

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

JOÃO VICTOR SILVA BERNARDES

**Abordagem da nutrição em enxofre na fixação biológica de nitrogênio e no
desenvolvimento de plantas de soja**

Piracicaba

2023

JOÃO VICTOR SILVA BERNARDES

Abordagem da nutrição em enxofre na fixação biológica de nitrogênio e no desenvolvimento de plantas de soja

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. José Lavres Junior

Piracicaba

2023

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Bernardes, João Victor Silva

Abordagem da nutrição em enxofre na fixação biológica de nitrogênio e no desenvolvimento de plantas de soja / João Victor Silva Bernardes; José Lavres Junior. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.
63 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Enxofre. 2. Fixação de nitrogênio. 3. Isótopos. 4. Nutrição vegetal. 5. Soja.
I. Título.

CDU 581.133.4/5 : 633.34

Elaborada por:

Rubenildo Oliveira da Costa

CRB-8/7946

Resolução CFB N° 184 de 29 de setembro de 2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Alex Bernardes e Erika Silva pelo amor, exemplo de vida e dignidade, por nunca medirem esforços para que eu buscasse meus sonhos e por sempre me ensinarem o caminho correto a seguir.

Á minha noiva Stephanye Resende por compreender minha ausência, pela paciência, incentivo e amor.

A quem esse material possa ser útil em seus estudos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me direcionar, proteger e conceder o discernimento necessário durante todo este período.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, por dispor de um programa de pós graduação de tamanha excelência e que contribuiu fortemente para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Lavres Junior, pelos ensinamentos valiosos não apenas profissionais, mas também para a vida, pela amizade, apoio, paciência, por sempre confiar em mim e pela importância em minha formação.

Aos Professores Dr. André Reis, Dr. João Paulo Marques, Dr. Hudson Carvalho, Dr. Paulo Mazzafera e Dr. Daniel Scherer, pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Fernando Galindo pela amizade ilibada e por todos os ensinamentos e auxílios prestados durante cada momento do percurso.

Ao MSc. Cassio Thiengo pela amizade ilibada e por todas as conversas e ensinamentos durante a jornada percorrida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder a bolsa de mestrado e recursos para o desenvolvimento da pesquisa. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – código de financiamento 001.

Ao Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (LIE-CENA USP), pelo acolhimento e pela ajuda na resolução de desafios relacionados ao projeto de pesquisa. Em especial, aos técnicos Ana Paula Ramim, Hugo Batagello, Cleuza Cabral, Clelber Vieira Prestes, Bento Moçambique de Moraes Neto, Miguel Luiz Baldessin e José Aurélio Bonassi.

Aos amigos da USP-CENA, Bruna Rodak, Carlos Diego, Hugo Meneghette, Abimael dos Santos, pela ajuda, conselhos e auxílio na condução e nas análises relacionadas ao experimento.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”
(Isaac Newton)

RESUMO

BERNARDES, J. V. S. **Abordagem da nutrição em enxofre na fixação biológica de nitrogênio e no desenvolvimento de plantas de soja.** 2023. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a principal fonte deste nutriente para a cultura da soja. Entretanto, com os atuais patamares produtivos, esse processo pode não ser suficiente para o suprimento da demanda de N, sendo necessário à sua potencialização. Assim, destaca-se o enxofre (S), elemento muito presente neste processo simbiótico e que é um dos nutrientes que mais vem limitando o aumento de produtividade de soja no Brasil. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da disponibilidade de S no desenvolvimento de plantas de soja e no processo de FBN. Para tanto, realizou-se o estudo em casa de vegetação com plantas cultivadas em solução nutritiva. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com três repetições, e os tratamentos consistiram em concentrações de S-SO₄ (0,0; 2,0 e 10,0 mmol L⁻¹) na solução nutritiva. Quando as plantas iniciaram o florescimento, realizaram-se coletas e avaliações e, posteriormente, a análise estatística dos dados. Os resultados exibem que o desequilíbrio na disponibilidade de S, tanto pela baixa, quanto pela elevada oferta afetou negativamente o desenvolvimento das plantas (parte aérea, raízes e nódulos radiculares). Além disso, um desequilíbrio no fornecimento de S prejudicou o acúmulo de nutrientes (C, N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mo, Zn) e elemento benéfico (Co) nos tecidos. Analisando a composição isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ nos tecidos e as imagens de microscopia dos nódulos, nota-se efeito negativo da deficiência ou excesso de S, culminando em significativa redução da FBN. Sendo assim, o desequilíbrio da nutrição em S, seja pela deficiência quanto pelo excesso, reduz inúmeros processos bioquímicos e nutricionais, com impacto negativo no metabolismo de nitrogênio pelas plantas de soja. Assim, a disponibilidade adequada de S às plantas de soja promove adequado metabolismo vegetal, influenciando significativamente o crescimento das plantas.

Palavras-chave: Abundância natural de ¹⁵N. FBN. Disponibilidade de enxofre.

ABSTRACT

BERNARDES, J. V. S. **Approach to sulfur nutrition in biological nitrogen fixation and development of soybean plants**. 2023. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

The biological nitrogen fixation (BNF) is the main source of this nutrient for the soybean crop. However, with the current production levels, this process may not be sufficient to supply the N demand, being necessary for its potentialization. Thus, sulfur (S) stands out, an element that is very present in this symbiotic process and which is one of the nutrients that has been limiting the increase in soybean productivity in Brazil. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of S availability on the development of soybean plants and on the BNF process. Therefore, the study was carried out in a greenhouse with plants grown in nutrient solution. The experimental design was completely randomized, with three replications, and the treatments consisted of S-SO₄ concentrations (0.0; 2.0 and 10.0 mmol L⁻¹) in the nutrient solution. When the plants started flowering, collections and evaluations were carried out and, later, the statistical analysis of the data. The results show that the imbalance in S availability, both due to low and high supply, negatively affected plant development (shoots, roots, and root nodules). Furthermore, an imbalance in the supply of S impaired the accumulation of nutrients (C, N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mo, Zn) and beneficial element (Co) in the tissues. Analyzing the isotopic composition of $\delta^{15}\text{N}$ in the tissues and the microscopy images of the nodules, a negative effect of S deficiency or excess is noted, culminating in a significant reduction in BNF. Thus, the imbalance of S nutrition, whether due to deficiency or excess, reduces numerous biochemical and nutritional processes, with a negative impact on nitrogen metabolism by soybean plants. Thus, adequate availability of S to soybean plants promotes adequate plant metabolism, significantly influencing plant growth.

Keywords: Natural abundance of ¹⁵N. BNF. Sulfur availability.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Absorção e transporte de S nas plantas superiores	18
2.2 Assimilação e papel fisiológico do S nas plantas superiores.....	19
2.3 O S no processo de fixação biológica de nitrogênio	23
2.4 Técnicas para a quantificação da fixação biológica de N.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Informações gerais.....	29
3.2 Desenho experimental	29
3.3 Crescimento das plantas	30
3.4 Amostragens	30
3.5 Determinações	31
3.5.1 Produção de matéria seca e número de nódulos radiculares	31
3.5.2 Desenvolvimento radicular.....	31
3.5.3 Microscopia de luz em nódulos radiculares	31
3.5.4 Acúmulo de C, N e S e suas relações	32
3.5.5 Acúmulo de nutrientes.....	32
3.5.6 Avaliação da fixação biológica de nitrogênio pela técnica isotópica.....	32
3.6 Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34
4.1. O desenvolvimento da parte aérea, raiz e nódulos radiculares de soja são severamente reduzidos em condições inadequadas de disponibilidade de S	34
4.2 Plantas que se desenvolvem em um meio desbalanceado quanto à disponibilidade de S, reduzem consideravelmente a concentração de C e N e suas relações com o S – destaque para o mecanismo de não consumo de luxo de S pela soja.....	39
4.3 Plantas que se desenvolvem em um meio desbalanceado quanto à disponibilidade de S apresentam alterações negativas na abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ nos tecidos, no valor B, na porcentagem de N proveniente da atmosfera e N-fixado na parte aérea	42
4.4 O desbalanço nutricional de S interfere de forma distinta na dinâmica de acúmulo de nutrientes nas plantas de soja, especialmente nos nódulos radiculares	44
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é, sabidamente, uma das plantas cultivadas mais importantes do mundo. Os seus grãos, além de apresentarem uma variedade de nutrientes e elementos essenciais à saúde humana, estão entre as principais fontes de proteína para a alimentação animal e de óleo vegetal (BALBOA; SADRAS; CIAMPITTI, 2018; CIAMPITTI; SALVAGIOTTI, 2018). Em 2019, mais de 333 milhões de toneladas de grãos foram colhidos no mundo e os três maiores produtores do grão foram a Argentina, Estados Unidos e Brasil, contribuindo com 16, 29 e 34% na produção mundial, respectivamente (FAO, 2019). A produtividade média mundial de grãos de soja, considerando dados reportados na literatura científica publicada entre 1955 e 2016, varia entre 2000 e 4100 kg ha⁻¹, porém, pode chegar até 8300 kg ha⁻¹ (CIAMPITTI; SALVAGIOTTI, 2018). No Brasil, a produtividade média de grãos está em torno de 3379 kg ha⁻¹ (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2021), porém, rendimentos superiores a 7000 kg ha⁻¹ têm sido relatados no Fórum Nacional de Máxima Produtividade do Comitê Estratégico Soja Brasil (CESB, 2023).

Elevadas produtividades alcançadas, conseqüentemente, sugerem uma maior demanda nutricional pelas plantas (BALBOA; SADRAS; CIAMPITTI, 2018). O nitrogênio (N) é um dos nutrientes mais exigidos pela cultura da soja e estima-se que para cada tonelada de grão produzido seja necessário aproximadamente 80 kg de N (CIAMPITTI; SALVAGIOTTI, 2018). Toda, ou boa parte deste N, advém do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e da mineralização do N no solo (CIAMPITTI; SALVAGIOTTI, 2018). De acordo com Salvagiotti et al. (2008), até 98% do N absorvido pelas plantas de soja podem provir da atmosfera, o que representa uma quantidade de N₂ fixada de 337 kg ha⁻¹, porém, esta taxa de fixação de N depende da atividade das bactérias. Além disso, esses mesmos autores mencionam que a quantidade de N proveniente da FBN pode não ser suficiente para garantir elevadas produtividades (acima de 7000 kg ha⁻¹), que por sua vez já são reportadas (CONAB, 2021; COMITÊ ESTRATÉGICO SOJA BRASIL - CESB, 2021).

Como a taxa de fixação de N depende da atividade das bactérias, torna-se importante manter/proporcionar boas condições para que estes organismos possam suprir a demanda de N das plantas. A FBN pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles a disponibilidade de nutrientes (MEDEIROS et al., 2007; OHYAMA et al., 2017) como, por exemplo, o enxofre (S). O S faz parte, juntamente com o molibdênio (Mo) e o ferro (Fe), da enzima nitrogenase, que é responsável pela quebra do N₂ atmosférico no interior do nódulo. Ainda, o S – que pode ser em parte substituído pelo selênio (Se) -, além do Fe e níquel (Ni), participa da enzima

hidrogenase, que hidrolisa o H_2 para fornecer elétrons à nitrogenase. Também, O S e o Fe, fazem parte da ferredoxina (tiorredoxina), que é doadora de elétrons para a Fe-proteína (HAWKESFORD et al., 2012; MALAVOLTA, 2006; VITTI et al., 2018).

O acúmulo de N, bem como a quantidade de N proveniente do processo de FBN, é substancialmente maior quando plantas leguminosas (*Mendicago sativa*, *trifolium pratense*, *Vicia faba* e *Pisum sativum* – plantas modelo) são cultivadas em condições adequadas quanto à disponibilidade de S (SCHERER; LANGE, 1996). Em condição de baixa disponibilidade de S, nota-se menor número e matéria seca de nódulos (SCHERER; LANGE, 1996). Além disso, há diminuição na atividade da nitrogenase (SCHERER, 2008; VARIN et al., 2010), na quantidade de ATP do bacteroide e da mitocôndria dos nódulos (SCHERER et al., 2008), na quantidade de glicose na parte aérea e na raiz e nos nódulos (PACYNA; SCHULZ; SCHERER, 2006), na ferredoxina (SCHERER et al., 2008) e na concentração de leghemoglobina no nódulo (PACYNA, 2005). Assim, a carência de S pode proporcionar redução na FBN (GETACHEW; ABERA; BEYENE, 2016; SCHERER; LANGE, 1996) e, conseqüentemente, na produção de grãos de leguminosas (GETACHEW; ABERA; BEYENE, 2017; SCHERER; LANGE, 1996).

Além de atuar no processo de FBN, o S é muito importante na nutrição mineral das plantas. O S^{2-} , resultante do processo de redução do SO_4^{2-} , é condensado à *O*-acetilserina, para formar cisteína, que é o composto primário da assimilação de SO_4^{2-} e é ponto de partida para a síntese de outros compostos sulfurados (HELDT; PIECHULLA, 2021; LONG et al., 2015). A cisteína tem importância singular nas funções estruturais e catalíticas de proteínas, dado que os grupos tióis com resíduos deste aminoácido podem formar ligação dissulfeto, necessária para o estabelecimento de estruturas proteicas (HELDT; PIECHULLA, 2021). Além disso, estes resíduos, juntamente com o Fe podem controlar processos celulares, reações de transferência de elétrons (HELDT; PIECHULLA, 2021; LONG et al. 2015), constituir a tiorredoxina, ser precursor da síntese de fitoalexinas e ter função de cofator (CoA, S adenosilmetionina e ácido lipóico) (DROUX et al., 1998; SAITO, 2004). O suprimento inadequado de S à cultura da soja influencia na quantidade de aminoácidos sulfurados (RUSHOVIC; WEIL, 2021) e na produção de grãos (MOREIRA et al., 2020; PETINELI et al., 2020).

Diante disso, parte-se do pressuposto que do S participa no processo de FBN e da nutrição mineral das plantas. Por mais que as plantas apresentem processos regulatórios, a absorção e o uso do S é regulada pela sua disponibilidade (KOK; STULEN; HOWKESFORD, 2011; LONG et al., 2015; TAKAHASHI et al., 2011). Dessa maneira, sob condições de deficiência, suficiência ou excesso de S, a FBN e a resposta das plantas poderão ser diferentes.

Assim, novos estudos acerca da temática e que visem conhecer os mecanismos envolvidos na resposta da FBN em função da disponibilidade de S às plantas, são extremamente importantes. Além disso, é relevante considerar estudos com a cultura da soja, leguminosa que tem como principal fonte de N aquele proveniente da atmosfera, com grande importância socioeconômica no Brasil e no mundo (CONAB, 2021). Nesse contexto, faz-se necessário o uso de técnicas que auxiliem na quantificação da FBN, como por exemplo a técnica isotópica da variação da abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}\text{‰}$), permite que o N na planta oriundo da fixação biológica do N_2 atmosférico seja quantificado (SHEARER; KOHL, 1986), garantindo precisão nos resultados.

A hipótese deste trabalho é que plantas de soja crescidas sob baixa disponibilidade de S, apresentem severa redução em seu desenvolvimento e na FBN. Semelhantemente, em condições de excesso do nutriente, também é notado o impacto negativo no crescimento das plantas e na FBN. Comparado esses dois extremos, espera-se que em condições adequadas de S, plantas de soja tenham o máximo desempenho em desenvolvimento, com incremento da eficiência da FBN, observando-se maior acúmulo de N nas plantas (parte aérea, raízes e nódulos), e maior produção de biomassa nas plantas. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos dos níveis de disponibilidade de S no crescimento das plantas, validado por avaliações produtivas (matéria seca, crescimento radicular, desenvolvimento da nodulação), na aquisição de nutrientes e na FBN, avaliada por meio das análises da variação da abundância natural ($\delta^{15}\text{N}\text{‰}$) no tecido vegetal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Absorção e transporte de S nas plantas superiores

O S, na forma de SO_2 , pode ser absorvido pelas folhas e frutos, enquanto em sua forma H_2S , pode ser absorvido pelos estômatos, porém, essas formas de entrada de S nas plantas são pouco relevantes em áreas pouco industrializadas (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011; TAKAHASHI, 2019; TELMAN; DIETZ, 2019; VATANSEVER et al., 2016). A maior parte do conteúdo de S nos tecidos das plantas advém da absorção radicular deste íon na forma de SO_4^{2-} , embora as raízes absorvam este íon ligado a aminoácidos, SO_4^{2-} orgânico e S elementar (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011). O contato do ânion SO_4^{2-} com as raízes das plantas ocorre, predominantemente (aproximadamente 95%), por fluxo de massa, porém a interceptação deste ânion pelas raízes também contribui para o contato íon-raiz (MALAVOLTA, 2006).

A absorção de S-SO_4^{2-} é ativa e ocorre por transporte acoplado, um processo de alta afinidade e contra um gradiente de concentração, sendo 3 prótons H^+ absorvidos por íon SO_4^{2-} através das proteínas transmembrana sulfato-permease (BROADLEY; WHITE, 2009). Os transportadores de SO_4^{2-} (SULTRs) são responsáveis pela absorção desta forma química de S e pelo seu transporte na planta. Essa família de transportadores geralmente tem 12-16 genes e são divididos em quatro categorias de acordo com a sequência de códigos homólogos, propriedades bioquímicas e funções fisiológicas (BARBERON et al., 2008; YOSHIMOTO et al., 2007). Os transportadores SULTR1 são considerados como os principais responsáveis pela absorção de S do solo (TAKAHASHI et al., 2011) e, também, pelo transporte de S entre os tecidos (redistribuição) (YOSHIMOTO et al., 2003). A translocação deste ânion das raízes para as demais partes da planta (KATAOKA et al., 2004a; TAKAHASHI et al., 1997; TAKAHASHI et al., 2000), bem como sua transferência para sementes em desenvolvimento (KATAOKA et al. 2004a; TAKAHASHI et al., 1997; TAKAHASHI et al., 2000), é realizada pelos transportadores SULTR2, que podem, ainda, transportar o S em formas orgânicas (glutaciona e S-metilmetionina).

Os transportadores da família SULTR3 são os menos caracterizados (KATAOKA et al., 2004a). Todavia, um homólogo denominado de transportador simbiótico de sulfato (SST1) foi observado em *Lotus japonicus*, uma leguminosa que estabelece relação com microrganismos fixadores de N (KRUSELL et al., 2005). Estes transportadores são encontrados especificamente na membrana do simbiossoma e tem alta expressão, o que indica papel importante na entrada

de SO_4^{2-} nos nódulos radiculares (KRUSELL et al., 2005). A categoria de transportadores da família SULTR4, localizados no tonoplasto, tem função de intermediar a entrada ou saída de SO_4^{2-} do vacúolo (KATAOKA et al., 2004b).

Boas evidências mostram que tanto SeO_4^{2-} e MoO_4^{2-} são transportados via transportadores de sulfatos nas plantas, e que estes elementos interagem de forma competitiva entre si (FITZPATRICK; TYERMAN; KAISER, 2008; LEGGETT; EPSTEIN, 1956). É importante mencionar, que plantas crescidas em baixa disponibilidade de S, podem apresentar maior acúmulo de SeO_4^{2-} e MoO_4^{2-} (FITZPATRICK; TYERMAN; KAISER, 2008; LEGGETT; EPSTEIN, 1956; SHINMACHI et al., 2010), ao passo que em condições de excesso, nota-se um tendência de diminuição de acúmulo destes ânions, devido compartilharem do mesmo transportador. Vale ressaltar, que o excesso de outros ânions pode diminuir a absorção de SO_4^{2-} , porém, por processos de competição por cargas nas raízes (CHAN; PHUA; VAN BREUSEGEM, 2019; HUANG; VETTING; RODERICK, 2005; KATAOKA et al., 2004a; MARUYAMA-NAKASHITA; OHKAMA-OHTSU, 2017).

2.2 Assimilação e papel fisiológico do S nas plantas superiores

Após a absorção, ou seja, a entrada do SO_4^{2-} nas células e do seu transporte para a parte aérea das plantas ocorre, predominantemente nos cloroplastos, o processo de redução deste ânion à S^2 . Pelo fato de ser uma molécula estável, o SO_4^{2-} necessita ser ativado por adenilação, catalisada pela enzima ATP-sulfarilaze (ATPS) e é formado adenosina-5'-fosfosulfato (APS). Neste ponto da via de redução do SO_4^{2-} , surge uma ramificação, pois APS pode receber um PO_4^{2-} via APS-quinase e formar 3'-fosfoadenosina-5'fosfosulfato (PAPS) que serve como uma fonte de sulfato que participa da síntese de polissacarídeos sulfatados, compostos sulfatados e glucosinolatos. APS doa o sulfato para uma molécula de glutatona, por meio da enzima APS-sulfotransferase, gerando S-sulfoglutationa. Essa molécula sofre uma redução por meio da APS-redutase, assim, a glutatona reduzida doa elétrons para a produção do SO_3^{2-} , que pode ser utilizado na síntese de sulfolípidos e até mesmo oxidado à SO_4^{2-} . Esse ânion, o sulfito, é reduzido a S^2 através da enzima sulfito redutase. Após este processo, o S^2 resultante será incorporado em uma molécula orgânica (LONG et al., 2015).

O S^2 , resultante do processo de redução do SO_4^{2-} , é condensado à *O*-acetilserina e da origem a cisteína, que é o composto primário da assimilação de SO_4^{2-} e é ponto de partida para a síntese de outros compostos sulfurados (HELDT; PIECHULLA, 2021; LONG et al., 2015). A cisteína tem importância singular nas funções estruturais e catalíticas de proteínas, dado que

os grupos tióis com resíduos deste aminoácido podem formar ligação dissulfeto, necessária para o estabelecimento de estruturas proteicas (HELDT; PIECHULLA, 2021). Além disso, estes resíduos, juntamente com o Fe podem controlar processos celulares, reações de transferência de elétrons (HELDT; PIECHULLA, 2021; LONG et al., 2015), constituir a tiorredoxina, ser precursor da síntese de fitoalexinas e ter função de cofator (vitamina H, U e B1, CoA, S adenosilmetionina e ácido lipóico) (DROUX et al., 1998; SAITO, 2004).

A síntese de cisteína ocorre com maior frequência nas folhas mais metabolicamente ativas, no cloroplasto, mitocôndria e citosol. Esse processo é mediado por um complexo multienzimático (cisteína sintase) que contém duas importantes enzimas, a serina acetiltransferase (SERAT) e *O*-acetilserina(thiol)liase (OAS liase) e que tem a característica de reversibilidade (HELDT; PIECHULLA, 2021). O processo se inicia na reação entre a serina e acetil-CoA por intermédio da (SERAT) e como resultado, tem-se a produção de *O*-acetilserina e CoASH, esta última, reabastece o processo de produção de acetil-CoA. De maneira geral, são encontrados nas plantas, três tipos de SERAT, que se diferem em suas propriedades catalíticas e localização (HELDT; PIECHULLA, 2021; LONG et al., 2015). Posteriormente, a *O*-acetilserina recebe o S^{2-} , processo este mediado pela OAS liase, e tem-se a formação da cisteína e de acetato, que também reabastece a via de produção de CoASH.

O principal ponto de regulação da síntese de cisteína no citosol está relacionada a disponibilidade de SO_4^{2-} . Em condições de suficiente disponibilidade de SO_4^{2-} , o complexo multienzimático (SERAT e OAS liase) está formado e produzindo *O*-acetilserina o qual ao receber o S^{2-} forma a cisteína, processo mediado pela OAS liase. Todavia, quando não há concentrações suficientes de SO_4^{2-} , o complexo multienzimático não se forma, assim, não há produção de *O*-acetilserina e aquelas que já estão no meio funcionam como uma sinalização para a absorção de SO_4^{2-} (HELDT; PIECHULLA, 2021; LONG et al., 2015).

A cisteína pode ser catabolizada por três rotas diferentes. A cisteína pode ser desaminada pela cisteína dessulfurase, gerando NH_4^+ , piruvato e H_2S . Durante a senescência das folhas, a enzima desulfidrase D-cisteína, degrada a cisteína e o S pode ser remobilizado na planta (BLOEN et al., 2004). Ainda, a cisteína pode sofrer transaminação para 3-mercaptopiruvato. O S desse composto é transferido para uma glutatona gerando o persulfeto de glutatona, que por sua vez é oxidado a sulfito. Este, é convertido a tiosulfato ou oxidado, formando SO_4^{2-} (HILDEBRANDT et al., 2015).

A partir da cisteína, outro aminoácido sulfurado pode ser formado, a metionina, cuja maior parte é convertida em adenosilmetionina (AdoMet), composto fundamental no

metabolismo com função de metilação de compostos (ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, lipídeos, membranas, clorofila, plastoquinona, biotina, poliaminas, entre outros) (HELDT; PIECHULLA, 2021).

Para a formação de metionina, a cisteína reage com a fosfohomoserina, por meio da enzima cistationa-sintase, e o produto é a cistationa. Esse composto é clivado, pela Cistationa-liase, formando um composto que se converte naturalmente e piruvato e NH_4^+ e homocisteína. A homocisteína, então, é metilada por uma metiltransferase (o metil vem do metil tetra hidrofolato) e forma a metionina e tetraidrofolato (HELDT; PIECHULLA, 2021). O principal ponto de regulação da via de síntese deste aminoácido é pela concentração de seus derivados, como o AdoMet (HELDT; PIECHULLA, 2021).

Em plantas leguminosas, cujos grãos apresentam elevado teor de proteína, tem-se investigado uma forma de aumento de aminoácidos sulfurados, dado sua importância na dieta dos seres-humanos (DURANTI, 2006). Em amendoim, o fornecimento de S às plantas aumentou a concentração de cisteína e metionina, bem como outros aminoácidos livres (THIRUNAVUKKARASU et al., 2018). Na cultura da soja, as concentrações de aminoácidos sulfurados, quando fornecido S às plantas, é quase dobrado (CHANDRA; PANDEY, 2016; RUSHOVIC; WEIL, 2021). Em feijão comum (GLOWACKA et al., 2019) e feijão preto (YADAV; MAHTO; CHAUDHARY, 2018), a concentração de cisteína e metionina nos grãos aumentaram consideravelmente, com o fornecimento de S às plantas. Diante destes resultados, advindos de várias investigações feitas nos últimos 10 anos, pode-se inferir que o fornecimento de S às plantas aumenta a qualidade dos grãos em relação ao conteúdo de aminoácidos sulfurados. A prática que visa o aumento da produtividade das culturas também pode ser considerada como uma técnica de biofortificação agrônômica, dado o aumento destas frações de aminoácidos que são essenciais aos humanos (DURANTI, 2006).

Um importante produto da rota assimilatória de redução do sulfato, o tripeptídeo glutationa é a principal proteína -tiol em plantas (JAHAN, 2017). Presente em concentrações milimolares nos vegetais, glutationa e seus derivados estão envolvidos em funções intrínsecas, como armazenamento e transporte de longa distância de S reduzido, na eliminação de peróxido de hidrogênio e espécies reativas de oxigênio (EROS) (HASANUZZAMAN et al., 2019), na desintoxicação de xenobióticos (CAVE-RADET et al., 2020), na ativação e na conjugando fenilpropanóides e hormônios, ou como substrato para a síntese de fitoquelatinas (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

Duas enzimas-chave constituem a biossíntese de glutationa, *γ -glutamilcisteína-sintetase* que catalisa a reação entre o aminoácido sulfurado cisteína e o glutamato, e *glutationa-sintetase*,

que por ligação alpha-peptídica adiciona glicina ao γ -Glu-Cys, formando assim Glutathione reduzida, ou GSH (JAHAN, 2017). Apesar de estar presente em todos os compartimentos celulares, glutathione é sintetizada apenas nos plastídios ou citosol vegetal. Estudos com *Arabidopsis* demonstraram que sementes de plantas mutantes sem γ -glutamylcisteína-sintetase germinam, mas não sobrevivem além do estágio de muda, mesmo que a glutathione seja fornecida externamente (OHKAMA-OHTSU et al., 2007). Os autores sugerem que a biossíntese e o transporte de GSH nas plantas dependem da mobilidade de compostos intermediários da enzima entre as membranas plastidiais.

Plantas transgênicas superexpressando gene bacteriano para γ -glutamylcisteína-sintetase demonstraram níveis aumentados de GSH (Glutathione reduzida), que frequentemente se correlacionam com maior resistência ao estresse abiótico (HASANUZZAMAN et al., 2019). Por outro lado, mutantes de *Arabidopsis* com repressão dos níveis de γ -glutamyl sintetase exibem tolerância comprometida a vários tipos de estresse, como tolerância ao Cd^{2+} (JIANG et al., 2019), perda da resistência a patógenos (GEU-FLORES et al., 2011), ou sinalização de genes responsivos do estresse celular vegetal (BALL et al., 2004).

Glutathione também exerce papel intrínseco na síntese de fitoquelatinas, oligopeptídeos ricos em cisteína sintetizados enzimaticamente a partir da glutathione pela enzima *fitoquelatina-sintase*, em uma reação de transpeptidação, que só ocorre na presença de íons metálicos (DAS et al., 2021). Dessa forma, as fitoquelatinas são compostos que se ligam a metais pesados como Cd^{2+} , ou micronutrientes em altas concentração de como o Cu^{2+} (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). Estão presentes em plantas, fungos e outros organismos, comuns em ambientes com alta concentração de metais. Dentre os tipos de fitoquelatinas presentes na natureza, temos as fitocelalatas, importantes compostos envolvidos no vegetal contra metais pesados, em particular Cd^{2+} e arsênio (As). A concentração de GSH em alguns grupos de plantas ditos fitorremediadores, aumentam sua tolerância ao Cd^{2+} e As (DAS et al., 2021).

A glutathione também desempenha importante papel na desintoxicação de compostos como toxinas, ou xenobióticos, produtos químicos como herbicidas, que podem ser inativados pela complexação com GSH (LIU et al., 2021). Pela ação da enzima *glutathione-S-transferase*, os conjugados $\text{GS}^- + \text{xenobiótico}$ são transportados para o vacúolo vegetal, onde são compostos, ao passo que conjugados de glutathione são hidrolisados em conjugados de cisteína. Esse mecanismo tem sido usado com sucesso na agricultura, identificando substâncias, denominadas de *safeners*, que podem aumentar a síntese da glutathione vegetal, aumentando assim a

resistência das plantas cultivadas a herbicidas, ou melhorando a seletividade da aplicação (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

2.3 O S no processo de fixação biológica de nitrogênio

O N é um dos nutrientes mais limitantes para a produtividade da maioria das culturas agrícolas (VITOUSEK; HOWARTH, 1991). A soja é altamente exigente em N, demandando cerca de 80 kg por tonelada de grãos (SATURNO et al., 2017). O fornecimento de N para soja normalmente é desempenhado através de duas formas: do N inorgânico do solo via adubação química ou pela FBN. Há uma grande variação na quantidade de N proveniente da FBN em relação ao solo (CÓRDOVA et al., 2019), porém sabe-se que esse processo é responsável por 40 a 90% da absorção de N (CIAMPITTI; SALVAGIOTTI, 2018).

A FBN consiste no processo de redução de N_2 a NH_3 por bactérias fixadoras de N, conhecidas como rizóbios, em associação simbiótica com plantas leguminosas (KAHEEL; JAHAN; KHAN, 2023). Essa associação inicia-se com a entrada da bactéria nos pelos radiculares da planta, culminando com o desenvolvimento de uma estrutura, denominada de nódulo radicular, dentro do qual os microssimbiontes realizam a FBN, disponibilizando o N em forma prontamente disponível para absorção pela planta, que em contrapartida, fornece fotoassimilados ao microrganismo (WANG et al., 2012). A FBN, portanto, desempenha um papel fundamental na sustentação da agricultura devido ao imenso impacto agronômico, econômico e ecológico que supera as limitações de fontes de N (N de solos e fertilizantes), as quais, muitas vezes desafiam a produção agrícola (PITUMPE ARACHCHIGE et al., 2020).

Por outro lado, plantas que estabelecem relação simbiótica com bactérias fixadoras de N têm maior demanda por S dado seu grande acúmulo nos bacteroides (quase 20 vezes maior que nas plantas) e o fato de sua falta desencadear uma série de efeitos negativos.

Quando as plantas crescem sob baixa disponibilidade de S, nota-se redução significativa do número e a massa de nódulos (Tabela 1). Varin et al. (2010) sugeriram que este fato se deu pelo alto acúmulo de aminoácidos ricos em N. Todavia, não só este feito deve ter causado redução no número e massa seca de nódulos. Bosse et al. (2021) revisando vários trabalhos sugerem que os flavonoides daidzeína e genisteína são os mais importantes para o processo de infecção das raízes pelas bactérias. Na rota de síntese destes flavonoides são encontradas moléculas que tem S em sua composição na forma de S-CoA. Sendo assim, a deficiência de S pode ocasionar redução na síntese de flavonoides importantes no processo de infecção da raiz pela bactéria. Entretanto, estudos mais objetivos que visem avaliar de fato os efeitos do S na

síntese de flavonoides relacionados ao processo anteriormente mencionado, são de extrema importância.

Para que o processo de fixação biológica de N ocorra, é necessária adequada funcionalidade da enzima nitrogenase, responsável pela quebra do N_2 e sua conversão à NH_3 . Esta molécula é composta por duas subunidades as quais são a Fe-proteína, que contém um cluster Fe_4S_4 , e FeMo-proteína que apresenta Fe_8S_7 . Desse modo, pode-se deduzir que para um adequado funcionamento desta enzima, além de outros nutrientes, é necessária uma significativa quantidade de S. Schneider et al. (2019) observou que na falta de transportadores do tipo SST 1, responsável pela entrada de SO_4^{2-} nos bacteroides, ocorre redução significativa na quantidade das subunidades da enzima nitrogenase.

O acúmulo de N, bem como a quantidade de N proveniente do processo de FBN, é substancialmente maior quando plantas leguminosas (*Mendicago sativa*, *trifolium pratense*, *Vicia faba* e *Pisum sativum* – plantas modelo) são cultivadas em condições adequadas quanto à disponibilidade de S (SCHERER; LANGE, 1996). Em condição de baixa disponibilidade de S, nota-se menor número e matéria seca de nódulos (ABIDO, 2018; GETACHEW; ABERA; BEYENE, 2016; SCHERER et al., 2008; SCHERER; LANGE, 1996). Além disso, há diminuição na atividade da nitrogenase (SCHERER, 2008; VARIN et al., 2010), na quantidade de ATP do bacteroide e da mitocôndria dos nódulos (SCHERER et al., 2008), na quantidade de glicose na parte aérea e na raiz e nos nódulos (PACYNA et al., 2006), na ferredoxina (SCHERER et al., 2006; SCHERER et al., 2008) e na concentração de leghemoglobina no nódulo (PACYNA, 2005). Assim, a carência de S pode proporcionar redução na FBN e, conseqüentemente, na produção de massa seca ou de grãos de leguminosas (CAZZATO et al., 2012a; 2012b; GETACHEW; ABERA; BEYENE, 2016; 2017; HUSSAIN et al., 2011; SCHERER; LANGE, 1996; SCHERER et al., 2006; VARIN et al., 2010).

Tabela 1. Efeitos do S em plantas leguminosas

Nome comum	Disponibilidade de S às plantas	Principais resultados	Referências
Amendoim	0 - 40 kg ha ⁻¹	Aumento da produção de grãos, da concentração de S nas raízes, parte aérea e grãos, aumento dos teores de cisteína e metionina e aminoácidos livres, aumento da concentração de proteína bruta e lipídeos nos grãos.	Thirunavukkarasu et al. (2018)
Amendoim	0 - 60 kg ha ⁻¹	Aumento da concentração de S e N, proteínas e lipídeos nos grãos	Yadav et al. (2020)

Soja	0 - 200 mg kg ⁻¹	Aumento na produção de massa seca da parte aérea e de grãos, aumento na concentração de S e N na folha e nos grãos, aumento no conteúdo de clorofila,	Moreira et al. (2020)
Soja	0 - 120 mg kg ⁻¹	Aumento na produção de massa seca da parte aérea e de grãos, aumento na concentração de S e N na folha e nos grãos, aumento no conteúdo de clorofila,	Petinel et al. (2020)
Soja	0 - 100 mg kg ⁻¹	Aumento na produção de massa seca da parte aérea e de grãos, aumento na concentração de S e N na folha e nos grãos, aumento no conteúdo de clorofila,	Moreira et al. (2018)
Soja	0 e 80 mg kg ⁻¹	Aumento na produção de massa seca da parte aérea e de grãos, aumento na concentração de S e N na folha e nos grãos, aumento no conteúdo de clorofila	Moreira e Moraes (2016)
Soja	0 - 100 kg ha ⁻¹	Aumento da produtividade de grãos	Sfredo e Moreira (2015)
Soja	0 - 200 mg kg ⁻¹	Aumento na produção de massa seca da parte aérea e de grãos, aumento na concentração de S e N nas folhas, aumento da concentração de proteínas nos grãos com destaque para albumina e prolamina	Ibañez et al. (2020)
Soja	0 - 80 kg fed ⁻¹	Aumento do número e massa de nódulo, aumento na produção de massa seca da parte aérea e de grãos e aumento na concentração de lipídeos nos grãos	Abido (2018)
Soja	0 - 40 kg ha ⁻¹	Aumento do número e massa de nódulos, aumento no tamanho e na produção de massa seca da parte aérea, aumento na concentração de S e N na parte aérea das plantas e aumento da fixação biológica de nitrogênio	Getachew, Abera e Beyene (2016)
Soja	0 - 40 kg ha ⁻¹	Aumento no rendimento de grãos, na concentração de S, N e proteínas nos grãos	Getachew, Abera e Beyene (2017)
Soja	0 - 100 solo / 0 - 11 foliar kg S ha ⁻¹	Aumento da concentração de S, cisteína e metionina nos grãos	Rushovic e Weil (2021)

Soja	1 - 8 meq S L ⁻¹	Aumento na produção de massa seca de raízes, parte aérea e de grãos, aumento na concentração de S e N nos tecidos, aumento da concentração de cisteína nos grãos, aumento das frações proteicas nos grãos, aumento na concentração de açúcares reduzidos, não reduzidos e totais nas folhas e nos grãos e aumento na concentração de amido nas folhas e grãos.	Chandra e Pandey (2016)
Soja	0 - 30 kg ha ⁻¹	Aumento da produção de massa seca da parte aérea e de grãos, aumento da concentração de N na parte aérea e aumento da fixação biológica de nitrogênio	Hussain et al. (2011)
Lentilha	0 - 40 kg ha ⁻¹	Aumento no número e massa de nódulos, aumento na produção de massa seca da parte aérea e de grãos e aumento na concentração de S nos grãos	Mekuria, Worku e Fikre (2019)
Tremoço branco	0 - 60 kg ha ⁻¹	Aumento da produção de grãos, aumento da fixação biológica de nitrogênio, aumento da concentração de proteína nos grãos, aumento na concentração de lipídeos e suas frações	Cazzato et al. (2012)a
Tremoço azul	0 - 60 kg ha ⁻¹ solo e foliar	Aumento da concentração de N e proteína nos grãos e redução da concentração de nitrato nos tecidos	Barczak e Barczak (2021)
Alfafa	25 - 200 mg por vaso	Aumento da massa de nódulos, aumento da produção de massa seca de raízes e parte aérea, aumento da concentração de S nas raízes e de S e N na parte aérea e aumento na concentração de ferredoxina e adenosina-trifosfato (ATP) nos nódulos	Scherer et al. (2008)
Ervilha	25 e 200 mg por vaso	Aumento da massa de nódulos, aumento da produção de massa seca de raízes e parte aérea, aumento da concentração de S nas raízes e de S e N na parte aérea e aumento na concentração de ferredoxina e adenosina-trifosfato (ATP) nos nódulos	Scherer et al. (2008)
Ervilha	0 e 200 mg por vaso	Aumento da massa dos nódulos, aumento da produção de massa seca da parte aérea, aumento da concentração de S e N nos nódulos e na parte aérea, aumento da fixação biológica de nitrogênio, aumento na concentração de glicose nos nódulos e parte aérea e da concentração de sacarose nos nódulos.	Scherer et al. (2006)

Travo branco	0 - 0,380 mM SO ₄ ⁻²	Aumento do número e massa de nódulos, aumento na produção de massa seca de raízes e parte aérea, aumento da concentração de S nos nódulos e de N nas folhas, aumento na fixação biológica de nitrogênio e da atividade da enzima nitrogenase, aumento na concentração de asparagina, arginina, histidina, glutamato e aminoácidos totais e aumento da concentração de proteína nos grãos	Varin et al. (2010)
Feijão comum	0 - 60 kg ha ⁻¹	Aumento na produção de grãos, aumento na fixação biológica de nitrogênio e aumento na concentração de proteína e lipídeos e suas frações nos grãos	Cazzato et al. (2012)b
Feijão comum	50 kg ha ⁻¹	Aumento na produção de grãos, aumento na concentração de S e N na parte aérea e aumento na concentração de cisteína e metionina e proteína nos grãos	Glowacka et al. (2019)
Caupi	0 - 40 kg ha ⁻¹	Aumento na produção de grãos e aumento na concentração de S, N e proteína nos grãos	Singh e Singh (2017)
Caupi	0 - 80 kg ha ⁻¹	Aumento do comprimento e da produção de massa seca da parte aérea e no rendimento de grãos	Patel et al. (2013)
Feijão preto	0 - 60 kg ha ⁻¹	Aumento no número e massa de nódulos, aumento no rendimento de grãos e aumento na concentração de metionina e de proteínas	Yadav, Mahto e Chaudhary (2018)
Feijão mungo	Suficiencia e deficiência de S	Aumento no comprimento e massa seca de raízes e da parte aérea, aumento no teor de clorofila, aumento na concentração de prolina nas raízes e folhas e aumento na concentração de açúcares reduzidos e totais nas raízes e folhas	Saha et al. (2016)

Fonte: Autor (2023).

2.4 Técnicas para a quantificação da fixação biológica de N

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) é fundamental para reduzir ou eliminar a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados. A mensuração da contribuição dessa associação para as plantas fornece aos produtores uma melhor orientação sobre o manejo do N, otimizando a produtividade e reduzindo as perdas prejudiciais ao meio ambiente, quando feita a suplementação desnecessária de N (LIU et al., 2011). As técnicas

utilizadas para medir a taxa de fixação biológica de N diferem quanto a sua rusticidade e capacidade de detecção, mas também podem ser influenciadas pelo tipo de amostra e o procedimento de coleta (FONSECA-LÓPEZ; QUILA; BALAGUERA-LÓPEZ, 2020).

O ensaio de redução de acetileno foi um dos primeiros esforços utilizados para medir a contribuição da FBN por meio da atividade da enzima nitrogenase (VESSEY, 1994). Essa técnica mede a taxa de conversão do gás acetileno em etileno que também é realizada pela enzima fixadora de N₂, a nitrogenase, assim consiste num método indireto de determinação da FBN, pois o etileno produzido é convertido em N₂ fixado (DANSO, 1996). Contudo, não é considerado um método muito confiável e recomendável devido os valores de redução do acetileno variarem em função de fatores como o tempo e o espaço de acondicionamento das amostras, além da dificuldade em convertê-los em quantidades de N fixas, se não impossível (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008).

Atualmente, a técnica de abundância natural de ¹⁵N desenvolvida por Shearer e Kohl (1986) tem sido a mais empregada para a quantificação direta da contribuição de FBN em leguminosas (ARAUJO et al., 2019). Essa técnica fundamentou-se em razão do N disponível para as plantas em grande parte dos solos ser naturalmente ligeiramente enriquecido no isótopo ¹⁵N em comparação ao do ar. Assim, para aplicá-la é preciso determinar a abundância de ¹⁵N tanto do N proveniente do solo quanto do derivado do ar via FBN (OKITO et al., 2004). Pois, plantas que dependem totalmente de FBN possuem valores de abundância de ¹⁵N ($\delta^{15}\text{N}$) próximo ao de N₂ do ar, que é universalmente definido como unidades zero delta (0,00 ‰). Desse modo, admite-se que plantas de referência não fixadoras de N₂, crescendo no mesmo ambiente acumularão N do solo, de forma que a diferença na abundância de ¹⁵N entre essas plantas e as leguminosas pode ser interpretada quantitativamente para estimar a contribuição de FBN (ARAUJO et al., 2018).

Em função disso, na abundância de ¹⁵N mensuráveis diferenças que naturalmente ocorrem entre plantas fixadoras de N₂ e não fixadoras têm sido frequentemente exploradas graças a modernização de equipamentos de espectrômetros de massa (PEOPLES et al., 2015), os quais apresentam a vantagem de possuir alta precisão para estimar isótopos no material avaliado devido sua sensibilidade de detecção (FONSECA-LÓPEZ; QUILA; BALAGUERA-LÓPEZ, 2020). Assim, a técnica de abundância natural de ¹⁵N é fundamental para fornecer estimativas totalmente confiáveis da porcentagem de N obtido da FBN e desse modo, possibilitar comparações legítimas da dinâmica de N de diferentes espécies em momentos e condições ambientais diferentes (PEOPLES et al., 2021).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Informações gerais

O experimento foi conduzido em condição de casa de vegetação. As plantas foram cultivadas entre os dias 26/02/2022 e 29/03/2022 com suplementação luminosa para que houvesse luz por 12 h todos os dias. Dentro da casa de vegetação a temperatura variou de 22,2 a 40,1°C e a umidade foi em média de 66,5%. Os dados exatos podem ser observados na Figura 1.

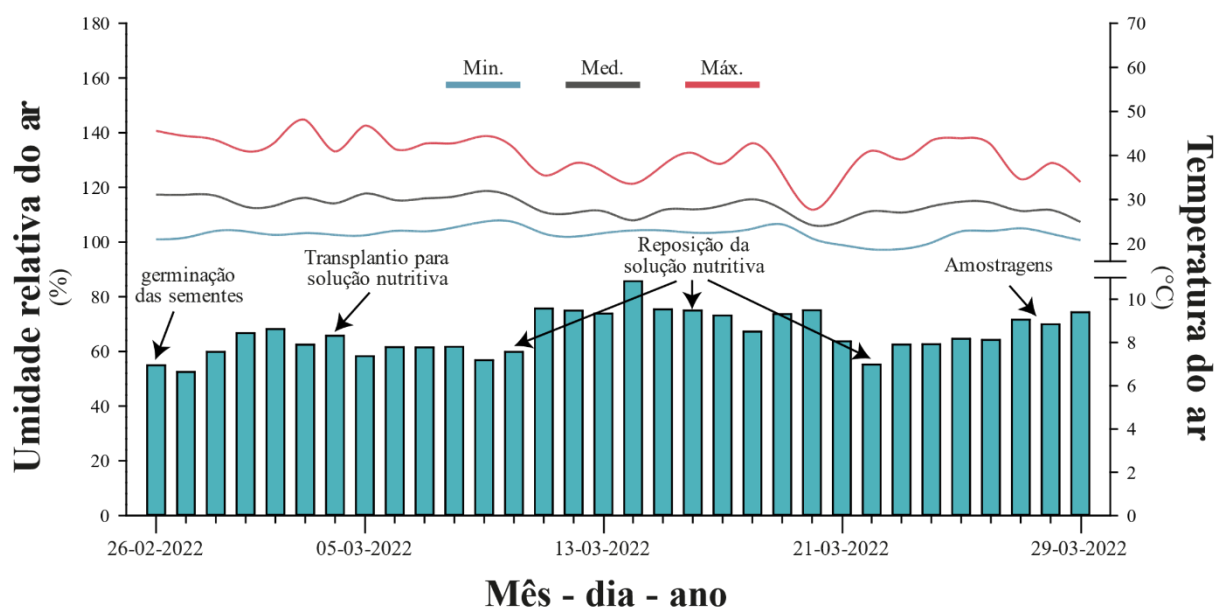


Figura 1. Registro de temperatura mínima, máxima e média e umidade relativa média da casa de vegetação ao longo do período experimental.

3.2 Desenho experimental

Foram estudadas três disponibilidades de S (0,0; 2,0 e 10,0 mmol L⁻¹ de S-SO₄) às plantas. Estas concentrações foram determinadas com base na concentração ideal de S-SO₄ sugerida por Hoaglan e Arnon (1950), de 2,0 mmol L⁻¹. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com três repetições e cada unidade experimental era representada por duas plantas.

3.3 Crescimento das plantas

As sementes do cultivar BMX Desafio (8473RSF IPRO), planta com alto potencial produtivo e frequentemente cultivada no Brasil, foram germinadas em areia lavada, umedecida com água deionizada. Vale ressaltar que na ocasião da semeadura da soja, foi aplicado 1 mL de uma solução água deionizada e inoculante comercial (1:1) a fim de promover a inoculação das sementes. O inoculante comercial utilizado no estudo era composto por *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5080) com 6×10^{12} UFC kg⁻¹.

Quando as plantas apresentaram o primeiro par de folhas unifolioladas, foi realizada a transferência para vasos contendo 5 L de solução nutritiva adaptada de Hoagland e Arnon (1950) com ausência de S e N e diluída a 1/5 da concentração usual. Além disso, foi aplicado 2 mL de inoculante para cada 1 L de solução nutritiva. As plantas permaneceram nesta solução por cinco dias com a finalidade de agravar os sintomas de carência nutricional, considerando a contribuição das reservas das sementes. Após o período de adaptação, as plantas passaram a ser cultivadas em solução nutritiva à 100% de força iônica e iniciando, portanto, os tratamentos.

A solução nutritiva utilizada foi preparada a partir da solução completa proposta por Hoagland e Arnon (1950), modificada para atender as concentrações de S estudadas e sem a presença de N. A água deionizada apresentava baixa concentração de S e N (abaixo do limite de detecção por ICP-OES) e para evitar a presença indesejada destes nutrientes, foram utilizados reagentes ultrapuros. A solução completa apresentou a seguinte composição: 1,30 mmol L⁻¹ de P; 8,31 mmol L⁻¹ de K; 4,50 mmol L⁻¹ de Ca; 2,06 mmol L⁻¹ de Mg; 50,00 µmol L⁻¹ de Cl; 50,60 µmol L⁻¹ de B; 8,59 µmol L⁻¹ de Cu; 39,03 µmol L⁻¹ de Fe; 9,95 µmol L⁻¹ de Mn; 1,13 µmol L⁻¹ de Mo; 3,35 µmol L⁻¹ de Zn; 1,72 µmol L⁻¹ de Ni; 0,17 µmol L⁻¹ de Co. As fontes utilizadas eram isentas de S ou N e os micronutrientes em sua maioria eram quelatizados por EDTA. A solução nutritiva foi constantemente aerada e o pH mantido à $6,0 \pm 0,5$. As soluções nutritivas foram trocadas de cinco em cinco dias e para cada L de solução nutritiva, foram aplicados 2 mL de inoculante.

3.4 Amostragens

As plantas foram coletadas quando os sintomas de carência nutricional se agravaram drasticamente. Este momento coincidiu com o início do florescimento das plantas (emergência das flores - R1; Fehr et al., 1971). As duas plantas de cada vaso foram coletadas e separadas em

parte aérea (caule + folhas), raiz e nódulos radiculares. Posteriormente, procedeu-se com as avaliações

3.5 Determinações

3.5.1 Produção de matéria seca e número de nódulos radiculares

As amostras de parte aérea, raízes e nódulos radiculares foram secas em estufa com circulação forçada de ar à 65°C por 72 horas e, posteriormente, pesadas para a mensuração da produção de matéria seca. Os nódulos, cuidadosamente destacados das raízes (em R1; FEHR et al., 1971) foram imediatamente contados.

3.5.2 Desenvolvimento radicular

Antes de secar o material vegetal, subamostras amostras (20% do volume radicular) foram coletadas e armazenadas em geladeira (10°C), evitando perda de matéria seca durante sua manipulação, devido à transpiração do tecido (LAVRES JUNIOR; MONTEIRO, 2003). Para o processamento, as raízes foram suavemente secadas com papel absorvente, colocadas em transparência evitando sobreposições, e digitalizadas em escala de cinza, em uma definição de 300dpi. Posteriormente, as imagens foram processadas individualmente por meio do *software* Safira[®] v. 1.1 (COSTA et al., 2014).

3.5.3 Microscopia de luz em nódulos radiculares

Os nódulos radiculares foram fragmentados ao meio e colocados em eppendorfs no fixador Karnovsky (10 mL de glutaraldeído a 25%, 10 mL de paraformaldeído a 20%, 25mL de tampão cacodilato de sódio 0,2M pH 7,2, 1 mL de cloreto de cálcio (0,1M)) (KARNOVSKY, 1965). Enquanto imersas no fixador, as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para uma melhor fixação. Em seguida, os fragmentos de nódulos foram desidratados em série etílica crescente (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) e, posteriormente, infiltradas na historesina *Tecknovit*[®] conforme descrito pelo fabricante. Os fragmentos foram imersos em solução de historesina com endurecedor para polimerização, posicionados com a base circular do corte paralela à fôrma de plástico, obtendo-se, dessa forma, um bloco de resina a ser transferido para corte em micrótomo, seguindo o protocolo de Marques e Soares (2021). Os blocos foram seccionados a 5 µm de espessura em micrótomo rotatório *Leica RM 2265*. As secções foram

montadas com água deionizada em lâminas de vidro e transferidas para uma chapa quente a 40°C para secar e promover a adesão dos cortes à lâmina de vidro. Posteriormente, as secções foram coradas com Azul de Toluidina (SAKAI, 1973), para as análises geral dos tecidos. Nessa técnica, em microscopia de luz, as estruturas celulares apresentam tons que variam do roxo ao azul esverdeado. O tom roxo-avermelhado indica compostos de natureza pécica e azul-esverdeado indica a presença de compostos fenólicos.

3.5.4 Acúmulo de C, N e S e suas relações

Em cada parte das plantas secas (parte aérea, raízes e nódulos) foram determinadas as concentrações de C e N em *Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)* – modelo HYDRA 20-20 ANCA–GLS, Sercon, Cheshire, Reino Unido), conforme Barrie et al. (1995) e S total de acordo com a metodologia adaptada de Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Foi calculado o acúmulo destes nutrientes por vaso e, posteriormente, estes valores foram relacionados entre si para obtenção da relação C/N, C/S e N/S para cada parte analisada.

3.5.5 Acúmulo de nutrientes

A concentração de P, K, Ca, Mg, Mn, B, Cu, Fe, Zn, Mo, Se e Co foi realizada para a parte aérea, raiz e nódulos radiculares, de acordo com a metodologia adaptada de Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). O acúmulo de nutrientes (mg ou µg/vaso) foi obtido multiplicando-se a concentração do elemento no tecido (órgão) pela produção de matéria seca do respectivo tecido (órgão) das plantas de soja.

3.5.6 Avaliação da fixação biológica de nitrogênio pela técnica isotópica

A composição isotópica de ^{15}N do tecido vegetal - abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) foi obtida diretamente por meio da leitura de amostras de sementes utilizadas na instalação do experimento, parte aérea, raízes e nódulos radiculares das plantas crescidas no experimento, por meio de espectrômetro de massa com interface de um analisador elementar de N acoplado (*Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)* – modelo *HYDRA 20-20 ANCA–GLS, Sercon, Cheshire, Reino Unido*), conforme Barrie et al. (1995), no Laboratório de Isótopos Estáveis, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo.

As únicas fontes de N disponíveis para plantas foram da semente e da atmosfera, pois o cultivo foi realizado em solução nutritiva isenta deste nutriente. Diante disso, foi calculado o valor 'B' da parte aérea, considerando que 50% do N da semente foi redistribuído para a parte aérea (OKITO et al., 2004). O cálculo foi realizado utilizando a seguinte expressão matemática:

$$'B_s' = \frac{(N_{TSh} \times \delta^{15}NSH) - (0.5 \times N_{TS} \times \delta^{15}NS)}{N_{TSh} - (0.5 \times N_{TS})}$$

Onde N_{TSH} e N_{TS} são o total de N acumulado na parte aérea e sementes, respectivamente. O $\delta^{15}NSH$ (‰) e $\delta^{15}NS$ (‰) são a abundância natural de $\delta^{15}N$ (‰) na parte aérea e semente, respectivamente.

A contribuição do N proveniente da atmosfera para o N total encontrado na parte aérea foi determinada pela técnica de abundância natural de $\delta^{15}N$ (‰), calculada pela equação de Shearer e Kohl (1986).

$$NDFAP_A = 100 \times (\delta^{15}N \text{ de referência} - \delta^{15}N \text{ da soja}) / (\delta^{15}N \text{ de referência} - B)$$

Onde, NDF_A é porcentagem de N obtido da FBN na parte aérea das plantas de soja; $\delta^{15}N$ (‰) de referência é abundância natural de ^{15}N na planta de referência (não fixadora de N₂ – arroz – cultivado nas mesmas condições da soja neste presente estudo); $\delta^{15}N$ (‰) da soja abundância natural de ^{15}N na parte aérea de plantas de soja; B = contribuição da fração de ^{15}N em relação ao ^{14}N pelas plantas de soja. Foi utilizado o valor B mensurado pela fórmula proposta por Okito et al. (2004) com os dados provenientes deste trabalho.

A quantidade em mg de N fixado na parte aérea das plantas por unidade experimental (vaso) foi calculada multiplicando NDF_A pelo respectivo acúmulo de N nas plantas por vaso.

3.6 Análise estatística

Os dados foram analisados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, que acusou distribuição normal. Por meio do teste de homoscedasticidade de Levene, foi verificado que esses dados também eram acompanhados de variâncias homogêneas ($W \geq 0,90$). Assim, os dados foram submetidos à análise de variância e quando constatada diferença significativa ($\alpha = 0,05$), as médias foram submetidas ao teste de Tukey à 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

Plantas de soja crescidas sob fornecimento inadequado de S (tanto pela baixa e/ou elevada disponibilidade) apresentaram menor produção de massa seca da parte aérea (Figura 2), restrições ao crescimento radicular (comprimento, superfície e volume de raízes) (Figura 3) e na produção de nódulos radiculares (Figura 4) e em sua ultraestrutura (Figura 5). Além disso, observou-se redução no acúmulo de nutrientes (C, N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mo, Zn – Figuras 5, 6, 7 e 8) e elementos benéficos (Co – Figura 7) nos tecidos das plantas. Ainda, observou-se redução no processo de fixação biológica de N, demonstrada pelos valores de abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ (Figura 10). Em suma, considerando que o S seja o único fator limitante em uma condição de crescimento de plantas de soja, conduzi-la sob uma adequada disponibilidade fará com que essa planta apresente bons retornos produtivos.

4.1. O desenvolvimento da parte aérea, raiz e nódulos radiculares de soja são severamente reduzidos em condições inadequadas de disponibilidade de S

A produção de matéria seca da parte aérea foi reduzida em 18 e 16%, respectivamente, quando as plantas cresceram em condições de omissão e na mais elevada disponibilidade de S, em relação ao tratamento com disponibilidade adequada deste nutriente (Figura 2 A). A produção de matéria seca de raízes não sofreu influência do fator de estudo ($p \geq 0,05$; média de 366,3 mg por vaso) (Figura 2 B). Contudo, a avaliação do sistema radicular, por meio de imagens (comprimento, área superficial e volume), revelou alterações morfológicas negativas nessas plantas, quando cultivadas em omissão e elevada disponibilidade de S (Figura 3). Nesse sentido, em condições de omissão de S, constatou-se redução de 19, 23 e 55%, respectivamente, no comprimento de raízes muito finas, finas, e grossas, ao passo que sob elevada disponibilidade de S, as reduções no comprimento radicular foram, respectivamente, de 37, 40 e 39% para raízes muito finas, finas e grossas, (Figura 3 A). Observou-se que plantas crescidas sob omissão deste nutriente, apresentaram redução na superfície de raízes muito finas, finas e grossas em 11, 32 e 63%, respectivamente, enquanto essa redução foi de, respectivamente, 31, 41 e 40% para raízes muito finas, finas e grossas, quando as plantas se desenvolveram em condições de elevada disponibilidade de S (Figura 3 B). Seguindo uma tendência semelhante, foi constatado que plantas que se desenvolveram sob omissão de S, apresentaram redução de 34, 33 e 61%, respectivamente, no volume de raízes muito finas, finas e grossas, por outro lado, notou-se redução no volume de raízes muito finas, finas e grossas

na ordem de 30,43 e 39%, respectivamente, em plantas crescidas em condições de elevada disponibilidade do nutriente estudado (Figura 3 B). Portanto, identificou-se restrições severas ao crescimento/desenvolvimento radicular independente da classe de diâmetro avaliada, indicando que o fornecimento inadequado de S pode prejudicar tanto as funções relacionadas à exploração de recursos (absorção de água e nutrientes), quanto àquelas relacionadas à fixação e sustentação das plantas.

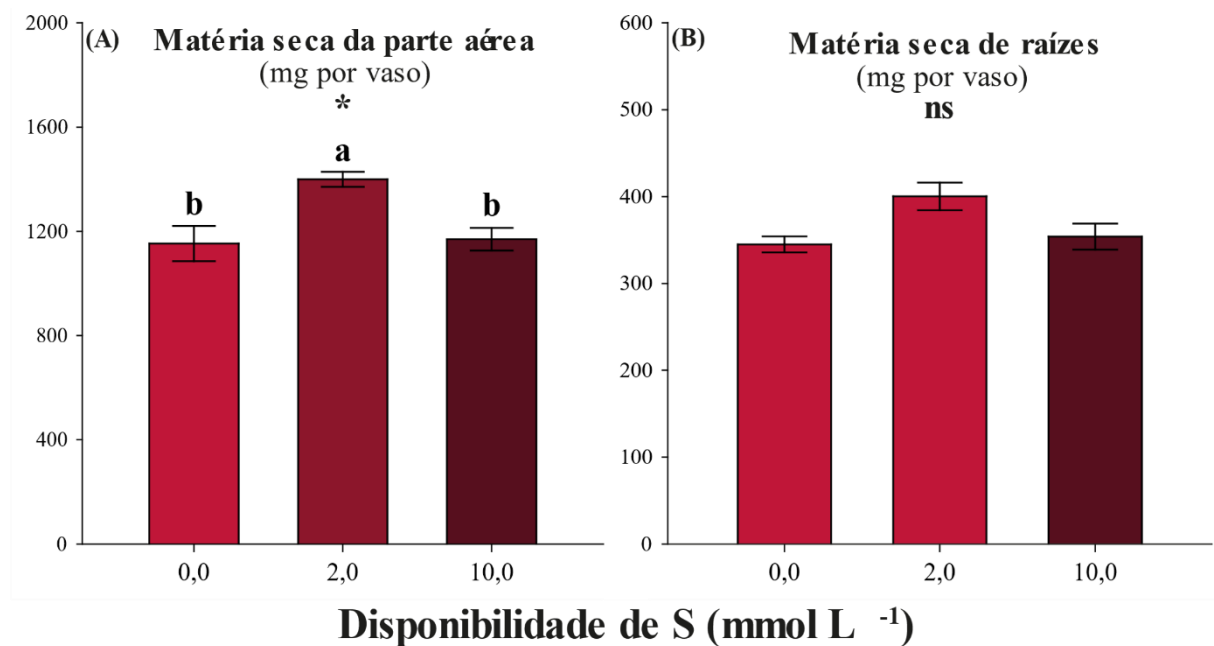


Figura 2. Produção de matéria seca da parte aérea (A) e de raízes (B) de plantas de soja (8473RSF IPRO – BMX Desafio) em função da disponibilidade de S. ns (não significativo), * (significativo à 5% de probabilidade) e ** (significativo à 1% de probabilidade). Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$). Barras de erro indicam \pm erro padrão da média, $n = 3$.

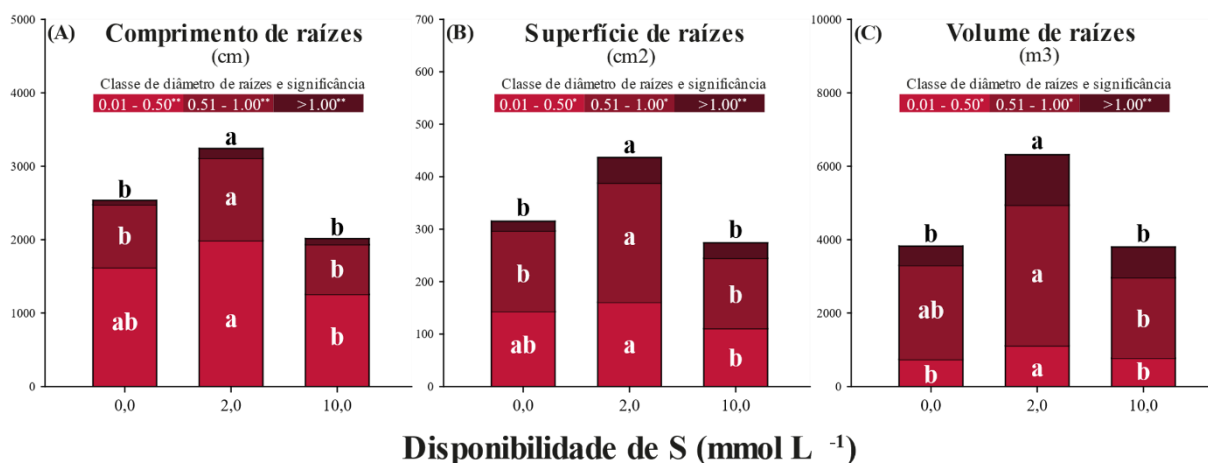


Figura 3. Comprimento (A), superfície (B) e volume (C) de raízes de soja (8473RSF IPRO – BMX Desafio) em função da disponibilidade de S para diferentes classes de diâmetro radicular. ns (não significativo), * (significativo à 5% de probabilidade) e ** (significativo à 1% de probabilidade). Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$). Barras de erro indicam \pm erro padrão da média, $n = 3$.

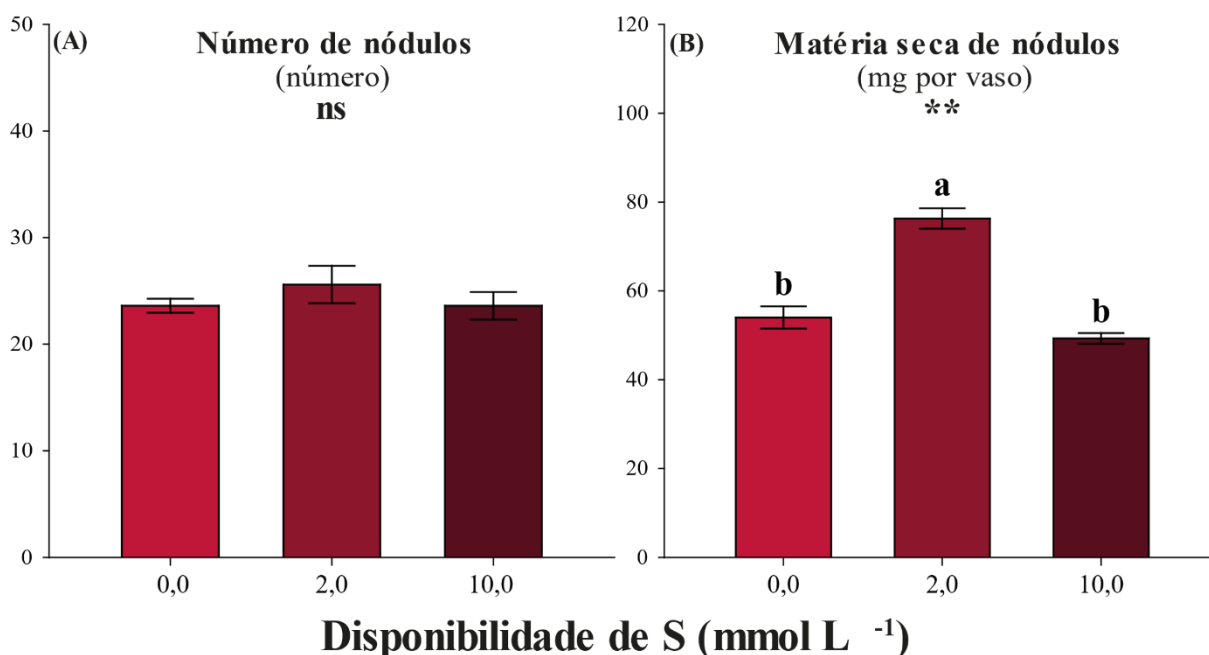


Figura 4. Número (A) e produção de matéria seca de nódulos radiculares (B) de soja (8473RSF IPRO – BMX Desafio) em função da disponibilidade de S. ns (não significativo), * (significativo à 5% de probabilidade) e ** (significativo à 1% de probabilidade). Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$). Barras de erro indicam \pm erro padrão da média, $n = 3$.

Apesar dos dados indicarem que não houve impacto do fornecimento de S no número de nódulos radiculares – com média de 24 nódulos por vaso – (Figura 4 A), plantas crescidas sob omissão e elevada disponibilidade de S apresentaram, respectivamente, redução de 29 e 35% na produção de matéria seca de nódulos radiculares (Figura 4 B). Os nódulos radiculares foram seccionados transversalmente e analisado ao microscópio de luz. As imagens das secções coradas com Azul de Toluidina revelam a presença de duas regiões distintas: a zona de infecção e a zona cortical. As células infectadas apresentam coloração mais escura (azul-arroxeadado), enquanto as células não infectadas permanecem apenas com sua parede celular corada (Figura 5 A, D, G). De acordo com o tratamento, é possível observar diferenças nos nódulos quanto ao tamanho da zona infectadas que tende a aumentar na medida em que ocorre a incremento de S (Figura 5 B, E, H). Na zona cortical nota-se que a baixa concentração de S promove alterações no arranjo do esclerênquima (células verdes no córtex) (Figura 5 C, F, I). Adicionalmente, foram realizados testes histoquímicos na região da zona de infecção coradas com Azul de Toluidina (Figura 6 A, C, E) e secções da mesma região coradas com Xylidine Ponceau (Figura 6 B, D, F). A coloração com Xylidine Ponceau destaca na cor rosas-avermelhadas componentes de natureza proteica. O grau de coloração indica maior presença de proteína em regiões mais escuras e avermelhadas nas células infectadas que tendem a ser maiores nos tratamentos com médio e alto S. Esses dados sugerem que o S exerce papel importante na formação de nódulos mais ativos e funcionais, embora essa afirmação seja suportável em conjunto com dados relacionados a própria eficiência do processo de FBN (Figura 10).

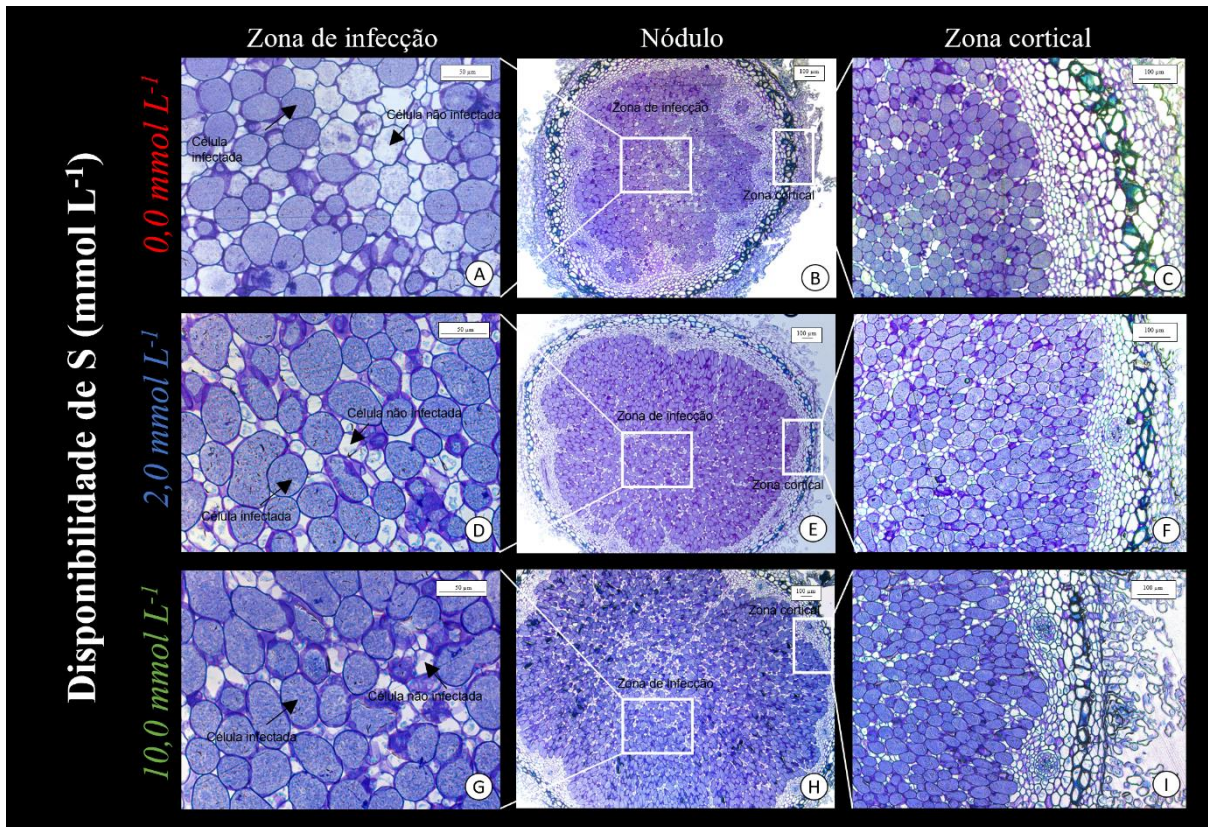


Figura 5. Nódulos de soja (8473RSF IPRO – BMX Desafio) seccionados transversalmente e corados com azul de toluidina. Visão geral do nódulo com zona de infecção e zona cortical de soja tratada com 0,0; 2,0 e 10,0 mmol L⁻¹ de S-SO₄ (B, E e H). Zona de infecção e zona cortical de nódulo de soja tratada com 0,0 mmol L⁻¹ de S-SO₄ (A e C). Zona de infecção e zona cortical de nódulo de soja tratada com 2,0 mmol L⁻¹ de S-SO₄ (D e F). Zona de infecção e zona cortical de nódulo de soja tratada com 10,0 mmol L⁻¹ de S-SO₄ (G e I).

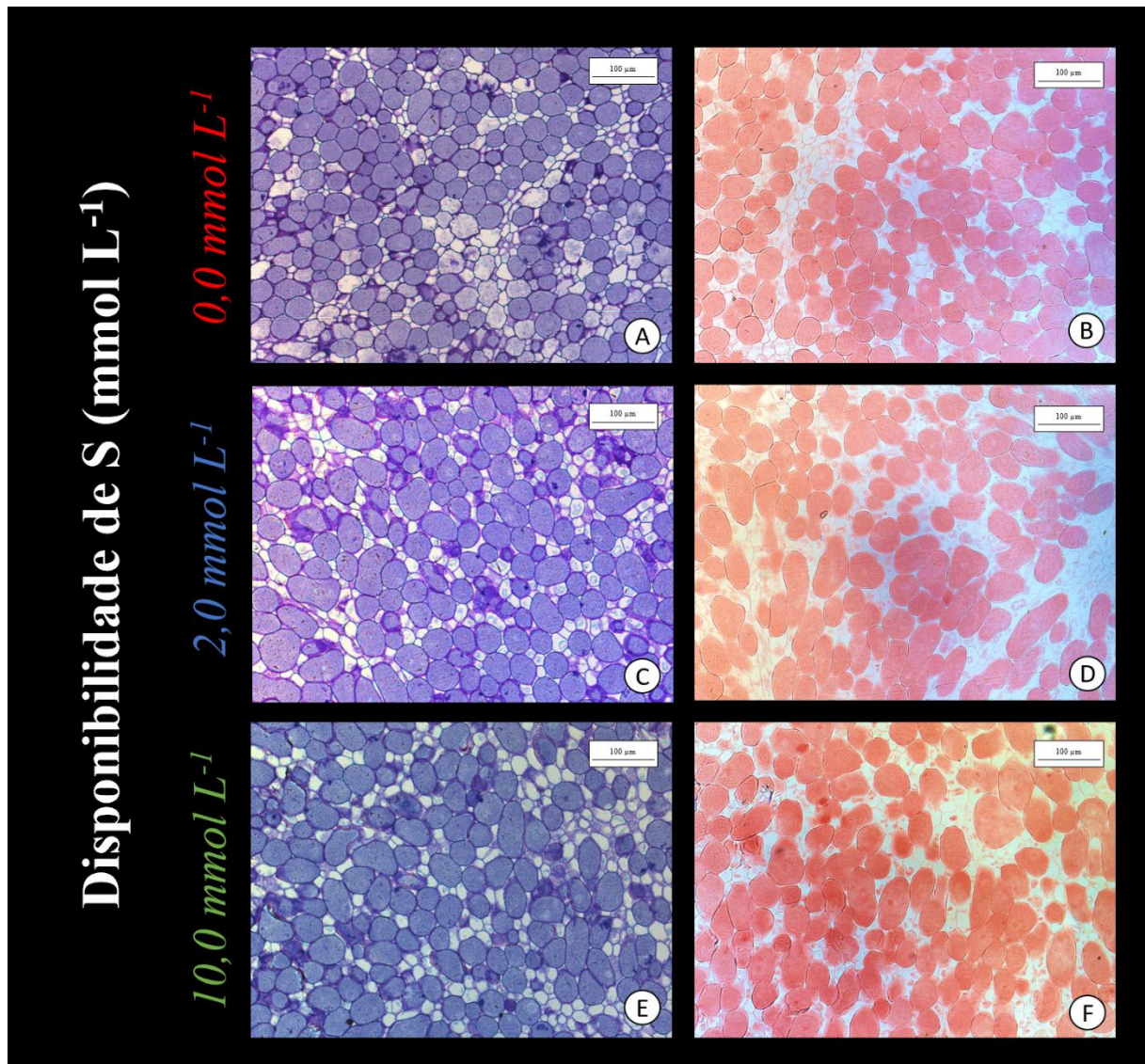


Figura 6. Nódulos de soja (8473RSF IPRO – BMX Desafio) seccionados transversalmente e corados com azul de toluidina (A, C e E) e com *Xilidine Ponceau* (B, D e F). As células infectadas em roxo no azul de toluidina reagiram positivamente para compostos proteicos com o corante *Xilidine Ponceau* e ficaram vermelhas.

4.2 Plantas que se desenvolvem em um meio desbalanceado quanto à disponibilidade de S, reduzem consideravelmente a concentração de C e N e suas relações com o S – destaque para o mecanismo de não consumo de luxo de S pela soja

A dinâmica de acúmulo de C (Figura 7 A, B e C) nas plantas foi muito semelhante à produção de matéria seca (Figuras 2 A, e B e 4 B). Quando as plantas cresceram sob omissão e elevada disponibilidade de S, observou-se redução no acúmulo de C da parte aérea em 19 e 19% (Figura 7 A), no acúmulo de C das raízes em 15 e 14% (Figura 7 B) e no acúmulo de C nos nódulos radiculares em 27 e 35%, (Figura 7 C) respectivamente. Nestas mesmas condições,

ou seja, omissão ou elevada disponibilidade de S, foi possível observar redução no acúmulo de N na parte aérea em 23 e 21% (Figura 7 D) e nos nódulos radiculares em 32 e 38% (Figura 7 F), respectivamente. Efeitos da disponibilidade de S no acúmulo de N nas raízes não foram observados. Analisando as concentrações de S na planta, é possível notar que as plantas que receberam menos S foram as que acumularam menos deste nutriente independente da parte da planta analisada (Figura 7 G, H e I). Todavia, o que chama atenção é que plantas que se desenvolveram sob adequada e elevada disponibilidade de S, exibiram acúmulo de S, na parte aérea e nas raízes, muito semelhante (Figura 7 G e H). Assim, supõe-se que plantas de soja apresentam um mecanismo contra o consumo de luxo deste elemento, dado que mesmo crescendo sob elevada disponibilidade de S, o acúmulo deste nutriente é semelhante àquele observado quando as plantas crescem em condições consideradas adequadas de disponibilidade de S ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SO_4) (Figura 7 G e H). Em contrapartida, nos nódulos radiculares, é possível observar que a omissão de S reduz a seu acúmulo nestes tecidos em 33%, enquanto sob condições de elevada disponibilidade essa redução é de 21% (Figura 7 I).

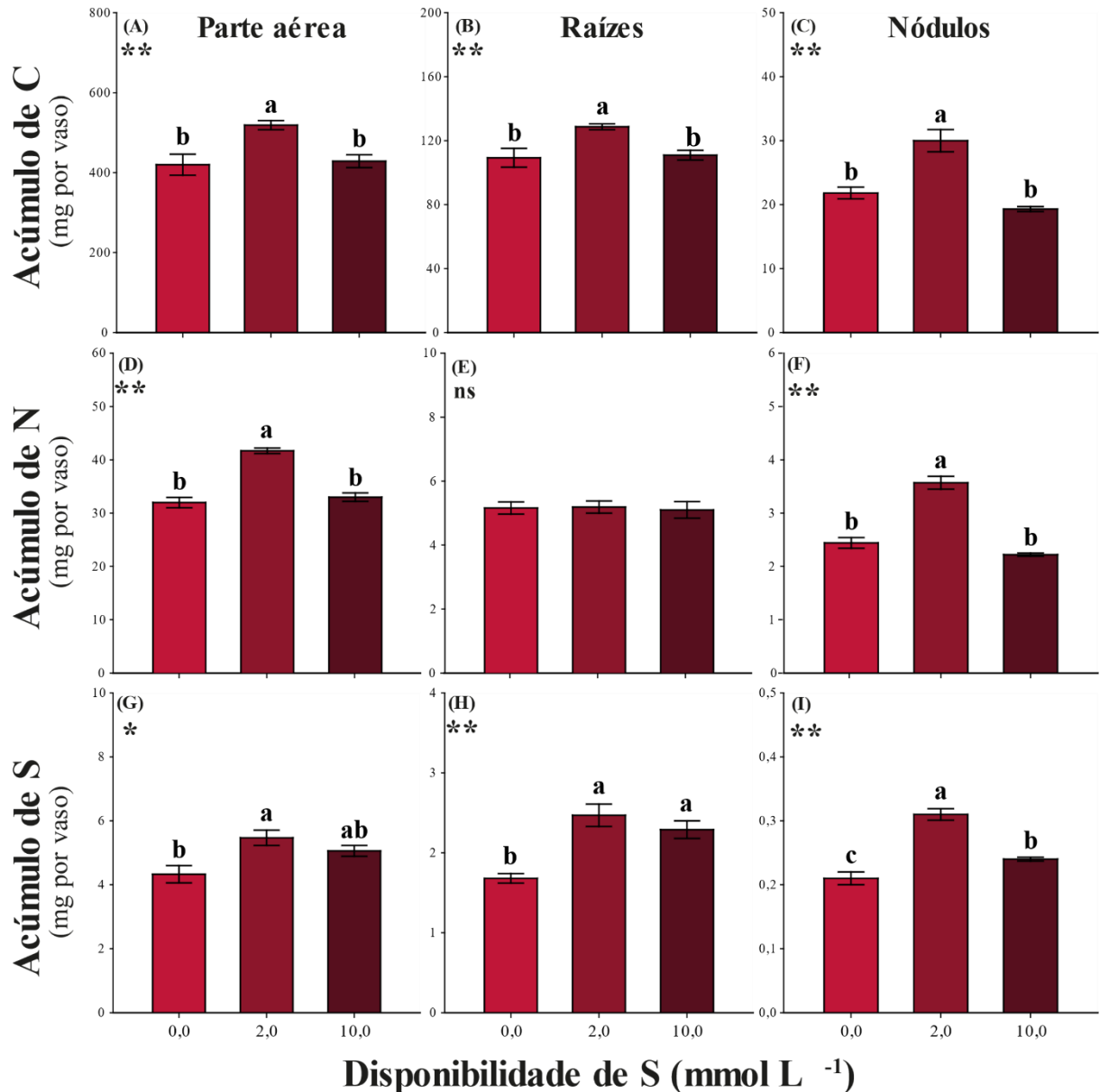


Figura 7. Acúmulo de C (A, B e C), N (D, E e F) e S (G, H e I) na parte aérea, raízes e nódulos radiculares de plantas de soja (8473RSF IPRO – BMX Desafio) em função da disponibilidade de S. ns (não significativo), * (significativo à 5% de probabilidade) e ** (significativo à 1% de probabilidade). Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$). Barras de erro indicam \pm erro padrão da média, $n = 3$.

Observa-se claramente redução linear na C/S à medida que as plantas crescem em condições de elevada concentração de S, isto para a parte aérea (Figura 8 A), raiz (Figura 8 B) e nódulos radiculares (Figura 8 C). Para a relação N/S, nota-se que na parte aérea, há diminuição significativa desta relação quando as plantas crescem em alta concentração de S (Figura 8 D), ao passo que esta relação na raiz é maior quanto menor o fornecimento de S (Figura 8 E).

Nos nódulos radiculares, verifica-se uma queda linear na relação N/S à medida que se aumenta o fornecimento de S às plantas (Figura 8 F).

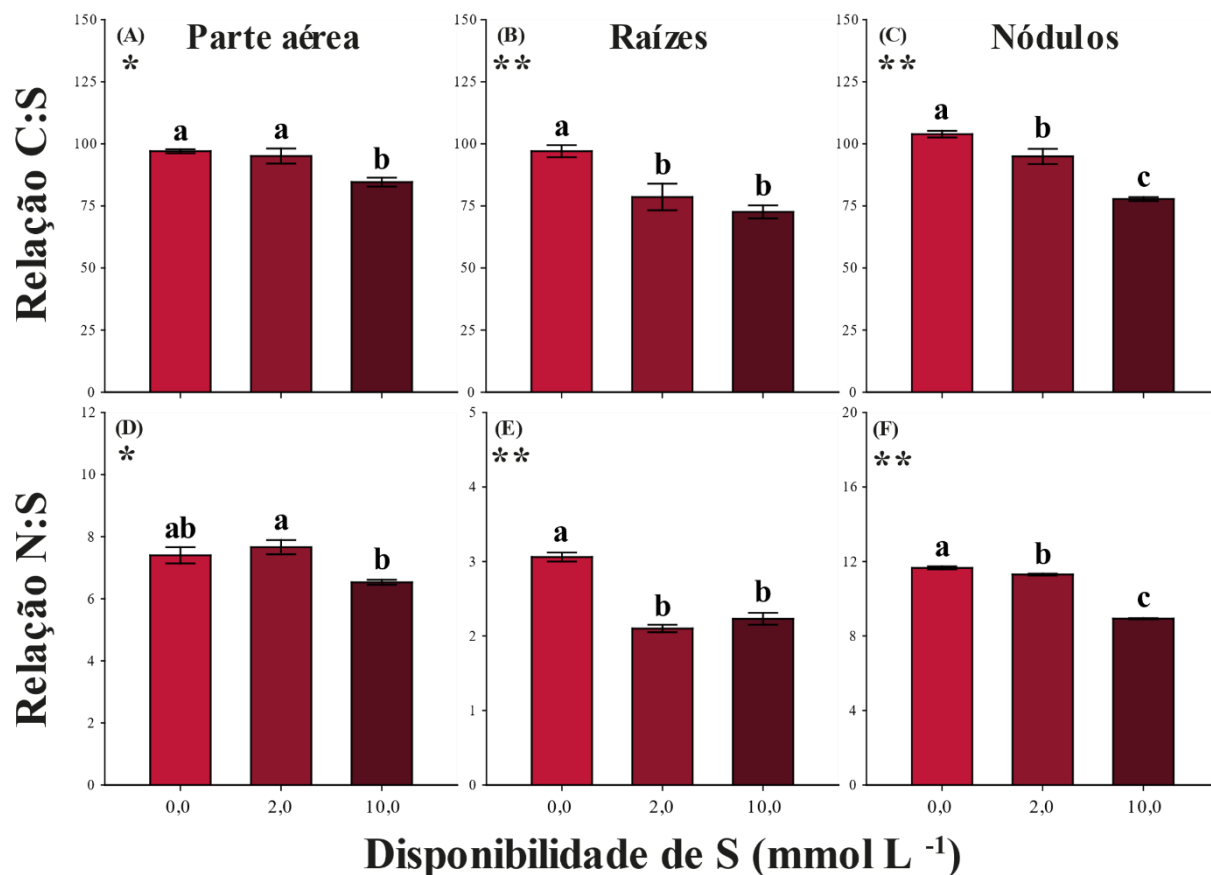


Figura 8. Relação C/S (A, B e C) e N/S (D, E e F) na parte aérea, raízes e nódulos radiculares em plantas de soja (8473RSF IPRO – BMX Desafio) em função da disponibilidade de S. ns (não significativo), * (significativo à 5% de probabilidade) e ** (significativo à 1% de probabilidade). Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$). Barras de erro indicam \pm erro padrão da média, $n = 3$.

4.3 Plantas que se desenvolvem em um meio desbalanceado quanto à disponibilidade de S apresentam alterações negativas na abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ nos tecidos, no valor B, na percentagem de N proveniente da atmosfera e N-fixado na parte aérea

Plantas que se desenvolveram sob omissão de S apresentaram abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ na parte aérea muito próximo de zero (-0,097‰), ao passo que quando fornecido 2,0 e 10,0 mmol L⁻¹ S-SO₄ este valor foi de -0,9324 e -0,6716‰, respectivamente (Figura 9 A). Na raiz, a tendência se inverte, sendo observado maior abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ quando as

plantas cresceram sob omissão de S (1,4330‰), e menor abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$, 0,2416 e 0,6107‰, respectivamente, quando as plantas cresceram sob 2,0 e 10,0 mmol L^{-1} S-SO₄ (Figura 9 B). Não se observou efeito da disponibilidade de S na abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ nos nódulos radiculares, sendo encontrado um valor médio de 6,6888‰ (Figura 9 C).

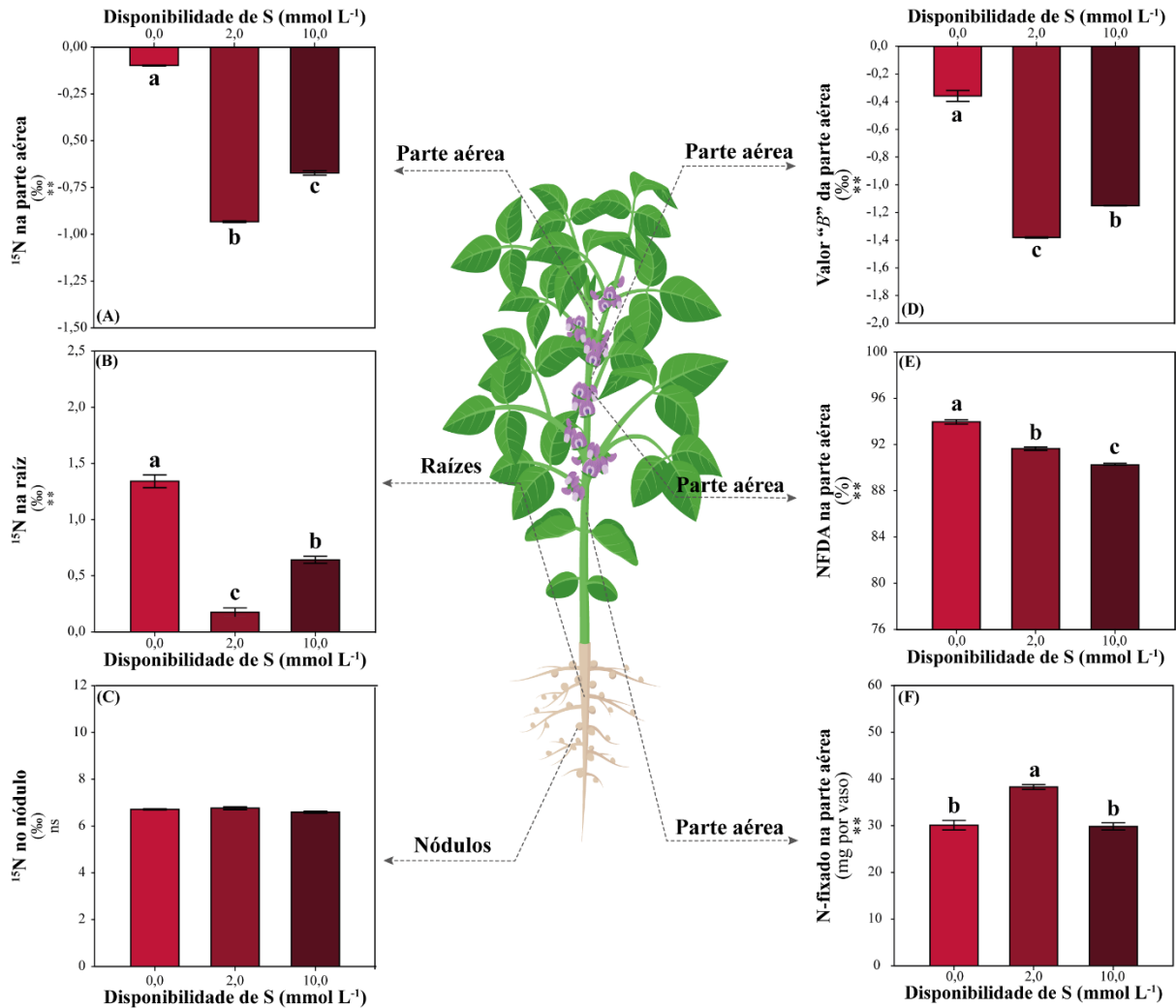


Figura 9. Abundância natural de ^{15}N na parte aérea (A), raiz (B) e nódulos radiculares (C), valor "B" da parte aérea (D), porcentagem de N proveniente da atmosfera (E) e quantidade de N atmosférico fixado na parte aérea (F), em função do fornecimento de S às plantas de soja (8473RSF IPRO – BMX Desafio). ns (não significativo), * (significativo à 5% de probabilidade) e ** (significativo à 1% de probabilidade). Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$). Barras de erro indicam \pm erro padrão da média, $n = 3$.

Pelo fato de as plantas terem crescido em condições livre de N (N proveniente apenas da semente e da atmosfera), foi possível calcular o valor "B" da parte aérea, que foi altamente influenciado pela disponibilidade de S às plantas. Quando a soja cresceu sob omissão de S,

o valor B da parte aérea foi de -0,3582% (muito próximo de zero) (Figura 9 D). Entretanto, ao se fornecer 2,0 e 10,0 mmol L⁻¹ de S-SO₄, este valor fica mais negativo, -1,3258 e -1,1691%, respectivamente (Figura 9 D). Assim, nota-se que fatores nutricionais podem interferir significativamente no valor “B” da parte aérea, parâmetro muito utilizado para estudos de quantificação da FBN em condições de campo.

Ao se calcular a porcentagem de N proveniente da atmosfera, observamos uma redução linear nestes valores à medida que se aumenta a disponibilidade de S às plantas (Figura 9 E). Plantas crescidas sob omissão de S exibiram 94% do N proveniente da atmosfera, ao passo que plantas que receberam 2,0 e 10,0 mmol L⁻¹ de S-SO₄, exibiram, respectivamente, 92 e 90% do N proveniente da atmosfera (Figura 9 E). Visualmente, foi possível observar cotilédones mais persistentes nas plantas que se desenvolveram na presença de S na solução nutritiva (dados não apresentados). Isso pode colaborar com menor quantidade de N proveniente da atmosfera, dado que nestas condições a planta pode extrair mais da reserva dos cotilédones. A quantidade de N fixada na parte aérea (em mg por vaso) foi 21 e 22% menor quando as plantas cresceram sob omissão e excesso de S, respectivamente, em relação ao tratamento considerado como adequado (2,0 mmol L⁻¹ de S-SO₄).

4.4 O desbalanço nutricional de S interfere de forma distinta na dinâmica de acúmulo de nutrientes nas plantas de soja, especialmente nos nódulos radiculares

Foi possível observar redução no acúmulo de P em 21 e 12% (Figura 10 A) e de Ca em 20 e 24% (Figura 10 G), respectivamente, quando as plantas se desenvolveram sob omissão e elevada disponibilidade de S, enquanto K e Mg não sofreram influência do fator de estudo (Figura 10 D, J). A disponibilidade de S não impactou o acúmulo de macronutrientes nas raízes das plantas de soja (Figura 10 B, E, H e K), embora tenha promovido mudanças significativas no acúmulo de nutrientes nos tecidos dos nódulos radiculares. Notou-se redução no acúmulo de P em 26 e 32% (Figura 10 C), no acúmulo de K em 31 e 33% (Figura 10 F), no acúmulo de Ca em 20 e 29% (Figura 10 I) e no acúmulo de Mg em 25 e 34% (Figura 10 L), quando as plantas se desenvolveram sob omissão e elevada oferta de S às plantas, respectivamente.

O acúmulo de micronutrientes também foi modulada pela disponibilidade de S às plantas. Constatou-se redução no acúmulo de Fe em 32 e 47% (Figura 11 A), no acúmulo de Zn em 3 e 26% (Figura 11 D) e no acúmulo de B em 19 e 16% (Figura 11 J), quando as plantas cresceram em condições de omissão e elevada disponibilidade de S, respectivamente. O acúmulo de Cu na parte aérea não sofreu influência dos tratamentos (Figura 11 G). Nas raízes,

foi possível observar que a omissão e a elevada disponibilidade de S, respectivamente, reduziram o acúmulo de Cu em 17 e 29% (Figura 11 H) e de B em 26 e 10% (Figura 10 K), ao passo que o acúmulo de Fe e Zn não foram influenciados pelos tratamentos (Figura 10 B e E). Verificou-se redução significativa no acúmulo de Fe em 16 e 25% (Figura 10 C), no acúmulo de Zn em 10 e 26% (Figura 10 F), no acúmulo de Cu em 21 e 28% (Figura 10 I) e de B em 10 e 24% (Figura 10 L), quando as plantas cresceram sob omissão e elevada disponibilidade de S, respectivamente. O acúmulo do micronutriente Mn e do elemento benéfico Se não foram influenciados pela disponibilidade de S-SO₄, independentemente da parte da planta analisada.

Quando as plantas se desenvolveram sob omissão de S, foi possível observar redução do acúmulo de Mo nos nódulos radiculares na ordem de 10%, ao passo que essa redução chegou à 40% quando as plantas cresceram em condições de elevada disponibilidade deste nutriente (Figura 11 A). Por outro lado, incremento no acúmulo de Co nos nódulos foi observada com o aumento das concentrações de S-SO₄ na solução nutritiva (Figura 11 B). Além disso, uma imagem realizada com auxílio de lupa de bancada permitiu a detecção na diferença na coloração de nódulos frescos (nódulos que acumularam mais Co apresentavam coloração mais intensa – Figura 11 B), apesar disto não se refletir em maior FBN.

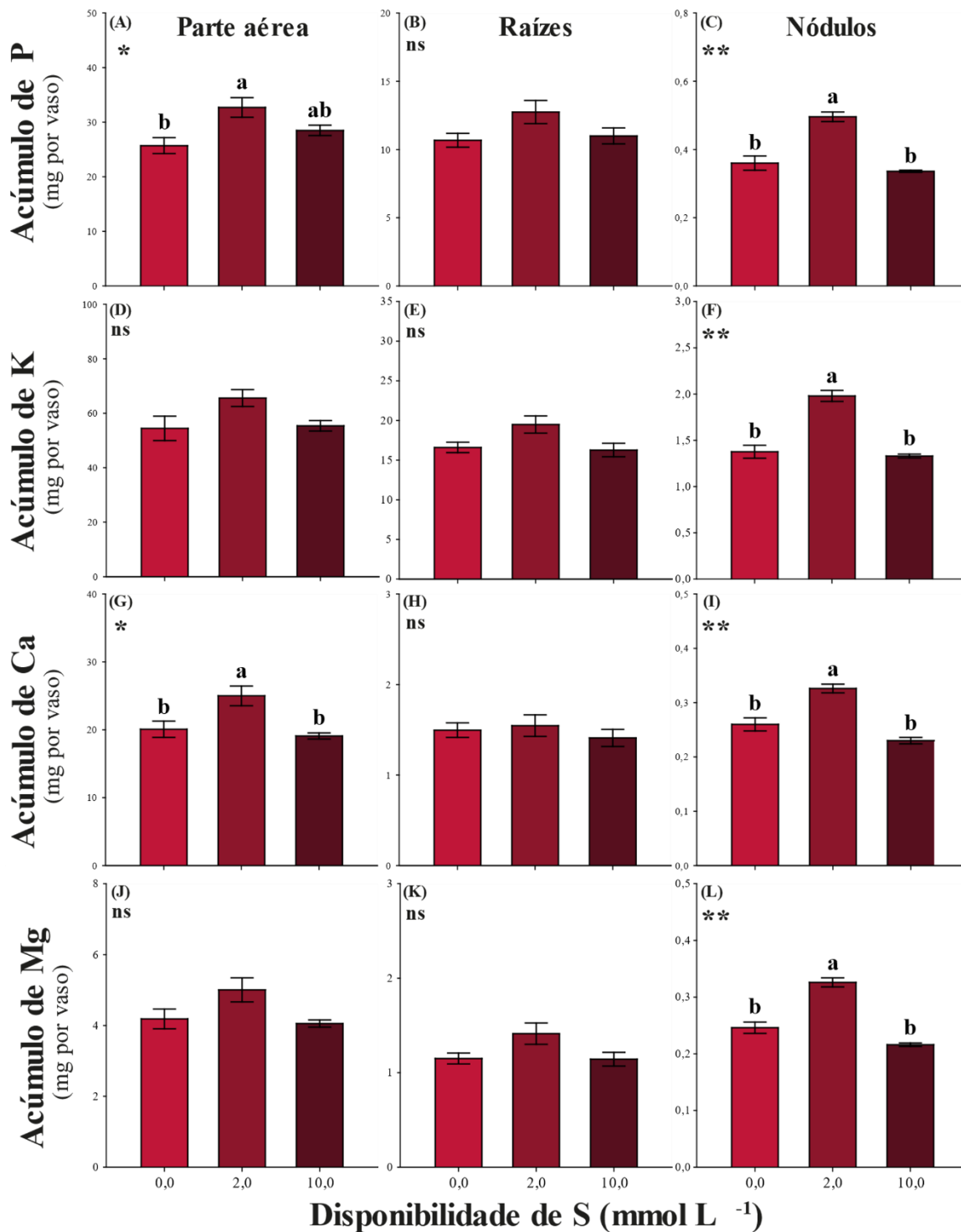


Figura 9. Acúmulos de P (A, B e C), K (D, E e F), Ca (G, H e I) e Mg (K, K e L) na parte aérea, raízes e nódulos radiculares em função da disponibilidade de S plantas de soja (8473RSF IPRO – BMX Desafio). ns (não significativo), * (significativo à 5% de probabilidade) e ** (significativo à 1% de probabilidade). Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$). Barras de erro indicam \pm erro padrão da média, $n = 3$.

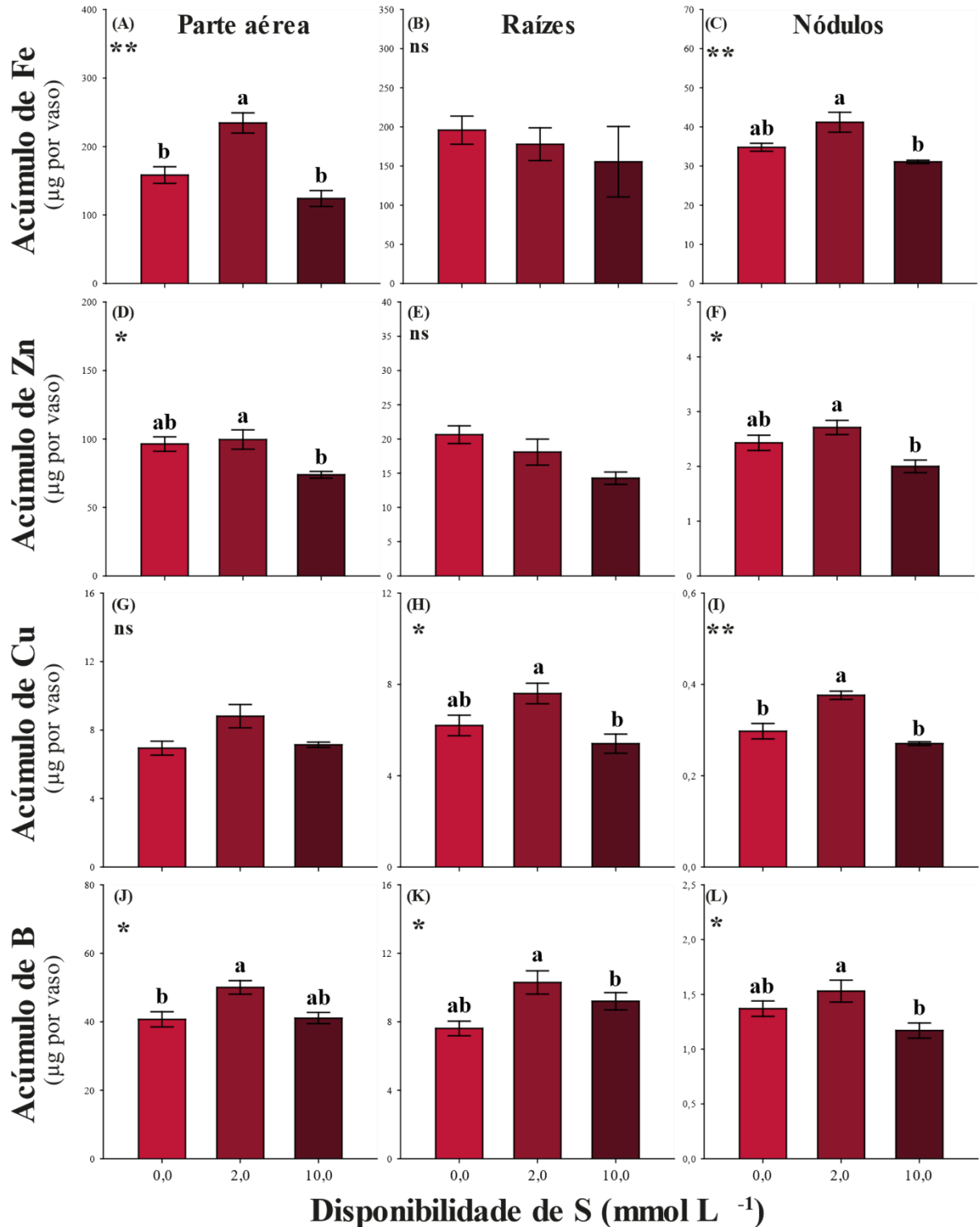


Figura 10. Acúmulos de Fe (A, B e C), Zn (D, E e F), Cu (G, H e I) e B (K, K e L) na parte aérea, raízes e nódulos radiculares em função da disponibilidade de S plantas de soja (8473RSF IPRO – BMX Desafio). ns (não significativo), * (significativo à 5% de probabilidade) e ** (significativo à 1% de probabilidade). Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$). Barras de erro indicam \pm erro padrão da média, $n = 3$.

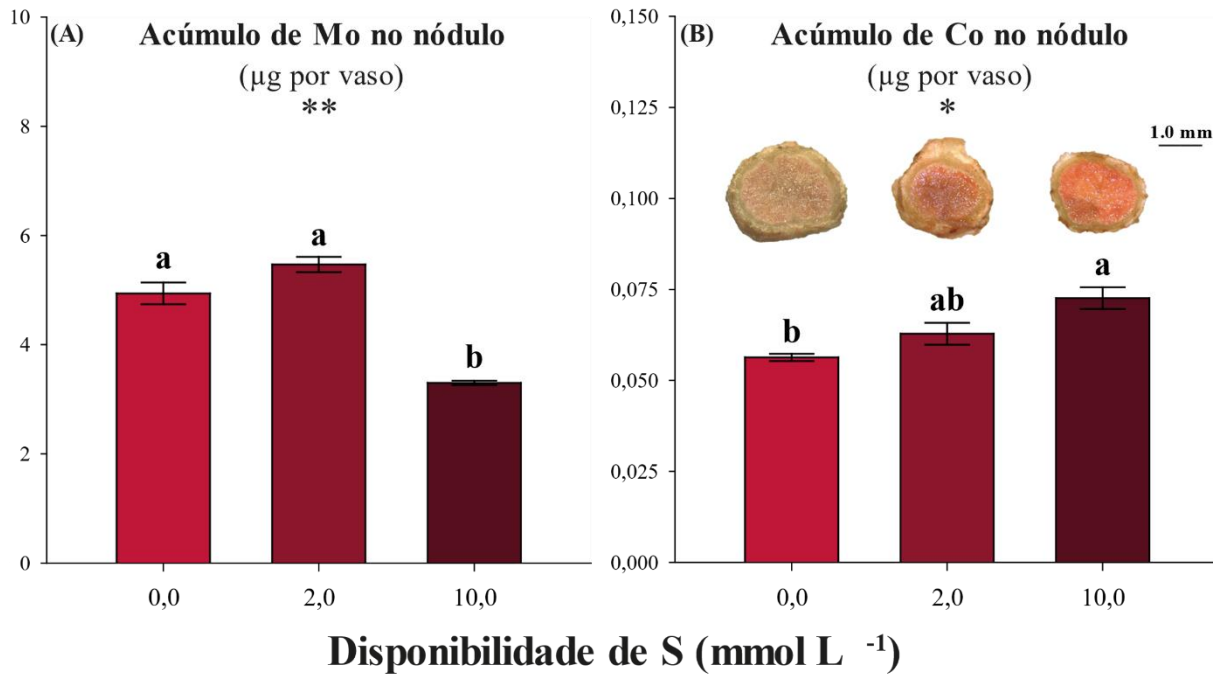


Figura 11. Acúmulos de Mo (A) e Co (B) nos nódulos radiculares em função da disponibilidade de S às plantas de soja (8473RSF IPRO – BMX Desafio). ns (não significativo), * (significativo à 5% de probabilidade) e ** (significativo à 1% de probabilidade). Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$). Barras de erro indicam \pm erro padrão da média, $n = 3$.

5. DISCUSSÃO

O potencial de produção de grãos de soja vem crescendo cada vez mais, porém, a disponibilidade adequada de nutrientes ainda é um fator chave para que se alcance resultados satisfatórios e maior eficiência do processo de fixação biológica de N (FBN). Por mais que o N-fixado atenda majoritariamente a demanda de N da soja, essa contribuição pode não ser suficiente para sustentar novos tetos produtivos. O S é estreitamente relacionado ao processo de FBN, mas informações continuam restritas sobre como a disponibilidade deste nutriente, de forma isolada, pode impactar o desenvolvimento/produzividade e a própria eficiência da FBN de plantas de soja, e, portanto, constitui-se como uma questão plausível de investigação.

Vários fatores podem afetar a morfologia, arquitetura e desempenho dos sistemas radiculares em plantas cultivadas sem solo (BALLIU et al., 2021), dentre eles a disponibilidade de nutrientes. Estudos relatam maior crescimento da raiz primária e emissão de raízes laterais em plantas crescidas sob deficiência S (DONG; WANG; TAKAHASHI, 2019; JOSH et al., 2019; KUTZ et al., 2002; NIKIFOROVA et al., 2003). Geralmente os mecanismos que elucidam esse processo indicam uma cascata de sinalização desencadeada inicialmente pela formação reduzida de cisteína (primeiro composto formado na assimilação deste nutriente), seguida de aumento dos níveis de triptofano, e, conseqüentemente, aumento do pool de auxina, que levaria ao maior desenvolvimento radicular e emissão de raízes laterais (HOEFGEN; NIKIFOROVA, 2008). Contudo, esse processo é limitado a privações iniciais de S.

Aqui, demonstramos que uma privação prolongada (do início dos processos de germinação até o início do florescimento das plantas de soja) de S leva a restrições no desenvolvimento do sistema radicular (comprimento, área superficial e volume de raízes). Sabe-se que altos níveis de auxina (inicial) desencadeiam alterações nos níveis de Ca citosólico, atenuando a expressão de genes relacionados à produção deste hormônio (ROGG; LASSWELL; BARTEL, 2001). Nesse sentido, o crescimento radicular de plantas que se desenvolvem em baixa disponibilidade de S é paralisado e a planta passa a economizar recursos a fim de ter uma reprodução rápida de sementes viáveis (HOEFGEN; NIKIFOROVA, 2008), como observado no presente estudo que plantas sob omissão de S floresceram antes daquelas que receberam S (dados não apresentados). Isso vai de acordo com os resultados deste estudo, que indicam que, apesar da melhoria da arquitetura das raízes sob fornecimento de adequado de S, o benefício sobre o crescimento da parte aérea foi mais significativo.

Geralmente isto ocorre de forma similar com o incremento no fornecimento de N (LIU; VON WIRÉN, 2022), e sugere maior investimento do total de fotoassimilados na parte aérea, mesmo que haja melhorias no crescimento da planta por inteiro (LI; GAO; YANG, 2020; WANG et al., 2003).

É bem documentado que plantas que se desenvolvem sob deficiência de S apresentam grande redução no conteúdo de lipídeos, S-adenosil-metionina (SAM) e clorofila (HOEFGEN; NIKIFOROVA, 2008). Esses fatores limitam a assimilação de energia da planta, e geralmente são refletidos em produção reduzida de massa seca da parte aérea. Todavia, uma questão que permanece sob especulação é como o excesso de S pode afetar o desenvolvimento das plantas e da FBN. Apesar de alguns relatos exibirem que as plantas são minimamente afetadas pelo excesso de S (MENGEL et al., 2001), nesse presente estudo, o efeito do fornecimento excessivo foi tão prejudicial quanto à deficiência. As significativas reduções de desenvolvimento da parte aérea e do desenvolvimento morfológico das raízes (comprimento, superfície e volume) podem estar relacionadas à baixa aquisição de nutrientes intrínsecos ao desenvolvimento das plantas, conforme observou-se neste trabalho. Observou-se redução clara no acúmulo de nutrientes estruturais como N, Ca, Mg, S, B, Cu, o que pode comprometer estruturalmente o desenvolvimento da planta (MALAVOLTA, 2006). Além disso, a redução na FBN foi atrelada, à redução no desenvolvimento dos nódulos (observado pelo seu peso seco e microscopia de luz), bem como pela abundância natural de ^{15}N . Nosso trabalho exhibe claramente efeitos negativos do excesso de S no desenvolvimento de plantas de soja e da FBN, o que deve ser mais bem explorado em níveis fisiológicos/bioquímicos e moleculares, posteriormente.

O emprego da microscopia de luz revelou que apesar do número de nódulos por planta não ter sido influenciado pela disponibilidade de S, houve mudanças estruturais acompanhados de aumento do peso seco de nódulos. Visualmente, nódulos que se desenvolveram sob baixa disponibilidade de S apresentavam forte redução do número de células infectadas. De fato, observações anteriores foram eficientes em estabelecer conexões entre a nutrição adequada de S e nodulação, visto que que *NodRm-1* (um gene fundamental na formação dessas estruturas em alfafa) era totalmente dependente do grupo sulfato para manter a atividade morfogênica em níveis adequados (TRUCHET et al., 1991).

O fornecimento inadequado de S provoca desordens nutricionais com influência na aquisição e acúmulo de nutrientes (ASTOLFI et al., 2018; DIVITO et al., 2016; PAGANI et al., 2012). Por exemplo, o ritmo de crescimento e a concentração de nutrientes no tecido

vegetal – *e.g.*, a marcha de absorção de nutrientes - são afetadas de forma semelhante para deficiências de P, K e S (DIVITO; SADRAS, 2014). Os resultados desta pesquisa suportam essa afirmação especialmente para os nódulos radiculares, em que o suprimento adequado de S favoreceu maior acumulação de nutrientes (C, N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mo, Zn) e elemento benéfico (Co).

Forte correlação entre fornecimento de S, o conteúdo de leghemoglobina e a atividade da nitrogenase nos nódulos foram reportados (VARIN et al., 2010). Contudo, a suficiência de outros nutrientes não-S é necessária para aumento da eficiência da FBN – ou seja, a aplicação da Lei de Sprengel e Liebig. Em estudo com abordagem de meta-análise, que compilou outros 124 estudos, foi demonstrado claramente que há maior sensibilidade de resposta ao suprimento de S nos nódulos em relação à outras partes da planta, especialmente por efeitos diretos dos nutrientes em processos fisiológicos e metabólitos dessas estruturas (DIVITO; SADRAS, 2014). De fato, P e Mg são requisitados para atender às exigências de ATP da nitrogenase, biossíntese de membrana e transdução de sinal; Ca e B possuem participação ativa na formação e estrutura dos nódulos; Fe e Mo são constituintes das subunidades da nitrogenase; e ainda Co, (elemento benéfico) fundamental para manter níveis adequados de leghemoglobina no nódulo (JAYAKUMAR et al., 2008; KERMAH et al., 2018; PACYNA, 2005; RIBET; DREVON, 1995; YAMAGISHI; YAMAMOTO, 1994; VARIN et al., 2010).

Além do impacto direto do S no metabolismo de C e N, a estequiometria entre esses nutrientes fornece amplo conhecimento para a homeostase desses elementos nas plantas no pós-estresse (UMAIR et al., 2020; FRATTE et al., 2021). Plantas bem nutridas em S apresentaram maior acúmulo de N e S, enquanto em condições inadequadas (omissão e excesso) de fornecimento de S foi observada menor acumulação destes nutrientes. Mudanças na homeostase entre N:S parece ter forte relação com as alterações no tetraidrofolato (cofator ligado ao processo de fotossíntese), biossíntese de metionina e desequilíbrio de N (HOEFGEN; NIKIFOROVA, 2008), seguidas de desproporcionalidade da relação C/N na planta (maior lignificação).

Os dados deste estudo ainda fornecem indícios que as desordens nutricionais causadas por excesso ou deficiência de S afetam negativamente a própria eficiência da FBN. Para obter boas estimativas, utilizamos da técnica da abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$ ‰) para a quantificação do N proveniente da fixação biológica do N atmosférico e foi calculado o valor “B” individual para o experimento desenvolvido neste projeto (considerando-se o N da semente, indicado para leguminosas que possuem sementes de maior tamanho) e extinguindo

o erro associado à escolha de espécies referências (NEBIYU et al., 2014; CHALK; CRASWELL, 2018). Mesmo assim, os valores de $\delta^{15}\text{N}\%$ não estabeleceram um padrão claro de respostas quando em conjuntos com a própria quantificação do N-fixado no tecido das diferentes partes da planta, o que merece mais atenção em estudos futuros. Em concordância com relatos anteriores (SANTACHIARA; SALVAGIOTTI; ROTUNDO, 2019), um padrão de respostas nesse estudo sugere que ao estabelecer níveis comparativos (deficiente, adequado e excessivo), o tempo de exposição a essas condições sejam mais críticas do que a própria magnitude do estresse sofrido para as respostas do fornecimento de S nas variáveis avaliadas.

6. CONCLUSÃO

As plantas cultivadas em condições de ausência de S apresentaram uma redução severa no desenvolvimento da parte aérea, bem como no comprimento, superfície e volume radicular, e apresentaram menor acúmulo de nutrientes (C, N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mo, Zn) e do elemento benéfico (Co) em seus tecidos. Adicionalmente, foi observado que os nódulos radiculares dessas plantas apresentaram um menor número de células infectadas, impactando negativamente a fixação biológica de nitrogênio foi afetada negativamente. Contudo, o excesso de S apresenta-se tão prejudicial quanto à deficiência, apresentando nódulos radiculares semelhantes em termos de ultraestrutura, porém menos eficientes em termos da quantidade de N₂ fixado biologicamente. Portanto, O desequilíbrio da nutrição em S, seja pela deficiência quanto pelo excesso, reduz inúmeros processos bioquímicos e nutricionais, com impacto negativo no metabolismo de nitrogênio pelas plantas de soja. Assim, a disponibilidade adequada de S às plantas de soja promove adequado metabolismo vegetal, influenciando significativamente o crescimento das plantas.

REFERÊNCIAS

ABIDO, W. A. E. Impact of phosphorus and sulfur fertilizers levels on soybean productivity impact of phosphorus and sulfur fertilizers levels on soybean productivity. **Journal of Plant Production**, v. 9, n. 12, p. 1223-1230, 2018.

ARAUJO, K. E. C. et al. Natural abundance of ^{15}N of N derived from the atmosphere by different strains of *Bradyrhizobium* in symbiosis with soybean plants. **Ciência Rural**, v. 49, p. 1-6, 2019.

ARAUJO, K. E. et al. Changes in ^{15}N natural abundance of biologically fixed N_2 in soybean due to shading, rhizobium strain and plant growth stage. **Plant and Soil**, v. 426, p. 413-428, 2018.

ASTOLFI, S. et al. Does Fe accumulation in durum wheat seeds benefit from improved whole-plant sulfur nutrition?. **Journal of Cereal Science**, v. 83, p. 74-82, 2018.

BALBOA, G. R.; SADRAS, V. O.; CIAMPITTI, A. Shifts in soybean yield, nutrient, uptake, and nutrient stoichiometry: a historical synthesis analysis. **Crop Science**, v. 58, p. 43-54, 2018.

BALL, L. et al. Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 16, p. 2448–2462, 2004.

BALLIU, A. et al. Environmental and cultivation factors affect the morphology, architecture and performance of root systems in soilless grown plants. **Horticulturae**, v. 7, n. 8, art. 243, 2021.

BARBERON, M. et al. Unequal functional redundancy between the two *Arabidopsis thaliana* high-affinity sulphate transporters SULTR1;1 and SULTR1;2. **New Phytologist**, v. 180, n. 3, p. 608-619, 2008.

BARCZAK, B.; BARCZAK, T. Sulphur as a factor influencing the content of nitrogen compounds in seeds of narrow-leafed lupin. **Journal of Elementology**, v. 26, n. 1, p. 137-147, 2021.

BARRIE, A. et al. High productivity analysis of ^{15}N and ^{13}C in soil/plant research. **Fertilizer Research**, v. 42, n. 1–3, p. 43 59, 1995.

BLOEN, E. et al. Sulphur supply and infection with *Pyrenopeziza brassicae* influence L-cysteine desulphydrase activity in *Brassica napus* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 406, p. 2305-2312, 2004.

BOSSE, M. A. et al. Physiological impact of flavonoids on nodulation and ureide metabolism in legume plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 166, p. 512-521, 2021.

BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J. (ed.). **Plant nutritional genomics**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2015.

CAVE-RADET, A. et al. Do specialized cells play a major role in organic xenobiotic detoxification in higher plants? **Frontiers in Plant Science**, v. 11, art. 1037, 2020.

CAZZATO, E. et al. Influence of sulphur application on protein quality, fatty acid composition and nitrogen fixation of white lupin (*Lupinus albus* L.). **European Food Research and Technology**, v. 235, p. 963-969, 2012a.

CAZZATO, E. et al. Quality, yield and nitrogen fixation of faba bean seeds as affected by sulphur fertilization. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B–Soil & Plant Science**, v. 62, n. 8, p. 732-738, 2012b.

CHALK, P. M.; CRASWELL, E. T. An overview of the role and significance of ¹⁵N methodologies in quantifying biological N₂ fixation (BNF) and BNF dynamics in agro-ecosystems. **Symbiosis**, v. 75, p. 1-16, 2018.

CHAN, K. X.; PHUA, S. Y.; VAN BREUSEGEM, F. Secondary sulfur metabolism in cellular signalling and oxidative stress responses. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 16, p. 4237-4250, 2019.

CHANDRA, N.; PANDEY, N. Role of sulfur nutrition in plant and seed metabolism of *Glycine max* L. **Journal of Plant Nutrition**, v. 39, n. 8, p. 1103-1111, 2016.

CIAMPITTI, I. A.; SALVAGIOTTI, F. New insights into soybean biological nitrogen fixation. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 4, p. 1185-1196, 2018.

COSTA, M.C.G., CUNHA, I.M.L., JORGE, L.A.C., ARAÚJO, I.C.S., 2014. Public-domain software for root image analysis. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 1359–1366. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832014000500001>.

COMITÊ ESTRATÉGICO SOJA BRASIL – CESB. **Publicações 2021**. Sorocaba: CESP, 2021. Disponível em: <https://www.cesbrasil.org.br/publicacoes/>. Acesso em: 02 ago. 2021.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Séries históricas de área plantada, produtividade e produção, relativas às safras 1999/00 a 2019/20 de grãos**. Brasília, DF, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=10>. Acesso em: 25 abr. 2023.

CÓRDOVA, S. C. et al. Soybean nitrogen fixation dynamics in Iowa, USA. **Field Crops Research**, v. 236, p. 165-176, 2019.

DANSO, S. K. A. Assessment of biological nitrogen fixation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN ECONOMY IN TROPICAL SOILS, 1994, Trinidad, WI. **Nitrogen economy in tropical soils; proceedings**. Berlin: Springer, 1996. p. 33-41.

DAS, U. et al. Sulfur triggers glutathione and phytochelatin accumulation causing excess Cd bound to the cell wall of roots in alleviating Cd-toxicity in alfalfa. **Chemosphere**, v. 262, art. 128361, 2021.

DIVITO, G. A. et al. N and S concentration and stoichiometry in soybean during vegetative growth: Dynamics of indices for diagnosing the S status. **Field Crops Research**, v. 198, p. 140-147, 2016.

DIVITO, G. A.; SADRAS, V. O. How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? a meta-analysis. **Field Crops Research**, v. 156, p. 161-171, 2014.

DONG, W.; WANG, Y.; TAKAHASHI, H. CLE-CLAVATA1 signaling pathway modulates lateral root development under sulfur deficiency. **Plants**, v. 8, n. 4, p. 103, 2019.

DROUX, M. et al. Interactions between serine acetyltransferase and O- acetylserine (thiol) lyase in higher plants-structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. **European Journal of Biochemistry**, v. 255, n. 1, p. 235-245, 1998.

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, v. 77, n. 2, p. 67-82, 2006.

FAO. **FAOSTAT database collections**. Rome, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/>. Acesso em: 02 ago. 2021.

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

FITZPATRICK, K. L.; TYERMAN, S. D.; KAISER, B. N. Molybdate transport through the plant sulfate transporter SHST1. **FEBS Letters**, v. 582, n. 10, p. 1508-1513, 2008.

FONSECA-LÓPEZ, D.; QUILA, N. J. V.; BALAGUERA-LÓPEZ, H. E. Techniques applied in agricultural research to quantify nitrogen fixation: a systematic review. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 21, n. 1, p. 32-50, 2020.

FRATTE, M. D. et al. The association of leaf sulfur content with the leaf economics spectrum and plant adaptive strategies. **Functional Plant Biology**, v. 48, n. 9, p. 924-935, 2021.

GETACHEW, Z.; ABERA, G.; BEYENE, S. Rhizobium inoculation and sulphur fertilizer improved yield, nutrient uptake and protein quality of soybean (*Glycine max* L. Merrill) varieties on nitisols of assosa area, Western Ethiopia. **African Journal of Plant Science**, v. 11, p. 123-132, 2017.

GETACHEW, Z.; ABERA, G.; BEYENE, S. Sulfur fertilizer and rhizobia inoculation improved soybean (*Glycine max* L. Merrill) growth performance and N₂ fixation on acidic nitisols of Western Ethiopia. **Ethiopia Journal of Applied Science and Technology**, v. 8, p. 1-11, 2016.

GEU-FLORES, F. et al. "Cytosolic γ -glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in *Arabidopsis*". **The Plant Cell**, v. 23, n. 6, p. 2456-2469, 2011.

GLOWACKA, A. et al. The response of common bean to sulphur and molybdenum fertilization. **International Journal of Agronomy**, v. 2019, art. 3830712, 2019.

HASANUZZAMAN, M. et al. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 384, 2019.

- HAWKESFORD, M. et al. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, P. (ed.). **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2012. p. 135-189.
- HELDT, H. W.; PIECHULLA, B. **Plant biochemistry**. Cambridge: Academic Press, 2021.
- HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1-18, 2008.
- HILDEBRANDT, T. M.; NESI, A. N.; ARAÚJO, W. L.; BRAUN, H. P. Amino acid catabolism in plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 11, p. 1563-1579, 2015.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. (California Agricultural Experiment Station; 347).
- HOEFGEN, R.; NIKIFOROVA, V. J. Metabolomics integrated with transcriptomics: assessing systems response to sulfur-deficiency stress. **Physiologia Plantarum**, v. 132, n. 2, p. 190-198, 2008.
- HUANG, B.; VETTING, M. W.; RODERICK, S. L. The active site of O-acetylserine sulphydrylase is the anchor point for bienzyme complex formation with serine acetyltransferase. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 9, p. 3201-3205, 2005.
- HUSSAIN, K. et al. Soybean growth and nitrogen fixation as affected by sulfur fertilization and inoculation under rainfed conditions in Pakistan. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 13, n. 6, 2011.
- IBAÑEZ, T. B. et al. Sulfur modulates yield and storage proteins in soybean grains. **Scientia Agricola**, v. 78, art. e20190020, 2020.
- JAHAN, S. Recent advances in the signalling function of glutathione on plants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 12, p. 1588-1593, 2017.
- JAYAKUMAR, K. et al. Soil applied cobalt alters the nodulation, leg-haemoglobin content and antioxidant status of *Glycine max* (L.) Merr. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 67, n. 2, p. 272-275, 2008.
- JIANG, X. et al. Methane control of adventitious rooting requires γ -glutamyl cysteine synthetase-mediated glutathione homeostasis. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 4, p. 802-815, 2019.
- JOSHI, N. C. et al. *Arabidopsis* γ -glutamylcyclotransferase affects glutathione content and root system architecture during sulfur starvation. **New Phytologist**, v. 221, n. 3, p. 1387-1397, 2019.
- KAFEEL, U.; JAHAN, U.; KHAN, F. A. Role of mineral nutrients in biological nitrogen fixation. In: **Sustainable Plant Nutrition**. Cambridge: Academic Press, 2023. p. 87-106.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KATAOKA, T. et al. Root-to-shoot transport of sulfate in *Arabidopsis*: evidence for the role of SULTR3; 5 as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. **Plant Physiology**, v. 136, n. 4, p. 4198-4204, 2004a.

KATAOKA, T. et al. Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 16, n. 10, p. 2693-2704, 2004b.

KERMAH, M. et al. N₂-fixation and N contribution by grain legumes under different soil fertility status and cropping systems in the Guinea savanna of northern Ghana. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 261, p. 201-210, 2018.

KOK, L. J.; STULEN, I.; HOWKESFORD, M. Sulfur nutrition in crop plants. In: HAWKESDFORD, M.; BARRACLOUGH, P. (eds.) **The molecular and physiological basis of nutrient use efficiency in crops**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2011.

KRUSELL, L. et al. The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules. **The Plant Cell**, v. 17, n. 5, p. 1625-1636, 2005.

KUTZ, A. et al. A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 30, n. 1, p. 95-106, 2002.

LAVRES JUNIOR, J.; MONTEIRO, F. A. Perfilhamento, área foliar e sistema radicular do capim-Mombaça sofreram a combinação de doses de permaneceram e alimentaram. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 5, p. 1068–1075, 2003.

LEGGETT, J. E.; EPSTEIN, E. Kinetics of sulfate absorption by barley roots. **Plant Physiology**, v. 31, n. 3, p. 222–226, 1956.

LI, Q.; GAO, Y.; YANG, A. Sulfur homeostasis in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 8926, 2020.

LIU, Y. et al. Models of biological nitrogen fixation of legumes. **Sustainable Agriculture**, v. 2, p. 883-905, 2011.

LIU, Y. et al. Structural and functional characterization of one unclassified glutathione S-transferase in xenobiotic adaptation of *Leptinotarsa decemlineata*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11921, 2021.

LIU, Y.; VON WIRÉN, N. Integration of nutrient and water availabilities via auxin into the root developmental program. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 65, p. 102-117, 2022.

LONG, S. R. et al. Nitrogen and sulfur. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2015.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do Estado Nutricional das Plantas**. Princípios e Aplicações. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997.

MARQUES, J. P. R.; SOARES, M. K. M. **Manual de técnicas aplicadas à histopatologia vegetal**. Piracicaba: FEALQ, 140 p, 2021.

MARUYAMA-NAKASHITA, A.; OHKAMA-OHTSU, N. Sulfur assimilation and glutathione metabolism in plants. **Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance**. Berlin: Springer, 2017. 287-308.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Response of crop plants under sulphur stress tolerance. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 7, n. 3, p. 23-57, 2011.

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

MEKURIA, G. F.; WORKU, W.; FIKRE, A. Nutrient utilization and yield response of lentil (*Lens culinaris* Medikus) to rhizobium inoculant and sulphur fertilization. **Agriculture, Forestry and Fisheries**, v. 8, n. 3, art. 64, 2019.

MENGEL, K. et al. Sulphur. In: MENGEL, K. et al. (eds.). **Principles of plant nutrition**. Berlin: Springer, 2001. p. 435-452.

MOREIRA, A. et al. Effect of sulfur source and rates on yield and yield components of soybean in subtropical soils. **Journal of Plant Nutrition**, v. 43, n. 14, p. 2081-2091, 2020.

MOREIRA, A. et al. Phosphorus, potassium and sulfur interactions in soybean plants on a Typic Hapludox. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 49, n. 4, p. 405-415, 2018.

MOREIRA, A.; MORAES, L. A. C. Sulfur use efficiency in soybean cultivars adapted to tropical and subtropical conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 47, n. 19, p. 2208-2217, 2016.

NEBIYU, A. et al. Importance of correct B value determination to quantify biological N₂ fixation and N balances of faba beans (*Vicia faba* L.) via ¹⁵N natural abundance. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, p. 517-525, 2014.

NIKIFOROVA, V. et al. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: Interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. **The Plant Journal**, v. 33, n. 4, p. 633-650, 2003.

OHKAMA-OHTSU, N. et al. Characterization of the extracellular γ -glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 49, p. 865 - 877, 2007.

OHKAMA-OHTSU, N. et al. Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by γ -glutamyl transpeptidase GGT3 in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 49, n. 5, p. 878-888, 2007.

OHYAMA, T. et al. Role of nitrogen on growth and seed yield of soybean and a new fertilization technique to promote role of nitrogen on growth and seed yield. In: KASAI, M. (ed.). **Soybean: the basis of yeld, biomass and productivity**. London: IntechOpen, 2017. p. 153-185.

OKITO, A. et al. Isotopic fractionation during N₂ fixation by four tropical legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 7, p. 1179-1190, 2004.

PACYNA, S. **Bedeutung des schwefels für den ferredoxin-und leghämoglobin-gehalt sowie die energieverorgung in n₂-fixierenden leguminosen.** 2005. Tese - University of Bonn, Bonn, 2005.

PACYNA, S; SCHULZ, M.; SCHERER, H. W. Influence of sulphur supply on glucose and ATP concentrations of inoculated broad beans (*Vicia faba minor* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, p. 324-329, 2006.

PAGANI, A. et al. Effects of nitrogen and sulfur application on grain yield, nutrient accumulation, and harvest indexes in maize. **Journal of Plant Nutrition**, v. 35, n. 7, p. 1080-1097, 2012.

PATEL, M. D. et al. Combining ability studies in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Environment and Ecology**, v. 31, n. 2C, p. 1054-1056, 2013.

PEOPLES, M. B. et al. Can differences in ¹⁵N natural abundance be used to quantify the transfer of nitrogen from legumes to neighbouring non-legume plant species?. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 87, p. 97-109, 2015.

PEOPLES, M. B. et al. Quantifying country-to-global scale nitrogen fixation for grain legumes: I. Reliance on nitrogen fixation of soybean, groundnut and pulses. **Plant and Soil**, v. 469, p. 1-14, 2021.

PETINELI, R. et al. Conventional and transgenic soybeans: physiological and nutritional differences in productivity under sulfur fertilization. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 51, n. 15, p. 2045-2053, 2020.

PITUMPE ARACHCHIGE, P. S. et al. Temporal biological nitrogen fixation pattern in soybean inoculated with *Bradyrhizobium*. **Agrosystems, Geosciences & Environment**, v. 3, n. 1, art. e20079, 2020.

RIBET, J.; DREVON, J. J. Increase in permeability to oxygen and in oxygen uptake of soybean nodules under limiting phosphorus nutrition. **Physiologia Plantarum**, v. 94, n. 2, p. 298-304, 1995.

ROGG, L. E.; LASSWELL, J.; BARTEL, B. A gain-of-function mutation in IAA28 suppresses lateral root development. **Plant Cell**, v. 13, p. 465-480, 2001.

RUSHOVICH, D.; WEIL, R. Sulfur fertility management to enhance methionine and cysteine in soybeans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 15, p. 6595-6601, 2021.

SAHA, S. et al. Effects of sulphur deficiency on growth, sugars, proline and chlorophyll content in mungbean (*Vigna radiata* L. var. BARI MUNG-6). **Bangladesh Journal of Botany**, v. 45, n. 2, p. 405-410, 2016.

SAITO, K. Sulfur assimilatory metabolism: the long and smelling road. **Plant Physiology**, v. 136, n. 1, p. 2443-2450, 2004.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, v. 48, p. 247-249, 1973.

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

SANTACHIARA, G.; SALVAGIOTTI, F.; ROTUNDO, J. L. Nutritional and environmental effects on biological nitrogen fixation in soybean: A meta-analysis. **Field Crops Research**, v. 240, p. 106-115, 2019.

SATURNO, D. F. et al. Mineral nitrogen impairs the biological nitrogen fixation in soybean of determinate and indeterminate growth types. **Journal of Plant Nutrition**, v. 40, n. 12, p. 1690-1701, 2017.

SCHERER, H. W. et al. Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N₂ fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p. 909-916, 2008.

SCHERER, H. W. et al. Sulphur supply to peas (*Pisum sativum* L.) influences symbiotic N₂ fixation. **Plant, Soil and Environment**, v. 52, n. 2, p. 72-77, 2006.

SCHERER, H. W. Impact of sulfur on N₂ fixation of legumes. In: KHAN, N. A.; SINGH, S.; UMAR, S. (eds.). **Sulfur assimilation and abiotic stress in plants**. Berlin: Springer-Verlag, 2008, p. 43-54.

SCHERER, H. W.; LANGE, A. N₂ fixation and growth of legumes as affected by sulphur fertilization. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p. 449-453, 1996.

SCHNEIDER, S. et al. Sulfate is transported at significant rates through the symbiosome membrane and is crucial for nitrogenase biosynthesis. **Plant, Cell & Environment**, v. 42, n. 4, p. 1180-1189, 2019.

SFREDO, G. J.; MOREIRA, A. Efficiency of sulfur application on soybean in two types of oxisols in southern Brazil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 46, n. 14, p. 1802-1813, 2015.

SHEARER, G.; KOHL, D. H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Functional Plant Biology**, v. 13, n. 6, p. 699-756, 1986.

SHINMACHI, F. et al. Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat. **Plant Physiology**, v. 153, n. 1, p. 327-336, 2010.

SINGH, R. A. N. J. I. T.; SINGH, A. P. Effect of phosphorus, sulphur and biofertilizer on yield, quality and uptake of nutrients in cowpea (*Vigna unguiculata*). **Annals of Plant and Soil Research**, v. 19, n. 2, p. 175-179, 2017.

TAKAHASHI, H. et al. Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 94, n. 20, p. 11102-11107, 1997.

TAKAHASHI, H. et al. Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: Molecular functions and regulations of transports and assimilatory enzymes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, p. 157-184, 2011.

TAKAHASHI, H. et al. The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 23, n. 2, p. 171-182, 2000.

TAKAHASHI, H. Sulfate transport systems in plants: Functional diversity and molecular mechanisms underlying regulatory coordination. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 16, p. 4075-4087, 2019.

TELMAN, W.; DIETZ, K. J. Thiol redox-regulation for efficient adjustment of sulfur metabolism in acclimation to abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 16, p. 4223-4236, 2019.

THIRUNAVUKKARASU, M. et al. Response of nano-sulphur to the groundnut. **International Journal of Chemical Studies**, v. 6, n. 3, p. 2067-2072, 2018.

TRUCHET, G. et al. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. **Nature**, v. 351, n. 6328, p. 670-673, 1991.

UMAIR, M. et al. Differential stoichiometric responses of shrubs and grasses to increased precipitation in a degraded karst ecosystem in Southwestern China. **Science of The Total Environment**, v. 700, art. 134421, 2020.

VARIN, S. et al. How does sulphur availability modify N acquisition of White clover (*Trifolium repens* L.)? **Journal Experimental Botany**, v. 61, p. 225-234, 2010.

VATANSEVER, R. et al. Genome-wide identification and expression analysis of sulfate transporter (SULTR) genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). **Planta**, v. 244, p. 1167–1183, 2016.

VESSEY, J. K. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay. **Plant and Soil**, v. 158, p. 151–162, 1994.

VITOUSEK, P. M.; HOWARTH, R. W. Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur?. **Biogeochemistry**, v. 13, p. 87-115, 1991.

VITTI, G. C. et al. Enxofre. In: FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R.; SANTOS, L. A. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2018. p. 377-400.

WANG, D. et al. Symbiosis specificity in the legume–rhizobial mutualism. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 334-342, 2012.

WANG, Y.F. et al. Effects of sulphur supply on the morphology of shoots and roots of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Grass and Forage Science**, v. 58, n. 2, p. 160-167, 2003.

YADAV, S. et al. Effect of sulphur and iron on nutrient content, uptake and quality of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 1, p. 1605-1609, 2020.

YADAV, S. K.; MAHTO, D. K.; CHAUDHARY, S. K. Influenced of different levels and sources of Sulphur on nodulation and quality of Blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 1S, p. 2027-2029, 2018.

YAMAGISHI, M.; YAMAMOTO, Y. Effects of boron on nodule development and symbiotic nitrogen fixation in soybean plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 40, n. 2, p. 265-274, 1994.

YOSHIMOTO, N. et al. Phloem-localizing sulfate transporter, Sultr1;3, mediates redistribution of sulfur from source to sink organs in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 131, n. 4, p. 1511-1517, 2003.

YOSHIMOTO, N. et al. Posttranscriptional regulation of high-affinity sulfate transporters in *Arabidopsis* by sulfur nutrition. **Plant Physiology**, v. 145, n. 2, p. 378-388, 2007.