015), o que explica a atual produção mundial de 348.6 milhões de toneladas (USDA, 2018).

Nos últimos anos, várias são as pesquisas voltadas ao melhoramento genético, tanto convencional, quanto com o uso de ferramentas biotecnológicas. Além do incentivo do melhoramento genético para aumentar os rendimentos e se adaptar às condições ambientais, há o incentivo à utilização e desenvolvimento de tecnologias e práticas agrícolas de manejo sustentável que

favorecem e mantêm a produtividade da cultura, reduzindo custos financeiros e ambientais (HUNGRIA et al., 2007; WILKINSON, 2009; COBA DE LA PEÑA e PUEYO, 2012; LAWLOR, 2013; CHEN et al., 2014; HU e XIONG, 2014; PATHAN et al., 2014).

2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

2.2.1 Importância e contribuição da FBN para a cultura de soja e seus benefícios socioeconômicos e ambientais

A cultura de soja é altamente dependente de N para garantir seus potenciais produtivos. Estima-se que para a produção de uma tonelada de grãos sejam necessários de 77 kg a 90 kg de N. O consumo elevado deste nutriente pela planta é reflexo da síntese de proteínas, que chegam a compor 40% dos grãos, além de outras biomoléculas. Assim, a escassez de N gera limitações significativas na produção da cultura (PANZIERI et al., 2000; SALVAGIOTTI et al., 2008; OHYAMA et al., 2017).

A utilização de fertilizantes químicos nitrogenados implica na eutrofização de recursos hídricos, na redução do ozônio estratosférico, no aumento da frequência de chuvas ácidas, intensificação do efeito estufa e mudanças no ciclo de N global. Assim, as desvantagens da adubação química nitrogenada têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir seu uso sem que haja diminuição da produção da soja (BHATTACHARJEE et al., 2008). Além disso, Cerezini et al. (2016) relataram que a associação de fertilizantes nitrogenados tem afetado negativamente a nodulação e a FBN em condições sem restrição hídrica, além dos rendimentos não superarem os tratamentos com inoculação.

A simbiose planta-bactéria nos nódulos onde há a FBN simbiótica é resultado de um processo evolutivo e muito utilizada atualmente no cultivo de leguminosas como a soja, como alternativa para substituição dos fertilizantes químicos, uma vez que permite suprir toda a exigência de N pela cultura a partir da FBN (SINCLAIR e VADEZ, 2012). Este processo, realizado pela ação de certas bactérias em simbiose com a planta, permite converter, dentro dos nódulos radiculares, o N₂ atmosférico em formas utilizáveis pela planta (GRAHAM e VANCE, 2003).

Em leguminosas de interesse agrícola, a FBN simbiótica supre cerca de 80% das necessidades de N nestas espécies (ORR et al., 2011), mas acredita-se que, no caso da soja, esses valores sejam ainda mais elevados. Com esse processo, no Brasil a economia anual de recursos que seriam utilizados para a compra de adubos nitrogenados é da ordem de R\$ 12,1 bilhões, apenas no caso da soja. Sem a utilização da simbiose como prática de cultivo, a soja brasileira teria seu custo de produção muito elevado, afetando diretamente sua competitividade no mercado mundial (SOUSA, 2013).

2.2.2 Características da FBN e importância das bactérias do gênero *Bradyrhizobium* sp. para a cultura da soja

A interação entre plantas e microrganismos do solo é um processo constante e contínuo na natureza. Porém, o que irá determinar se esta interação é favorável ou não para as plantas será o tipo de microrganismo que está em interação com a planta e o tipo de interação que está ocorrendo. O solo é um ecossistema rico em microrganismos, com uma ampla diversidade de gêneros e espécies (FIERER et al., 2007; ADHIKARI et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2012). É graças a esta ampla diversidade microbiana do solo que as plantas conseguem se desenvolver na natureza sem a interferência direta do homem.

Em razão da grande diversidade microbiana e constantes pesquisas desenvolvidas para conhecimento da diversidade metabólica destes microrganismos, inúmeras bactérias são identificadas constantemente com capacidade de fixar N simbioticamente em diversas plantas. Porém, nem sempre a FBN é considerada eficiente para determinados genótipos de plantas. Para que este processo seja eficiente, a simbiose entre planta - bactéria precisa ocorrer de forma rápida, de modo a suprir as necessidades da planta o mais breve possível. Inúmeros fatores influenciam a eficiência da FBN, desde ambiental a genético, podendo sofrer interferências do próprio genótipo da planta hospedeira (HUNGRIA et al., 2014; BABUJIA et al., 2016).

Sabendo-se disto, muitos estudos são realizados no intuito de identificar espécies de bactérias eficientes para plantas específicas. Na agroindústria, a utilização de bactérias diazotróficas na produção de inoculantes principalmente para leguminosas como a soja vem conquistando cada vez mais

espaço, uma vez que é uma prática simples, eficiente na disponibilização de N para as plantas e de baixo custo financeiro e ambiental (GIONGO et al., 2008; HUNGRIA et al., 2014). Em leguminosas como a soja, as bactérias mais utilizadas para a inoculação são pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, devido à melhor eficiência no processo de interação planta-bactéria e, conseqüentemente, maior eficiência na FBN (GRAHAM e VANCE, 2003; HUNGRIA et al., 2006, 2007; HUNGRIA e MENDES, 2015).

A FBN simbiótica é um processo complexo natural que ocorre pela necessidade dos simbioss em obter N assimilável para suprir as necessidades metabólicas. Neste processo, bactérias utilizam, como fonte de energia para seu metabolismo, fotoassimilados fornecidos pela planta e em troca, disponibilizam amônia (NH_3) (rapidamente convertida em amônio (NH_4^+) no interior da célula), obtida como resposta à redução de moléculas de N_2 atmosférico pela nitrogenase, a enzima chave do processo (FAGAN et al., 2007; HUNGRIA et al., 2007). Em leguminosas, esta interação entre simbioss tem como resultado a formação de nódulos, um novo órgão na raiz da planta (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Na soja, o NH_4^+ resultante da redução de N_2 atmosférico é assimilado pelas plantas por intermédio da atividade de várias enzimas, dentre elas, a glutamina sintetase (GS). Este é assimilado e armazenado na planta em formas orgânicas não tóxicas, comumente na forma de ureídeos (SINCLAIR et al., 2007; FAGAN et al., 2007; CHRISTOPHE et al., 2011). Devido à importância da atividade das enzimas GS na assimilação de NH_4^+ pela planta e seu respectivo acúmulo em forma de ureídeos, análises da atividade da GS nos nódulos e concentração de ureídeos na parte aérea da planta se tornaram referência na estimativa da eficiência da FBN em soja.

2.2.3 Alterações climáticas e influências no processo de FBN e na cultura da soja

A má distribuição de chuvas e elevadas temperaturas em fases importantes do desenvolvimento da lavoura se tornaram uma realidade atual e que tende a perdurar pelas próximas gerações. Do ponto de vista biológico, além da relação direta da seca com a redução na produtividade devido aos efeitos na fisiologia da planta, a microbiota do solo, inclusive as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), é altamente dependente dos fatores ambientais para atingir as

condições ótimas de sobrevivência e eficiência metabólica (COLLINO et al., 2015). Dentre os vários fatores que influenciam a FBN destacam-se a umidade, oxigenação, pH, quantidade e qualidade de carbono, além da própria disponibilidade de N, sendo a FBN um dos primeiros processos a serem prejudicados pela restrição hídrica (HUNGRIA e VARGAS, 2000; GIONGO et al., 2008; HSU e BUCKLEY, 2009; CAZENAVE et al., 2014; COLLINO et al., 2015). Para Hueso et al. (2012), condições severas de seca são capazes de modificar a estrutura, o tamanho e a atividade da comunidade microbiana do solo, sendo a fisiologia da comunidade microbiana o fator mais afetado.

Condições de baixa umidade no ambiente geram mudanças morfológicas e metabólicas nos nódulos, inibindo a atividade da nitrogenase (CHRISTOPHE et al., 2011). Situações como esta reduzem a permeabilidade dos nódulos aos gases, dificultando a disponibilidade de O₂ para as bactérias, afetando sua respiração e eficiência nos processos de obtenção da energia empregada na redução do N₂ a amônia.

Além disso, fatores como a assimilação e o transporte de fotoassimilados para os nódulos e importação e síntese de compostos nitrogenados na parte aérea da planta também são afetados em condições de seca, interferindo no metabolismo do C e N (ARRESE-IGOR et al., 2011; HUESO et al., 2012; GIL-QUINTANA et al., 2013). Acúmulo de compostos nitrogenados na parte aérea e nos nódulos, na forma de ureídeos e aminoácidos livres também são exemplos de interferências da seca no processo de FBN (SINCLAIR et al., 2007; GIL-QUINTANA et al., 2013).

2.2.4 Interação FBN, linhagens de soja geneticamente modificadas e condições de seca

Além dos possíveis benefícios da melhor resistência de plantas geneticamente modificadas em relação à FBN sob condições de seca, alterações genéticas nas plantas farão expressar novas e desejáveis características. A expressão destas características pode, eventualmente, liberar exsudatos no solo diferente dos encontrados em cultivares convencionais, causando impactos sobre a microbiota do solo, afetando, por exemplo, a etapa inicial do estabelecimento da

simbiose para realizar a FBN, essencial na cultura de soja (REIS JÚNIOR et al., 2005).

Por outro lado, plantas geneticamente modificadas para melhor tolerar condições de seca e manter as condições fisiológicas estáveis por um maior período, tendem a favorecer a simbiose, mantendo-a ativa e eficiente por mais tempo, já que esta é dependente da estrutura e da fisiologia vegetal. A nodulação por bactérias fixadoras de nitrogênio apresenta relação positiva com a taxa fotossintética, condutância estomática, concentrações internas de CO₂ nas folhas, potencial hídrico da folha e teor de água no substrato, sendo altamente sensível à disponibilidade de água no ambiente radicular e potencial hídrico foliar (FENTA et al., 2012). O sucesso do desenvolvimento de linhagens de soja geneticamente melhoradas para melhor tolerar condições de seca e capazes de reduzir a sensibilidade da FBN nestas condições, gerando melhores produtividades, é descrito por Sinclair et al. (2007). Assim, é importante que cada transgênico seja estudado não só quanto à eficiência da característica introduzida, mas também quanto aos impactos proporcionados por ela. Espera-se que cultivares de soja mais adaptadas às condições de seca, também tenham capacidade de manter a FBN ativa nessas condições, garantindo o suprimento de N demandado pela planta.

O desenvolvimento de uma agricultura sustentável é uma necessidade cada vez maior, visando a obtenção de rendimentos crescentes, adaptação e preservação ambiental além de recuperação de ambientes degradados e inexplorados. Para Coba de La Peña e Pueyo (2012), o estudo da relação e adaptação regional entre plantas e bactérias é essencial e indispensável para o alcance desse sucesso. Para os autores, mesmo havendo vários estudos na área, estes ainda são insuficientes.

2.3 ESTUDOS DE MELHORAMENTO GENÉTICO NO DESENVOLVIMENTO E ADAPTAÇÃO DA SOJA ÀS ALTERAÇÕES AMBIENTAIS E TOLERÂNCIA À SECA

Até há pouco tempo, o maior enfoque no melhoramento genético aplicado a transgenia da soja estava voltado ao desenvolvimento de genótipos resistentes ou tolerantes a insetos e a herbicidas, desenvolvendo-se assim os genótipos RR, RR2 e a atual soja BT (IPRO), resistentes ao herbicida glifosato e eficientes na proteção contra o ataque de lagartas desfolhadoras, facilitando o

manejo da lavoura e reduzindo perdas de produtividade (ZOBIOLE et al., 2011; Yu et al., 2013; CARNEIRO et al., 2014; YU et al., 2014a; YU et al., 2014b). Por outro lado, alterações e instabilidades climáticas têm incentivado os cientistas a buscar o melhoramento para tolerância a estresses abióticos (ALMEIDA et al., 1999; MANAVALAN et al., 2009; LAWLOR, 2013; THORNTON et al., 2014). De acordo a Conab (2016), a má distribuição de chuvas proporcionou redução de 9,5% na produtividade de grãos do país na safra 2015/16 em relação à safra 2014/15, sendo 4,3% de redução no rendimento da soja.

As condições de seca e altas temperaturas cada vez mais frequentes e severas têm acelerado a busca por genótipos de plantas capazes de tolerar estas condições adversas (FANG e XIONG, 2015). A inserção de genes para tolerância a condições extremas, dentre elas a seca, vem sendo amplamente estudada. Vários são os genes estudados para tolerância à seca, dentre eles podemos citar DREB (dehydration responsive element binding), AREB (Abscisic acid (ABA) responsive element binding), NCED (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase), GalS (Galactinol synthase), entre vários outros, que têm mostrado bons resultados no aumento da tolerância da soja à seca (POLIZEL et al., 2011; KRASENSKY e JONAK, 2012; BARBOSA et al., 2013; ENGELS et al., 2013; MARCOLINO-GOMES et al., 2014; NAKASHIMA et al., 2014).

A inserção de genes capazes de conferir tolerância a determinada condição adversa permite que a planta perceba e identifique sinais que caracterizam o estresse abiótico, ativando e regulando a superexpressão de alguns genes durante o estresse. A superexpressão de genes específicos em resposta à seca, por exemplo, estimula a produção de determinadas substâncias que regularão o metabolismo em resposta ao estresse. Dentre as alterações ocorridas no metabolismo podem-se citar ajustes na membrana, alterações na estrutura da parede celular, alterações no ciclo e divisão celular, produção de solutos capazes de estabilizar as proteínas e estruturas celulares e manter a turgescência celular por ajuste osmótico, além do estímulo ao metabolismo antioxidante para remover excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante a situação de estresse, restabelecendo o equilíbrio redox celular (KRASENSKY e JONAK, 2012; LAWLOR, 2013; HU e XIONG, 2014; FANG e XIONG, 2015).

A regulação destes genes durante a seca pode ser intermediada por ácido abscísico (ABA-dependente) ou não (ABA-independente). Altas concentrações

de ABA têm efeito principalmente no fechamento estomático, função metabólica das células-guarda, regula os níveis transcricionais da proteína calmodulina, além de regular a expressão de vários genes ABA-dependentes (FANG e XIONG, 2015). Os mecanismos ABA-independentes respondem geralmente com a produção e acúmulo de aminoácidos, aminas e carboidratos na célula, conferindo-lhe resistência à seca por osmo-regulação. Embora os processos ativem mecanismos distintos na planta, ambos podem proporcionar acúmulo de substâncias semelhantes, geradas por diferentes vias, como é o caso do acúmulo de prolina (KRASENSKY e JONAK, 2012; HU e XIONG, 2014; NAKASHIMA et al., 2014; FANG e XIONG, 2015).

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA

A produção de EROs ocorre naturalmente em decorrência do metabolismo da planta, sendo os principais geradores naturais de EROs o processo de respiração mitocondrial e a fotossíntese. As principais formas de EROs produzidas nas plantas são as moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH) e oxigênio singlete (1O_2) (MAHATMA et al., 2011; DEMIDCHIK, 2015; AKITHA DEVI e GIRIDHAR, 2015). Estas moléculas quando produzidas e armazenadas nas plantas em baixas concentrações podem ser benéficas, como é o caso das moléculas de H_2O_2 . Relativamente estável e difusível por meio de membranas, pode auxiliar como sinalizador de estresse, atuando como mensageiro secundário envolvendo rotas de sinal de transdução em resposta ao estresse (DEMIDCHIK, 2015). Desta forma, presença de EROs na planta pode auxiliar no processo de tolerância ao estresse.

Por outro lado, vários fatores abióticos como seca, temperaturas extremas, alta radiação ultravioleta, salinidade, infecções patogênicas, entre outros, capazes de proporcionar qualquer tipo de estresse na planta, têm a capacidade de estimular uma superprodução de EROs. O acúmulo destas substâncias na planta se torna extremamente tóxico, resultando em estresse oxidativo (KRASENSKY e JONAK, 2012; DEMIDCHIK, 2015; AKITHA DEVI e GIRIDHAR, 2015). As principais consequências do acúmulo de EROs na planta são a peroxidação de lipídios (degradação da membrana celular por consequência do acúmulo de EROs, proporcionando acúmulo de malondialdeído [MDA] nas células), modificações proteicas, destruição de clorofilas e extravasamento iônico, além da degradação das

moléculas de DNA, resultando em morte celular (FOYER et al., 1997; LAMB e DIXON, 1997; KRASENSKY e JONAK, 2012; MAGALHÃES et al., 2012).

Em contrapartida, os organismos possuem um sistema de defesa antioxidante, dentre elas, a produção de enzimas antioxidativas. Dentre as várias enzimas capazes de degradar os EROs que se acumulam na planta, destacam-se as enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (MAHATMA et al., 2011; AKITHA DEVI e GIRIDHAR, 2015; DEMIDCHIK, 2015; DAS, 2016,). As enzimas CAT têm papel fundamental na conversão de H_2O_2 em moléculas de $H_2O + O_2$ na planta. Já as enzimas SOD são fundamentais na desintoxicação da célula aos radicais O_2^- . Assim, quanto maior o estresse sofrido pela planta, maior é o acúmulo de EROs (AKITHA DEVI e GIRIDHAR, 2015; DEMIDCHIK, 2015; DAS, 2016). Quanto maior o estresse oxidativo sofrido pela planta maior é a necessidade de produção de enzimas antioxidantes. Desta forma, genótipos tolerantes ao estresse tendem a apresentar maior atividade das enzimas antioxidantes como defesa ao estresse (AKITHA DEVI e GIRIDHAR, 2015; DAS, 2016).

3 ARTIGO 1: FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA TOLERÂNCIA À SECA

3.1 RESUMO

As perdas de rendimento na agricultura devido à restrição hídrica (RH) proveniente da má distribuição de chuvas e períodos de veranicos cada vez mais severos têm estimulado a busca por genótipos de soja (*Glycine max* [L.] Merrill) tolerantes à seca associados a práticas eficientes e de baixo custo financeiro e ambiental, como é o caso da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Este trabalho teve como objetivo avaliar características fisiológicas, bioquímicas, a nodulação e a produção de grãos de genótipos de soja geneticamente modificados (GM) para tolerância à seca e no genótipo parental, quando inoculados com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 5019 ou *B. diazoefficiens* estirpe SEMIA 5080, submetidos à RH ou sob fornecimento pleno de água. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na safra 2014/15, em esquema fatorial 4x2x2, em 8 blocos, sendo quatro genótipos (os GM DREB 1, DREB 2 e AREB e o parental BR 16); duas condições hídricas [sob estresse, 30% da capacidade de campo – CC; e sem estresse, 70% da CC]; e inoculação com uma das duas estirpes de *Bradyrhizobium*. As plantas foram submetidas à RH por 12 dias a partir do início do florescimento. Durante estes período, foram realizadas duas avaliações fisiológicas. Ao final do período de restrição hídrica, plantas de quatro blocos foram avaliadas quanto ao teor de ureídeos nos pecíolos, macro e micronutrientes em folhas, atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidação de lipídios (PL) em folhas frescas, glutamina sintetase em nódulos (GSN) frescos e nodulação. Ao término do ciclo da cultura foi analisada a massa de grãos e os respectivos teores de óleo e proteínas. Todas as plantas tiveram redução na taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática sob RH, evidenciando a condição de estresse. A CAT foi pouco influenciada pelos tratamentos. A RH aumentou a PL em todos os genótipos e houve maior atividade de SOD em AREB. A inoculação com *B. elkanii* aumentou a PL nos genótipos DREB. A RH reduziu massa de nódulos, os teores de N foliares, mas não influenciou o teor proteico dos grãos. A inoculação com *B. diazoefficiens* aumentou a produção de grãos sob RH. O genótipo AREB foi o mais promissor quanto às características de tolerância à seca, com maior rendimento de grãos sob RH, indicando que a transgenia lhe proporcionou maior estabilidade produtiva.

Palavras-chave: Restrição hídrica. Estresse oxidativo. *Bradyrhizobium*. AREB.

3.2 ABSTRACT

The yield losses in agriculture due to water restriction resulting from uneven distribution of rain and shortage of rain during the rainy season have challenged the search for genotypes of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) tolerant to drought and associated with environmentally-friendly technologies like the biological nitrogen fixation (BNF). The aim of this work was assess some physiological and biochemical traits, nodulation and yield of soybean genotypes genetically modified (GM) for tolerance to drought, in addition to the parental genotype, inoculated with *Bradyrhizobium elkanii* strain SEMIA 5019 or *B. diazoefficiens* strain SEMIA 5080, and submitted to water restriction or left under plenty water supply. The trial was carried out under greenhouse in the season 2014/15, in a 4 x 2 x 2 factorial arrangement, in eight blocks, consisting of four genotypes (the GM DREB 1, DREB 2 and AREB, and the parental BR 16), two water conditions (water restriction, at 30% of field capacity – FC, or plenty water supply at 70% of FC), and inoculated with one of the *Bradyrhizobium* strains. The water stress was induced for 12 days at the beginning of flowering. During this period, two physiological assessments were undergone. At the end of the water restriction period, plants from four blocks were assessed for ureides in the petioles, concentrations of macro and micronutrients in leaves, activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), lipids peroxidation (LP) in fresh leaves, glutamine synthetase in fresh nodules (GS) and nodulation. At the end of the crop cycle the grain yield and concentrations of oil and proteins were taken. All plants under water restriction had reductions in photosynthetic rate, transpiration and stomatal conductance, evidencing the stressing condition. CAT was barely affected by the treatments. The water restriction increased the OP in all genotypes and the SOD increased in the AREB genotype. The inoculation with *B. elkanii* increased the PL in the DREB genotypes. The water restriction decreased the mass of nodules, foliar concentration of N, but did not affect the concentration of proteins in grains. The inoculation with *B. diazoefficiens* increased the grain yield under water restriction. The AREB genotype was the most promising concerning the drought tolerance traits, and whit higher grain yield under water restriction, showing that the transgeny allowed higher yield stability.

Keywords: Water restriction. Oxidative stress. *Bradyrhizobium*. AREB.

3.3 INTRODUÇÃO

Alterações climáticas associadas à restrição hídrica e altas temperaturas são eventos cada vez mais rotineiros, com alto impacto na agricultura. Há várias safras são observadas perdas na produção de diversas *commodities* ocasionadas pela falta de chuvas e maior frequência de chuvas mal distribuídas (THORNTON et al., 2014; CRAFT et al., 2015; CONAB, 2016; VÁSQUEZ et al., 2017). Embora a safra 2016/17 tenha produzido boas médias devido às condições climáticas favoráveis, o Brasil enfrentou perdas na produtividade agrícola devido à restrição hídrica em algumas regiões. Mesmo com aumento de 0,6% na área plantada para safra 2015/16, a produção nacional de grãos teve um decréscimo de 9,5% em relação à safra anterior, no caso da soja, 4,3% causada pela restrição hídrica (CONAB, 2016). Além do Brasil, outros países têm relatado sérios problemas com restrição hídrica, dentre eles Estados Unidos da América (CRAFT et al., 2015; HOWITT et al., 2015), Irã (VAGHEFI et al., 2014) e China (PIAO et al., 2010).

Desenvolver genótipos geneticamente modificados capazes de tolerar a seca é uma alternativa para amenizar as perdas de produtividade (Chen et al. 2014, Hu e Xiong 2014). A inserção dos genes DREB (*d*ehydration *r*esponsive *e*lement *b*inding) e AREB (*a*bscisic acid (ABA) *r*esponsive *e*lement *b*inding) permitem aumento da capacidade de tolerância das plantas à seca e outros estresses como temperaturas extremas e salinidade quando superexpressos na planta (POLIZEL et al., 2011; BARBOSA et al., 2013; ENGELS et al., 2013; HU e XIONG, 2014; MARCOLINO-GOMES et al., 2014; PAIVA-ROLLA et al., 2014).

Entretanto, desenvolver genótipos tolerantes não é suficiente, pois estes precisam manter outros processos importantes para a cultura. Um desafio na adaptação às alterações climáticas é a manutenção de taxas adequadas de fixação biológica de nitrogênio (FBN) simbiótica, a qual sofre influência da condição hídrica (SINCLAIR e VADEZ, 2012; MASTRODOMENICO et al., 2013; CERZINI et al., 2014; CERZINI et al., 2016).

Várias análises fisiológicas e bioquímicas podem ser feitas para avaliar e quantificar os danos da restrição hídrica sobre a planta e sobre a FBN e o quanto a planta é capaz de tolerar a condição de estresse. Plantas submetidas a estresses têm seu metabolismo prejudicado, com drástica redução na taxa fotossintética e condutância estomática, o que resulta em menor desenvolvimento e, conseqüentemente, menor rendimento de grãos (MASTRODOMENICO et al., 2013;

DARYANTO et al., 2015). A FBN é um dos primeiros processos a serem limitados pela restrição hídrica, mesmo antes da fotossíntese (SINCLAIR e VADEZ, 2012). Plantas tolerantes apresentam melhor desempenho nessa condição, o que pode resultar em maior estabilidade produtiva sob condições adversas (POLIZEL et al., 2011; BARBOSA et al., 2013; ENGELS et al., 2013; NEZHADAHMADI et al., 2013; CEREZINI et al., 2014; HU e XIONG, 2014; PAIVA-ROLLA et al., 2014; CEREZINI et al., 2016).

A redução nas atividades fisiológicas da planta sob estresse ou a super-estimulação de certos processos biológicos acarreta acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO's), como por exemplo, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2^-), que se tornam tóxicas quando em excesso (GILL e TUTEJA, 2010; NEZHADAHMADI et al., 2013; DEMIDCHIK, 2015). O acúmulo destas substâncias causa danos a proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, resultando em um estresse oxidativo com redução no teor de clorofila, na peroxidação de lipídios e morte celular (GILL e TUTEJA, 2010; DEMIDCHIK, 2015). A principal causa do acúmulo de ERO's nas plantas se dá pela limitação em produzir a quantidade suficiente de enzimas capazes de reverter e neutralizar estas substâncias. Plantas mais tolerantes apresentam maiores e mais eficientes atividades de enzimas capazes de degradar as ERO's (NEZHADAHMADI et al., 2013). Dentre as enzimas que auxiliam na degradação de ERO's estão a catalase (CAT), capaz de degradar as moléculas de H_2O_2 , e a enzima superóxido dismutase (SOD), responsável por degradar as moléculas de O_2^- . Assim, a intensidade da atividade das enzimas nas plantas pode ser um indicador do nível de estresse e sua capacidade de tolerá-lo (FERREIRA et al., 2010; GILL e TUTEJA, 2010; NEZHADAHMADI et al., 2013; FERREIRA et al., 2014; DEMIDCHIK, 2015).

A fim de caracterizar genótipos de soja quanto à capacidade de manter a FBN em condições de seca, este trabalho teve como objetivo avaliar características fisiológicas e bioquímicas, a nodulação e a produção de grãos em genótipos de soja geneticamente modificados para a tolerância a seca e no genótipo parental, quando inoculados com *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 5019 ou *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080, submetidos à restrição hídrica severa no início do período reprodutivo.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Condução do experimento e delineamento experimental

O experimento foi realizado durante a safra 2014/15 em casa de vegetação, sob delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x2x2, com oito repetições. Foram empregados quatro genótipos, três transgênicos para tolerância à seca (DREB 1A P58, DREB 2A P2193 e AREB 1Ea2939) mais a cultivar parental (BR 16); duas condições hídricas [estressado a 30% da capacidade de campo - CC e não estressado, 70% da CC]; e inoculação com duas estirpes, *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 5019 ou *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe SEMIA 5080, totalizando 16 tratamentos e 128 unidades experimentais.

As construções genéticas dos genótipos transgênicos contêm o promotor construtivo 35S ou rd29A, estresse-induzido, e as regiões codificantes dos genes AREB 1Ea2939, DREB 1A P58 e DREB 2A P2193, isolados de *Arabidopsis thaliana* (POLIZEL et al., 2011; BARBOSA et al., 2013; ENGELS et al. 2013) que foram engenheirados na cultivar comercial BR 16.

O substrato foi proveniente da superfície (0-20 cm) do solo de uma área agrícola, classificado como Typic Acrudox (USDA, Soil Taxonomy). A análise química apontou: matéria orgânica = 33 g kg⁻¹; P (Mehlich⁻¹) = 2,14 mg dm⁻³; K = 0,31 cmol_c dm⁻³; Ca = 4,02 cmol_c dm⁻³, Mg = 0,64 cmol_c dm⁻³; H + Al = 5,6 cmol_c dm⁻³; CEC = 10,5 cmol_c dm⁻³, SB = 4,97; V = 47%; Al = 0 cmol_c dm⁻³; areia 732 g kg⁻¹; silte 30 g kg⁻¹, argila 238 g kg⁻¹. Os vasos foram preenchidos com 5 kg da amostra de solo seco peneirado e homogeneizado e o pH corrigido para 6 com CaCO₃ e MgCO₃. Para a manutenção da umidade do solo, a capacidade de retenção de água foi determinada pela tabela de tensão e dispositivo extractor de Richards (EMBRAPA, 1997), o que permitiu a construção de uma curva de retenção de água e determinação do potencial hídrico do solo (ψ_w). Plantas bem irrigadas foram mantidas com ψ_w de -13 kPa (70% CC) e plantas sob restrição hídrica foram mantidas com ψ_w -200 kPa (30% CC).

A semeadura foi realizada no dia 7 de novembro 2014. Foram semeadas cinco sementes por vaso. Estas foram inoculadas no momento da semeadura com inoculante líquido à base da bactéria *B. elkanii* estirpe SEMIA 5019 ou *B. diazoefficiens* estirpe SEMIA 5080 (4,7 x 10⁶ células por semente). Após a emergência, foram mantidas duas plantas por vaso.

Aos 14 e 45 dias após a semeadura (DAS) foi realizada a suplementação nutricional das plantas com P (150 mg), K (200 mg) e MgSO₄ (80 mg

de Mg e 50 mg de S), respectivamente, por vaso. Aos 21 e 45 DAS, as plantas foram supridas com 50 mL de solução de micronutrientes (0,0014 mg de CoSO_4 ; 0,0054 mg de Na_2MO_4 ; e 0,5 g de H_3BO_3 em 5 L de água). Os dados de temperatura e umidade da casa de vegetação foram obtidos diariamente com auxílio de termohigrógrafo.

A restrição hídrica foi controlada com base na massa dos vasos pela pesagem diária. O solo foi mantido com umidade a 70% CC até o início da indução da restrição hídrica no início do florescimento – R1/R2 (FEHR e CAVINESS, 1977) aos 49 DAS, quando os tratamentos sob restrição hídrica passaram a ser mantidos a 30% CC por 12 dias. Ao final dos 12 dias, quatro repetições de cada tratamento foram utilizadas para as análises bioquímicas, fisiológicas, massa da parte aérea seca e nodulação, enquanto que as outras quatro repetições foram mantidas até o final do ciclo da cultura para a obtenção dos grãos. Após os 12 dias de RH, as plantas remanescentes continuaram ou tornaram a receber água a 70% CC até o final do ciclo.

3.4.2 Desenvolvimento fenológico e avaliações fisiológicas

Os estádios de desenvolvimento fenológico foram determinados ao longo do experimento de acordo com Fehr e Caviness (1977) (Tabela 3.1). As avaliações fisiológicas de fotossíntese, transpiração e condutância estomática foram realizadas com auxílio do equipamento LCpro-SD (ADC BioScientific) (90% luz vermelha e 10% de luz azul em 2 cm^2 de área), aos 53 e 59 DAS, 4 e 10 dias após o início da restrição hídrica, respectivamente, no folíolo central da terceira folha desenvolvida (do ápice para a base), em plantas de três blocos. Todas as leituras foram realizadas entre as 8:30 e 11:00 h da manhã, sob luminosidade plena ($\text{PAR} = 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração de CO_2 de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ e referência de água de 18-20 mmol mol^{-1} .

3.4.3 Avaliações e análises bioquímicas da parte aérea e nodulação

Ao final do período de restrição hídrica (61 DAS), plantas de quatro repetições por tratamento foram coletadas para análises bioquímicas da parte aérea e nodulação. O corte das plantas foi realizado rente ao solo e o terceiro e quarto trifólios desenvolvidos (da ápice para a base) foram separados e mantidos em N_2 líquido. A outra parte das folhas foi levada à estufa de secagem com circulação de ar constante a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas. O sistema radicular foi lavado, a coroa radicular de uma planta por vaso foi armazenada em N_2 líquido durante a coleta, e as demais partes da raiz

levadas à estufa com circulação de ar a 60 °C por 62 h. Após secos, os nódulos foram contados e pesados. O material mantido em N₂ líquido foi armazenado em ultrafreezer a -80 °C até a análise.

Tabela 3.1 - Estágio de desenvolvimento fenológico dos genótipos de soja geneticamente modificados para tolerância a seca e do respectivo genótipo parental, quando inoculados com *B. elkanii* estirpe SEMIA 5019 ou *B. diazoefficiens* estirpe SEMIA 5080, sob restrição hídrica, em casa de vegetação.

Condição Hídrica	Tratamento	DAS*										VE-R8 (Dias)
		4	28	42	60	108	115	125	129	132	133	
ESTRESSADO (30% CC)	AREB 1Ea2939 x <i>B. elkanii</i> 5019	VE ¹	V4	V8	V10	R5.4	R5.5	R6	R7	R8		129
	AREB 1Ea2939 x <i>B. diazoefficiens</i> 5080	VE	V4	V8	V10	R5.4	R5.5	R6	R7	R7	R8	133
	DREB 1A P58 x <i>B. elkanii</i> 5019	VE	V4	R1	R3	R6	R7	R7	R8			126
	DREB 1A P58 x <i>B. diazoefficiens</i> 5080	VE	V4	R1	R4	R6	R7	R7	R8			126
	DREB 2A P2193 x <i>B. elkanii</i> 5019	VE	V4	R1	R4	R6	R7	R7	R8			126
	DREB 2A P2193 x <i>B. diazoefficiens</i> 5080	VE	V4	R1	R5.1	R6	R7	R7	R8			126
	BR 16 x <i>B. elkanii</i> 5019	VE	V4	R1	R4	R6	R7	R8				122
	BR 16 x <i>B. diazoefficiens</i> 5080	VE	V4	R1	R4	R6	R7	R7	R8			126
NÃO ESTRESSADO (70% CC)	AREB 1Ea2939 x <i>B. elkanii</i> 5019	VE	V4	V8	V13	R5.5	R6	R7	R8			126
	AREB 1Ea2939 x <i>B. diazoefficiens</i> 5080	VE	V4	V8	V13	R5.5	R5.5	R6	R7	R8		129
	DREB 1A P58 x <i>B. elkanii</i> 5019	VE	V4	R1	R3	R6	R7	R8				122
	DREB 1A P58 x <i>B. diazoefficiens</i> 5080	VE	V4	R1	R4	R6	R7	R8				122
	DREB 2A P2193 x <i>B. elkanii</i> 5019	VE	V4	R1	R4	R7	R8					112
	DREB 2A P2193 x <i>B. diazoefficiens</i> 5080	VE	V4	R1	R5.1	R7	R8					112
	BR 16 x <i>B. elkanii</i> 5019	VE	V4	R1	R3	R7	R8					112
	BR 16 x <i>B. diazoefficiens</i> 5080	VE	V4	R1	R4	R7	R8					112

¹Com base no desenvolvimento das plantas dos blocos 7 a 10, mantidas até o final do ciclo. Os espaços em branco indicam que as plantas já haviam concluído o ciclo. *Dias após a semeadura.

Folhas frescas foram utilizadas para análise da atividade de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidação de lipídios (PL). O teor de macro e micronutrientes foi quantificado nas folhas secas moídas e o teor de ureídeos foi quantificado nos pecíolos secos. A nodulação foi avaliada quanto ao número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS) e atividade da enzima glutamina sintetase em nódulos frescos (GSN).

Para determinação das atividades de CAT (EC 1.11.1.6) e SOD (EC 1.15.1.1), preparou-se um extrato contendo 1 g de folhas frescas maceradas em N₂ líquido e homogeneizadas com 3 mL de tampão fosfato (pH 7,0) acrescido de EDTA sal dissódico, ditioneitol e PVP. Este extrato foi armazenado a -20 °C até o momento de uso (CAVALCANTI et al., 2004). Para determinação da atividade da enzima CAT, cada amostra foi determinada em duplicata. Cada reação foi constituída por um volume final de 2000 µL (250 mM de H₂O₂, 100 mM tampão fosfato, água ultrapura), incubadas em banho-maria a 30 °C por três minutos e acrescidos de 12,5 µL de extrato enzimático. A determinação da atividade foi realizada em espectrofotômetro a 240 nm, com leituras realizadas a cada 10 segundos durante 90 segundos. A atividade enzimática da CAT foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ m}^{-1}$ e expresso em µmol H₂O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹ proteína (HAVIR e MCHALE, 1987).

Para a determinação da atividade da SOD, foram preparadas reações em triplicata, com volume final de 2000 µL, contendo 50 mM de tampão fosfato de sódio, 13 mM de metionina, 75 µM de nitroblue tetrazolium (NBT), 0,1 mM de EDTA sal dissódico, 2 µM de riboflavina e 30 µL de extrato enzimático bruto (DEL LONGO et al., 1993). Os tubos foram mantidos sob iluminação de uma lâmpada fluorescente (15 W) por 40 minutos a 25 °C. A fotorredução do NBT a azul de formazana foi mensurada em espectrofotômetro a 560 nm. A atividade SOD foi expressa em U mg⁻¹ proteína. Cada unidade representa a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT. O “branco” da análise foi constituído por uma reação exatamente igual a descrita anteriormente, porém, mantida no escuro. A reação controle foi preparada sem o extrato enzimático bruto e mantida sob iluminação, nas mesmas condições descritas para as amostras.

A quantificação da peroxidação de lipídios foi realizada de acordo com Hodges et al. (1999) com algumas modificações. Para a elaboração do extrato vegetal, empregou-se 1 g de folhas frescas maceradas em N₂ líquido e homogeneizadas com 5 mL de etanol 80%. A quantificação colorimétrica foi obtida a 532 e 600 nm para uma reação contendo ácido tricloroacético (TCA) 20% + PVP (solução A), e a 440, 532 e 600 nm para a reação contendo ácido tiobarbitúrico 0,65% (TBA) em TCA 20% (solução B). Os resultados foram apresentados em nmol de malondialdeído (MDA) por grama de folhas frescas, obtidas em triplicata no extrato (HODGES et al., 1999). O teor de macro e micronutrientes foi determinado de acordo com Yemm e Willis (1954).

Para determinação da atividade de GS em nódulos frescos, preparou-se o extrato conforme Hungria (1994), utilizando-se 0,5 g de nódulos macerados com 5 mL

de tampão para extração. As amostras foram filtradas em coluna de Sephadex G-25 e quantificadas colorimetricamente com espectrofotômetro a 505 nm (FERGUSON e SIMS, 1971). Foram utilizados 20 µL de extrato, tempo de incubação de 10 minutos a 30 °C, utilizando-se cloreto férrico a 0,37 mol L⁻¹ para parar a reação. A concentração das amostras foi calculada de acordo com uma curva padrão tendo como referência diferentes concentrações de γ-glutamil hidroxamato.

Tanto para a quantificação de CAT e SOD de folhas quanto para GS nos nódulos, o teor de proteínas de cada amostra foi previamente quantificado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

3.4.4 Teor de óleo, proteínas e produção de sementes

Ao final do ciclo das plantas foram avaliados os parâmetros de rendimento: massa seca total de grãos (MSTG) (g) e o teor de óleo e proteínas os grãos (%). Os teores de óleo e proteínas foram quantificados por espectrofotometria de infravermelho próximo - NIR (Thermo Scientific, modelo Antaris II) e os espectros das amostras foram coletados de grãos intactos posicionados na esfera de integração do aparelho. As leituras foram realizadas com comprimento de onda na faixa espectral entre 1100 e 2500 nm. Cada espectro foi resultado de 32 “scans”, com resolução de 4 cm.

3.4.5 Análise estatística

Foram realizadas as análises pressupostas aos testes paramétricos e, uma vez atendidas, os dados foram submetidos à ANOVA em seguida ao teste Tukey, sendo testadas as interações duplas e triplas entre os fatores. Estas análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico Sisvar v. 5.3. Análises de correlação de Pearson foram realizadas entre todas as variáveis, por meio do programa estatístico Genes. Em todos os testes o nível de significância considerado foi de 5%.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Análises Fisiológicas

A temperatura média na casa de vegetação foi de 31 °C com a máxima diária de 40,5 °C e a mínima diária de 21,9 °C. A umidade relativa do ar média foi de 62%, com a mínima e a máxima variando entre 35,8% e 90%, respectivamente.

Houve interação tripla para taxa fotossintética e condutância estomática aos 4 e 10 dias após o início do período de restrição hídrica (RH) e aos 10 dias para transpiração. Quatro dias após o início da RH as plantas já apresentavam sintomas de estresse, com redução na taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática, que se mantiveram baixos durante o período de RH (Tabela 3.2). Aos 10 dias sob estresse verificaram-se nos genótipos BR 16 e DREB 2 maiores taxas fotossintéticas quando inoculadas com *B. diazoefficiens* 5080 em relação às inoculadas com *B. elkanii* 5019. O mesmo foi observado para BR 16 quanto à condutância estomática. Quatro dias após o início do estresse, AREB apresentou maior taxa fotossintética quando inoculada com *B. elkanii* 5019 em relação a *B. diazoefficiens* 5080 (Tabela 3.2).

Na condição não estressante, avaliada aos quatro dias correspondentes às plantas sob estresse, os genótipos DREB 1, DREB 2 e BR 16 inoculados com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080 apresentaram maiores taxas fotossintéticas, além de maior condutância estomática nos genótipos DREB 1 e BR 16 em relação à inoculação com *B. elkanii* 5019 (Tabela 3.2). Para DREB 2 e AREB o efeito da estirpe *B. diazoefficiens* 5080 foi observado na segunda avaliação, aos 10 dias. Maiores taxas de transpiração foram observadas aos 10 dias em plantas AREB inoculadas com *B. diazoefficiens* 5080 em relação às inoculadas com *B. elkanii* 5019.

Aos 4 dias sob RH, o genótipo DREB 2 apresentou a maior taxa fotossintética, porém, aos 10 dias, AREB apresentou os maiores valores (Tabela 3.2). A transpiração e a condutância estomática não diferiram entre os genótipos sob estresse. Nas plantas sem RH, aos 10 dias, DREB 1 inoculado com *B. elkanii* 5019 apresentou menor taxa fotossintética e a menor condutância estomática. Por sua vez, BR 16 e AREB associados com *B. diazoefficiens* 5080 apresentaram a maior condutância estomática na segunda avaliação.

3.5.2 Análises Bioquímicas

A peroxidação de lipídios (PL), as atividades da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutamina sintetase (GS) e o teor de ureídeos apresentaram interação tripla significativa. A RH aumentou a PL, exceto no genótipo DREB 2 inoculado com *B. diazoefficiens* 5080, que não diferiu do tratamento sem RH. Por outro lado, a inoculação dos genótipos DREB 1 e DREB 2 com *B. elkanii* 5019 resultou em maior PL em relação à inoculação com *B. diazoefficiens* 5080. Os genótipos BR 16 e AREB apresentaram menor PL sob RH quando inoculados com *B. elkanii* 5019 (Figura 3.1A).

Tabela 3.2 - Taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática em genótipos de soja geneticamente modificados para tolerância à seca (P58 DREB1A, P2193 DREB2A, AREB 1Ea2939) e no genótipo parental (BR 16), inoculados com *B. elkanii* 5019 e *B. diazoefficiens* 5080, aos 4 e 10 dias sob restrição hídrica (53 e 59 dias após a semeadura - DAS).

Tempo de estresse	Condição Hídrica	Genótipos								Média geral
		P58 DREB 1A		P2193 DREB 2A		AREB 1Ea2939		BR 16		
		<i>B. elkanii</i> 5019	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	<i>B. elkanii</i> 5019	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	<i>B. elkanii</i> 5019	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	<i>B. elkanii</i> 5019	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	
<i>Taxa fotossintética ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)</i>										
4 DAS	Estressado	0,57	0,26	2,03	1,65	0,19	0,79	0,24	0,43	0,76
	Não estressado	22,96	25,69	22,81	26,59	26,01	24,55	20,29	26,87	24,47
	Média	11,7	13,0	12,4	14,1	13,1	12,7	10,3	13,6	
	<i>p</i> valor	Genótipo (G) $p \leq 0,001$	Condição hídrica (CH) $p \leq 0,001$	Estirpe (E) $p \leq 0,001$	G * CH $p \leq 0,001$	G * E $p \leq 0,001$	E * CH $p \leq 0,001$	G * E * CH $p \leq 0,001$		
10 DAS	Estressado	0,39	0,72	0,57	2,04	2,37	2,45	0,06	1,64	1,28
	Não estressado	27,2667	28,08	28,9133	28,44	28,6067	27,7267	27,7233	27,3433	28,01
	Média	13,8	14,4	14,7	15,2	15,5	15,1	13,9	14,5	
	<i>p</i> valor	Genótipo (G) $p \leq 0,001$	Condição hídrica (CH) $p \leq 0,001$	Estirpe (E) $p = 0,085$	G * CH $p = 0,017$	G * E $p = 0,168$	E * CH $p = 0,004$	G * E * CH $p = 0,071$		
<i>Transpiração ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)</i>										
4 DAS	Estressado	0,21	0,14	0,52	0,42	0,41	0,16	0,14	0,42	0,30
	Não estressado	3,95	4,10	4,01	4,26	4,09	4,22	4,03	4,22	4,11
	Média	2,1	2,1	2,3	2,3	2,2	2,2	2,1	2,3	
	<i>p</i> valor	Genótipo (G) $p = 0,181$	Condição hídrica (CH) $p \leq 0,001$	Estirpe (E) $p = 0,256$	G * CH $p = 0,653$	G * E $p = 0,432$	E * CH $p = 0,100$	G * E * CH $p = 0,558$		
10 DAS	Estressado	0,24	0,54	0,35	0,41	0,63	0,43	0,41	0,53	0,44
	Não estressado	4,31	4,36	4,34	4,57	4,26	4,77	4,56	4,72	4,48
	Média	2,3	2,4	2,3	2,5	2,4	2,60	2,48	2,62	
	<i>p</i> valor	Genótipo (G) $p = 0,082$	Condição hídrica (CH) $p \leq 0,001$	Estirpe (E) $p = 0,012$	G * CH $p = 0,513$	G * E $p = 0,996$	E * CH $p = 0,153$	G * E * CH $p = 0,046$		

Continua...

Tab. 2. Continuação...

Tempo de estresse	Condição Hídrica	Genótipos								Média geral	
		P58 DREB 1A		P2193 DREB 2A		AREB 1Ea2939		BR 16			
		<i>B. elkanii</i> 5019	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	<i>B. elkanii</i> 5019	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	<i>B. elkanii</i> 5019	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	<i>B. elkanii</i> 5019	<i>B. diazoefficiens</i> 5080		
<i>Condutância estomática (mol m⁻² s⁻¹)</i>											
4 DAS	Estressado	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	Não estressado	0,42	0,56	0,51	0,52	0,54	0,52	0,50	0,56	0,56	0,52
	Média	0,2	0,3	0,26	0,27	0,27	0,3	0,3	0,3	0,3	
	<i>p</i> valor	Genótipo (G) p = 0,105	Condição hídrica (CH) p ≤ 0,001	Estirpe (E) p ≤ 0,001	G * CH p = 0,250	G * E p = 0,002	E * CH p = 0,002	G * E * CH p = 0,006			
10 DAS	Estressado	0,0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,05	0,01
	Não estressado	0,61	0,63	0,68	0,74	0,64	0,80	0,81	0,77	0,77	0,71
	Média	0,31	0,32	0,34	0,37	0,32	0,41	0,41	0,41	0,41	
	<i>p</i> valor	Genótipo (G) p ≤ 0,001	Condição hídrica (CH) p ≤ 0,001	Estirpe (E) p ≤ 0,001	G * CH p ≤ 0,001	G * E p = 0,002	E * CH p = 0,008	G * E * CH p ≤ 0,001			

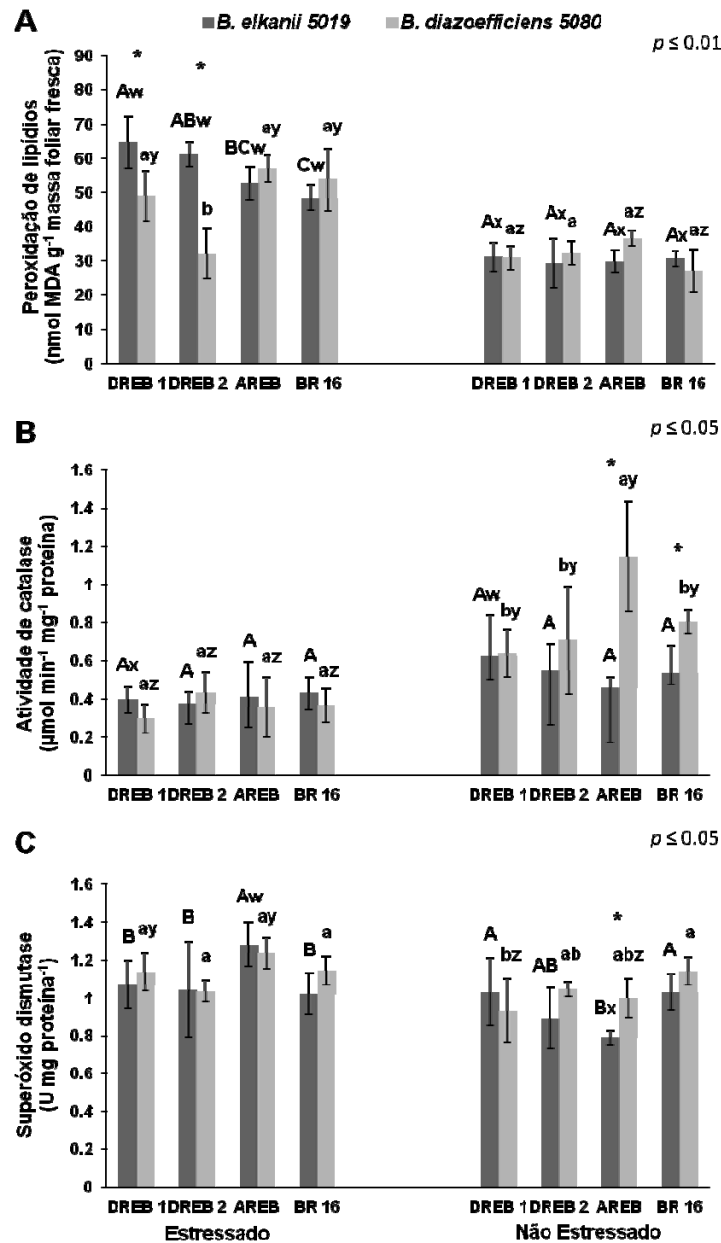


Figura 3.1 - Peroxidação de lipídios (A), atividade de catalase (B) e de superóxido dismutase (C) em folhas de soja geneticamente modificada para tolerância à seca (P58 DREB1A, P2193 DREB2A, AREB 1Ea2939) e no genótipo parental (BR 16) após 12 dias sob restrição hídrica. Letras maiúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. elkanii* 5019 dentro de cada condição hídrica. Letras minúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080 dentro de cada condição hídrica. *diferença entre estirpes para o mesmo genótipo, dentro de cada condição hídrica. “w” e “x” comparam condições hídricas para o mesmo genótipo, inoculado com a estirpe *B. elkanii* 5019. “y” e “z” comparam condições hídricas para o mesmo genótipo, inoculado com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080.

Houve redução na atividade da catalase (CAT) nas plantas submetidas à RH, com exceção da AREB inoculada com *B. elkanii* 5019. Na condição de suprimento pleno de água, a inoculação dos genótipos AREB e BR 16 com *B. diazoefficiens* 5080

resultou em maior atividade da enzima quando comparada à inoculação com *B. elkanii* 5019, sendo maior no genótipo AREB (Figura 3.1B).

A maior atividade da SOD ocorreu no genótipo AREB sob RH e inoculação com *B. elkanii* 5019. DREB 1 inoculado com *B. diazoefficiens* 5080 e AREB inoculado com ambas estirpes apresentaram aumento da SOD quando submetidos à RH. Na condição não estressante, AREB apresentou maior atividade de SOD quando inoculado com *B. diazoefficiens* 5080. AREB e DREB 2 inoculados com *B. elkanii* 5019 e DREB 1 inoculada com *B. diazoefficiens* 5080 apresentaram menores atividades de SOD sob suprimento pleno de água (Figura 3.1C).

A atividade da glutamina sintetase em nódulos (GS) não diferiu entre os genótipos sob RH. Já os genótipos DREB 1 e DREB 2 inoculados com *B. elkanii* 5080 apresentaram menor atividade GS na condição não estressante em relação aos inoculados com *B. diazoefficiens* 5019 (Figura 3.2A).

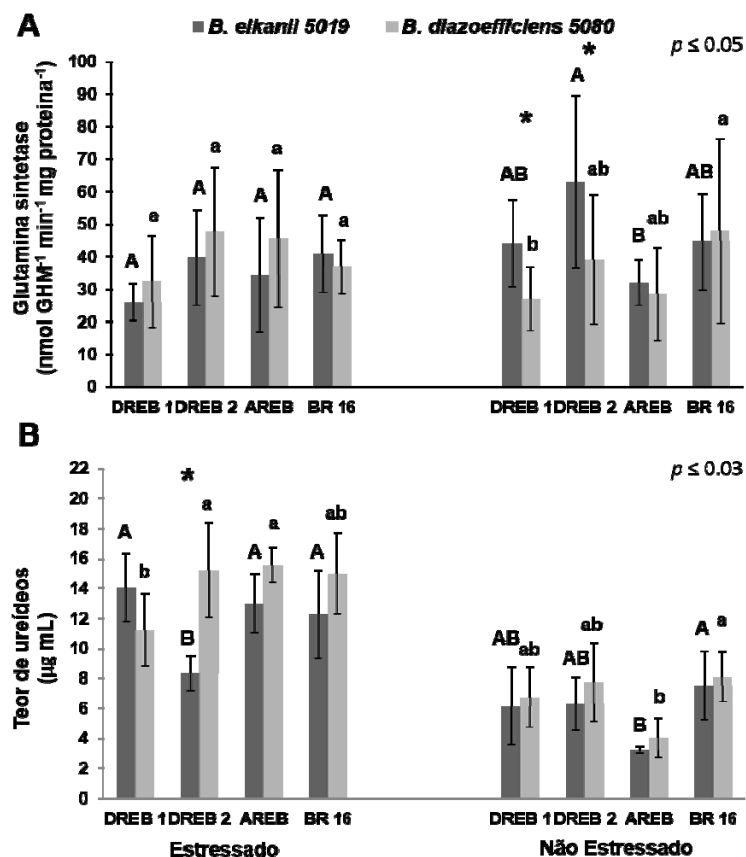


Figura 3.2 - Atividade da glutamina sintetase em nódulos frescos (A) e teor de ureídeos em pecíolos (B) de soja geneticamente modificada para tolerância à seca (P58 DREB1A, P2193 DREB2A, AREB 1Ea2939) e no genótipo parental (BR 16) após 12 dias sob restrição hídrica. Letras maiúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. elkanii* 5019 dentro de cada condição hídrica. Letras minúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080 dentro de cada condição hídrica. * diferença entre estirpes para o mesmo genótipo, dentro de cada condição hídrica.

Com exceção do genótipo DREB 2 inoculado com *B. elkanii* 5019, a RH aumentou os teores de ureídeos quando comparado aos tratamentos sem RH. Além disso, quando submetido à RH, DREB 2 apresentou diferenças nos teores de ureídeos de acordo com a estirpe inoculada, sendo os maiores valores observados quando inoculados com *B. diazoefficiens* 5080. Sem RH não houve influência da estirpe sobre o teor de ureídeos em cada genótipo, porém, entre os genótipos inoculados com *B. elkanii* 5019, os maiores teores foram observados em BR 16, enquanto que os menores foram obtidos no AREB (Figura 3.2B).

3.5.3 Teores de macro e micronutrientes nas folhas

Com exceção dos nutrientes Ca, Mg, Mn, que não apresentaram alteração na concentração de acordo com a disponibilidade hídrica, e Zn, que apresentou maiores teores nas folhas das plantas sob restrição hídrica, os demais nutrientes apresentaram redução nos teores sob restrição hídrica. A inoculação com *B. diazoefficiens* 5080 favoreceu maiores teores de P, B e Fe nas folhas (Tabela 3.3).

Nitrogênio, ferro e manganês não tiveram influência do genótipo sobre a concentração nas folhas. AREB apresentou os menores teores de P, K, Mg, S e Zn em relação aos demais genótipos, não deferindo quanto aos teores de Ca e Cu. Os menores teores de Ca, B e Zn foram observados no genótipo DREB 2. O genótipo DREB 1 apresentou as maiores concentrações de P, K, Ca, Mg, S, B, Cu e Zn, diferindo do genótipo parental (BR 16) apenas quanto ao teor de Zn, sendo que DREB 1 apresentou maiores teores do que BR 16 (Tabela 3.3).

3.5.4 Análises quantitativas, teor de óleo e proteínas

Houve interação tripla para número de nódulos (NN) e massa de nódulos secos (MNS). Os maiores valores de NN e MNS foram observados no genótipo AREB sem RH. Houve maior NN quando associado a *B. elkanii* 5019, porém, não houve influência da estirpe na MNS. Por sua vez, BR 16 apresentou maior NN quando associado a *B. diazoefficiens* 5080. Sob RH, menor NN foi observado no genótipo DREB 2, porém, não houve redução na MNS. Sob RH, a inoculação com *B. elkanii* 5019 proporcionou maior MNS para BR 16 em relação a *B. diazoefficiens* 5080. Em pleno fornecimento de água, *B. elkanii* 5019 favoreceu a MNS no genótipo DREB 1, quando comparado à inoculação com *B. diazoefficiens* 5080. Já para DREB 2 os resultados apontam o contrário (Figura 3.3A, 3.3B).

Tabela 3.3 - Concentração de macro e micronutrientes em folhas de genótipos de soja sob diferentes condições hídricas e inoculação com *B. diazoefficiens* 5080 ou *B. elkanii* 5019.

Condição Hídrica	Genótipo	Estirpe	Macronutrients (g kg ⁻¹)					Micronutrients (mg kg ⁻¹)					
			N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Estressado	DREB 1A P58	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	39.1	2.3	17.5	12.9	5.4	1.9	22.5	6.1	90.3	33.5	31.1
	DREB 2A P2193	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	39.7	2.2	16.7	10.9	5.0	1.7	16.9	5.0	89.0	26.0	20.1
	AREB 1Ea2939	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	37.2	2.1	12.4	12.5	5.0	1.7	23.7	5.6	98.0	30.8	27.4
	BR 16	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	39.0	2.3	16.0	12.6	5.8	2.0	23.5	6.0	91.3	32.8	27.7
Estressado	DREB 1A P58	<i>B. elkanii</i> 5019	37.3	2.2	15.9	13.3	5.5	1.8	23.1	5.6	90.8	35.3	29.0
	DREB 2A P2193	<i>B. elkanii</i> 5019	37.4	2.2	15.5	12.3	5.0	1.7	19.8	5.7	89.3	33.3	27.3
	AREB 1Ea2939	<i>B. elkanii</i> 5019	36.3	2.0	13.2	12.4	5.3	1.7	26.0	5.9	88.5	41.8	29.2
	BR 16	<i>B. elkanii</i> 5019	37.7	2.1	13.9	13.0	5.5	1.8	22.6	5.6	90.8	31.8	23.2
Não estressado	DREB 1A P58	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	48.9	3.1	20.4	13.2	5.5	2.1	31.3	7.1	115.8	34.5	23.7
	DREB 2A P2193	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	49.6	2.9	19.6	12.5	5.0	2.1	24.5	6.2	120.3	34.8	29.3
	AREB 1Ea2939	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	47.4	2.7	15.5	13.7	5.2	2.0	26.7	7.0	112.0	30.8	18.7
	BR 16	<i>B. diazoefficiens</i> 5080	50.0	2.9	19.1	12.2	5.4	2.2	26.7	6.5	109.8	33.8	19.0
Não estressado	DREB 1A P58	<i>B. elkanii</i> 5019	49.0	2.8	19.2	13.7	5.4	2.1	26.7	6.7	107.8	36.0	29.7
	DREB 2A P2193	<i>B. elkanii</i> 5019	48.0	2.9	18.9	12.6	5.0	2.0	21.9	6.4	110.8	33.8	19.7
	AREB 1Ea2939	<i>B. elkanii</i> 5019	49.0	2.4	16.0	12.3	4.9	1.9	21.5	5.8	102.8	30.3	22.9
	BR 16	<i>B. elkanii</i> 5019	50.1	2.8	19.0	12.4	5.5	2.1	23.3	6.6	111.3	30.3	20.5
Média da Condição Hídrica	Estressado		37.9 ^B	2.2 ^B	15.2 ^B	12.5	5.3	1.8 ^B	22.3 ^B	5.7 ^B	91.0 ^B	33.1	26.9 ^A
	Não estressado		49.0 ^A	2.8 ^A	18.5 ^A	12.8	5.2	2.1 ^A	25.3 ^A	6.4 ^A	111.3 ^A	33.0	21.7 ^B
Média dos Genótipos	DREB 1A P58		43.6	2.6 ^A	18.3 ^A	13.3 ^A	5.4 ^A	2.0 ^{AB}	25.9 ^A	6.4 ^A	101.1	34.8	28.3 ^A
	DREB 2A P2193		43.7	2.6 ^A	17.7 ^A	12.1 ^B	5.0 ^B	1.9 ^{BC}	20.8 ^B	5.8 ^B	102.3	31.9	21.6 ^C
	AREB 1Ea2939		42.5	2.3 ^B	14.3 ^B	12.7 ^{AB}	5.1 ^B	1.8 ^C	24.5 ^A	6.1 ^{AB}	100.3	33.4	24.6 ^B
	BR 16		44.2	2.5 ^{AB}	17.0 ^A	12.6 ^{AB}	5.6 ^A	2.1 ^A	24.0 ^A	6.2 ^{AB}	100.8	32.1	22.6 ^{BC}
Média das Estirpes	<i>B. elkanii</i> 5019		43.1	2.4 ^B	16.5	12.7	5.2	1.9	23.1 ^B	6.0	99.0 ^B	34.0	23.7
	<i>B. diazoefficiens</i> 5080		43.8	2.5 ^A	17.2	12.5	5.3	1.9	24.5 ^A	6.2	103.3 ^A	32.1	24.9
Estatística (valor de p)	Condição Hídrica (CH)		<0.001	<0.001	<0.001	0.1668	0.4050	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.9150	<0.001
	Genótipo (G)		0.1024	0.0013	<0.001	0.0154	<0.001	<0.001	<0.001	0.0415	0.9353	0.2844	<0.001
	Estirpe (E)		0.1450	0.0490	0.1116	0.4669	0.6053	0.0964	0.0417	0.3110	0.0660	0.1029	0.0735
	CH * G * E		0.9153	0.5698	0.8339	0.6023	0.1426	0.2739	0.5883	0.0939	0.7346	0.3094	0.0391
	CH * G		0.7224	0.4947	0.7755	0.2632	0.7603	0.7020	0.0019	0.6998	0.3141	0.0257	0.1399
	CH * E		0.0937	0.6422	0.4581	0.1743	0.6053	0.5692	0.0002	0.2187	0.3869	0.0198	0.0090
	G * E		0.4019	0.4510	0.3122	0.2093	0.8884	0.4452	0.5872	0.0777	0.5098	0.1523	0.0014

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey $p \leq 0.05$).

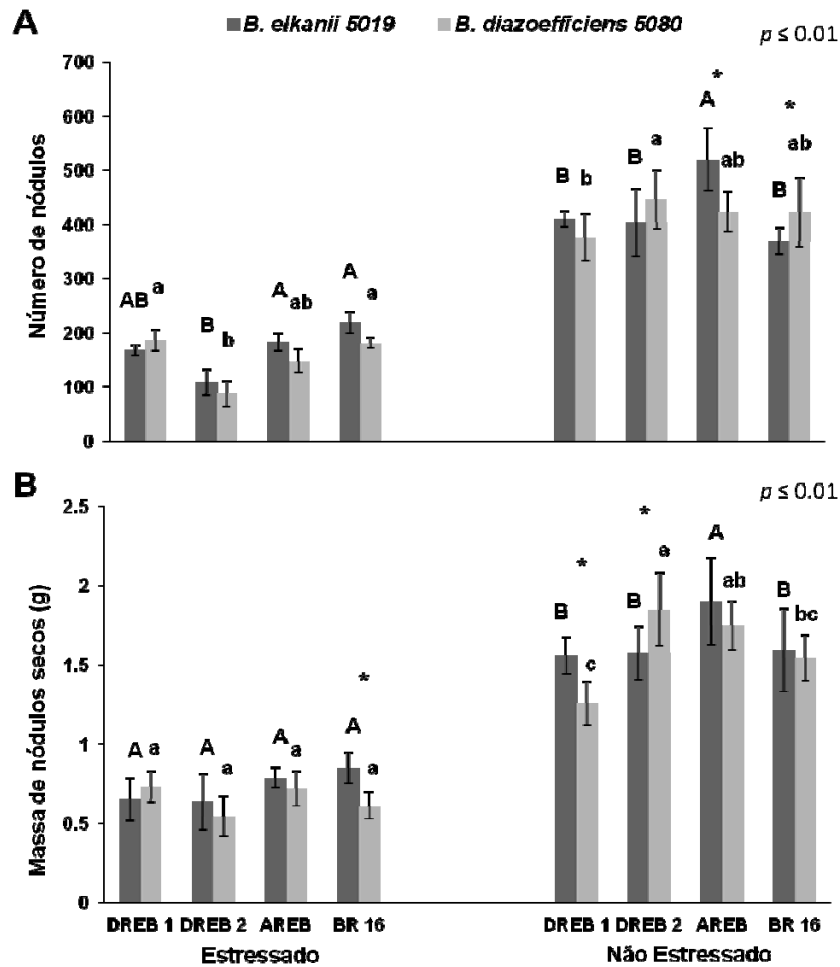


Figura 3.3 - Número de nódulos (A) e massa de nódulos secos (B) de soja geneticamente modificada para tolerância à seca (P58 DREB1A, P2193 DREB2A, AREB 1Ea2939) e do genótipo parental (BR 16) após 12 dias sob restrição hídrica. Letras maiúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. elkanii* 5019 dentro de cada condição hídrica. Letras minúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080 dentro de cada condição hídrica. * diferença entre estirpes para o mesmo genótipo, dentro de cada condição hídrica.

Observou-se interação dupla entre genótipo x condição hídrica para teor de óleo e interação tripla para teor de proteínas. AREB não apresentou alterações nos teores de óleo em relação ao DH (Figura 3.4A). Para a condição bem irrigada, DREB 1 apresentou os menores valores, enquanto que na condição restritiva, AREB diferiu dos demais genótipos apresentando os maiores teores (Figura 3.4A). A restrição hídrica aumentou o teor de proteínas nos grãos de BR 16, independente da estirpe inoculada, e para DREB 1 inoculado com *B. elkanii* 5019, quando comparadas à condição sem RH. DREB 1 apresentou mais proteínas sob RH que os demais transgenes quando inoculados com *B. elkanii* 5019, enquanto que na inoculação com *B. diazoefficiens* 5080

não houve diferença entre os genótipos. Para a condição suprimento pleno de água, *B. elkanii* 5019 promoveu maiores teores em AREB e menores valores em DREB 2. Já na inoculação com *B. diazoefficiens* 5080 na condição bem irrigada, os maiores valores foram observados para DREB 1 (Figura 3.4B).

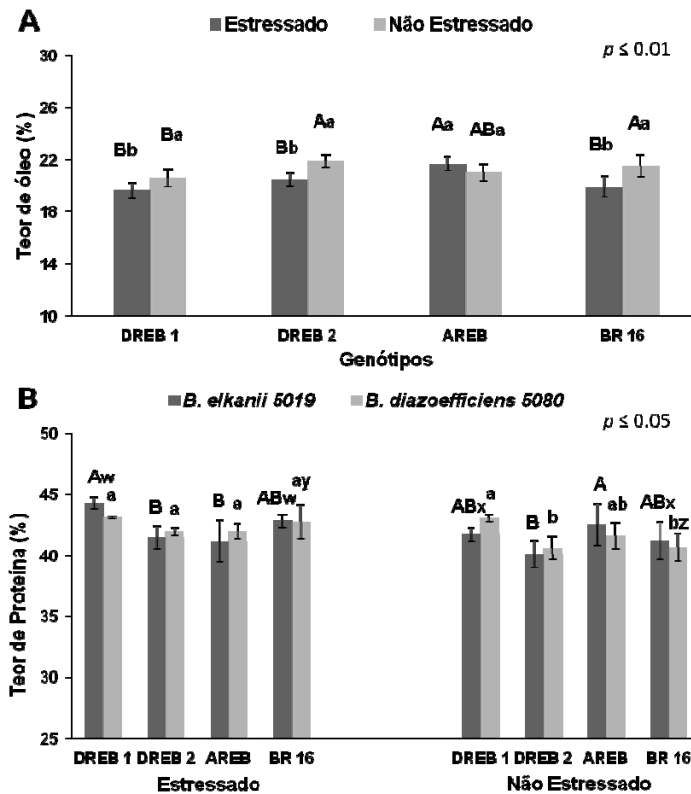


Figura 3.4 - (A) Desdobramento da interação dupla entre genótipo x condição hídrica para teor de óleo em grãos de soja geneticamente modificada para tolerância à seca (P58 DREB1A, P2193 DREB2A, AREB 1Ea2939) e no genótipo parental (BR 16) que passaram por restrição hídrica por 12 dias no início da fase reprodutiva, ou mantidos sob pleno fornecimento de água. Letras maiúsculas comparam os genótipos para a mesma estirpe de *Bradyrhizobium*; letras minúsculas comparam as estirpes para cada genótipo. (B) Desdobramento interação tripla para teor de proteína em grãos de soja, conforme tratamentos acima. Letras maiúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. elkanii* 5019 dentro de cada condição hídrica. Letras minúsculas comparam os genótipos inoculados com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080 dentro de cada condição hídrica. “w” e “x” apontam condições hídricas para o mesmo genótipo, inoculado com a estirpe *B. elkanii* 5019. “y” e “z” comparam condições hídricas para o mesmo genótipo, inoculado com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080.

Houve interação dupla entre genótipo x condição hídrica e entre estirpe x condição hídrica para massa de grãos, em que a RH reduziu a produção de todos os genótipos, embora AREB tenha tido melhor resultado nessa condição (Figura 3.5A). No suprimento pleno de água, a maior produção foi para BR 16 e DREB 2, enquanto DREB 1 apresentou os menores valores. Não houve diferenças

em relação às estirpes na condição de suprimento pleno de água, enquanto que a inoculação com *B. diazoefficiens* 5080 resultou em maior produção sob RH (Figura 3.5B).

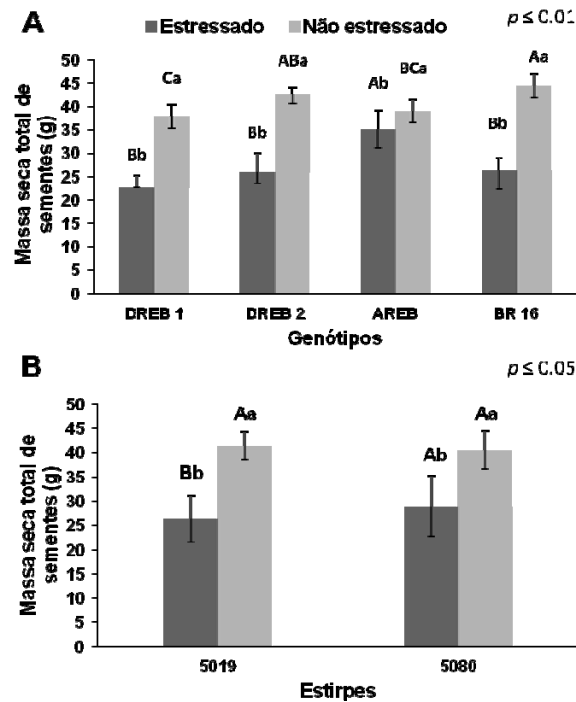


Figura 3.5 - Massa seca total de grãos de soja geneticamente modificada para tolerância à seca (P58 DREB1A, P2193 DREB2A, AREB 1Ea2939) e do genótipo parental (BR 16) que passaram por restrição hídrica por 12 dias no início da fase reprodutiva, ou mantidos sob pleno fornecimento de água. A) Desdobramento da interação genótipos x condição hídrica, em que letras maiúsculas comparam os genótipos na mesma condição hídrica e letras minúsculas comparam condição hídrica no mesmo genótipo. B) Desdobramento da interação estirpes x condição hídrica, em que letras maiúsculas comparam as estirpes na mesma condição hídrica e letras minúsculas comparam a condição hídrica na mesma estirpe.

3.5.5 Análises de correlação de Pearson

Vários foram os parâmetros que apresentaram correlação pela análise simples de Pearson, porém, o destaque foi dado para correlação entre GS e PL (-98%), concentração de Ca^+ e proteína (98%), atividade da enzima SOD e a concentração de Ca^+ (-99%) e para a GSN e concentração de Ca^+ (-73%). Estes dados estão apresentados na tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Principais resultados da análise de correlação de Pearson entre parâmetros avaliados durante a safra de soja 2014/2015, em casa de vegetação. GSN = glutamina sintetase em nódulos. PL = peroxidação de lipídios. SOD = atividade da enzima superóxido dismutase. NN = número de nódulos. MNS = massa de nódulos secos.

Parâmetros	Dados de correlação	Probabilidade (%)
GS x PL	-0,9791	0,017402
Ca⁺ x proteína	0,9849	0,011845
SOD x Ca⁺	-0,9998	0,01362
GS x Ca⁺	-0,7298	0,039162
PL x Ca⁺	0,7439	0,033794
SOD x óleo	0,7584	0,028791
SOD x fotossíntese	0,7086	0,048163
SOD x prod. sementes	0,7702	0,025088
NN x MNS	0,7747	0,023767

3.6 DISCUSSÃO

O estágio de desenvolvimento fenológico da planta é um dos principais fatores a determinar sua resposta metabólica a fatores abióticos como a restrição hídrica. Além disso, determina o potencial de recuperação da planta após um período de reidratação (CEREZINI et al., 2016). Assim, quanto mais tarde o estresse se manifestar, menos tempo a planta terá para sua recuperação. Plantas do genótipo AREB apresentaram ciclo ligeiramente mais longo quando comparadas aos demais genótipos, dependendo da condição hídrica, mas também da estirpe de *Bradyrhizobium* inoculada.

Além da redução da taxa fotossintética sob RH, as plantas responderam com drástica redução na condutância estomática (*gs*) e transpiração. A redução na *gs* é uma das primeiras respostas da planta à redução do potencial hídrico foliar ocasionado pela falta de água. Menor *gs* reduz a taxa transpiratória, resultando no aumento da temperatura foliar. A redução da fotossíntese diminui drasticamente a produção de energia para a planta e assim, o seu desenvolvimento (DEVI e GUIRIDHAR, 2015; DAS et al., 2016). Para Das et al. (2016), a redução na

taxa fotossintética ocorre principalmente pela redução na atividade da Rubisco. Esse efeito se reflete ainda em outros aspectos fisiológicos da planta, como a FBN, que é um processo com alta demanda energética (DAS et al., 2016).

Uma das principais causas na redução da g_s é o aumento da produção de ABA sob condições de seca, levando ao fechamento estomático. Com base na análise de plantas de soja com seis dias sob restrição hídrica, Das et al. (2016) e Mak et al. (2014) apontam que um dos fatores que desencadeiam a síntese de ABA é o acúmulo de Ca^{2+} na parte aérea de plantas sob RH, o que justificaria a correlação de -73% entre g_s e concentração de Ca^{2+} em plantas cultivadas sob restrição hídrica avaliadas neste experimento. Para Demidchik (2015) um dos fatores a influenciar a permeabilidade de Ca^{2+} na célula e fechamento estomático pela produção de ABA é a assimilação de H_2O_2 . Altas concentrações de O_2^- (precursor de H_2O_2 e substrato para atividade enzimática SOD) no interior da célula estimulam o influxo de Ca^{2+} , proporcionando o efluxo de K^+ , capaz de resultar na morte programada das células. Assim, a permeabilidade de Ca^{2+} na célula e sua concentração no citosol são determinantes ao controle da concentração de O_2^- . Altas concentrações de Ca^{2+} no interior da célula devido à presença O_2^- ativam cascatas regulatórias dependentes de Ca^{2+} por meio de proteínas de ligação ao Ca^{2+} , reduzindo a formação de H_2O_2 e a atividade de SOD (DEMIDCHIK, 2015; GILROY et al., 2016).

O eficiente controle de EROs interno da planta através da concentração de Ca^{2+} resulta em diminuição da concentração de O_2^- . A presença de O_2^- detectado como EROs na célula ativa a enzima SOD, reduzindo ainda mais a concentração do precursor de H_2O_2 (SHEN et al., 2015). A baixa concentração de H_2O_2 não ativa a atividade da enzima CAT. Além disto, Singh et al. (2016) observaram que baixas concentrações de O_2^- nas raízes de *Arabidopsis thaliana* são utilizados pelo metabolismo nos processos de multiplicação celular, enquanto que H_2O_2 está envolvido no alongamento e diferenciação celular, essenciais no desenvolvimento da planta. Por sua vez, quanto melhor o desenvolvimento da planta, maior tendem a ser seus teores proteicos. Isso explica a menor atividade de CAT sob condições de estresse e a similaridade na intensidade da atividade SOD entre ambas condições hídricas nos diferentes genótipos de soja. De acordo com os dados bibliográficos e correlação de 98% entre os teores de Ca^{2+} e proteína, e de -99% entre SOD e Ca^{2+} , pode-se supor que, nas condições desse trabalho, as

plantas tiveram a maior parte do controle de EROs nas células sob RH via concentração de Ca^{2+} e menor ativação da atividade enzimática.

Por sua vez, a redução na taxa fotossintética desencadeia o acúmulo de EROs na planta. Das et al. (2016) e Mak et al. (2014) observaram que em plantas de soja sob RH houve incremento significativo nos teores de H_2O_2 na célula, porém, a capacidade de detoxificação celular ocorreu via anidrase carbônica, protegendo a planta contra os danos oxidativos, ativando as enzimas em casos mais extremos. Devi e Guiridhar (2015) observaram que a indução de RH moderada a leve antes do florescimento favorece a tolerância à seca mais pelo aumento no teor de isoflavonas do que pela atividade das enzimas protetoras das EROs.

Segundo Das et al. (2016), ao menos 44 proteínas sofrem alterações em sua síntese sob estresse abiótico, sendo destas, ao menos 25 afetadas pela restrição hídrica. A alteração da atividade destas proteínas pode variar de acordo com os genótipos. Dentre as proteínas afetadas, estão a Rubisco e a glutamina sintetase, o que explica, respectivamente, a alteração na taxa fotossintética e na assimilação de nitrogênio (DEMIDCHIK, 2015; DAS et al., 2016). Cerca de 65,6% das proteínas com alguma relação com estresses como seca e altas temperaturas apresentam relação com a taxa fotossintética; 7,78% com a síntese de ATP; 4,44 % com a síntese proteica; 3,33% com a atividade da SOD; e 1,11% com a fixação de nitrogênio (DAS et al., 2016). A atividade de SOD é um dos principais mecanismos de defesa da planta contra estresse oxidativo (DEVI e GUIRIDHAR, 2015). O nível de expressão das enzimas varia de acordo com vários fatores, dentre eles, a cultura em estudo. Shen et al. (2015) observaram que em plantas de soja a expressão de SOD é superior à de CAT enquanto que em plantas de milho, a enzima CAT é mais ativa em relação à SOD.

Em relação à nodulação sob RH, Marino et al. (2007) verificaram que a falta de água gera respostas locais no sistema radicular e não sistêmicas na planta, ou seja, se parte do sistema radicular estiver recebendo água e parte não, a parte com disponibilidade de água apresentará melhor nodulação e FBN e a parte sem água será afetada, apresentando redução no teor de malato e na atividade sacarose sintase, principais fontes de disponibilização da energia para manter a respiração celular das bactérias nos nódulos e a geração de poder redutor para a realização da FBN. Assim, a RH reduz a MNS devido à redução da síntese proteica local nos nódulos. Além disso, acúmulo de substâncias como malondialdeído e 4-

hidroxinonenal resultantes da peroxidação de lipídios reage e oxida vários aminoácidos, dentre eles, lisina e histidina, fundamentais na constituição/formação de proteínas e dependentes de fontes de nitrogênio para serem sintetizados (MARINO et al., 2007).

A atividade da glutamina sintetase do nódulo pode apresentar diferentes respostas à restrição hídrica, podendo ter sua atividade inibida, como forma de proteção à planta, já que a forma intermediária à redução do nitrito (óxido nítrico) pode se tornar tóxica à planta se não metabolizado, ou podem ativar a superexpressão da atividade da enzima, favorecendo a fotorrespiração e mantendo maiores taxas fotossintéticas (DAS et al., 2016). Análise de correlação foi coerente com este dado, indicando correlação de -98% entre a atividade da GS e PL, ou seja, quanto maior a atividade da glutamina sintetase nos nódulos, menores são os danos causados às células. Ao se analisar a atividade da GS em relação à estirpe inoculada em condições de RH, houve uma tendência de maior atividade da enzima GS e menor PL em plantas inoculadas com a estirpe *B. diazoefficiens* 5080, o que refletiu em maiores taxas fotossintéticas nas plantas inoculadas com esta estirpe. O oposto foi observado em plantas inoculadas com *B. elkanii* 5019. Assim, supõe-se que as estirpes analisadas desencadeiam metabolismos diferentes nas plantas de soja submetidas à RH e, por isso, inoculantes à base de *B. diazoefficiens* 5080 podem aumentar a performance da planta frente a condições de restrição hídrica moderada.

Para Daryanto et al. (2015), as plantas podem apresentar dois mecanismos de tolerância quanto à falta de água, como fechamento estomático e controle osmótico das células. Plantas capazes de ativar o controle osmótico das células em condições de RH geralmente apresentam menores diminuições de produtividade. O controle osmótico gera acúmulos de solutos no interior da célula e evita que a fotossíntese seja muito prejudicada, o que mantém o turgor celular e a FBN ativa. A FBN é um fator determinante no potencial produtivo da planta de soja. Quando capaz de manter a FBN por meio de mecanismos mais eficientes para manter a fotossíntese, a planta atinge maiores rendimentos. Assim, plantas que conseguem manter a fotossíntese ativa por mais tempo sob RH tendem a favorecer a FBN.

As plantas são capazes de recuperar a taxa de FBN após um breve período de seca na fase inicial do período reprodutivo (CEREZINI et al., 2016).

Restabelecendo-se a reidratação em R5, as plantas ainda possuem o metabolismo ativo capaz de se refazer. Em R6, por exemplo, quando as plantas já estão entrando em período de senescência, estas não conseguem mais realocar N para as sementes e não recuperam mais o rendimento e teor proteico dos grãos. Isso é válido desde que a planta tenha disponibilidade de nutrientes no período de reidratação (MASTRODOMÊNICO et al., 2013). Embora tenha sido observada diferença entre o ciclo das plantas para os diferentes genótipos, nenhuma planta estava ainda no estágio R6 quando se suprimiu a restrição hídrica, o que pode explicar o fato de o teor de proteínas nos grãos não ter sido influenciado pela RH.

A indução da RH no final do período vegetativo ao início do reprodutivo reduz o rendimento principalmente devido à redução no crescimento da planta (número de nós), região fundamental para a floração e posterior frutificação. O estresse hídrico em um período mais avançado da fase reprodutiva reduz drasticamente o rendimento principalmente por haver aceleração/encurtamento de ciclo e as plantas entrarem em processo de senescência mais cedo (MASTRODOMÊNICO et al., 2013). Por outro lado, a RH no período vegetativo reduz o crescimento da planta, porém, afeta menos seus rendimentos, pois a planta consegue se aclimatar, dentro de certos limites, às condições extremas, alterando seu metabolismo (por meio da expressão gênica), desenvolvendo mecanismos que permitam sua sobrevivência (DARYANTO et al., 2015). Além disso, também há mais tempo para se recuperar do estresse sofrido.

Plantas bem nutridas e saudáveis têm maiores teores foliares de N, o qual acaba sendo redistribuído na planta durante o período de estresse. Se o período é curto e o estresse não muito severo, a seca pode causar poucos danos à produção (MASTRODOMÊNICO et al., 2013). Além disto, pôde-se observar maior atividade da enzima SOD e segunda menor peroxidação de lipídios para AREB sob RH, o que possivelmente tenha contribuído para que o genótipo tenha apresentado a maior produtividade de grãos.

Quanto à inoculação dos diferentes genótipos com *B. diazoefficiens* ou *B. elkanii*, a prevalência de respostas positivas quando inoculados com *B. diazoefficiens*, tais como maiores produtividade de grãos em condições de seca, se deve, principalmente, às respostas fisiológicas da bactéria frente às condições ambientais e não necessariamente do genótipo em si.

3.7 CONCLUSÕES

O genótipo AREB mostrou resultados promissores quanto ao desenvolvimento de mecanismos de tolerância à seca e manutenção da FBN, resultando em maiores taxas fotossintéticas sob restrição hídrica e mantendo maior potencial produtivo. Quanto à estirpe de *Bradyrhizobium* inoculada, houve alta variação da resposta em relação aos diversos fatores estudados, porém, a *B. diazoefficiens* 5080 resultou em maior taxa fotossintética e em maior produção de grãos por planta sob restrição hídrica.

4 ARTIGO 2: ATRIBUTOS FISIOLÓGICOS E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA TOLERÂNCIA À SECA

4.1 RESUMO

A ocorrência cada vez mais frequente de restrição hídrica no solo, induzida pelas mudanças na quantidade e na distribuição das chuvas, justifica o desenvolvimento de genótipos de soja (*Glycine max* [L.] Merrill) adaptados a esse cenário visando à manutenção do potencial produtivo. Além de aspectos fisiológicos relativos à planta, a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN) pelos genótipos melhorados é um aspecto importante entre os mecanismos de tolerância à seca. O objetivo deste trabalho foi avaliar atributos fisiológicos e a FBN em genótipos de soja geneticamente modificados para tolerância à seca (AREB 1Ea2939 e 2Ia4 Gols), seu genótipo parental (BR16) e um genótipo comercial (BRS 1010IPRO), em condições de campo sob fornecimento controlado de água. O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, com quatro blocos. Nas parcelas foram aplicadas quatro condições hídricas: restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), fornecimento de água pela chuva (NIRR) e chuva + irrigação quando necessário (IRR); os quatro genótipos foram dispostos nas subparcelas. Foram realizadas três avaliações ao longo do ciclo da cultura: no início da RH-V, no início da RH-R, na fase de enchimento de grãos. Avaliaram-se as trocas gasosas, teor de clorofila, massa da parte aérea seca, teores de N foliar, ureídeos, atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, peroxidação de lipídios, nodulação, teor de óleo e proteínas nos grãos, massa de 100 grãos, e rendimento de grãos. A restrição hídrica afetou negativamente a nodulação e rendimento para todos os genótipos. Os genótipos AREB e Gols apresentaram alguns atributos considerados positivos quanto a tolerância à seca. AREB apresentou respostas favoráveis à restrição hídrica e nodulação, porém a transgenia aumentou o ciclo fisiológico e diminuiu o potencial produtivo da planta. Gols apresentou características fisiológicas e bioquímicas favoráveis de tolerância à seca além de potencial produtivo similar ao padrão comercial e à BR 16. O genótipo comercial não transgênico BRS 1010IPRO teve a nodulação mais intensamente prejudicada pela seca e apresentou redução do ciclo.

Palavras-chave: Veranico. AREB. Gols. Ureídeos. Rendimentos. Estresse oxidativo.

4.2 ABSTRACT

The more frequent occurrence of water restriction caused by uneven distribution of rain have led to the search for soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) genotypes more tolerant to drought. In addition to physiological traits related to the plant, the effectiveness of the biological nitrogen fixation (BNF) is one of the mechanisms associated to tolerance to drought. The aim of this work was to assess physiological traits and the BNF in soybean genotypes genetically modified for tolerance to drought (AREB 1Ea2939 and 2Ia4 Gols), its parental genotype (BR 16), and a commercial genotype (BRS 1010IPRO) under field conditions under controlled water supply. The experiment was in a split-plot design, in four blocks. Four water conditions were applied in the plots: water restriction in the vegetative stage, water restriction in the reproductive stage, rainfed, and rainfed + supplemented with irrigation whenever necessary. The four genotypes were set in the subplots. Three assessments were made along the crop cycle: At the beginning of the water restriction in the vegetative stage, at the beginning of water restriction at the reproductive stage, and during the pod filling. Gas exchanges, chlorophyll concentration, shoot dry weight, leaf N concentration, ureides, activities of catalase and superoxide dismutase, lipids peroxidation, nodulation, and concentration of oil and proteins in grains, mass of 100 grains, and yield were assessed. The water restriction negatively affected the nodulation and yield in all genotypes. AREB and Gols showed some positive traits related to tolerance to drought. AREB showed positive responses for nodulation under drought, but the transgene increased the physiological cycle and decreased the plant yield potential. Gols showed physiological and biochemical traits for tolerance to drought, in addition to yield potential similar to the commercial standard BRS 1010 IPRO and the parental BR 16. The commercial standard BRS 1010 IPRO had stronger decrease in nodulation and shortened the cycle because of water restriction.

Keywords: Water restriction. AREB. Gols. Ureides. Grain yield. Oxidative stress.

4.3 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) é uma das principais *commodities* nacionais e de extrema importância para a agroindústria, indústria química e alimentícia (Bolla 2015, FAO 2002). A importância econômica global desta cultura globalmente justifica o constante investimento no seu melhoramento genético e desenvolvimento de práticas agrícolas que permitam melhores rendimentos, com menores custos financeiros e impactos ambientais. Como resultado desses esforços, houve uma produção mundial recorde de 330.4 milhões de toneladas de soja na safra 2015/16 (USDA, 2016), enquanto que no Brasil o recorde ocorreu na safra 2016/17, com mais de 113 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

A má distribuição de chuvas e incidência de veranicos cada vez mais intensos e frequentes, em parte decorrentes das mudanças climáticas globais, têm preocupado cientistas, pois pode levar a perdas significativas de rendimento na agricultura (ALMEIDA et al., 1999; MANAVALAN et al., 2009; LAWLOR, 2013; THORNTON et al., 2014). Somente na safra de 2015/16 a produção nacional de grãos teve uma redução de 9,5% em relação à safra anterior. Já em relação à cultura da soja, esta redução foi de 4,3% (CONAB, 2016) e só não foi mais significativa porque houve aumento da área cultivada.

Constantemente são lançados no mercado genótipos de soja geneticamente modificados com novas características como resistência a herbicidas e a insetos mastigadores. A obtenção de genótipos de soja geneticamente modificados para tolerância à seca ainda está em andamento, porém, vêm apresentando resultados promissores (POLIZEL et al., 2011; KRASENSKY e JONAK, 2012; BARBOSA et al., 2013; ENGELS et al., 2013; MARCOLINO-GOMES et al., 2014; NAKASHIMA et al., 2014). A inserção de genes capazes de conferir tolerância à seca, como é o caso dos genes AREB (*Abscisic acid* [ABA] *responsive element binding*) e GolS (*Galactinol synthase*), permite que a planta perceba e reconheça sinais do estresse, ativando e regulando a superexpressão de genes envolvidos nos mecanismos de tolerância (KRASENSKY e JONAK, 2012; UNDA et al., 2012; BARBOSA et al., 2013; MARCOLINO-GOMES et al., 2014; NAKASHIMA et al., 2014).

A superexpressão destes genes estimula a produção de determinadas substâncias que regularão o metabolismo em resposta ao estresse.

Dentre as alterações ocorridas no metabolismo, podem-se citar ajustes no sistema de membranas, alterações na estrutura da parede celular, alterações no ciclo celular e divisão celular, produção de solutos capazes de estabilizar proteínas e estruturas celulares e manter a turgescência celular por ajuste osmótico, além do estímulo ao metabolismo antioxidante para remover excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO's) produzidas durante a situação de estresse, restabelecendo, assim, o equilíbrio redox celular (KRASENSKY e JONAK, 2012; LAWLOR, 2013; HU e XIONG, 2014; FANG e XIONG, 2015).

Por outro lado, o desenvolvimento de genótipos tolerantes à seca sem levar em consideração outros fatores essenciais à cultura não é suficiente para um sistema de produção sustentável. A FBN é um processo que permite a disponibilização de N para a planta a partir do N₂ atmosférico. Esta prática é tida como essencial para a cultura da soja, dispensando o uso de fertilizantes químicos nitrogenados, já que é capaz de suprir as necessidades da cultura e apresenta baixo custo financeiro e ambientais (GIONGO et al., 2008; HUNGRIA et al., 2014). Por outro lado, a FBN é dependente de vários fatores ambientais, dentre eles a disponibilidade hídrica, podendo sofrer influências do próprio genótipo (HUNGRIA et al., 2014; HUNGRIA e MENDES, 2015; BABUJIA et al., 2016). Portanto, genótipos de soja tolerantes à seca também precisam ser capazes de manter uma FBN eficiente.

O objetivo deste trabalho foi analisar, com base em avaliações fisiológicas e bioquímicas, a resposta de genótipos de soja geneticamente modificados para tolerância à seca, seu parental convencional, e um genótipo comercial, em condições de campo sob fornecimento controlado de água.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Instalação do experimento e delineamento experimental

O experimento foi realizado a campo, durante a safra 2015/2016, na estação experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja (23°11'37" S, 51°11'03" W, altitude 630 m) situada em Londrina, Paraná, Brasil. De acordo com a "USDA Soil Taxonomy" o solo é classificado como "Typic Hapludox", contendo 71% de argila. Análises químicas para fins de fertilidade (0-20

cm de profundidade) indicaram pH (CaCl₂) = 4.9; carbono orgânico = 15.6 g dm⁻³; P (Mehlich I) = 24.2 mg dm⁻³; K = 0.74 cmol_c dm⁻³; Ca = 3.9 cmol_c dm⁻³, Mg = 1.8 cmol_c dm⁻³, H + Al = 3.5 cmol_c dm⁻³, Al = 0.03 cmol_c dm⁻³, CTC = 10.0 cmol_c dm⁻³, SB = 6.5 cmol_c dm⁻³, and V = 64.8%. A temperatura média histórica anual da região é de 21,1 °C, com a média das máximas de 29.8 °C no mês de fevereiro e a média das mínimas de 11.7 °C em julho. A média histórica de precipitação anual é de 1626 mm com 122 dias chuvosos ao ano, sendo o trimestre mais chuvoso entre dezembro e fevereiro e o trimestre menos chuvosos entre junho e agosto. De acordo com a classificação de Köpen, o clima da região é classificado como Cfa (subtropical úmido com verões quentes). A temperatura, a umidade relativa do ar e a precipitação da área experimental durante a condução do experimento foram monitoradas em uma estação agroclimática localizada na própria área experimental e estão apresentadas na Figura 4.1.

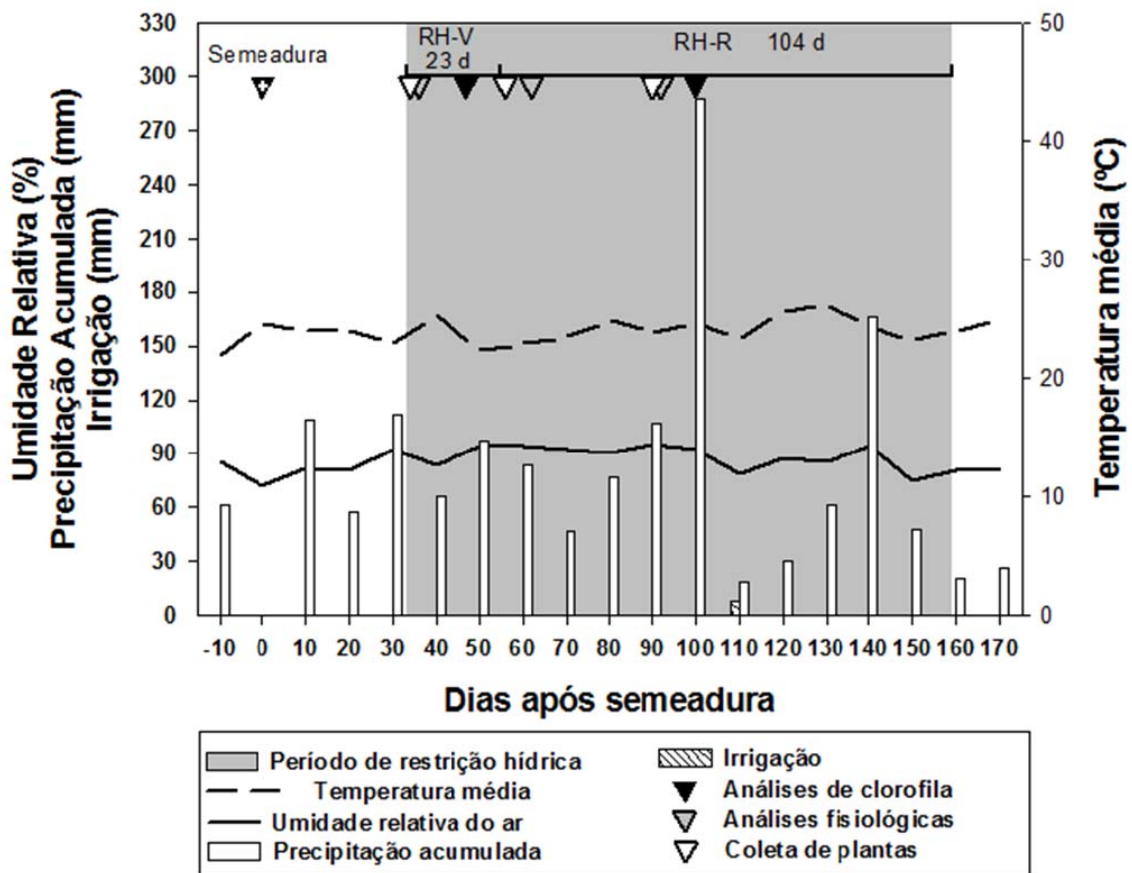


Figura 4.1 - Dados obtidos da estação agroclimática da área experimental, durante a safra 2015/16. Os dados estão apresentados por decêndio em relação à sementeira.

A semeadura foi realizada manualmente no dia 7 de outubro 2015, com espaçamento entre linhas de 0,5 m e densidade de 16 plantas por metro linear. As sementes foram previamente tratadas com fungicida e inseticida (carboxin 200 g + fipronil 250 g para cada 100 kg de sementes). A inoculação foi realizada no sulco simultaneamente à semeadura, com inoculante comercial composto por *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080, na proporção equivalente a 4.7×10^6 células por semente. O fertilizante químico aplicado foi o formulado N-P-K 0-20-20, na dose de 250 kg ha⁻¹, em sulco, antecedendo a semeadura da soja (TECNOLOGIAS, 2013).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições, em esquema de parcelas subdivididas. As parcelas foram constituídas por quatro condições hídricas: Restrição hídrica no período vegetativo – RH-V (33-55 dias após a semeadura - DAS); restrição hídrica no período reprodutivo – RH-R (55-159 DAS); não irrigado - NIR (somente fornecimento de água pela ocorrência de chuvas), e irrigado – IRR (chuvas e complementação com irrigação quando necessário). As subparcelas foram constituídas de quatro genótipos de soja: dois genótipos geneticamente modificados para tolerância à seca, AREB 1Ea2939 e 2Ia4 Gols; o genótipo BR 16 (parental) e o genótipo comercial BRS 1010IPRO (geneticamente modificado para resistência ao herbicida glifosato e lagartas desfolhadoras, mas não para tolerância à seca).

Aos 55 DAS, as plantas que foram submetidas à RH-V desde os 33 DAS voltaram a receber água da chuva, enquanto que as plantas sob RH-R passaram a ser submetidas ao período de RH, mantido até 159 DAS, correspondente a maturação fisiológica. Os tratamentos sob restrição hídrica (RH) foram conduzidos em subparcelas de 6 m x 1.5 m, enquanto que os tratamentos sem RH (IRR e NIR) foram conduzidos em parcelas de 6 m x 4 m, mantendo-se bordadura de 0,5 m em torno de cada subparcela.

4.4.2 Controle das condições hídricas

As parcelas com os tratamentos sob RH foram conduzidas sob abrigos (*rainout shelters*) programados para se moverem automaticamente sobre as plantas em caso de ocorrência de precipitação pluvial, encobrindo-as e evitando o umedecimento do solo, voltando a descobrir automaticamente ao cessar da

precipitação. Estas parcelas são delimitadas por paredes de concreto com 60 cm de profundidade e 10 cm de altura, a fim de evitar que recebam água da superfície adjacente.

Plantas sob RH-V foram submetidas ao controle da entrada de água no período entre 33 e 55 DAS, enquanto que plantas sob RH-R passaram a ter o controle da entrada de água a partir dos 55 DAS até a colheita (Figura 4.1). Os tratamentos sem restrição hídrica (IRR e NIRR) receberam toda chuva ocorrente no ciclo da cultura, sendo que as plantas sob IRR receberam água de irrigação (complementar à precipitação) quando necessário (Figura 4.1). A necessidade de irrigação foi monitorada com base em tensiômetros instalados nas parcelas, nas profundidades de 0,15 m e 0,30 m. A irrigação foi aplicada quando o potencial matricial do solo atingiu -0,02 MPa na profundidade de 0,30 m (FARIA e COSTA 1987).

4.4.3 Estádios fenológicos, trocas gasosas e teor de clorofila

O estágio de desenvolvimento fenológico das plantas foi avaliado na véspera das demais avaliações (FEHR e CAVINESS, 1977; TECNOLOGIAS, 2013). Os teores de clorofila foram aferidos aos 47, 56 e 100 DAS (Figura 4.1), com auxílio de um clorofilômetro SPAD-505 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan), em três plantas por subparcela e duas leituras por folíolo central, do terceiro trifólio desenvolvido (do ápice para a base). Os valores foram convertidos em teor de clorofila de acordo com Fritschi e Ray (2007).

As taxas fotossintéticas, condutância estomática e transpiração foram avaliadas aos 36, 62 e 92 DAS nos quatro tratamentos, o que correspondeu a um período de 3 dias sob RH-V, e 7 e 37 dias sob RH-R, respectivamente. Foi utilizado um medidor portátil de trocas gasosas modelo LCpro-SD (ADC BioScientific) com 90% de fonte de luz vermelha e 10% de luz azul, em uma área de 2 cm². As leituras foram realizadas em plantas de três blocos por tratamento, no período entre 9 e 11 h da manhã, sob luminosidade plena (PAR = 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração de CO₂ de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e referência de água de 18-20 mmol mol⁻¹.

4.4.4 Massa da parte aérea seca, nodulação e análises bioquímicas

Aos 34, 56 e 90 DAS (1 dia sob RH-V; 1 e 35 dias sob RH-R) foram coletadas a parte aérea de três plantas por subparcela. Três trifólios por subparcela foram imediatamente armazenados em N₂ líquido e posteriormente armazenados a -80 °C para posteriores análises bioquímicas. O restante do material foi levado à estufa de circulação de ar a 60 °C até alcançar massa constante.

Após secagem em estufa, as plantas foram pesadas para determinação da massa da parte aérea seca (MPAS) e posteriormente moídas para quantificação do teor de nitrogênio após digestão sulfúrica (100 mg de amostra para 1,5 mL de ácido sulfúrico PA e catalisadores). A concentração de nitrogênio foi determinada pelo método verde salicilato por leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 697 nm (SEARLE, 1984).

Para avaliação da nodulação, aos 56 DAS e 90 DAS foi coletada uma planta inteira (com sistema radicular) por subparcela, totalizando quatro plantas por tratamento. O sistema radicular foi separado da parte aérea, lavado e secado em estufa com circulação de ar a 60 °C. Após a secagem, os nódulos da coroa foram contados e pesados. Plantas sob RH-V foram coletadas apenas aos 56 DAS, ao término do período de RH-V. Plantas sob RH-R foram coletadas aos 90 DAS.

As análises de ureídeos foram realizadas utilizando-se 300 mg de folhas secas por amostra para preparo dos extratos, dos quais utilizaram-se 100 µL para cada reação, em duplicata (VOGELS e VAN der DRIFT, 1970; HUNGRIA, 1994).

As análises bioquímicas para avaliar a resposta dos genótipos às condições de disponibilidade hídrica foram feitas no material fresco armazenado a -80 °C. Foram realizadas análises de atividade das enzimas catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) e superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) e a quantificação da peroxidação de lipídios. Primeiramente, utilizou-se 1 g de folhas congeladas para preparação do extrato a ser utilizado na avaliação da atividade de CAT e SOD. Este material foi macerado em N₂ líquido e homogeneizado em tampão fosfato (pH 7,0) acrescido de EDTA sal dissódico, ditiotreitól e PVP, sendo armazenado a -20 °C (CAVALCANTI et al., 2004).

As reações para avaliar a atividade de CAT foram preparadas em um volume final de 2000 µL (250 mM de H₂O₂, 100 mM tampão fosfato, água

ultrapura), incubadas em banho-maria a 30 °C por três minutos e acrescidas de 12,5 µL de extrato enzimático. A determinação da atividade foi realizada em espectrofotômetro a 240 nm, com leituras realizadas a cada 10 segundos durante 90 segundos, em duplicata (HAVIR e MCHALE, 1987). A atividade enzimática foi calculada de acordo com Havir e McHale (1987), com o coeficiente de extinção molar de $36 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ m}^{-1}$ e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ consumido min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

A determinação da atividade da enzima SOD foi realizada de acordo com o protocolo pré-estabelecido por Del Longo et al. (1993). As reações foram preparadas em um volume final de 2000 µL, contendo 50 mM de tampão fosfato de sódio, 13 mM de metionina, 75 µM de nitroblue tetrazolium (NBT), 0,1 mM de EDTA sal dissódico, 2 µM de riboflavina e 30 µL de extrato enzimático bruto, preparadas em triplicatas. As reações ocorreram sob iluminação de uma lâmpada fluorescente (15 W), por 40 min e 25 °C, seguidos pela quantificação da fotorredução do NBT a azul de formazana em espectrofotômetro a 560 nm. Esta foi expressa em U mg^{-1} proteína. Cada unidade representa a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT. O “branco” da análise foi constituído por uma reação exatamente igual à descrita anteriormente, porém, mantida no escuro. A reação controle foi preparada sem o extrato enzimático bruto e mantida sob iluminação, nas mesmas condições descritas para as amostras.

Os teores de proteína do extrato foram previamente quantificados pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soroalbumina bovina como padrão. Estes valores foram posteriormente utilizados nos cálculos da atividade de CAT e SOD por unidade de proteínas.

Para a quantificação da peroxidação de lipídios, empregou-se 1 g de folhas frescas, maceradas em N_2 líquido e homogeneizadas em etanol 80%. A quantificação colorimétrica foi obtida a 532 e 600 nm para uma reação contendo ácido tricloroacético (TCA) 20% + PVP (solução A), e a 440, 532 e 600 nm para a reação contendo ácido tiobarbitúrico 0,65% (TBA) em TCA 20% (solução B), em triplicata. Os resultados foram apresentados em nmol de malondialdeído por g^{-1} de massa de folhas frescas (HODGES et al., 1999).

4.4.5 Teor de óleo e proteína nos grãos e produtividade

Os teores de óleo e proteína nos grãos foram quantificados por espectrofotometria de infravermelho próximo - NIR (Thermo Scientific, modelo Antaris II) e os espectros das amostras foram coletados de grãos intactos posicionados na esfera de integração do aparelho. As leituras foram realizadas com comprimento de onda na faixa espectral entre 1100 e 2500 nm. Cada espectro foi resultado de 32 “scans”, com resolução de 4 cm.

A massa seca de 100 grãos foi obtida com base em uma amostra de sementes provenientes da colheita da área útil de cada subparcela. Para isto, uma amostra de 100 grãos foi seca em estufa de circulação de ar a 40 °C até atingir massa constante.

A produtividade foi calculada utilizando-se a umidade desejada dos grãos a 13%, a partir do seguinte cálculo:

$$GY = \frac{(100 - HGM)}{(100 - DGM)} * HGW * \frac{10,000}{HPA}$$

Onde:

GY = Rendimento (kg ha⁻¹), HGM = umidade dos grãos colhidos (%), DGM = umidade desejada dos grãos (%), HGW = peso dos grãos colhidos (kg) e HPA = área colhida (m²).

4.4.6 Análise estatística

Com os resultados obtidos, estando de acordo com os pressupostos exigidos para as análises paramétricas, estes foram submetidos à ANOVA e suas médias comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$), com auxílio do programa estatístico Sisvar v. 5.3. Análises de correlação de Pearson foram realizadas entre todas as variáveis, por meio do programa estatístico Genes.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Estádios fenológicos, trocas gasosas e teor de clorofila

As avaliações dos estádios fenológicos indicaram que o genótipo AREB 1Ea2939 possui um ciclo fenológico mais longo que os demais. Já o genótipo AREB 1Ea2939 e BRS 1010IPRO tiveram seu ciclo reduzido em 4 e 5 dias, respectivamente, quando submetidos à RH-R (Tabela 4.1).

Os maiores teores de clorofila foram observados no genótipo AREB 1Ea2939 durante as avaliações 47 e 100 DAS, não havendo diferenças entre genótipos aos 56 DAS (Figura 4.2). A RH-R reduziu significativamente o teor de clorofila no genótipo BRS 1010IPRO, quando comparado aos demais, possivelmente devido à aceleração no ciclo das plantas (Figura 4.2, Tabela 4.1).

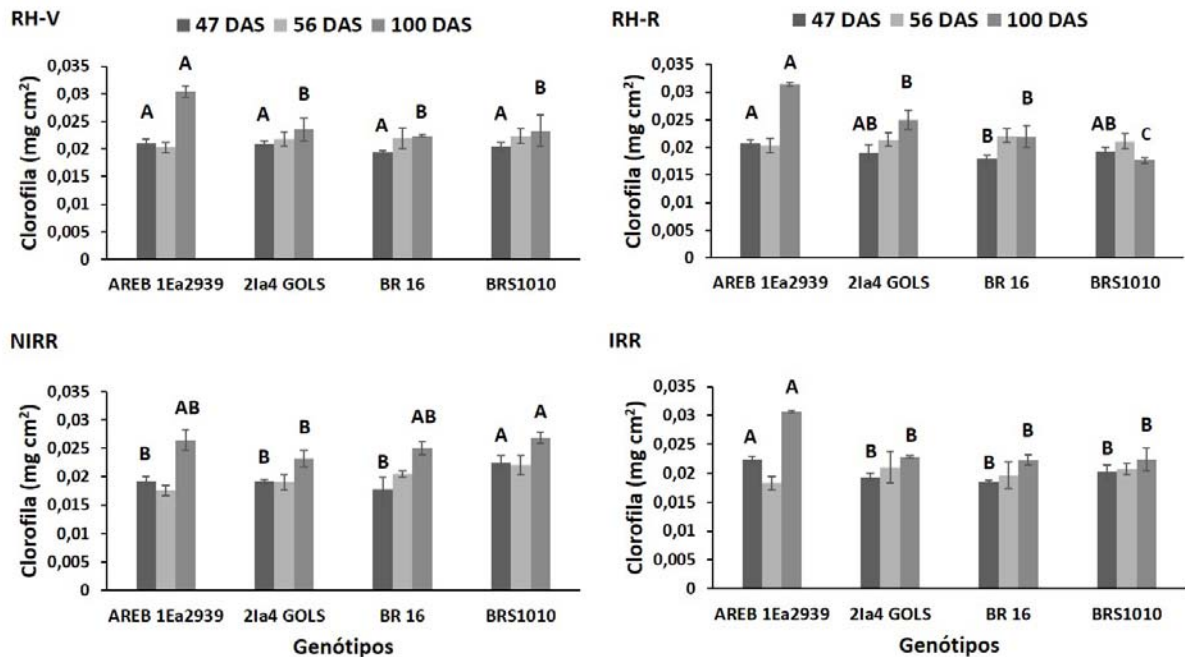


Figura 4.2 - Desdobramento da interação Genótipo x Condição hídrica para teor de clorofila em folhas de soja cultivada sob diferentes condições hídricas: restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR) aos 47, 56 e 100 dias após a semeadura. Letras distintas indicam diferenças entre os genótipos para a mesma condição hídrica e coleta. Coleta 1: *p* valor G <0,001; DH 0,1201; G x DH <0,001. Coleta 2: *p* valor G 0,0066, DH <0,001 e G x DH 0,5858. Coleta 3: *p* valor G <0,001, DH 0,1691 e G x DH <0,001.

A RH-V (62 DAS) não reduziu a taxa fotossintética, taxa transpiratória e condutância estomática quando comparada às demais condições

hídricas na mesma data de coleta (Tabela 4.2). A RH-R reduziu drasticamente as trocas gasosas das plantas em relação às demais condições hídricas, porém, não foram observadas diferenças entre os genótipos. Quanto à condutância estomática, houve redução nos valores conforme aumentou a idade da planta (Tabela 4.2).

Tabela 4.1 - Estágio de desenvolvimento fenológico dos genótipos de soja geneticamente modificados para tolerância à seca (AREB 1Ea2939 e 2Ia4 GoIS), do respectivo genótipo parental (BR 16) e do genótipo comercial BRS 1010IPRO, submetidos a diferentes condições de hídricas: restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR).

Condição Hídrica	Tratamento	DAS*											Semeadura-Colheita (Dias)
		36	47	56	62	71	82	89	100	105	119	131	
RH-V	AREB 1Ea2939	V6	V9	V11	V13	R2	R3	R3	R5.1	R5.2	R5.5	R5.5	157
	2Ia4 GoIS	V6	R2	R4	R5.1	R5.3	R5.4	R5.5	R5.5	R6	R8		118
	BR 16	V7	R2	R3	R4	R5.2	R5.4	R5.4	R5.5	R5.5	R8		118
	BRS 1010	V6	R2	R4	R5.1	R5.4	R5.4	R5.5	R6	R7	R8		119
RH-R	AREB 1Ea2939	V6	V9	V11	V13	R2	R3	R3	R5.1	R5.2	R5.5	R6	153
	2Ia4 GoIS	V6	R2	R3	R4	R5.1	R5.4	R5.4	R5.5	R6	R8		117
	BR 16	V6	R2	R3	R4	R5.1	R5.4	R5.4	R5.5	R6	R8		118
	BRS 1010	V6	R2	R4	R4	R5.3	R5.4	R5.5	R7	R8	R8		114
NIRR	AREB 1Ea2939	V6	V9	V11	V12	R2	R3	R3	R5.1	R5.2	R5.5	R5.5	158
	2Ia4 GoIS	V7	R2	R3	R4	R5.2	R5.4	R5.5	R5.5	R5.5	R8		118
	BR 16	V7	R2	R3	R4	R5.1	R5.4	R5.4	R5.5	R5.5	R8		120
	BRS 1010	V6	R2	R4	R5.1	R5.3	R5.4	R5.5	R5.5	R6	R8		119
IRR	AREB 1Ea2939	V5	V9	V11	V13	R2	R3	R3	R5.1	R5.2	R5.4	R5.5	158
	2Ia4 GoIS	V6	R2	R3	R4	R5.1	R5.3	R5.5	R5.5	R5.5	R8		118
	BR 16	V7	R2	R3	R4	R5.1	R5.4	R5.5	R5.5	R5.5	R8		120
	BRS 1010	R1	R3	R4	R5.1	R5.3	R5.4	R5.5	R5.5	R6	R8		119

* Dias após a semeadura. Os espaços em branco indicam que as plantas já haviam concluído o ciclo.

Tabela 4.2 - Efeitos isolados da disponibilidade hídrica e dos genótipos de soja sobre a taxa fotossintética, taxa transpiratória e condutância estomática aos 36, 62 e 92 dias após a semeadura (DAS).

Variável	Tratamento	Coleta (DAS)		
		36	62	92
Taxa Fotossintética ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	AREB 1Ea2939	27,57 ^b	24,67 ^b	21,42
	2Ia4 GoIS	30,72 ^a	28,23 ^a	23,68
	BR 16	27,76 ^b	23,53 ^b	21,62
	BRS1010	28,07 ^{ab}	26,07 ^{ab}	22,67
	RH-V	29,53 ^a	25,97	25,99 ^a
	RH-R	28,79 ^{ab}	24,18	13,26 ^b
	NIRR	28,97 ^{ab}	25,71	25,26 ^a
	IRR	26,83 ^b	26,64	24,88 ^a
<i>p</i> valor	Genótipo (G)	0,0175	0,0006	0,3153
	Disponibilidade Hídrica (DH)	0,0301	0,1765	0,0003
	G x DH	0,1521	0,3642	0,9902
Taxa Transpiratória ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	AREB 1Ea2939	5,93	3,37	3,99
	2Ia4 GoIS	6,18	3,35	4,14
	BR 16	6,05	3,40	3,89
	BRS1010	5,83	3,29	3,90
	RH-V	5,37 ^c	3,27	4,53 ^a
	RH-R	6,95 ^a	3,28	2,45 ^b
	NIRR	5,87 ^b	3,39	4,42 ^a
	IRR	5,80 ^{bc}	3,47	4,53 ^a
<i>p</i> valor	Genótipo (G)	0,0995	0,2127	0,3989
	Disponibilidade Hídrica (DH)	0,0001	0,1316	0,0052
	G x DH	0,7705	0,0505	0,8946
Condutância Estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	AREB 1Ea2939	6,96	4,48	1,29
	2Ia4 GoIS	6,71	4,77	1,01
	BR 16	7,33	4,17	0,94
	BRS1010	5,66	5,10	0,93
	RH-V	7,48 ^a	5,44	1,06 ^{ab}
	RH-R	7,75 ^a	4,31	0,19 ^b
	NIRR	7,47 ^a	4,15	1,40 ^a
	IRR	3,94 ^b	4,63	1,52 ^a
<i>p</i> valor	Genótipo (G)	0,0923	0,8297	0,1041
	Disponibilidade Hídrica (DH)	0,0100	0,5215	0,0150
	G x DH	0,2033	0,9998	0,1762

Condições hídricas: RH-V: restrição hídrica no período vegetativo (36 DAS); RH-R: restrição hídrica no período reprodutivo (92 DAS); NIRR: descoberto não irrigado; IRR: descoberto irrigado. Genótipos de soja: geneticamente modificados para tolerância à seca (AREB 1Ea2939 e 2Ia4 GoIS), parental (BR 16) e comercial (BRS 1010IPRO).

4.5.2 Massa da parte aérea seca, nodulação e análises bioquímicas

A restrição hídrica, tanto no período vegetativo quanto no período reprodutivo, não afetou a MPAS. Plantas sob RH-V não diferiram das plantas das demais condições hídricas aos 56 DAS. Aos 90 DAS, período em que foi induzida a RH-R, as plantas não diferiram daquelas sob IRR e NIRR. Quanto aos genótipos, a indução da RH, tanto no período vegetativo quanto reprodutivo, não influenciou a MPAS, tendo havido efeito apenas dos genótipos em RH-V e IRR (Figura 4.3).

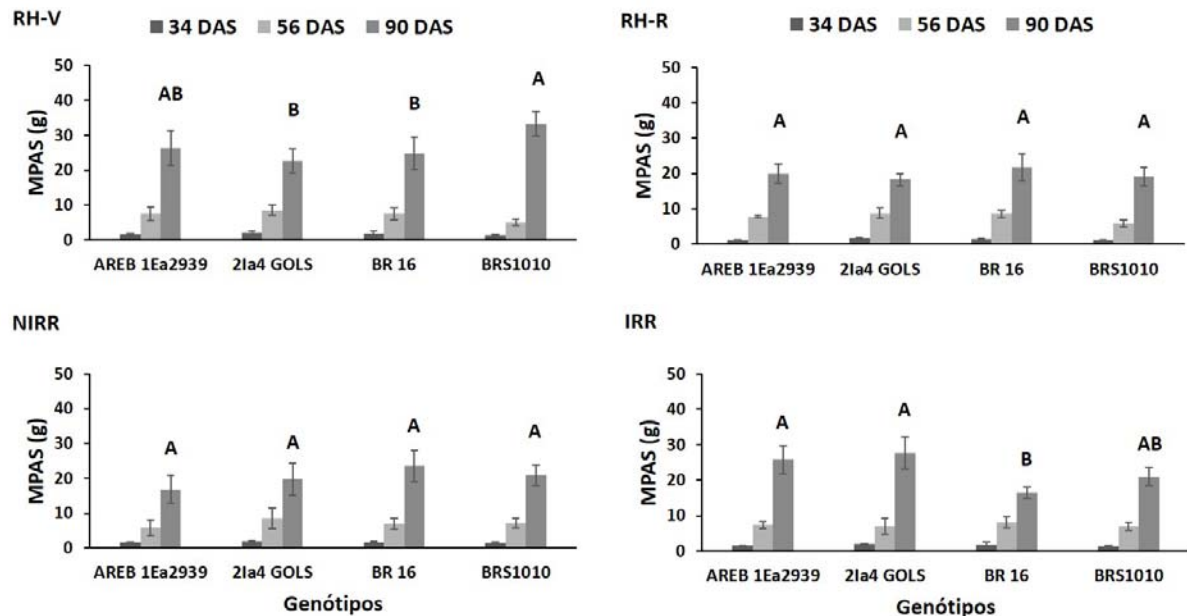


Figura 4.3 - Desdobramento da interação Genótipo x Condição hídrica para massa da parte aérea seca de plantas de soja cultivadas sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR) aos 34, 56 e 90 dias após a semeadura. Letras distintas indicam diferenças entre os genótipos para a mesma condição hídrica e coleta. Coleta 1: *p* valor G <0,001; DH 0,0121; G x DH 0,9851. Coleta 2: *p* valor G 0,0060, DH 0,5809 e G x DH 0,2315. Coleta 3: *p* valor G 0,4958, DH <0,001 e G x DH <0,001.

Aos 34 e 56 DAS não foram observados efeitos isolados das condições hídricas sobre os teores foliares de N, enquanto que aos 90 DAS os menores teores de nitrogênio foram observados nas plantas dos tratamentos RH-V e RH-R, não diferindo do IRR (não apresentados). Quanto aos genótipos, efeitos isolados foram observados aos 90 DAS, com maiores teores de nitrogênio em AREB

1Ea2939, sem diferir de 2Ia4 GolS (não apresentados). Aos 56 DAS, no desdobramento da interação genótipo x condição hídrica, na condição RH-R, os maiores teores foram observados em 2Ia4 GolS e BRS 1010IPRO, e os menores em AREB 1Ea2939 e BR16. Sob a condição NIRR, apenas AREB 1Ea2939 e 2Ia4 GolS diferiram entre si, com menor e maior teor, respectivamente (Figura 4.4).

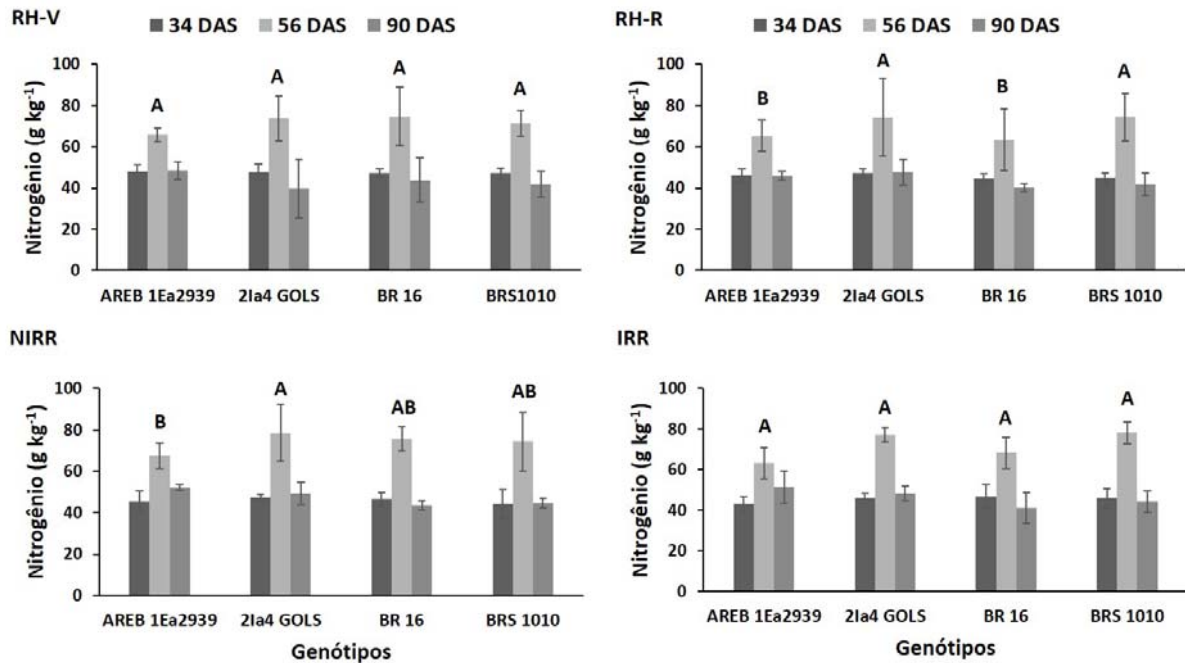


Figura 4.4. Desdobramento da interação Genótipo x Condição hídrica para concentração de nitrogênio foliar de plantas de soja cultivadas sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR); Em três períodos de coleta: 34, 56 e 90 dias após a semeadura. As letras indicam diferenças entre os genótipos para a mesma condição hídrica e coleta. Coleta 1: *p* valor G 0,4220; DH 0,3699; G x DH 0,7218. Coleta 2: *p* valor G <0,001, DH 0,7618 e G x DH 0,0497. Coleta 3: *p* valor G <0,001, DH 0,0176 e G x DH 0,2045.

A restrição hídrica reduziu a nodulação, sendo observado efeito isolado da condição hídrica aos 56 dias e interação entre Genótipo x Condição hídrica aos 90 dias (Figura 4.5). Não houve diferença entre genótipos quanto ao número de nódulos aos 56 DAS, porém, aos 90 DAS o destaque foi para AREB 1Ea2939, com maior NN e os genótipos convencionais BR 16 e BRS 1010IPRO, com menor nodulação (Figura 4.5A). A massa de nódulos secos aos 90 DAS apresentou as maiores médias em AREB 1Ea2939, sobretudo no tratamento irrigado (Figura 4.5B).

Os teores de ureídeos nas folhas, independente da condição hídrica, foram maiores aos 56 DAS, que corresponde ao final do período vegetativo e início do período reprodutivo (Figura 4.6). Entretanto, a interação Genótipo x Condição hídrica só foi observada aos 34 e 90 dias. Nas duas épocas o genótipo BRS 1010IPRO apresentou menor teor de ureídeos; aos 90 DAS AREB apresentou maior concentração de ureídeos, tanto sob restrição hídrica, quanto sem restrição (Figura 4.6).

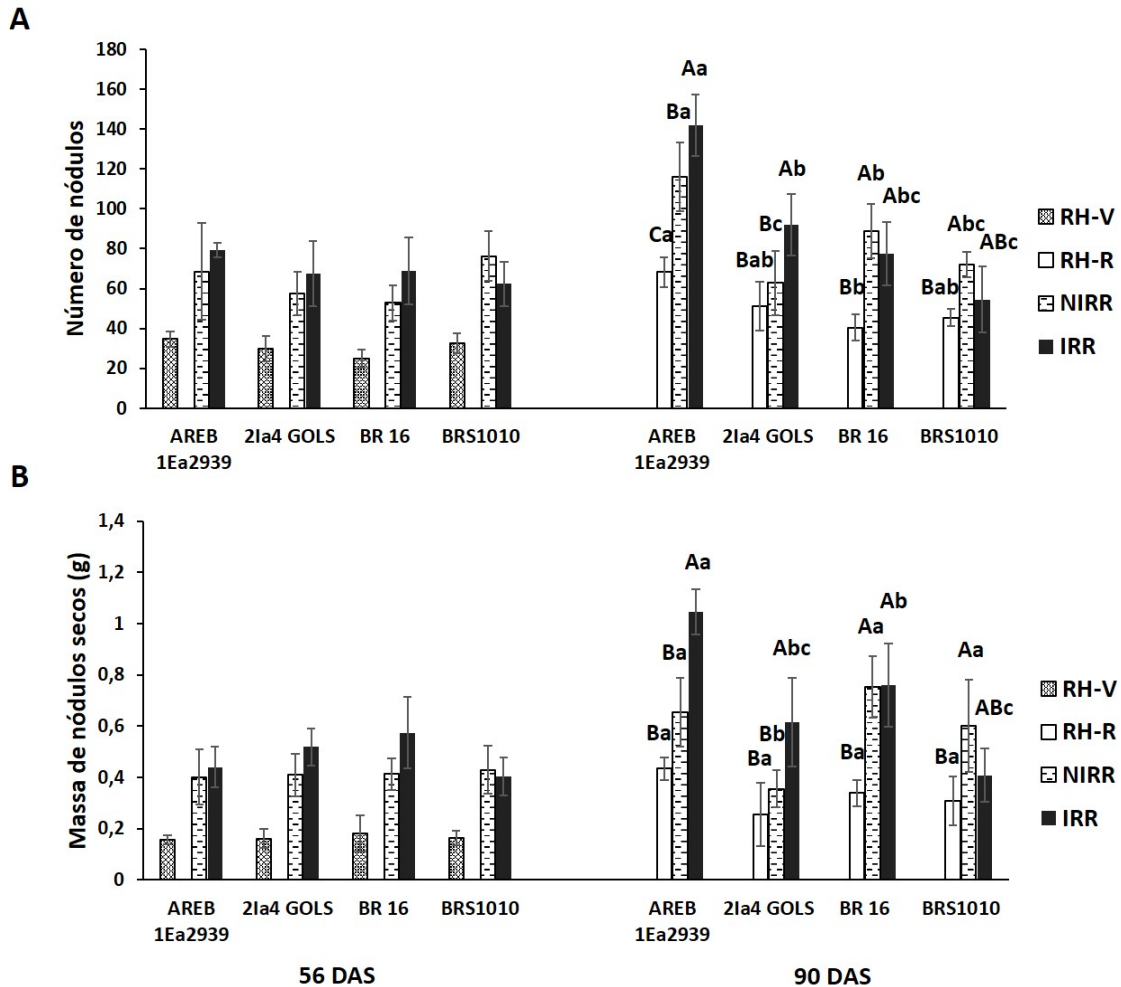


Figura 4.5 - Desdobramento da interação Genótipo x Condição hídrica para (A) número de nódulos e (B) massa de nódulos secos obtidos de plantas de soja cultivadas sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR), 56 e 90 dias após a semeadura. Letras maiúsculas comparam condições hídricas para o mesmo genótipo. Letras minúsculas comparam genótipos para a mesma condição hídrica. *p* valor (número de nódulos) 56 DAS (A): G 0,0849, DH <0,001, G x DH 0,2782; 90 DAS: G <0,001, DH 0,0016, G x DH <0,001. *p* valor (massa de nódulos) 56 DAS: G 0,1712, DH <0,001, G x DH 0,1993; 90 DAS: G <0,001, DH 0,0011, G x DH <0,001.

Neste experimento a indução de RH, tanto no período vegetativo, quanto no período reprodutivo, não afetou a atividade das enzimas CAT e SOD (Tabela 4.3), já

que as diferenças observadas aos 34 e 56 DAS não foram específicas para RH, não sendo observadas diferenças significativas na atividade enzimática entre os tratamentos sob RH e com irrigação (Tabela 4.3). Além disso, maiores atividades da enzima CAT foram observadas aos 56 DAS, transição entre o final do período vegetativo e início do período reprodutivo (Tabela 4.3).

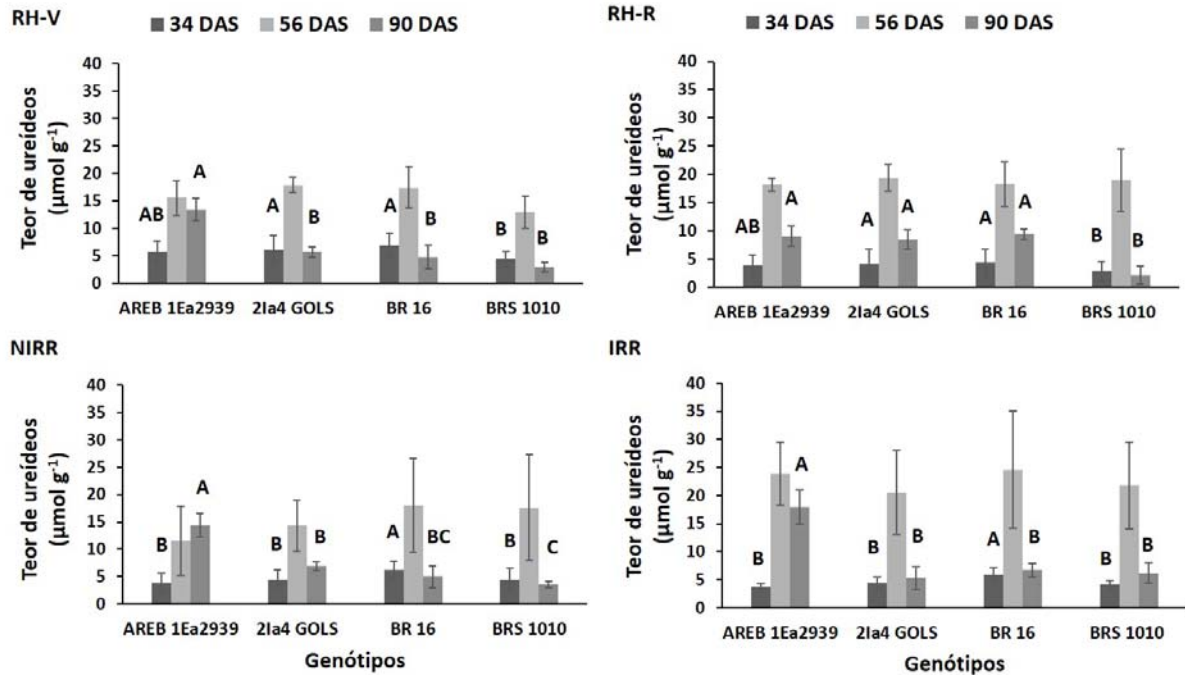


Figura 4.6 - Desdobramento da interação Genótipo x Condição hídrica para teor de ureídeos foliar de plantas de soja cultivadas sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR), aos 34, 56 e 90 dias após a semeadura. Letras distintas indicam diferenças entre os genótipos para a mesma condição hídrica e coleta. Coleta 1: *p* valor G <0,001; DH 0,2546; G x DH 0,0124. Coleta 2: *p* valor G 0,5008, DH 0,0598 e G x DH 0,4914. Coleta 3: *p* valor G <0,001, DH 0,0613 e G x DH <0,001.

Quanto aos genótipos, diferenças na atividade de SOD foram observadas aos 90 DAS. Neste período, houve a maior atividade nos genótipos 2Ia4 Gols e BR 16 (Tabela 4.3). Em contrapartida, neste mesmo período, 2Ia4 Gols e BR 16 apresentaram menor atividade de CAT (Tabela 4.3). Aos 34 DAS o genótipo BRS 1010IPRO foi o que apresentou maior atividade CAT (Tabela 4.3).

A peroxidação de lipídios se mostrou sensível à RH. A menor taxa de peroxidação foi observada aos 56 DAS. Neste período, os maiores valores foram observados para os genótipos BR 16 e AREB (Figura 4.7).

Aos 90 DAS, a menor peroxidação continuou sendo observada em plantas que passaram por RH-V, seguidas por plantas sob RH-R. Dentre os genótipos sob RH-R, GoIS apresentou a menor taxa de peroxidação de lipídios. Já nos tratamentos sem restrição hídrica (NIRR e IRR), GoIS apresentou maiores taxas de peroxidação (Figura 4.7).

Tabela 4.3 - Atividade da enzima CAT e SOD em folhas frescas de plantas de soja cultivadas sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR), 34, 56 e 90 dias após a semeadura. Coleta 1: *p* valor G 0,0139; DH 0,0364; G x DH 0,2121. Coleta 2: *p* valor G 0,1061, DH 0,0229 e G x DH 0,7367. Coleta 3: *p* valor G 0,0125, DH 0,3153 e G x DH 0,6441.

Atividade Enzimática	Tratamento	Coleta (DAS)		
		34	56	90
Catalase ($\mu\text{mol min}^{-1}$ mg de proteína)	AREB 1Ea2939	0,212 ^b	1,291	1,402 ^a
	2la4 GoIS	0,385 ^{ab}	1,792	0,785 ^b
	BR 16	0,399 ^{ab}	1,589	0,844 ^b
	BRS 1010	0,436 ^a	1,421	1,188 ^{ab}
	RH-V	0,379 ^{ab}	1,837 ^a	0,926
	RH-R	0,571 ^a	1,853 ^a	0,773
	NIRR	0,232 ^b	1,095 ^b	1,250
	IRR	0,250 ^{ab}	1,308 ^{ab}	1,269
<i>p</i> valor	Genótipo (G)	0,0139	0,1061	0,0125
	Disponibilidade Hídrica (DH)	0,0364	0,0229	0,3153
	G x DH	0,2121	0,7367	0,6441
Superóxido Dismutase (U mg proteína)	AREB 1Ea2939	0,786	0,832	1,064 ^b
	2la4 GoIS	0,844	0,962	1,356 ^a
	BR 16	0,803	0,889	1,343 ^a
	BRS 1010	0,912	0,936	1,134 ^b
	RH-V	0,900 ^{ab}	1,020	1,300
	RH-R	1,146 ^a	0,863	1,249
	NIRR	0,751 ^b	0,866	1,323
	IRR	0,548 ^b	0,869	1,025
<i>p</i> valor	Genótipo (G)	0,4015	0,2857	0,0004
	Disponibilidade Hídrica (DH)	0,0042	0,5098	0,3274
	G x DH	0,0757	0,0705	0,9287

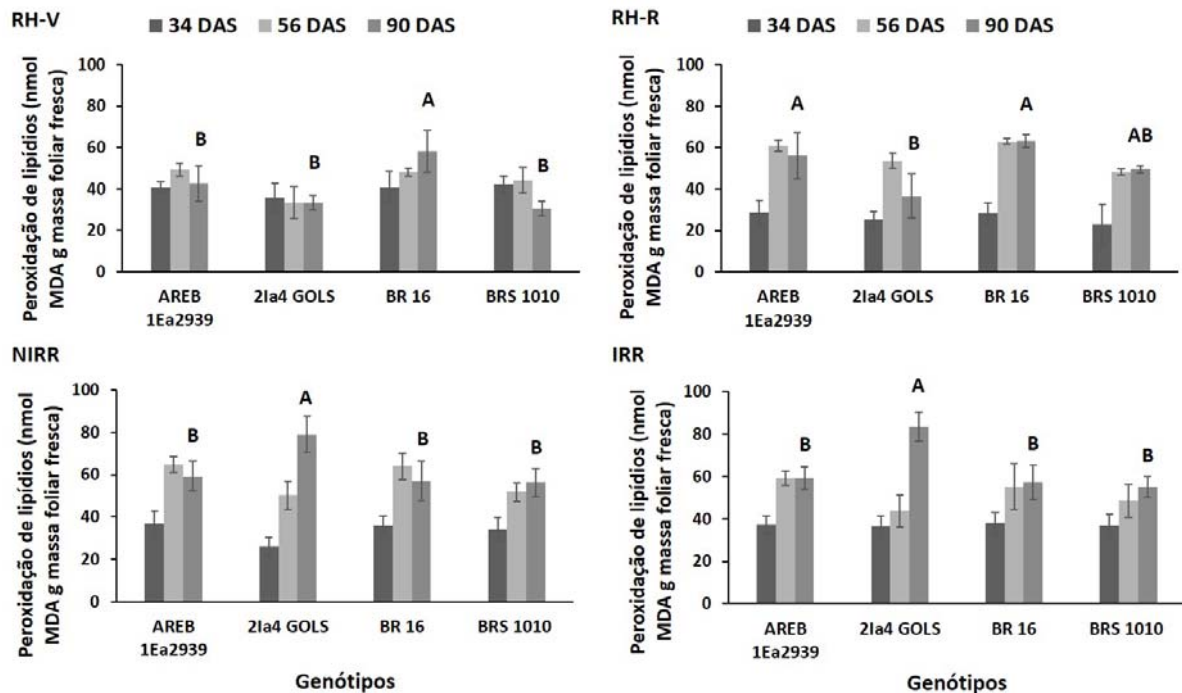


Figura 4.7 - Desdobramento da interação Genótipo x Condição Hídrica para peroxidação de lipídios em folhas de plantas de soja cultivadas sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR), 34, 56 e 90 dias após a semeadura. Letras distintas indicam diferenças entre os genótipos para a mesma condição hídrica. Coleta 1: *p* valor G 0,0033; DH <0,001; G x DH 0,1865. Coleta 2: *p* valor G <0,001, DH<0,001 e G x DH 0,1668. Coleta 3: *p* valor G 0,0010, DH <0,001 e G x DH <0,001.

4.5.3 Teor de óleo e proteína de sementes e rendimento

Os maiores teores de óleo foram predominantemente observados nos genótipos BRS 1010IPRO e BR 16, com valores significativamente superiores aos encontrados em AREB 1Ea1939, exceto na RH-V, em que não houve variação (Figura 4.8A). Por sua vez, o teor de proteínas apresentou comportamento inverso, com maior teor no genótipo AREB 1Ea1939 e menor me BRS 1010IPRO (Figura 4.8B). A condição hídrica pouco influenciou no teor de óleo, em que a RH-R resultou em menores valores no genótipo 2Ia4 GolS e BRS 1010IPRO. Já o teor de proteínas aumentou nos genótipos BR16 e BRS 1010IPRO expostos à RH-R.

O RH-R afetou negativamente a massa de 100 sementes (M100S) e o rendimento de grãos (Figuras 4.8A, 4.8B), exceto a M100S no genótipo AREB 1Ea1939. Os maiores rendimentos sob RH-R foram obtido para o genótipo 2Ia4 GolS, que por sua vez não diferiu do padrão comercial BRS 1010IPRO (Figura

4.9B). Os menores rendimentos foram observados para AREB 1Ea1939, independente da condição hídrica (Figura 4.9B).

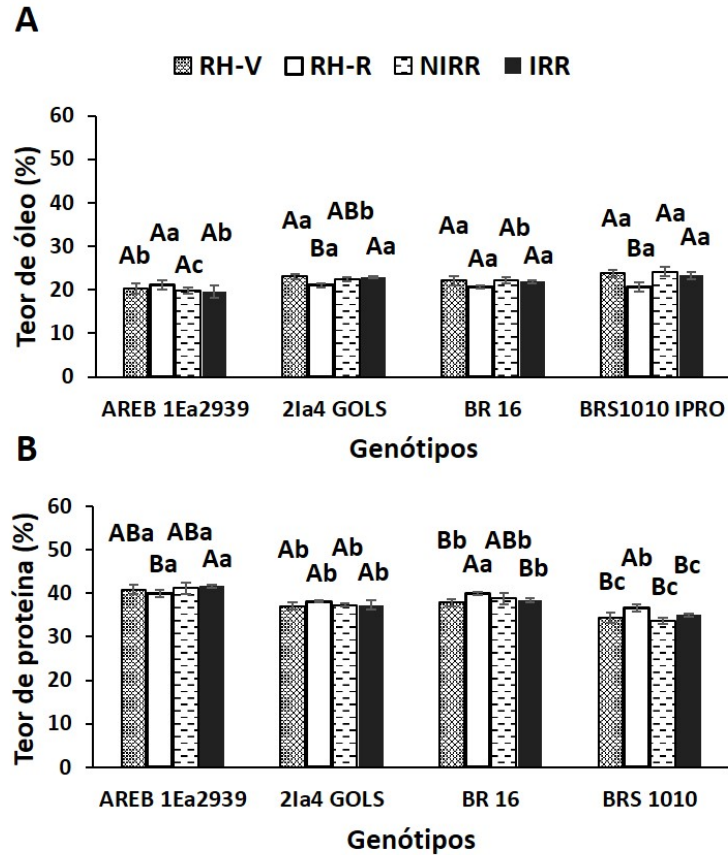


Figura 4.8 - Desdobramento da interação Genótipo x Condição Hídrica para (A) teor de óleo e (B) teor de proteína em sementes de soja cultivada sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR). Letras maiúsculas comparam condições hídricas para o mesmo genótipo. Letras minúsculas comparam genótipos para a mesma condição hídrica. *p* valor para teor de óleo: G <0,001, DH 0,0040, G x DH G <0,001; *p* valor para teor de proteínas: G <0,001, DH 0,0197, G x DH <0,001.

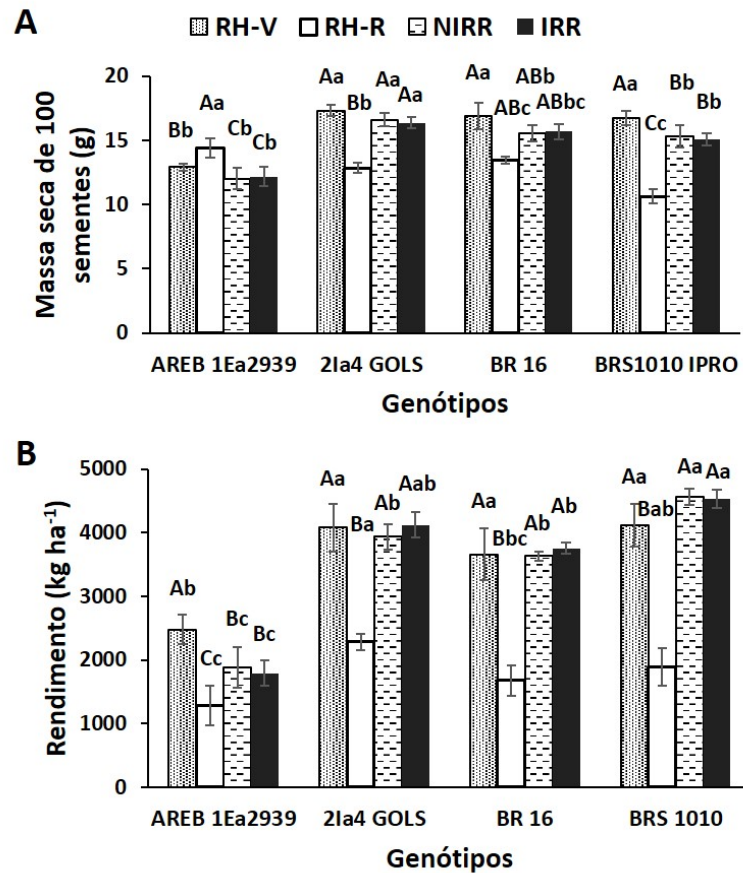


Figura 4.9 - Desdobramento da interação Genótipo x Condição hídrica para (A) massa de 100 sementes e (B) rendimento de grãos em soja cultivada sob restrição hídrica no período vegetativo (RH-V), restrição hídrica no período reprodutivo (RH-R), descoberto não irrigado (NIRR) e descoberto irrigado (IRR). Letras maiúsculas comparam condições hídricas para o mesmo genótipo. Letras minúsculas comparam genótipos para a mesma condição hídrica. *p* valor para massa de 100 sementes: G <0,001, DH G <0,001, G x DH G <0,001. *p* valor para rendimento: G <0,001, DH <0,001, G x DH <0,001.

4.5.4 Análises de correlação de Pearson

Houve várias correlações significativas a partir da análise de correlação simples de Pearson. Destacaram-se a correlação de 81% entre condutância estomática e transpiração, 94% entre fotossíntese e transpiração, 79% entre fotossíntese e condutância estomática, -58% entre teor de clorofila e transpiração, 66% clorofila e CAT, 71% entre taxa transpiratória e atividade da enzima SOD e -56% entre CAT e SOD, transpiração e peroxidação de lipídios -84%, condutância estomática e peroxidação de lipídios -74%, fotossíntese e peroxidação de lipídios -58%, peroxidação de lipídios e assimilação de nitrogênio -51%,

peroxidação de lipídios e teor de óleo -57%, e peroxidação de lipídios e rendimento - 59% (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Análise de correlação de Pearson entre parâmetros fisiológicos, bioquímicos e de rendimento referente a safra de soja 2015/2016, a campo. CAT = atividade da enzima catalase. SOD = atividade da enzima superóxido dismutase.

Parâmetros	Dados de correlação	Probabilidade (%)
Condutância estomática x Transpiração	0,8114	0,016
Fotossíntese x Transpiração	0,9444	0,000
Fotossíntese x Condutância estomática	0,7878	0,032
Transpiração x Clorofila	-0,5857	1,649
Clorofila x CAT	0,6570	0,562
Transpiração x SOD	0,7141	0,1939
CAT x SOD	-0,5646	2,1785
Transpiração x Peroxidação de lipídios	-0,8453	0,0048
Condutância estomática x Peroxidação de lipídios	-0,7473	0,0932
Fotossíntese x Peroxidação de lipídios	-0,5811	1,7553
Peroxidação de lipídios x N₂	-0,5147	3,9624
Peroxidação de lipídios x Óleo	-0,5697	2,0416
Peroxidação de lipídios x Rendimento	-0,5860	1,6433

4.6 DISCUSSÃO

O grande volume de chuvas durante a safra 2015/2016 e a alta umidade relativa do ar não permitiram a imposição de estresse hídrico severo, principalmente durante a fase vegetativa. Mesmo com os abrigos funcionando em perfeito estado, a alta umidade pode ter reduzido os sintomas de restrição hídrica para os diferentes genótipos sob as diferentes condições de disponibilidade hídrica. Quando o estresse foi imposto na fase vegetativa e suprimido posteriormente, as plantas tiveram mais tempo para recuperação e, portanto, os efeitos tiveram pouca persistência nas fases

posteriores e ao final do ensaio, conforme indicaram os resultados de produtividade. Parâmetros mais sensíveis à disponibilidade hídrica, como é o caso dos parâmetros fisiológicos e de nodulação, responderam à restrição hídrica, enquanto que os parâmetros menos sensíveis não apresentaram respostas significativas. Além disso, houve diferença entre os ciclos fisiológicos dos diferentes genótipos, o que resultou de respostas diferenciadas ao estresse hídrico imposto. AREB, por exemplo, apresentou ciclo mais longo em relação aos demais genótipos, enquanto que BRS 1010IPRO teve o ciclo acelerado devido à redução da disponibilidade hídrica.

As correlações obtidas neste trabalho para taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, clorofila, enzima CAT e enzima SOD são possíveis devido à relação entre os processos fisiológicos. A clorofila, indispensável para atividade fotossintética, é essencial para produção de energia pela planta. A expressão das proteínas receptoras de luz presentes nas clorofilas a/b e responsáveis pela atividade fotossintética (do inglês light-harvesting chlorophyll a/b-binding [LHCB] proteins), está diretamente relacionada ao estresse oxidativo e à concentração de ABA (STANELONI et al., 2008; XU et al., 2012; FUGANTI-PAGLIARINI et al., 2017).

A expressão das proteínas LHCB como receptoras do ABA tem mostrado grande importância nas respostas à seca (XU et al., 2012; FUGANTI-PAGLIARINI et al., 2017). Plantas com deficiência em clorofila terão menores concentrações destas proteínas e, conseqüentemente, menor sensibilidade a estresses abióticos (Xu et al., 2012).

Uma das principais respostas ao estresse hídrico é o fechamento estomático. Este, por sua vez, gera respostas diretas quanto à redução na condutância estomática, taxa de transpiração e taxa fotossintética (AKITHA DEVI e GUIRIDHAR, 2015; DAS et al., 2016). A redução na assimilação de carbono pela planta, resultado da baixa condutância estomática, reduz drasticamente a produção de energia e assim, restringe o seu desenvolvimento (AKITHA DEVI e GUIRIDHAR, 2015; DAS et al., 2016). Apesar de a biomassa de plantas não ter sido influenciada pela condição hídrica, o atributo mais sensível foi a nodulação, a qual foi drasticamente reduzida, especialmente quando as plantas foram expostas à restrição hídrica tanto na fase vegetativa, quanto na reprodutiva. Entretanto, ao final do ciclo da cultura, as plantas foram negativamente influenciadas quanto à produtividade apenas quando foram submetidas à restrição hídrica na fase reprodutiva. Isso indica que embora a restrição hídrica na fase vegetativa seja prejudicial à nodulação, pode não resultar

em diminuição de produtividade se as plantas tiverem tempo de se recuperar do estresse.

Uma das principais condições para que ocorra o fechamento estomático é o acúmulo de ABA nas células-guarda. As respostas produzidas pelo ABA nas células-guarda decorrem do aumento da concentração de Ca^{2+} no interior da célula induzido por este hormônio (DEMIDCHIK, 2015). O influxo de Ca^{2+} é fortemente estimulado pela concentração de H_2O_2 (DEMIDCHIK, 2015). A restrição hídrica, por sua vez, gera estresse oxidativo nas células a partir do acúmulo de substâncias tóxicas como, por exemplo, O_2^- (precursor de H_2O_2 e substrato da enzima SOD) e H_2O_2 (substrato da enzima CAT). Assim, altas concentrações de O_2^- e, conseqüentemente, de H_2O_2 no interior da célula estimulam o influxo de Ca^{2+} (MAK et al. 2014; DEMIDCHIK, 2015; GILROY et al., 2016; DAS et al., 2016). O acúmulo de EROs nas células desencadeia a síntese de ABA e em seguida o fechamento estomático (TRIPATHI et al., 2016). Assim, quanto maior o teor de clorofila na célula, maior tende a ser a concentração das proteínas LHC, mais eficiente será a detecção de ABA e melhor será o controle da restrição hídrica (XU et al., 2012). Por outro lado, altas concentrações de Ca^{2+} no interior da célula ativam cascatas regulatórias por meio de proteínas de ligação ao Ca^{2+} reduzindo a formação de O_2^- e H_2O_2 , reduzindo a atividade de CAT e SOD (DEMIDCHIK, 2015; Gilroy et al., 2016).

A produção de EROs como O_2^- e H_2O_2 em condições estressantes para a planta e ausência ou redução na atividade de mecanismos de proteção resultam na peroxidação de lipídeos (MADANI et al., 2010). Dados da análise de correlação negativa entre SOD e peroxidação de lipídios aos 56 (DAS) corroboram essa afirmação, ou seja, quanto maior a atividade enzimática, menores são os danos oxidativos às células.

Análise de correlação entre transpiração e peroxidação de lipídios (-84%) aos 34 DAS, e aos 56 DAS a condutância estomática e peroxidação de lipídios (-74%), fotossíntese e peroxidação de lipídios (-58%), peroxidação de lipídios e assimilação de nitrogênio (-51%), peroxidação de lipídios e teor de óleo (-57%), e peroxidação de lipídios e rendimento (-59%) mostram a influência do estresse oxidativo no desenvolvimento da planta e apontam maior influência dos danos oxidativos sobre o rendimento quando a restrição hídrica ocorre no final do período vegetativo e início do período reprodutivo (56 DAS). Assim, avaliações de atributos relativos ao estresse em plantas poderiam ser usados como preditores de produtividade de soja

que passou por estresse hídrico na fase vegetativa ou início da reprodutiva, mas para isso um conjunto robusto de dados em várias condições edafoclimáticas e utilizando vários genótipos de soja precisa ser obtido para permitir estudos preditivos com base em modelagem, além de sua posterior validação.

Em relação à nodulação, AREB e GoIS apresentaram o melhor desempenho quanto à MNS aos 90 DAS, o que resultou em maior assimilação de N pelas plantas. O genótipo comercial BRS 1010IPRO foi o que teve maior prejuízo à nodulação pela restrição hídrica. Além disto, AREB e GoIS apresentaram os maiores teores de ureídeos nas folhas. Apesar de maiores teores de ureídeos nas folhas serem interpretados como consequência negativa da seca sobre a FBN (SINCLAIR et al., 2007), trabalhos mais recentes indicam que a FBN mais eficiente resulta em maiores teores de ureídeos nas plantas tanto sob restrição hídrica, quanto em pleno fornecimento de água (CARTER e TEGEDER, 2016), e que o acúmulo relativo de ureídeos da condição normal para a condição de seca é maior nos genótipos mais sensíveis à seca (CEREZINI et al., 2017). Tanto a nodulação quanto a eficiência na FBN são diretamente ligadas a fatores genéticos e metabólicos tanto da planta quanto do microssimbionte, sendo, portanto, dependentes não somente da restrição hídrica, mas também da resposta vegetal e da bactéria a esta condição (KUNERT et al., 2016).

4.7 CONCLUSÃO

A restrição hídrica afetou negativamente a nodulação e o rendimento de todos os genótipos. Os genótipos AREB e GoIS apresentaram alguns atributos considerados positivos para tolerância à seca. AREB apresentou respostas favoráveis à restrição hídrica quanto à nodulação, porém a transgenia aumentou o ciclo fisiológico e diminuiu o potencial produtivo da planta. GoIS apresentou características fisiológicas e bioquímicas favoráveis de tolerância à seca além de potencial produtivo similar ou maior ao padrão comercial e ao parental não transgênico para tolerância à seca. O genótipo comercial não transgênico BRS 1010IPRO teve a nodulação mais intensamente prejudicada pela seca e apresentou redução do ciclo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tolerância à seca é um dos grandes desafios para o futuro dos sistemas de produção, que precisam encontrar soluções para lidar com a realidade imposta e agravada pelas mudanças climáticas globais. No caso particular da soja, a busca pela tolerância à seca passa pelo aumento da eficiência da FBN nessa condição, o que envolve características relativas tanto à planta quanto ao simbionte, conforme ficou demonstrado nesse trabalho. Características intrínsecas dos genótipos de soja, como capacidade de manter as trocas gasosas e a taxa fotossintética, como a inserção de genes de tolerância à seca se apresentam como ferramentas para aumento da eficiência da FBN sob restrição hídrica.

A inserção do gene AREB em genótipos comerciais promissores resultou em aumento de características da planta relacionados a mecanismos de tolerância à seca e aumento da eficiência da FBN, provenientes de maiores taxas fotossintéticas sob restrição hídrica, o que permitiu maior estabilidade produtiva das plantas submetidas à seca. Além de atributos relativos à planta, a estirpe de bactéria empregada na inoculação também resultou em resposta diferenciada da planta quanto exposta à seca. A inoculação com *B. diazoefficiens* estirpe SEMIA 5080 estimulou a taxa fotossintética e resultou em maior produção de grãos por planta sob condições de seca.

Em geral, a restrição hídrica afeta negativamente a nodulação e rendimento, tanto nos genótipos convencionais, como nos geneticamente modificados para tolerância à seca. Os genótipos geneticamente modificados com os genes AREB e GoIS apresentaram características consideradas positivas quanto a tolerância à seca. Entretanto, a transgenia com AREB aumentou o ciclo fisiológico das plantas, o que não é interessante em termos de sistema de produção. Assim, o aprimoramento dos genótipos que apresentaram características fisiológicas de tolerância à seca, aliado ao uso de estirpes de *Bradyrhizobium* mais eficientes em manter a FBN sob seca podem contribuir, em curto prazo, para a maior estabilidade produtiva do sistema de produção de soja. O transgene GoIS apresentou características fisiológicas e bioquímicas favoráveis de tolerância à seca, além de potencial produtivo e ciclo similares ao padrão comercial e ao parental não transgênico para tolerância à seca, podendo ser empregado como fonte de tolerância à seca em programas de melhoramento genético da soja.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, D. *et al.* Genetic diversity of soybean-nodulating rhizobia in Nepal in relation to climate and soil properties. **Plant and Soil**, v. 357, p. 131-145, 2012.
- AKITHA DEVI, M.K.; GIRIDHAR, P. Variations in physiological response, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities, proline and isoflavones content in soybean varieties subjected to drought stress. **The Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences**, v. 85, n. 1, p. 35-44, 2015.
- ALMEIDA, L.A.; KIIHL, R.A.S.; MIRANDA, M.A.C.; CAMPELO, G.J.A. Melhoramento da soja para regiões de baixas latitudes. In: Embrapa Semi-Árido; Embrapa Recursos Genéticos/Biotecnologia. (Org.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste brasileiro**. 1 ed. Petrolina-PE; Brasília-DF: Embrapa, p. -, v. 1, 1999.
- ARRESE-IGOR, C. *et al.* Physiological responses of legume nodules to drought. **Plant Stress**, v. 5, p. 24–31, 2011.
- BABUJIA, L.C. *et al.* Impact of long-term cropping of glyphosate-resistant transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) on soil microbiome. **Transgenic Research**, v. 25, 2016.
- BARBOSA, E.G.G. *et al.* Overexpression of the ABA-dependent AREB1 transcription factor from *Arabidopsis thaliana* improves soybean tolerance to water deficit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, p. 719-730, 2013.
- BHATTACHARJEE, R.B.; SINGH A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 80, p. 199-209, 2008.
- BOLLA, K.N. Soybean consumption and health benefits. **International Journal of Scientific and Technology Research**, v. 4, ed. 7, 2015.
- 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.
- CARNEIRO, G.E.S. *et al.* Cultivares de soja: Macrorregiões 1, 2 e 3, Centro-sul do Brasil. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa soja**, Ed. 1, 2014, 32 p.
- CARTER, A.M.; TEGEDER, M. Increasing nitrogen fixation and seed development in soybean requires complex adjustments of nodule nitrogen metabolism and partitioning processes. **Current Biology**, v. 26, 2016.
- CAVALCANTI, F.R. *et al.* 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.

CAZENAVE, A.B. *et al.* N₂ fixation of pea hypernodulating mutants is more tolerant to root pruning than that of wild type. **Plant and Soil**, v. 378, p. 397-412, 2014.

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 Science**, v. 5, p. 4011-4017, 2014.

CEREZINI, P. *et al.* Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. **Field Crops Research**, v. 196, p. 160-167, 2016.

CHEN, M.X; LUNG, S.C.; DU, Z.Y.; CHYE, M.L. Engineering plants to tolerate abiotic stresses. **Biocatalisys and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 81-87, 2014.

CHRISTOPHE, S. *et al.* Plant N fluxes and modulation by nitrogen, heat and water stresses: a review based on comparison of legumes and non-legume plants. In: SHANKER, A.; VENKATESWARLU, B. (Eds). **Abiotic stress in plants - Mechanisms and adaptations**. Editora: Croácia, 2011. p. 79-118.

COBA DE LA PEÑA, T.; PUEYO, J.J. Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 65-91, 2012.

COLLINO D.J. *et al.* Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: relationships with crop, soil, and meteorological factors. **Plant and Soil**, v. 392, p. 239-252, 2015.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v 3, safra 2015/16, n. 11. Décimo primeiro levantamento, agosto 2016.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, oitavo levantamento, maio 2014. Brasília: CONAB, 2014. 92 p.

CRAFT, K.E. *et al.* Twentieth century droughts and agriculture: Examples from impacts on soybean production in Kentucky, USA. **Royal Swedish Academy of Sciences**, v. 44, p. 557-568, 2015.

DARYANTO, S; WANG, L.; JACINTHE, P-A. Global synthesis of drought effects on food legume production. **PLoS ONE**, v. 10, e. 6, e0127401, 2015.

DAS A. *et al.* Leaf proteome analysis reveals prospective drought and heat stress response mechanisms in soybean. **BioMed Research International**, v. 2016, Article ID 6021047, 2016, 23 p.

DEL LONGO, O.T.; GONZÁLES, C.A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v.34, p.1023-1028, 1993.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212-228, 2015.

DEVI, A.M.K.; GIRIDHAR, P. Variations in physiological response, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities, proline and isoflavones content in soybean varieties

subjected to drought stress. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, India, Section B: Biological Sciences, v. 85, n. 1, p. 35-44, 2015.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), **Manual de métodos de análise de solo**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, EMBRAPA: Rio de Janeiro, 1997.

EMBRAPA. **Tecnologia de produção de soja**: Região Central do Brasil 2003. Londrina: Embrapa Soja. 2003. Versão eletrônica (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 1). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/importancia.htm>. Acesso dia 09 de setembro 2016.

ENGELS, C. et al. Introduction of the rd29A:AtDREB2A CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, p. 556-565, 2013.

FAGAN, E.B. et al. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia (FZVA)**, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 673-689, 2015.

FAO, Animal production and health. Protein sources for the animal feed industry. **Expert consultation and workshop**, 2002.

FARIA R.T., COSTA A.C.S. **Tensiômetro: construção, instalação e utilização**: um aparelho simples para se determinar quando irrigar. Londrina, IAPAR, 1987, 24 p.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Special Report 80. Iowa State University of Science and Technology, Iowa, 1977, 11p.

FENTA, B.A.; DRISCOLL, S.P.; KUNERT, K.J; FOYER, C.H. Characterization of drought-tolerance traits in nodulated soya beans: The importance of maintaining photosynthesis and shoot biomass under drought-induced limitations on nitrogen metabolism. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 198, p. 92-103, 2012.

FERGUSON, A.R., SIMS, A.P. (1971) 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.

FERREIRA, L.C. et al. Nitric oxide reduces oxidative stress generated by lactofen in soybean plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 47-54, 2010.

FERREIRA, L.C. et al. Copper oxychloride fungicide and its effect on growth and oxidative stress of potato plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 112, p. 63-69, 2014.

FIERER N. et al. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, Archaea, Fungi, and viruses in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 21, p. 7059-7066, 2007.

- FOYER, C.H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J.F.; SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. **Physiology Plant.**, v. 100, p. 241-54, 1997.
- FRITSCHI, F.B.; RAY, J.D. Soybean leaf nitrogen, chlorophyll content, and chlorophyll *a/b* ratio. **Photosynthetica**, v. 45, p. 92-98, 2007.
- FUGANTI-PAGLIARINI, R. *et al.* Characterization of soybean genetically modified for drought tolerance in field conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017, 15 p.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.
- GIL-QUINTANA, E. *et al.* Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 2171-2182, 2013.
- GILROY, S. *et al.* ROS, calcium, and electric signals: Key mediators of rapid Systemic Signaling in plants. **Plant Physiology**, v. 171, p. 1606-1615, 2016.
- GIONGO, A. *et al.* Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields. **Applied Soil Ecology**, v. 38, p. 261-269, 2008.
- GRAHAM, P.H.; VANCE, C.P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, v. 131, p. 872-877, 2003.
- GUIMARÃES, A.A. *et al.* Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, 6726, 2012.
- HARTMAN, G.L.; WEST, E.D.; HERMAN, T.K. Crops that feed the world 2. Soybean - worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v. 3, p. 5-17, 2011.
- 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.
- HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, p. 604-611, 1999.
- HOWITT, R.E. *et al.* **Economic Analysis of the 2015 Drought for California Agriculture**. Center for Watershed Sciences, University of California – Davis, Davis, CA, 2015, 16 p.
- HSU, S.F.; BUCKLEY, D.H. Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. **International Society for Microbial Ecology**, v. 3, p. 124-136, 2009.

HU, H.; XIONG, L. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, 2014, 27 p.

HUESO, S.; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ T. Severe drought conditions modify the microbial community structure, size and activity in amended and unamended soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 50, p. 167-173, 2012.

HUNGRIA, M. *et al.* Effects of glyphosate-resistant gene and herbicides on soybean crop: Field trials monitoring biological nitrogen fixation and yield. **Field Crop Res**, v. 158, p. 43–54, 2014.

HUNGRIA, M. *et al.* Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal Plant Science**, v. 86, p. 927–939, 2006.

HUNGRIA, M. Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nódulos. In: Hungria M.E Araújo, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. EMBRAPA, Brasília, 1994. (EMBRAPA CNPAF. Documentos, 46).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Embrapa Soja, Londrina, 2007.

HUNGRIA, M.; MENDES, I.C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: de BRUJIN, F. (ed) **Biological nitrogen fixation**. Wiley: New Jersey, 2015, p 1005–1019.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with na emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 1593-1608, 2012.

KUNERT, K.J. *et al.* Drought stress responses in soybean roots and nodules. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016, 7p.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 251-275, 1997.

LAWLOR, D.W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n.1, p. 83-108, 2013.

MADANI, A.; NEHAL, M.; HAQUE, S.S.; KHAN, A. Perspective of oxidative stress in a biological system and prevention by naturally occurring antioxidant. **National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences**, v. 80, p. 287–295, 2010.

MAGALHÃES, P.C.; SOUZA, T.C.; PADILHA, F.A. Influência do ácido abscísico na atividade enzimática antioxidante, nos parâmetros hídricos e na tolerância à seca em

híbridos de milho. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 53, 2012, 42 p.

MAHATMA, M.K.; BHATNAGAR, R.; MITTAL, G.K.; MAHATMA, L. Antioxidant metabolism in pearl millet genotypes during compatible and incompatible interaction with downy mildew pathogen. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 44, n. 9, p. 911-924, 2011.

MAK, M. *et al.* Leaf mesophyll K⁺, H⁺ and Ca²⁺ fluxes are involved in drought-induced decrease in photosynthesis and stomatal closure in soybean. **Environmental and Experimental Botany**, v. 98, p.1-12, 2014.

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

MARCOLINO-GOMES, J. *et al.* Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, e86402, 2014.

MARINO, D. *et al.* Nitrogen fixation control under stress. Localized or systemic? **Plant Physiology**, v. 143, p. 1968-1974, 2007.

MASTRODOMENICO, A.T.; PURCELL, L.C.; KING C.A. The response and recovery of nitrogen fixation activity in soybean to water deficit at different reproductive developmental stages. **Environmental and Experimental Botany**, v. 85, p. 16-21, 2013..

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, E.; NEPOMUCENO, A.L. Phenotyping soybean plants transformed with rd29A:AtDREB1A for drought tolerance in the greenhouse and field. **Transgenic Research**, v. 23, p. 75-87, 2014.

NEZHADAHMADI, A.; PRODHAN, Z.H.; FARUQ, G. Drought tolerance in wheat. Hindawi Publishing Corporation, **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013, 12p.

OHYAMA T. *et al.* Role of nitrogen on growth and seed yield of soybean and a new fertilization technique to promote nitrogen fixation and seed yield. **INTECH**, capítulo 9, 2017.

ORR, C.H. *et al.* Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 911-919, 2011.

PAIVA-ROLLA, A.A. *et al.* Phenotyping soybean plants transformed with rd29A:AtDREB1A for drought tolerance in the greenhouse and field. **Transgenic Res**, v. 23, p. 75-87, 2014.

PANZIERI, M.; MARCHETTINI, N.; HALLAM, T.G. Importance of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis for the sustainability of a soybean cultivation. **Ecological Modelling**, v. 135, p. 301–310, 2000.

PATHAN, S.M. *et al.* Two soybean plant introductions display slow leaf wilting and reduced yield loss under drought. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 200, p. 231-236, 2014.

PIAO, S. *et al.* The impacts of climate change on water resources and agriculture in China: **Reviews. Nature**, v. 467, p. 43-51, 2010.

POLIZEL, A.M. *et al.* Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with rd29A:AtDREB1A for the improvement of drought tolerance. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 3641-3656, 2011.

REIS JÚNIOR, F.B.; MENDES, I.C.; HUNGRIA M. **Plantas transgênicas e a microbiota do solo**. Planaltina – DF: Embrapa Cerrados, 2005, 36 p. (Documentos 141).

SALVAGIOTTI, F. *et al.* Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. **Field Crops Research**, v. 108, p. 1-13, 2008.

SEARLE, P. L. The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. **Analyst**, v. 109, p. 549-568, 1984.

SHEN, X.; DONG, Z.; CHEN, Y. Drought and UV-B radiation effect on photosynthesis and antioxidant parameters in soybean and maize. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, 2015.

SINCLAIR, T.R. *et al.* 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. The future of grain legumes in cropping systems. **Crop and Pasture Science**, v. 63, p. 501-512, 2012.

SINGH, R. *et al.* Reactive oxygen species (ROS): Beneficial companions of plants' developmental processes. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, artigo 1299, 2016.

SOUSA, T.C.R. **Relatório de avaliação dos impactos das tecnologias geradas pela embrapa**. Embrapa cerrados: Planaltina, março 2013, 38p.

STANELONI, R.T.; RODRIGUEZ-BATILLER, M.J.; CASAL, J.J. Abscisic acid, high-light, and oxidative stress down-regulate a photosynthetic gene via a promoter motif not involved in phytochrome-mediated transcriptional regulation. **Molecular Plant**, v. 1, p. 75-83, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4^a ed. Artmed: Porto Alegre, 2009.

TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA – Região Central do Brasil 2014. Londrina: **Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste**, 2013. 265 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 16).

THORNTON, P.K.; ERICKSEN, P.J.; HERRERO, M.; CHALLINO, A.J. Climate variability and vulnerability to climate change: a review. **Global Change Biology**, v. 20, p. 3313-3328, 2014.

TRIPATHI, P. *et al.* A toolbox of genes, proteins, metabolites and promoters for improving drought tolerance in soybean includes the metabolite coumestrol and stomatal development genes. **BMC Genomics**, 2016, 22 p.

UNDA, F.; CANAM, T.; PRESTON, L.; MANSFIELD, S.D. Isolation and characterization of galactinol synthases from hybrid poplar. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 2059-2069, 2012.

USDA, United States Department of Agriculture. World agriculture supply and demand estimates. WASDE 556, **World Agricultural Outlook Board**, august 2016.

USDA, United States Department of Agriculture. World agriculture supply and demand estimates. WASDE 573, **World Agricultural Outlook Board**, january 2018.

VAGHEFI, S.A. *et al.* Analyses of the impact of climate change on water resources components, drought and wheat yield in semiarid regions: Karkheh River Basin in Iran. **Hydrological Processes**, v. 28, p. 2018-2032, 2014.

VÁSQUEZ, P.I.L. *et al.* Historical analysis of interannual rainfall variability and trends in southeastern Brazil based on observational and remotely sensed data. **Climate Dynamics**, v. 137, 2017, 24p.

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

WILKINSON, J. (Coord.). **Relatório integrante da pesquisa “Perspectivas do Investimento no Brasil”, em parceria com o Instituto de Economia da UNICAMP, financiada pelo BNDES**. Perspectivas do investimento no agronegócio. Rio de Janeiro: UFRJ, Instituto de Economia, 2008/2009. 306 p. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/empresa/pesquisa/pib/pib_agronegocio.pdf. Acesso em 04 set. 2016.

XU, Y.H. *et al.* Light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 3, p. 1095-1106, 2012.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954.

YU, H. *et al.* Acquisition of Cry1Ac protein by non-target arthropods in Bt soybean fields. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8: e103973, 2014 a.

YU, H. *et al.* Expression of Cry1Ac in transgenic Bt soybean lines and their efficiency in controlling lepidopteran pests. **Pest Management Science**, v. 69, p. 1326-1333, 2013.

YU, H.; LI, H.; LI, X.; WU, K. Arthropod abundance and diversity in transgenic Bt soybean. **Environmental Entomology**, v. 43, n. 4, p. 1124-1134, 2014 b.

ZOBIOLE, L.H.S.; KREMER, R.J.; OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J. Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of “second generation” glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 53-60, 2011.