UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

ALLAN DE MARCOS LAPAZ

COMPORTAMENTO FISIO-BIOQUÍMICO DA SOJA EM RESPOSTA AO ENCHARCAMENTO DO SOLO ASSOCIADO AO EXCESSO DE FERRO

Ilha Solteira
2019

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ALLAN DE MARCOS LAPAZ

COMPORTAMENTO FISIO-BIOQUÍMICO DA SOJA EM RESPOSTA AO ENCHARCAMENTO DO SOLO ASSOCIADO AO EXCESSO DE FERRO

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Especialidade: Sistemas de Produção.

Prof.ª Dr.ª Ana Carolina Firmino
Orientadora

Prof.ª Dr.ª Liliane Santos de Camargos
Coorientadora

Prof. Dr. Rafael Simões Tomaz
Coorientador

Ilha Solteira
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Lapaz, Allan de Marcos.
L299c Comportamento fisio-bioquímico em resposta ao encharcamento do solo associado ao excesso de ferro na soja / Allan de Marcos Lapaz. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2019
68 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistema de Produção, 2019

Orientador: Ana Carolina Firmino
Co-orientador: Liliane Santos de Camargos, Rafael Simões Tomaz
Inclui bibliografia

1. Trocas gasosas. 2. Clorofilas. 3. Anoxia. 4. Íon ferroso. 5. *Glycine max*.

João Josué Barbosa
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Diretor Técnico
CRB 8-5642

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Comportamento fisio-bioquímico da soja em resposta ao encharcamento do solo associado ao excesso de ferro

AUTOR: ALLAN DE MARCOS LAPAZ
ORIENTADORA: ANA CAROLINA FIRMINO
COORIENTADORA: LILIANE SANTOS DE CAMARGOS
COORIENTADOR: RAFAEL SIMÕES TOMAZ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA, área: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

Prof.ª Dr.ª ANA CAROLINA FIRMINO
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Prof. Dr. PAULO ALEXANDRE MONTEIRO DE FIGUEIREDO
Diretoria Geral da FCAT / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Prof. Dr. VAGNER DO NASCIMENTO Vagner do Nascimento
Curso de Engenharia Agronômica / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Ilha Solteira, 17 de dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcos Antônio Lapaz e Maria de Fátima Rosseto, e a minha noiva, Camila Hatsu Pereira Yoshida, pelo apoio conferido a mim nessa jornada.

A minha orientadora, Prof.ª Dr.ª Ana Carolina Firmino, e aos meus coorientadores, Prof.ª Dr.ª Liliane Santos de Camargos e Prof. Dr. Rafael Simões Tomaz, pelo conhecimento técnico repassado e pela confiança depositada em mim.

Aos Profs. Drs. Paulo Alexandre Monteiro de Figueiredo, Carolina dos Santos Batista Bonini e Reges Heinrichs pelo conhecimento repassado.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo: 2018 / 17380-4).

A todos os meus amigos da graduação de Engenharia Agronômica e do programa de Pós-Graduação em Agronomia da UNESP, campus de Dracena e de Ilha Solteira, em especial ao doutorando Jailson Vieira Aguilar.

A Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), campus de Dracena e de Ilha Solteira e ao programa de Pós-Graduação em Agronomia, campus de Ilha Solteira, pela formação profissional conferida a mim até o presente momento.

RESUMO

O encharcamento do solo é um problema comum em algumas áreas agricultáveis, inclusive em regiões sob cultivo de soja (*Glycine max*). Em solos encharcados, ocorre a depleção de O_2 do solo pelos microrganismos aeróbicos e plantas, afetando os processos metabólicos e fisiológicos das plantas após sofrerem anoxia no tecido radicular. Outro fator prejudicial neste contexto, é o aumento exponencial da disponibilidade de ferro (Fe) no solo, o que pode resultar na absorção excessiva do Fe pelas plantas. No primeiro experimento, o objetivo foi avaliar a vulnerabilidade do aparato fotossintético e produção de biomassa de duas cultivares de soja no estágio fenológico V2, sob condição hídrica adequada e diferentes níveis de encharcamento do solo associada a uma concentração moderada e duas concentrações tóxicas de Fe. No segundo experimento, o objetivo foi avaliar o comportamento fisiológico e bioquímico da soja cultivar Agroeste 3680 associado ao desenvolvimento das vagens (estágio fenológico R3) sob solo não encharcado e encharcado combinado com uma concentração moderada e duas concentrações tóxicas de Fe. No primeiro experimento, o aparato fotossintético das cultivares de soja responderam diferentemente ao encharcamento e à disponibilidade de Fe no solo. Ambas cultivares foram vulneráveis ao encharcamento de 100% em todas as concentrações Fe, o que resultou em danos acentuados às trocas gasosas, concentração de clorofilas e, consequentemente, levou à diminuição da biomassa seca da parte aérea e da raiz. O desempenho fotossintético e a produção de biomassa seca do Agroeste 3680 não foram afetados quando expostos a concentrações moderadas de Fe associadas ao encharcamento de 50%. A cultivar NS 6601 IPRO apresentou tolerância moderada ao Fe quando não cultivada em solo encharcado, uma vez que a taxa de assimilação de CO_2, a eficiência instantânea da carboxilação e a concentração da clorofila *a* não foram afetadas. No segundo experimento, as trocas gasosas foram fortemente afetadas pelo encharcamento do solo. O excesso de Fe sem encharcamento do solo reduziu os pigmentos fotossintéticos e potencializou a redução quando associado ao encharcamento do solo. O acúmulo de amido e ureídeos no primeiro trifólio totalmente expandido podem ser considerados biomarcadores eficientes para indicar a fitotoxicidade causada pelo encharcamento do solo e excesso de Fe em plantas de soja. O comportamento da biomassa seca das vagens revelou que o desenvolvimento reprodutivo é bruscamente interrompido com a imposição dos estresses, principalmente sob efeito do encharcamento do solo, o que se deve em grande parte à diminuição substancialmente da *A*, ao bloqueio no transporte de carboidratos para os tecidos drenos e ao aumento de MDA.

Palavras-chaves: Trocas gasosas. Clorofilas. Anoxia. Íon ferroso. *Glycine max*.

ABSTRACT

Soil waterlogging is a common problem in some agricultural areas, including regions under soybean (*Glycine max*) cultivation. In waterlogged soils, soil O_2 depletion occurs due to aerobic microorganisms and plants, affecting the metabolic and physiological processes of plants after suffering anoxia in their root tissue. Another harmful factor of this situation is the exponential increase in the availability of iron (Fe) in the soil, which may result in excessive Fe uptake by plants. In the first experiment, the objective was to evaluate the vulnerability of the photosynthetic apparatus and biomass production of two soybean cultivars at the phenological stage V2, under optimal water condition and different levels of soil waterlogging, combined with one moderate and two toxic levels of Fe. While in the second experiment, the objective was to evaluate the physiological and biochemical behaviour of soybean cultivar Agroeste 3680, associated with the development of pods (at the phenological stage R3) in non-waterlogged and waterlogged soil, combined with one moderate and two toxic levels of Fe. In the first experiment, the photosynthetic apparatus of the two soybean cultivars responded differently to waterlogging and the availability of Fe in the soil. Both cultivars were vulnerable to waterlogging of 100% at all concentrations Fe, which resulted in damage to gas exchange and chlorophyll levels, and consequently, led to lower shoot and root biomass accumulation. The photosynthetic performance and dry biomass production of Agroeste 3680 were not affected when exposed to moderate levels of Fe associated with waterlogging of 50%. NS 6601 IPRO cultivar also showed a moderate tolerance to excess Fe when not waterlogged, since net photosynthetic rate, instantaneous carboxylation efficiency and chlorophyll a content were not affected. In the second experiment, gas exchange was strongly affected by soil waterlogging. Excess Fe without soil waterlogging reduced photosynthetic pigments, and potentiated this reduction when associated with soil waterlogging. Starch and ureides accumulated in the first newly expanded trifoliate leaves could be considered efficient biomarkers, indicating phytotoxicity caused by soil waterlogging and Fe excess in soybean plants. Thus, this finding can be used as a parameter to identify tolerable varieties to these abiotic conditions. The reproductive development was abruptly interrupted by the imposition of the stresses, leading to loss of pod dry biomass, particularly under soil waterlogging, which was largely due to the substantial decrease in A, the blockage of carbohydrate transport to sink tissues and an increase of MDA.

Keywords: Anoxia. Ferrous ion. Starch. Ureides. *Glycine max*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I
Descrevendo como o encharcamento do solo associado ao excesso de Fe podem ser prejudiciais às plantas

CAPITULO II
Comportamento fotossintético e produção de biomassa em resposta ao encharcamento do solo associado ao excesso de ferro na fase vegetativa da soja

Figura 1 - Taxa de assimilação de CO_2 expressa por área (A e B) e condutância estomática (C e D) em plantas de soja submetidas a três níveis de encharcamento (0 - sem encharcamento, 50 e 100%) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}), em duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe e * expressa o valor significativamente maior entre as duas cultivares em cada condição testada. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas) 26

Figura 2 - Eficiência instantânea da carboxilação (A e B) em plantas de soja submetidas a três níveis de encharcamento (0 - sem encharcamento, 50 e 100%) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}), em duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe e * expressa o valor significativamente maior entre as duas cultivares em cada condição testada. Barra na NS 6601 IPRO vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas) 27

Figura 3 - Transpiração (A e B) e eficiência do uso da água (D e C) em plantas de soja em plantas de soja submetidas a três níveis de encharcamento (0 - sem encharcamento, 50 e 100%) e três doses de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}), em duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe e * expressa o valor significativamente maior entre as duas cultivares em cada condição testada. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas)..... 28

Figura 4 - Concentração de clorofila *a* (A e B), concentração de clorofila *b* (C e D) e concentração de clorofila total (E e F) em plantas de soja submetidas a três níveis de encharcamento (0 – sem encharcamento, 50 e 100%) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}), em duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúsculas comparam os níveis de encharcamento independente das concentrações de Fe e cultivares, letras minúsculas comparam as concentrações de Fe independente dos níveis de encharcamento e * expressa o valor significativamente maior entre as duas cultivares independente dos níveis de encharcamento. Barra na 30

vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas).....

Figura 5 - Concentração de carotenoides (A e B) em plantas de submetidas a três níveis de encharcamento (0 - sem encharcamento, 50 e 100%) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}), em duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúsculas comparam os níveis de encharcamento independente das concentrações de Fe e cultivares, letras minúsculas comparam as concentrações de Fe independente dos níveis de encharcamento e * expressa o valor significativamente maior entre as duas cultivares independente dos níveis de encharcamento. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas)..... 31

Figura 6 - Biomassa seca da parte aérea (A e B) e biomassa seca da raiz (C e D) em plantas de soja submetidas a três níveis de encharcamento (0 - sem encharcamento, 50 e 100%) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}), em duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe e * expressa o valor significativamente maior entre as duas cultivares em cada condição testada. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 9 plantas)..... 32

Figura S1 - Dados climáticos de temperatura média, temperatura máxima, temperatura mínima e umidade relativa registrados na casa de vegetação durante a condução experimental..... 37

CAPITULO III

Um vislumbre comportamental da soja em resposta ao encharcamento do solo associado ao excesso de ferro no estágio reprodutivo

Figura 1 - Taxa de assimilação de CO_2 expressa por área (A), condutância estomática (B), taxa de transpiração (C), eficiência do uso da água (D) e eficiência instantânea da carboxilação (E) em plantas de soja submetidas a dois níveis de encharcamento do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas)..... 46

Figura 2 - Conteúdo de Clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenoides (D) em plantas de soja submetidas a dois níveis de encharcamento do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas)..... 47

Figura 3 - Conteúdos de amido (A), sacarose (B) e carboidratos totais (C) em plantas de soja submetidas a dois níveis de encharcamento do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três concentrações de Fe 49

(25, 125 e 500 mg dm^{-3}). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas).....

Figura 4 - Conteúdos de ureídeos totais (A), ácido alantóico (B), alantoína (C), nitrato (D) e proteína (E) em plantas de soja submetidas a dois níveis de encharcamento do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula isoladas comparam os níveis de encharcamento, independente das concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas isoladas comparam as concentrações de Fe, independente do encharcamento. Letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas)..... 51

Figura 5 - Peróxido de hidrogênio (A) e malondialdeído (B) em plantas de soja submetidas a dois níveis de encharcamento do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula isoladas comparam os níveis de encharcamento, independente das concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas isoladas comparam as concentrações de Fe, independente do encharcamento. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas)..... 52

Figura 6 - Biomassa seca da parte aérea (A), biomassa seca das vagens (B), biomassa seca da raiz (C) e acúmulo de Fe na parte aérea (D), em plantas de soja submetidas a dois níveis de encharcamento do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas para FEAS; n = 9 plantas para biomassa seca)..... 53

Figura 7 - Correlação de Pearson entre as características analisadas. Os quadrados que receberam a cor branca pertencem à categoria de valores não significativos. Taxa de assimilação de CO_2 expressa por área (*A*), condutância estomática (*gs*), taxa de transpiração (*E*), eficiência instantânea do uso da água (*EUA*), eficiência da carboxilação (*EiC*), clorofila *a* (C*a*), clorofila *b* (C*b*), clorofila total (C*t*), carotenoides (CAR), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), malondialdeído (MDA), biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da vagens (BSV), biomassa seca da raiz (BSR) e acúmulo de Fe na parte aérea (AFePA)..... 54

Figura S1 - Dados climáticos de temperatura média, temperatura máxima, temperatura mínima e umidade relativa registrados na casa de vegetação durante a condução experimental..... 61

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I
Descrevendo como o encharcamento do solo associado ao excesso de Fe podem ser prejudiciais às plantas

CAPITULO II
Comportamento fotossintético e produção de biomassa em resposta ao encharcamento do solo associado ao excesso de ferro na fase vegetativa da soja

Tabela S1 - Resumo da análise de variância (ANOVA) entre três níveis de encharcamento do solo (0, 50 e 100%), três concentrações de ferro (25, 125 e 500 mg dm^{-3}) e duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO) para as características de taxa de assimilação de CO_2 expressa por área (*A*), condutância estomática (*gs*), transpiração (*E*), eficiência da carboxilação (*EiC*), eficiência instantânea do uso da água (*EUA*), clorofila *a* (C*a*), clorofila *b* (C*b*), clorofila total (C*t*), carotenoides (CAR), biomassa seca da parte aérea (BSPA) e biomassa seca da raiz (BSR)..... 36

CAPITULO III
Um vislumbre comportamental da soja em resposta ao encharcamento do solo associado ao excesso de ferro no estágio reprodutivo

Tabela S1 - Resumo da análise de variância (ANOVA) entre dois níveis de água no solo (sem encharcamento e com encharcamento), três concentrações de ferro (25, 125 e 500 mg dm^{-3}) para as características de taxa de assimilação de CO_2 expressa por área (*A*), condutância estomática (*gs*), transpiração (*E*), eficiência instantânea do uso da água (*EUA*), eficiência da carboxilação (*EiC*), clorofila *a* (C*a*), clorofila *b* (C*b*), clorofila total (C*t*), carotenoides (CAR), amido, carboidratos totais, sacarose, ureídeos totais, alantoato, alantoína, amônia, nitrato, proteína, peróxido de higrogênio (H_2O_2), malondialdeído (MDA), acúmulo de ferro na parte aérea (AFEPA), biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca das vagens (BSV), biomassa seca da raiz (BSR)..... 60

SUMARIO

CAPITULO I

Descrevendo como o encharcamento do solo associado ao excesso de Fe podem ser prejudiciais às plantas

1	**INTRODUÇÃO**	**14**
1.1	**REVISÃO DE LITERATURA**	15
1.1.1	**Históricos da soja e sua importância para o Brasil**	15
1.1.2	**Disponibilidade do Fe sob efeito do encharcamento do solo**	16
1.1.3	**Excesso de Fe e estresse oxidativo**	16
1.1.3.1	***Efeito indireto (inclusão)***	*16*
1.1.3.2	***Efeito indireto (exclusão)***	*18*
1.1.4	**Fixação biológica do N em solos encharcados e não encharcados**	18

CAPITULO II

Comportamento fotossintético e produção de biomassa em resposta ao encharcamento do solo associado ao excesso de ferro na fase vegetativa da soja

2	**INTRODUÇÃO**	**20**
2.1	**MATERIAL E MÉTODOS**	21
2.1.1	**Local experimental**	21
2.1.2	**Delineamento e tratamentos experimentais**	22
2.1.3	**Condições de cultivo**	22
2.1.4	**Instalação e condução experimental**	22
2.1.5	**Determinação dos atributos de trocas gasosas**	23
2.1.6	**Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos**	24
2.1.7	**Produção de biomassa**	24
2.1.8	**Análise estatística**	24
2.2	**RESULTADOS**	24
2.2.1	**Comportamento das trocas gasosas**	24
2.2.2	**Concentração de pigmentos fotossintéticos**	29
2.2.3	**Produção de biomassa**	31
2.3	**DISCUSSÃO**	32
2.3.1	**Trocas gasosas: comportamento diferencial de cultivares de soja e efeito em resposta ao encharcamento do solo combinado com o excesso de ferro**	32
2.3.2	**A concentração de pigmentos fotossintético reduziram no encharcamento de 100% e as cultivares apresentaram comportamento diferencial às concentrações de Fe**	34
2.3.3	**Produção de biomassa: comportamento diferencial de cultivares de soja em resposta ao encharcamento do solo combinado com o excesso de ferro**	35
2.4	**CONCLUSÕES**	35
	MATERIAL SUPLEMENTAR	**36**

CAPITULO III

Um vislumbre comportamental da soja em resposta ao encharcamento do solo associado ao excesso de ferro no estágio reprodutivo

3	**INTRODUÇÃO**	**38**
3.1	**MATERIAL E MÉTODOS**	39
3.1.1	**Local experimental**	39
3.1.2	**Delineamento e tratamentos experimentais**	39
3.1.3	**Condições de cultivo**	40
3.1.4	**Instalação e condução experimental**	40
3.1.5	**Determinação dos atributos de trocas gasosas**	41
3.1.6	**Coleta de folhas no término da imposição dos estresses**	41
3.1.7	**Análise dos pigmentos fotossintéticos**	42
3.1.8	**Análise dos compostos de C e N nas folhas**	42
3.1.9	**Análise do peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica**	43
3.1.10	**Acúmulo de Fe na parte aérea e produção particionada de biomassa**	44
3.1.11	**Análise estatística**	44
3.2	**RESULTADOS**	44
3.2.1	**Comportamento das trocas gasosas**	44
3.2.2	**Conteúdo de pigmentos fotossintéticos**	46
3.2.3	**Metabolismo do carbono na folha**	47
3.2.4	**Metabolismo do nitrogênio na folha**	49
3.2.5	**Concentração de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica**	51
3.2.6	**Acúmulo de Fe na parte aérea e produção particionada de biomassa**	52
3.3	**DISCUSSÃO**	54
3.3.1	**As trocas gasosas foram fortemente afetadas pelo encharcamento do solo**	54
3.3.2	**O excesso de Fe sem encharcamento do solo reduziu os pigmentos fotossintéticos e potencializou a redução quando associado ao encharcamento do solo**	55
3.3.3	**Metabolismo de carbono e nitrogênio: o amido e os ureídeos se acumulam na folha em resposta ao encharcamento do solo e ao excesso de Fe**	56
3.3.4	**Toxicidade e peso da biomassa particionada em resposta ao encharcamento do solo e ao excesso de Fe**	57
3.4	**CONCLUSÕES**	58
	MATERIAL SUPLEMENTAR	59
	REFERÊNCIAS	61

CAPÍTULO I

Descrevendo como o encharcamento do solo associado ao excesso de Fe podem ser prejudiciais às plantas

1INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma cultura com alto valor econômico responsável pelo fornecimento de mais da metade do óleo vegetal e dois terços da farinha de proteína no mundo (DIVITO *et al*., 2015), motivo pelo qual é a leguminosa mais cultivada entre as demais (BORNHOFEN *et al*., 2015). A soja é utilizada como matéria-prima em muitos segmentos agroindustriais e de indústrias químicas e alimentícias (PIMENTEL ; PATZEK, 2005; VIANNA *et al*., 2013). O grão tem alto conteúdo proteico (cerca de 40%) (VIEIRA *et al*., 1999), além de ser fonte de vitaminas, fosfolipídio, mineral e de compostos bioativos (ACHOURI, *et al*., 2005; KIM, *et al*., 2012).

O ferro (Fe) é um elemento extremamente importante para a vida (AMILS *et al*., 2007). Em particular, para as plantas, esse mineral é componente do grupo de proteínas ferro-enxofre (Fe-S) e heme, os quais exercem funções biológicas chaves para a manutenção da vida, como fotossíntese, respiração, fixação do nitrogênio (N), síntese de DNA e síntese de hormônios vegetais (BECANA *et al*., 1998; JEONG ; GUERINOT, 2009; BALK ; PILON, 2011).

Solos pobres ou ricos em Fe apresentam problemas para o cultivo de culturas. Especificamente, concentrações elevadas de Fe associada a condições anaeróbicas tornam-no fitotóxico para a planta (FREI *et al*., 2016; MARANGUIT *et al*., 2017). Anteriormente, foi documentado toxicidade por Fe na soja devido ao encharcamento do solo, ocasionado pelo excesso de chuva forte em solo compacto com deficiência natural de drenagem (BATAGLIA ; MASCARENHAS, 1981).

Uma vez o Fe^{2+} absorvido em excesso, esse metal pode deslocar o equilíbrio redox da célula para um estado pró-oxidante, afetando os mecanismos fisiológicos e causando alterações estruturais e ultraestruturais em função do estresse oxidativo (JUCOSKI *et al*., 2013; SIQUEIRA-SILVA *et al*., 2012). Os sintomas típicos nas folhas são bronzeamento e necrose, enquanto na raiz é flacidez, ausência de ramificação, aspecto mucilaginoso e escurecimento do ápice radicular; tanto a parte aérea como a raiz têm seu crescimento afetado (DA SILVA *et al*., 2017).

Outro fator prejudicial em decorrência do encharcamento do solo é o preenchimento dos espaços dos macroporos do solo pela água, restringindo o fornecimento de O_2 para a raiz

e nódulos (em leguminosas), categorizado pela ausência parcial de O_2 (hipóxia) ou completa ausência de O_2 (anoxia) (MOHANTY ; ONG, 2003). A escassez do O_2 altera via da fosforilação oxidativa para glicólise e fermentação (MOHANTY ; ONG, 2003), como a eficiência energética dessa via é menor, consequentemente provoca declínio na fixação do N e na síntese de ATP (SOUZA *et al*., 2016).

Portanto, no estágio fenológico V2, o objetivo foi avaliar a vulnerabilidade do aparato fotossintético e produção de biomassa de duas cultivares de soja no estágio fenológico V2, sob condição hídrica adequada e diferentes níveis de encharcamento do solo associada a uma concentração moderada e duas concentrações tóxicas de Fe. No estágio fenológico R3, o objetivo foi avaliar as trocas gasosas, conteúdo de pigmentos fotossintéticos, metabolismo do C e N, concentração de Fe na parte aérea e raiz e peroxidação lipídica na soja, a fim de associar essas respostas à produção de biomassa e ao desenvolvimento de vagens, o que proporcionará subsídios para o desenvolvimento de variedades toleráveis a essas condições abiótica

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1. Históricos da soja e sua importância para o Brasil

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a principal cultura leguminosa do mundo (BORNHOFEN *et al*., 2015), sendo, respectivamente o USA, Brasil e Argentina os seus principais produtores (EMBRAPA, 2017). A utilização do grão da soja na dieta humana e animal em vários países decorre de seu valor nutricional, principalmente pelo alto conteúdo proteico, com cerca de 40% (VIEIRA *et al*., 1999), além de ser fonte de vitaminas, fosfolipídio, mineral e de compostos bioativos (ACHOURI, *et al*., 2005; KIM, *et al*., 2012). Ainda, o grão da soja, tem outros destinos no mercado mundial, como a produção de óleo vegetal, biocombustíveis, farinha, formulação de rações, entre outros (PIMENTEL ; PATZEK, 2005; VIANNA *et al*., 2013).

Esta cultura foi domesticada a partir da soja selvagem (*Glycine soja* Sieb. e Zucc.), na China há 5.000 anos e, posteriormente, introduzida na Coréia e Japão há cerca de 2.000 anos. Por volta de 1765, chegou à América do Norte e, logo após, durante a primeira metade do século passado, chegou à América Central e do Sul (ZHOU *et al*., 2015). Por fim, no ano de 1919, começou a apresentar participação efetiva na produção mundial de grãos (SCHAUB *et al*., 1988).

No Brasil, em 1901, foi realizado o primeiro cultivo de soja, registrado pela Estação Agropecuária de Campinas, fundada em 1887, pelo Imperador Dom Pedro II, atualmente

conhecida como Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Somente em 1941, o cultivo de soja obteve registro estatístico no Anuário Agrícola do Rio Grande do Sul, apresentando um rendimento de aproximadamente 700 kg ha^{-1}. Contudo, o aumento expressivo na produção de soja no Brasil aconteceu somente ao final da década de 70 (BARBOSA ; ASSUNÇÃO, 2001).

Atualmente, no Brasil, a soja movimenta grande parte do agronegócio, sua área de cultivo corresponde a mais de 50% de toda área cultivada com grãos no país, sendo o segundo maior produtor, atrás apenas dos Estados Unidos. Na safra de (2016/2017) a produção nacional foi de 113,9 milhões de toneladas em uma área de 33,9 milhões de hectares com produtividade média de 3362 kg ha^{-1}; enquanto que os EUA alcançaram 117,2 milhões de toneladas em uma área de 33,5 milhões de hectares com produtividade média de 3501 kg ha^{-1} ambos na safra de 2016/2017 (EMBRAPA, 2017).

A perspectiva é de que em 2020 a produção brasileira de soja ultrapasse a produção dos EUA, tornando-se o maior produtor mundial dessa *commodity*, por meio do aumento de produtividade e a maior capacidade de cultivo em terras agricultáveis, já que os EUA se encontram limitados a exploração de novas áreas de cultivo, dependendo somente do aumento de produtividade (FREITAS, 2011).

1.1.2. Disponibilidade do Fe sob efeito do encharcamento do solo

Em situações de encharcamento do solo, a estratégia 1 e 2 de absorção do Fe não são necessárias (HELL ; STEPHAN, 2003), pois é aumentado a disponibilidade do Fe no solo em decorrência das atividades realizados pelos microrganismos do solo. Mais precisamente, nesta situação, os microrganismos aeróbicos consomem todo o O_2 molecular e morrem por falta deste. Os microrganismos remanescentes anaeróbicos facultativos e anaeróbicos então passam a atuar. Esses microrganismos utilizam aceptores de elétrons alternativos como NO^{3-}, Mn^{4+}, Fe^{3+} e SO_4^{2-} para manter o seu metabolismo celular (MARANGUIT *et al*., 2017). Dessa maneira, os elétrons são transferidos dos compostos orgânicos para os oxidados, resultando em um ambiente de redução de pH e acúmulo de CO_2 e alteração do potencial redox do solo (MARANGUIT *et al*., 2017), o que limita a disponibilidade de nutrientes no solo e causa o acúmulo de fitotoxinas (YIN ; KOMATSU, 2017).

1.1.3. Excesso de Fe e estresse oxidativo

1.1.3.1. Efeito indireto (inclusão)

Na resposta direta, ocorre o acúmulo de Fe^{2+} livre na planta, uma vez que há comprometimento do metabolismo celular. Nesta situação, o Fe^{2+} passa ser um potencial tóxico para as plantas, pois catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando os radicais de hidroxilas ($HO^{\bullet}$), conforme equação: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + HO^{-}$, o qual são extremamente reativos, cuja reação é denominada de Fenton. O Fe^{3+}, produto da reação de Fenton, pode ser reduzido de volta à Fe^{2+} pelo ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), regenerando Fe^{2+} e permitindo que ocorra novamente a reação de Fenton, conforme equação: $Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ (reação de Haber-Weiss (HELL; STEPHAN, 2003).

Dentre as espécies reativas de oxigênio (EROs), os radicais de hidroxilas ($HO^{\bullet}$) são os mais prejudiciais para a planta, provocando a peroxidação lipídica, incluindo o colapso celular e, até mesmo, a deterioração do tecido. Além disso, provoca a oxidação dos açúcares, proteínas, ácido nucléicos e lipídios, interrupção do transporte de elétrons e inibição ou ativação enzimática (HELL ; STEPHAN, 2003; PEREIRA *et al*., 2013).

Para conter o estresse oxidativo, as plantas dispõem de sistemas de defesa antioxidantes, dividido em compostos enzimáticos [superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD)]; e compostos não enzimáticas (glutationa, carotenóides, ascorbato, tocoferol, ubiquinol, ácido úrico e ácido lipóico) (JUCOSKI *et al*., 2013, KROHLING *et al*., 2016).

Outra alternativa para evitar o estresse oxidativo, é a ligação do Fe na parede celular e a armazenação em proteínas chamadas ferritinas, as quais têm a capacidade de armazenar até 4500 átomos de Fe em seu núcleo. Estes processos visam a homeostase do Fe, a fim mantê-lo em um nível funcional ótimo para a planta, evitando que ele reaja com o O_2 e gere EROs (NIKOLIC ; RÖMHELD, 2003; DARBANI *et al*., 2013).

As ferritinas são encontradas principalmente nos cloroplastos e mitocôndrias (NOUET; MOTTE; HANIKENNE, 2011), locais estes quantitativamente mais importantes para uso do Fe (THOMINE ; VERT, 2013), embora também estejam presentes em plastídios da raiz e nos vacúolos (HELL ; STEPHAN, 2003).

É aceito que, para a entrada do Fe no cloroplasto, é necessário que antes ocorra sua redução, reação catalisada pela proteína FRO7, enquanto a PIC1, pode ser um importador de Fe cloroplastidial; ambas proteínas estão localizadas no envelope interno do cloroplasto. Em relação a entrada do Fe na mitocôndria, a FRO8 parece estar envolvida na redução do Fe, porém ainda não está claro o importador específico do Fe (NOUET; MOTTE; HANIKENNE, 2011).

Especificamente para o Fe, os vacúolos exercem papel de armazenamento e sequestro, especialmente em sementes. Os transportadores NRAMP3 e NRAMP4 exportam o Fe para fora dos vacúolos, enquanto o transportador VIT1 exerce função na importação de Fe para o vacúolo (THOMINE ;VERT, 2013). O influxo do Fe para o vacúolo das células radiculares é mediado via transportador AtFPN2 (MORRISSEY ; GUERINOT, 2009).

1.1.3.2. Efeito indireto (exclusão)

Por outro lado, indiretamente, o Fe^{2+} reage com oxigênio presente na raiz, formando um precipitado de hidróxido de ferro na superfície da raiz, de cor avermelhado regular e aspecto macio ou uma placa de revestimento irregular, o que altera a absorção de outros nutrientes (CHENG *et al.*, 2014; KROHLING *et al*., 2016).

É importante salientar, que mesmo a raiz em situação de anoxia, a falta de O_2 pode ser suprida neste órgão, através da formação de extensos aerênquimas oriundos da parte aérea e de modificações anatômicas na raiz (CHENG *et al.*, 2014), em consequência pode ocasionar a resposta indireta supracitada.

1.1.4. Fixação biológica do N em solos encharcados e não encharcados

As plantas podem absorver as formas de N orgânico e inorgânico, porém a maior fonte de N para as plantas é o N inorgânico, o qual é principalmente absorvido na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+). Outra forma de absorção é fixação biológica do nitrogênio (FBN) em plantas simbióticas, onde o nitrogênio (N_2) utilizado é oriundo da atmosfera (BLUMENTHAL *et al*., 1997; PELIZZARO *et al*., 2017).

Especificamente, nas leguminosas, a forma predominante de absorção do N é via FBN, devido terem a capacidade de estabelecer simbioses com as bactérias do gênero *Rhizobium* para fixar o N_2 atmosférico (OLDROYD, 2001, BALESTRASSE *et al*., 2006). A associação simbiótica das leguminosas com as bactérias fixadoras de N ocorrem, na pluralidade das espécies, no sistema radicular, formando os nódulos radiculares, onde ocorre a conversão do N_2 atmosférico à NH_3^+, pela ação da enzima nitrogenase (BALESTRASSE *et al*., 2006).

A enzima nitrogenase é um complexo enzimático formado por duas subunidades (proteínas). Subunidade I, a nitrogenase ou Fe-proteína; subunidade II, a dinitrogênio redutase ou MoFe-proteína. A ferredoxina reduz a Fe-proteína, que logo em seguida, hidrolisa ATP e reduz a MoFe-proteina. A MoFe-proteína, sob condições normais, reage com N_2 e H^+, tendo como o produto o NH_4^+ (ANDREWS *et al*., 2009).

Essa interação simbiótica efetiva entre a planta e o rizóbio é apoiada por uma complexa rede de troca de nutrientes entre os dois parceiros (PELIZZARO *et al*., 2017). Em troca do NH_3^+, as plantas fornecem carboidratos, como o malato, oriundo de seu processo fotossintético. Dentro dos nódulos, esses carboidratos são hidrolisados para a obtenção dos compostos intermediários da respiração e de compostos com poder redutor (BALESTRASSE *et al*., 2006; JUSTINO ; SODEK, 2013).

O O_2 é aceptor final dos elétrons provenientes da respiração do bacterióide, no entanto a enzima nitrogenase é sensível à sua presença, o que afeta a sua atividade (LUCIÑSKI, POLCYN ; RATAJCZAK, 2002). Em vista disso, visando a homeostase, a entrada do O_2 no bacterióide é controlada por uma camada de células que circunda o córtex interno do nódulo ao redor da zona infectada, formando uma barreira de difusão ao O_2 (JUSTINO ; SODEK, 2013). A proteína leghemoglobina também está diretamente relacionada ao controle do O_2 dentro do hospedeiro, assim, por meio da sua alta afinidade com o O_2, liga-se a este e armazena-o por alguns segundos, para transportá-lo até as células dos nódulos, o que garante a disponibilidade de grandes quantidades de O_2, porém de maneira muito controlada (TAIZ *et al*., 2017). A partir desses recursos fisiológicos da planta, os níveis de O_2 livre no hospedeiro são reduzidos, o que favorece a atividade da enzima nitrogenase.

Quando o solo está encharcado, ocorre o preenchimento dos espaços dos macroporos do solo pela água, restringindo o fornecimento de O_2 para a raiz e nódulos, categorizado em ausência parcial de O_2 (hipóxia) ou a completa ausência de O_2 (anoxia) (MOHANTY; ONG, 2003). Dessa forma, a escassez do O_2 altera via da fosforilação oxidativa para glicólise e a fermentação (MOHANTY ; ONG, 2003), como a eficiência energética dessa via é substancialmente menor, ocorre declínio da fixação do N e da síntese de ATP (SOUZA, *et al*., 2016).

CAPÍTULO II

Comportamento fotossintético e produção de biomassa em resposta ao encharcamento do solo associado ao excesso de ferro na fase vegetativa da soja

2 INTRODUÇÃO

O encharcamento do solo é um problema comum em algumas áreas agricultáveis, inclusive em regiões sob cultivo de soja (MAEKAWA *et al*., 2011; SYED *et al*., 2015; SARTORI *et al*., 2016), em decorrência de lençóis freáticos altos, irrigações inadequadas ou após grandes períodos de chuva em solos compactados com deficiência natural de drenagem (BATAGLIA ; MASCARENHAS, 1981; KOKUBUN, 2013) e em solos de várzea (PEDO *et al*., 2015).

As trocas gasosas entre o solo e a atmosfera são severamente afetadas em solos encharcados (MAEKAWA *et al*., 2011), assim como também é natural a destruição da estrutura do solo, o que causa a dispersão dos agregados; consequentemente os poros são bloqueados pelas suas partículas, impedindo o movimento da água e do ar no solo (RODRÍGUEZ-GAMIR *et al*., 2011). Sob efeito do encharcamento, o O_2 apresenta baixa solubilidade e possui baixa taxa de difusão em relação ao ar, o que afeta diretamente o suprimento de O_2 para a raiz e nódulos (em leguminosas) (MOHANTY ; ONG, 2003; VOESENEK *et al*., 2006).

Conforme o tempo de duração do encharcamento do solo, pode ocorrer depleção parcial (hipóxia) ou completa (anoxia) do O_2 pelos microrganismos aeróbicos e plantas. Sob anoxia, os microrganismos presentes são os anaeróbicos facultativos e anaeróbicos. Esses microrganismos utilizam aceptores de elétrons alternativos, preferencialmente os com maior potencial de produção de energia ou os que estão mais prontamente disponíveis, para manutenção das atividades metabólicas (MARANGUIT *et al*., 2017). Além disso, o encharcamento do solo causa outras mudanças em suas características químicas, incluindo a acidificação e alteração do potencial redox do solo, o que limita a disponibilidade de nutrientes no solo e causa o acúmulo de fitotoxinas (YIN ; KOMATSU, 2017).

O óxido insolúvel de Fe^{3+} é um aceptor de elétrons de iminente risco para as plantas, pois é reduzido à Fe^{2+} (forma solúvel) e liberado na água presente no solo, o que resulta na absorção do Fe em excesso (FREI *et al*., 2016; MARANGUIT *et al*., 2017). Altas concentrações de Fe no tecido foliar podem afetar a taxa de assimilação de CO_2 devido a degradação das membranas celulares e ruptura dos complexos de proteínas fotossintéticas,

como a proteína D1 (MÜLLER *et al*., 2017), pela a ação de radicais de hidroxila (HO•) via reação de Fenton (HELL ; STEPHAN, 2003; PEREIRA *et al*., 2013).

Concomitantemente, com a falta de O_2, a planta estimula o tecido radicular submerso a alterar a via de fosforilação oxidativa de produção de energia para a glicólise e fermentação (MOHANTY ; ONG, 2003), consequentemente ocorre o declínio da fixação do N em leguminosas e síntese de ATP (SOUZA *et al*., 2016). O rendimento global de ATP produzido durante a fermentação é de apenas duas moléculas de ATP por molécula de glicose, contra 38 moléculas de ATP produzidas durante a fosforilação oxidativa (SAIRAM *et al*., 2009).

Nas folhas, após o encharcamento, o primeiro comportamento detectável é a diminuição da disponibilidade de CO_2 devido à limitação estomática, prejudicando as trocas gasosas, absorção de água e transpiração (ZHANG *et al*., 2016; YAN *et al*., 2018). Consequentemente, pode ocorrer o bloqueio do transporte de elétrons fotossintéticos e limitação da fixação de CO_2 no ciclo de Calvin-Benson, levando a uma produção acentuada espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZHENG *et al*., 2017; YAN *et al*., 2018). O vazamento dos íons da cadeia transportadora de elétrons é transferido para o O_2, o que pode induzir o excesso de produção do oxigênio singleto ($^1O_2$) e peroxido de hidrogênio (H_2O_2) no Fotossistema II (PSII) (BARBOSA *et al*., 2014; ZHENG *et al*., 2017), assim como também o elétron da ferredoxina reduzida é transferido para O_2, em vez de ir para NADP, formando o ânion superóxido ($O2^{\bullet-}$) ao lado do receptor do Fotossistema I (PSI) (BARBOSA *et al*., 2014; YAN *et al*., 2018).

Este trabalho avaliou a vulnerabilidade do aparato fotossintético e produção de biomassa de duas cultivares de soja no estágio fenológico V2, sob condição hídrica adequada e diferentes níveis de encharcamento do solo associada a uma concentração moderada e duas concentrações tóxicas de Fe. Até onde é sabido, não há estudos que elucidam essa temática com a cultura em questão, embora seja de grande importância analisar o seu comportamento a fim de proporcionar subsídios para o desenvolvimento de variedades toleráveis a essas condições abióticas.

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Local experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no município de Dracena, Estado de São Paulo, Brasil (21 ° 29′ S e 51 ° 2′ W; 396 m de altitude). A casa de vegetação utilizada foi do tipo arco, coberta com difusor de filme plástico transparente com espessura de 1000

mícrons, sendo os lados cobertos por tela sombrite com 50% de capacidade de retenção de luz.

2.1.2 Delineamento e tratamentos experimentais

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, disposto em esquema fatorial 3 × 3 × 2, sendo três níveis de encharcamento do solo (0 – sem encharcamento, 50 e 100%); três níveis de concentração de ferro no solo (25, 125 e 500 mg dm^{-3}); e dois níveis de cultivares de soja (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO, ambas de crescimento indeterminado). Cada vaso foi composto por uma população de 3 plantas, totalizando uma população final de 9 plantas por tratamento.

2.1.3 Condições de cultivo

O solo utilizado foi um Latossolo Vermelho Distrófico de textura franco arenosa (SANTOS, 2018). A amostra foi coletada na profundidade de 0,00–0,20 m, formando uma amostra composta. O solo foi desintegrado, seco ao ar, peneirado (4,0 mm) e determinado as seguintes propriedades químicas: pH ($CaCl_2$): 4,6; matéria orgânica: 14 g dm^{-3}; P (resina): 4 mg dm^{-3}; K: 2,1 $mmol_c$ dm^{-3}; Ca: 7 $mmol_c$ dm^{-3}; Mg: 5 $mmol_c$ dm^{-3}; S: 5 mg dm^{-3}; B: 0,09 mg dm^{-3}; Cu: 0,6 mg dm^{-3}; Fe: 0,25 mg dm^{-3}; Mn: 16,7 mg dm^{-3}; Zn: 1 mg dm^{-3}; acidez potencial: 18 $mmol_c$ dm^{-3}; Al: 4 $mmol_c$ dm^{-3}; soma de bases trocáveis: 14,1 $mmol_c$ dm^{-3}; capacidade de troca catiônica: 32,1 $mmol_c$ dm^{-3}; saturação por bases: 44%.

A saturação de base do solo foi aumentada para 70% (QUAGGIO *et al*., 1985) por meio da adição de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) e carbonato de magnésio ($MgCO_3$), na proporção de 3: 1. O solo foi incubado por 30 dias em vasos e mantido a umidade à 80% da capacidade de campo para que ocorra a reação. Posteriormente, o solo foi seco ao ar durante 7 dias. Os vasos usados foram de polipropileno com capacidade de 4 dm^{-3}, forrados com manta de poliestireno para evitar a perda de solo.

2.1.4 Instalação e condução experimental

A fertilização foi realizada com as seguintes concentrações e fontes por vaso: 10 mg dm^{-3} de N ($CO(NH_2)_2$); 200 mg dm^{-3} de P ($Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$); 100 mg dm^{-3} de K (K_2SO_4); 0,5 mg dm^{-3} de B (H_3BO_3); 0,05 mg dm^{-3} de Co ($CoCl_2 \cdot H_2O$); 1,0 mg dm^{-3} de Cu ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$); 0,05 mg dm^{-3} de Mo (H_2MoO_4); 0,05 mg dm^{-3} de Ni ($NiSO_4 \cdot 7H_2O$); 5,0 mg dm^{-3} de Mn ($MnSO_4$) e 2,0 mg dm^{-3} de Zn ($ZnSO_4$). A aplicação do K foi parcelada em 2 partes, sendo aplicados antes da semeadura e no estágio fenológico V2. As concentrações de Fe

($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) foram aplicadas nas concentrações de 0 (sem fornecimento), 100 e 475 mg dm^{-3} no solo, a fim de manter respectivamente uma concentração natural de Fe (25 mg dm^{-3}) e proporcionar duas concentrações altas de Fe (125 e 500 mg dm^{-3}).

Após quatro dias, foram semeadas 10 sementes de soja a uma profundidade de 3 cm, previamente inoculadas com bactérias fixadoras de N_2 (*Bradyrhizobium japonicum*), com as estirpes SEMIA 587 e 5019. No estágio fenológico V1 (FEHR *et al*. 1971), foi realizado o desbaste, reduzindo a população para três plantas por vaso, as quais foram escolhidas pelo maior vigor e homogeneidade em tamanho entre si.

No estágio fenológico V2 (FEHR *et al*., 1971), foi realizado o encharcamento do solo por um período de 10 dias. Os vasos pertencentes aos níveis de encharcamento de 50 e 100% foram colocados em vasos maiores sem furos. Para o nível de 50% de encharcamento, foi mantido a água na proporção da metade do vaso externo; enquanto para o nível de 100% de encharcamento, foi mantido a água na proporção de 2 cm acima do solo.

Durante o período experimental, a reposição de água evapotranspirada das unidades experimentais foi realizada por meio de micro aspersores em suspensão, acionados duas vezes ao dia (período da manhã e tarde). Dessa forma, foi mantido a umidade do solo à 80% da capacidade de campo, exceto durante os 10 dias de imposição do estresse, no qual a irrigação foi realizada via manual.

2.1.5 Determinação dos atributos de trocas gasosas

No 10º dia de estresse, foram realizadas avaliações de trocas gasosas por meio do analisador portátil de gases infravermelhos (ADC Bioscientifc Ltd., Hoddesdon, United Kingdom) em 2 plantas de cada unidade experimental no primeiro trifólio totalmente expandido. As leituras foram realizadas em um dia claro entre às 10:00 e 11:30. A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) foi padronizada para uma luz de saturação artificial de 1000µmolm^{-2} s^{-1} e uma concentração de CO_2 no ambiente. A umidade relativa média foi de 30%.

Foram obtidas as taxas de assimilação de CO_2 expressa por área (*A* – µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}), condutância estomática (*gs* – mol H_2O m^{-2} s^{-1}) e transpiração (*E* – mmol H_2O H_2O). À posteriori, foram estimadas a eficiência da carboxilação (*EiC* – mol air^{-1}) e a eficiência instantânea do uso da água (*EUA* – µmol CO_2 $mmol^{-1}$ H_2O) por meio das equações 1 e 2, respectivamente.

$$EIC = \left(\frac{A}{Ci}\right) \qquad \text{Eq. (1)}$$

$$EUA = \left(\frac{A}{E}\right) \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde Ci (µmol CO_2 mol ar^{-1}) corresponde a concentração interna de CO_2 na câmara subestomática.

2.1.6 Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos

A determinação dos pigmentos fotossintéticos foi baseada na descrição de Lichtenthaler e Wellburn (1983). Para a extração, foram coletadas folhas do primeiro trifólio totalmente expandido de duas plântulas de cada vaso, utilizando a acetona 80% como solvente. Tecido de folhas frescas (0,5 g) foram macerados em N_2 líquido com pilão e almofariz. Foi adicionado 5 ml de acetona 80% nas amostras e centrifugado a 1500 rpm por 5 min. Após a extração, a absorbância (ABS) do solvente foi medida em comprimentos de onda específicos por espectrofotometria. As concentrações de clorofila *a* (C*a*), clorofila *b* (C*b*), clorofila total (C*t*) e carotenoides (CAR) foram expressos em µg mL^{-1} e calculados conforme as equações abaixo:

$$Ca = \left(12{,}25 \times \mathrm{ABS}_{663{,}2}\right) - \left(2{,}79 \times \mathrm{ABS}_{646{,}8}\right) \quad \text{Eq. (3)}$$

$$Cb = \left(21{,}50 \times \mathrm{ABS}_{646{,}8}\right) - \left(5{,}10 \times \mathrm{ABS}_{663{,}2}\right) \quad \text{Eq. (4)}$$

$$Ct = \left(7{,}15 \times \mathrm{ABS}_{663{,}2}\right) + \left(18{,}71 \times \mathrm{ABS}_{646{,}8}\right) \quad \text{Eq. (5)}$$

$$\mathrm{CAR} = \left(\left(1000 \times \mathrm{ABS}_{470}\right) - \left(1{,}82 \times \mathrm{Ca} - 85{,}02 \times \mathrm{Cb}\right)/198\right) \quad \text{Eq. (6)}$$

2.1.7 Produção de biomassa

Após o final do período de imposição do estresse, as plantas foram separadas em parte aérea e raízes. O material foi identificado, embalado em sacos de papel e seco em estufa à 65 °C por 72 h. Para então, mensurar as biomassas secas da parte aérea e raiz (g $planta^{-1}$).

2.1.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p \leq 0{,}05$). Quando significativos, os parâmetros foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0{,}05$). A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software R (R CORE TEAM, 2019).

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Comportamento das trocas gasosas

As características de taxa de assimilação de CO_2, condutância estomática, eficiência instantânea da carboxilação, transpiração e eficiência do uso da água apresentaram efeito significativo de interação tripla na ANOVA (Tabela suplementar 1).

A cultivar Agroeste 3680 apresentou diminuição da taxa de assimilação de CO_2 com o aumento das concentrações de Fe nos três níveis de encharcamento (Figura 1A). O encharcamento de 100% foi o que proporcionou as menores estimativas seguido pelos tratamentos sem encharcamento e encharcamento de 50% em cada concentração de Fe, exceto com a concentração de 500 mg dm^{-3} (Figura 1A). Diferentemente, a cultivar NS 6601 IPRO não apresentou diminuição da taxa de assimilação de carbono com o aumento das concentrações de Fe no tratamento sem encharcamento. A concentração de 500 mg dm^{-3} de Fe associada ao encharcamento de 50% e as concentrações de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe associada ao encharcamento de 100% foram as únicas que causaram a diminuição da taxa de assimilação de CO_2 (Figura 1B). Em cada concentração de Fe, o encharcamento de 100% foi o que apresentou as menores estimativas em relação aos encharcamentos de 0 e 50% (Figura 1B). As estimativas de taxa de assimilação de CO_2 foram mais altas com a cultivar Agroeste 3680 na maioria das situações testadas (Figuras 1A e 1B).

A condutância estomática apresentou comportamento semelhante à taxa de assimilação de CO_2 (Figura 1). No entanto, com a cultivar Agroeste 3680, não foi observado redução desta característica sob encharcamento de 100% com a concentração de 125 mg dm^{-3} de Fe (Figura 1C). Por outro lado, a cultivar NS 6601 IPRO apresentou uma redução com a concentração de 125 mg dm^{-3} de Fe em relação a concentração de 25 mg dm^{-3} de Fe quando associado ao encharcamento de 50% (Figura 1D). A cultivar Agroeste 3680 apresentou maior condutância estomática nos tratamentos sem encharcamento e encharcamentos de 50 e 100% com as concentrações de 25 e 125 mg dm^{-3} Fe em relação a cultivar NS 6601 IPRO. Por sua vez, esta alcançou maiores estimativas somente com a concentração de 500 mg dm^{-3} de Fe associada a situação sem encharcamento (Figuras 1C e 1D).

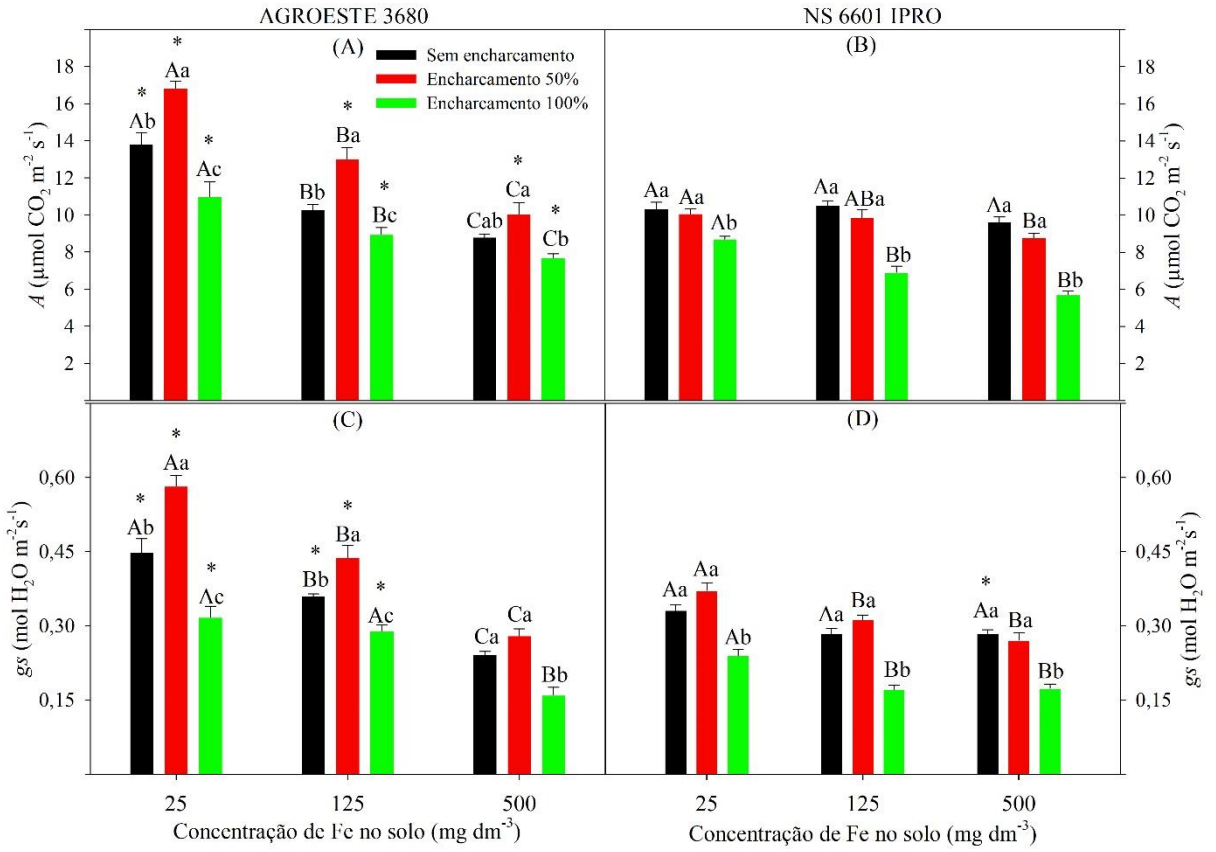

Figura. 1. Taxa de assimilação de CO_2 expressa por área (A e B) e condutância estomática (C e D) em plantas de soja submetidas a três níveis de encharcamento (0 - sem encharcamento, 50 e 100%) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}), em duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe e * expressa o valor significativamente maior entre as duas cultivares em cada condição testada. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Foi verificado na cultivar Agroeste 3680 uma diminuição da eficiência instantânea da carboxilação com o aumento das concentrações de Fe nos três níveis de encharcamento. No entanto, as concentrações de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe associada ao encharcamento de 100% não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 2A). Em cada concentração de Fe, o encharcamento de 100% foi o que proporcionou as menores estimativas para esta característica, seguido pelos tratamentos sem encharcamento e encharcamento de 50%, exceto com a concentração de 500 mg dm^{-3} (Figura 2A). A cultivar NS 6601 IPRO não apresentou diferença significativa para a eficiência instantânea da carboxilação com o aumento das concentrações de Fe nos tratamentos sem encharcamento e encharcamento de 50% (Figura 2B). As concentrações de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe associadas ao encharcamento de 100% foram as únicas que apresentaram semelhante diminuição da taxa de assimilação de CO_2 (Figura 2B). Em cada concentração de Fe, os tratamentos sem encharcamento e

encharcamento de 50% apresentaram estimativas semelhantes entre si e superiores às proporcionadas pelo encharcamento de 100% (Figura 2B).

A cultivar Agroeste 3680 apresentou maior eficiência instantânea da carboxilação do que a cultivar NS 6601 IPRO nos tratamentos sem encharcamento (concentração de 25 mg dm^{-3} de Fe), encharcamentos de 50 (concentrações de 25 e 125 mg dm^{-3} de Fe) e 100% (concentração de 500 mg dm^{-3} de Fe). As demais condições testadas apresentaram valores semelhantes para esta característica entre as cultivares (Figuras 2A e 2B).

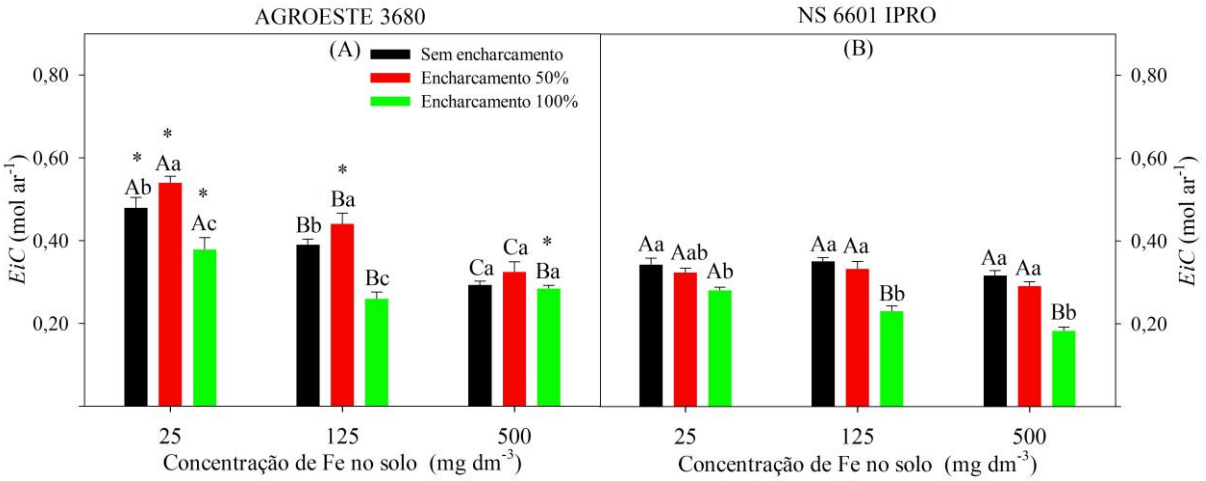

Figura. 2. Eficiência instantânea da carboxilação (A e B) em plantas de soja submetidas a três níveis de encharcamento (0 - sem encharcamento, 50 e 100%) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}), em duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe e * expressa o valor significativamente maior entre as duas cultivares em cada condição testada. Barra na NS 6601 IPRO vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Foi verificado na cultivar Agroeste 3680 uma diminuição da eficiência instantânea da carboxilação com o aumento das concentrações de Fe nos três níveis de encharcamento (Figura 2A). Em cada concentração de Fe, o encharcamento de 100% foi o que proporcionou as menores estimativas para esta característica, seguido pelos tratamentos sem encharcamento e encharcamento de 50%, exceto com a concentração de 500 mg dm^{-3} (Figura 2A). A cultivar NS 6601 IPRO não apresentou diferença significativa para a eficiência instantânea da carboxilação com o aumento das concentrações de Fe nos tratamentos sem encharcamento e encharcamento de 50% (Figura 2B). As concentrações de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe associadas ao encharcamento de 100% foram as únicas que apresentaram semelhante diminuição da taxa de assimilação de CO_2 (Figura 2B). Em cada concentração de Fe, os tratamentos sem encharcamento e encharcamento de 50% apresentaram estimativas semelhantes entre si e superiores às proporcionadas pelo encharcamento de 100% (Figura 2B).

A cultivar Agroeste 3680 apresentou diminuição da eficiência do uso da água com o aumento das concentrações de Fe no tratamento sem encharcamento. Por outro lado, a concentração de 500 mg dm^{-3} de Fe associada aos encharcamentos de 50 e 100% apresentou uma diminuição da eficiência do uso da água (Figura 3C). Em cada concentração de Fe, o encharcamento de 50% e 100% foram os que apresentaram as menores estimativas em relação ao tratamento sem encharcamento, exceto na concentração de 500 mg dm^{-3} de Fe (Figura 3C). A cultivar NS 6601 IPRO não apresentou diferença significativa para a eficiência do uso da água com o aumento das concentrações de Fe nos tratamentos sem encharcamento e encharcamento de 50%. Por outro lado, a concentração de 500 mg dm^{-3} de Fe apresentou diminuição da eficiência do uso da água no encharcamento de 100% em relação as demais concentrações de Fe. Ainda, este tratamento se diferenciou dos demais encharcamentos nesta mesma concentração de Fe (Figura 3D). De forma geral, a cultivar Agroeste 3680 apresentou maior eficiência do uso da água do que a cultivar NS 6601 IPRO na maioria das condições avaliadas (Figuras 3C e 3D).

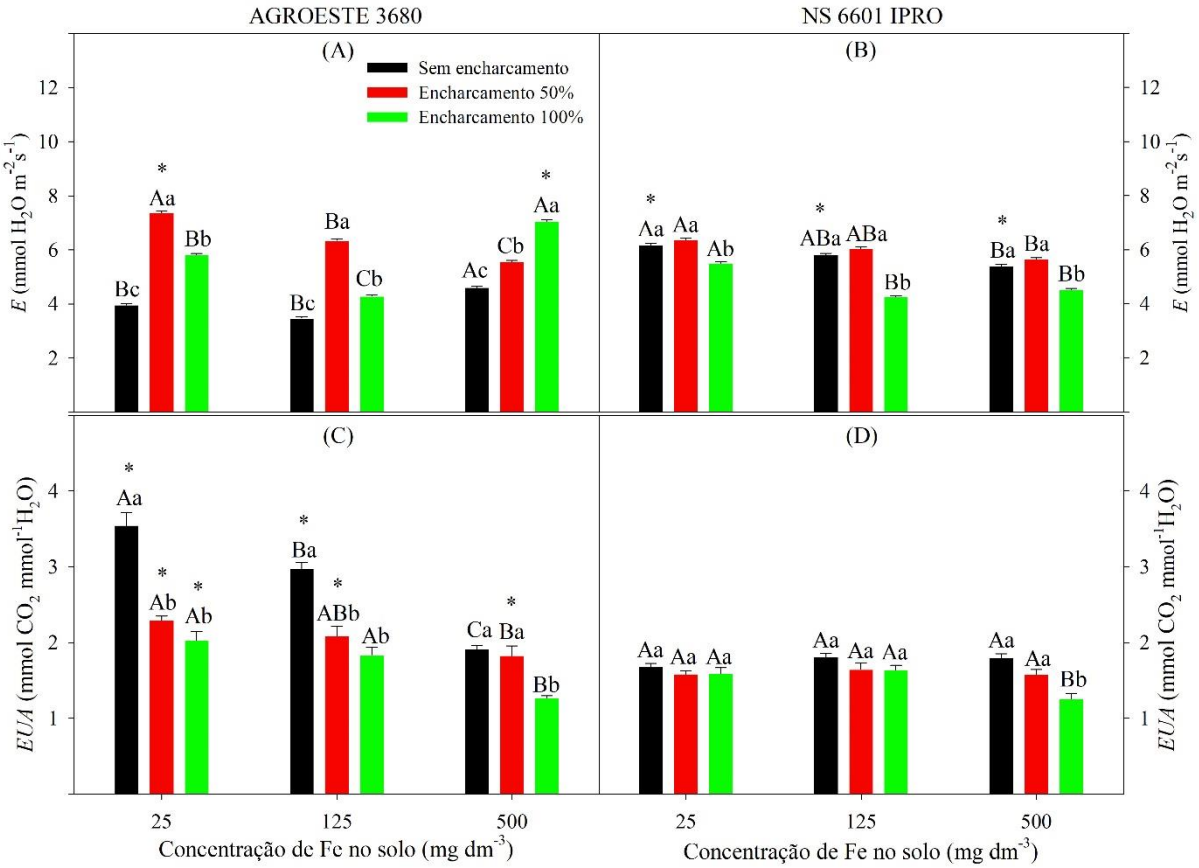

Figura. 3. Transpiração (A e B) e eficiência do uso da água (D e C) em plantas de soja em plantas de soja submetidas a três níveis de encharcamento (0 - sem encharcamento, 50 e 100%) e três doses de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}), em duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe e * expressa o valor

significativamente maior entre as duas cultivares em cada condição testada. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

2.2.2. Concentração de pigmentos fotossintéticos

As características de clorofila *a*, *b* e total e carotenoides apresentaram efeito significativo simples para os níveis de encharcamento e interação dupla entre os níveis de ferro e variedade na ANOVA (Tabela suplementar 1).

A concentração de clorofila *a*, *b* e total apresentaram decréscimo somente no encharcamento de 100%, sendo respectivamente na ordem de 21, 30, e 25% em relação ao tratamento sem encharcamento (Figuras 4A, 4C e 4E), independentemente das concentrações de Fe e cultivares.

Independentemente dos níveis de encharcamento, as concentrações de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe reduziram igualmente a concentração de clorofila *a* da cultivar Agroeste 3680, apresentando respectivamente uma redução de 34 e 44% em relação a concentração de 25 mg dm^{-3} de Fe (Figura 4B). Por outro lado, o aumento das concentrações de Fe não alterou a concentração de clorofila *a* da cultivar NS 6601 IPRO (Figura 4B). A concentração de clorofila *b* e total apresentaram redução com o aumento das concentrações de Fe. Tal efeito foi mais pronunciado na concentração de 500 mg dm^{-3} de Fe para a cultivar Agroeste 3680 [-50% (clorofila *b*) e -45% (clorofila total)]. As concentrações de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe proporcionaram redução semelhante na concentração de clorofila *b* e total da cultivar NS 6601 IPRO, sendo respectivamente inferior em 29 e 33% (clorofila b) e 21 e 24% (clorofila total) em relação à concentração de 25 mg dm^{-3} de Fe (Figuras 4D e F). De forma geral, a cultivar Agroeste 3680 apresentou maiores concentrações de clorofila *a*, *b* e total (Figuras 4B, 4D e 4F).

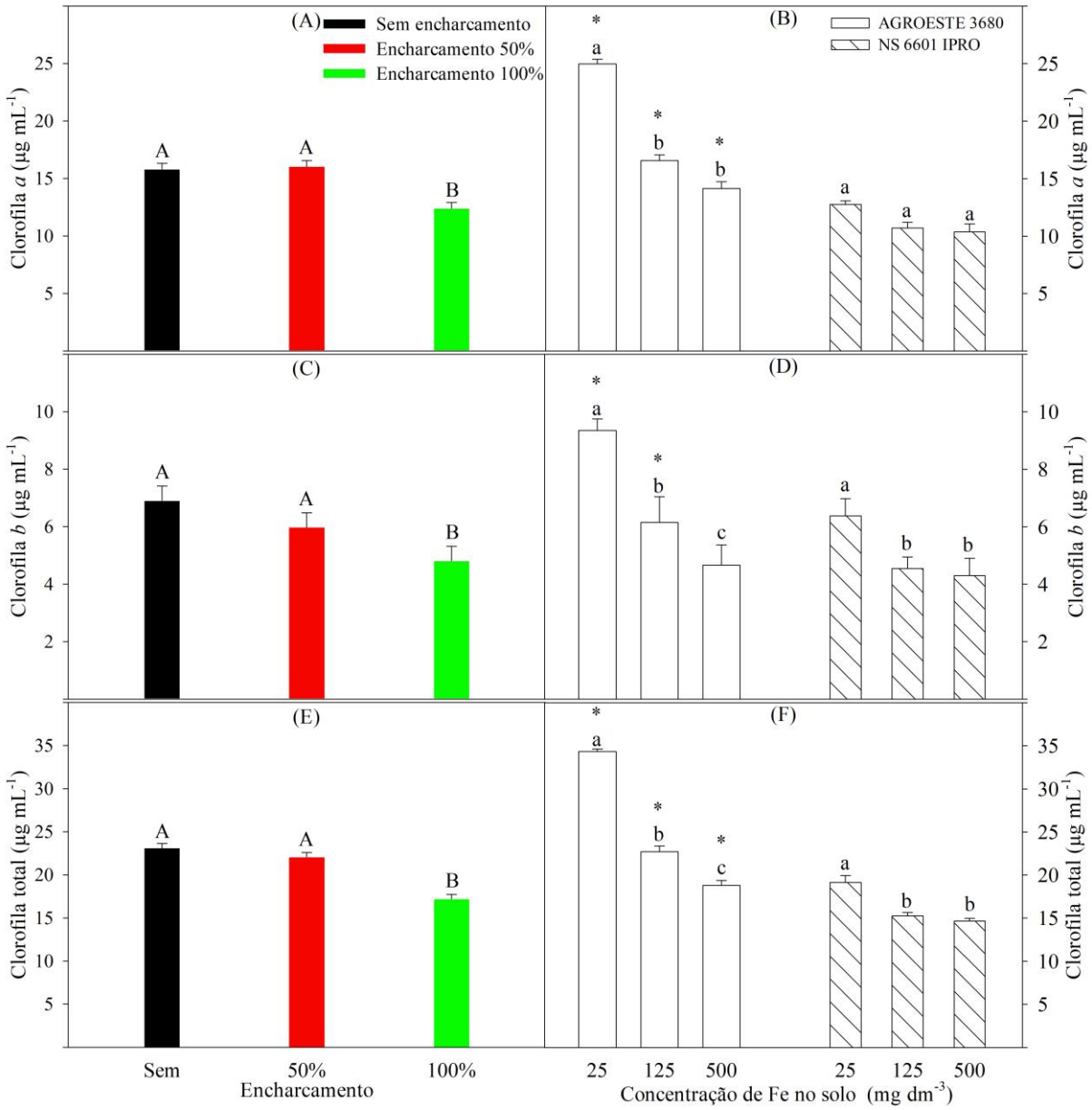

Figura. 4. Concentração de clorofila *a* (A e B), concentração de clorofila *b* (C e D) e concentração de clorofila total (E e F) em plantas de soja submetidas a três níveis de encharcamento (0 – sem encharcamento, 50 e 100%) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}), em duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúsculas comparam os níveis de encharcamento independente das concentrações de Fe e cultivares, letras minúsculas comparam as concentrações de Fe independente dos níveis de encharcamento e * expressa o valor significativamente maior entre as duas cultivares independente dos níveis de encharcamento. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Em relação ao encharcamento, a concentração de carotenoide apresentou o mesmo comportamento da clorofila *a*, *b* e total (Figura 5A). As concentrações de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe reduziram igualmente a concentração carotenoide em ambas as cultivares, sendo a

cultivar Agroeste 3680 a que apresentou maior estimativa para esta característica, independentemente dos níveis de encharcamento (Figura 5A).

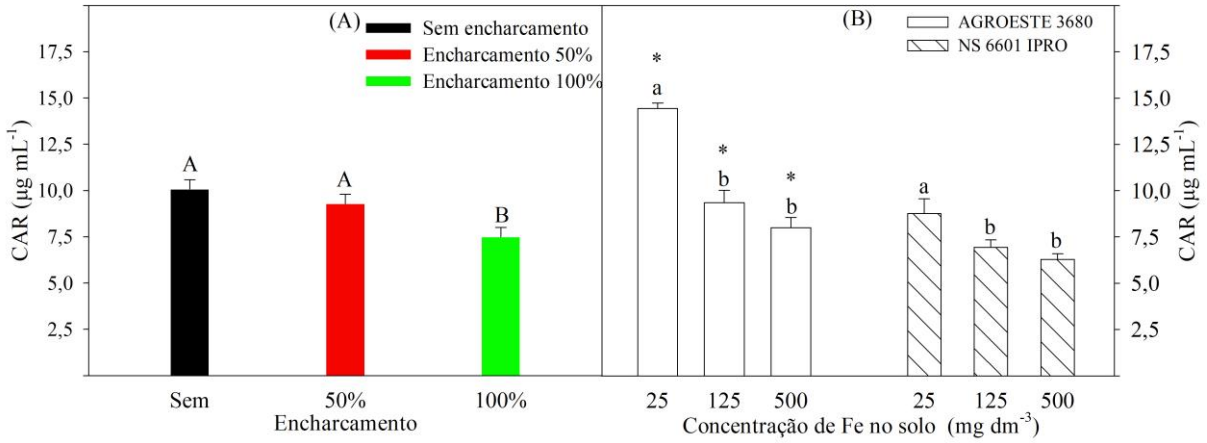

Figura. 5. Concentração de carotenoides (A e B) em plantas de submetidas a três níveis de encharcamento (0 - sem encharcamento, 50 e 100%) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}), em duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúsculas comparam os níveis de encharcamento independente das concentrações de Fe e cultivares, letras minúsculas comparam as concentrações de Fe independente dos níveis de encharcamento e * expressa o valor significativamente maior entre as duas cultivares independente dos níveis de encharcamento. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

2.2.3. Produção de biomassa

As características de biomassa seca para parte aérea e de raiz apresentaram efeito significativo de interação tripla na ANOVA (Tabela suplementar 1).

De maneira geral, a cultivar Agroeste 3680 apresentou redução da biomassa seca da parte aérea e da raiz com o aumento das concentrações de Fe nos três níveis de encharcamento (Figuras 6A e 6C) e, em cada concentração de Fe, o encharcamento de 100% foi o que apresentou as menores estimativas. Com a cultivar NS 6601 IPRO, a concentração de 500 mg dm^{-3} de Fe associada aos tratamentos sem encharcamento e encharcamento de 50% e as concentrações de 125 (somente para a parte aérea) e 500 mg dm^{-3} de Fe associada ao encharcamento de 100% foram as únicas que proporcionaram diminuição da biomassa seca da parte aérea e da raiz (Figuras 6B e 6D). As estimativas da biomassa seca da parte aérea e da raiz foram superiores na maioria das condições testadas com a cultivar Agroeste 3680 (Figura 6).

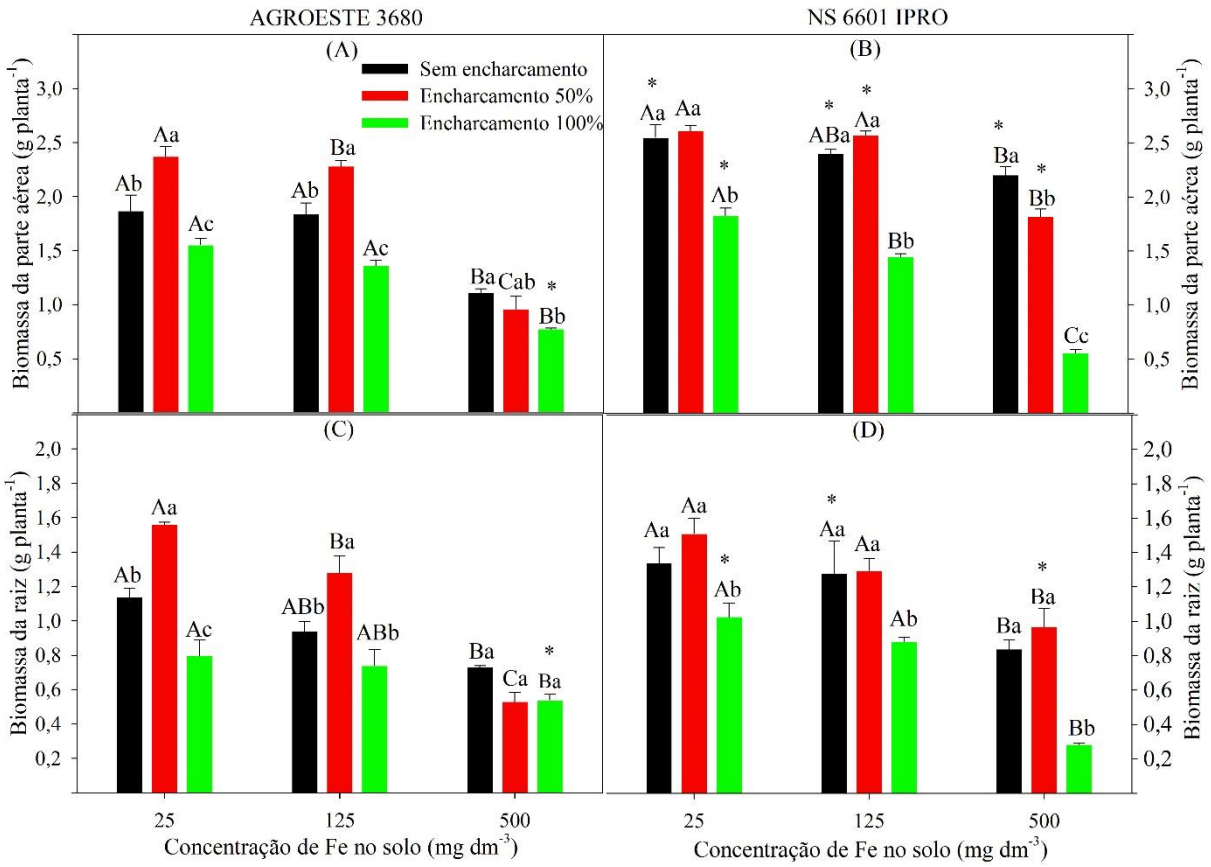

Figura. 6. Biomassa seca da parte aérea (A e B) e biomassa seca da raiz (C e D) em plantas de soja submetidas a três níveis de encharcamento (0 - sem encharcamento, 50 e 100%) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}), em duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe e * expressa o valor significativamente maior entre as duas cultivares em cada condição testada. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 9 plantas).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

2.3. DISCUSSÃO

2.3.1. Trocas gasosas: comportamento diferencial de cultivares de soja em resposta ao encharcamento do solo combinado com o excesso de ferro

A fotossíntese é um processo fisiológico primário para a sobrevivência e crescimento das plantas (YAN *et al.*, 2018). Em espécies sensíveis, o encharcamento do solo e o excesso de Fe são estresses que afetam diretamente a fotossíntese, a partir do qual é possível dimensionar a grau de tolerância das espécies estudas. A condutância estomática pode ser um limitante físico para o influxo de CO_2 para a fotossíntese, assim como também, após o CO_2 superar a barreira estomática e mesofílica, podem ocorrer limitações pelas reações de carboxilação, que são comumente usadas para inferir os efeitos cumulativos das limitações bioquímicas (MÜLLER *et al.*, 2017).

As limitações estomáticas e bioquímicas foram observadas com a cultivar Agroeste 3680 quando cultivada sob excesso de Fe e encharcamento de 100%, devido aos decréscimos da condutância estomática e taxa de assimilação de CO_2 (Figuras 1C e 1A), juntamente com a redução da eficiência da carboxilação (Figura 2A). Comportamento semelhante foi observado com a cultivar NS 6601 IPRO nos tratamentos supracitados, exceto para o tratamento sem encharcamento com o aumento das concentrações de Fe, visto que as limitações estomáticas e bioquímicas não foram presenciadas (Figuras 1B, 1D e 2B), sugerindo uma tolerância moderada ao Fe inerente a esta cultivar.

A diminuição da condutância estomática detectada em ambas as cultivares no encharcamento de 100% quando comparado aos demais encharcamentos (Figuras 1C e 1D), provavelmente constitui mais uma medida adaptativa de defesa a fim de evitar a perda de água e desidratação dos tecidos (YAN et al., 2018), do que uma consequência da perda de turgescência celular causada pela diminuição da condutividade hidráulica (CHAUDHARY et al., 2016; OLMO-VEGA et al., 2017). Pois as plantas de soja apresentam adaptações morfológicas para tolerar o encharcamento (THOMAS et al., 2005). No entanto, a perturbação imposta pelo encharcamento, perdura até desenvolverem uma rede de aerênquima suficiente para a difusão do O_2 até a raiz (SHIMAMURA et al., 2010).

O aumento das concentrações de Fe também refletiu na diminuição da condutância estomática (Figuras 1C e 1D). Segundo Dufey et al. (2009) e Pereira et al. (2013) o excesso de Fe absorvido está intimamente atrelado a esse comportamento (Figuras 1C e 1D), pois a diminuição da condutância estomática é uma resposta tardia a toxicidade do Fe e não um mecanismo de defesa na cultura do arroz. Esses relatos são respaldados pelos sintomas fenotípicos encontrados em ambas as cultivares de soja (dados não apresentados), cuja sintomatologia observada foi o amarelecimento marginal das folhas inferiores, seguido de necrose (STEIN et al., 2009).

Como esperado, a diminuição da condutância estomática refletiu imediatamente em menor grau de transpiração da cultivar NS 6601 IPRO (Figuras 1D e 3B), o que foi crucial para não afetar a eficiência de uso da água, exceto no tratamento que impôs o maior estresse (Figura 3D). No entanto, interessantemente, tal efeito não foi observado na cultivar Agroeste 3680 com a concentração de 500 mg dm^{-3} associada aos tratamentos sem encharcamento e encharcamento de 100%, visto que continuou a transpirar em maior grau apesar da diminuição da condutância estomática (Figuras 1C e 3A), resultando numa menor eficiência de uso da água (Figura 3C). Em relação ao encharcamento de 50%, embora tenha apresentado maior taxa de assimilação de CO_2 quando comparado aos demais encharcamentos, isso

aparentemente ocorreu em detrimento de maior perda de água em consonância com o aumento da condutância estomática (Figuras 1A, 1C e 3C).

2.3.2. A concentração de pigmentos fotossintético reduziram no encharcamento de 100% e as cultivares apresentaram comportamento diferencial às concentrações de Fe

Os danos aos fotossistemas PSI e PSII podem ser inferidos, respectivamente, pelos teores de clorofila *a* e *b*, uma vez que a concentração de clorofila varia entre os fotossistemas (WIENTJES et al., 2017). Sob efeito do encharcamento do solo, o comportamento das concentrações das clorofilas *a* e *b* (Figuras 4A e 4C) foram semelhantes ao da clorofila total (Figura 4E), indicando que as diminuições documentadas no encharcamento de 100% foram semelhantes entre as clorofilas. Pesquisas recentes também relataram a diminuição da concentração de clorofila *a* e *b*, porém com danos notavelmente maiores na clorofila *b*, como relatado para as culturas de alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) (YAN et al., 2018), feijão-mungo (*Vigna radiata*) (SAIRAM et al., 2009) e algodão (*Gossypium hirsutum*) (KUAI et al., 2014); esse comportamento diferencial pode estar atrelado a tolerância das espécies em questão e/ou a duração do encharcamento.

Outro ponto chave a ser abordado, é o fato de que a degradação das clorofilas (Figuras 4A e 4C) pode ter potencializado as reduções na taxa de assimilação de carbono no encharcamento de 100% (Figuras 1A e 1B), independente do comportamento da condutância estomática (Figuras 1C e 1D). Tais agravos também são evidentes em plantas de soja cultivadas sob excesso de Fe, porém em magnitudes diferentes entre as cultivares, embora tenham apresentado em comum maiores danos à concentração de clorofila *b* (Figura 4D), o que não foi compensado pela concentração de clorofila total (Figura 4F). Estudos anteriores com a cultura da batata (*Solanum tuberosum*) (CHATTERJEE et al., 2006) e ervilha (*Pisum sativum*) (XU et al., 2015) também relataram maior degradação de clorofila *b* sob excesso de Fe. Dessa forma, presume-se que o excesso de Fe prejudica a utilização e dissipação de energia da luz e causa redução do complexo antena em relação aos centros de reação, indicando maior dano fotooxidativo e oxidativo ao PSII (XU et al., 2015). O fato da cultivar NS 6601 IPRO não ter apresentado diminuição do concentração de clorofila *a* (Figura 4B), corrobora com os resultados obtidos para a taxa de assimilação de CO_2 (Figura 1B) e sustenta a hipótese de que esta cultivar é mais tolerante ao excesso de Fe do que a cultivar Agroeste 3680.

Os carotenóides participam da absorção de luz e protegem o complexo da antena do dano oxidativo, devido à capacidade de extinguir as EROs que se formam naturalmente durante o processo (PINTO et al., 2003; ASADA, 2006). Nesse contexto, a redução no conteúdo de carotenóides observada nas duas cultivares (Figs. 5A e B) pode expô-los a danos por EROs, gerados acentuadamente como resultado da combinação dos estresses.

2.3.3. Produção de biomassa: comportamento diferencial de cultivares de soja em resposta ao encharcamento do solo combinado com o excesso de ferro

A limitação na fixação de N e absorção de P pela soja e a consequência da alteração da via de fosforilação oxidativa para a glicólise e fermentação imposta pelo encharcamento do solo levam a uma perda progressiva da biomassa e do desempenho das plantas (ARAKI, 2006; DAT et al., 2004; MARTÍNEZ-ALCÁNTARA et al., 2012), tal como evidenciado pelos resultados obtidos neste estudo (Figura 6). De forma geral, a biomassa seca também diminuiu com o aumento das concentrações de Fe (Figura 6). Em relação as cultivares, a taxa de assimilação de CO_2 apresentou maiores estimativas com a cultivar Agroeste 3680 (Figuras 1A e 1B), embora a maior biomassa seca da parte aérea e da raiz foi obtido com a cultivar NS 6601 IPRO (Figura 6). De acordo com MÜLLER et al. (2017), à resistência das cultivares ou espécies a tolerar a toxicidade de Fe reflete em sua biomassa, o que depende em parte da capacidade de mitigar a absorção excessiva de Fe via mecanismos de exclusão e/ou armazenamento/remobilização. Portanto, a tolerância moderada ao Fe da NS 6601 IPRO pode ter levado a aumentos diferenciais na biomassa seca entre as cultivares (Figura 6).

2.4. CONCLUSÕES

O aparato fotossintético das cultivares de soja estudadas responderam diferentemente ao encharcamento e à disponibilidade de Fe no solo. Ambas cultivares foram vulneráveis ao encharcamento de 100% em todas as concentrações Fe, o que resultou em danos acentuados às trocas gasosas, concentração de clorofilas e, consequentemente, levou à diminuição da biomassa seca da parte aérea e da raiz. O desempenho fotossintético e a produção de biomassa seca do Agroeste 3680 não foram afetados quando expostos a concentrações moderadas de Fe associadas ao encharcamento de 50%. A cultivar NS 6601 IPRO apresentou tolerância moderada ao Fe quando cultivada em solo não encharcado, uma vez que a taxa de assimilação de CO_2, a eficiência instantânea da carboxilação e a concentração da clorofila *a* não foram afetadas.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Resumo da análise de variância (ANOVA) entre três níveis de encharcamento do solo (0, 50 e 100%), três concentrações de ferro (25, 125 e 500 mg dm^{-3}) e duas cultivares (Agroeste 3680 e NS 6601 IPRO) para as características de taxa de assimilação de CO_2 expressa por área (*A*), condutância estomática (*gs*), transpiração (*E*), eficiência da carboxilação (*EiC*), eficiência instantânea do uso da água (*EUA*), clorofila *a* (C*a*), clorofila *b* (C*b*), clorofila total (C*t*), carotenoides (CAR), biomassa seca da parte aérea (BSPA) e biomassa seca da raiz (BSR).

Fonte de variação	Características avaliadas										
	A	*gs*	*E*	*EiC*	*EUA*	C*a*	C*b*	C*t*	CAR	BSPA	BSR
Encharcamento (A)	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Ferro (F)	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Variedade (V)	***	***	ns	***	***	***	***	***	***	***	***
A x F	***	***	***	**	***	ns	ns	ns	ns	***	ns
A x V	***	***	***	***	***	ns	ns	ns	ns	***	ns
F x V	***	***	***	***	***	***	*	***	***	**	**
A x F x V	**	***	***	***	***	ns	ns	ns	ns	***	***

Significância da análise fatorial: ns, não significativo; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

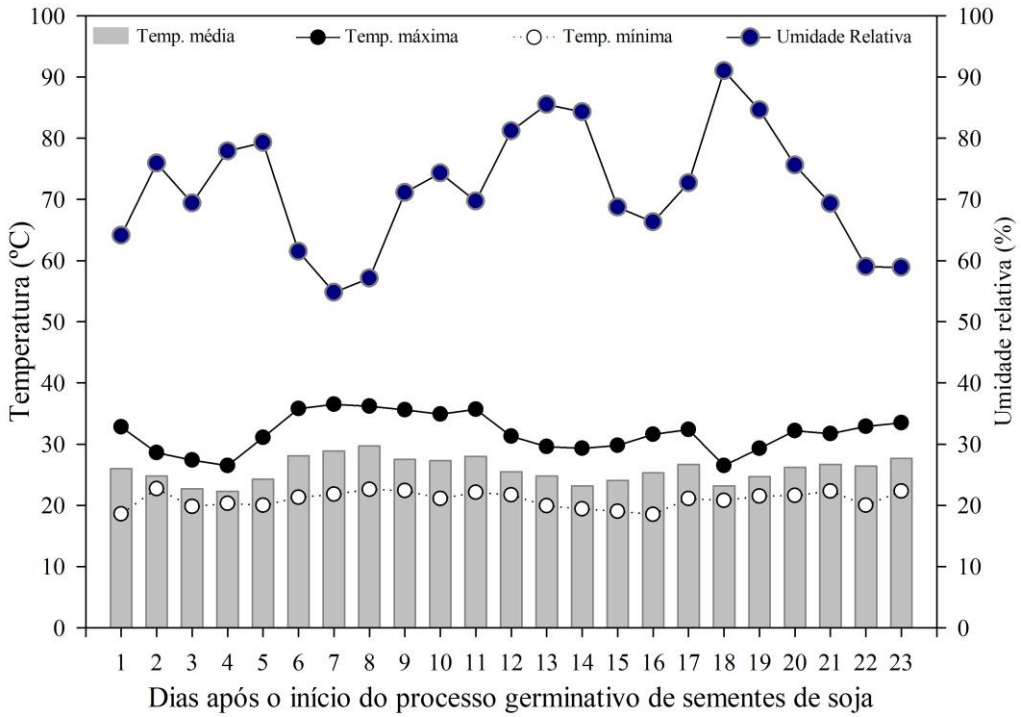

Figura S1. Dados climáticos de temperatura média, temperatura máxima, temperatura mínima e umidade relativa registrados na casa de vegetação durante a condução experimental.
Fonte: Estação Climatológica da UNESP de Dracena.

CAPITULO III

Um vislumbre comportamental da soja em resposta ao encharcamento do solo associado ao excesso de ferro no estágio reprodutivo

3. INTRODUÇÃO

A soja é responsável pelo fornecimento de mais da metade do óleo vegetal e dois terços da farinha proteica no mundo, motivo pelo qual se destaca como a leguminosa de grão mais importante cultivada dentre às demais (DIVITO *et al*., 2015). No entanto, várias regiões sob cultivo de soja (MAEKAWA *et al*., 2011; SYED *et al*., 2015; SARTORI *et al*., 2016) são afetadas pelo encharcamento do solo, levando ao declínio do rendimento de grãos e a perdas econômicas (LINKEMER *et al*., 1998; YIN e KOMATSU, 2017). Segundo Bailey-Serres *et al*. (2012) e Hirabayashi *et al*. (2013), as mudanças climáticas devem aumentar a frequência e severidade deste fator estressante devido à alta pluviosidade e à drenagem deficiente dos solos, o que consequentemente pode afetar negativamente o cultivo de plantas de sequeiro em várias regiões do mundo.

O excesso de água afeta a estrutura física do solo (RODRÍGUEZ-GAMIR *et al*., 2011). Além disso, o O_2 dissolvido no espaço dos poros preenchidos com água possuí baixa taxa de difusão na água em comparação com a do ar (DAT *et al*., 2004; YIN e KOMATSU, 2017). Consequentemente, um dos principais efeitos do encharcamento do solo é a escassez de O_2, o que é aumentado com o prolongamento desse estresse como resultado do consumo de O_2 pelos microrganismos aeróbicas e plantas, levando a condições de anoxia (MOHANTY ; ONG, 2003).

O tecido radicular das plantas sob anoxia altera o caminho de produção de energia da fosforilação oxidativa para glicólise e fermentação (MOHANTY ; ONG, 2003), resultando em um grave declínio no status energético das células da raiz. O rendimento global de ATP produzido durante a fermentação é apenas duas moléculas de ATP por molécula de glicose, em vez das 38 moléculas produzidas durante a fosforilação oxidativa (SAIRAM *et al*., 2009). Os efeitos metabólicos e fisiológicos oriundos do encharcamento do solo nas plantas são derivados principalmente desta mudança de energia experimentada pela planta (MARTÍNEZ-ALCÁNTARA, *et al*., 2012). Segundo esses autores, as respostas iniciais são reduções no fluxo de água das raízes, seguidas por alterações no uso da água, absorção de nutrientes e partição da biomassa seca. Em adição, o transporte de ureídeos via xilema é inibido em plantas de sojas (PUIATTI ; SODEK, 1999), resultante da menor atividade de N-fixação. À nível

foliar, um dos primeiros efeitos detectáveis é a diminuição da disponibilidade de CO_2 devido à limitação estomática, a fim de evitar a perda de água para o ambiente (ZHANG *et al*., 2016; YAN *et al*., 2018).

Outro ponto importante a ser abordado é que, em solos anóxicos, os microrganismos presentes são os anaeróbicos facultativos e anaeróbicos. Esses microrganismos utilizam aceptores de elétrons alternativos para manter o seu metabolismo (MARANGUIT *et al*., 2017). Nesse contexto, solos ricos em ferro (Fe) sob condições anaeróbicas tornam-no fitotóxico para as plantas, quando os óxidos insolúveis de Fe^{3+} são reduzidos à Fe^{2+} e liberados na água presente no solo como forma solúvel (FREI *et al*., 2016; MARANGUIT *et al*., 2017). Uma vez o Fe em excesso no tecido vegetal, este metal pode deslocar o equilíbrio redox da célula para um estado pró-oxidante, o que pode afetar diferentes aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos da planta, gerando o estresse oxidativo (DE OLIVEIRA JUCOSKI *et al*., 2013; MÜLLER *et al*., 2017), principalmente pela ação de radicais hidroxila ($HO^{\bullet}$) via reação de Fenton (HELL ; STEPHAN, 2003; PEREIRA *et al*., 2013).

Não há informação disponível na literatura sobre o encharcamento do solo associado ao excesso de Fe com a cultura da soja, embora a tolerância a esse estresse é muitas vezes um produto da tolerância à anaerobiose e às toxicidades dos elementos disponibilizados em excesso devido à condição imposta pelo encharcamento do solo (SINGH ;SETTER, 2017). Portanto, este estudo propôs avaliar o comportamento fisiológico e bioquímico da soja ‘Agroeste 3680’ associado ao desenvolvimento das vagens sob solo não encharcado e encharcado combinado com uma concentração moderada e duas concentrações tóxicas de Fe.

3.1. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1. Local experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil (21 ° 29′ S, 51 ° 2′ W; 396 m acima do nível do mar). A estufa utilizada foi do tipo arco, coberta com difusor de filme plástico transparente com espessura de 1000 mícrons, sendo os lados cobertos por tela sombrite com 50% de capacidade de retenção de luz.

3.1.2. Delineamento e tratamentos experimentais

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, disposto em esquema fatorial 2 × 3, sendo dois níveis de água do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três níveis de concentração de ferro no solo (25, 125 e 500 mg dm^{-3}). Cada vaso foi composto por uma população de 3 plantas, totalizando uma população final de 9 plantas por tratamento.

3.1.3. Condições de cultivo

O solo utilizado foi um Latossolo Vermelho Distrófico (SANTOS, 2018). A amostra foi coletada na profundidade de 0,00–0,20 m, formando uma amostra composta. O solo foi desintegrado, seco ao ar, peneirado (4,0 mm) e determinado as seguintes propriedades químicas: pH ($CaCl_2$): 4,6; matéria orgânica: 14 g dm^{-3}; P (resina): 4 mg dm^{-3}; K: 2,1 $mmol_c$ dm^{-3}; Ca: 7 $mmol_c$ dm^{-3}; Mg: 5 $mmol_c$ dm^{-3}; S: 5 mg dm^{-3}; B: 0,09 mg dm^{-3}; Cu: 0,6 mg dm^{-3}; Fe: 0,25 mg dm^{-3}; Mn: 16,7 mg dm^{-3}; Zn: 1 mg dm^{-3}; acidez potencial: 18 $mmol_c$ dm^{-3}; Al: 4 $mmol_c$ dm^{-3}; soma de bases trocáveis: 14,1 $mmol_c$ dm^{-3}; capacidade de troca catiônica: 32,1 $mmol_c$ dm^{-3}; saturação por bases: 44%.

Com base na análise química, foi realizada a calagem do solo para elevar a saturação por bases para 70% (QUAGGIO *et al.*, 1985) por meio da adição de $CaCO_3$ e $MgCO_3$, reagente analítico (AR), na proporção de 3: 1. O solo com os sais de carbonato foi incubado por 30 dias em vasos a uma umidade de 80% da capacidade de campo para permitir que ele se equilibrasse. Posteriormente, o solo foi seco ao ar durante sete dias. Os vasos utilizados foram de polipropileno com capacidade de 4 dm^3, revestidos com manta de poliestireno para evitar a perda de solo durante o experimento.

3.1.4. Instalação e condução experimental

A fertilização foi realizada com as seguintes concentrações e fontes por vaso: 10 mg dm^{-3} de N ($CO(NH_2)_2$); 200 mg dm^{-3} de P ($Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$); 150 mg dm^{-3} de K (K_2SO_4); 0,5 mg dm^{-3} de B (H_3BO_3); 0,05 mg dm^{-3} de Co ($CoCl_2 \cdot H_2O$); 1,0 mg dm^{-3} de Cu ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$); 0,05 mg dm^{-3} de Mo (H_2MoO_4); 0,05 mg dm^{-3} de Ni ($NiSO_4 \cdot 7H_2O$); 5,0 mg dm^{-3} de Mn ($MnSO_4$) e 2,0 mg dm^{-3} de Zn ($ZnSO_4$). A aplicação de K foi parcelada em 3 partes, sendo aplicada antes da semeadura, e nos estádios fenológicos V2 e R1 (Fehr *et al.*, 1971). O Fe ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) foi aplicado nas concentrações de 0 (sem fornecimento), 100 e 475 mg dm^{-3} no solo, a fim de manter respectivamente uma concentração natural de Fe (25 mg dm^{-3}) e proporcionar duas concentrações altas de Fe (125 e 500 mg dm^{-3}).

Após quatro dias, foram semeadas 10 sementes de soja a uma profundidade de 3 cm, previamente inoculadas com bactérias fixadoras de N_2 (*Bradyrhizobium japonicum*), com as estirpes SEMIA 587 e 5019. No estágio fenológico V1 (FEHR *et al*. 1971), foi realizado o desbaste, reduzindo a população para três plantas por vaso selecionando aquelas com maior vigor e homogeneidade de tamanho.

No estágio fenológico R3 (FEHR *et al*., 1971), foi realizado o encharcamento do solo por um período de 10 dias. Os vasos pertencentes ao tratamento com solo encharcado foram colocados em vasos maiores sem furos, mantendo o nível de água à 2 cm acima do solo. Durante o período experimental, a reposição de água evapotranspirada das unidades experimentais foi realizada por meio de micro aspersores em suspensão, acionados duas vezes ao dia (período da manhã e tarde). Dessa forma, foi mantido a umidade do solo à 80% da capacidade de campo, exceto durante os 10 dias de imposição do estresse, quando a irrigação foi realizada manualmente.

3.1.5. Determinação dos atributos de trocas gasosas

No 10º dia de estresse, foram realizadas avaliações de trocas gasosas por meio do analisador portátil de gases infravermelhos (ADC Bioscientifc Ltd., Hoddesdon, United Kingdom) em duas plantas de cada unidade experimental no primeiro trifólio totalmente expandido. As leituras foram realizadas em um dia claro entre às 10:00 e 11:30. A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) foi padronizada para uma luz de saturação artificial de 1000µmolm^{-2} s^{-1} e uma concentração de CO_2 no ambiente. A umidade relativa média foi de 30%.

Foram obtidas a taxa de assimilação de CO_2 expressa por área (*A*, µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}), condutância estomática (*gs*, mol H_2O m^{-2} s^{-1}) e taxa de transpiração (*E*, mmol H_2O). À posteriori, foram estimadas a eficiência instantânea do uso da água (*EUA*, µmol CO_2 $mmol^{-1}$ H_2O) e a eficiência da carboxilação (*EiC*, mol air^{-1}) por meio das equações 1 e 2, respectivamente.

$$EUA = \left(\frac{A}{E}\right) \quad \text{Eq. (1)}$$

$$EiC = \left(\frac{A}{Ci}\right) \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde *Ci* (µmol CO_2 mol ar^{-1}) corresponde a concentração interna de CO_2 na câmara subestomática.

3.1.6. Coleta de folhas no término da imposição dos estresses

Foram coletadas folhas do primeiro trifólio totalmente expandido e congeladas em N_2 líquido. O material foi identificado, embalado em papel alumínio e armazenado à −80 °C até ser analisado.

3.1.7. Análise dos pigmentos fotossintéticos

A determinação dos pigmentos fotossintéticos foi baseada na descrição de Lichtenthaler e Wellburn (1983). Para a extração, foram utilizadas folhas oriundas de duas plantas de cada vaso, utilizando a acetona 80% como solvente. Tecido de folhas frescas (0,5 g) foram macerados em N_2 líquido com pilão e almofariz. Foi adicionado 5 mL de acetona 80% nas amostras e centrifugado a 1500 rpm por 5 min. Após a extração, a absorbância (ABS) do solvente foi medida em comprimentos de onda específicos por espectrofotometria. As concentrações de clorofila *a* (C*a*), clorofila *b* (C*b*), clorofila total (C*t*) e carotenoides (CAR) foram expressos em μg mL^{-1} e calculados conforme as equações abaixo:

$$Ca = \left(12{,}25 \times \mathrm{ABS}_{663{,}2}\right) - (2{,}79 \times \mathrm{ABS}_{646{,}8}) \quad \text{Eq. (3)}$$

$$Cb = \left(21{,}50 \times \mathrm{ABS}_{646{,}8}\right) - (5{,}10 \times \mathrm{ABS}_{663{,}2}) \quad \text{Eq. (4)}$$

$$Ct = (7{,}15 \times \mathrm{ABS}_{663{,}2}) + (18{,}71 \times \mathrm{ABS}_{646{,}8}) \quad \text{Eq. (5)}$$

$$\mathrm{CAR} = [(1000 \times \mathrm{ABS}_{470}) - (1{,}82 \times \mathrm{Ca} - 85{,}02 \times \mathrm{Cb})]/198 \quad \text{Eq. (6)}$$

3.1.8. Análise dos compostos de C e N nas folhas

Foram utilizadas folhas oriundas de duas plantas de cada vaso. Tecido de folhas frescas (0,5 g) foi macerado em N_2 líquido com pilão e almofariz. Conforme metodologia descrita por Bieleski e Turner 1966, os compostos foram extraídos durante 24 h com 0,5 mL de solução de MCW (60% de metanol, 25% de clorofórmio e 15% de água). As amostras foram centrifugadas à 3000 rpm por 15 min, e o sobrenadante e o precipitado foram coletados.

Foi adicionado 1 volume de clorofórmio e 1,5 volume de água a cada 4 volumes do sobrenadante obtido. Após a separação de fases ao longo de 24 h, a fase aquosa (superior) foi usada para a quantificação dos compostos. Os conteúdos de sacarose e carboidratos totais (mg g^{-1} MF) foram determinados pelo método de antrona de Umbreit *et al*. (1957) e Yemm e Willis (1954), respectivamente, usando glicose como padrão. Ureídeos totais, alantoato e alantoína foram determinados pelo método da fenilhidrazina de Vogels e Van Der Drift (1970), utilizando alantoína como padrão. Para a

determinação do ácido alantóico, foi omitido o passo de hidrólise alcalina inicial e alantoína foi calculada por diferença do ensaio do ureídeos totais. A amônia e o nitrato foram determinados pelo método do fenol-hipoclorito de McCullough (1967) e pelo método do ácido salicílico descrito em Cataldo *et al*. (1975), respectivamente. Os conteúdos de ureídeos totais, alantoato e alantoína, nitrato e amônia foram expressos em μmol g^{-1} MF (massa fresca).

A partir do resíduo obtido após a centrifugação do extrato inicial do MCW (precipitado), foi determinado o conteúdo de proteína como descrito por Bradford (1976), utilizando albumina como padrão. Sequencialmente, foi determinado o conteúdo amido pelo método do ácido perclórico/antrona (YEMM ; WILLIS, 1954; UMBREIT *et al*., 1957). Os conteúdos de proteína e o amido foram expressos em mg g^{-1} MF.

3.1.9. Análise do peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica

A concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinada pela reação com iodeto de potássio (KI) de acordo com Alexieva *et al*. (2001). Folhas oriundas de duas plantas de cada vaso foram utilizadas. 0,25 g de tecido de folhas frescas foram pesados e triturados com N_2 líquido com pilão e almofariz, aos quais foram adicionados 3 mL de ácido tricloroacético à 0,1% (TCA) na presença de 20% de polivinil polipirrolidona (PVPP). Após homogeneização completa, o extrato foi centrifugado a 10000 rpm durante 10 min à 4 °C numa centrífuga refrigerada. Para a reação, 0,2 mL do sobrenadante foram adicionados 0,2 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,5 (100 mM) e 800 μL de solução KI (1M). As amostras foram mantidas em gelo e escuro por uma hora. As leituras de absorbância foram realizadas à 390 nm. A concentração de H_2O_2 foi calculada com base em uma curva padrão e os resultados expressos em nmol g^{-1} FW.

A concentração de peroxidação lipídica foi determinada pela produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente malondialdeído (MDA), segundo Heath e Packer (1968). Os procedimentos iniciais para medições de MDA foram os mesmos descritos acima para medições de H_2O_2. Após centrifugação, 0,25 mL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de solução de TCA à 20% contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA). As amostras foram mantidas em banho seco a 95 ° C por 30 min e depois em gelo por 20 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 min, a fim de separar os resíduos formados durante o

aquecimento. As amostras foram lidas em dois comprimentos de onda, uma a 535 nm e outra a 600 nm, e a concentração de MDA foi calculada de acordo com a equação 7:

$$\text{MDA (nmol g}^{-1}) = [(ABS_{532} - ABS_{600}) / 155000] \times 10^3 \quad \text{Eq. (7)}$$

3.1.10. Acúmulo de Fe na parte aérea e produção particionada de biomassa

Após o final do período de imposição dos estresses, as plantas foram separadas em parte aérea e raízes. Da parte aérea foi colhido as vagens, a fim de analisar a magnitude do efeito deletério dos estresses sob ao desenvolvimento das vagens. O material foi seco em estufa a ± 65 °C por 72 h. Subsequentemente, foram determinados a biomassa seca da parte aérea (BSPA), vagens (BSV) e raiz (BSR), expressos em g planta^{-1}.

Para determinar a o acúmulo de Fe na parte aérea (AFePA), as amostras foram submetidas à digestão úmida com solução de ácido nítrico-perclórico (3: 1) à 200 °C (MALAVOLTA *et al*., 1997) após serem moídas em um moinho de Wiley. Posteriormente, a concentração de Fe foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica. O AFEPA (µg planta^{-1}) foi calculado pela multiplicação da concentração de Fe pela BSPA.

3.1.11. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$). Quando significativos, as características foram submetidas ao teste de Tukey ($p<0,05$). Foi calculado a correlação de Pearson ($p<0,05$) com as comparações múltiplas à 1% de probabilidade através do pacote Corrplot. A análise estatística dos dados foi por meio de rotinas desenvolvidas no software R (R CORE TEAM, 2019).

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Comportamento das trocas gasosas

As características de *A, gs, E, EUA* e *EiC* apresentaram um efeito significativo da interação dupla na ANOVA (Tabela S1, Material suplementar).

As plantas cultivadas sem encharcamento do solo apresentaram reduções com as concentrações de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe para *gs* em 10 e 22% e para *E* 28 e 51%, respectivamente (Figura 1B e 1C). As características *A* e *EiC* foram menos sensíveis e reduzidas somente com a concentração de 500 mg dm^{-3} de Fe, registrando decréscimos de 14 e 17%, respectivamente (Figura 1A e 1E). As concentrações de 125 e 500 mg dm^{-}

^{3} de Fe proporcionaram reduções semelhantes para o *EUA*, sendo em média de 46% (Figura 1D).

O aumento das concentrações de Fe associado ao encharcamento do solo não apresentou diferença significativa para *A*, *gs*, *EUA* e *EiC* (Figura 1A, 1B, 1D e 1E), enquanto a *E* diminuiu com a concentração de 500 mg dm^{-3} Fe (Figura 1C). As características mostradas na Figura 1 mostraram uma redução acentuada sob efeito do encharcamento do solo em todos as concentrações de Fe em relação ao solo sem encharcamento (Figura 1A-E).

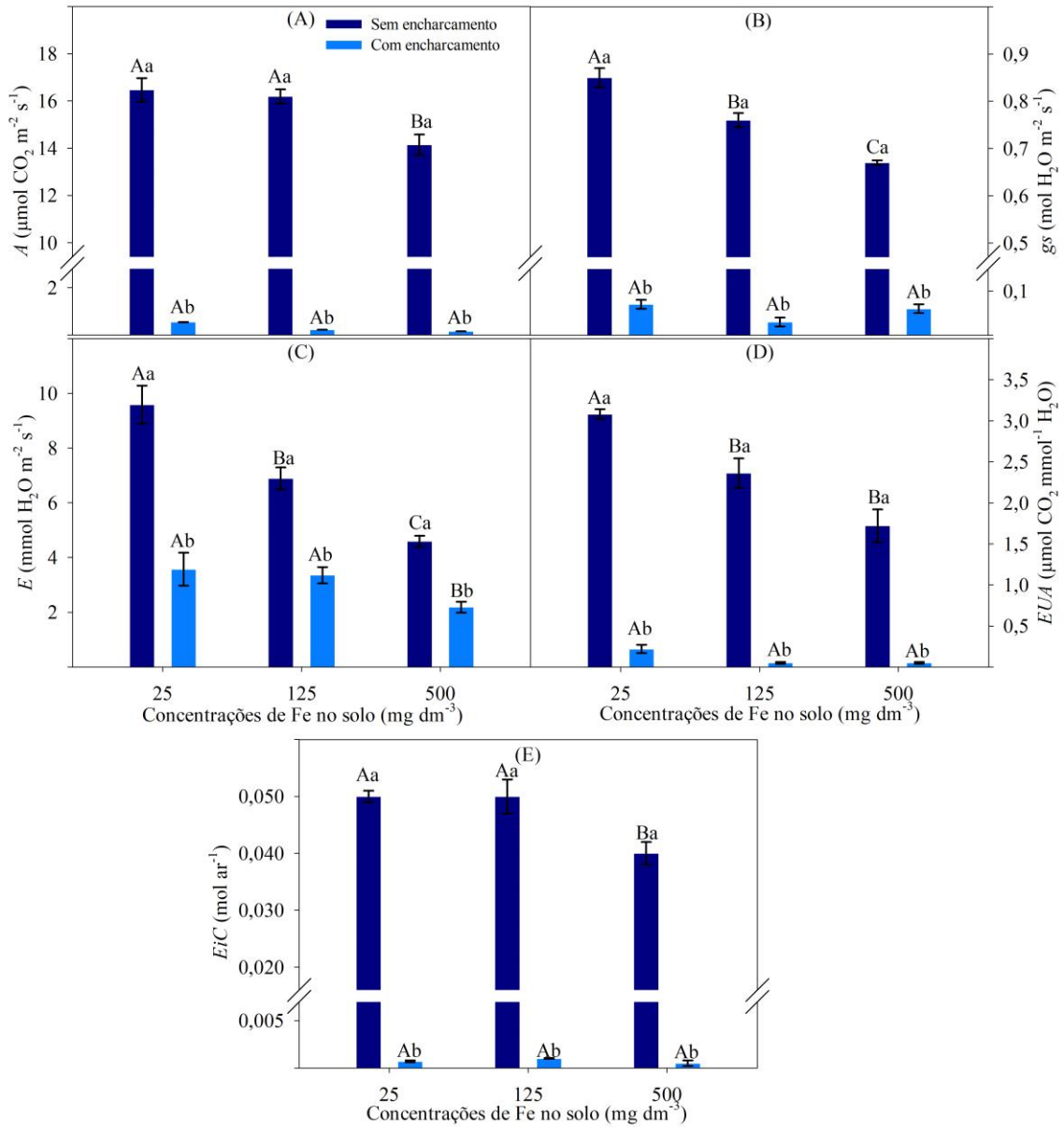

Figura 1. Taxa de assimilação de CO_2 expressa por área (A), condutância estomática (B), taxa de transpiração (C), eficiência do uso da água (D) e eficiência instantânea da carboxilação (E) em plantas de soja submetidas a dois níveis de encharcamento do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.2.2. Conteúdo de pigmentos fotossintéticos

As características de C*a*, C*b*, C*t* and CAR apresentaram um efeito significativo da interação dupla na ANOVA (Tabela S1, Material suplementar).

Foi observada uma diminuição semelhante nos conteúdos de C*a*, C*b*, C*t* e CAR com o fornecimento de 125 e 500 mg dm^{-3} Fe sem encharcamento do solo, o que

resultou em reduções médias de 24, 25, 25 e 20%, respectivamente. A mesma resposta foi encontrada sob efeito do encharcamento do solo para os conteúdos de C*b* (-24%), C*t* (-14%) e CAR (-20%), conforme apresentado nas Figuras 2A-D. Por outro lado, o conteúdo de C*a* foi menos sensível e reduzido somente com o fornecimento de 500 mg dm^{-3} Fe (variando em 14%), uma vez que as plantas à 25 e 125 mg dm^{-3} Fe não diferiram entre si (Figura 2A).

Em cada concentração de Fe, as plantas apresentaram menor conteúdo de pigmento fotossintético sob efeito do encharcamento do solo. Quando associado a concentração natural de Fe, apresentaram uma redução de 50, 51, 50 e 43% para as características C*a*, C*b*, C*t* e CAR, respectivamente. Quando associado ao excesso de Fe, apresentaram uma redução média de 41% para o C*a*, 51% para o C*b*, 46% para o C*t* e 34% para CAR (Figuras 2A-D).

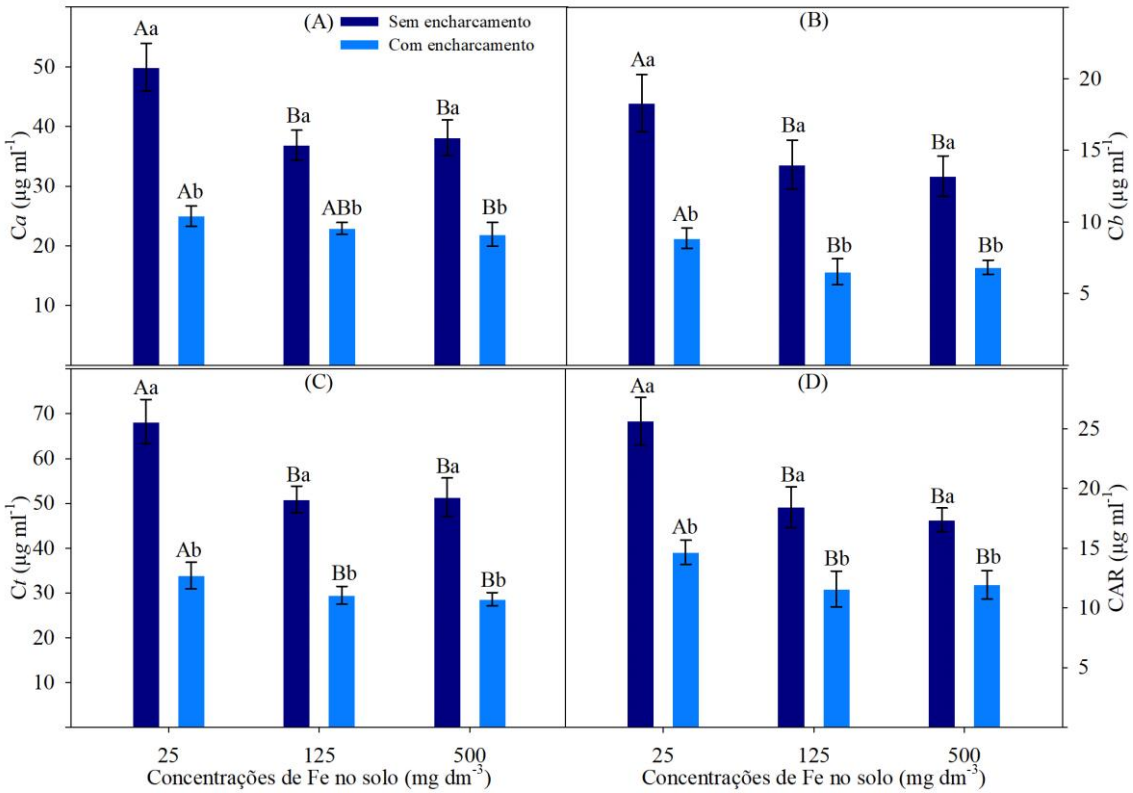

Figura 2. Conteúdo de Clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenoides (D) em plantas de soja submetidas a dois níveis de encharcamento do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.2.3. Metabolismo do carbono na folha

As características de amido, sacarose e carboidratos totais apresentaram um efeito significativo de interação dupla na ANOVA (Tabela S1, Material suplementar).

Foi observado um aumento no conteúdo de amido sob as condições sem encharcamento do solo associado à concentração de 500 mg dm^{-3} de Fe e com encharcamento do solo associado às concentrações de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe, o que resultou em acréscimos de 41, 16 e 16%, respectivamente. Em adição, o encharcamento do solo proporcionou maior conteúdo de amido em todas as concentrações de Fe (Figura 3A). Em contraste, os conteúdos de carboidratos totais e sacarose diminuíram em plantas cultivadas à 500 mg dm^{-3} de Fe em as ambas condições de água no solo e foram menores sob efeito do encharcamento do solo, com uma tendência de menor variação com o aumento das concentrações de Fe em comparação com aquelas sem encharcamento solo. Essas variações observadas levaram à redução dos conteúdos de carboidratos totais e sacarose em 49 e 45% (sem encharcamento) e 41 e 34% (com encharcamento) entre as concentrações de 25 e 500 mg dm^{-3} de Fe (Figura 3B e 3C).

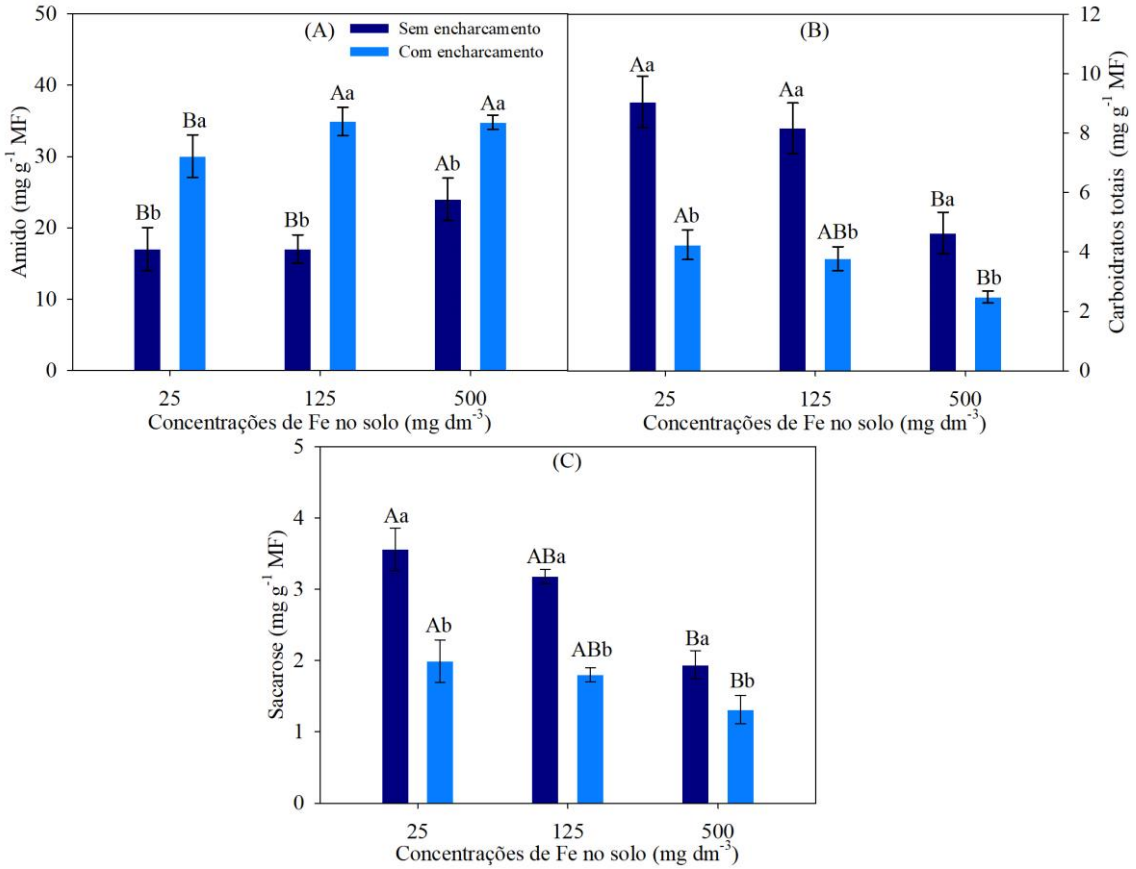

Figura 3. Conteúdos de amido (A), carboidratos totais (B) e sacarose (C) em plantas de soja submetidas a dois níveis de encharcamento do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.2.4. Metabolismo do nitrogênio na folha

Como mostrado na ANOVA (Tabela S1, Material suplementar), o conteúdo de amônia não foi afetado por nenhum fator e seu conteúdo no tecido foliar foi nulo (0 nmol g^{-1}). O conteúdo de ureídeos totais, ácido alantóico e alantoína mostraram um efeito significativo simples para condições de encharcamento do solo e concentrações de Fe. Por outro lado, o conteúdo de nitrato e proteína mostraram um efeito significativo de interação dupla.

Independentemente das concentrações de Fe, os conteúdos de ureídeos totais, ácido alantóico e alantoína aumentaram nas plantas sob efeito do encharcamento do solo, com proporções de 24, 18 e 31%, respectivamente. A concentração de 500 mg dm^{-3} Fe proporcionou aumentos nos conteúdos de ureídeos totais, ácido alantóico e alantoína de 28, 18 e 19%, respectivamente, em relação às médias das plantas à 25 e

125 mg dm^{-3} de Fe (Figuras 4A-C), independentemente das condições de encharcamento.

O conteúdo de nitrato não foi alterado em plantas cultivadas sob as concentrações crescentes de Fe sem encharcamento do solo. Por outro lado, as plantas à 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe associado ao encharcamento do solo apresentaram uma redução semelhante, sendo em média de 33% (Figura 4D). À 25 mg dm^{-3} Fe, o conteúdo de nitrato apresentou um incremento de 38% sob efeito do encharcamento do solo, comparado ao solo sem encharcamento, enquanto as concentrações de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe não diferiram entre ambas condições da água no solo (Figura 4D). O conteúdo de proteína aumentou com à concentração de 500 mg dm^{-3} de Fe sem encharcamento do solo, resultando em um acréscimo de 86%. Por outro lado, sob encharcamento de solo, o aumento no conteúdo ocorreu em plantas cultivadas à 25 mg dm^{-3} de Fe, o que resultou em um acréscimo de 57% em relação a maior concentração de Fe (Figura 4E). À 25 mg dm^{-3} Fe, o conteúdo de proteína aumentou substancialmente com o encharcamento do solo em relação ao solo sem encharcamento, enquanto as concentrações de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe não diferiram entre ambas condições da água no solo (Figura 4E).

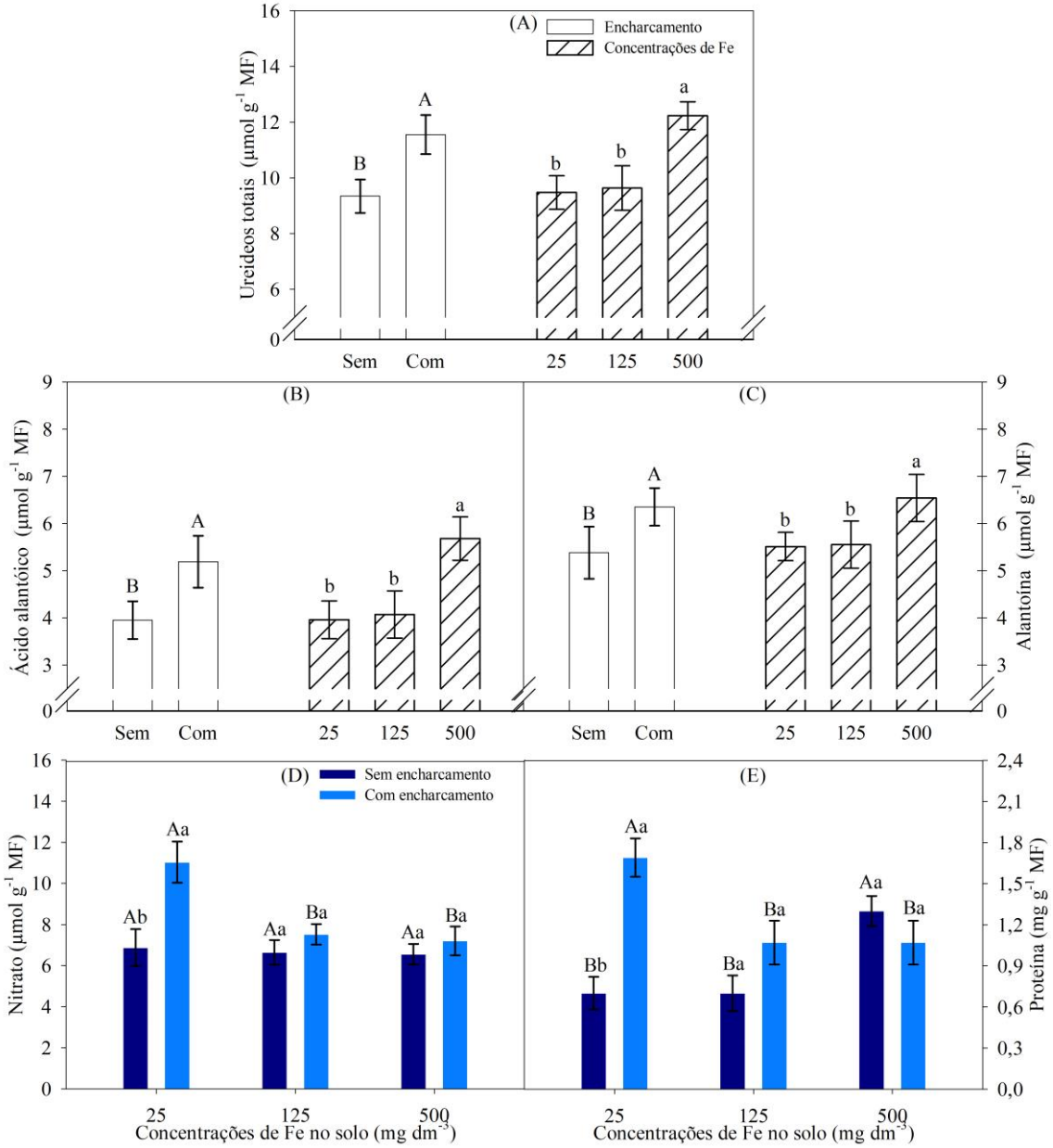

Figura 4. Conteúdos de ureídeos totais (A), ácido alantóico (B), alantoína (C), nitrato (D) e proteína (E) em plantas de soja submetidas a dois níveis de encharcamento do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúsculas isoladas comparam os níveis de encharcamento, independente das concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas isoladas comparam as concentrações de Fe, independente do encharcamento. Letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.2.5. Concentração de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica

As concentrações de H_2O_2 e MDA mostraram um efeito significativo simples para as condições de encharcamento do solo e concentrações de Fe na ANOVA (Tabela S1, Material suplementar).

Independentemente das concentrações de Fe, as concentrações de H_2O_2 e MDA aumentaram em 94 e 23% em plantas sob efeito do encharcamento do solo, respectivamente. A concentração de 500 mg dm^{-3} Fe proporcionou o maior aumento para o H_2O_2, enquanto as concentrações de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe apresentaram um aumento semelhante para o MDA. Os incrementos foram de 17 e 23% para a concentração de H_2O_2 e MDA, respectivamente (Figuras 5A e 5B), independentemente das condições de encharcamento.

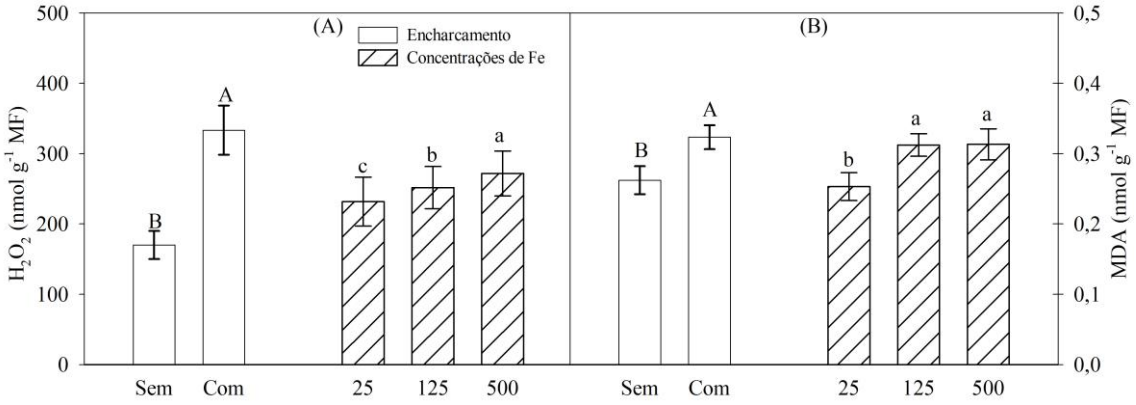

Figura 5. Peróxido de hidrogênio (A) e malondialdeído (B) em plantas de soja submetidas a dois níveis de encharcamento do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúsculas isoladas comparam os níveis de encharcamento, independente das concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas isoladas comparam as concentrações de Fe, independente do encharcamento. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.2.6. Acúmulo de Fe na parte aérea e produção particionada de biomassa

As características de BSPA, BSV, BSR e AFePA apresentaram um efeito significativo da interação dupla na ANOVA (Tabela S1, Material suplementar).

As plantas cultivadas sem encharcamento do solo apresentaram reduções severas com o aumento das concentrações de Fe para a BSPA e BSR. Sob efeito do encharcamento do solo, essas características apresentaram menor variação, sendo reduzida somente à 500 mg dm^{-3} de Fe. Em adição, a BSPA e BSR apresentaram os menores valores sob efeito do encharcamento do solo em comparação com o solo sem encharcamento, principalmente a BSR; e ambas apresentaram uma tendência de menor variação com o aumento das concentrações de Fe (Figuras 6A e 6C).

O aumento das concentrações de Fe em ambas condições de água no solo apresentou uma redução na BSV com o aumento das concentrações de Fe. Tal efeito foi mais pronunciado no solo sem encharcamento, resultando em reduções de 44 e 94% com o fornecimento de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe, respectivamente. Por outro lado, essas

concentrações de Fe apresentaram uma redução semelhante sob efeito do encharcamento do solo, sendo em médio de 60%. Em cada concentração de Fe, as plantas apresentaram menores valores sob efeito do encharcamento do solo, registrando decréscimos de 94 (25 mg dm^{-3}), 95 (125 mg dm^{-3}) e 65 (500 mg dm^{-3}) quando comparado ao solo sem encharcamento (Figura 6B). O AFePA apresentou um decréscimo de 91% com o fornecimento de 500 mg dm^{-3} de Fe (sem encharcamento) e, respectivamente, de 25 e 74% com o fornecimento de 125 e 500 mg dm^{-3} de Fe (com encharcamento), sendo os maiores valores alcançado em solo encharcado (Figura 6D).

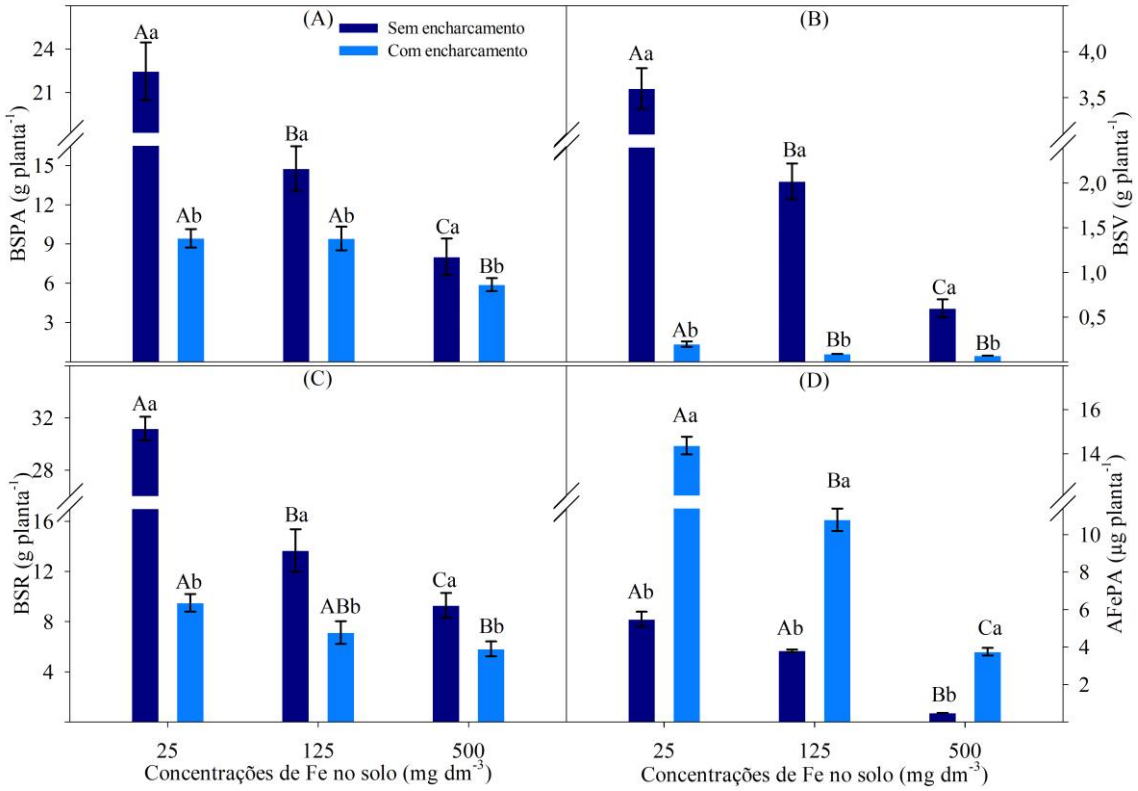

Figura 6. Biomassa seca da parte aérea (A), biomassa seca das vagens (B), biomassa seca da raiz (C) e acúmulo de Fe na parte aérea (D), em plantas de soja submetidas a dois níveis de encharcamento do solo (sem encharcamento e com encharcamento) e três concentrações de Fe (25, 125 e 500 mg dm^{-3}). De acordo com o teste de Tukey, letras maiúscula comparam os níveis de encharcamento entre as diferentes concentrações de Fe, enquanto letras minúsculas comparam os níveis de encharcamento dentro das mesmas concentrações de Fe. Barra na vertical representa o desvio padrão (n = 6 plantas para AFEPA; n = 9 plantas para biomassa seca).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na Figura 7, a maioria das características apresentaram correlações significativas. No entanto, o nitrato, a proteína e o AFePA foram as características que menos relacionaram com as demais.

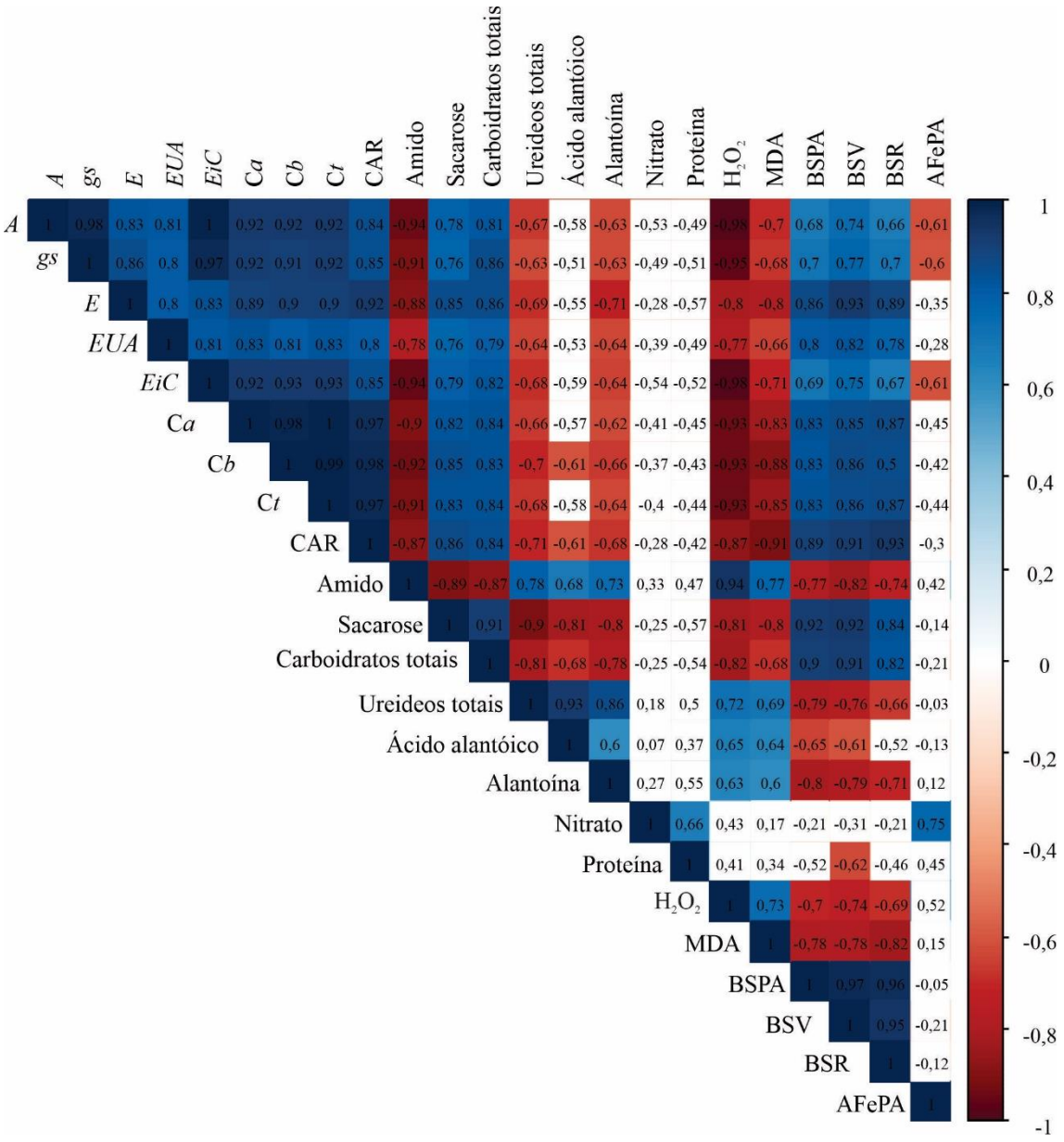

Figura 7. Correlação de Pearson entre as características analisadas. Os quadrados que receberam a cor branca pertencem à categoria de valores não significativos. Taxa de assimilação de CO_2 expressa por área (*A*), condutância estomática (*gs*), taxa de transpiração (*E*), eficiência instantânea do uso da água (*EUA*), eficiência da carboxilação (*EiC*), clorofila *a* (C*a*), clorofila *b* (C*b*), clorofila total (C*t*), carotenoides (CAR), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), malondialdeído (MDA), biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da vagens (BSV), biomassa seca da raiz (BSR) e acúmulo de Fe na parte aérea (AFePA).
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.3. DISCUSSÃO

3.3.1. As trocas gasosas foram fortemente afetadas pelo encharcamento do solo

A fotossíntese é um processo fisiológico primário para a sobrevivência e crescimento das plantas (YAN *et al.*, 2018). Em espécies sensíveis, o encharcamento do solo e o excesso de Fe são estresses que afetam diretamente a fotossíntese, cujas medidas podem determinar o grau de tolerância das espécies. Reduções na *gs* podem

limitar o influxo de CO_2 para a fotossíntese. Além disso, também pode ocorrer limitações nas reações de carboxilação, que são comumente usadas para inferir os efeitos cumulativos das limitações bioquímicas (MÜLLER *et al*., 2017), o que leva à redução da fotossíntese.

Sem encharcamento do solo, a *gs* apresentou uma diminuição progressiva com o aumento das concentrações de Fe (Figura 1B), no entanto as alterações na *A* e *EiC* foram menores sob estas condições (Figuras 1A e 1D), sugerindo que o comportamento observado na *A* está mais associado a limitações bioquímicas do que à limitação estomática. Resultados semelhantes foram obtidos com a cultura de arroz (*Oryza sativa*) por Müller *et al*. (2017). A diminuição da *gs* provavelmente está atrelado ao aumento documentado no AFePA (Figura 6A), o que é corroborado pela correlação negativa registrado na Figura 7. De acordo com Dufey *et al*. (2009) e Pereira *et al*. (2013), o fechamento estomático é uma resposta tardia ao aumento da captação de Fe e não um mecanismo de defesa na cultura do arroz. Com a diminuição da *gs*, consequentemente, a *E* foi reduzida (Figuras 1B e 1C), no entanto não foi o suficiente para otimizar a *EUA* (Figura 1E).

Sob efeito do encharcamento do solo, as trocas gasosas foram substancialmente reduzidas (Figuras 1A-E). A concentração natural de Fe no solo proporcionou valores semelhantes às concentrações tóxicas para estas características, exceto a redução detectada à 500 mg dm^{-3} de Fe na *E* (Figura 1C). Essas respostas mostram que encharcamento do solo prejudicou fortemente as trocas gasosas de plantas de soja no estágio fenológico R3. É importante salientar que os efeitos do encharcamento são complexos e variam dependendo do genótipo, condições ambientais, estágio de crescimento e duração do encharcamento (TIAN *et al*., 2019).

3.3.2. O excesso de Fe sem encharcamento do solo reduziu os pigmentos fotossintéticos e potencializou a redução quando associado ao encharcamento do solo

Danos ao PSI e PSII podem ser inferidos pelos conteúdos de C*a* e C*b*, respectivamente, uma vez que o conteúdo de clorofila varia entre os fotossistemas (WIENTJES *et al*., 2017). Sob efeito do excesso de Fe sem encharcamento do solo, os conteúdos de C*a* e C*b* (Figuras 2A e 2B) se comportaram de forma semelhante ao conteúdo de C*t* (Figura 4C), indicando que as diminuições registradas nestas situações foram semelhantes entre as clorofilas. No entanto, a redução do conteúdo das clorofilas

à 125 mg dm^{-3} de Fe não reduziu a *A* (Figura 1A), indicando que mesmo com fluxo de elétrons menor, a *A* foi mantida.

O encharcamento do solo associado ao excesso de Fe potencializou o dano ao conteúdo de C*b*, principalmente à 125 mg dm^{-3} Fe. Em adição, o declínio no conteúdo de C*b* não foi compensado pelo conteúdo de C*t* (Figuras 2A-C). Assim, assume-se que as combinações desses estresses prejudica a utilização e dissipação de energia luminosa, e provoca uma redução no tamanho da antena em relação aos centros de reação, indicando maior dano oxidativo e fotooxidativo ao PSII (XU *et al*., 2015). Por outro lado, as plantas de soja cultivadas sob a concentração natural de Fe associada ao encharcamento do solo mostraram uma diminuição similar entre o conteúdo de C*a* e C*b*. Essas respostas mostram que as reduções observadas no conteúdo das clorofilas não foram determinantes para alterar a *A* (Figura 1A), uma vez que essa característica não apresentou comportamento diferencial com o aumento das concentrações de Fe. Estudos anteriores sobre encharcamento do solo relataram danos notavelmente maiores no conteúdo de C*b*, em *Helianthus tuberosus* (YAN *et al*., 2018), *Vigna radiata* (SAIRAM *et al*., 2009) e *Gossypium hirsutum* (KUAI *et al*., 2014).

Os carotenóides participam da absorção de luz e protegem o complexo da antena do dano oxidativo, devido à capacidade de extinguir as ROS que se formam naturalmente durante o processo fotossintético (PINTO *et al*., 2003). As variações observadas no conteúdo das clorofilas e carotenoides (Figuras 2A-D) possivelmente estão relacionadas ao estresse oxidativo verificado por meio das concentrações de MDA e H_2O_2 (Figura 5A e 5B), o que é corroborado pela correlação significativa (Figura 7).

3.3.3. Metabolismo de carbono e nitrogênio: o amido e os ureídeos se acumulam na folha em resposta ao encharcamento do solo e ao excesso de Fe.

O amido é o principal produto de armazenamento (KUAI *et al*., 2014). O acúmulo do seu conteúdo (Figura 3A) sugere um bloqueio no transporte de carboidratos para os tecidos fontes e diminuição da exportação de triose fosfatos para o citoplasma, resultando em menores conteúdos de sacarose e carboidratos totais (Figuras 3B e 3C). O menor peso seco da biomassa particionada observado sob efeito dos estresses (Figuras 6B-D) sustenta esta hipótese. Estudos anteriores verificaram resultados semelhantes, por exemplo, Wample e Davis (1983) descobriram que a sacarose translocada de folha para raiz foi bloqueada em condições de encharcamento do solo, resultando em um acúmulo de amido no tecido foliar de girassol (*Helianthus annuus*). Kuai *et al*. (2014) relataram

que a transferência de sacarose da folha subtendente para a cápsula de algodão (*Gossypium hirsutum*) foi irreversivelmente bloqueada após 3 dias de encharcamento do solo.

O acúmulo de ureídeos em folhas de soja já foi descrito sob déficit hídrico (VADEZ *et al*., 2000; KING ; PURCELL, 2005). Esses autores sugeriram que o acúmulo de ureídeos poderia ter um papel regulador e participar da inibição da retroalimentação de N da nitrogenase. No entanto, um estudo de Gil-Quintana *et al*. (2013), usando um sistema de raízes divididas, rejeitou esta hipótese, pois o conteúdo de ureídeos aumentaram nos nódulos estressados posteriormente à inibição da fixação do N_2. Resta saber, se sob encharcamento do solo, o acúmulo de ureídeos no tecido foliar é um sinalizador molecular para a inibição da fixação do N_2, o que abre caminho para novas pesquisas nesse seguimento. A influência das concentrações de Fe no acúmulo de ureídeos em folhas de soja podem estar atreladas a disponibilidade de Mn^{2+}. Izaguirre-Mayoral e Sinclair (2005) verificaram que concentrações elevadas de Fe resultaram em concentrações menores de Mn em folhas de soja e propuseram que a inibição da atividade da alantoato amido-hidrolase é mediada pela deficiência de seu co-fator de Mn^{+2}. Esta enzima decompõe o ácido alantóico em ureideglicolato (WATANABE *et al*., 2014). Dessa forma, o acúmulo de ácido alantóico pode impedir que alantoína armazenada nos peroxissomos se movimente para o reticulo endoplasmático onde ocorre o catabolismo dos ureídeos propriamente dito.

Segundo Oliveira *et al*. (2013), absorção de nitrato pelas plantas de soja é menor sob hipóxia do que em normoxia e o local de sua metabolização passa a ser alterado, ocorrendo na folha sob hipóxia e na raiz sob normaxia. O conteúdo de nitrato verificado nas folhas de soja neste estudo não variou em ambas condições de água no solo (125 e 500 mg dm^{-3}), no entanto, houve um aumento do conteúdo de nitrato nas plantas expostas ao encharcamento solo quando comparado àquelas sem encharcamento solo à 25 mg dm^{-3} de Fe. O AFePA (Figura 6D) apresentou correlação significativa com o nitrato (Figura 7), sugerindo interferir na sua dinâmica em plantas de soja. Além disso, o incremento de proteína em condição de estresse pode estar relacionado a formação de quelantes ou outras substancias atenuantes de EROS.

3.3.4. Toxicidade e peso da biomassa particionada em resposta ao encharcamento do solo e ao excesso de Fe.

As plantas cultivadas sob solo encharcado apresentaram maiores AFePA (Figura 6D), o que é potencialmente tóxico para as plantas, pois Fe^{2+} catalisa a decomposição do H_2O_2, gerando $HO^{\bullet}$ (reação de Fenton). O Fe^{3+} produzido a partir dessa reação pode novamente ser reduzido para Fe^{2+} pelo $O_2^{\bullet-}$ (reação de Haber-Weiss), regenerando Fe^{2+} e permitindo que a reação de Fenton ocorra novamente (BECANA *et al*., 1998; HELL ; STEPHAN, 2003). Em adição, o encharcamento do solo pode afetar a dinâmica do funcionamento do aparato fotossintético, levando ao vazamento dos íons da cadeia transportadora de elétrons para o O_2, o que induziria excesso de produção do $^1O_2$ e H_2O_2 no PSII (BARBOSA *et al*., 2014; ZHENG *et al*., 2017), assim como também o elétron da ferredoxina reduzida pode ser transferido para O_2, em vez de ir para NADP, formando o $O_2^{\bullet-}$ ao lado do receptor do PSI (BARBOSA *et al*., 2014; YAN *et al*., 2018). Esses eventos podem explicar às maiores concentrações de H_2O_2 e MDA nas folhas de soja em função do encharcamento do solo e excesso de Fe (Figuras 5A e 5B), o que está associado a perda da biomassa seca (Figura 7).

As plantas de soja diminuíram severamente a biomassa seca com a imposição dos estresses (Figuras 6A-C). Em particular, o encharcamento do solo foi o que mais impactou BSV (Figura 6C), revelando ser extremamente prejudicial para a soja neste estágio fenológico. Essa perda progressiva da biomassa e do desempenho das plantas é resultado das alterações fisiológicas e bioquímicas documentadas neste estudo (Figuras 1-5), no entanto outros fatores podem ter contribuído, bem como: (I) redução do redox do solo e a consequente redução da capacidade de absorção tenderão a diminuir a concentração de N e P das plantas (DAT *et al*., 2004); (II) alteração da via de fosforilação oxidativa para a glicólise e fermentação devido à ausência de O_2 no tecido radicular (SAIRAM *et al*., 2009; MARTÍNEZ-ALCÁNTARA, *et al*., 2012); (III) capacidade das plantas em mitigar a absorção excessiva de Fe via mecanismos de exclusão e/ou armazenamento/remobilização (MÜLLER *et al*., 2017).

3.4. CONCLUSÕES

O acúmulo de amido e ureídeos no primeiro trifólio totalmente expandido podem ser considerados biomarcadores eficientes para indicar a fitotoxicidade causada pelo encharcamento do solo e excesso de Fe em plantas de soja. O comportamento da biomassa seca das vagens revelou que o desenvolvimento reprodutivo é bruscamente interrompido com a imposição dos estresses, principalmente sob efeito do encharcamento do solo, o que se deve em grande parte à diminuição substancialmente

da *A*, ao bloqueio do transporte de carboidratos para os tecidos drenos e ao aumento do MDA.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Resumo da análise de variância (ANOVA) entre dois níveis de água no solo (sem encharcamento e com encharcamento), três concentrações de ferro (25, 125 e 500 mg dm^{-3}) para as características de taxa de assimilação de CO_2 expressa por área (*A*), condutância estomática (*gs*), transpiração (*E*), eficiência instantânea do uso da água (*EUA*), eficiência da carboxilação (*EiC*), clorofila *a* (C*a*), clorofila *b* (C*b*), clorofila total (C*t*), carotenoides (CAR), amido, carboidratos totais, sacarose, ureídeos totais, ácido Alantoico, alantoína, amônia, nitrato, proteína, peróxido de higrogênio (H_2O_2), malondialdeído (MDA), biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca das vagens (BSV), biomassa seca da raiz (BSR) e acúmulo de ferro na parte aérea (AFePA).

Características	Encharcamento	Ferro	Interação
A	***	***	*
gs	***	**	**
E	***	***	***
EUA	***	**	**
EiC	***	***	***
C*a*	***	***	***
C*b*	***	***	*
C*t*	***	***	***
CAR	***	***	***
Amido	***	***	**
Carboidratos totais	***	***	*
Sacarose	***	***	*
Ureídeos totais	***	***	ns
Ácido Alantoico	**	**	ns
Alantoína	**	**	ns
Amônia	ns	ns	ns
Nitrato	**	**	*
Proteína	**	ns	**
H_2O_2	***	***	ns
MDA	***	**	ns
BSPA	***	***	***
BSV	***	***	***
BSR	***	***	***
AFePA	***	***	**

Significância da análise fatorial: ns, não significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

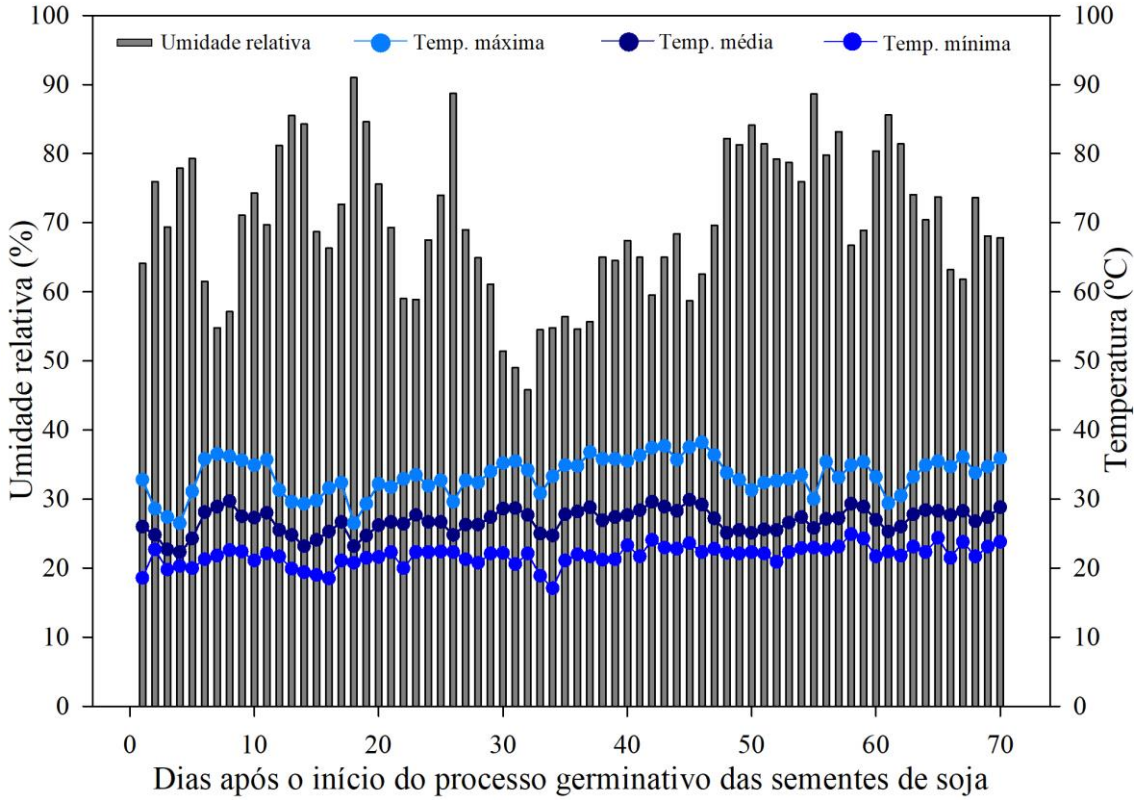

Figura S1. Dados climáticos de temperatura média, temperatura máxima, temperatura mínima e umidade relativa registrados na casa de vegetação durante a condução experimental.
Fonte: Estação Climatológica da UNESP de Dracena.

REFERÊNCIAS

ACHOURI, A.; BOYE, J. I.; BELANGER D. Soybean isoflavones: efficacy of extration consition and an effect of food type on extractability. **Food Research International**, Barking, v.38, n 10, p. 1199-1204, 2005.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001.

AMILS, R.; FUENTE, V.; RODRÍGUEZ, N.; ZULUAGA, J.; MENÉNDEZ, N.; TORNERO, J. Composition, speciation and distribution of iron minerals in *Imperata cilindrica*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 45, n. 5, p. 335-340, 2007.

ANDREWS, M.; LEA, P. J.; RAVEN, J. A.; AZEVEDO, R. A. Nitrogen use efficiency. 3. Nitrogen fixation: genes and costs. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 155, n. 1, p. 1-13, 2009.

ARAKI, H. Water uptake of soybean (*Glycine max* L. Merr.) during exposure to O_2 deficiency and field level CO_2 concentration in the root zone. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 98-105, 2006.

BAILEY-SERRES, J.; FUKAO, T.; GIBBS, D. J.; HOLDSWORTH, M. J.; LEE, S. C.; LICAUSI, F.; PERATA, P.; VOESENEK, L. A. C. J.; VAN DONGEN, J. T. Making sense of low oxygen sensing. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 129-138, 2012.

BALESTRASSE, K. B.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Aluminium stress affects nitrogen fixation and assimilation in soybean (*Glycine max* L.). **Plant Growth Regulation**, New York, v. 48, n. 3, p. 271-281, 2006.

BALK, J.; PILON, M. Ancient and essential: the assembly of iron–sulfur clusters in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 218-226, 2011.

BARBOSA, M. R.; MEDEIROS DE ARAÚJO SILVA, M.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; RANGEL CAMARA, T. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, 2014.

BARBOSA, M. Z.; ASSUNÇÃO, R. Ocupação territorial da produção e da agroindústria da soja no Brasil, nas décadas de 80 e 90. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 31, n. 11, p. 7-16, 2001.

BATAGLIA, O. C.; MASCARENHAS, H. A. Toxicidade de ferro em soja. Iron toxicity in soybeans. **Bragantia**, Campinas, v. 40, n. 1, p. 199-203, 1981.

BECANA, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, The Hague, v. 201, n. 1, p. 137-147, 1998.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical biochemistry**, New York, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.

BLUMENTHAL, J. M.; RUSSELLE, M. P.; VANCE, C. P. Nitrogenase activity is affected by reduced partial pressures of N_2 and NO_3^-. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 114, n. 4, p. 1405-1412, 1997.

BORNHOFEN, E.; BENIN, G.; GALVAN, D.; FABER FLORES, M. Épocas de semeadura e desempenho qualitativo de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 1, p. 46-55, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CATALDO, D. A.; HARRON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.

CHATTERJEE, C.; GOPAL, R.; DUBE, B. K. Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 1-6, 2006.

CHAUDHARY, S.; KUSAKABE, A.; MELGAR, J. C. Phytophthora infection in flooded citrus trees reduces root hydraulic conductance more than under non-flooded condition. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 202, n. 5, p. 107-110, 2016.

CHENG, H.; WANG, M.; WONG, M. H.; YE, Z. Does radial oxygen loss and iron plaque formation on roots alter Cd and Pb uptake and distribution in rice plant tissues? **Plant and Soil**, The Hague, v. 375, n. 1-2, p. 137-148, 2014.

DA SILVA, L. C.; DE ARAÚJO, T. O.; SIQUEIRA-SILVA, A. I.; PEREIRA, T. A. R.; CASTRO, L. N.; SILVA, E. C.; OLIVA, M. A.; AZEVEDO, A. A *Clusia hilariana* and *Eugenia uniflora* as bioindicators of atmospheric pollutants emitted by an iron pelletizing factory in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 24, n. 36, p. 28026-28035, 2017.

DARBANI, B.; BRIAT, J. F.; HOLM, P. B.; HUSTED, S.; NOEPARVAR, S.; BORG, S. Dissecting plant iron homeostasis under short and long-term iron fluctuations. **Biotechnology Advances**, New York, v. 31, n. 8, p. 1292-1307, 2013.

DAT, J. F.; CAPELLI, N.; FOLZER, H.; BOURGEADE, P.; BADOT, P. M. Sensing and signalling during plant flooding. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 4, p. 273-282, 2004.

DE OLIVEIRA JUCOSKI, G.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; DE OLIVEIRA, J. A.; DE PAULA, S. O.; OLIVA, M. A. Impact of iron toxicity on oxidative metabolism in

young *Eugenia uniflora* L. plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracóvia, v. 35, n. 5, p. 1645-1657, 2013.

DIVITO, G. A.; ECHEVERRÍA, H. E.; ANDRADE, F. H.; SADRAS, V. O. Diagnosis of S deficiency in soybean crops: performance of S and N: S determinations in leaf, shoot and seed. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 180, n. 10, p. 167-175, 2015.

DUFEY, P.; HAKIZIMANA, X.; DRAYE, S.; LUTTS, P.; BERTIN, P. QTL mapping for biomass and physiological parameters linked to resistance mechanisms to ferrous iron toxicity in rice. **Euphytica**, Wageningen, v. 167, n. 2, p. 143-160, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – Embrapa. 2017. Embrapa Soja. **Soja em números (safra 2016/2017)**. Disponivel em: https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos. Acesso em: 06 jan. 2020.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage development descriptions for soybeans *Glycine max* (L) Merril. **Crop Science**, Madison, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.

FREI, M.; TETTEH, R. N.; RAZAFINDRAZAKA, A. L.; FUH, M. A.; WU, L. B.; BECKER, M. Responses of rice to chronic and acute iron toxicity: genotypic differences and biofortification aspects. **Plant and Soil**, The Hague, v. 408, n. 1-2, p. 149-161, 2016.

FREITAS, M. D. C. M. D. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera– Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.

GIL-QUINTANA, E.; LARRAINZAR, E.; SEMINARIO, A.; DÍAZ-LEAL, J. L.; ALAMILLO, J. M.; PINEDA, M.; ARRESE-IGOR C.; WIENKOOP S.; GONZÁLEZ, E. M. Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 8, p. 2171-2182, 2013.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

HELL, R.; STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, Berlin, v. 216, n. 4, p. 541-551, 2003.

HIRABAYASHI, Y.; MAHENDRAN, R.; KOIRALA, S.; KONOSHIMA, L.; YAMAZAKI, D.; WATANABE, S.; KIM, H.; KANAE, S. Global flood risk under climate change. **Nature Climate Change**, London, v. 3, n. 9, p. 816, 2013.

IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L.; SINCLAIR, T. R. Soybean genotypic difference in growth, nutrient accumulation and ultrastructure in response to manganese and iron supply in solution culture. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 1, p. 149-158, 2005.

JEONG, J.; GUERINOT, M. L. Homing in on iron homeostasis in plants. **Trends in plant science**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 280-285, 2009.

JUCOSKI, O. G.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; DE OLIVEIRA, J. A.; PAULA, S. O.; OLIVA, M. A. Impact of iron toxicity on oxidative metabolism in young *Eugenia uniflora* L. plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracóvia, v. 35, n. 5, p. 1645-1657, 2013.

JUSTINO, G. C.; SODEK, L. Recovery of nitrogen fixation after short-term flooding of the nodulated root system of soybean. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 170, n. 3, p. 235-241, 2013.

KIM, E. H.; RO, H. M.; KIM, S. L.; KIM, H. S.; CHUNG, I. M. Analysis of isoflavone, phenolic, soyasapogenol, and tocopherol compounds in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] germplasms of different seed weights and origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 23, p. 6045-6055, 2012.

KING, C. A.; PURCELL, L. C. Inhibition of N_2 fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 137, n. 4, 1389–1396, 2005.

KOKUBUN, M. Genetic and cultural improvement of soybean for waterlogged conditions in Asia. **Field Crops Research**, Amsterdam, n. 12, v. 152, p. 3-7, 2013.

KUAI, J.; LIU, Z.; WANG, Y.; MENG, Y.; CHEN, B.; ZHAO, W.; ZHOUA, Z.; OOSTERHUIS, D. M. Waterlogging during flowering and boll forming stages affects sucrose metabolism in the leaves subtending the cotton boll and its relationship with boll weight. **Plant Science**, Oxford, v. 223, n. 6, p. 79-98, 2014.

KUMUTHA, D.; SAIRAM, R. K.; EZHILMATHI, K.; CHINNUSAMY, V.; MEENA, R. C. Effect of waterlogging on carbohydrate metabolism in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.): upregulation of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase. **Plant Science**, Oxford, 175, n. 5, p. 706-716, 2008.

LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 11, n. 1, p. 591-592, 1983.

LINKEMER, G.; BOARD, J. E.; MUSGRAVE, M. E. Waterlogging effects on growth and yield components in late-planted soybean. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 6, p. 1576-1584, 1998.

LUCIÑSKI, R.; POLCYN, W.; RATAJCZAK, L. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium-legumes. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 49, n. 2, p. 537-546, 2002.

MAEKAWA, T.; SHIMAMURA, S.; SHIMADA, S. Effects of short-term waterlogging on soybean nodule nitrogen fixation at different soil reductions and temperatures. **Plant Production Science**, London, v. 14, n. 4, p. 349-358, 2011.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

MARANGUIT, D.; GUILLAUME, T.; KUZYAKOV, Y. Effects of flooding on phosphorus and iron mobilization in highly weathered soils under different land-use types: Short-term effects and mechanisms. **Catena**, Amsterdam, v. 158, n. 10, p. 161-170, 2017.

MARTÍNEZ-ALCÁNTARA, B.; JOVER, S.; QUIÑONES, A.; FORNER-GINER, M. A.; RODRÍGUEZ-GAMIR, J.; LEGAZ, F.; PRIMO-MILLO, E.; IGLESIAS, D. J. Flooding affects uptake and distribution of carbon and nitrogen in citrus seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 12, p. 1150-1157, 2012.

McCULLOUGH, H. The determination of ammonium in whole blood by a direct colorimetric method. **Clínica Chimica Acta**, Netherland, v. 17, n. 2, p. 297-304, 1967.

MOHANTY, B.; BEE-LIAN ONG. Contrasting effects of submergence in light and dark on pyruvate decarboxylase activity in roots of rice lines differing in submergence tolerance. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 2, p. 291-300, 2003.

MORRISSEY, J.; GUERINOT, M. L. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. **Chemical Reviews**, Washington, v. 109, n. 10, p. 4553-4567, 2009.

MÜLLER, C.; SILVEIRA, S. F. S.; DALOSO, D. M.; MENDES, G. C.; MERCHANT, A.; KUKI, K. N.; OLIVA, M. A.; LOUREIRO, M. E.; ALMEIDA, A. M. Ecophysiological responses to excess iron in lowland and upland rice cultivars. **Chemosphere**, Oxford, v. 189, n. 24, p. 123-133, 2017.

NIKOLIC, M.; RÖMHELD, V. Nitrate does not result in iron inactivation in the apoplast of sunflower leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 3, p. 1303-1314, 2003.

NOUET, C.; MOTTE, P.; HANIKENNE, M. Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 7, p.395-404, 2011.

OLDROYD, G. E. Dissecting symbiosis: developments in Nod factor signal transduction. **Annals of Botany**, London, v. 87, n. 6, p. 709-718, 2001.

OLIVEIRA, H. C.; FRESCHI, L.; SODEK, L. Nitrogen metabolism and translocation in soybean plants subjected to root oxygen deficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 66, n. 5, p. 141-149, 2013.

OLMO-VEGA, A.; GARCÍA-SÁNCHEZ, F.; SIMÓN-GRAO, S.; SIMÓN, I., LIDÓN, V.; NIEVES, M.; MARTÍNEZ-NICOLÁS, J. J. Physiological responses of three pomegranate cultivars under flooded conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 224, n. 10, p. 171-179, 2017.

PEDÓ, T.; KOCH, F.; MARTINAZZO, E. G.; VILLELA, F. A.; AUMONDE, T. Z. Physiological attributes, growth and expression of vigor in soybean seeds under soil

waterlogging. **African Journal of Agricultural Research**, Benin, v. 10, n. 39, p. 3791-3797, 2015.

PELLIZZARO, A.; ALIBERT, B.; PLANCHET, E.; LIMAMI, A. M.; MORERE-LE PAVEN, M. C. Nitrate transporters: an overview in legumes. **Planta**, Berlin, v. 246, n. 4, p. 585-595, 2017.

PEREIRA, E. G.; OLIVA, M. A.; ROSADO-SOUZA, L.; MENDES, G. C.; COLARES, D. S.; STOPATO, C. H.; ALMEIDA, A. M. Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. **Plant Science**, Shannon, v. 201-202, n. 3, p. 81-92, 2013.

PIMENTEL, D.; PATZEK, T. W. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. **Natural Resources Research**, New York, v. 14, n. 1, p. 65-76, 2005.

PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T. C.; LEITÃO, M. A.; OKAMOTO, O. K.; MORSE, D.; COLEPICOLO, P. Heavy metal–induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**, New York, v. 39, n. 6, p. 1008-1018, 2003.

PUIATTI, M.; SODEK, L. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 37, n. 10, p. 767-773, 1999.

QUAGGIO, J. A.; RAIJ, B. van; MALAVOLTA, E. Alternative use of the SPM – buffer solution to determine lime requirement of soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 16, n. 3, p.245-260, 1985.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. Disponível em: https://www.R-project.org/. Acesso em: 12 dez. 2019.

RODRÍGUEZ-GAMIR, J.; ANCILLO, G.; GONZÁLEZ-MAS, M. C.; PRIMO-MILLO, E.; IGLESIAS, D. J.; FORNER-GINER, M. A. Root signalling and modulation of stomatal closure in flooded citrus seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, n. 6, p. 636-645, 2011.

SAIRAM, R. K.; DHARMAR, K.; CHINNUSAMY, V.; MEENA, R. C. Waterlogging-induced increase in sugar mobilization, fermentation, and related gene expression in the roots of mung bean (*Vigna radiata*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 166, n. 6, p. 602-616, 2009.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBREARAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; FILHO, J. C. A; OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. rev. ampl. Rio de Janeiro: Embrapa. 2018. 531 p.

SARTORI, G. M. S.; MARCHESAN, E.; DAVID, R.; DONATO, G.; COELHO, L. L.; AIRES, N. P.; ARAMBURU, B. B. Sistemas de preparo do solo e de semeadura no rendimento de grãos de soja em área de várzea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 3, 2016.

SARTORI, G. M. S.; MARCHESAN, E.; DAVID, R.; DONATO, G.; COELHO, L. L.; AIRES, N. P.; ARAMBURU, B. B. Sistemas de preparo do solo e de semeadura no rendimento de grãos de soja em área de várzea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 3, 2016.

SCHAUB, J.; MCARTHUR, W. C.; HACKLANDER, D.; GLAUBER, J.; LEATH, M.; DOTY, H. The U.S. Soybean Industry. Commodity Economics Division. Economic Research Service. U.S. Department of Agriculture. **Agricultural Economic Report**, v 588. 1988.

SHIMAMURA, S.; YAMAMOTO, R.; NAKAMURA, T.; SHIMADA, S.; KOMATSU, S. Stem hypertrophic lenticels and secondary aerenchyma enable oxygen transport to roots of soybean in flooded soil. **Annals of Botany**, London, v. 106, n. 2, p. 277-284, 2010.

SINGH, S. P.; SETTER, T. L. Effect of waterlogging on element concentrations, growth and yield of wheat varieties under farmer's sodic field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, Allahabad, v. 87, n. 2, p. 513-520, 2017.

SIQUEIRA-SILVA, A. I.; SILVA, L. C ; AZEVEDO, A. A.; OLIVA, M. A. Iron plaque formation and morphoanatomy of roots from species of restinga subjected to excess iron. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 78, n. 3, p. 265-275, 2012.

SOUZA, S. C. R.; MAZZAFERA, P.; SODEK, L. Flooding of the root system in soybean: biochemical and molecular aspects of N metabolism in the nodule during stress and recovery. **Amino Acids**, Viena, v. 48, n. 5, p. 1285-1295, 2016.

STEIN, R. J.; DUARTE, G. L.; SPOHR, M. G.; LOPES, S. I. G.; FETT, J. P. Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 154, n. 2, p. 269-277, 2009.

SYED, N. H.; PRINCE, S. J.; MUTAVA, R. N.; PATIL, G.; LI, S.; CHEN, W.; BABU, V.; JOSHI, T.; KHAN, S.; NGUYEN, H. T. Core clock, SUB1, and ABAR genes mediate flooding and drought responses via alternative splicing in soybean. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 22, p. 7129-7149, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

THOMAS, A. L.; GUERREIRO, S. M. C.; SODEK, L. Aerenchyma formation and recovery from hypoxia of the flooded root system of nodulated soybean. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 7, p. 1191-1198, 2005.

THOMINE, S.; VERT, G. Iron transport in plants: better be safe than sorry. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 16, n. 3, p. 322-327, 2013.

TIAN, L.; LI, J.; BI, W.; ZUO, S.; LI, L.; LI, W.; SUN, L. Effects of waterlogging stress at different growth stages on the photosynthetic characteristics and grain yield of spring maize (*Zea mays* L.) under field conditions. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 218, n. 8, p. 250-258, 2019.

UMBREIT, W. W.; KINGSLEY, G. R.; SCHAFFERT, R. R. A colorimetric method for transaminase in serum or plasma. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. New York, v. 49, n. 3, p. 454-459, 1957.

VADEZ, V.; SINCLAIR, T.; SERRAJ, R. Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N_2 fixation in soybean. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 110, n.2, 215–223, 2000.

VIANNA, V. F.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; BIZARI, E. H.; FERRAUDO, A. S.; Di MAURO, A. A divergência genética e fenotípica de genótipos precoces de soja a partir de dados moleculares e agronômicos. **Ciência & Tecnologia Fatec-JB**, Jaboticabal, v. 4, 2013.

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; PAULA, A. C. O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Goiânia v. 34, n. 7, p.1277-1283, 1999.

VOESENEK, L. A. C. J.; COLMER, T. D.; PIERIK, R.; MILLENAAR, F. F.; PEETERS, A. J. M. How plants cope with complete submergence. **New Phytologist**, Chichester, v. 170, n. 2, p. 213-226, 2006.

VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical biochemistry**, New York, v. 33, n. 1, p. 143-157, 1970.

WAMPLE, R. L.; DAVIS, R. W. Effect of flooding on starch accumulation in chloroplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Physiology**, Bethesda, v. 73, n. 1, p. 195-198, 1983.

WATANABE, S.; MATSUMOTO, M.; HAKOMORI, Y.; TAKAGI, H.; SHIMADA, H.; SAKAMOTO, A. The purine metabolite allantoin enhances abiotic stress tolerance through synergistic activation of abscisic acid metabolism. **Plant, Cell & Environment**, Chichester, v. 37, n. 4, p. 1022-1036, 2014.

WIENTJES, E.; PHILIPPI, J.; BORST, J. W.; VAN AMERONGEN, H. Imaging the Photosystem I/Photosystem II chlorophyll ratio inside the leaf. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1858, n. 3, p. 259-265, 2017.

XU, S.; LIN, D.; SUN, H.; YANG, X.; ZHANG, X. Excess iron alters the fatty acid composition of chloroplast membrane and decreases the photosynthesis rate: a study in hydroponic pea seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracóvia, v. 37, n. 10, p. 212, 2015.

YAN, K.; ZHAO, S.; CUI, M.; HAN, G.; WEN, P. Vulnerability of photosynthesis and photosystem I in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) exposed to

waterlogging. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 125, n. 4, p. 239-246, 2018.

YEMM, C. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. **Biochemistry Journal**, Sharjah, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

YIN, X.; KOMATSU, S. Comprehensive analysis of response and tolerant mechanisms in early-stage soybean at initial-flooding stress. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 169, n. 19, p. 225-232, 2017.

ZHANG, Y.; CHEN, Y.; LU, H.; KONG, X.; DAI, J.; LI, Z.; DONG, H. Growth, lint yield and changes in physiological attributes of cotton under temporal waterlogging. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 194, n. 10, p. 83-93, 2016.

ZHENG, X.; ZHOU, J.; TAN, D. X.; WANG, N.; WANG, L.; SHAN, D.; KONG, J. Melatonin improves waterlogging tolerance of *Malus baccata* (Linn.) Borkh. seedlings by maintaining aerobic respiration, photosynthesis and ROS migration. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, n. 1, p. 483, 2017.

ZHOU, Z.; JIANG, Y.; WANG, Z.; GOU, Z.; LYU, J.; LI, W.; FANG, C. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, n. 4, p. 408, 2015.