



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULA CEREZINI

**EFEITO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA FIXAÇÃO
BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA**

Londrina
2013

PAULA CEREZINI

**EFEITO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA FIXAÇÃO
BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central
da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C414e Cerezini, Paula.
Efeito da restrição hídrica na fixação biológica de nitrogênio em soja / Paula
Cerezini. – Londrina, 2013.
57 f. : il.

Orientador: Marco Antonio Nogueira.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
2013.

Inclui bibliografia.

1. Nitrogênio – Fixação – Teses. 2. Plantas – Efeito da seca – Teses. 3. Soja –
Condições hídricas – Teses. 4. Microbiologia agrícola – Teses. I. Nogueira, Marco
Antonio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 631.461.5

PAULA CEREZINI

**EFEITO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE
NITROGÊNIO EM SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dr^a. Mariangela Hungria da Cunha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Antonio Eduardo Pípolo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Londrina, 15 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

O período de desenvolvimento deste trabalho representa uma trajetória de aprendizado acadêmico, profissional e pessoal. Durante esse período muitas pessoas ajudaram para a realização dessa etapa, agora vencida. Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de alguma forma para sua concretização.

Agradeço a Deus, por ter me dado forças, pelas bênçãos recebidas e por guiar meus caminhos.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Marco Antonio Nogueira, pela oportunidade, amizade, ensinamentos e dedicação a esse trabalho. A ele, minha admiração.

À Dr. Mariangela Hungria, pelo profissionalismo demonstrado, pela disponibilidade e importantes contribuições ao trabalho.

Ao departamento e aos professores do curso de Pós-graduação em Microbiologia da UEL, pela oportunidade e ensinamentos.

À Embrapa Soja pela disposição de suas dependências para a realização da pesquisa. Em especial aos laboratórios de Biotecnologia do solo e Ecofisiologia vegetal.

Aos pesquisadores Antonio Eduardo Pípolo, Adônis Moreira, Larissa Moraes, Josirley Carvalho e Glaciela Kaschuk, pelas generosas contribuições para realização deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Aos colegas de laboratório pelo apoio, incentivo, auxílio no desenvolvimento do trabalho, pela amizade e convívio. Em especial agradeço à Dáfila, pelo incentivo, ensinamentos, pelos bons conselhos e amizade.

E por fim, à minha família que tanto amo, meus pais Paulo e Luiza, minha irmã Mariana e meu namorado Neto. Agradeço pelo amor incondicional, paciência, confiança, educação e pelo imenso incentivo dedicados.

MUITO OBRIGADA!

CEREZINI, Paula. **Efeito da restrição hídrica na fixação biológica de nitrogênio em soja**. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é indispensável para a viabilidade econômica e ambiental da cultura da soja, mas estresses ambientais como a seca, prejudicam a cultura e a FBN. Neste trabalho, avaliaram-se efeitos da restrição hídrica em parâmetros relacionados à FBN e desenvolvimento das plantas em genótipos de soja que apresentam FBN com diferentes níveis de tolerância à seca. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5×2 , com 7 repetições. Empregaram-se os genótipos R01-581F, R01-416F, R02-1325, com capacidade de manter a FBN sob restrição hídrica, e os suscetíveis CD 215 e BRS 317, em combinação com suprimento adequado de água (70% da capacidade de campo - CC), ou restrição hídrica (30% CC) entre 45 e 55 dias após a emergência. Apenas o genótipo R01-581F não apresentou diminuição da fotossíntese sob restrição hídrica, com médias de 15,07 e 17,31 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, na condição de 30 e 70% CC, respectivamente. Além disso, apresentou maior taxa transpiratória (3,67 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e concentração intercelular de CO_2 (253 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), em relação aos demais genótipos, que variaram suas taxas transpiratórias de 1,78 a 2,34 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, e a concentração intercelular de CO_2 de 185 a 236 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, quando submetidos à restrição hídrica. Todos os genótipos apresentaram redução no teor de clorofila a 30% CC, com variação entre 18,46 e 21,34 $\mu\text{g cm}^{-2}$, porém, menos intensa nos genótipos tolerantes R01-581F (de 22,03 para 20,96 $\mu\text{g cm}^{-2}$) e R02-1325 (de 22,43 para 21,34 $\mu\text{g cm}^{-2}$). À exceção do genótipo R01-416F, todos apresentaram redução da massa de nódulos secos a 30% CC, sendo que, nessa mesma condição, todos tiveram diminuição do número de nódulos, de 329 para 243. A massa da parte aérea (PA) seca diminuiu (de 28,3 para 22,7 g), enquanto a massa de raízes secas aumentou (de 7,32 para 8,24 g) sob estresse hídrico. Os maiores teores de macro e micronutrientes na PA foram observados nos genótipos R01-581F, R01-416F e R02-1325, independente da condição hídrica, sendo que o genótipo R01-581F apresentou o maior teor de N, sob restrição hídrica, com 32,0 e 33,5 g kg^{-1} na condição de 30 e 70% CC, respectivamente. Na condição de 30% CC, o genótipo R01-416F aumentou a concentração de açúcares solúveis totais (AST) na PA (de 118 para 168 mg g^{-1}); os genótipos R01-581F e R02-1325 não foram afetados, enquanto CD 215 e BRS 317 tiveram redução, de 171,9 para 121,9 mg g^{-1} e de 157,1 para 108,5 mg g^{-1} , respectivamente. Todos os genótipos tiveram aumento de AST nos nódulos quando submetidos à restrição hídrica (de 108 para 233 mg kg^{-1}), assim como o teor de ureídeos nas folhas (de 4,05 para 5,54 $\mu\text{mol g}^{-1}$), pecíolos (de 6,05 para 8,70 $\mu\text{mol g}^{-1}$) e nódulos (de 8,83 para 22,05 $\mu\text{mol g}^{-1}$) também aumentaram. A restrição hídrica afetou a maioria das variáveis analisadas, sendo que os genótipos considerados tolerantes demonstraram melhor desempenho nessa condição em relação aos genótipos suscetíveis, sugerindo maior proteção da FBN e melhor ajuste fisiológico sob seca.

Palavras-chave: Ureídeos. Seca. Açúcares solúveis totais. Tolerância. Genótipos.

CEREZINI, Paula. **Effect of water deficit on nitrogen fixation in soybean**. 2013. 57 p. Dissertation (Master in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The biological nitrogen fixation (BNF) is critical to the economical and environmental viability of the soybean crop. Nevertheless, several environmental stresses such as drought may impair the crop performance and the BNF. The aim of this work was to evaluate effects of water restriction on parameters related to the BNF and plant performance in soybean genotypes that show BNF with different levels of tolerance to drought. The experimental design was entirely randomized in 5 × 2 factorial, with seven replicates. The genotypes were the bred lines R01-581F, R01-416F and R02-1325, that are able to keep the BNF under drought, and the susceptible genotypes CD 215 and BRS 317, submitted to adequate water supply (70% of field capacity - FC) or to water restriction (30% of FC) between 45 and 55 days after emergence. Only the genotype R01-581F showed no decrease in photosynthesis under water restriction, averaging between 15.07 and 17.31 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, at 30 and 70% FC, respectively. In addition, this genotype showed higher transpiration rate (3.67 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and intercellular CO_2 concentration (253 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) in comparison to other genotypes, with transpiration rates ranging from 1.78 to 2.34 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, and intercellular CO_2 concentration from 185 to 236 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, when subjected to water restriction. All genotypes had reduced chlorophyll content at 30% FC, ranging between 18.46 and 21.34 mg cm^{-2} , which was less intense in tolerant genotypes R01-581F (from 22.03 to 20.96 mg cm^{-2}) and R02-1325 (from 22.43 to 21.34 mg cm^{-2}). Except for R01-416F, all genotypes had reduced dry mass of nodules at 30% FC; under this same condition, all genotypes showed a decrease in the number of nodules, from 329 to 243 nodules. Shoot dry weight decreased (from 28.3 to 22.7 g), and root dry weight increased (from 7.32 to 8.24 g) in all genotypes under water stress. The highest levels of macro and micronutrients in shoots were found in the genotypes R01-581F, R01-416F e R02-1325, irrespectively of the moisture condition. R01-581F had the highest N content in shoot under water restriction, with average N content of 32.0 and 33.53 g kg^{-1} at 30 and 70% FC, respectively. At 30% FC, R01-416F increased the concentration of total soluble sugars (TSS) in shoot (from 118 to 168 mg g^{-1}); R01-581F and R02-1325 were not affected, while CD 215 and BRS 317 had reduced levels of TSS in shoot, from 171.9 to 121.9 mg g^{-1} and 157.1 to 108.5 mg g^{-1} , respectively. All genotypes showed increased levels of TSS in nodules when subjected to water restriction (108 to 233 mg kg^{-1}); the content of ureides in leaves (from 4.05 to 5.54 $\mu\text{mol g}^{-1}$), petioles (from 6.05 to 8.70 $\mu\text{mol g}^{-1}$) and nodules (from 22.05 to 8.83 $\mu\text{mol g}^{-1}$) also increased for most of genotypes. Water restriction generally affected negatively most of the assessed variables, but the tolerant genotypes showed better performance under water restriction, suggesting protection of the BNF and physiological adjustment under water deficit.

Keywords: Ureides. Drought. Total soluble sugars. Tolerance. Genotypes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Curva de retenção de água do solo, com base nos resultados da mesa de tensão e do aparelho de extração de Richards.30
- Figura 2** - Variação da temperatura (A) e umidade relativa do ar (B) na casa de vegetação e temperatura do substrato nos vasos medida a 5 cm da superfície (C) durante a condução do experimento.....31
- Figura 3** - Taxas fotossintética (A) e transpiratória (B), concentração intercelular de CO₂ (C) e eficiência intrínseca do uso da água (D) em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência35
- Figura 4** - Teor de clorofila em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência (DAE) (A). Teor de clorofila nos genótipos a mantidos a 70% CC e ou submetidos a 30% CC entre 45 e 55 DAE (B)36
- Figura 5** - Massa de nódulos secos em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.....40
- Figura 6** - Massa de raízes e parte aérea secas e número de nódulos em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência40
- Figura 7** - Concentração de açúcares solúveis totais na parte aérea de genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a

	70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.....	41
Figura 8	- Concentração de ureídeos nos pecíolos (A) e nódulos (B) de genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.....	43
Figura 9	- Fluxograma demonstrando os principais mecanismos envolvidos na inibição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em genótipos com FBN tolerante à seca (A) e em genótipos com FBN suscetíveis à seca (B); (+) = acúmulo; (-) = inibição; AA = alantoato amidohidrolase; SS = sacarose sintase.....	50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Características químicas e granulométricas do substrato de cultivo antes da aplicação do corretivo e das fontes de nutrientes, e após a execução do experimento.....29
- Tabela 2** - Condutância estomática e eficiência do uso da água em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.....36
- Tabela 3** - Nitrogênio total (N_T), teores de nitrogênio (N), potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg), manganês (Mn), enxofre (S), cobre (Cu), boro (B) e zinco (Zn) na parte aérea em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.....38
- Tabela 4** - Teor de açúcares solúveis totais (AST) em nódulos frescos de genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.....42
- Tabela 5** - Concentração de ureídeos em folhas em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.....43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	PRODUÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CULTURA DA SOJA.....	13
2.2	IMPORTÂNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO PARA A SOJA.....	15
2.3	PROCESSO DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	16
2.4	MUDANÇAS CLIMÁTICAS E PREJUÍZOS À PRODUÇÃO DE SOJA.....	19
2.5	EFEITOS DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	22
3	OBJETIVO GERAL	27
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	28
4.2	AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS.....	31
4.3	DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA DA PLANTA.....	32
4.4	TEOR DE NUTRIENTES NA PARTE AÉREA.....	32
4.5	DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS.....	32
4.6	TEOR DOS UREÍDOS NAS FOLHAS, PECÍOLOS E NÓDULOS.....	33
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5	RESULTADOS	34
5.1	AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS.....	34
5.2	TEOR DE NUTRIENTES NA PARTE AÉREA.....	37
5.3	BIOMASSA DA PARTE AÉREA, RAÍZES E NÓDULOS.....	39
5.4	TEORES DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS NA PARTE AÉREA E NÓDULOS.....	41
5.5	CONCENTRAÇÃO DE UREÍDOS NAS FOLHAS, PECÍOLOS E NÓDULOS.....	42
6	DISCUSSÃO	44
	CONCLUSÕES	51

REFERÊNCIAS.....	52
------------------	----

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é considerada uma das culturas de maior relevância econômica no cenário agrícola mundial, sendo o Brasil o segundo maior produtor e maior exportador de grãos dessa oleaginosa, com perspectivas de se tornar líder de produção mundial dessa leguminosa na safra 2012/2013. Na safra 2011/2012 o Brasil produziu 66,4 milhões e exportou 36,7 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2012), o que gera benefícios para a economia do país, pois o complexo soja (grão, farelo e óleo) é empregado em diversos setores, desde a indústria química, até a alimentícia.

Devido ao alto teor de proteínas em seus grãos – aproximadamente 40%, a cultura da soja tem elevada demanda por nitrogênio (N) para seu desenvolvimento. Em média, são exigidos 80 kg de N para produzir 1000 kg de grãos, que podem ser fornecidos eficientemente pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Esse processo é indispensável para a viabilidade econômica da cultura e ocorre graças às bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, que são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (N₂) quando em simbiose com leguminosas, fornecendo todo N requerido pela planta, substituindo o uso de fertilizantes químicos nitrogenados e trazendo benefícios econômicos e ambientais.

Entretanto, vários fatores podem ser limitantes à produtividade da cultura da soja, como os decorrentes de mudanças climáticas. Segundo relatório do IPCC (2007) ocorrerá agravamento de períodos de seca para os próximos anos, pois há previsão de redução das chuvas em áreas normalmente chuvosas. A ocorrência de veranicos em fases críticas do desenvolvimento da soja é um dos principais fatores responsáveis por grandes perdas na lavoura, uma vez que a restrição hídrica não só compromete a planta fisiologicamente, mas também pode causar prejuízos indiretos, com efeitos negativos ao processo de FBN. Dessa forma, o suprimento de N à cultura é diretamente afetado, podendo causar limitações à produtividade e, conseqüentemente, prejuízos econômicos.

A FBN em soja é especialmente vulnerável à restrição hídrica, entretanto, os mecanismos que estão envolvidos na redução da eficiência da fixação de N₂ ainda não são bem compreendidos. Entretanto, alguns estudos apontam a limitação na difusão de oxigênio para o nódulo, a escassez de substratos de carbono

ao bacteroide e a regulação pelo metabolismo do nitrogênio, com acúmulo de compostos nitrogenados nas folhas e nódulos, como prováveis mecanismos envolvidos na inibição da atividade da nitrogenase. Deficiências hídricas mais severas podem inibir irreversivelmente a FBN; contudo, estudos sugerem que existam variações genotípicas entre cultivares de soja quanto à capacidade de manter o processo simbiótico, como também seus processos fisiológicos, em condições de restrição hídrica.

Os genótipos R01-581F e R01-416F, provenientes do cruzamento entre Jackson (FBN tolerante à seca) e KS4895 (característica de altos rendimentos), foram selecionados por manter altas produtividades em condições de seca (CHEN et al., 2007). Além disso, esses genótipos demonstraram maior acúmulo de N na parte aérea e alta atividade da nitrogenase em condições de restrição hídrica, sugerindo a manutenção da FBN nessa condição. Entretanto, há necessidade de estudos mais aprofundados quanto à fisiologia, nutrição e ao metabolismo do C e N nos genótipos R01-581F e R01-416F sob restrição hídrica, a fim de confirmar a característica de FBN tolerante a seca atribuída a esses genótipos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar alguns mecanismos envolvidos na auto-regulação da FBN em condições de restrição hídrica em genótipos de soja que apresentam FBN com diferentes níveis de tolerância à seca.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CULTURA DA SOJA

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das mais importantes culturas na economia mundial e é a que mais tem crescido nos últimos anos. Dall'Agnol et al. (2007) mencionam que, de 1970 a 2007, o aumento da produção mundial dessa leguminosa foi de 763%. Atribui-se isso, entre outros fatores, à grande aplicabilidade da matéria-prima da soja, que possui elevado teor de proteína em seus grãos – cerca de 40%, e considerável teor de óleo – aproximadamente 20%, sendo empregados na agroindústria, indústria química e alimentícia (HARTMAN; WEST; HERMAN, 2011), além de participar como matéria-prima alternativa na produção de biocombustível (DALL'AGNOL et al., 2007).

A soja é uma dicotiledônea herbácea, pertencente à família *Fabaceae*, com relatos do seu aparecimento há mais de cinco mil anos, na região leste da Ásia (ALIYEV; MIRZOYEV, 2010). Sua domesticação ocorreu por volta do século XI a.C. e, durante muito tempo, seu cultivo permaneceu restrito apenas aos países orientais, como China, Coreia e Japão, e tinha baixo valor econômico (DALL'AGNOL et al., 2007). O cultivo da soja só foi reconhecido no final do século XIX e, a partir de então, passou a ser difundido nos demais continentes (ALIYEV; MIRZOYEV, 2010).

No Brasil, os estudos com soja iniciaram em 1882, na Escola de Agronomia da Bahia, com germoplasma trazido dos EUA, que não era adaptado à baixa latitude da região. Em 1891 novos genótipos foram testados em Campinas-SP, apresentando melhores resultados de produção (DALL'AGNOL et al., 2007). No entanto, foi no Estado do Rio Grande do Sul que ocorreu a primeira produção significativa de soja em escala comercial, na década de 40, por ser a melhor alternativa no verão para a sucessão com o trigo (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003). Contudo, o agronegócio da soja teve expansão a partir de 1960, com ganho de competitividade (DALL'AGNOL et al., 2007), elevando o país à condição de um dos maiores produtores e exportadores mundiais, com notável crescimento até os dias atuais.

Esse sucesso do agronegócio brasileiro de soja se deve tanto aos investimentos em pesquisa para o desenvolvimento de cultivares adaptadas ao solo

e às condições climáticas (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003), quanto à capacidade da planta em realizar simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, que têm capacidade de fixar o N₂ atmosférico e disponibilizá-lo para a cultura, tornando-a independente do uso de fertilizantes químicos nitrogenados (FAGAN et al., 2007; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

No cenário atual da agricultura, a soja é a oleaginosa mais cultivada no mundo, com produção de 236,38 milhões de toneladas na safra 2011/2012 (USDA, 2012), sendo que o Brasil ocupa lugar de destaque no *ranking* dos maiores produtores do grão. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2012), na safra 2011/2012 o Brasil aumentou 3,4% (822,1 mil hectares) a área plantada, passando de 24,18 milhões para 25,0 milhões de hectares, com produção de 66,4 milhões de toneladas de grãos, o equivalente a 28% da produção mundial, mantendo-se como segundo maior produtor, superado apenas pelos Estados Unidos, que produziu, naquela safra, 83,17 milhões de toneladas (USDA, 2012).

Embora cultivada em todas as regiões do Brasil, o plantio de soja concentra-se principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sul do país (CONAB, 2012), sendo o Estado do Mato Grosso o maior produtor, com 21,78 milhões de toneladas e o Estado do Paraná o segundo maior produtor, com 10,94 milhões de toneladas de grãos, na safra 2011/2012. Nesta mesma safra, o Brasil atingiu a marca de maior exportador mundial de soja, com 36,7 milhões de toneladas de grãos (USDA, 2012). Segundo Hartman, West e Herman (2011), os países sul-americanos têm mostrado um crescimento muito rápido no cultivo de soja e se essa expansão continuar, o Brasil poderá ultrapassar os EUA como líder de produção mundial dessa cultura.

Com expectativa de crescimento da população mundial, dos 6,3 bilhões atuais, para 8 bilhões de habitantes em 2030, as altas taxas de crescimento da produção de soja devem se manter, afim de atender uma maior demanda por alimentos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; HARTMAN; WEST; HERMAN, 2011). Com isso, são fundamentais, para a sustentabilidade dos sistemas de produção, inovações tecnológicas constantes, que possam manter a produtividade da soja economicamente viável. A utilização de recursos genéticos pode fornecer soluções necessárias para amenizar ou combater a contínua pressão de fatores

adversos à produção, como a disponibilidade de nutrientes e a ocorrência de veranicos (SADOK; SINCLAIR, 2011).

2.2 IMPORTÂNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO PARA A SOJA

Com exceção da água, o N é considerado o componente que mais frequentemente limita o crescimento e desenvolvimento de plantas no seu ambiente natural (FRANCO; DÖBEREINER, 1994). Esse elemento é um constituinte essencial das células vegetais a nível estrutural, genético e metabólico, estando envolvido nos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, com influência direta no rendimento das culturas (CHRISTOPHE et al., 2011). Apesar de o N ser o elemento mais abundante na atmosfera terrestre, as plantas e outros organismos eucariontes são incapazes de metabolizá-lo. Isto ocorre porque o N atmosférico está na forma de N_2 , que possui alta estabilidade, devido à tripla ligação covalente que existe entre os átomos de N, uma das mais fortes que se tem conhecimento na natureza (FAGAN et al., 2007).

As principais fontes de N assimiláveis para as culturas, segundo o ciclo do nitrogênio, são: o solo, a fixação não-biológica, os fertilizantes nitrogenados e a FBN (FAGAN et al., 2007; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). No solo, o N proveniente da decomposição da matéria orgânica é limitado, com esgotamento rápido após alguns cultivos, considerado como uma fonte insustentável de suprimento do nutriente. Da mesma forma, a fixação não-biológica, resultante de descargas elétricas, combustão e vulcanismo, contribui apenas com pequenas quantidades de N anualmente (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

Os fertilizantes nitrogenados representam uma forma de assimilação mais rápida para as plantas, mas a alto custo, pois o processo químico que transforma N_2 em amônia – forma assimilável – requer altas temperaturas e pressão, com uso de energia de fontes não renováveis, como o petróleo. Calcula-se que sejam gastos seis barris de petróleo a cada tonelada de amônia produzida (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Além disso, os fertilizantes nitrogenados são de baixa eficiência, com aproveitamento aproximado de apenas 50% do N aplicado. Com isso, aliado à alta demanda de N para o cultivo da soja, o suprimento de N via fertilizante químico tornaria esta cultura inviável economicamente para o Brasil (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Além do mais, o uso indiscriminado de

fertilizantes químicos causa riscos ambientais, como a lixiviação do nitrato, por exemplo, que pode contaminar lençóis freáticos, rios e reservatórios, podendo atingir níveis tóxicos à vida aquática, aos animais e ao homem (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). O processo de desnitrificação, realizado por bactérias do solo, também pode ocorrer e acarretar perda do N aplicado via fertilizante. Esse processo transforma o nitrato (NO_3^-) proveniente do fertilizante nitrogenado em formas gasosas, como NO (óxido nítrico) e N_2O (óxido nitroso), gases que apresentam vida longa na atmosfera e têm grande potencial de aquecimento global (PAG), da ordem de 300 vezes mais que o PAG do CO_2 , prejudicando o meio ambiente e contribuindo para as mudanças climáticas globais (CARMO et al., 2005; MENDES et al., 2010).

A capacidade das leguminosas em formar simbiose com bactérias que realizam a FBN é uma grande vantagem evolutiva, visto que o crescimento de plantas leguminosas, como a soja, não é limitado pela disponibilidade de N no solo (SINCLAIR; VADEZ, 2012). A FBN consiste na transformação do N atmosférico em amônia, por meio de microrganismos procariotos, denominados diazotróficos, que podem fornecer todo nitrogênio que a planta necessita, desde que respeitados os procedimentos para uma boa nodulação. Em troca, a planta fornece fotoassimilados, essenciais para a manutenção do metabolismo bacteriano e para manter alta atividade da FBN (FAGAN et al., 2007; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). O processo de FBN ocorre em temperatura e pressão ambientes, resultando em uma fonte de N com baixo custo econômico, altos rendimentos à cultura e impacto ambiental reduzido (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Sendo assim, o processo de FBN torna-se indispensável para a sustentabilidade da agricultura brasileira. A recomendação atual para o cultivo de soja no Brasil é a utilização do inoculante microbiano sem a adição de fertilizante nitrogenado, pois estima-se que quase 100% do nitrogênio requerido pela cultura possa ser disponibilizado por meio da FBN (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). A economia para o país, com a não utilização dos fertilizantes nitrogenados e aplicação dessa tecnologia na produção de soja, está em torno de US\$ 9 bilhões anualmente (MENDES et al., 2010).

2.3 PROCESSO DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Depois da fotossíntese, a FBN é considerada o mais importante processo biológico do planeta (MENDES et al., 2010), sendo fundamental para o

estabelecimento da vida na Terra. A FBN envolve uma série de etapas que se iniciam com a atração da bactéria à planta e culminam na fixação do N_2 atmosférico. São processos complexos, em que a infecção e colonização das raízes caracterizam-se como um evento dinâmico, com mudanças fisiológicas, bioquímicas e morfológicas, tanto na célula hospedeira, quanto na bactéria (FAGAN et al., 2007).

A ocorrência da simbiose entre as leguminosas e os rizóbios não é obrigatória, no entanto, sob condições de limitação de N no solo, os simbioses procuram uns aos outros, por meio de trocas de sinais moleculares, tendo como resultado a formação de um novo órgão na raiz da planta, o nódulo (TAIZ; ZEIGER, 2009). No nódulo, a bactéria é diferenciada em bacteroide e passa a sintetizar diversas enzimas, como o complexo enzimático nitrogenase, e proteínas, como a leghemoglobina (FAGAN et al., 2007).

O complexo nitrogenase é formado por duas unidades proteicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), que são capazes, juntamente com a ferridoxina, de transportar elétrons, os quais são necessários para redução do N_2 a NH_3 (FAGAN et al., 2007). A nitrogenase é extremamente sensível à exposição ao oxigênio (O_2), até mesmo em baixas concentrações, sendo irreversivelmente inativada por esse gás. Assim, a função da leghemoglobina é a de regular o transporte de O_2 para as células fixadoras de N_2 nos nódulos, de modo que a concentração de O_2 seja mantida em um nível não deletério à nitrogenase, mas que permita altas taxas de FBN. Os nódulos, quando ativos, apresentam coloração rosácea intensa em seu interior, indicando a atividade da leghemoglobina (FAGAN et al. 2007; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; SINCLAIR; VADEZ, 2012).

No processo de FBN, o N atmosférico é reduzido a amônia (NH_3), que em contato com o substrato aquoso do citoplasma dos bacteroides é transformada em amônio (NH_4^+), sendo este liberado por difusão para o citosol da célula infectada. O acúmulo de NH_4^+ é tóxico ao bacteroide e às células, por isso este deve ser convertido em formas orgânicas, como ureídos, aminoácidos e amidas, para posterior translocação e incorporação ao metabolismo nitrogenado das plantas. As reações de assimilação são intermediadas, principalmente, pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), sendo que a atividade destas enzimas é um dos parâmetros que indicam a eficiência na

assimilação da amônia e, conseqüentemente, da FBN (FAGAN et al., 2007; ALCÂNTARA; REIS, 2008; CHRISTOPHE et al., 2011).

Em geral, leguminosas de clima temperado transportam N na forma de amidas, mas no caso da soja, 90% do N são transportados na forma de ureídos (KING; PURCELL, 2005; SINCLAIR et al., 2007; CHRISTOPHE et al., 2011; DURAN; TODD, 2012). As principais formas de ureídos presentes nas plantas são a alantoína, sintetizada nos peroxissomos a partir do ácido úrico e, o ácido alantóico, sintetizado no retículo endoplasmático a partir da alantoína (KING; PURCELL, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2009). Esses compostos nitrogenados são translocados, via xilema, dos nódulos até a parte aérea, onde são rapidamente metabolizados (KING; PURCELL, 2005). Dessa forma, a FBN atende à demanda de N das culturas, pois proporciona aumento significativo no acúmulo do N total nas plantas e maiores concentrações de N nas sementes, quando comparado às plantas sob suprimento de N via fertilizante químico (KASCHUK et al., 2010).

Os benefícios gerados pelo microssimbionte, pela disponibilização do N às plantas, são acompanhados de um custo energético muito alto, visto que os nódulos precisam assimilar carbono como fonte de energia aos microsimbiontes, para fornecer esqueletos de carbono à assimilação do amônio produzido, para o crescimento e para biossíntese de amido (SCHUBERT, 2002). Os custos de C da FBN são compensados pelas maiores taxas fotossintéticas, que podem aumentar em até 28% devido à simbiose (KASCHUK et al., 2009).

A fotossíntese é comandada de acordo com a demanda nutricional da planta e incrementos nas taxas fotossintéticas ocorrem por causa do forte dreno da simbiose por fotoassimilados (KASCHUK et al., 2009). Além disso, como o N é essencial à síntese da Rubisco, principal enzima envolvida na fixação do CO₂ e na síntese de clorofilas, a FBN, ao aumentar a concentração de N foliar, aumenta também a eficiência fotossintética (KASCHUK et al., 2010). Com o estímulo da fotossíntese pela simbiose, o período potencial para o crescimento da planta e para o enchimento dos grãos pode aumentar, adiando a degradação de proteínas foliares e da clorofila, com retardamento da senescência da planta, o que pode resultar em maiores rendimentos (ONO et al., 2001; KASCHUK et al., 2010).

O principal produto da fotossíntese, transportado da parte aérea até os nódulos, é a sacarose (ALCÂNTARA; REIS, 2008; ARRESE-IGOR et al., 2011). Nos nódulos, a sacarose é hidrolisada pela enzima sacarose sintase (SS), sendo a

atividade dessa enzima essencial ao metabolismo do C nos nódulos. Depois da hidrólise da sacarose, o bacteroide recebe substrato de C na forma de ácidos dicarboxílicos, particularmente malato ou succinato (LODWIG; PEOPLE, 2003; ALCÂNTARA; REIS, 2008), os quais servem de fonte de energia ao metabolismo do microssimbionte. A FBN é extremamente dependente da formação de fotoassimilados, sendo que a taxa de FBN é proporcional à taxa fotossintética das plantas. Portanto, a integração do metabolismo do N e C nos nódulos desempenha um papel chave na eficácia da simbiose (ALCÂNTARA; REIS, 2008). Porém, como a maioria dos processos fisiológicos das plantas, a FBN pode sofrer interferências quando submetida a condições adversas, sendo os fatores ambientais, tais como disponibilidade hídrica, temperatura e salinidade, agentes determinantes para o sucesso da relação simbiótica (FAGAN et al., 2007; CHRISTOPHE et al., 2011).

2.4 MUDANÇAS CLIMÁTICAS E PREJUÍZOS À PRODUÇÃO DE SOJA

Nos últimos anos, alterações no clima têm sido observadas em todo o mundo. Isso inclui incrementos na temperatura e diminuição das geleiras do Ártico, irregularidade da precipitação pluvial, alteração da salinidade dos oceanos, dos padrões de vento e aspectos de clima extremo, como secas, fortes precipitações, ondas de calor e intensidade de ciclones tropicais, levando a alterações no equilíbrio energético do sistema climático (IPCC, 2007).

O efeito estufa é um fenômeno natural que ocorre na atmosfera e possibilita as condições térmicas necessárias para a vida na Terra. Os principais gases de efeito estufa (GEE) são: dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), ozônio (O_3) e óxido nitroso (N_2O) (IPCC, 1995). Esses gases, em conjunto com o vapor d'água, absorvem parte dos raios infravermelhos refletidos pela superfície terrestre, impedindo que essa energia passe diretamente para o espaço. Essa interação permite que a temperatura média da atmosfera seja favorável à vida, pois caso não houvesse esses gases na atmosfera, a temperatura média da Terra seria aproximadamente 30°C menor, o que inviabilizaria as atuais formas de vida (CERRI et al., 2007).

As atividades antrópicas, como o crescente consumo de combustíveis fósseis, a derrubada e queima de florestas, a agricultura e pecuária e os processos de industrialização têm contribuído para o aumento excessivo dos

GEE na atmosfera. Esse acúmulo contínuo de GEE acarreta maior retenção de radiação infravermelha emitida pela Terra, com consequente aumento da temperatura do ar e decorrentes eventos extremos (IPCC, 2007). Nas últimas décadas, as mudanças climáticas globais têm despertado preocupações da comunidade científica (IPCC, 2011; WANG et al., 2012). A problemática destas alterações levou a OMM (Organização Meteorológica Mundial) e a PNUMA (Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente) a criarem o IPCC (Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas) em 1988, o qual é considerado como órgão consultor de todas as nações para avaliar as questões relacionadas às mudanças no clima (IPCC, 2007).

De acordo com o IPCC (2011), as concentrações de CO₂ na atmosfera cresceram significativamente desde a época pré-industrial, que eram em torno de 280 ppm para 390 ppm no final de 2010. As emissões dos GEE, de um modo geral, cresceram mais de 70% entre 1970 a 2010. Aliado a este fato, houve um aumento na temperatura média global, entre 1850-1899 a 2001-2005, de 0,76°C, com projeções de aumento da temperatura média do planeta em 1,1°C a 6,4°C no próximo século (IPCC, 2007; IPCC, 2011).

A fim de amenizar os impactos negativos ao ambiente, várias iniciativas a favor da sustentabilidade no uso dos recursos naturais estão sendo implementadas, como o Acordo de Cancun, realizado na Conferência das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas (UNFCCC), em 2010, que pretende limitar o aumento da temperatura média global para 2,0°C. Para isso, a concentração dos GEE terá que se estabilizar entre 450-490 ppm até 2050, o que representa uma diminuição de 50 a 85% do nível de emissão de CO₂ geradas no ano de 2000, com início de redução das emissões até 2015 (IPCC, 2011). Mesmo com essas iniciativas, as oscilações climáticas são inevitáveis, sendo que tais mudanças têm trazido efeitos negativos ao ambiente, com consequências à agricultura (IPCC, 2007).

A relação entre agricultura e o clima é bastante complexa, pois fatores ambientais afetam tanto o crescimento e desenvolvimento das plantas, como também todas as etapas do cultivo, incluindo o preparo do solo, data da semeadura, colheita, transporte e armazenagem do produto. Segundo o IPCC (2007), dentre os cenários de mudanças climáticas, é prevista a redução das chuvas em áreas subtropicais em até 20%, com agravamento das secas. De fato, nos últimos anos

tem ocorrido maior irregularidade das chuvas, com seguidos prejuízos para a agricultura. A ocorrência de períodos secos durante o ciclo das culturas é denominada veranicos, fator constante de perdas de safra.

Como todas as práticas agrícolas, o cultivo da soja sofre influência de diversos fatores e, entre eles, a seca é um dos principais agentes de redução na produtividade do grão (EMBRAPA, 2010). A restrição hídrica afeta desde sua germinação e floração, até o enchimento e desenvolvimento dos grãos e qualidade das sementes (MANAVALAN et al., 2009). No Brasil, foi observado, na última safra de soja (2011/2012), efeito negativo das condições climáticas, sendo que a estiagem prolongada, causada pelo aquecimento global, juntamente com o fenômeno “La Niña”, acarretaram diminuição na produção da oleaginosa em 11,8% (representando 8,93 milhões de toneladas de grãos a menos), em relação à produção da safra anterior (2010/2011), a qual atingiu 75,32 milhões de toneladas de grãos de soja (CONAB, 2012).

Segundo relatório do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2012), na safra 2012/2013 os norte-americanos sofreram os efeitos da pior seca em mais de meio século. Em decorrência da estiagem no país, a produção de soja caiu de 83,17, na safra 2011/2012, para 80,66 milhões de toneladas de grãos, segundo a última projeção da USDA (2012). As expectativas para a safra brasileira de soja 2012/2013 são elevadas e, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2012) a produção pode chegar a 81,44 milhões de toneladas de grãos de soja, com um crescimento de 8,8% da área plantada em relação à safra anterior. Se confirmada a previsão, o Brasil tem chance de superar os EUA como maior produtor mundial de soja, com safra recorde.

No entanto, a safra brasileira está vulnerável aos efeitos das condições climáticas ao longo do período de desenvolvimento, pois a ocorrência de veranicos e perdas agrícolas deverá estar presente com maior frequência no futuro em função das mudanças climáticas globais previstas em diversos meios acadêmicos (NOGUEIRA, 2012). A água atua em quase todos os processos da planta, e constitui, aproximadamente, 90% da sua massa. O déficit hídrico pode ser definido como todo o conteúdo de água de um tecido ou célula que está abaixo do nível exibido no estado de hidratação (TAIZ; ZEIGER, 2009), sendo que a resposta das culturas frente ao estresse hídrico é considerada uma síndrome, ou seja, um grupo de respostas simultâneas (LAWLOR, 2002).

A necessidade total da cultura da soja por água varia de 450 mm a 800 mm por ciclo. A semente de soja necessita absorver, no mínimo, 50% de sua massa em água para assegurar boa germinação. Nessa fase, o conteúdo de água no solo não deve exceder a 85% do total máximo de água disponível e nem ser inferior a 50%. A necessidade de água na cultura da soja vai aumentando com o desenvolvimento da planta, atingindo o máximo durante a floração/enchimento de grãos (7 a 8 mm/dia), decrescendo após esse período (EMBRAPA, 2010). Em trabalhos realizados em Londrina-PR, ao longo de 15 safras, avaliando-se diversas cultivares de soja sob diferentes condições de disponibilidade hídrica, e verificou-se que os maiores rendimentos de grãos foram obtidos com 650 a 700 mm de água, bem distribuídos ao longo do ciclo (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

A deficiência hídrica influencia muitos processos fisiológicos indiretamente. Plantas sob estresse hídrico têm afetados o fechamento estomático, a transpiração, a fotossíntese, a biomassa total, as atividades enzimáticas, o metabolismo do nitrogênio, entre outros processos (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007; CHRISTOPHE et al., 201; SINCLAIR et al., 2007). Entretanto, ao longo da evolução, as plantas desenvolveram mecanismos com os quais têm sobrevivido a condições adversas, como a seca. Em resposta ao estresse, as plantas ativam uma série de mecanismos de defesa, como vários genes, que levam à produção de proteínas que atuam sinergicamente em vias metabólicas visando ao aumento da tolerância ao estresse hídrico (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000; FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

2.5 EFEITOS DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O efeito da seca na FBN em soja tem sido amplamente documentado por ser considerado o principal fator ambiental que afeta a eficiência simbiótica com consequências negativas ao rendimento da cultura (ZHRAN, 1999; LADRERA et al., 2007; MARINO et al., 2007; SINCLAIR et al., 2007). A FBN em soja é caracterizada por ser vulnerável à restrição hídrica, sendo o primeiro processo a ser prejudicado, antes mesmo da transpiração e da fotossíntese (KING; PURCELL, 2005; SINCLAIR et al., 2007; ARRESE-IGOR et al., 2011).

A restrição hídrica compromete a formação e a sobrevivência do microsimbionte, com mudanças na morfologia e no metabolismo dos nódulos e

inibição da atividade da nitrogenase (STREETER, 2003; CHRISTOPHE et al., 2011). Os fatores envolvidos na redução/inibição da FBN sob condições de seca ainda não são bem compreendidos, mas alguns estudos têm associado a sensibilidade da FBN à seca com um, ou a combinação de três mecanismos, sendo a (1) limitação de oxigênio, (2) escassez de substratos de carbono e (3) regulação pelo metabolismo do nitrogênio (SERRAJ; SINCLAIR; PURCELL, 1999; KING; PURCELL, 2001; GÁLVEZ; GONZÁLEZ; ARRESE-IGOR, 2005; LADRERA et al., 2007).

Em situação de estresse hídrico, ocorre redução da permeabilidade dos nódulos aos gases, o que limita o fornecimento de O₂ para a respiração do bacteroide, causando danos oxidativos à nitrogenase (HUNGRIA; VARGAS, 2000; CHRISTOPHE et al., 2011). Além disso, sob severas condições de seca, o conteúdo de leghemoglobina nos nódulos também é afetado (MANAVALAN et al., 2009) comprometendo ainda mais o fornecimento de O₂ ao microssimbionte.

A disponibilidade hídrica é essencial aos processos de importação e assimilação de fotoassimilados para os nódulos e, exportação e degradação de compostos nitrogenados na parte aérea. Portanto, em condições de seca, esses processos são afetados, interferindo no metabolismo do C e do N, que atuam na regulação da FBN (LADRERA et al., 2007; ARRESE-IGOR et al., 2011). A redução no fluxo de carbono nodular é atribuível ao decréscimo da atividade da enzima SS, causando acúmulo de carbono na forma de sacarose e esgotamento de carbono na forma de malato, necessário para a obtenção de energia e poder redutor pelo bacteroide, e tendo, como consequência, inibição da atividade da enzima nitrogenase (GÁLVEZ; GONZÁLEZ; ARRESE-IGOR, 2005; LADRERA et al., 2007; MARINO et al., 2007; ARRESE-IGOR et al., 2011).

O metabolismo do N também interfere na regulação da FBN em condições de seca, por um mecanismo de *feedback* envolvendo acúmulo de compostos nitrogenados na parte aérea e nos nódulos (VADEZ; SINCLAIR, 2002). Várias moléculas orgânicas tiveram sua participação sugerida nesse mecanismo, como ureídos e aminoácidos livres (VADEZ; SINCLAIR; SERRAJ, 2000; KING; PURCELL, 2005; SINCLAIR et al., 2007). Tem sido relatado que plantas que transportam N na forma de amidas são menos sensíveis ao moderado déficit hídrico do que as que transportam ureídos, como a soja (SERRAJ; SINCLAIR; PURCELL, 1999; SINCLAIR et al., 2007).

King e Purcell (2006) sugerem que a intensidade do déficit hídrico pode determinar o grau em que a fixação de N_2 é afetada. Além disso, alguns estudos mostram que há variações genótípicas entre cultivares de soja quanto à sensibilidade da FBN em seca (VADEZ; SINCLAIR, 2002; SINCLAIR et al., 2007; ARRESE-IGOR et al., 2011). A cultivar Jackson foi identificada entre 28 genótipos como tendo característica de FBN tolerante à seca. Em estudos anteriores, Serraj e Sinclair (1997) confirmaram a superioridade de Jackson em uma comparação com 18 cultivares. A vantagem deste genótipo está associada à sua capacidade de minimizar sob seca o acúmulo de ureídos em toda a planta, sendo capaz de metabolizar rapidamente os ureídos na folha, o que parece estar associado à capacidade desse genótipo em acumular maiores concentrações de Mn (PURCELL; KING; BALL, 2000). Além disso, a suplementação de Mn em condições de seca moderada aumentou a FBN em genótipos sensíveis à seca, como KS4895 (VADEZ; SINCLAIR, 2002).

A cultivar KS4895 (PI 595081) é amplamente adaptada a alto rendimento de grãos, mas possui FBN sensível à seca (PURCELL; KING; BALL, 2000). Jackson (PI 548657), ao contrário, possui característica de FBN tolerante à seca, mas com baixa produtividade. Em 1993, realizou-se o cruzamento dessas cultivares com a obtenção de várias linhagens. Em 2001, as cultivares R01-581F e R01-416F foram selecionadas e testadas, demonstrando potencial de alto rendimento em condições de seca (CHEN et al., 2007). Sinclair et al. (2007) estudaram as linhagens R01-581F e R01-416F em ambientes com restrição hídrica e obtiveram melhores resultados quanto ao acúmulo de N na parte aérea e à atividade da fixação biológica de N_2 , pelo teste de redução de acetileno, em relação ao parental KS4895, além de maiores rendimentos de grãos por esses genótipos em relação aos controles comerciais em condições de restrição hídrica em experimentos a campo.

A redução de acetileno é um método utilizado para estimar a FBN com base na atividade da enzima nitrogenase. Essa técnica é questionada por muitos autores, pois, apesar de simples e de alta sensibilidade, se trata de uma medida pontual, e como se sabe o processo de FBN apresenta sazonalidade ao longo do dia e do período de crescimento das plantas (PEOPLES et al., 1989; RESENDE et al., 2003). Dessa forma, outros parâmetros devem ser considerados para comprovar a suposta tolerância dos genótipos R01-581F e R01-416F à

restrição hídrica, como avaliações fisiológicas e nutricionais das plantas e o conteúdo de ureídos, que é indicativo da eficiência da FBN.

As principais vias enzimáticas que catabolizam os ureídos na parte aérea de soja são a alantoato amidinohidrolase (SHELP; IRELAND, 1985) e a alantoato amidohidrolase (WINKLER et al., 1985), sendo essa última dependente do Mn como cofator. Vadez e Sinclair (2002) observaram que a cultivar Jackson apresenta menores teores de ureídos na parte aérea sob condições de seca, sendo que esse genótipo manteve altas concentrações de Mn nas folhas, mas foi insensível à suplementação de Mn sob condições de restrição hídrica, levando à suposição que esse genótipo utiliza a via independente de Mn como cofator.

Por outro lado, a maior sensibilidade à seca de algumas cultivares de soja está sendo atribuída à utilização da via enzimática alantoato amidohidrolase. De acordo com essa hipótese, uma deficiência da disponibilidade de Mn pode ser a causa da sensibilidade da fixação de N₂ à seca em alguns cultivares de soja (VADEZ; SINCLAIR, 2002; SINCLAIR; VADEZ; CHENU, 2003). Vadez, Sinclair e Serraj (2000) citam que aminoácidos, como asparagina (Asp), atuam como agentes quelantes do íon Mn, e que o aumento na concentração de Asp devido a condições adversas pode interferir na degradação dos ureídos na parte aérea pela inibição da enzima alantoato amidohidrolase.

Entretanto, há controvérsias em relação às reais causas do acúmulo de ureídos na parte aérea e se estes estão relacionados ao *feedback* de inibição da FBN. King e Purcell (2005) encontraram associação entre o aumento na concentração dos ureídos e Asp nos nódulos e acúmulo de aminoácidos nas folhas, com a redução na atividade da enzima nitrogenase. Em estudos mais recentes, Charlson, Korth e Purcell (2009) demonstraram que a expressão do gene da alantoato amidohidrolase não está associada com a concentração de ureídos na parte aérea em soja sob condições de seca, sendo a resposta ao estresse hídrico e as características de tolerância independentes da expressão desse gene; eles sugerem que uma regulação pós-transcricional, ou outros fatores estariam afetando a atividade dessa enzima na metabolização de ureídos na parte aérea em condições de restrição hídrica.

Quanto ao acúmulo de ureídos nos nódulos, não está claro se eles acumulam porque os ureídos recém-sintetizados deixam de ser exportados devido à diminuição no abastecimento de água para nódulos, resultando em

comprometimento da translocação; ou se acumulam como resultado de um excesso de ureídos na parte aérea, que voltam para os nódulos por meio do floema (VADEZ; SINCLAIR; SERRAJ, 2000). Ladrera et al. (2007) observaram que a seca não alterou significativamente o conteúdo de ureídos na parte aérea nos primeiros momentos da restrição hídrica, mas sim nos nódulos, embora um acúmulo na parte aérea em fases posteriores sob condições mais severas de restrição hídrica, não pode ser descartado. Esses autores apoiam a hipótese de que a causa da inibição da FBN sob seca é de origem local, nos nódulos, ao invés de sistêmica.

Alamillo et al. (2010) observaram acúmulo de ureídos nas folhas e raízes de feijão, mas não em nódulos, após 14 dias de indução da seca. Nesse período, a atividade da nitrogenase já havia cessado. Estudos realizados por Silvente, Sobolev e Lara (2012), mostraram que a alteração no conteúdo de ureídos em resposta ao estresse hídrico foi observado apenas nas folhas de um genótipo sensível, mas não no tolerante, uma vez que a atividade da enzima nitrogenase permaneceu inalterada sob restrição hídrica em ambos genótipos. Assim, esses autores sugeriram que a inibição da fixação simbiótica de N_2 e o acúmulo de ureídos na parte aérea, após um estresse hídrico, são concomitantes, mas não é necessariamente relação causal, porque seguem cinéticas diferentes.

Dessa forma, a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na inibição/tolerância da FBN em soja sob restrição hídrica tornam-se importantes. A elucidação nos mecanismos envolvidos no acúmulo de compostos nitrogenados entre diferentes genótipos de soja, bem como a compreensão das características genotípicas associadas à sensibilidade/tolerância da FBN em genótipos de soja sob condições de restrição hídrica podem ser úteis na seleção de cultivares que consigam manter seus processos fisiológicos e eficiência no processo simbiótico, dentro de certos limites, em condições de restrição hídrica.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar mecanismos envolvidos na inibição/tolerância da FBN e desenvolvimento da planta em condições de restrição hídrica em relação a condições de fornecimento pleno de água, em genótipos de soja que apresentem FBN com diferentes níveis de tolerância à seca.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade fotossintética e as trocas gasosas nas folhas;
- Analisar os teores de macro e micronutrientes na parte aérea das plantas;
- Analisar alterações na biomassa das plantas e dos nódulos;
- Quantificar mudanças na concentração de açúcares solúveis totais na parte aérea e nos nódulos;
- Verificar mudanças nos teores de ureídeos nas folhas, pecíolos e nódulos;
- Definir parâmetros que estão envolvidos no processo de autorregulação da FBN em condições de deficiência hídrica, a fim de melhor caracterizar genótipos com características de FBN tolerante à seca.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Foi conduzido um experimento em casa de vegetação na EMBRAPA Soja, Londrina-PR, com delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (5 x 2) com sete repetições. Foram testados cinco genótipos de soja: R01-581F, R01-416F, R02-1325, que apresentam características de manter a FBN em condições de seca (CHEN et al., 2007), e os suscetíveis CD 215 e BRS 317; com e sem indução da restrição hídrica entre os 45 e 55 dias após a emergência (DAE), período de florescimento pleno dos genótipos.

Foi utilizado como substrato amostra da camada 0-20 cm de um solo proveniente de área agrícola obtida em Ponta Grossa-PR, classificado como Latossolo Vermelho distrófico, cujos resultados da análise química (antes e após a condução do experimento) e granulométrica são apresentados na Tabela 1. Para manutenção da umidade do solo, foi determinada sua capacidade de retenção de água pelos métodos da mesa de tensão e do aparelho extrator de Richards (EMBRAPA, 1997), os quais possibilitaram a construção de uma curva característica de retenção de água no solo (Figura 1).

Com base na análise química (Tabela 1), foram aplicados 2,2 kg de calcário dolomítico por tonelada de substrato, visando elevar o pH para próximo a 6,0 e uma saturação por bases próxima a 70%. Após a homogeneização do corretivo, 8 kg do substrato foram acondicionados em vasos de PVC, receberam água e foram incubados por 30 dias antes da instalação do experimento para que a reação de neutralização se completasse. Para correção nutricional do solo, cada vaso recebeu 106 mg de fósforo, 630 mg de potássio, 460 mg de magnésio e 620 mg de enxofre, além disso, receberam 50 mL de uma solução de micronutrientes contendo 0,0057 g de CoSO_4 , 0,0217 g de Na_2MO_4 , 2 g de H_3BO_3 em 5 L de água. Não foi adicionada qualquer fonte de N mineral, o qual foi fornecido apenas via FBN. Para tanto, a inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) foi realizada momentos antes da semeadura, com inoculante líquido contendo 1×10^9 células viáveis mL^{-1} . Primeiramente as sementes foram desinfestadas segundo método de Hungria et al. (1994) e em seguida foram imersas no inoculante líquido por 20 min. Após a semeadura cada semente recebeu 500 μL

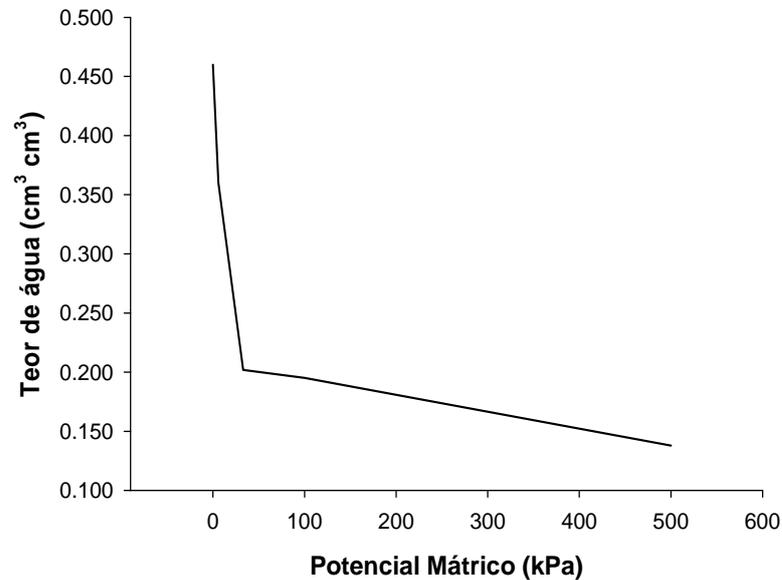
do inóculo microbiano. Foram semeadas oito sementes por vaso, que foram desbastadas para três plântulas por vaso sete DAE.

Tabela 1 - Características químicas e granulométricas do substrato de cultivo antes da aplicação do corretivo e das fontes de nutrientes, e após a execução do experimento.

Atributos	Antes	Após
pH ^a	4,7	5,2
H + Al (cmol _c dm ⁻³)	5,6	3,6
Al (cmol _c dm ⁻³)	0,01	0,00
Ca (cmol _c dm ⁻³)	4,02	3,39
Mg (cmol _c dm ⁻³)	0,64	2,75
K (cmol _c dm ⁻³)	0,31	0,16
SB (cmol _c dm ⁻³)	4,97	4,97
CTC (cmol _c dm ⁻³)	10,5	9,91
P (mg dm ⁻³) ^b	2,14	2,42
Mn (mg dm ⁻³)	NA	17,8
Fe (mg dm ⁻³)	NA	57,1
Cu (mg dm ⁻³)	NA	1,59
Zn (mg dm ⁻³)	NA	0,65
B (mg dm ⁻³)	NA	0,84
N _T (g dm ⁻³)	NA	1,45
MO (g kg ⁻³)	33,2	29,0
C (g kg ⁻³)	19,3	16,8
V (%)	47,0	63,6
m (%)	0,09	0,00
Areia (g kg ⁻¹)		238
Silte (g kg ⁻¹)		30
Argila (g kg ⁻¹)		732

^aCaCl₂; ^bMehlich I; NA= não analisado.

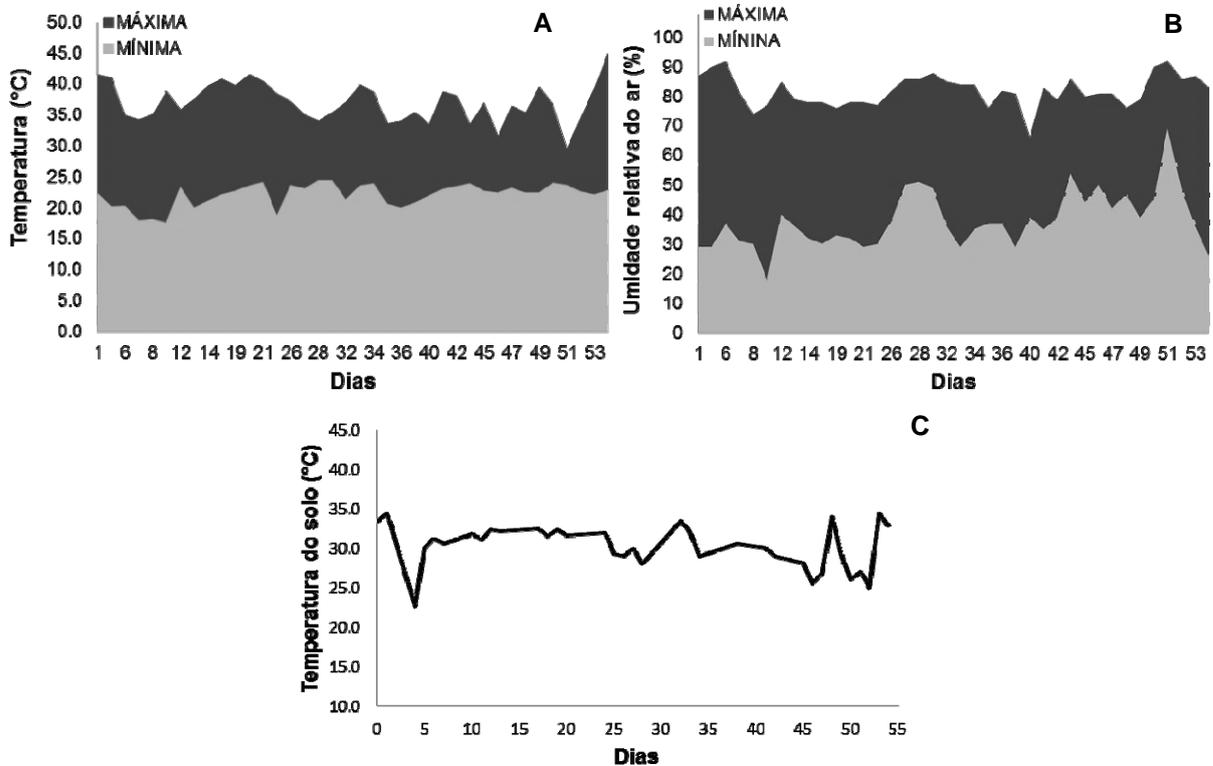
Figura 1 - Curva de retenção de água do solo, com base nos resultados da mesa de tensão e do aparelho de extração de Richards.



O experimento foi conduzido com suprimento hídrico adequando (70% da capacidade de campo – CC) por 45 DAE, quando metade das plantas foram submetidas a um período de restrição hídrica, passando a receber água para manutenção de 30% CC por 10 dias e a outra metade continuou a receber água a 70% CC. O controle da quantidade de água fornecida em todo o experimento foi realizado por pesagens diárias em balança eletrônica durante o período em que metade das plantas passou por restrição hídrica a 30% CC. Nessa fase, a massa das plantas foi estimada e descontada das pesagens para o controle do fornecimento hídrico.

Durante o período de condução do experimento um termo-higrômetro foi utilizado para controle diário de temperatura e umidade relativa do ar. A temperatura média variou entre 21,9 e 37,2°C, sendo que a mínima foi de 17,7°C, e a máxima chegou a 45,3°C (Figura 2A). A umidade relativa média do ar variou entre 37,7 a 82,5%, com mínima de 18% e máxima de 94% (Figura 2B). A temperatura do substrato também foi monitorada com um termômetro de haste, apresentando média de 30,3°C, com mínima de 22,7°C e máxima de 33,5°C (Figura 2C).

Figura 2 - Variação da temperatura (A) e umidade relativa do ar (B) na casa de vegetação e temperatura do substrato nos vasos medida a 5 cm da superfície (C) durante a condução do experimento.



4.2 AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS

Para a análise de parâmetros fisiológicos foi utilizado um medidor de trocas gasosas modelo LI-6400 com sistema aberto de fluxo de ar (LI-COR, Biosciences Inc., Nebraska, EUA), um dia antes da desinstalação do experimento, quando foram determinadas a condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e transpiratória ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração intercelular de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), relação fotossíntese/transpiração (eficiência do uso da água - $\text{mmol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$), que representa a quantidade de carbono que a planta fixa para cada unidade de água que transpira e a relação fotossíntese/condutância estomática (eficiência intrínseca do uso da água - $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), que representa a quantidade de carbono que a planta fixa por unidade de condutância estomática (FLEXAS et al., 2001).

O teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$) foi determinado com um medidor portátil modelo SPAD-502 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) durante os 10 dias de indução da restrição hídrica, e a concentração foliar de clorofila calculada conforme calibração descrita por Kaschuk et al. (2010). As avaliações foram

realizadas no terceiro trifólio recém-expandido de uma das plantas de cada vaso no período da manhã.

4.3 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA DA PLANTA

A desinstalação do experimento foi realizada no final dos 10 dias de restrição hídrica, aos 55 DAE. Do sistema radicular foram coletados e pesados 30 nódulos, que foram imediatamente congelados em N₂ líquido e armazenamos em ultrafreezer (-80°C) para análises posteriores. A parte aérea (PA) e raízes foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 60°C por 48 h, para determinação da massa seca. Os nódulos restantes foram coletados, realizando-se a pesagem e contagem dos mesmos. A massa seca dos nódulos congelados foi estimada com base na relação massa úmida/massa seca dos nódulos restantes.

4.4 TEOR DE NUTRIENTES NA PARTE AÉREA

Para determinação do teor de N na PA foi realizada digestão sulfúrica do tecido moído, com quantificação em espectrofotometria pelo método do verde de salicilato (SEARLE, 1984). Para determinação dos demais macronutrientes: fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), e micronutrientes: boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), o tecido moído foi submetido à digestão nitro-perclórica e quantificados em espectrofotometria de absorção atômica (EAA) modelo AA200 Perkin Elmer, para os macronutrientes e, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP), modelo 5200 DV Perkin Elmer, para os micronutrientes.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

Os açúcares solúveis totais (AST) na PA foram extraídos segundo Carvalho, Pinto e Figueiredo-Ribeiro (1998) com modificações, em que 200 mg do tecido seco foram incubados três vezes com 10 mL de etanol 80%, levadas em banho-maria a 80°C durante 15 min e centrifugados a 925 g por 15 min. No sobrenadante foi feita a determinação dos AST pelo método colorimétrico da antrona (YEMM; WILLIS, 1954), utilizando glicose (60 mg mL⁻¹) como padrão.

Para extração dos AST dos nódulos, utilizou-se o método descrito em Hungria (1994), em que 20 mg de nódulos frescos congelados foram pesados e macerados em 5 mL de etanol 80% a 70°C. Essas amostras ficaram em banho de ultrassom por 30 s e foram na sequência centrifugadas a 1.800 *g* por 10 min. O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 80% a 70°C. A determinação dos AST foi realizada no sobrenadante pelo método da antrona (YEMM; WILLIS, 1954), utilizando padrão de glicose (1 g L⁻¹).

4.6 TEOR DOS UREÍDOS NAS FOLHAS, PECÍOLOS E NÓDULOS

Amostras de tecidos foliares, pecíolos e nódulos secos foram moídas separadamente, e a extração foi feita segundo Hungria (1994), em que 300 mg do material foi incubado com 5 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e 2,5 mL de etanol em banho-maria (80°C por 5 min), agitados em vórtex e filtrados. Os extratos foram centrifugados (10.000 *g* por 5 minutos) e no sobrenadante foi feita a determinação da alantoína e ácido alantóico, segundo a metodologia de Vogels e van der Drift (1970). Para obtenção da concentração de ureídeos, os teores de alantoína e ácido alantóico foram somados.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F a 5% de probabilidade. Constatado efeito dos fatores isolados ou da interação, os dados foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação de médias entre os tratamentos.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS

Todas variáveis fisiológicas analisadas sofreram influência da restrição hídrica para a maioria dos genótipos. As taxas fotossintética e transpiratória, a concentração intercelular de CO₂ e a eficiência intrínseca do uso da água apresentaram interação entre os fatores genótipo e condição hídrica (Figura 3). Nas variáveis condutância estomática e eficiência do uso da água houve apenas efeito isolado da condição hídrica, sem efeito do genótipo (Tabela 2).

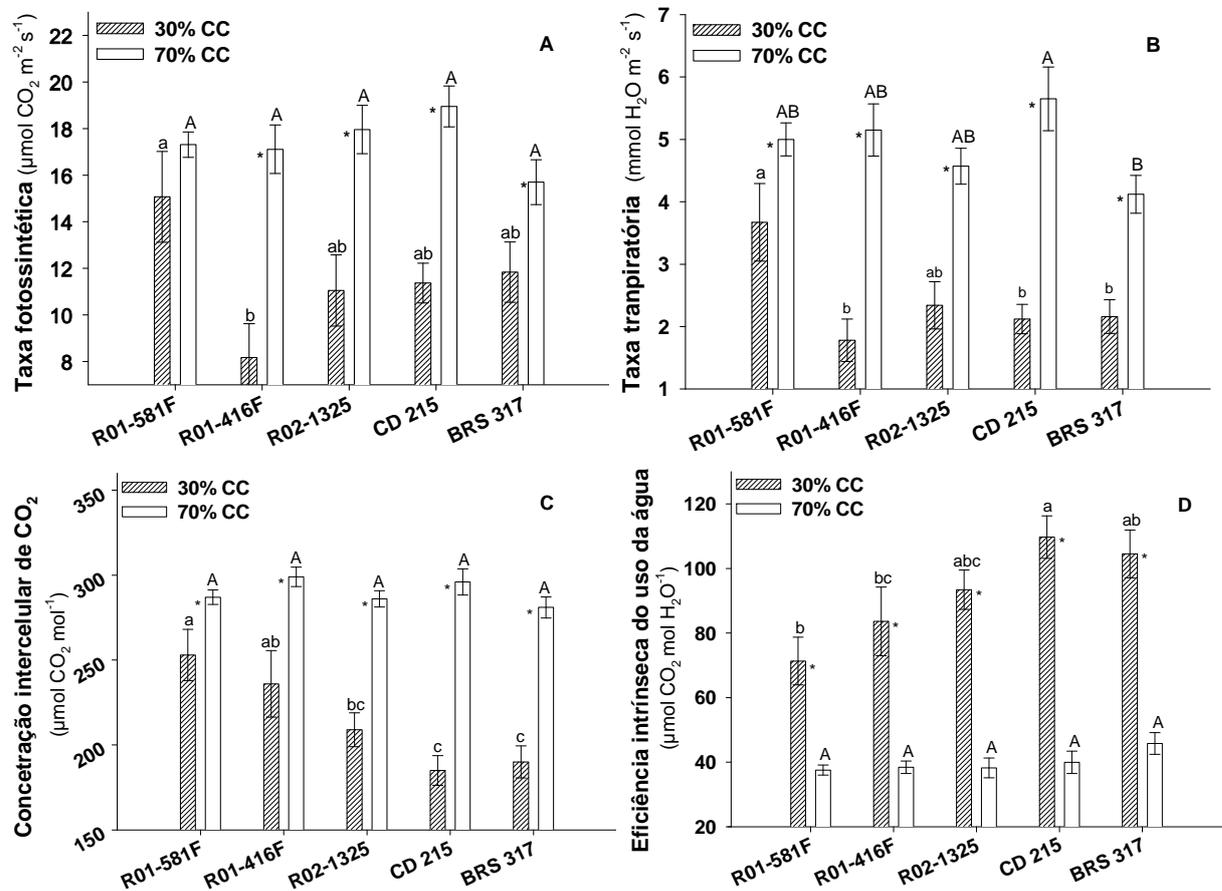
Somente o genótipo R01-581F não sofreu redução significativa da fotossíntese na condição de 30% CC (Figura 3A), tendo apresentado taxa fotossintética 30% superior à média dos demais genótipos; além disso, na condição de 30% CC, esse mesmo genótipo apresentou maior taxa transpiratória e concentração intercelular de CO₂ em relação aos demais, apesar de todos os genótipos terem apresentado redução dessas variáveis quando submetidos à restrição hídrica (Figura 3B e 3C). No entanto, na condição de 30% CC, os genótipos tolerantes reduziram 20% a concentração intercelular de CO₂, já os genótipos suscetíveis apresentaram redução de 35%, em relação às plantas sob suprimento hídrico adequado.

A restrição hídrica aumentou substancialmente a eficiência intrínseca do uso da água para todos os genótipos, com os maiores valores observados nos genótipos suscetíveis, que apresentaram acréscimo de 150% contra 117% dos genótipos tolerantes (Figura 3D). Nessa mesma condição, a condutância estomática diminuiu 70% em relação aos tratamentos sob suficiência hídrica, enquanto a eficiência do uso da água aumentou 38%, na média dos genótipos (Tabela 2).

As concentrações de clorofila foram influenciadas pela interação entre os fatores genótipo e condição hídrica (Figura 4A) e também pelo tempo de exposição à restrição hídrica (Figura 4B). Na condição de 30% CC, houve redução no teor de clorofila para todos os genótipos, sendo que os genótipos R01-581F e R02-1325 apresentaram menores diminuições, seguidos pelos genótipos R01-416F, CD 215 e BRS 317, com menores valores (Figura 4A). Mesmo na condição de suprimento hídrico adequado, os genótipos tolerantes já apresentavam os maiores

teores de clorofila em relação aos suscetíveis. O teor de clorofila nos tratamentos sob restrição hídrica permaneceu praticamente constante durante os 10 dias de exposição a essa condição, enquanto que nas plantas sob suficiência hídrica houve incrementos na concentração de clorofila em cerca de 7% nesse período (Figura 4B).

Figura 3 - Taxas fotossintética (A) e transpiratória (B), concentração intercelular de CO_2 (C) e eficiência intrínseca do uso da água (D) em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência



Letras maiúsculas comparam os genótipos na condição de 70% CC, letras minúsculas comparam os genótipos na condição de 30% CC; letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * indica efeito significativo da condição hídrica dentro de cada genótipo. Barras verticais indicam o desvio-padrão ($n = 7$).

Tabela 2 - Condutância estomática e eficiência do uso da água em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.

CONDIÇÃO HÍDRICA	GENÓTIPOS					
	R01-581F	R01-416F	R02-1325	CD 215	BRS 317	MÉDIA
----- CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) -----						
30% CC	0,237	0,105	0,122	0,107	0,122	0,138 b
70% CC	0,467	0,456	0,488	0,506	0,360	0,455 a
Média	0,351 A	0,280 A	0,305 A	0,306 A	0,241 A	

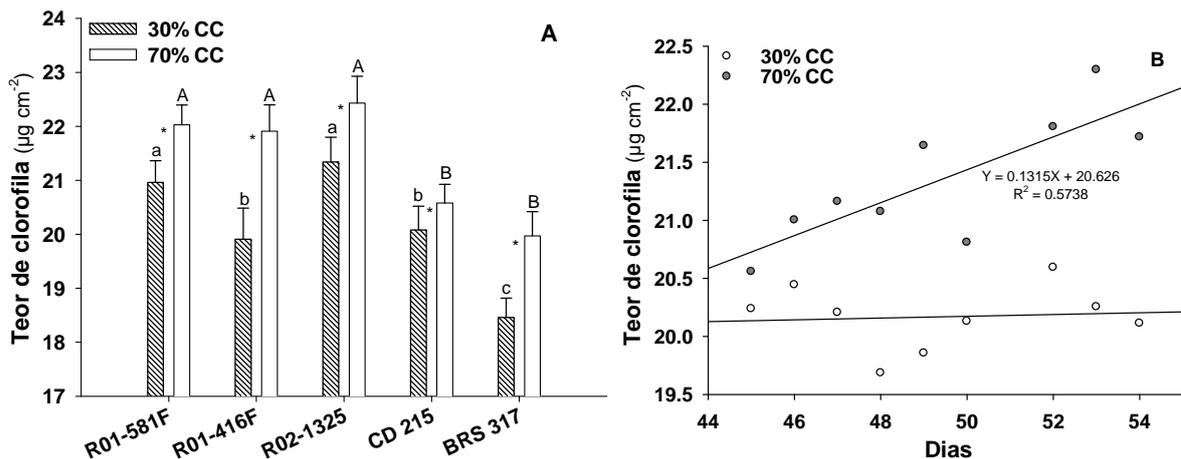
ANAVA= genótipo (G) > 0,05, condição hídrica (H) < 0,05, GxH > 0,05. CV = 34,6%

CONDIÇÃO HÍDRICA	GENÓTIPOS					
	R01-581F	R01-416F	R02-1325	CD 215	BRS 317	MÉDIA
----- EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA (fotossíntese/transpiração) ($\text{mmol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$) -----						
30% CC	4,32	4,61	4,82	5,63	5,66	5,00 a
70% CC	3,50	3,38	3,95	3,46	3,85	3,63 b
Média	3,91 A	3,99 A	4,39 A	4,55 A	4,75 A	

ANAVA= genótipo (G) > 0,05, condição hídrica (H) < 0,05, GxH > 0,05. CV = 19,8%

Letras maiúsculas comparam na linha, letras minúsculas comparam na coluna. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 4 - Teor de clorofila em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência (DAE) (A). Teor de clorofila nos genótipos a mantidos a 70% CC e ou submetidos a 30% CC entre 45 e 55 DAE (B).



Letras maiúsculas comparam os genótipos na condição de 70% CC, letras minúsculas comparam os genótipos na condição de 30% CC; letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * indica efeito significativo da condição hídrica dentro de cada genótipo. Barras verticais indicam o desvio-padrão ($n = 7$).

5.2 TEOR DE NUTRIENTES NA PARTE AÉREA

A análise de variância para os teores de N, P, K e Mn na PA das plantas de soja apresentou interação entre genótipos e condição hídrica (Tabela 3). Em geral, os genótipos com capacidade de manter a FBN sob seca apresentaram maiores concentrações destes nutrientes, independente da disponibilidade hídrica. O maior teor de N nas plantas submetidas à restrição hídrica foi encontrado no genótipo R01-581F, com média de $33,53 \text{ g kg}^{-1}$, seguido pelos genótipos R01-416F e R02-1325, e os genótipos CD 215 e BRS 317, com os menores teores. Ao comparar o efeito das condições hídricas, os genótipos R01-581F, R02-1325 e BRS 317 não reduziram os teores de N na PA na condição de deficiência hídrica, sendo que para os demais genótipos, a restrição de água levou à redução no teor de N na PA. Na média, os genótipos tolerantes apresentaram concentração de N na PA 31% superior em relação aos genótipos suscetíveis sob restrição hídrica.

Em relação aos teores de P e K na PA observou-se a mesma tendência entre os genótipos, em que R01-581F, R01-416F e R02-1325 apresentaram as maiores concentrações dos nutrientes em relação aos suscetíveis. Em condição de restrição hídrica, a concentração de P nos genótipos tolerantes foi 29% superior em relação aos suscetíveis; nessa mesma condição, os teores de K não sofreram redução para os genótipos tolerantes frente à restrição hídrica, porém, os suscetíveis apresentaram diminuição desses teores.

A concentração de Mn na PA foi superior no genótipo R01-581F em relação aos demais, independente da condição hídrica. Ao analisar o efeito da condição hídrica nos genótipos, observou-se que apenas os genótipos CD 215 e BRS 317 não sofreram influência da restrição hídrica, porém, nessa condição, os genótipos R01-581F, R01-416F e R02-1325 apresentaram médias de concentração de Mn na PA 24% superiores em relação aos genótipos suscetíveis, sendo que na condição de suprimento hídrico adequado, os genótipos tolerantes apresentaram concentração de Mn na PA quase 50% maior que nos suscetíveis.

O acúmulo de N total (N_T) e os teores dos macronutrientes Ca, Mg e S e dos micronutrientes B, Cu e Zn na PA sofreram apenas efeito isolado da condição hídrica e/ou dos genótipos (Tabela 3). A indução do déficit hídrico reduziu em 26% o acúmulo de N nas plantas, com as maiores médias de acúmulo de N nos genótipos R01-581F e R01-416F em relação aos demais. Em geral, as maiores

concentrações de Ca e Mg foram observadas nos genótipos considerados tolerantes, independente da condição hídrica, sendo que a deficiência hídrica afetou negativamente tanto o teor de Ca quanto de Mg. A concentração de S foi maior no genótipo R01-581F em relação aos genótipos R02-1325 e CD 215. Os teores dos micronutrientes B, Cu e Zn não foram influenciados pela restrição hídrica, no entanto, o genótipo R01-581F apresentou os maiores teores de B e Cu, enquanto no genótipo R01-416F observou-se o maior teor de Zn, independente da condição hídrica.

Tabela 3 - Nitrogênio total (N_T), teores de nitrogênio (N), potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg), manganês (Mn), enxofre (S), cobre (Cu), boro (B) e zinco (Zn) na parte aérea em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.

CONDIÇÃO HÍDRICA	GENÓTIPOS					
	R01-581F	R01-416F	R02-1325	CD 215	BRS 317	MÉDIA
----- NITROGÊNIO TOTAL (mg vaso ⁻¹) -----						
30% CC	680	642	536	464	447	554 b
70% CC	911	834	728	708	574	751 a
Média	796 A	738 A	632 B	586 BC	510 C	
ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) < 0,05, GxH > 0,05. CV = 12,3%						
----- NITROGÊNIO (g kg ⁻¹) -----						
30% CC	32,00 A a	27,06 AB b	25,68 B a	18,55 C b	21,11 C a	24,87
70% CC	33,53 A a	31,31 A a	26,54 B a	22,34 C a	20,41 C a	26,83
Média	32,76	29,18	26,10	20,75	20,44	
ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) < 0,05, GxH < 0,05. CV = 8,86%						
----- FÓSFORO (g kg ⁻¹) -----						
30% CC	0,90 A a	0,90 A a	0,86 A a	0,64 B a	0,62 B a	0,78
70% CC	0,74 BC b	0,97 A a	0,85 AB a	0,72 C a	0,64 C a	0,78
Média	0,82	0,93	0,85	0,68	0,63	
ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) > 0,05, GxH < 0,05. CV = 10,43%						
----- POTÁSSIO (g kg ⁻¹) -----						
30% CC	18,17 A a	18,41 A a	17,21 A a	15,18 B b	15,01 B b	16,80
70% CC	18,57 A a	18,34 A a	16,94 B a	16,48 B a	16,12 B a	17,30
Média	18,37	18,38	17,08	15,66	15,75	
ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) < 0,05, GxH < 0,05. CV = 4,94%						
----- CÁLCIO (g kg ⁻¹) -----						
30% CC	4,56	4,13	3,69	4,39	3,69	4,09 b
70% CC	4,55	4,52	3,97	4,39	4,01	4,29 a
Média	4,55 A	4,32 A	3,82 B	4,39 A	3,85 B	
ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) < 0,05, GxH > 0,05. CV = 8,87%						
----- MAGNÉSIO (g kg ⁻¹) -----						
30% CC	2,23	2,04	1,96	1,87	1,78	1,98 b
70% CC	2,27	2,22	2,09	1,85	1,89	2,07 a
Média	2,25 A	2,13 AB	2,02 B	1,86 C	1,83 C	
ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) > 0,05, GxH > 0,05. CV = 6,24%						
----- MANGANÊS (mg kg ⁻¹) -----						

30% CC	6,81 A b	4,37 B b	4,15 B b	3,60 B a	4,12 B a	4,61
70% CC	9,03 A a	6,73 B a	6,00 B a	3,61 C a	3,96 C a	5,86
Média	7,92	5,18	5,44	3,61	4,04	
ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) < 0,05, GxH < 0,05. CV = 21,09%						
----- ENXOFRE (g kg⁻¹) -----						
30% CC	2,49	2,25	2,02	1,56	2,49	2,16 a
70% CC	2,70	2,29	2,18	1,65	2,13	2,18 a
Média	2,60 A	2,17 AB	2,10 B	1,61 C	2,31 AB	
ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) > 0,05, GxH > 0,05. CV = 14,5%						
----- COBRE (mg kg⁻¹) -----						
30% CC	22,41	14,80	13,92	19,54	16,65	17,46 a
70% CC	20,23	16,85	20,75	17,99	16,23	18,41 a
Média	21,32 A	15,83 B	17,33 AB	18,76 AB	16,44 AB	
ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) > 0,05, GxH > 0,05. CV = 27,0%						
----- BORO (mg kg⁻¹) -----						
30% CC	31,15	25,48	25,07	24,26	24,93	26,18 a
70% CC	34,13	27,27	25,30	24,03	23,72	26,89 a
Média	32,64 A	26,38 B	25,18 B	24,15 B	24,31 B	
ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) > 0,05, GxH > 0,05. CV = 8,76%						
----- ZINCO (mg kg⁻¹) -----						
30% CC	8,42	7,85	5,14	9,14	5,54	7,22 a
70% CC	7,73	9,38	6,14	6,78	6,05	7,21 a
Média	8,08 AB	8,62 A	5,64 B	7,96 AB	5,80 B	
ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) > 0,05, GxH > 0,05. CV = 36,4%						

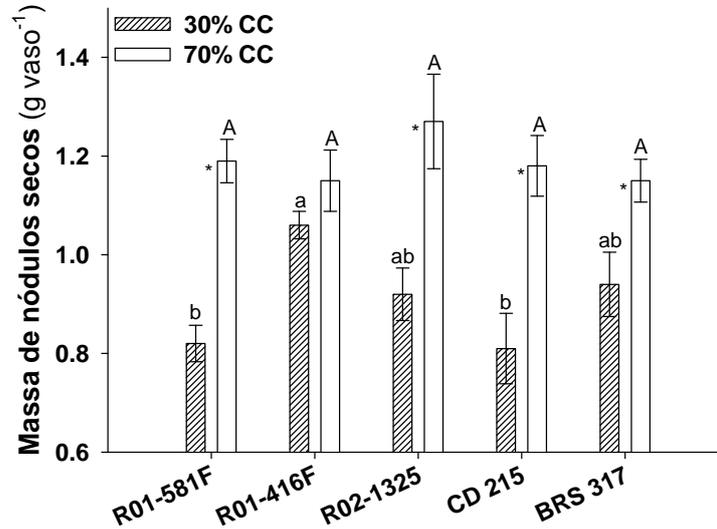
Letras maiúsculas comparam na linha, letras minúsculas comparam na coluna. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

5.3 BIOMASSA DA PARTE AÉREA, RAÍZES E NÓDULOS

A massa de nódulos secos apresentou interação entre genótipos e condição hídrica (Figura 5), enquanto a massa da parte aérea e raízes secas, e o número de nódulos (Figura 6) apresentaram somente efeito isolado dos fatores. Na condição de 30% CC o genótipo R01-416F apresentou maior MNS em relação aos genótipos R01-581F e CD 215. Além disso, esse genótipo não sofreu influência da restrição hídrica, sendo que os demais apresentaram redução da biomassa de nódulos sob restrição hídrica (Figura 5).

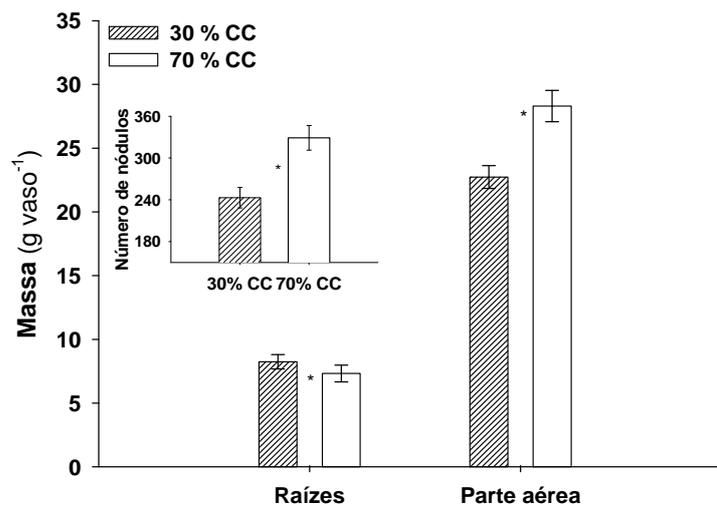
A restrição hídrica reduziu o número de nódulos e a produção de MPAS (Figura 6) em 26% e 21% respectivamente, enquanto que a MRS aumentou em média 13% nos genótipos sob deficiência hídrica; com incremento de 23% da MRS nos genótipos tolerantes e apenas 2,6% nos suscetíveis, em relação aos tratamentos sob suprimento hídrico adequado.

Figura 5 - Massa de nódulos secos em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.



Letras maiúsculas comparam os genótipos na condição de 70% CC, letras minúsculas comparam os genótipos na condição de 30% CC; letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * indica efeito significativo da condição hídrica dentro de cada genótipo. Barras verticais indicam o desvio-padrão ($n = 7$).

Figura 6 - Massa de raízes e parte aérea secas e número de nódulos em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência



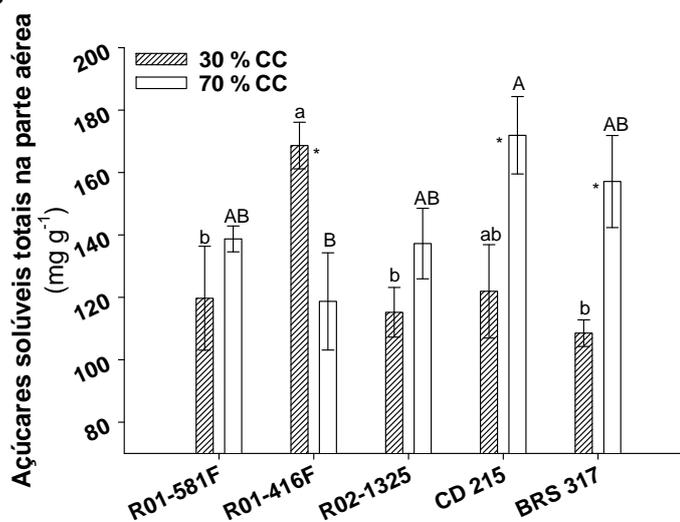
* Indica efeito significativo da condição hídrica dentro de cada genótipo, Tukey ($p < 0,05$). Barras verticais indicam o desvio-padrão ($n = 7$).

5.4 TEORES DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS NA PARTE AÉREA E NÓDULOS

O teor de AST na PA apresentou interação significativa entre os fatores, sendo que na condição de 30% CC, o genótipo R01-416F aumentou a concentração de AST na PA, os genótipos R01-581F e R02-1325 não foram afetados significativamente pelo déficit hídrico, enquanto que para os genótipos CD 215 e BRS 317 a restrição hídrica reduziu os teores de AST na PA (Figura 7). Na condição de restrição hídrica, o genótipo R01-416F apresentou incremento de 42% na concentração de AST na PA em relação ao tratamento sob 70% CC, enquanto que os genótipos suscetíveis sofreram redução de 30% nos teores de AST na PA sob restrição hídrica.

O teor de AST nos nódulos frescos apresentou apenas efeito isolado dos fatores (Tabela 4). Todos os genótipos apresentaram aumento no teor de AST nos nódulos quando submetidos à restrição hídrica, cujo incremento médio foi de 59% em relação aos tratamentos sob suficiência hídrica. Os genótipos R02-1325 e CD 215 apresentaram as maiores concentrações de AST nos nódulos frescos em relação ao genótipo R01-416F, que apresentou o menor teor.

Figura 7 - Concentração de açúcares solúveis totais na parte aérea de genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.



Letras maiúsculas comparam os genótipos na condição de 70% CC, letras minúsculas comparam os genótipos na condição de 30% CC; letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * indica efeito significativo da condição hídrica dentro de cada genótipo. Barras verticais indicam o desvio-padrão ($n = 7$).

Tabela 4 - Teor de açúcares solúveis totais (AST) em nódulos frescos de genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.

CONDIÇÃO HÍDRICA	GENÓTIPOS					
	R01-581F	R01-416F	R02-1325	CD 215	BRS 317	MÉDIA
	----- AST EM NÓDULOS FRESCOS (g kg ⁻¹) -----					
30% CC	10,77	6,93	10,65	12,73	8,99	10,01 a
70% CC	6,57	3,20	7,40	8,62	5,44	6,24 b
Média	8,70 AB	5,06 B	9,02 A	10,70 A	7,21 AB	

ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) < 0,05, GxH > 0,05. CV = 18,6%

Letras maiúsculas comparam na linha, letras minúsculas comparam na coluna. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

5.5 CONCENTRAÇÃO DE UREÍDOS NAS FOLHAS, PECÍOLOS E NÓDULOS

Os teores foliares de ureídeos apresentaram apenas efeito isolado dos fatores (Tabela 5), visto que a restrição hídrica levou ao aumento médio dos teores foliares de ureídeos em 37%, com a maior concentração observada no genótipo BRS 317, que diferiu apenas do genótipo CD 215. Os incrementos de ureídeos nas folhas dos genótipos com característica de FBN tolerante à seca foram na ordem de 30%, já nos genótipos suscetíveis observou-se aumento de 46% no teor de ureídeos foliares em relação aos genótipos sob 70% CC.

A concentração de ureídeos nos pecíolos das plantas que sofreram restrição hídrica foi maior no genótipo R01-581F e menor no BRS 317 (Figura 8A). O genótipo R01-416F não sofreu influência da condição hídrica quanto ao teor de ureídeos nos pecíolos, enquanto que para os demais genótipos a restrição hídrica aumentou os teores de ureídeos. Nesse caso, os teores de ureídeos nos pecíolos dos genótipos suscetíveis foi em média 9 vezes maior do que nos genótipos tolerantes, sendo que estes apresentaram maiores teores de ureídeos mesmo em condição de suprimento hídrico adequado.

O teor de ureídeos nos nódulos das plantas que sofreram restrição hídrica foi maior no genótipo R01-416F em relação aos genótipos CD 215 e BRS 317 (Figura 8B). A restrição hídrica aumentou a concentração de ureídeos nos nódulos de todos os genótipos, com aumento de mais de 100% em relação às plantas a 70% CC, com os maiores valores observados nos genótipos tolerantes. Porém, o incremento de ureídeos nos nódulos dos genótipos suscetíveis foi mais

expressivo do que para os genótipos tolerantes, 165% e 145%, respectivamente.

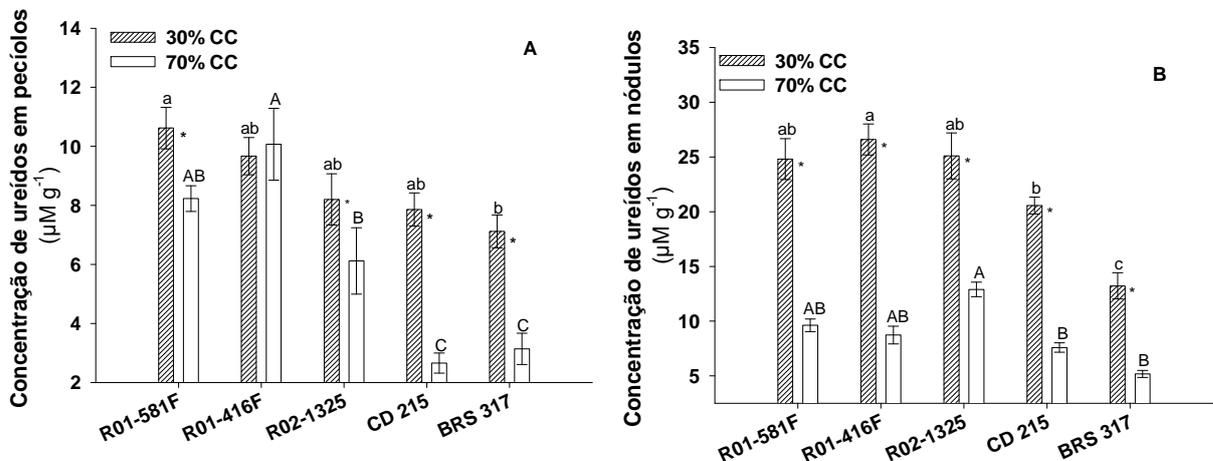
Tabela 5 - Concentração de ureídeos em folhas em genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência.

CONDIÇÃO HÍDRICA	GENÓTIPOS					MÉDIA
	R01-581F	R01-416F	R02-1325	CD 215	BRS 317	
	----- UREÍDOS EM FOLHAS ($\mu\text{M g}^{-1}$) -----					
30% CC	5,26	4,68	5,73	5,27	6,75	5,54 a
70% CC	4,19	4,29	3,54	3,42	4,80	4,05 b
Média	4,72 AB	4,49 AB	4,64 AB	4,35 B	5,77 A	

ANAVA= genótipo (G) < 0,05, condição hídrica (H) < 0,05, GxH > 0,05. CV = 13,6%

Letras maiúsculas comparam na linha, letras minúsculas comparam na coluna. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 8 - Concentração de ureídeos nos pecíolos (A) e nódulos (B) de genótipos de soja com diferentes capacidades de manter a fixação biológica de nitrogênio sob restrição hídrica, mantidos a 70% da capacidade de campo (CC), ou submetidos a 30% da CC entre 45 e 55 dias após a emergência



Letras maiúsculas comparam os genótipos na condição de 70% CC, letras minúsculas comparam os genótipos na condição de 30% CC; letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * indica efeito significativo da condição hídrica dentro de cada genótipo. Barras verticais indicam o desvio-padrão ($n = 7$).

6 DISCUSSÃO

A restrição hídrica afeta os processos fisiológicos e nutricionais das plantas, além de comprometer a eficiência da FBN, especialmente em soja (KING; PURCELL, 2005; SINCLAIR et al., 2007). Neste estudo, a restrição hídrica afetou a maioria dos parâmetros analisados, comprovando que as plantas estavam em situação de estresse quando impostas à restrição hídrica, pois sofreram alterações nos aspectos fisiológicos, como taxas fotossintética e transpiratória, no teor de nutrientes na PA e, ainda, no metabolismo do N e do C na PA e nódulos dos genótipos estudados.

A deficiência hídrica a que as plantas foram submetidas comprometeu a nodulação, pois o número de nódulos e MNS diminuíram sob restrição hídrica. Há de se destacar que essa resposta é bastante rápida, pois ocorreu com um período de restrição hídrica de apenas 10 dias, entre 45 e 55 dias após a emergência. No entanto, o genótipo R01-416F não reduziu significativamente a MNS na condição de 30% CC, mesmo apresentando diminuição no número de nódulos, quando comparado à condição de suprimento hídrico adequado. Esses resultados corroboram os estudos de King e Purcell (2001), os quais constataram que uma das características de tolerância à seca da cultivar Jackson em relação ao genótipo KS4895 está associada à maior biomassa de seus nódulos, sendo esse resultado um indicativo de tolerância do genótipo R01-416F.

A diminuição da biomassa da PA observada nesse estudo é uma resposta evidente à carência de água no solo, pois as plantas sob restrição hídrica sofreram redução na condutância estomática, com consequente diminuição na transpiração, limitação da difusão intercelular de CO₂, o que afetou a assimilação C pelo processo fotossintético. Segundo Ohashi et al. (2006), isso ocorre com intuito de controlar a perda de água e proteger a planta da condição de estresse. Além disso, as plantas podem evitar a dessecação mudando os padrões de alocação de carbono para permitir a prolongação do sistema radicular para a exploração de água em camadas mais profundas do solo (LOPES et al., 2011). Dessa forma, nos genótipos tolerantes um dos mecanismos de adaptação à restrição hídrica foi o aumento expressivo do sistema radicular.

O genótipo R01-581F se destacou quanto à capacidade de manter seus processos fisiológicos sob restrição hídrica. Embora tenha ocorrido redução da

massa nodular, diminuição na condutância estomática e menor eficiência intrínseca do uso da água em relação aos suscetíveis, conseguiu manter as mais altas taxas fotossintética, transpiratória e concentração intercelular de CO₂. Gilbert, Zwieniecki e Holbrook (2011) estudaram a relação entre capacidade fotossintética, condutância estomática e eficiência intrínseca do uso da água em 11 genótipos de soja submetidos à seca e concluíram que o aumento da eficiência intrínseca do uso da água pode ser um mecanismo que facilita a aclimatação das plantas às limitações hídricas, mas não pode ser usado como elemento isolado para seleção de genótipos tolerantes, pois deseja-se obter plantas em que o consumo de água reduzido esteja associado com aumento da produtividade pela maior capacidade fotossintética, o que não ocorreu nos genótipos suscetíveis deste estudo. A sustentação da taxa fotossintética e do teor de N na PA observados no genótipo R01-581F indica que esse genótipo mantém o potencial produtivo em condições de restrição hídrica, atributos herdados dos seus parentais, KS4895 (alta produtividade de grãos) e Jackson (FBN tolerante à seca). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Fenta et al. (2012), que encontraram variações genotípicas quanto à capacidade fotossintética, e constataram que o genótipo Jackson é capaz de manter elevadas taxas fotossintéticas mesmo com 14 dias de restrição hídrica.

Juntamente com o teor de N, fotossíntese e outros parâmetros relacionados às trocas gasosas, o melhor desempenho quanto ao teor de clorofila nos genótipos tolerantes, na condição estressante, sugere que estes estariam amenizando o efeito da restrição hídrica com intuito de garantir a produção, pois o teor de clorofila pode ser usado para avaliação dos danos no sistema fotossintético, como estimativa rápida e não invasiva do desempenho da fotossíntese, e por consequência da produtividade, que normalmente sofre diminuição quando as plantas são submetidas a algum tipo de estresse (BAKER; ROSENQVST, 2004).

Mesmo com o comprometimento na assimilação de CO₂ causada pela restrição hídrica, os teores de AST na PA do genótipo R01-416F foram aumentados, apesar de esse genótipo ter apresentado a menor taxa fotossintética na condição de restrição hídrica. Kaschuk et al. (2010) observaram que a atividade da FBN mantém altas taxas fotossintéticas, com sustentação de altas concentrações de clorofila, e diminuição no teor de carboidratos nas folhas, sendo que isso leva ao atraso na senescência foliar. No entanto, em condições de restrição hídrica, esses processos são prejudicados, com consequente aceleração do processo de

senescência. Dessa forma, o aumento nos AST na PA é uma resposta ao estresse hídrico, podendo ser prejudicial às plantas, pois leva à senescência foliar. Entretanto, Nepomuceno et al. (2001) citam que o acúmulo de alguns compostos que atuam como osmorreguladores e osmoprotetores, tais como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e íons inorgânicos, como o K^+ , representa um mecanismo de aclimatação à seca. Dessa forma, o aumento no teor de K e o acúmulo de AST na PA do genótipo R01-416F podem estar relacionados ao processo de aclimatação da planta, visto que esse genótipo demonstrou melhor desempenho quanto ao acúmulo de biomassa de nódulos. Como os teores de AST na PA dos genótipos R01-581F e R02-1325 não sofreram influência da restrição hídrica, sugere-se que esses genótipos estariam mantendo um melhor desempenho, em termos de assimilação de C, visto que também apresentaram altos teores de K na PA na condição de 30% CC, quando comparados aos genótipos suscetíveis, que poderia estar atuando como regulador osmótico. Além disso, nos genótipos com característica de FBN tolerante à seca, a concentração dos demais nutrientes na PA estava sendo menos prejudicada do que nos genótipos suscetíveis, demonstrando, novamente, que estes genótipos mantêm melhor desempenho em condições de seca.

Nos genótipos R01-581F, R01-416F e R02-1325, os maiores acúmulos de N_T na PA, independente da condição hídrica, e a manutenção de maiores concentrações de N na PA, mesmo sob restrição hídrica, confirmam maior tolerância da FBN nessa condição. Apesar de o genótipo suscetível BRS 317 não ter apresentado redução nos teores de N sob déficit hídrico, a concentração de N, em geral, foi menor do que naqueles genótipos que sofreram efeito negativo da restrição hídrica, demonstrando a baixa eficiência de sua FBN. A disponibilidade de N para as culturas é fator limitante à produtividade (RAY; HEATHERLY; FRITSCHI, 2006) e assim os maiores teores de N nos genótipos considerados tolerantes, corroboram os resultados encontrados por Chen et al. (2007), nos quais os genótipos R01-581F e R01-416F foram capazes de manter alta produtividade sob condições de restrição hídrica, o que deve estar relacionada à maior eficiência simbiótica desses genótipos. Sinclair et al. (2007) observaram maior acúmulo de N nos genótipos R01-581F e R01-416F do que nos parentais, indicando que esses genótipos possuem a combinação das características de robustez e FBN tolerante à seca. Além disso, King e Purcell (2006) observaram que existem diferenças na concentração de N na

PA entre diferentes genótipos de soja sob condições hídricas adequadas e que este fato está relacionado à sensibilidade/tolerância dos genótipos à FBN em condições de seca, sugerindo que genótipos que apresentam maiores teores de N na PA em condições de suprimento hídrico adequado tendem a acumular menores concentrações de ureídeos em toda a planta, sob restrição hídrica, o que ocorreu nos genótipos tolerantes desse estudo.

Os maiores teores de Mn observados nos genótipos com FBN menos sensível à seca em relação aos suscetíveis, confirma mais um atributo herdado do parental Jackson, que apresenta maiores concentrações de Mn na PA sob condições de restrição hídrica e consegue minimizar o acúmulo de ureídeos em toda a planta. Vadez e Sinclair (2002) observaram essa mesma tendência, mas citam que a via enzimática de degradação de ureídeos utilizada por Jackson não requer Mn como cofator. Entretanto, os resultados do presente estudo sugerem que possa haver uma relação entre ureídeos foliares e teores de Mn na PA, uma vez que os incrementos nos teores de ureídeos nas folhas dos genótipos suscetíveis foram mais expressivos, visto que estes apresentaram menores concentrações de Mn na PA.

Streeter (2003) também observaram acúmulo de ureídeos na PA de plantas de soja submetidas à restrição hídrica por uma semana, sendo que a concentração foi duas vezes maior nas plantas estressadas em relação ao tratamento controle. No entanto, Ladrera et al. (2007) não observaram a mesma tendência em seus estudos, visto que os genótipos Jackson e Biloxi não apresentaram alteração no conteúdo de ureídeos na PA em momentos iniciais de restrição hídrica moderada. Já Alamillo et al. (2010) observaram acúmulo de ureídeos na PA e raízes de feijão, mas não em nódulos, após 14 dias de indução da seca, sendo que nesse período a atividade da nitrogenase já havia cessado.

No presente estudo, a escassez de água no solo comprometeu a translocação e o metabolismo dos compostos nitrogenados, visto que ocorreu aumento no teor de ureídeos tanto nas folhas e pecíolos, quanto nos nódulos. Nos genótipos suscetíveis, o aumento nos pecíolos foi mais expressivo, mostrando que o metabolismo do N nesses genótipos estava sendo mais prejudicado do que nos genótipos tolerantes, já que os incrementos de ureídeos nos seus pecíolos, em condição de 30% CC, foram menores, ou nulo, como no caso do genótipo R01-416F. Os genótipos R01-581F, R01-416F e R02-1325 possuíam, mesmo em

condições hídricas adequadas, maiores teores de ureídos nos pecíolos em relação aos genótipos suscetíveis, na mesma condição. Dessa forma, pode-se sugerir, novamente, que a eficiência da FBN nesses genótipos é maior, pois o teor de ureídos em plantas sob suficiência hídrica é um parâmetro que explica o melhor desempenho da FBN.

Nos nódulos, o incremento substancial de ureídos em todos os genótipos comprova que ocorrem falhas no transporte desse composto nitrogenado durante períodos de restrição hídrica, condição em que o fluxo de água no xilema e floema é comprometido (SINCLAIR; VADEZ, 2012), ocorrendo acúmulo de ureídos nos nódulos, que pode levar à inibição da FBN. Para evitar a inibição da atividade da nitrogenase por retroalimentação do N-ureído, é essencial que os produtos nitrogenados sejam rapidamente transportados dos nódulos até a parte aérea da planta, onde serão metabolizados. Em estudos anteriores, Vadez, Sinclair e Serraj (2000) também associaram o aumento do teor de ureídos nos nódulos à inibição da FBN em condição de seca, mas questionam se o acúmulo de ureídos nos nódulos provém dos ureídos recém-sintetizados que deixam de ser exportados para a parte aérea pela falta de fluxo ascendente, ou se acumulam como resultado de um excesso de ureídos não metabolizados na parte aérea que são transportados de volta para os nódulos via floema. Diante disso, os resultados obtidos neste estudo sugerem que possa estar ocorrendo acumulação tanto dos ureídos recém-sintetizados, quanto dos ureídos não metabolizados na PA, pois se observou incremento deste composto em todas as partes da planta. No entanto, o incremento de ureídos nos nódulos foi mais expressivo, levando à conclusão de que a grande maioria de ureídos acumulados nos nódulos provém dos ureídos recém-sintetizados, que são candidatos potenciais à inibição da nitrogenase.

Ladrera et al. (2007) observaram acúmulo de ureídos nos nódulos dos genótipos Jackson e Biloxi quando submetidos à restrição hídrica, porém verificaram que em Biloxi, genótipo sensível à seca, esse acúmulo foi maior e ocorreu em um período curto de tempo, em relação a Jackson. Dessa forma, pode haver a possibilidade de os genótipos suscetíveis deste estudo estarem acumulando mais ureídos em períodos curtos de restrição hídrica, em relação aos tolerantes, porém não se pode confirmar essa hipótese, visto que a avaliação do teor de ureídos nas plantas ocorreu apenas após os 10 dias de restrição hídrica para todos os genótipos. Arrese-Igor et al. (2011) revisaram os possíveis mecanismos de

inibição da FBN em condições de seca e relataram que não há evidências de que o acúmulo de ureídos nos nódulos seja responsável por diminuir a FBN em condição de deficiência hídrica. No entanto, sugere-se que a presença de ureídos, juntamente com outros compostos nitrogenados e a disponibilidade de carboidratos nos nódulos, sejam potenciais candidatos envolvidos no *feedback* de inibição da FBN sob restrição hídrica.

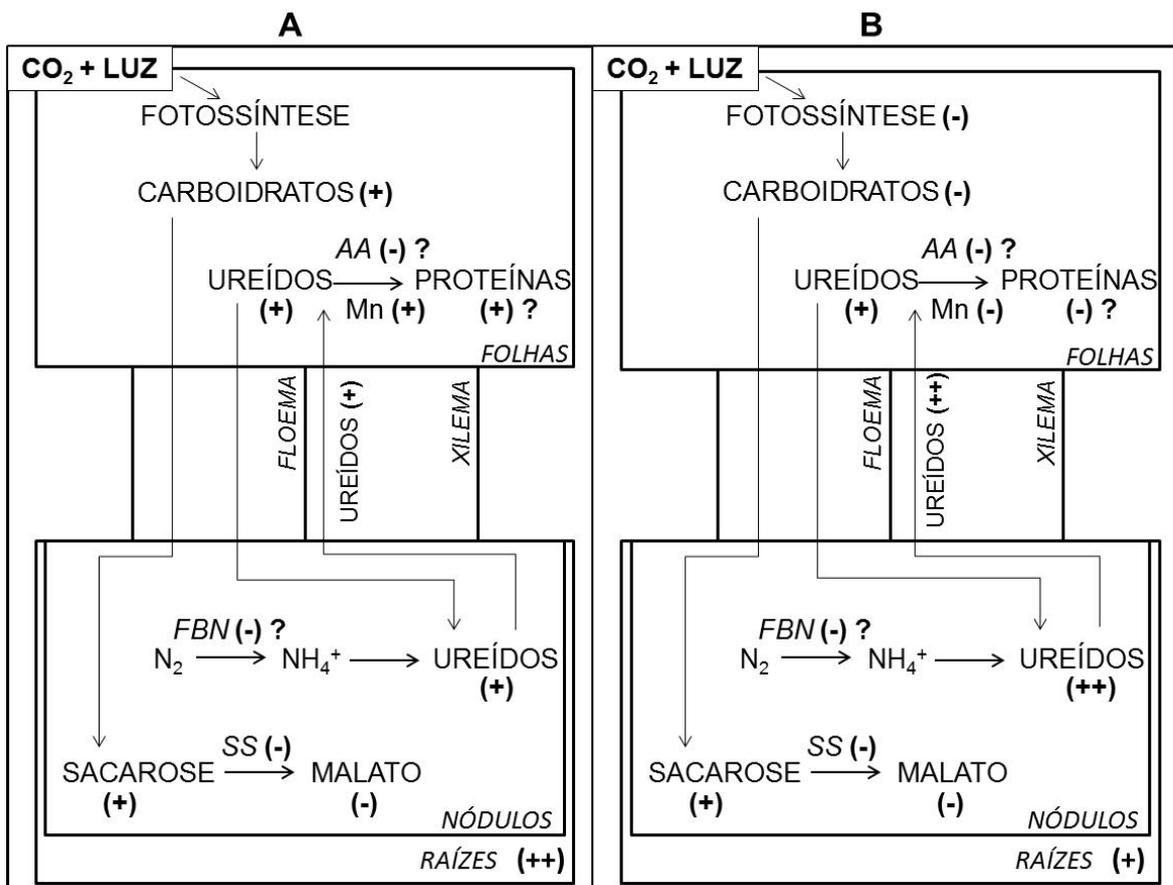
Neste trabalho, a disponibilidade de fontes de carboidratos pode ter afetado a FBN, pois o aumento no teor de AST nos nódulos, observado em todos os genótipos submetidos ao estresse hídrico, sugere que estaria ocorrendo diminuição da atividade da sacarose sintase, principal enzima envolvida na hidrólise de sacarose nos nódulos. Ladrera et al. (2007) observaram que a atividade dessa enzima foi a primeira a ser inibida no nódulo sob seca, porém a inibição ocorreu primeiro no genótipo Biloxi (sensível), enquanto que Jackson (tolerante) conseguiu manter por mais tempo sua atividade. Dessa forma, o declínio da atividade da sacarose sintase devido à restrição hídrica deve estar relacionado com o acúmulo de AST nos nódulos, resultando em falhas no metabolismo do C, com comprometimento no fornecimento de substratos de C, como o malato, que é utilizado como fonte de energia pelo bacteroide. Dessa forma, fica evidente que estaria ocorrendo comprometimento do metabolismo do C e N nos nódulos, sendo essas atividades essenciais ao bom funcionamento do processo de FBN.

Mesmo com todas as falhas metabólicas causadas pelo estresse hídrico moderado, os genótipos tolerantes demonstraram melhor manutenção de seus processos fisiológicos em relação aos genótipos suscetíveis, com melhor absorção de nutrientes, taxas fotossintéticas, teor de clorofila e regulação do metabolismo do N. Sugere-se que esses genótipos, além de apresentarem característica de manter o processo de FBN sob seca, são capazes de amenizar o efeito da escassez de água em toda planta, podendo ser considerados genótipos com característica de tolerância à restrição hídrica.

Com os resultados obtidos neste estudo, foi construído um fluxograma demonstrando os possíveis mecanismos envolvidos na inibição da FBN, sob restrição hídrica (Figura 9). Neste fluxograma, sugere-se que a translocação dos compostos nitrogenados dos nódulos até a PA seja comprometida, com acúmulo substancial de ureídos nos nódulos, tanto em genótipos suscetíveis quanto nos genótipos com FBN menos sensível à restrição hídrica, e que esses compostos

acumulam, em decorrência do período de seca, em demais partes da planta, como nos pecíolos e na PA. O aumento da concentração de ureídeos na PA pode estar relacionado a falhas na metabolização dos ureídeos, sendo que o Mn pode auxiliar a minimizar o acúmulo desse composto. Além disso, a ocorrência de secas compromete o metabolismo do C na planta, sendo que nos genótipos suscetíveis, as falhas no metabolismo são mais expressivas, demonstrando que os genótipos R01-581F, R01-416F e R02-1325 conseguem manter por mais tempo suas atividades fisiológicas, como fotossíntese e demais processos, como a FBN em condições de restrição hídrica, retardando os efeitos da seca.

Figura 9 - Fluxograma demonstrando os principais mecanismos envolvidos na inibição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em genótipos com FBN tolerante à seca (A) e em genótipos com FBN suscetíveis à seca (B); (+) = acúmulo; (-) = inibição; AA = alantoato amidohidrolase; SS = sacarose sintase.



CONCLUSÕES

A restrição hídrica afetou a maioria das variáveis analisadas neste estudo, porém os genótipos apresentaram respostas diferenciadas, sendo que aqueles com FBN menos sensível à seca apresentaram melhores resultados. Os genótipos R01-581, R01-416F e R02-1325, em geral, se mostraram superiores quanto à capacidade de manter seus processos fisiológicos, absorção de nutrientes, e regulação do metabolismo do C e N na parte aérea e nódulos, em condição de restrição hídrica, quando comparados aos genótipos suscetíveis CD 215 e BRS 317.

Os mecanismos envolvidos no processo de inibição da FBN sob seca parecem estar relacionados a falhas no metabolismo do C e N na parte aérea e nos nódulos, levando ao acúmulo de ureídeos nos nódulos, pecíolos e folhas, e escassez de substratos de C, na forma de malato, em decorrência da inibição da enzima SS. Apesar de os genótipos tolerantes terem apresentado alterações na maioria das variáveis analisadas diante da restrição hídrica, parece que conseguem retardar os efeitos da seca em toda planta. Portanto, esses genótipos são promissores para o uso em programas de melhoramento para o desenvolvimento de genótipos mais tolerantes à deficiência hídrica. Entretanto, mais estudos devem ser realizados com intuito de elucidar melhor os mecanismos envolvidos no *feedback* de inibição da FBN sob restrição hídrica, a fim de obter genótipos que mantenham a eficiência do processo simbiótico, bem como seus processos fisiológicos, e consequentemente garantam alta produtividade.

REFERÊNCIAS

- ALAMILLO, J.M. et al. Molecular analysis of ureide accumulation under drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 1828-1837, 2010.
- ALCANTARA, R.M.C.M.; REIZ, V.M. **Metabolismo do Carbono nos Nódulos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 253).
- ALIYEV, J.A.; MIRZOYED, R.S. Photosynthesis and productivity of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 65, n. 5-6, p. 60-70, 2010.
- ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, p. 1-9, 2003.
- ARRESE-IGOR, C. et al. Physiological responses of legume nodules to drought. **Plant Stress**, v. 5, p. 24–31, 2011.
- BAKER, N.R.; ROSENQVST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1607-1621, 2004.
- CARMO, J. B. et al. Disponibilidade de nitrogênio e fluxos de N₂O a partir de solo sob pastagem após aplicação de herbicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.735-746, 2005.
- CARVALHO, M.A.M.; PINTO, M.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, p. 275-280, 1998.
- CERRI, C.E.P. et al. Tropical agriculture and global warning: impacts and mitigation options. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 1, p. 83-99, 2007.
- CHARLSON, D.V.; KORTH, K.L.; PURCELL, L.C. Allantoate amidohydrolase transcript expression is independent of drought tolerance in soybean. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 3, p. 847-851, 2009.
- CHEN, P. et al. Registration of soybean germplasm lines R01-416F and R01-581F for improved yield and nitrogen fixation under drought stress. **Journal of Plant Registrations**, v. 1, n. 2, p. 166-167, 2007.
- 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**, Croácia, p. 79-118, 2011.
- CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira: grãos; décimo primeiro levantamento**. CONAB, 2012. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: dezembro de 2012.

DALL'AGNOL, A.; ROESSING, A.C.; LAZZAROTTO, J.J.; HIRAKURI, M.H.; OLIVEIRA, A.B. **O complexo agroindustrial da soja brasileira**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. (Embrapa Soja. Circular Técnica 43).

DURAN, V.A.; TODD, C.D. Four allantoinase genes are expressed in nitrogen-fixing soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 149-155, 2012.

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-CNPS. Documentos, 1).

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil 2011**. Embrapa Soja, Embrapa Cerrados, Embrapa Agropecuária Oeste, 2010. (Sistemas de Produção, nº 14).

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.

FARIAS, J.R.B.; NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2007. (EMBRAPA-CNPSO. Circular técnica, 48).

FENTA B.A. et al. 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 (2), p. 92-103, 2012.

FRANCO, A.A.; DOBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 20, p. 68–74, 1994.

FLEXAS, J. et al. Seasonal patterns and control of gas exchange in local populations of the Mediterranean evergreen shrub *Pistacia lentiscus*. **Acta Oecologica**, v. 22, p. 33-43, 2001.

GÁLVEZ, L.; GONZÁLEZ E.M.; ARRESE-IGOR, C. Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 419, p. 2551-2561, 2005.

GILBERT, M.E.; ZWIENIECKI, M.A.; HOLBROOK, N.M. Independent variation in photosynthetic capacity and stomatal conductance leads to differences in intrinsic water use efficiency in 11 soybean genotypes before and during mild drought. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2875–2887, 2011.

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.

HUNGRIA, M. et al. Segurança, equipamentos e técnicas em um laboratório de microbiologia do solo. 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. Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nódulos. In: HUNGRIA, M. E ARAUJO, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. EMBRAPA, Brasília, 1994. (EMBRAPA CNPAF. Documentos, 46).

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

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. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

IPCC (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE). **IPCC second assessment climate change 1995**. A report of the intergovernmental panel on climate change. 1995. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch>>. Acesso em: novembro de 2011.

IPCC (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE). **Climate change: the physical science basis**. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. IPCC, Paris, 2007. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch>>. Acesso em: novembro de 2011.

IPCC (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE). **Renewable energy sources and climate change mitigation**. 2011. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch>>. Acesso em: setembro de 2012.

KASCHUK, G. et al. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 1233-1244, 2009.

KASCHUK, G. et al. Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] dependent on N₂ fixation or nitrate supply. **Plant Biology**, v. 12, p. 60–69, 2010.

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

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

KING, C.A.; PURCELL, L.C. Genotypic variation for shoot N concentration and response to water deficits in soybean. **Crop Science**, v. 46, p. 2396–2402, 2006.

LADRERA, R. et al. Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean. **Plant Physiology**, v. 145, p. 539-546, 2007.

LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, v. 89, p. 871–885, 2002.

- LODWIG, E.; POOLE, P. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 1, p. 37-78, 2003.
- LOPES, M.S. et al. Enhancing drought tolerance in C4 crops. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-19, 2011.
- MANAVALAN, L.P. et al. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. **Plant and Cell Physiology**, v.50, p. 1260–1276, 2009.
- MARINO, D. et al. Nitrogen fixation control under drought stress. Localized or systemic? **Plant Physiology**, v. 143, p. 1968-1974, 2007.
- MENDES, I. et al. **Fixação biológica de nitrogênio na soja**: bom para a qualidade do solo, para o bolso do agricultor e para o Brasil. 2010. Disponível em: <<http://www.portaldiadecampo.com.br>>. Acesso em: novembro de 2012.
- NEPOMUCENO, A.L. et al. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 23, 2001.
- NOGUEIRA, A.C.L. **Agricultura**: o agronegócio da soja: produção nacional e mercado global. Análise de conjuntura, Informações FIPE: Fundação instituto de pesquisas econômicas, 2012.
- OHASHI, Y. et al. Effects of drought stress on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and stem diameter of soybean plants. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 1, p. 138-141, 2006.
- ONO, K. et al. Possible mechanisms of adaptive leaf senescence. **Plant Biology**, v. 3, p. 234-243, 2001.
- PEOPLES, M. B. et al. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Canberra: ACIAR, 1989. 76 p. (ACIAR Monograph, 11).
- PURCELL, L.C.; KING, C.A.; BALL, R.A. Soybean cultivar differences in ureides and the relationship to drought tolerant nitrogen fixation and manganese nutrition. **Crop Science**, v. 40, p. 1062-1070, 2000.
- RAY, J.D.; HEATHERLY, L.G.; FRITSCHI, F.B. Influence of large amounts of nitrogen on non-irrigated and irrigated soybean. **Crop Science**, v. 46, p. 52-60, 2006.
- RESENDE, A. S. de. et al. **Técnicas utilizadas na quantificação da fixação biológica de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 165).
- SADOK, W.; SINCLAIR, T.R. Chapter seven - Crops yield increase under water-limited conditions: review of recent physiological advances for soybean genetic improvement. **Advances in Agronomy**, v. 113, p. 325-349, 2011.
- SCHUBERT, M. **Carbon partitioning in nitrogen-fixing root nodules**. 2002. Tese (Doutorado) - University of Göttingen.

- SEARLE, P. L. The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. **Analyst**, v.109, p. 549-568, 1984.
- SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R. Variation among soybean cultivars in dinitrogen fixation response to drought. **Agronomy Journal**, v. 89, p. 963–969, 1997.
- SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R.; PURCELL, L.C. Symbiotic N₂ fixation response to drought. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 331, p. 143-155, 1999.
- SHELP B.J., IRELAND R.J. Ureide metabolism in leaves of nitrogen-fixing soybean plants. **Plant Physiology**, v. 77, p. 779-783, 1985.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Plant Biology**, v. 3, p. 217–223, 2000.
- SILVENTE, S.; SOBOLEV, A.P.; LARA, M. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.
- SINCLAIR, T.R.; VADEZ, V.; CHENU, K. Ureide accumulation in response to Mn nutrition by eight soybean genotypes with N₂ fixation tolerance to soil drying. **Crop Science**, v. 43, p. 592-597, 2003.
- 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 & Pasture Science**, v. 63, p. 501-512, 2012.
- STREETER, J.G. Effects of drought on nitrogen fixation in soybean root nodules. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 1199-1204, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4^a ed. Artmed: Porto Alegre, 2009.
- USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). **World agricultural supply and demand estimates**. 2012. Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: agosto de 2012.
- VADEZ, V.; SINCLAIR, T.R.; SERRAJ, R. Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N₂ fixation in soybean. **Physiologia Plantarum**, v. 110, p. 215-223, 2000.
- VADEZ, V.; SINCLAIR, T.R. Sensitivity of N₂ fixation traits in soybean cultivar Jackson to manganese. **Crop Science**, v. 42, p. 791-796, 2002.
- VOGELS, G.D.; van der DRIFT, C. Differential analysis of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, v. 33, p. 143-157, 1970.
- WANG, J. et al. Modeling impacts of alternative practices on net global warming potential and greenhouse gas intensity from rice–wheat annual rotation in China. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

WINKLER R.G. et al. Enzymic degradation of allantoate in developing soybeans. **Plant Physiology**, v. 79, p. 787-793, 1985.

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

ZAHRAN, H.H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 4, p. 968-989, 1999.