

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI
E DAS MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**

HELENA CHAVES TASCA

**TROCAS GASOSAS, ESTRESSE OXIDATIVO E FIXAÇÃO
BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE SOJA
(*Glycine max* (L.) Merr.) SOB DÉFICIT HÍDRICO**

ERECHIM, MARÇO DE 2023.

HELENA CHAVES TASCA

**TROCAS GASOSAS, ESTRESSE OXIDATIVO E FIXAÇÃO
BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE SOJA
(*Glycine max* (L.) Merr.) SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia.

Linha de Pesquisa: Ambiente e Tecnologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tanise Luisa Sausen

Coorientadores: Prof. Dr. Rogério Cansian e Prof. Dr. Geraldo Chavarria

ERECHIM, MARÇO DE 2023.

T197t Tasca, Helena Chaves

Trocas gasosas, estresse oxidativo e fixação biológica de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) sob déficit hídrico / Helena chaves Tasca. – 2023.

45 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2023.

“ Orientação: Prf.^a Dr^a Tanise Luisa Sausen; Co-orientadores Prof. Dr. Rogério Cansian, Prof. Dr. Geraldo Chavarria”

1. Fossíntese 2. Peróxido - hidrogênio 3. Peroxidação - lipídios 4. Nodulação
I. Título

C.D.U. 581

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

HELENA CHAVES TASCA

**TROCAS GASOSAS, ESTRESSE OXIDATIVO E FIXAÇÃO
BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE SOJA
(*Glycine max* (L.) Merr.) SOB DÉFICIT HÍDRICO**

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a TANISE LUISA SAUSEN

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim

Prof. Dr. ROGÉRIO CANSIAN

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim

Prof. Dr. GERALDO CHAVARRIA

Universidade de Passo Fundo

Prof.^a Dr.^a CLARICE STEFFENS

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim

Dr.^a CAROLINE MÜLLER

Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus de Erechim

Erechim, março de 2023.

AGRADECIMENTOS

Essa trajetória é repleta de conhecimentos, científicos e pessoais, que me fizeram crescer e me descobrir. Sinto que de fato aproveitei todas as emoções que passaram por mim, fico grata por estar disposta a viver esse mestrado.

Tive companhia, ajuda e apoio de pessoas muito importantes na minha vida, agradeço a todos que de alguma forma estiveram comigo.

Sou grata à minha família, em especial minha mãe e irmã, que estiveram presente em todas as etapas: pesando vasos de terra, semeando, macerando folhas e lendo as escritas. Obrigada por perceberem o quanto a pesquisa é importante para mim, e por se envolverem junto.

Agradeço aos meus amigos, que demonstraram apoio a essa trajetória e me incentivaram a continuar, mesmo com dó das plantas que ficam sem água.

Aos meus colegas de mestrado, que compartilharam desesperos e conquistas, aulas online e à campo, café e chopp; vocês fizeram essa etapa ser ainda mais incrível.

Agradeço ao time ECOSSIS que me acompanhou e ajudou, principalmente nos dias de coleta e análises; sem vocês eu ainda estaria contando nódulos!

Sou grata à minha orientadora e grande inspiração, Tanise Sausen, pelos ensinamentos, conversas e explicações, que me fizeram crescer como pesquisadora. Obrigada pela empatia e amizade. Agradeço também aos meus coorientadores, Rogério Cansian e Geraldo Chavarria, que sempre estiveram disponíveis e dispostos a me ajudar.

Agradeço ao PPG Ecologia e a URI Erechim pela estrutura e auxílio para desenvolver a pesquisa.

Finalmente, agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa, a qual foi essencial para iniciar e concluir esse sonho.

Trocas gasosas, estresse oxidativo e fixação biológica de nitrogênio em plantas de soja
(*Glycine max* (L.) Merr.) sob déficit hídrico

Helena Chaves Tasca

Prof.^a Dr.^a Tanise Luisa Sausen, Prof. Dr. Rogério Cansian e Prof. Dr. Geraldo Chavarria

03 de março de 2023

Resumo

No contexto ecológico e econômico, o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a mais eficiente forma de absorção de nitrogênio para as plantas, em especial para leguminosas, como a soja (*Glycine max* (L.) Merr.). Um dos principais fatores limitantes da produtividade vegetal é a restrição hídrica, a qual causa redução na assimilação de carbono, aumento do estresse oxidativo, além de afetar a nodulação, e consequentemente, a FBN. Tendo em vista a importância de práticas agrícolas sustentáveis e conciliando o aumento da produtividade vegetal com a adoção de manejos que considerem aspectos ecológicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do déficit hídrico sobre atributos fisiológicos e a eficiência de FBN em plantas de soja durante estágio de desenvolvimento vegetativo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação utilizando a cultivar de soja BMX Zeus IPRO. Inicialmente, as sementes foram inoculadas com cepas de *Bradyrhizobium*, tratadas com micronutrientes e extrato de algas e, no estágio V4, realizada a aplicação de tratamento foliar. No estágio V6, as plantas foram divididas em dois tratamentos: i) grupo controle (C), com plantas irrigadas; e ii) déficit hídrico (DH), com suspensão de irrigação, por oito dias. As trocas gasosas foram avaliadas aos 2, 5 e 8 dias após a imposição dos tratamentos. Ao final do período experimental, foram avaliados o *status* hídrico, produção de peróxido de hidrogênio e peroxidação de lipídios, acúmulo de prolina, atributos de crescimento e da eficiência de nodulação das plantas de soja. Com a suspensão da irrigação observou-se uma redução temporal das trocas gasosas, com redução da taxa de transpiração e concentração intercelular de CO₂ após dois dias de suspensão da irrigação e uma acentuada redução na taxa fotossintética, condutância estomática e eficiência de carboxilação a partir do quinto dia após a imposição do déficit hídrico. As plantas expostas ao DH apresentaram redução no conteúdo relativo de água na folha, na massa foliar, na taxa de assimilação de carbono e aumento na produção de H₂O₂, peroxidação de lipídios e acúmulo de prolina. Embora a fotossíntese tenha sido mais afetada pelo déficit hídrico, a eficiência da FBN não foi

comprometida na mesma intensidade. As plantas em déficit hídrico exibiram menor número e massa de nódulos, porém, sem diferenças significativas no conteúdo de nitrogênio entre folhas e nódulos quando comparadas com as plantas irrigadas. Os resultados deste estudo indicam que os efeitos negativos de períodos de déficit hídrico foram mais acentuados na fixação de carbono em plantas de soja do que sobre o metabolismo de nitrogênio. O padrão temporal de redução na fotossíntese foi resultado de limitações não-estomáticas (redução na eficiência de carboxilação) e foi acompanhado por estresse oxidativo e efeitos protetivos ao déficit hídrico evidenciados pelo acúmulo de prolina. Apesar da acentuada redução na fotossíntese, a eficiência da FBN durante períodos de déficit hídrico não foi limitada na mesma intensidade, visto que a concentração de nitrogênio tanto nos nódulos como nas folhas não foi reduzida. Os resultados deste estudo mostraram que as plantas em déficit hídrico apresentaram maior eficiência no uso do nitrogênio.

Palavras-chave: fotossíntese; peróxido de hidrogênio; peroxidação de lipídios; prolina; nodulação; seca.

Gas exchange, oxidative stress and biological nitrogen fixation in soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.) under water deficit

Helena Chaves Tasca

Prof.^a Dr.^a Tanise Luisa Sausen, Prof. Dr. Rogério Cansian e Prof. Dr. Geraldo Chavarria

March, 3rd, 2023

Abstract

In ecological and economic contexts, the process of biological nitrogen fixation (BNF) is the most efficient way of nitrogen uptake for plants, especially for leguminous species like soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). One of the main limiting factors for plant productivity is water restriction, which leads to reduced carbon assimilation, increased oxidative stress, and affects nodulation and, consequently, BNF. Considering the importance of sustainable agricultural practices and balancing increased plant productivity with ecological considerations, the objective of this study was to assess the effects of water deficit on physiological attributes and BNF efficiency in soybean plants during the vegetative development stage. The experiment was conducted in a greenhouse using the soybean cultivar BMX Zeus IPRO. Initially, the seeds were inoculated with *Bradyrhizobium* strains, treated with micronutrients and algae extract, and at the V4 stage, foliar treatment was applied. At the V6 stage, the plants were divided into two treatments: i) control group (C) with regular irrigation, and ii) water deficit (WD) with irrigation suspended for eight days. Gas exchange measurements were evaluated at 2, 5, and 8 days after treatment imposition. At the end of the experimental period, water status (RWC), hydrogen peroxide production (H₂O₂), lipid peroxidation (TBARS), proline accumulation, growth attributes, and nodulation efficiency (number, mass and carbon and nitrogen content in nodules) of soybean plants were assessed. Water deficit caused a temporal reduction in gas exchange, with decreased transpiration rate and intercellular CO₂ concentration after two days of irrigation suspension, and a marked reduction in photosynthetic rate, stomatal conductance, and carboxylation efficiency from the fifth day after water deficit imposition. Plants exposed to water deficit showed a decrease in RWC, leaf mass, carbon assimilation rate, and an increase in H₂O₂, TBARS, and proline accumulation. Although photosynthesis was more affected by

water deficit, BNF efficiency was not compromised to the same extent. Plants under water deficit exhibited fewer and smaller nodules, but with no significant differences in nitrogen content between leaves and nodules compared to irrigated plants. The results of this study indicate that the negative effects of water deficit were more pronounced on carbon fixation in soybean plants than on nitrogen metabolism. The temporal pattern of photosynthesis reduction was attributed to non-stomatal limitations (reduced carboxylation efficiency) and was accompanied by oxidative stress and protective effects of water deficit, as evidenced by proline accumulation. Despite the marked reduction in photosynthesis, BNF efficiency during water deficit periods was not limited to the same extent, as the nitrogen concentration in both nodules and leaves was not reduced. The results of this study showed that plants in water deficit had greater efficiency in the nitrogen use efficiency.

Keywords: photosynthesis; hydrogen peroxide; lipid peroxidation; proline; nodulation; drought.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados do teste t para a taxa de assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E), concentração interna de CO₂ (C_i) e eficiência de carboxilação (A/C_i) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar BMX Zeus IPRO, após oito dias da imposição dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0.05$).

Tabela 2 – Índice de clorofila (IC), área foliar (AF), área foliar específica (AFE), massa seca da folha (MS) e conteúdo relativo de água (CRA) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), cultivar BMX Zeus IPRO, após oito dias da imposição dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). Valores representam médias $\pm$ erro padrão ($n = 28 - 40$). Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0.05$).

Tabela 3 – Número de nódulos (Nod), massa fresca dos nódulos (MFnod), massa seca dos nódulos (MSnod), conteúdo de nitrogênio foliar (Nf), conteúdo de nitrogênio no nódulo (Nnod), conteúdo de carbono foliar (Cf), conteúdo de carbono no nódulo (Cnod) e eficiência no uso do nitrogênio (EUN) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), cultivar BMX Zeus IPRO, após oito dias da imposição dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). Valores representam médias $\pm$ erro padrão ($n = 28 - 38$). Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0.05$).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxa de assimilação de CO₂ (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (a), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (b), taxa de transpiração (E , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (c), concentração intracelular de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e eficiência de carboxilação (A/C_i) (e) de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar BMX Zeus IPRO, sob condições controle (C) e déficit hídrico (DH), após oito dias da imposição dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). Dados representam médias $\pm$ erro padrão ($n = 40$). Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0.05$).

Figura 2 - Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (a), Peroxidação de lipídios (TBARS) (b) e concentração de prolina (c) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar BMX Zeus IPRO, após oito dias da imposição dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). Barras representam médias $\pm$ erro padrão ($n = 10$). Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0.05$).

Figura 3 - Análise de componentes principais entre os tratamentos hídricos, controle (C) e déficit hídrico (DH) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), cultivar BMX Zeus IPRO, após oito dias da imposição dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). Boxplot entre PC1 e PC2 mostram a contribuição dos atributos de trocas gasosa, conteúdo de água, bioquímicos e de eficiência de nodulação na variabilidade e segregação de plantas de soja expostas a diferentes tratamentos hídricos.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	8
REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO I: Trocas gasosas, estresse oxidativo e fixação biológica de nitrogênio em plantas de soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) sob déficit hídrico	17
INTRODUÇÃO	20
METODOLOGIA.....	21
<i>Condições experimentais</i>	<i>21</i>
<i>Delineamento experimental e imposição dos tratamentos</i>	<i>22</i>
<i>Trocas gasosas e índice de clorofila.....</i>	<i>23</i>
<i>Estresse oxidativo e concentração de prolina</i>	<i>23</i>
<i>Nodulação, conteúdo de C e N nas folhas e nódulos, e eficiência no uso de N</i>	<i>24</i>
<i>Análise de dados</i>	<i>25</i>
RESULTADOS	25
<i>Conteúdo de água, trocas gasosas, área e massa foliar e clorofila</i>	<i>25</i>
<i>Peróxido de hidrogênio, peroxidação de lipídios e concentração de prolina.....</i>	<i>28</i>
<i>Nodulação, conteúdo de C e N nas folhas e nódulos, e eficiência no uso de N</i>	<i>29</i>
<i>Análise de Componentes Principais</i>	<i>30</i>
DISCUSSÃO	31
CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
CONCLUSÃO GERAL	40

INTRODUÇÃO GERAL

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para todos os organismos vivos, pois compõem moléculas complexas necessárias para o desenvolvimento, como a constituição das proteínas e dos ácidos nucleicos (EPSTEIN e BLOOM, 2006). Embora em abundância na atmosfera (~78%), as plantas não têm a capacidade de acessar diretamente o nitrogênio atmosférico (N_2) devido à alta estabilidade da ligação tripla covalente entre os dois átomos de nitrogênio (EVERT e EICHHORN, 2014). Desse modo, dependem da quebra dessa ligação e transformação do N_2 em compostos nitrogenados mais reativos, como nitrato (NO_3^-) ou amônia (NH_3^+), processo conhecido com fixação do nitrogênio, que pode ocorrer por processos industriais e naturais (EVERT e EICHHORN, 2014; KERBAUY, 2019).

Os fertilizantes nitrogenados são as principais fontes desse nutriente para as plantas, disponibilizando o N na forma de amônia (NH_3^+), a qual é rapidamente assimilável (HUNGRIA; MENDES, 2015; RODRIGUES et al., 2017; BRASIL, 2019). No entanto, a transformação de N_2 em NH_3 é feita a alto custo econômico e ambiental, por requerer um derivado de gás de petróleo, catalisador contendo ferro, altas temperaturas (300 a 600 °C) e altas pressões (200 a 800 atm) (HUNGRIA et. al., 2007; REICHLE; FELDERHOFF; SCHÜTH, 2021). Ainda, os fertilizantes químicos têm baixa eficiência de absorção uma vez que cerca de 50% da quantidade aplicada pode ser perdida via lixiviação, desnitrificação ou volatilização (HUNGRIA et. al., 2007), acarretando, ainda, em prejuízos ambientais.

De forma natural, o nitrogênio pode ser absorvido pelas plantas diretamente do solo, principalmente através do processo de decomposição da matéria orgânica. Porém, essa fonte de nitrogênio é pequena e variável, pois as condições de temperatura e umidade do território brasileiro aceleram a decomposição e perdas de N, resultando em solos com baixos teores desse nutriente (HUNGRIA et al., 2001). Ainda, eventos como descargas elétricas, combustão e vulcanismo disponibilizam nitrogênio inorgânico, conhecido como fixação não-biológica, porém com uma contribuição de apenas 10% da entrada anual de N na Terra (HUNGRIA et al., 2007).

A principal fonte de N, nos contextos econômico e ecológico, ocorre através da fixação biológica do nitrogênio (FBN), com aproximadamente 65% da entrada de N anual (HUNGRIA et al., 2007). A FBN ocorre por meio de bactérias do gênero *Rhizobium* capazes de quebrar a tripla ligação do N_2 . Essas bactérias podem ser de vida livre no solo ou

estabelecer relações simbióticas com plantas leguminosas. A simbiose envolve a alocação de açúcares da planta para o funcionamento da bactéria, que, em troca, disponibiliza componentes nitrogenados diretamente para a planta (EVERT e EICHHORN, 2014).

A simbiose planta-bactéria se inicia na germinação da semente e formação das raízes das plantas, com a exsudação de flavonoides à rizosfera (BEGUM et al., 2001). A resposta das bactérias a esses sinais químicos é a secreção de genes Nod, necessários para a bactéria reconhecer o hospedeiro, iniciar a infecção e formação do nódulo, onde ocorre o processo de fixação biológica (DÉNARIÉ, CULLIMORE, 1993; HUNGRIA et al., 2001; COOPER; SCHERER, 2012; LI et al, 2020; BOSSE et al., 2021).

Com o nódulo formado, ocorre a síntese de diversas enzimas, em especial a nitrogenase, responsável pela catalisação do N_2 e sua posterior fixação, além de nutrientes e proteínas necessárias para o bom funcionamento da nitrogenase e dos processos metabólicos da bactéria (HUNGRIA et al., 2007; EVERT e EICHHORN, 2014). A fixação do nitrogênio atmosférico resulta em amônia (NH_3), composto nitrogenado que as plantas são capazes de absorver; à amônia são incorporados íons hidrogênio, abundantes nas células das bactérias, transformando-se em íons amônio (NH_4^+) que serão distribuídos para a planta hospedeira e incorporados em diversas formas de N orgânico, como os ureídeos, aminoácidos e amidas (HUNGRIA et al., 2007).

No Brasil, as pesquisas sobre processo de fixação do nitrogênio se iniciaram na década de 40, através da inoculação em plantas cultivadas como soja, feijão e trevo, por José Gomes da Silva, no Instituto Agrônomo de Campinas, e por João Rui Jardim Freire, na Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul (DÖBBEREINER e DUQUE, 1980). Na década seguinte, a pesquisadora Johanna Döbereiner (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA) liderou os primeiros estudos sobre a viabilidade do processo de FBN como substituto de fertilizantes minerais, com descobertas de novas bactérias fixadoras de nitrogênio associadas à rizosfera de algumas gramíneas (DÖBBEREINER, 1953; DÖBBEREINER e RUSCHEL 1958).

Nos anos 60, com a criação da Comissão Nacional de Soja, passou-se a recomendar que trabalhos de melhoramento de soja fossem feitos apenas com inoculação e sem uso de fertilizantes nitrogenados, visto a alta produtividade comparada à soja fertilizada com fontes de N inorgânico (WEBER, 1966 apud ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; DÖBBEREINER e DUQUE, 1980). Assim, mais pesquisas sobre a FBN foram

desenvolvidas, como a comparação de cepas de *Rhizobium japonicum* isoladas e locais (JARDIM-FREIRE; VIDOR, 1981 apud ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003), avaliação da eficiência de cepas com base na quantidade de N₂ fixado por biomassa do nódulo (NEVES et al., 1985), efeitos de diferentes condições de luminosidade (SANTOS; NEVES; RUMJANEK, 1996) e durabilidade da eficiência e competitividade das cepas (HUNGRIA et al., 1999 apud ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003). Desde então, novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando potencializar o processo de FBN, através de processos de reinoculação, co-inoculação e aplicação de produtos fisiológicos.

A simbiose planta-bactéria resulta de um processo de milhões de anos de co-evolução, onde se observa que bactérias específicas conseguem desenvolver nódulos em tipos específicos de plantas. Então, quando tratamos de leguminosas exóticas, como é o caso da soja, com a origem genética na China, é necessário que haja o fornecimento de bactérias no primeiro ano de cultivo, através do processo de inoculação (HUNGRIA et al., 2007; ZILLI et al., 2021). As bactérias podem permanecer no solo, porém o seu crescimento é limitado por diversos fatores ambientais e nutricionais, e estimativas apontam que somente 10% da população microbiana permaneça ativa (HUNGRIA et al., 2007). Assim, a reinoculação, isto é, o fornecimento anual de bactérias em áreas já cultivadas com soja é importante e vantajoso (SEIXAS et al., 2020). Pesquisas apontam um ganho médio de pelo menos 8% no rendimento anual de grãos e maiores concentrações de N com a reinoculação (HUNGRIA et al., 2007; MERCANTE et al., 2011). Segundo Ulzen e colaboradores (2018) alguns fatores como a população nativa de rizóbios, umidade do solo, precipitação diária e radiação solar influenciam a persistência de novas cepas introduzidas (*Bradyrhizobium yuanmingense* e *B. japonicum*).

A co-inoculação é a união de dois microrganismos que atuam em diferentes processos microbianos, otimizando o crescimento da planta (BARBOSA et al., 2021). A eficiência dessa técnica está relacionada à seleção adequada das cepas, à concentração celular de cada uma, ao método de inoculação (aplicado nas sementes, via foliar ou no sulco) e ao genótipo da planta (SANTOS et al., 2019). A mistura de alguns inoculantes pode resultar em precocidade de nodulação, o que pode ocasionar um maior rendimento da cultura (CHIBEBA et al., 2015). A associação entre uma bactéria promotora de crescimento de plantas, *Azospirillum brasilense* e a rizobactéria *Bradyrhizobium* spp., largamente utilizada no Brasil, foi descrita por aumentar, em média, 16% o rendimento de grãos da soja

(HUNGRIA et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2018). Nas culturas do feijão-caupi e do trigo, a coinoculação com *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense*, aumentou o nitrogênio acumulado nas plantas e melhorou a eficiência no uso do nitrogênio, levando também ao maior rendimento de grãos (GALINDO, et al, 2021).

As leguminosas que fixam N₂ necessitam de teores nutricionais maiores do que aquelas que recebem N mineral, devido à demanda da planta hospedeira, do rizóbio e do sistema simbiótico (HUNGRIA et al., 2007). O cobalto (Co) e o molibdênio (Mo), por exemplo, são elementos essenciais para o processo de FBN e, com a intensificação da agricultura e alterações no pH do solo, é observado o empobrecimento desses nutrientes, sendo recomendada a sua suplementação (EMBRAPA, 2020). O Co é componente da coenzima cobamina, precursora da leghemoglobina, responsável pelo transporte de oxigênio (HUNGRIA et al., 2001). O Mo faz parte da enzima nitrogenase, responsável pela redução do N₂ em amônia (HUNGRIA et al., 2001; SINGH, KUMAR, 2008). Além desses elementos, o níquel (Ni), componente estrutural da urease e hidrogenase, participa do metabolismo do nitrogênio e sua deficiência reduz o nível de atividade dessas enzimas (KLUCAS et al, 1983; LAVRES et al., 2016)

Além de deficiência nutricional, estudos recentes têm demonstrado que períodos de restrição hídrica mais severa, ou mesmo episódios pontuais, podem prejudicar a nodulação das plantas (ALCÂNTARA, et al., 2017; CEREZINI et al., 2020; MORETTI et al., 2021). O déficit hídrico reduz o crescimento e o número de nódulos tanto em genótipos tolerantes quanto sensíveis à seca, afetando negativamente o metabolismo de FBN (CEREZINI et al., 2020). Segundo esses autores, mesmo em genótipos considerados tolerantes à seca observou-se menor acúmulo de ureídeos, produtos da FBN. Essa redução no acúmulo de ureídeos em tecidos, folhas e nódulos está relacionada com a sensibilidade da FBN em resposta à seca (SINCLAIR et al., 2003; PURCELL et al., 2004, KING e PURCELL, 2005).

Uma questão bem estabelecida é que o déficit hídrico reduz a FBN, a qual está diretamente associada com a redução na atividade da nitrogenase do nódulo (KING e PURCELL, 2005), diminuição da atividade da sacarose sintase (MARINO et al., 2007; CEREZINI et al., 2017), maior acúmulo de ureídeos nos nódulos e redução desses compostos em outros órgãos vegetais (PURCELL et al., 2004). Além disso, os efeitos do déficit hídrico sobre a produtividade vegetal são bem estabelecidos na literatura e podem envolver limitações estomáticas e não-estomáticas à fotossíntese (TEZARA et al., 1999,

LAWLOR, 2002), que culminam na menor produção e translocação de fotoassimilados, resultando numa restrição à FBN.

A concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs), em condições adequadas, é mantida sob estrito controle por um sistema de defesa antioxidante que incluem componentes enzimáticos e não-enzimáticos (MENEZES, 2019). No entanto, em condições de estresse, ocorre o desbalanço entre a produção e consumo das EROs, causando o estresse oxidativo (SOARES et al., 2019). No caso do déficit hídrico, há o aumento de produção de EROs em diferentes compartimentos celulares (cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias), resultando em estresse oxidativo (CRUZ DE CARVALHO, 2008). Moretti et al. (2021) verificaram que o consórcio bacteriano, constituído por *Bradyrhizobium* spp. e cepas de *A. brasilense* combinadas com aplicação de metabólitos secundários microbianos, pode aliviar o dano oxidativo durante períodos de déficit hídrico em plantas de soja. Segundo os autores, o consórcio microbiano melhorou a nodulação da soja e, conseqüentemente, a produtividade de grãos da cultura.

Considerando que as mudanças climáticas têm causado períodos mais frequentes de DH durante o ciclo das culturas, e a importância do processo de FBN para a redução do uso de fertilizantes, a presente trabalho buscou avaliar os efeitos do déficit hídrico nos atributos fisiológicos, oxidativos, de crescimento, e da fixação biológica de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) durante estágio de desenvolvimento vegetativo. Esta dissertação compreende um capítulo, apresentado em formato de manuscrito científico, intitulado: “Trocias gasosas, estresse oxidativo e fixação biológica de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) sob déficit hídrico”.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, R. M. C. M. et al. Fixação biológica do Nitrogênio. In: CARDOSO, M. J. **Feijão-Caupi: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa. p. 95-105. 2017.
- ALVES, B. JR.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and soil**, v. 252, p. 1-9, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1024191913296>
- BARBOSA, J. Z. et al. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 163, p. 103913, 2021. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103913>
- BEGUM, A. A.; LEBOVITCH, S.; MIGNER, P.; ZHANG, F. I. Inoculation of pea (*Pisum sativum* L.) by *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae preincubated with naringenin and hesperetin or application of naringenin and hesperetin directly into soil increased pea nodulation under short season conditions. **Plant and Soil**, v. 237, n. 1, p. 71-80, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.360.1537>
- BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Association of *Azospirillum* and other diazotrophs with tropical gramineae (28-47). In: **Non-symbiotic N₂ Fixation and Organic Matter in the Tropics. Symposia Paper I, Transactions of the 12th International Congress of Soil Science, New Delhi**. 1982.
- BOSSE, M. A. et al. Physiological impact of flavonoids on nodulation and ureide metabolism in legume plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 166, p. 512-521, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.007>
- BRASIL, Ministério de Minas e Energia. Competitividade do Gás Natural: Estudo de Caso na Indústria de Fertilizantes Nitrogenados. **Empresa de Pesquisa Energética**. 2019. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/Documents/EPE-DEA-IT-01-19%20-%20GN_Fertilizantes.pdf>. Acesso em: 09 jan 2023.
- BRIGNOLI, F. M. **Avaliação da nodulação e desenvolvimento da soja (*Glycine max*) em função da acidez do solo e de diferentes doses de cloreto de potássio**. Trabalho de Conclusão de Curso. Agronomia, Instituto Federal Catarinense. 2016.
- CEREZINI, P. et al. Soybean tolerance to drought depends on the associated *Bradyrhizobium* strain. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1977-1986. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00375-1>
- CHIBEBA, A. M. et al. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**. 2015. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.610164>
- COOPER, J. E.; SCHERER, H. W. Nitrogen Fixation. In: MARSCHNER, P. (Ed.) **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3. ed. San Diego: Elsevier Ltd., p. 389-408, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00016-9>
- CRUZ DE CARVALHO, M. H. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 3, p. 156-165, 2008. DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5536>

- DÉNARIÉ, J.; CULLIMORE, J. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell*, v. 74, n. 6, p. 951-954, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90717-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90717-5)
- DÖBBEREINER, J.; DUQUE, F. F. Contribuição da pesquisa em fixação biológica de nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. **Brazilian Journal of Rural Economy and Sociology (Revista de Economia e Sociologia Rural-RESR)**, v. 18, n. 1346-2017-2328, p. 447-460, 1980.
- DÖBBEREINER, J. Azotobacter em solos ácidos. **Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícolas**. Rio de Janeiro. n. 11. p. 1-36. 1953.
- DÖBBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de Beijerinckia. **Revista de Biologia**. Rio de Janeiro. v. 1. p. 261-272. 1958.
- DOMINGOS, C. S.; LIMA, L. H. S.; BRACCINI, A. L. Nutrição mineral e ferramentas para o manejo da adubação na cultura da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 132-140, 2015. DOI: <https://doi.org/10.18188/sap.v14i3.12218>
- EMBRAPA. Tecnologias de Produção da soja. Londrina: **Embrapa Soja**. n. 17, p. 347, 2020.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. Nutrição Mineral de Plantas. **Editora Planta**. ed. 2. 2006.
- EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2014. E-book. 978-85-277-2384-8. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/978-85-277-2384-8/>. Acesso em: 19 nov. 2022.
- FAQUIN, V. Nutrição mineral de plantas. **Lavras**: Editora UFLA/FAEPE. 186p. 2005.
- FERRAM, E.; SOUTO, S. M.; DÖBBEREINER, J. Efeito da temperatura do solo na nodulação e no desenvolvimento da soja perene (*Glycine favanica* L.). **EMBRAPA**. Seção: Solo. Pesq. agropec. bras. 2:461-466. 1967.
- GALINDO, F. S. et al. Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. **Applied Soil Ecology**, v. 157, p. 103764, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103764>
- GOLO, A. L.; KAPPES, C.; CARVALHO, M. A. C. de; YAMASHITA, O. M. Qualidade das sementes de soja com a aplicação de diferentes doses de molibdênio e cobalto. **Revista Brasileira de Sementes**. Pelotas, v. 31, n. 1, p. 40-49. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-31222009000100005>
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**. p. 80, 2007.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Londrina: **Embrapa Soja**. p. 48. 2001.
- HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis?. **Biological nitrogen fixation**, vol. 2. p. 1009-1024, 2015.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum* brasilense: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 811-817, 2015. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2019. E-book. 9788527735612. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527735612/>. Acesso em: 29 nov. 2022.

KLUCAS, R. V. et al. Nickel: a micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 8, p. 2253-2257, 1983.

LAVRES, J.; CASTRO FRANCO, G.; DE SOUSA CÂMARA, G. M. Soybean seed treatment with nickel improves biological nitrogen fixation and urease activity. **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, p. 37, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00037>

LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, n. 89, p. 871-885, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcf110>

LI, RONG et al. Research status of soybean symbiosis nitrogen fixation. **Oil Crop Science**, v. 5, n. 1, p. 6-10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ocsci.2020.03.005>

MARANHA, L. R. **Efeito da temperatura e de bioagentes em parâmetros fisiológicos de sementes de soja**. Trabalho de Conclusão de Curso. Agronomia. Centro Universitário de Anápolis UniEVANGÉLICA. 2020.

MENDES, I. de C.; DOS REIS JUNIOR, F. B.; DA CUNHA, M. H. **20 perguntas e respostas sobre fixação biológica de nitrogênio**. Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E). 2010.

MERCANTE, F. M.; HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B. **Estratégias para aumentar a eficiência de inoculantes microbianos na cultura da soja**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2011. p. 4. (Embrapa Agropecuária Oeste. Comunicado Técnico, 169).

NEVES, M. C. P. et al. Rhizobium strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, n. 8, p. 1179-1192, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/36.8.1179>

NOGUEIRA, M. A. et al. **Ações de transferência de tecnologia em inoculação/coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja na safra 2017/18 no estado do Paraná**. Londrina: Embrapa Soja, 2018. 15 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 143).

REICHLE, S.; FELDERHOFF, M.; SCHÜTH, F. Mechanocatalytic Room-Temperature Synthesis of Ammonia from Its Elements Down to Atmospheric Pressure. **Angewandte Chemie**, v. 133, n. 50, p. 26589-26593, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.202112095>

- RODRIGUES, R. A. R et al. Dinâmica do nitrogênio em sistemas agrícolas e florestais tropicais e seu impacto na mudança do clima. **Revista Virtual Química**, vol 9, n. 5, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170110>
- RONDON, M. A. et al. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with bio-char additions. **Biology and fertility of soils**, v. 43, n. 6, p. 699-708, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-006-0152-z>
- SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **Amb Express**, v. 9, n. 1, p. 1-22, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>
- SANTOS, V. A. F.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efficiency of soybean nodules related to rhizobia hydrogenase is influenced by light level. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 1996.
- SEIXAS, C. D. S. et al. Tecnologias de produção de soja. Londrina: **Embrapa Soja**. n. 17. p. 348. 2020.
- SILVA, A.F. FREITAS, A.D.S.; STAMFORD, N.P. Efeito da inoculação da soja (cv. Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1327-1333, 2002. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v24i0.2371>
- SINGH, M.; KUMAR, N. Effect of Micronutrients and *Bradyrhizobium japonicum* Inoculation on Nodulation, Growth, Nutrient Uptake by Plant and Yield of Soybean in Mollisol. **Soybean Research**, p. 37, 2008.
- SOARES, C; CARVALHO, M. E. A.; AZEVEDO, R. A.; FIDALGO, F. Plants facing oxidative challenges - A little help from the antioxidant networks. **Environmental and Experimental Botany**, v. 161, p. 4-25, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.009>
- ULZEN, J. et al. Is there a need for *Bradyrhizobium yuanmingense* and *B. japonicum* reinoculation in subsequent cropping seasons under smallholder farmers' conditions?. **Applied Soil Ecology**, v. 128, p. 54-60, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.04.003>
- ZILLI, J. É. et al. Biological N₂ fixation and yield performance of soybean inoculated with *Bradyrhizobium*. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 119, n. 3, p. 323-336, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10705-021-10128-7>

CAPÍTULO I: Trocas gasosas, estresse oxidativo e fixação biológica de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) sob déficit hídrico

HELENA CHAVES TASCA^{1,2}, DOUGLAS ANTÔNIO POSSO², HELOÍSA CHAVES TASCA¹, LEANDRO GALLON³, ALTEMIR JOSÉ MOSSI³; ROGÉRIO LUÍS CANSIAN¹, GERALDO CHAVARRIA⁵, TANISE LUISA SAUSEN¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim.

² Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade de Passo Fundo.

Este manuscrito científico será submetido para a revista *Nitrogen* (Fator de Impacto 1.6).

Trocas gasosas, estresse oxidativo e fixação biológica de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) sob déficit hídrico

Helena Chaves Tasca; Douglas Antônio Posso; Heloísa Chaves Tasca; Leandro Gallon; Altemir José Mossi; Rogério Luís Cansian Geraldo Chavarria; Tanise Luisa Sausen

Resumo: O déficit hídrico é um dos principais fatores limitantes da produtividade vegetal, causando redução na assimilação de carbono, aumento do estresse oxidativo e afetando a nodulação, com consequente impacto na fixação biológica de nitrogênio (FBN). Com o objetivo de avaliar os efeitos do déficit hídrico sobre os atributos fisiológicos, estresse oxidativo, crescimento e metabolismo do nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), foi conduzido um experimento em casa de vegetação. Plantas da cultivar BMX Zeus IPRO foram submetidas a dois tratamentos hídricos: controle (C) e déficit hídrico (DH), com suspensão de irrigação por oito dias durante o estágio vegetativo. As plantas expostas ao DH apresentaram uma redução acentuada nas trocas gasosas e na eficiência de carboxilação, além de um aumento na produção de peróxido de hidrogênio, peroxidação de lipídios e acúmulo de prolina. O DH resultou em um menor número e massa de nódulos nas plantas de soja, mas sem diferenças no conteúdo de nitrogênio nos nódulos e nas folhas, resultando em uma maior eficiência no uso do nitrogênio. Os resultados deste estudo indicam que, apesar da redução acentuada na assimilação de carbono, a FBN não parece ser limitada na mesma proporção, indicando que as limitações metabólicas nos bacteroides foram menos pronunciadas sob restrição hídrica. Concomitantemente, os efeitos negativos na fixação de carbono foram associados ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), enquanto o acúmulo de prolina foi um importante mecanismo protetivo ao déficit hídrico.

Palavras-chave: estresse oxidativo; trocas gasosas; nodulação; prolina; seca.

Abstract:

Water deficit is one of the main limiting factors for plant productivity, leading to reduced carbon assimilation, increased oxidative stress, and affecting nodulation, with consequent impact on biological nitrogen fixation (BNF). With the aim of assessing the effects of water deficit on physiological attributes, oxidative stress, growth, and nitrogen metabolism in soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.), a greenhouse experiment was conducted. Plants of the BMX Zeus IPRO cultivar were subjected to two water treatments: control (C) and water deficit (WD), with irrigation suspended for eight days during the vegetative stage. Plants exposed to water deficit exhibited a marked reduction in gas exchange rates and carboxylation efficiency, along with an increase in hydrogen peroxide production, lipid peroxidation, and proline accumulation. WD resulted in a lower number and mass of nodules on soybean plants, but without differences in nitrogen content in nodules and leaves, resulting in greater nitrogen use efficiency. The results of this study suggest that, despite the significant reduction in carbon assimilation, BNF does not seem to be as limited as one might expect, indicating that metabolic limitations in bacteroids were less pronounced under water restriction. Concurrently, the negative effects on carbon fixation were associated with an increase in the production of reactive oxygen species (ROS), while proline accumulation was an important protective mechanism against water deficit.

Keywords: oxidative stress; photoassimilates; nodules; proline; drought.

INTRODUÇÃO

A soja é considerada a principal fonte proteica vegetal para o consumo humano e animal, desempenhando um papel fundamental na produção de alimentos e na segurança alimentar (TAGLIAPIETRA et al., 2018). Em leguminosas, como a soja, a absorção de nitrogênio pode ocorrer por meio da simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e as raízes das plantas, pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (RODRIGUES et al. 2017; GUO et al., 2022). A FBN também é de extrema importância para o ambiente e desempenha um papel fundamental no fornecimento de nitrogênio em ecossistemas naturais e manejados, sendo reconhecida como o segundo processo biológico mais relevante na Terra, logo após a fotossíntese (DE BRUIJN, 2015; LAL, R. e STEWART, 2018). A FBN consiste numa importante alternativa de adaptação às mudanças climáticas considerando que a principal fonte de nitrogênio se dá através da ureia que necessita de combustível fóssil para sua produção. A redução no uso de fertilizantes químicos nitrogenados e a maior eficiência da FBN contribuem na redução das perdas de N e emissões de gases de efeito estufa pela agricultura (ZILLI et al., 2020).

A capacidade das leguminosas de fixar o nitrogênio atmosférico por meio da simbiose com rizóbios nos nódulos radiculares torna seu crescimento teoricamente independente tanto do nitrogênio presente no solo quanto da adição de fertilizantes nitrogenados (COOPER; SCHERER, 2012). Recentemente, avanços nas ferramentas moleculares aplicadas à taxonomia e sistemática microbiana têm permitido a identificação de mais de 250 espécies de rizóbios (NASCIMENTO JUNIOR et al., 2023). No entanto, os rizóbios podem exibir diferentes graus de especificidade em relação aos seus hospedeiros. A relação simbiótica entre plantas de soja e rizobactérias infectantes das raízes das plantas, como as do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, gera o crescimento de nódulos (HUNGRIA; MENDES, 2015; HUNGRIA et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2018). O funcionamento da FBN envolve uma alta demanda energética (ATP) que é fornecida pelo catabolismo aeróbico de carboidratos, e resulta na produção de compostos nitrogenados (HUNGRIA et al., 2007). Em leguminosas, o N fixado pela FBN é transportado via xilema para a parte aérea principalmente como ureídeos (alantoína e ácido alantóico) (CUNHA et al., 2022; RASO et al., 2007). Nas folhas, os ureídeos são convertidos em aminoácidos e proteínas e utilizados para o crescimento das plantas (BARAL et al., 2016).

O déficit hídrico é o estresse ambiental mais expressivo na agricultura mundial, limitando a produção agrícola por causar prejuízos no crescimento e desenvolvimento das plantas. As perdas de safra, resultantes da falta de água, têm um profundo impacto econômico, sendo agravadas cada vez mais com as mudanças climáticas, afetando a segurança alimentar mundial (TELLES; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2023). Nas últimas duas safras agrícolas (2021/2022, 2022/2023), a produção de soja no estado do Rio Grande do Sul foi prejudicada devido a ocorrência do fenômeno climática La Niña (CONAB, 2023).

O processo de fixação biológica de nitrogênio (BNF) na cultura da soja é particularmente suscetível ao estresse hídrico, resultando em sua redução antes mesmo de ocorrerem alterações na taxa de transpiração e fotossíntese (BELLALLOUI; MENGISTU, 2015). A redução na fotossíntese, por sua vez, limita a disponibilidade de energia necessária para o funcionamento adequado dos bacteroides nos nódulos. Ainda, em plantas de soja sob restrição hídrica, pode ocorrer redução na fixação de N₂, com aumento nas concentrações de ureídeos e aminoácidos livres nos tecidos vegetais, devido a diminuição na partição de fotoassimilados (KING; PURCELL, 2005; COOPER; SCHERER, 2012; CEREZINI et al., 2020).

Diante do cenário de mudanças climáticas com períodos de seca cada vez mais frequentes e prolongados, o estudo do comportamento fisiológico das plantas de soja em períodos de déficit hídrico é importante para a adoção de práticas de manejo agrícola sustentáveis. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do déficit hídrico sobre os atributos fisiológicos, oxidativos, de crescimento e metabolismo do nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) da cultivar BMX Zeus, durante o estágio vegetativo.

METODOLOGIA

Condições experimentais

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, de março a maio de 2022, com plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar BMX Zeus. Durante o período experimental, a temperatura e a umidade relativa médias foram de 19,47 °C e 79,85%, respectivamente. Em cada vaso (8 litros) foram semeadas cinco sementes inoculadas (2 mL/kg de sementes) com o inoculante Rizoliq® (Rizobacter, Londrina, Brasil), com concentração mínima de bactérias de 5 x 10⁹ UFC/mL, contendo as cepas de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080. Ainda na semeadura, as sementes

receberam tratamento comercial de sementes com micronutrientes quelatados (Co e Ni) e não quelatados (Mo) e extrato de alga, conforme a recomendação técnica do fabricante. Os vasos foram preenchidos com 6,5 kg de solo e substrato comercial na proporção 2:1. A análise química do solo apresentou as seguintes características: P = 4,9 mg/dm³; matéria orgânica = 6,5 %; pH H₂O = 5,7; K = 480,0 mg/dm³; Ca²⁺ = 12,2 cmmol_c/dm³; Mg = 2,3 cmmol_c/dm³; H + Al = 5,8 cmmol_c/dm³; Al³⁺ = 0,0 cmmol_c/dm³; CTC = 15,7 cmmol_c/dm³.

Após a germinação e abertura das folhas cotiledonares, realizou-se o desbaste e foram mantidas três plantas por vaso. No estágio de desenvolvimento V4, as plantas receberam tratamento foliar com macronutrientes (P, Mg, S), micronutrientes quelatados (Co, Ni e Zn) e não quelatados (Mo), conforme recomendação técnica do fabricante. As plantas foram irrigadas diariamente, com sistema de irrigação automático, até o período de imposição dos tratamentos hídricos foram mantidas bem irrigadas, em 80% da capacidade de vaso.

Delineamento experimental e imposição dos tratamentos

Os tratamentos hídricos foram impostos quando as plantas atingiram o estágio vegetativo V6, sendo um grupo controle (C), e o tratamento com déficit hídrico (DH), com a suspensão da irrigação por um período de oito dias (SCHNEIDER et al., 2020). As plantas controle continuaram a receber irrigação diária, com água suficiente para manter o teor de água do solo em $\cong$ 80% da capacidade do campo. O estresse hídrico foi imposto pela suspensão da irrigação. Para monitorar a redução na quantidade de água no solo, os vasos foram pesados ao longo dos oito dias de suspensão da irrigação para monitor o conteúdo gravimétrico de água no solo. Além disso, tensiômetros foram instalados a 0,15 m de profundidade em três vasos de cada tratamento hídrico, e a reposição da água evapotranspirada foi realizada com base na leitura tensiométrica. O tratamento de déficit hídrico resultou em valores de potencial matricial do solo de 50 kPa.

Cada tratamento hídrico consistiu em 40 vasos, totalizando 80 vasos e 240 plantas. Todo o experimento (incluindo o período de aclimação) decorreu de março a maio de 2022.

Status hídrico e área foliar específica

Para a determinação do *status* hídrico das plantas, folhas foram coletadas e transferidas imediatamente para o laboratório armazenadas em caixas térmicas para evitar a perda excessiva de água. Inicialmente, as folhas foram pesadas em balança de precisão para

a determinação da massa fresca (MF). Posteriormente, as folhas frescas foram embebidas em água destilada em placas de Petri, sobre refrigeração e protegidas de luz. Após 24 horas, o material vegetal foi pesado para determinação da massa túrgida (MT) e seco em estufa (60 °C), por uma semana, para a determinação da massa seca (MS). O conteúdo relativo de água (CRA) foi calculado pela Equação 1:

$$\text{CRA (\%)} = ((\text{MF}-\text{MS}) / (\text{MT}-\text{MS})) \times 100 \quad (1)$$

A determinação da área foliar (cm²) foi realizada a partir de imagens digitalizadas utilizando o programa ImageJ (<https://imagej.net/ij/>). A área foliar específica (AFE, cm² g⁻¹) foi estimada pela razão entre a área foliar (AF, cm) e a massa seca das folhas.

Trocas gasosas e índice de clorofila

As trocas gasosas foram avaliadas em folhas completamente expandidas, em uma planta por vaso, no período das 8 às 10 horas da manhã, após dois, cinco e oito dias de restrição hídrica. As análises foram realizadas utilizando um analisador de gases no infravermelho (IRGA; LCA PRO, Analytical Development Co, Ltd, Hoddesdon, UK), com fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (1500 µmol m⁻² s⁻¹), concentração de CO₂ interno (400 µmol/mol) e umidade relativa (50-60%) constantes. Foram obtidos a taxa de assimilação de CO₂ (*A*, µmol m⁻² s⁻¹), condutância estomática (*g_s*, mmol m⁻² s⁻¹), taxa de transpiração (*E*, mol m⁻² s⁻¹), e a concentração intracelular de CO₂ (*C_i*, µmol mol⁻¹). A partir da razão entre *A* e *C_i* foi calculada a eficiência de carboxilação (*A/C_i*).

Oito dias após a imposição dos tratamentos, o índice de clorofila foi avaliado utilizando o aparelho ClorofiLog (Falker, Porto Alegre, Brasil).

Estresse oxidativo e concentração de prolina

Para a determinação do peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e concentração de prolina foram coletados em nitrogênio líquido folíolos expandidos do terceiro nó da segunda planta dos vasos. Posteriormente, o material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e armazenado em ultra freezer até o momento das análises.

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinado conforme metodologia descrita por Loreto e Velikova (2001). O material foliar (0,1 g) foi homogeneizado em 2 ml de ácido tricloroacético (TCA, 0,1%) e centrifugada a 12.000 rpm à 4°C por 15 min. Cinquenta microlitros de cada amostra biológica foram adicionadas à solução contendo 50 µL de iodeto

de potássio (1 M) e 100 µL de tampão fosfato de potássio (10Mm; pH 7,0). A absorbância foi lida a 390 nm em espectrofotômetro (Sinergy h1, Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Para o cálculo da concentração do H₂O₂ (µmol g⁻¹ MF) foi considerado um fator de correção de 0,54, e os resultados expressos por grama de massa fresca.

A peroxidação lipídica foi determinada pela estimativa das substâncias reativas do TBA (TBARS) conforme descrito por Heath & Packer (1968), com modificações. Inicialmente, 0,3 g de amostra foliar foi homogeneizada em 3ml de ácido tricloroacético (TCA, 0,1%), e centrifugada a 12.000 rpm, por 20 min. Posteriormente, 1 ml de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,5% em TCA 20%) foi adicionado em 1 ml do sobrenadante. As amostras foram incubadas a 95 °C, por 30 min e rapidamente resfriada em banho de gelo para paralização da reação. Após a centrifugação a 12.000 rpm, por 20 min, a absorbância do sobrenadante foi lida em 532 e 600 nm em espectrofotômetro. A concentração de TBARS (nmol g⁻¹ MF) foi calculada usando o coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹ cm⁻¹, e os resultados expressos por grama de massa fresca.

A concentração de prolina foi quantificada de acordo com metodologia proposta por Shabnam et al. (2015), com modificações. O material foliar (0,3 g) foi homogeneizado em 3 ml de ácido sulfossalicílico (3%) e centrifugada a 10.000 rpm, por 20 min. Em seguida, foi adicionado 1 ml de sobrenadante à 2 ml de solução de ninidrina (1,25 g de ninidrina + 30 mL de ácido acético glacial + 100 ml H₂O). A mistura foi incubada a 100 °C por 30 min e rapidamente resfriada em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 20 min, e a absorbância foi lida em 508 nm em espectrofotômetro. A concentração de prolina livre (µM g⁻¹ MF) de cada amostra foi calculada a partir da curva padrão preparada com prolina (1 mM), e os resultados expressos por grama de massa fresca.

Nodulação, conteúdo de C e N nas folhas e nódulos, e eficiência no uso de N

Para a avaliação dos atributos relacionados à nodulação das plantas, as raízes foram retiradas dos vasos, lavadas e o número de nódulos contados manualmente. Posteriormente, os nódulos foram pesados para determinação da massa fresca e, em seguida, secos em estufa (60 °C) até atingir massa constante para determinação da massa seca.

Amostras de folhas e nódulos secos foram encaminhadas ao laboratório de Biogeoquímica Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a determinação de teor de nitrogênio e carbono utilizando o analisador de elementos

flashmart (FlashEA 1112, Thermo Electron Corporation, Milão, Itália). O conteúdo de C e N nos nódulos e nas folhas foi expresso com base na massa seca. A eficiência no uso de N (EUN) foi calculada de acordo com a equação: $EUN = \text{conteúdo de N na raiz (mg)} / \text{massa seca raiz (g)}$.

Análise de dados

A variação dos atributos de trocas gasosas, *status* hídrico, análises bioquímicas, de crescimento, de eficiência de nodulação e teor de C e N entre os tratamentos foram avaliadas através do teste *t*. Para verificar se ocorre segregação entre os tratamentos hídricos foi realizada uma análise de componentes principais (PCA). Todas as análises foram realizadas no *software* R versão 4.2.0 (R CORE TEAM, 2022), considerando o nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Conteúdo de água, trocas gasosas, área e massa foliar e clorofila

A suspensão da irrigação resultou na redução do teor gravimétrico de água no solo (θ_m) de 0,15 a 0,03 g g⁻¹ (redução de 80%). O conteúdo relativo de água na folha (CRA) apresentou uma redução de 34% nas plantas em déficit hídrico (Tabela 1). Nas plantas em déficit hídrico observou-se, ainda, a redução de 23% de massa fresca da folha (MFf), mas um aumento de 24% na área foliar específica (AFE), comparado ao controle (Tabela 2). A área foliar (AF) não apresentou diferença entre plantas C e DH (Tabela 1).

Após dois dias de suspensão da irrigação foram observadas reduções de cerca de 10% na taxa de transpiração (*E*) e na concentração intracelular de CO₂ (*Ci*) (Figura 1, Tabela 2). Após cinco e oito dias de suspensão da irrigação observaram-se efeitos mais acentuados com a redução em todos os parâmetros de trocas gasosas (*A*, *gs*, *E* e *A/Ci*) e aumento concentração intracelular de CO₂ (*Ci*) (Figura 1, Tabela 2). O índice de clorofila (IC) não apresentou diferença entre plantas C e DH (Tabela 1).

Tabela 1 – Conteúdo relativo de água (CRA), massa fresca da folha (MFf), área foliar (AF); área foliar específica (AFE), e Índice de clorofila (IC) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), cultivar BMX Zeus IPRO, após oito dias da imposição dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). Valores representam médias $\pm$ erro padrão ($n = 40$). Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0.05$).

Atributos	C	DH	p
CRA (%)	88,75 $\pm$ 2,27	66,68 $\pm$ 2,35	0,001*
MFf (g)	2.78 $\pm$ 0.12	2.26 $\pm$ 0.1	0,001*
AF (cm ²)	100.25 $\pm$ 3.9	100.44 $\pm$ 3.53	0,972
AFE (cm ² g ⁻¹)	36,9 $\pm$ 1,34	45,84 $\pm$ 1,21	<0,0001*
IC	44,23 $\pm$ 0,77	43,34 $\pm$ 0,58	0,358

Figura 1 – Taxa de assimilação de CO₂ (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (a), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (b), taxa de transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (c), concentração intracelular de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e eficiência de carboxilação (A/C_i) (e) de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar BMX Zeus IPRO, sob condições controle (C) e déficit hídrico (DH), após oito dias da imposição dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). Dados representam médias $\pm$ erro padrão ($n = 40$). Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0.05$).

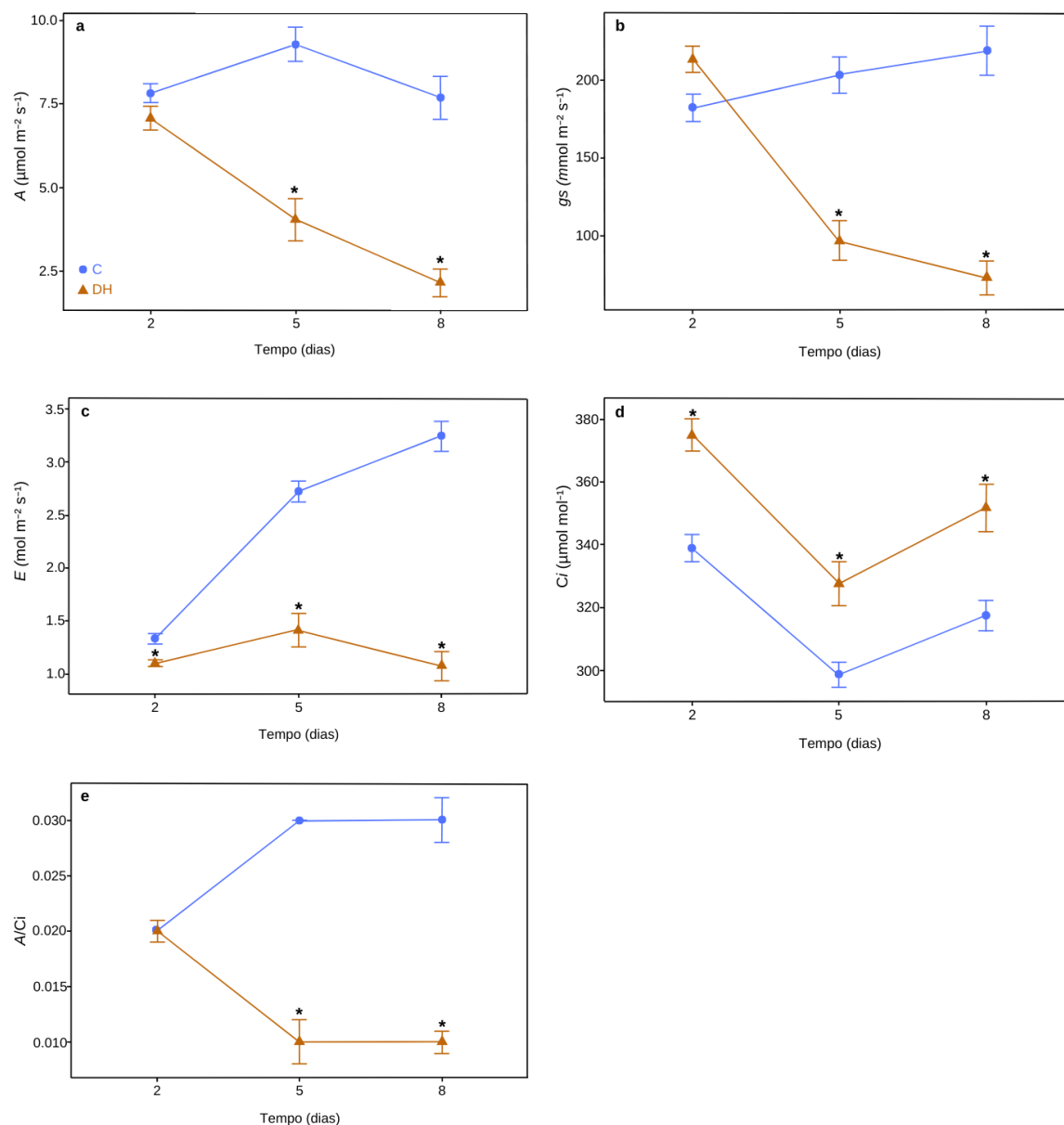


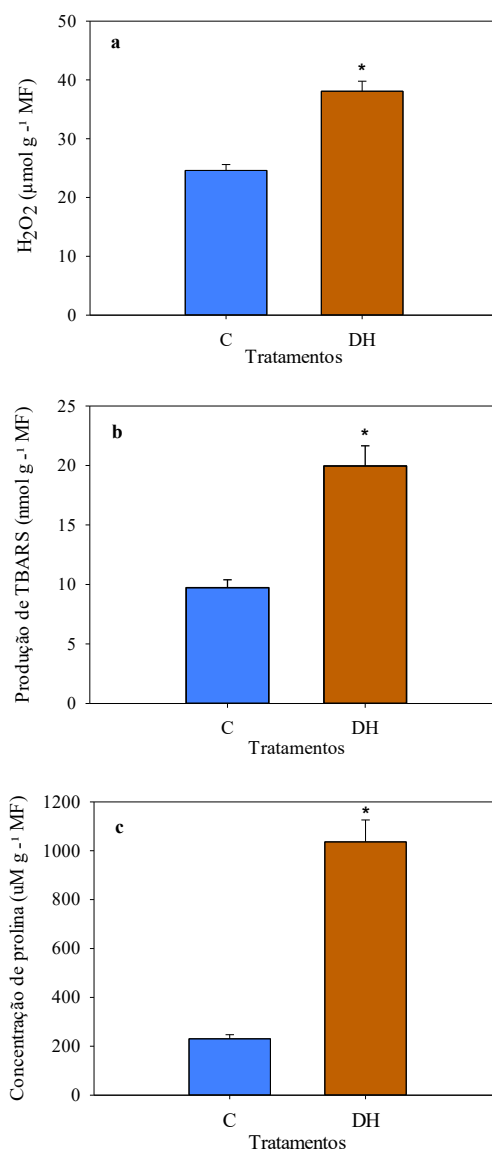
Tabela 2 - Resultados do teste *t* para a taxa de assimilação de CO₂ (*A*) condutância estomática (*gs*), taxa de transpiração (*E*), concentração interna de CO₂ (*Ci*) e eficiência de carboxilação (*A/Ci*) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar BMX Zeus IPRO, após oito dias da imposição dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste *t* (*p* < 0.05).

Atributos	Dia 2	Dia 5	Dia 8
<i>A</i> (μmol m ⁻² s ⁻¹)	0,258	<0,001*	<0,0001*
<i>gs</i> (mol m ⁻² s ⁻¹)	0,081	<0,0001*	<0,0001*
<i>E</i> (mmol m ⁻² s ⁻¹)	0,01*	<0,0001*	<0,0001*
<i>Ci</i> (μmol mol ⁻¹)	<0,001*	<0,001*	<0,001*
<i>A/Ci</i>	0,067	<0,0001*	<0,0001*

Peróxido de hidrogênio, peroxidação de lipídios e concentração de prolina

O peróxido de hidrogênio, a peroxidação de lipídios (TBARS) e a concentração de prolina diferiram significativamente entre os tratamentos controle e déficit hídrico (Figura 2). As plantas expostas ao DH apresentaram um aumento de 35% na produção de peróxido de hidrogênio (Figura 2a), 51% na peroxidação de lipídios (TBARS) (Figura 2b) e 77% na concentração de prolina (Figura 2c) quando comparadas às plantas controle.

Figura 2 - Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (a), Peroxidação de lipídios (TBARS) (b) e concentração de prolina (c) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar BMX Zeus IPRO, após oito dias da imposição dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). Barras representam médias $\pm$ erro padrão ($n = 10$). Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0.05$).



Nodulação, conteúdo de C e N nas folhas e nódulos, e eficiência no uso de N

O número e massa de nódulos foram menores nas plantas expostas ao DH (Tabela 3), com redução de cerca de 30% no número de nódulos por planta, 68% na massa fresca e 18% na massa seca de seca, em relação às plantas controle (Tabela 3). O conteúdo de carbono no nódulo (Cnod) e a eficiência de uso de nitrogênio (EUN) foram maiores em plantas sob DH comparadas às plantas C (Tabela 3). Os conteúdos de nitrogênio da folha (Nf) e nódulo

(Nnod) e o conteúdo de carbono nas folhas (Cf) não apresentaram diferença entre os tratamentos (Tabela 3).

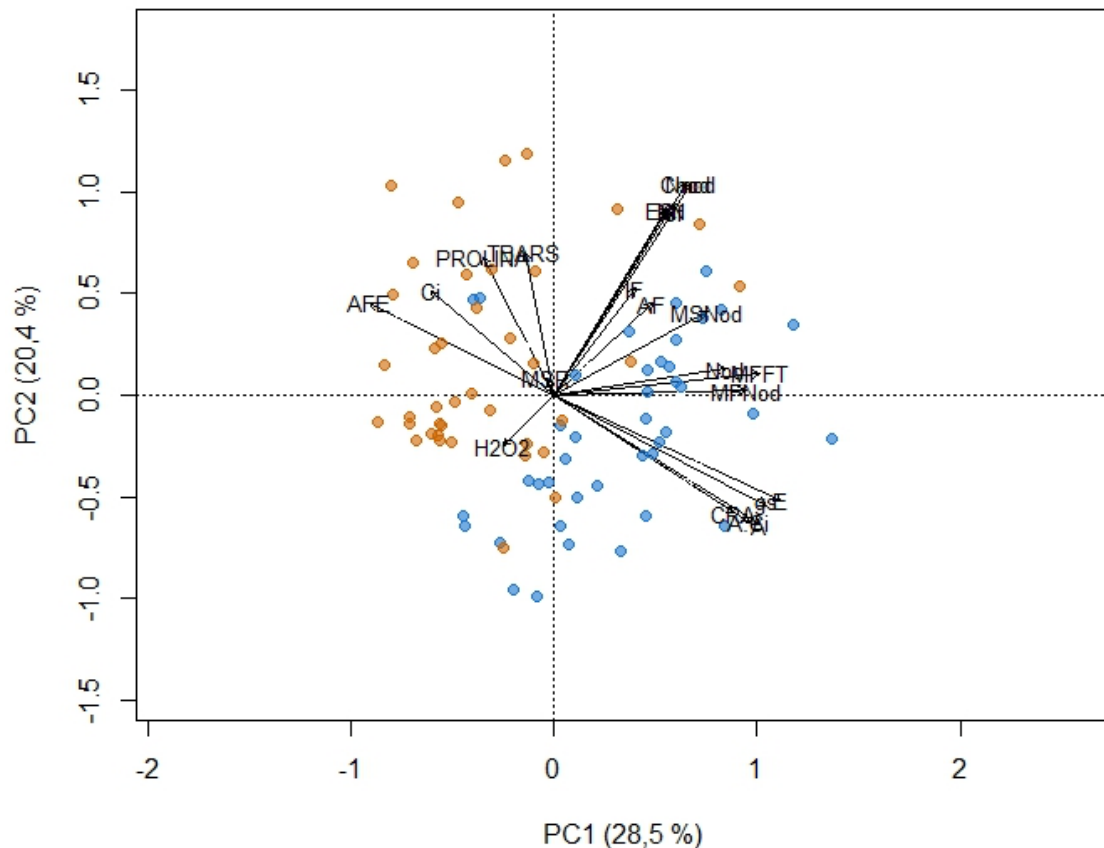
Tabela 3 – Número de nódulos (Nod), massa fresca dos nódulos (MFnod), massa seca dos nódulos (MSnod), conteúdo de nitrogênio foliar (Nf), conteúdo de nitrogênio no nódulo (Nnod), conteúdo de carbono foliar (Cf), conteúdo de carbono no nódulo (Cnod) e eficiência no uso do nitrogênio (EUN) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), cultivar BMX Zeus IPRO, após oito dias da imposição dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). Valores representam médias $\pm$ erro padrão ($n = 28 - 38$). Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0.05$).

Atributos	C	DH	p
Nod (und)	40,62 $\pm$ 2,93	28,36 $\pm$ 1,61	<0,001*
MFnod (g)	0,75 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,02	<0,0001*
MSnod (g)	0,17 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	0,01*
Nf (g g ⁻¹)	2,19 $\pm$ 0,09	2,15 $\pm$ 0,09	0,816
Nnod (g g ⁻¹)	0,55 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,03	0,157
Cf (g mg ⁻¹)	20,8 $\pm$ 0,83	19,42 $\pm$ 0,71	0,294
Cnod (g mg ⁻¹)	4,42 $\pm$ 0,18	5,36 $\pm$ 0,26	0,05*
EUN (mg g ⁻¹)	0,15 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,03	0,01*

Análise de Componentes Principais

Os dois principais componentes (PCs), baseado nos valores relativos, explicaram 48,9% da variação total nos dados analisados, sendo que o primeiro componente (PC1) explicou 28,5% e o segundo componente (PC2) 20,4% (Figura 3). O PC1 foi caracterizado por scores altamente positivos para A , g_s , E , A/C_i , CRA e atributos de eficiência de nodulação. O PC2 teve uma correlação positiva com prolina e peroxidação de lipídios (TBARs), e negativa com o peróxido de hidrogênio. Os atributos de trocas gasosas foram associados com o grupo controle, enquanto os atributos bioquímicos foram associados ao grupo em déficit hídrico.

Figura 3 - Análise de componentes principais entre os tratamentos hídricos, controle (C) e déficit hídrico (DH) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), cultivar BMX Zeus IPRO, após oito dias da imposição dos tratamentos controle (C) e déficit hídrico (DH). Boxplot entre PC1 e PC2 mostram a contribuição dos atributos de trocas gasosa, conteúdo de água, bioquímicos e de eficiência de nodulação na variabilidade e segregação de plantas de soja expostas a diferentes tratamentos hídricos.



A = taxa de assimilação de CO_2 ; gs = condutância estomática; E = taxa de transpiração; C_i = concentração interna de CO_2 (C_i); A/C_i = eficiência de carboxilação; IC = índice de clorofila; AF = área foliar; MFf = massa fresca da folha; AFE = área foliar específica; CRA = conteúdo relativo de água; H_2O_2 = produção de peróxido de hidrogênio; $TBARS$ = produto da peroxidação de lipídios; $PROLINA$ = acúmulo de prolina; Nod = número de nódulos; $MFNod$ = massa fresca dos nódulos; $MSNod$ = massa seca dos nódulos; MSR = massa seca da raiz; Nf = nitrogênio na folha; $Nnod$ = nitrogênio no nódulo; EUN = eficiência no uso do nitrogênio; Cf = carbono na folha e $Cnod$ = carbono no nódulo;

DISCUSSÃO

A sazonalidade da produtividade da soja associada com períodos de seca tem sido evidenciada nos últimos anos (NGUYEN, THOMPSON, COSTELLO, 2023; USDA, 2021). No caso específico do estado do Rio Grande do Sul, a redução na produtividade em relação aos outros estados produtores é diretamente associado com a ocorrência, por dois anos

consecutivos, do fenômeno climático La niña (CONAB, 2023). Os períodos de estiagem mais severa foram observados durante o estágio vegetativo de desenvolvimento da cultura, com a ocorrência de chuvas na fase reprodutiva, o que reduziu as perdas de produtividade. Os resultados observados neste estudo e evidenciados pela PCA (Figura 3), destacaram que sob restrição hídrica, a fotossíntese é drasticamente reduzida e essa redução é acompanhado pelo aumento na produção de EROS, que são associados com estresse oxidativo.

Nossos resultados indicaram um padrão temporal de redução nas trocas gasosas, com efeitos gradativos e mais pronunciados após oito dias de suspensão da irrigação. Após dois dias de suspensão da irrigação foi observada uma redução na taxa de transpiração e aumento na concentração intercelular de CO_2 , indicando um mecanismo de defesa de evitamento da perda de água. Após cinco dias e de forma mais pronunciada aos oito dias, foram observadas reduções em todos os parâmetros de trocas gasosas. Em plantas de soja, a redução na fotossíntese e no crescimento são umas das primeiras respostas das plantas com a redução na disponibilidade de água no solo (WANG et al., 2018). A redução na condutância estomática está normalmente associada à limitação estomática da fotossíntese em plantas sob déficit hídrico moderado (CORNIC, 2000; FLEXAS e MEDRANO, 2002). No entanto, nas plantas de soja observou-se que a redução na fotossíntese foi acompanhada pela redução na gs e aumento na concentração intercelular de CO_2 desde o segundo dia após a imposição do DH, o que indica limitação não-estomática da fotossíntese (LAWLOR, 2002). A limitação não-estomática da fotossíntese pode depender da atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) e da síntese e regeneração de RuBP (PARRY et al., 2002; FLEXAS e MEDRANO, 2002). Limitações não-estomáticas devido ao estresse hídrico também foram observadas em Jiang e colaboradores (2022) em plantas de soja, apontando que a redução da fotossíntese pode ser causada pela diminuição da condutividade elétrica.

A redução na fotossíntese também acarreta estresse oxidativo nas plantas, já que a produção de peróxido de hidrogênio é acoplada ao transporte de elétrons na cadeia transportadora de elétrons de diferentes organelas, como os cloroplastos (SHARMA et al., 2012; MITTLER, 2017). De fato, Schneider et al. (2023) observaram um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio em plantas de soja submetidas ao período de oito dias de suspensão da irrigação, acompanhados de mecanismos de defesa antioxidante que foram uma importante estratégia para minimizar dos danos da formação de EROs. Nós

observamos um aumento tanto na produção de H_2O_2 , como na concentração de TBARS, indicando estresse oxidativo e possíveis danos da integridade das membranas, após oito dias de suspensão da irrigação.

Nós também observamos um expressivo aumento na concentração de prolina sob déficit hídrico. O acúmulo de prolina é considerado como um eficiente mecanismo de homeostase, sendo um importante componente não-enzimático da defesa antioxidante para evitar os danos de EROs sob condições de déficit hídrico (SOARES et al., 2019). Além disso, o acúmulo de prolina geralmente é associado com um mecanismo protetivo ao déficit hídrico, atuando como o principal osmoregulador e contribuindo com a capacidade das plantas em sobreviver sob estresse hídrico (TAYLOR, 1996). Em genótipos de soja, o acúmulo de prolina foi considerado um importante atributo para promover tolerância a seca (HUIMIN et al., 2022). Neste estudo nós consideramos que o acúmulo de prolina está associado, principalmente, com um efeito protetivo ao déficit hídrico (SZABADOS e SAVOURÉ, 2010; REJEB et al., 2014).

O processo de fixação biológica de nitrogênio também é vulnerável a seca, sendo reduzido antes das taxas de transpiração e fotossíntese. Estimativas sugerem que, entre 12-15% dos fotoassimilados produzidos pelas plantas são alocados para manter a atividade dos nódulos (VANCE et al., 2008). Neste estudo observou-se uma redução de cerca de 70% na taxa de assimilação de carbono após oito dias de suspensão da irrigação, enquanto o número e massa de nódulos apresentou uma redução de 30 e 18%, respectivamente. Esses resultados sugerem a sensibilidade do processo de FBN em resposta à redução na assimilação de carbono e, consequentemente, na translocação de fotoassimilados. Porém, observou-se um maior conteúdo de carbono nos nódulos nas plantas em déficit hídrico.

Todavia, nesse estudo não foram observadas diferenças quanto ao conteúdo de nitrogênio nos nódulos e nas folhas e também no índice de clorofila, o que sugere que após oito dias de suspensão da irrigação, a redução no transporte de compostos nitrogenados parece ser afetado em menor proporção. Além disso, nós observamos que sob déficit hídrico, ocorre um aumento de 42% na eficiência no uso de nitrogênio em relação as plantas irrigadas. A EUN compreende a eficiência de assimilação e de utilização, que envolve a remobilização de N (HAO et al., 2011). Esses resultados indicam que plantas em déficit hídrico com maior EUN poderiam manter um melhor crescimento quando o N fosse limitante (QIAN et al., 2020). De fato, Noureldin et al. (2013) observaram maior EUN em

menor níveis de disponibilidade de N. Em condições de seca, foi relatado a melhora da EUN em comparação a condições de boa irrigação (SHI et al. 2017).

A redução/inibição da FBN pode ser explicada por três mecanismos relacionados com as plantas hospedeiras: (1) limitação de oxigênio dentro dos nódulos; (2) escassez de substratos de carbono como fonte de energia para os bacteróides; (3) feedback por compostos de nitrogênio como ureídeos (GÁLVEZ et al., 2005; LADRERA et al., 2007; ALAMILLO et al., 2010; CEREZINI et al., 2014; CEREZINI et al., 2020). Em soja, ureídeos são os produtos da FBN, sendo exportados dos nódulos, mas apresentam baixa solubilidade (BARAL et al., 2016; SPRENT, 1980). Uma relação inversa é observada entre disponibilidade de água no solo e transporte de ureídeos para a parte aérea, sendo que o acúmulo de ureídeos, tanto nas folhas como nódulos, indica a suscetibilidade de cultivares de soja a seca (MARQUEZ-GARCIA et al., 2015; CEREZINI et al., 2020; DE FREITAS et al., 2022).

A manutenção da fixação biológica de nitrogênio (FBN) sob condições de seca é essencial para auxiliar as plantas a lidarem com o estresse hídrico. Portanto, a pesquisa detalhada sobre o metabolismo de carbono e nitrogênio na soja é fundamental para uma compreensão mais abrangente dos efeitos dos períodos de deficiência hídrica. Essa investigação não apenas oferece insights vitais sobre as respostas das plantas ao estresse, mas também fornece uma base sólida para o desenvolvimento de estratégias de manejo agrícola visando fortalecer a resiliência das culturas de soja frente aos desafios climáticos cada vez mais presentes.

CONCLUSÕES

O estudo revela a complexidade das respostas fisiológicas da cultivar de soja BMX Zeus ao déficit hídrico, neste caso imposto pela suspensão da irrigação por oito dias, especialmente em contextos de sazonalidade e eventos climáticos extremos, como La Niña, no qual afetou diretamente a taxa fotossintética, e em consequência a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Todavia, adaptações como o aumento na concentração de prolina são observadas como estratégias de defesa antioxidante, enquanto a eficiência no uso de nitrogênio em plantas sob déficit hídrico sugere adaptações para otimizar o uso de recursos em condições adversas. Portanto, compreender o metabolismo de carbono e nitrogênio em culturas como a soja é crucial para desenvolver estratégias de manejo que aumentem a

resiliência das plantas às mudanças climáticas, garantindo a segurança alimentar diante dos desafios ambientais.

REFERÊNCIAS

ALAMILLO, J. M. et al. Molecular analysis of ureide accumulation under drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, n. 11, p. 1828-1837, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02187.x>

BARAL, B.; DA SILVA, J. A. T.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L. Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. **Journal of Plant Physiology**, v. 193, p. 97-109, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.013>

BARAL, B.; DA SILVA, J. A. T.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L. Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. **Journal of Plant Physiology**, v. 193, p. 97-109, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.013>

BELLALLOUI, N., MENGISTU, A. Effects of Boron Nutrition and Water Stress on Nitrogen Fixation, Seed δ ¹⁵N and δ ¹³C Dynamics, and Seed Composition in Soybean Cultivars Differing in Maturities. **Scientific World Journal**. v. 2015, p. 11, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/407872>

CEREZINI, P.; KUWANO, B. H.; GRUNVALD, A. K.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Soybean tolerance to drought depends on the associated *Bradyrhizobium* strain. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1977-1986. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00375-1>

CEREZINI, P.; PÍPOLO, A. E.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. et al. Gas exchanges and biological nitrogen fixation in soybean under water restriction **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 26, p. 4011-4017, 2014. DOI: <http://doi.org/10.4236/ajps.2014.526419>

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 10, safra 2022/23, n. 7. sétimo levantamento, 2023. Acesso em : 27 de abril de 2023. Disponível em : https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/47017_2cc607edd5428e14b76bd6e988cd358c

COOPER, J. E.; SCHERER, H. W. Nitrogen Fixation. In: MARSCHNER, P. (Ed.) **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3. ed. San Diego: Elsevier Ltd., p. 389-408, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00016-9>

CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture—not by affecting ATP synthesis. **Trends in plant science**, v. 5, n. 5, p. 187-188, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01625-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01625-3)

CUNHA, M. L. O. et al. Selenium increases photosynthetic capacity, daidzein biosynthesis, nodulation and yield of peanuts plants (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 190, p. 231-239, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.08.006>

CUNHA, M. L. O. et al. Selenium increases photosynthetic capacity, daidzein biosynthesis, nodulation and yield of peanuts plants (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 190, p. 231-239, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.08.006>

- DA SILVA, J. A. T.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L. Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. **Journal of Plant Physiology**, v. 193, p. 97-109, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.013>
- DE BRUIJN, F. J. The quest for biological nitrogen fixation in cereals: a perspective and prospective. **Biological nitrogen fixation**, p. 1087-1101, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch108>
- DE FREITAS, V. F. et al. Strategies to deal with drought-stress in biological nitrogen fixation in soybean. **Applied Soil Ecology**, v. 172, p. 104352, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104352>
- DU, Y. et al. Effect of drought stress on sugar metabolism in leaves and roots of soybean seedlings. **Plant physiology and biochemistry**, v. 146, p. 1-12, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.003>
- FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Annals of botany**, v. 89, n. 2, p. 183-189, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcf027>
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eri249>
- GUO, K. et al. Biological nitrogen fixation in cereal crops: progress, strategies and perspectives. **Plant Communications**, v. 2, p. 100499, 2022.
- HAO, Q. N. et al. Identification of genes associated with nitrogen-use efficiency by genome-wide transcriptional analysis of two soybean genotypes. **BMC genomics**, v. 12, p. 1-15, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-525>
- HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperox-oxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acidperoxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, p. 189–198, 1968.
- HUIMIN, C. et al. Using Proline Synthetase and BT gene to improve soybean (*Glycine max*) drought and insect resistance. **Plant Breeding**, v. 141, n. 6, p. 771-785, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbr.13051>
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. **Embrapa Soja-Documents (INFOTECA-E)**. 2007.
- HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? **Biological nitrogen fixation**, vol. 2. p. 1009-1024, 2015.
- JIANG, Y. et al. Photosynthetic physiology performance and expression of transcription factors in soybean of water use efficiency difference. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 69, n. 1, p. 9, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1134/S102144372201006X>
- KALAJI, H. M. et al. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. **Photosynthesis Research**, v. 132, p. 13-66, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0318-y>

KING, C. A.; PURCELL, L. C. Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. **Plant Physiology**, v. 137, n. 4, p. 1389-1396, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.104.056317>

KULUNDŽIĆ, A. M. et al. Physiological insights on soybean response to drought. **Agricultural Water Management**, v. 268, p. 107620, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2022.107620>

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, n. 2, p. 539-546, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.107.102491>

LAL, R.; STEWART, B. A. (Ed.) Soil nitrogen uses and environmental impacts. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2018.

LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, n. 89, p. 871–885, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcf110>

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1781-1787, 2001.

MARQUEZ-GARCIA, B. et al. Redox markers for drought-induced nodule senescence, a process occurring after drought-induced senescence of the lowest leaves in soybean (*Glycine max*). **Annals of Botany**, v. 116, n. 4, p. 497-510, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcv030>

MENDES, I. de C.; DOS REIS JUNIOR, F. B.; DA CUNHA, M. H. **20 perguntas e respostas sobre fixação biológica de nitrogênio**. Embrapa Cerrados-Docmentos (INFOTECA-E). 2010.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02312-9)

NASCIMENTO JUNIOR, V.C. Do. PRETE, C. E. C.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Fixação biológica de nitrogênio em soja com diferentes níveis de tolerância à seca. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, [S. l.], v. 18, n. 3, p. e3268, 2023. DOI: <https://doi.org/10.5039/agraria.v18i3a3268>

NGUYEN, H.; THOMPSON, A.; COSTELLO, C. Impacts of historical droughts on maize and soybean production in the southeastern United States. **Agricultural Water Management**, v. 281, p. 108237, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2023.108237>

NOURELDIN, Nemat A. et al. Grain yield response index of bread wheat cultivars as influenced by nitrogen levels. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 58, n. 2, p. 147-152, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aos.2013.07.012>

PARRY, M. A. J. et al. Rubisco activity: effects of drought stress. **Annals of botany**, v. 89, n. 7, p. 833-839, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcf103>

QIAN, W. A. N. G. et al. Physiological evaluation of nitrogen use efficiency of different apple cultivars under various nitrogen and water supply conditions. **Journal of Integrative**

Agriculture, v. 19, n. 3, p. 709-720, 2020. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62848-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62848-0)

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2022. Disponível em: <<https://www.R-project.org>>. Acesso em: 01 ago 2022.

RASO, M. J. et al. Biochemical characterisation of an allantoin-degrading enzyme from French bean (*Phaseolus vulgaris*): the requirement of phenylhydrazine. **Planta**, v. 226, p. 1333-1342, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0570-7>

RASO, M. J. et al. Biochemical characterisation of an allantoin-degrading enzyme from French bean (*Phaseolus vulgaris*): the requirement of phenylhydrazine. **Planta**, v. 226, p. 1333-1342, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0570-7>

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of plant physiology**, v. 161, n. 11, p. 1189-1202, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.013>

REJEB, K. B.; ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 278-284, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.007>

RODRIGUES, R. A. R et al. Dinâmica do nitrogênio em sistemas agrícolas e florestais tropicais e seu impacto na mudança do clima. **Revista Virtual Química**, vol 9, n. 5, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170110>

SCHNEIDER, J. R. et al. Biostimulant induces proline production in soybean plants under xenobiotic and water stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 45, n. 9, p. 110, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-023-03594-9>

SCHNEIDER, J. R. et al. Soybean plant metabolism under water deficit and xenobiotic and antioxidant agent application. **Biology**, v. 9, n. 9, p. 266, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology9090266>

SHABNAM, N. et al. A rapid, ideal, and eco-friendlier protocol for quantifying proline. **Protoplasma**, v. 253, n. 6, p. 1577-1582, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0910-6>

SHARMA, I. Arsenic induced oxidative stress in plants. **Biologia**, v. 67, n. 3, p. 447-453, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11756-012-0024-y>

SHI, H. et al. Physiological and transcriptional responses of *Catalpa bungei* to drought stress under sufficient and deficient-nitrogen conditions. **Tree Physiology**, v. 37, n. 11, p. 1457-1468, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx090>

SOARES, C. et al. Plants facing oxidative challenges - A little help from the antioxidant networks. **Environmental and Experimental Botany**, v. 161, p. 4-25, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.009>

SPRENT, J. I. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. **Plant, Cell & Environment**, v. 3, n. 1, p. 35-43, 1980.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in plant science**, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>

TAGLIAPIETRA, E. L. et al. Optimum leaf area index to reach soybean yield potential in subtropical environment. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 3, p. 932-938, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2134/agronj2017.09.0523>

TAIZ, L.; ZEIGER, E; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TAYLOR, C. B. Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. **The Plant Cell**, v. 8, n. 8, p. 1221, 1996.

TELLES, T. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 31, p. 103158, 2023. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103158>

TEZARA, W. M. V. J. et al. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. **Nature**, v. 401, n. 6756, p. 914-917, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1038/44842>

USDA (United States Department of Agriculture). **Foreign Agricultural Service –FAS**. Oilseeds: World Markets and Trade, 2021. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade> Acesso em: Dez 2021

VANCE, C. P. et al. Carbon and nitrogen metabolism in legume nodules. *In: Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*. Springer. v. 7. p. 293-320, 2008.

VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 143-157, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.08.006>

WANG, W. et al. Effects of drought stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence images of soybean (*Glycine max*) seedlings. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 11, n. 2, p. 196-201, 2018. DOI: <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20181102.3390>

CONCLUSÃO GERAL

Períodos de déficit hídrico têm se tornado cada vez mais frequentes e intensos nos últimos anos e a produtividade de soja apresenta uma variação sazonal diretamente associada as condições hídricas durante o período de cultivo. A seca é o principal fator limitante da produtividade vegetal e afeta o processo de fixação biológica de nitrogênio. A compreensão da relação entre processos fisiológicos do metabolismo de carbono na planta e nos bacteroides nos nódulos sob condições de déficit hídrico é extremamente importante para indicação de práticas de manejo.

Além disso, os efeitos do déficit hídrico são específicos para diferentes cultivares e a avaliação de diferentes atributos fisiológicos e bioquímicos é fundamental para a seleção de cultivares/genótipos tolerantes a seca. Neste estudo nós observamos que apesar da susceptibilidade da cultivar BMX Zeus a períodos de déficit hídrico, com redução das trocas gasosas e da eficiência de FBN, indicada pela menor número e massa de nódulos, o acúmulo de prolina e o aumento na eficiência no uso do nitrogênio podem ser considerados as principais estratégias desta cultivar para enfrentar períodos de déficit hídrico severo.

Estudos adicionais com a avaliação de diferentes cultivares, bem como avaliando a combinação de condições de déficit hídrico com fatores que potencializam a FBN, principalmente a aplicação de nutrientes, são extremamente importantes para compreender as respostas fisiológicas em plantas de soja que promovam a tolerância a seca.