DIOGO ARISTÓTELES RODRIGUES GONÇALVES

PERFIL METABÓLICO EM PLÂNTULAS DE SOJA SUBMETIDAS AODÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

RIO PARANAÍBA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca UFV - Campus de Rio Paranaíba

G635p
2014

Gonçalves, Diogo Aristóteles Rodrigues, 1986-
Perfil metabólico em plântulas de soja submetidas ao déficit hídrico / Diogo Aristóteles Rodrigues Gonçalves. – Rio Paranaíba, MG, 2014.
45 f.; 29cm.

Orientador: D. Sc. Liliane Evangelista Visôtto.
Co-orientador: D. Sc. Pedro Ivo Vieira Goog God; D. Sc. Danilo da Cruz Centeno.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

1. *Glycine max*. 2. Déficit hídrico
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

DIOGO ARISTÓTELES RODRIGUES GONÇALVES

PERFIL METABÓLICO EM PLÂNTULAS DE SOJA SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 24 de fevereiro de 2014

_____	_____
Pedro Ivo Vieira Good God	Danilo da Cruz Centeno
Coorientador	Coorientador

_____

Márcio Santos Soares

_____

Liliane Evangelista Visôtto
Orientadora

Aos meus pais, Eustáquio Antônio Gonçalves e Ivone Rodrigues (*in memorian*), e a minha irmã, Daniella Rodrigues Gonçalves.

AGRADECIMENTOS

À Deus, luz do meu caminho.

À Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A professoraLiliane Evangelista Visôtto, pela orientação, amizade, confiança e apoio durante a realização do curso e desta pesquisa.

Aos professoresPedro Ivo Vieira Good God e Danilo da Cruz Centeno, pela coorientação, sugestões e suportecientíficona realização deste trabalho.

Ao professor Márcio Santos Soares, pelo engrandecimento de minha dissertação, com sua participação na banca examinadora.

A minha namorada, Barbara Palmas, pelo apoio e paciência.

Aos grandes amigos de república,Cícero Augusto Guimarães Fuga (Papi), Diego Sichocki (Tio Diego) e Roney Mendes Gott (Tio Roney) pelo auxílio na condução do experimento, momentos de descontração e grande amizade.

Aos membros do Grupo de pesquisa da professora Liliane pelo auxílio na condução do experimento.

E aos professores, pesquisadores, colegas e principalmente aos amigos e familiares que me incentivaram a ingressar no Mestrado e que durante este período muito me auxiliaram.

“Cada planta tem centenas de substâncias, e uma delas pode ser mais importante que uma galáxia.”

Otto Gottlieb

SUMÁRIO

RESUMO vii
ABSTRACT ix
INTRODUÇÃO GERAL 1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 6

CAPÍTULO I - RESPOSTA FISIOLÓGICA EM PLÂNTULAS DE SOJA SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO 10
RESUMO 10
1. INTRODUÇÃO 10
2. MATERIAL E MÉTODOS 12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 13
4. CONCLUSÕES 26
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 26

CAPÍTULO II - PERFIL METABÓLICO DA SOJA SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO 29
RESUMO 29
1. INTRODUÇÃO 30
2. MATERIAL E MÉTODOS 30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 33
4. CONCLUSÕES 43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 43

CONCLUSÕES GERAIS 46

RESUMO

GONÇALVES, Diogo Aristóteles Rodrigues,M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014.**Perfil metabólico em plântulas de soja submetidas aodéficit hídrico**. Orientadora: Liliane Evangelista Visôtto. Coorientadores:Pedro Ivo Vieira Good God e Danilo da Cruz Centeno.

Asoja é a principal cultura de abertura das fronteiras agrícolas no Brasil, sendo que atualmente, sua área de cultivo encontra-se em expansão. No entanto, previsões pessimistas a cerca das mudanças climáticas indicam uma redução da área apta ao plantio, caso não sejam desenvolvidos genótipos adaptados às intempéries climáticas.Acredita-se que longos períodos de estiagem será uma das alterações que mais afetará a produção de grãos, por isso há uma necessidade de busca de alternativas viáveis para o desenvolvimento de variedades tolerantes ao déficit hídrico. Recentemente, estudos metabolômicos de resposta de plantas ao estresse tem ganhado notoriedade, devido a dificuldade de se trabalhar com características poligênicas. As plantas sofrem alterações em seu perfil metabólico para adaptar a condição de estresse, e devido a isto, são necessários estudos que visem elucidar as respostas das plantas em situações de estresse. O objetivo do presente trabalho foi analisar os metabólitos em plantas de soja, submetidas ao estresse hídrico, visando contribuir para o desenvolvimento de cultivares com maior tolerância ao déficit hídrico. Para tal, foi avaliado asvariações no desenvolvimento morfológico, a reposta fisiológica e a resposta do metabolismo de plântulas de soja (*Glicynemax*) em duas condições hídricas, déficit hídrico (tratamento) e irrigado (controle). Um ensaio foi montado com o objetivo de verificar as respostasde oito variedades de soja a ausência de irrigação, através da determinação dos parâmetros morfológicas, massa fresca e comprimento de estruturas.Os resultados obtidos permitiram selecionar e classificar as variedades como susceptível ("Anta 82" e "BRSMG 811c RR"), intermediária ("CD 250 RR", "MG/BR 46 (Conquista)", "BRS Favorita RR" e "BMX Potência RR") e tolerante ("M-7908 RR" e "BRSMG 68 (Vencedora)"). Posteriormente, três variedades selecionadas como tolerante ("M-7908 RR"), intermediária ("BRS Favorita RR") e suscetível ("BRSMG 811c RR") foram submetidas a análise do monitoramento da eficiência quântica potencial do fotossistema II, afim de

confirmar os resultados de adaptabilidade obtido pela análise morfológica. Na última fase, foirealizado o estudo comparativo das variações no metabolismo das plantas submetidas ao déficit hídrico e das plantas controle, onde se observou o aumento de sacarose e glicose na folha unifoliolada da variedade tolerante, na suscetível o aumento da glicose na folha cotiledonar.A partir desses resultados, verificou que os açúcares são metabólitosque constituem fortes indicadores de resposta ao estresse hídrico.

Palavras-chave: *Glicynemax*, morfologia, fisiologia, metabolômica

ABSTRACT

GONÇALVES, Diogo AristótelesRodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Metabolic profile in soybean seedlings subjected to water deficit.** Advisor: Liliane Evangelista Visôtto. Co-advisors: Pedro Ivo Vieira Good God and Danilo da Cruz Centeno.

Soybean is the main crop for opening agricultural frontier in Brazil, and currently, its cultivation area is expanding. However, pessimistic predictions about climate change indicate a reduction of the area suitable for planting if adapted genotypes are not developed to inclement weather. It is believed that long periods of drought will be one of the changes that most affect grain production, so there is a need to search for viable development of varieties tolerant to drought alternatives. Recently, metabolomic studies of plant response to stress have gained notoriety due to the difficulty of working with polygenic traits. The plants undergo changes in their metabolic profile to adapt the stress condition, and due to this, studies that aim to elucidate the responses of plants under stress are. The objective of this study was to analyze the metabolites in soybean plants subjected to drought stress, to contribute to the development of cultivars with increased tolerance to water deficit. To this was evaluated changes in morphological development, the physiological response and the response of the metabolism of soybean seedlings (*Glicyne max*) in two water conditions, water loss (treatment) and watered (control). A trial was set up with the objective of verifying the answers eight soybean varieties the absence of irrigation, through the determination of morphological parameters, fresh weight and length of structures. The results allowed to select and classify the varieties as susceptible ("Anta 82" and "BRSMG 811c RR"), intermediate ("CD 250 RR", "MG/BR 46 (Conquista)", "BRS Favorita RR" and "BMXPotência RR") and tolerant ("M-7908 RR" and "BRSMG 68 (Vencedora)"). Subsequently three selected as tolerant varieties ("M-7908 RR"), intermediate ("BRS Favorita RR") and susceptible ("BRSMG 811c RR") were subjected to analysis of monitoring potential quantum efficiency of photosystem II, in order to confirm adaptability of the results obtained by the morphological analysis. In the last phase, the comparative study of the variations was performed

in the metabolism of plants subjected to water deficit and plant control, where we observed the increase of sucrose and glucose in unifoliate leaf tolerant variety, the likely increase of glucose in the cotyledon leaf. From these results, we found that the sugars are metabolites that are strong predictors of response to water stress.

Keywords: *Glicyne max*, morphology, physiology, metabolomics

INTRODUÇÃO GERAL

A criação de novos cultivares tem sido uma das tecnologias que mais têm contribuído para o aumento da produtividade e estabilidade da produção, sem custos adicionais ao agricultor (Borém, 2005). É reconhecido que a expansão da soja nas baixas latitudes foi alavancada com o lançamento de cultivares, com características agronômicas de melhor adaptação às condições edafoclimáticas, estendendo a fronteira agrícola para todas as regiões brasileiras (Costa, 2005; Embrapa, 2011).

A soja é a cultura que mais cresceu nas últimas três décadas no território nacional, correspondendo a 49% da área plantada em grãos do país (MAPA, 2013). Mesmo assim, as metas de rendimentos são desafiadas em função dos cenários projetados pelo aquecimento global (Tilmanet al., 2001)

A produção da safra de soja de 2012 foi de 66,4 milhões de toneladas, no entanto, quando comparada à safra anterior, nota-se uma produção inferior de 8,93 milhões de toneladas, o que equivale a 11,8% a menos que a produção de 2011. As condições climáticas adversas caracterizadas por estiagens prolongadas causadas pelo fenômeno “La Niña” foram as responsáveis por este resultado negativo. Na safra 2013, a Companhia Nacional de Abastecimento, registrou uma produção de 81,4 milhões de toneladas, uma safra recorde, volume 18,4% acima da safra anterior, e para a colheita de 2014, é previsto novo recorde com 90,3 milhões de toneladas deste grão (Conab, 2014).

Apesar do cenário favorável, as mudanças climáticas são preocupantes.Segundo Tilmanet al. (2001), as grandes culturas terão suas áreas de cultivo reduzidas praticamente pela metade, quando a temperatura média da Terra estiver 5,8ºC acima da atual, situação prevista para ocorrer num prazo de 50 a 100 anos. Estas mudanças devem alterar os regimes hídricos, tornando inviável o cultivo da soja em regiões onde as chuvas já se encontram de forma restrita à curtas estações, durante seu ciclo. Uma vez que a água constitui aproximadamente 90% de seu peso, é essencial à vida e ao metabolismo, pois atua em praticamente todos os processos fisiológicos e bioquímicos (Casagrande et al., 2001; Silva et al., 2002; Farias et al., 2007).

A habilidade das plantas em tolerar a falta d'água é de grande importância para o desenvolvimento do agronegócio de qualquer país e o conhecimento antecipado dos indicadores de adaptabilidade às condições hídricas tende a auxiliar o empreendedor agrícola na busca de estratégias mais seguras para as tomadas de decisões (Martorano, 2007; Queiroz, 2010).

O déficit hídrico é um dos principais problemas da agricultura, sendo um dos principais fatores responsáveis por estresse abiótico em plantas. Segundo Taiz&Zeiger (2013), o estresse é geralmente definido como um fator externo que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta. Este se estabelece quando a absorção de água pelas raízes não consegue atender as demandas da planta (Regueraet al., 2012; Sanches, 2012).

A partir de trabalhos produzidos na ultima década, Chaves et al. (2009), afirmam que tornou-se evidente a percepção e a resposta rápida das plantas as alterações na disponibilidade hídrica, através de uma série de eventos fisiológicos, celulares e moleculares que ocorrem em sequencia ou em paralelo. As respostas em vários níveis são moduladas pela duração, severidade e taxa de progressão do estresse, além da variabilidade genética e época de ocorrência (Casagrande et al., 2001; Silva et al., 2002; Pinheiro & Chaves, 2011).

O estresse hídrico afeta plantas de soja nas fases de germinação e emergência, diminuindo o estande de plantas. No florescimento, causa o aborto das flores e impede a antese, enquanto no enchimento dos grãos, o estresse, afeta seu desenvolvimento e, consequentemente, a produção. Ao longo de todo o ciclo, caso a planta não se adapte, ocorrerá o declínio na taxa de crescimento, com folhas pequenas e entrenós curtos. O tecido vegetal apresentará aspecto murcho e os folíolos tendem a "fechar" para diminuir a área foliar, ocorrerá senescência, abscisão das folhas e diminuição do acumulo de matéria seca (Casagrande et al., 2001; Silva et al., 2002; Farias et al., 2007; Sousa, 2013; Taiz&Zeiger, 2013).

Os processos celulares que são afetados em condições de baixa disponibilidade de água são o fechamento estomático, o acúmulo e translocação de solutos e antioxidantes, redução do processo fotossintético e da respiração, menor taxa de assimilação do carbono, menor rendimento da transpiração, da difusão do vapor de água, da atividade enzimática, do metabolismo do nitrogênio, e aumento na formação de carboidratos (Casagrande et al., 2001; Angelocci, 2002; Munns, 2002; Anami et al., 2009; Hummel et al., 2010; Queiroz, 2010;

Pinheiro & Chaves, 2011; Farias et al., 2007; Sousa, 2013; Taiz&Zeiger, 2013).Segundo Casagrande et al. (2001)estes eventos são justificados devido a importância que a água desempenha na função de solvente, por meio do qual solutos entram nas células e movem-se através da planta.

Ao nível molecular, é afetada a expressão de genes específicos de resposta ao estresse, prejudicando a síntese de enzimas, proteínas entre outras (Casagrande et al., 2001; Silva et al., 2002; Taiz&Zeiger, 2013).

Tais mecanismos variam entre espécies e dizem respeito a evitar, escapar e tolerar o déficit hídrico. No primeiro caso, a planta mantém o potencial hídrico elevado nos tecidos, através da manutenção do conteúdo relativo de água (CRA); no segundo, a planta completa seu ciclo antes de períodos de seca; e, no terceiro caso, a planta sobrevive sob elevados níveis de estresse hídrico interno, devido aos tecidos que podem tolerar a desidratação até certo ponto. A estratégia de tolerância permite às plantas manter a atividade metabólica com a evolução do déficit hídrico e declínio do CRA (Fiorezeet al., 2011; Farias et al., 2007; Taiz&Zeiger, 2013).

O grau de tolerância de uma espécie ou cultivar pode ser determinado à curto prazo, com o aumento na razão sacarose/amido pelo carbono recentemente fixado, como à longo prazo, pelo *pool* de solutos orgânicos de baixo peso molecular, compatíveis com o metabolismo celular, conduzindo à manutenção de um estado hídrico favorável, auxiliado pelo ajustamento osmótico e protegendo as estruturas celulares contra os danos induzidos pela desidratação. Ambas as alterações fazem parte de uma resposta reguladora da planta para manter a turgescência foliar sob baixa disponibilidade de água (Bajji et al., 2001; Munns, 2002; Anami et al., 2009). Uma resposta fisiológica específica ao déficit hídrico representa, na verdade, combinações de eventos moleculares que são ativados ou desativados pela percepção do estresse. A compreensão de como estes eventos interage é importante parao melhoramento vegetal com tolerância à seca (Casagrande et al., 2001).

Como a expressão da característica é naturalmente dependente do ambiente ou do nível de deficiência hídrica, espera-se que a interação entre genótipos e ambientes esteja presente entre as principais causas de variação (Arias et al., 2007). Portanto, a caracterização de genótipos tolerantes ou sensíveis à seca é um pré-requisito para seleção e manipulação genética (Casagrande et al., 2001).

Considerando-se os mecanismos que geram a tolerância à seca como uma característica poligênica, poucos programas de melhoramento se preocupam com essa característica devido às dificuldades em ser trabalhadas. Consequentemente, pode-se esperar que não existisse um padrão similar de respostas que seja altamente correlacionado com a produtividade, em todos os ambientes com déficit hídrico (Cattivelliet al., 2008), Embora muitos genes associados a resposta da planta ao estresse tenham sido identificados e utilizados para gerar plantas tolerantes, o sucesso dessa estratégia torna-se limitado devido ao pouco conhecimento bioquímico e metabolômico de resposta da planta (Reguera et al., 2012). De acordo com Komatsuet al. (2013), as plantas respondem às condições de estresse por meio de mudanças nos perfis das "ômicas", incluindo transcriptômica, proteômica e metabolômica.

A metabolômica é a ciência que estuda o metaboloma, que é a caracterização dos fenótipos dos metabólitos, com ligação destes aos padrões de expressão gênica, abundância de proteína e acumulação de metabólitos, refletindo a real atividade das células a nível funcional. Abordagens metabolômicas podem lançar à vista os mecanismos bioquímicos de adaptação da soja em resposta a estresses ambientais (Resende, 2010; Faleiroet al., 2011; Putri et al., 2012; Komatsu et al., 2013).

Por conseguinte, é por muitas vezes considerada uma poderosa ferramenta para fornecer um instantâneo da fisiologia de uma célula. O poder da metabolômica reside na aquisição dos dados analíticos, extraídos da apreciação global quantitativa dos metabolitos, juntamente com os elementos mais significativos dos dados, usando ferramentas de análises diferenciadas (Putriet al., 2013). Xiaoet al. (2012), complementa dizendo que devido à complexidade e à natureza dinâmica do metaboloma, múltiplas plataformas analíticas são necessárias para cobrir todo o espectro de metabólitos, de forma geral, os metabólitos podem ser divididos em duas classes: primários e secundários, cuja composição varia enormemente conforme as condições genéticas, fisiológicas e ambientais (Faleiro et al., 2011).

A metabolômica, semelhante a transcriptômica e proteômica, gera grandes volumes de dados que exigem bioinformática especializada e ferramentas de mineração de dados para compreensão dos resultados. A ciência dos estudos dos metabólitos requer software automatizado de processamento de dados, que é

capaz de trabalhar com dados brutos, dados oriundos de vários instrumentos, extensas bibliotecas de espectros de massa e sistemas de gerenciamento de banco de dados poderosos. Manipulação de dados metabolômicos, análise e mineração e sua integração com outras plataformas “ômicas” foram dramaticamente melhoradas nos últimos anos devido ao desenvolvimento de um conjunto de ferramentas de bioinformática disponíveis publicamente (Shulaevet al., 2008). Estas tecnologias permitiram demonstrar análises de redes regulatórias que controlam as respostas ao déficit hídrico. Tais análises têm aumentado nossa compreensão dos sistemas globais de plantas nas respostas e adaptação a condições de estresse (Urano et al., 2010), colaborando na correlação entre perfis metabólicos e na diferenciação dos metabólitos entre variedades tolerantes e suscetíveis aos agentes estressores (Weckwerth&Morgenthal, 2005; Forst, 2006).

Através da engenharia do metabolismo, pode-se aplicar o conhecimento adquirido na modificação genética dos organismos, para que estes possam produzir o metabólito em questão (Aharoniet al., 2005).

Apesar das pesquisas, que produzem uma infinidade de informações, dos diversos fenômenos chaves na tolerância ao estresse, estas ainda não estão totalmente elucidadas, pois apenas alguns componentes de diversas vias foram relacionados ao estresse hídrico (Queiroz, 2010).Sugere-se assim, que devido à importância de fatores estressantes, é necessáriomais estudos que visem elucidar as interações fisiológicas e bioquímicas das plantas quando submetidas ao estresse hídrico, em especial, a fim de desenvolver, de forma eficiente, cultivares de soja tolerante. Em virtude do exposto, os estudos dos metabólitos em plantas de soja, para o desenvolvimento de variedades com tolerância ao déficit hídrico, se apresenta como uma ótima ferramenta.

O presente estudo objetivou analisar os metabólitos em plantas de soja, submetidas ao estresse hídrico, visando contribuir para o desenvolvimento de cultivares com maior tolerância ao déficit hídrico, onde se procurou identificar o número de dias para extração e avaliação dos metabólitos, avaliando a presença e acúmulo dos metabólitos das plantas submetidas ao déficit hídrico em comparação com o controle. Definindo assim, a melhor cultivar elite para ser utilizada como genitora em programas de melhoramento para tolerância ao estresse hídrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHARONI, A.; JONGSMA, M.A.; BOUWMEESTER, H.J. Volatile science?Metabolic engineering of terpenoids in plants.**Trends in plant science.**v.10, p.594-602, 2005.

ANAMI, S.; DE BLOCK, M.; MACHUKA, J.; VAN LIJSEBETTENS, M. Molecular improvement of tropical maize for drought stress tolerance in Sub-Saharan Africa. **Criticalreviews in plantsciences.** Boca Raton, v. 28, p.16-35, 2009.

ANGELOCCI, L. R. **Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera: introdução ao tratamento biofísico**. Piracicaba: FEALQ, 2002, 272 p.

ARIAS, C.A.A. et al. DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES DE SOJA COM TOLERÂNCIA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA. In: **SIMPÓSIO SOBRE TOLERÂNCIA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA EM PLANTAS**, 2007, Londrina: Embrapa Soja, p. 130-134, 2007.

BAJJI, M.; LUTTS, S.; KINET, L.M. Water deficit effects on solute contribution osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum*Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. **Plantscience,** v.160, p.669-681, 2001.

BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Ed. UFV, 969p., 2005.

CASAGRANDE, E.C.; FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P.K. BRETON, M.C.; NEPOMUCENO, A.L. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja**. RevistaBrasileiraFisiologia Vegetal**, Londrina, v. 2, n. 13, p.168-184, 2001.

CATTIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F.W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A.M.; FRANCIA, E.; MARÈA, C.; TONDELLI, A.; STANCA, A.M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v.105, p.1-14, 2008.

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under grought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **AnallsofBotany,** v.103, p.551-560, 2009.

COSTA, N.L. **Complexo Soja: Sua importância para o Agronegócio, a Balança Comercial e a Economia Brasileira**. 2005. 95f. Monografia (Especialização) - Curso de Especialização em Comércio Exterior. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Frederico Westphalen, RS. 2005.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira de grãos**. Brasília : Conab, 67p. 2014.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2012 e 2013.** Londrina: Embrapa Soja. 261 p., 2011.

FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JUNIOR, F.B. **Biotecnologia: estado de arte e aplicações na agropecuária.** Planaltina, Embrapa Cerrados, 730p. 2011.

FARIAS, J.R.B.; NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja.** Londrina: Circular Técnico 48, 2007. 9p.

FIOREZE, S.L.; PIVETTA, L.C.; FANO, A.; MACHADO, F.R.; GUIMARÃES, V.F. Comportamento de genótipos de soja submetidos a déficit hídrico intenso em casa de vegetação. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 3, p.342-349, 2011.

FORST, C.V. Host-pathogen systems biology.**Drug discovery today**.v.11, p.220-227, 2006.

HUMMEL, I.; PANTIN, F.; SULPICE, R.; PIQUES, M.; ROLLAND, G.; DAUZAT, M.; CHRISTOPHE, A.; PERVENT, M.; BOUTEILLÉ, M.; STITT, M.; GIBON, Y.; MULLER, B. Arabidopsis Plants Acclimate to Water Deficit at Low Cost through Changes of Carbon Usage: An Integrated Perspective Using Growth, Metabolite, Enzyme, and Gene Expression Analysis. **Plant Physiology**, Montpellier, France, n. 154, p.357-372, 2010.

KOMATSU, S.; SHIRASAKA N, SAKATA K. **'Omics' techniques for identifying flooding–response mechanisms in soybean.**Journal of proteomics,v.10, p. 1016-1026, 2013.

MAPA. **Soja**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>. Acessado em 09 de Março de 2013.

MARTORANO, L.G. **PADROES DE RESPOSTA DA SOJA A CONDIÇÕES HÍDRICAS DO SISTEMA SOLO-PLANTA-ATMOSFERA, OBSERVADOS NO CAMPO E SIMULADOS NO SISTEMA SUPORTE A DECISÃO DSSAT.** 2007. 151 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fitotecnia, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2007.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p. 239-250, 2002.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M.M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of experimental botany.**v.62, p.869-882, 2011.

PUTRI, S.P. et al. Current metabolomics: Practical applications**. Journal ofBiosciences and Bioengeneering**, v.X, p.1-10, 2012.

PUTRI, S.P. et al. Current metabolomics: Technological advances. **JournalofBiosciencesandBioengeneering**v.X, p.1-11, 2013.

QUEIROZ, R.J.B.**Resposta fisiológica e molecular de dois genótipos de milho à limitação hídrica.** 2010. 154f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Agronomia, Faculdade de Ciências Agrarias e Veterinárias, Jaboticabal, 2010

REGUERA M, PELEG Z, BLUMWALD E. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. **BiochimicaEtBiophysica Acta**, Davis, Usa, p.186-194, 2012.

RESENDE, N.M.**Análises metabólica e metabolômica de atleta olímpico: Uma nova proposta para um *nexus*bioquímico.** 2010. 95f. Dissertação (mestrado) - Pós-graduação em genética e bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

SANCHES, R.F.E. **Relações hídricas e respostas ao déficit hídrico da espécie *Bauhiniaforficata*Link: mecanismos de manutenção do status hídrico.** 2012. 78f. Dissertação (mestrado) – Pós-graduação em fisiologia e bioquímica de plantas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2012.

SHULAEV, V.; CORTES, D.; MILLER, G.; MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response.**PhysiologiaPlantarum**, Blacksburg, Usa, n. 132, p.199-208, 2008.

SILVA, S.R.S.; Demuner, A.J.; Barbosa, L.C.A.; Casali, V.W.D.; Nascimento, E.A.; Pinheiro, A.L. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de MelaleucaalternifoliaCheel. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p.1363-1368, 2002.

SOUSA, C.C.M. **Influência do estresse hídrico e da compactação do solo na associação nematóide, rizobactérias e fungos micorrízicosarbusculares.** 2013. 137f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Engenharia Agrícola**,** Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.**Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.

TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W. H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science's compass review**, v. 292, p. 281-284, 2001.

URANO, K.; KURIHARA, Y.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K. 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses.**Current Opinion In Plant Biology**, Tsukuba, Japao, n. 13, p.132-138, 2010.

XIAO, J.F.;ZHOU, B.; RESSOM, H.W. **Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics.**Trends in Analytical Chemistry, v.32, p.1-14, 2012.

WECKWERTH, W.; MORGENTHAL, K. Metabolomics: from patterns recognition to biological interpretation. **Drugdiscoverytoday: targets**, v.10, p.1551-1558,2005.

CAPÍTULO I - RESPOSTA FISIOLÓGICA EM PLÂNTULAS DE SOJA SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi a identificação de parâmetros morfológicos e fisiológicos de diferentes variedades de soja submetidas a déficit hídrico, permitindo selecionar as variedades em tolerante, intermediária e suscetível, a este estresse. Foram utilizados dois tamanhos de sementes de oito variedades de soja no estágio V1 submetidas aos tratamentos irrigado (controle) e com suspensão total de rega (tratamento com estresse hídrico). As avaliações da massa fresca e o comprimento de diferentes estruturas foram realizadas durante seis dias consecutivos. Além da biometria morfológica foi feito o monitoramento da eficiência quântica potencial do fotossistema II de três variedades selecionadas, durante sete dias, utilizando-se um fluorômetro portátil. Plantas obtidas de sementes 6,5 mm apresentaram maior diferenciação entre os tratamentos nas análises morfológicas, sendo confirmado pela avaliação fisiológica. O conjunto dos resultados permitiu selecionar e classificar as variedades como suscetíveis ("Anta 82" e "BRSMG 811c RR"), intermediárias ("CD 250 RR", "MG/BR 46 (Conquista)", "BRS Favorita RR" e "BMX Potência RR") e tolerantes ("M-7908 RR" e "BRSMG 68 (Vencedora)") ao déficit hídrico.

Termos para indexação:*Glycinemax*, tamanho de semente, déficit hídrico.

1. Introdução

O Brasil é, atualmente, o segundo maior produtor mundial de soja, ficando atrás apenas dos EUA (Conab, 2013). Em função da boa aceitação das novas tecnologias, por parte dos produtores, associada ao relevante esforço dos programas de melhoramento de soja, a produtividade da cultura tem aumentado consideravelmente (Texeiraet al., 2008). Porém, problemas das mais variadas

ordens podem surgir durante o cultivo. Agentes causadores de estresses, como déficit hídrico, temperaturas extremas e desequilíbrio de íons, estão entre as principais condições de estresse abiótico que reduzem o crescimento das plantas e resultam em significativas perdas na produtividade.

De todos os fatores inerentes a produção agrícola, o clima aparece como aquele de mais difícil controle e maior ação sobre as máximas produtividades (Farias et al., 2007). Fato que ocorreu com a safra de soja, do ano agrícola 2011/12, onde as condições climáticas adversas caracterizadas por estiagens prolongadas causadas pelo fenômeno “La Niña” foram responsáveis pela redução de 11,8% em relação a safra anterior (Conab 2013).

A limitação na disponibilidade de água para a planta pode modificar sua estrutura fisiológica e morfológica provocando uma situação de estresse hídrico. Esta situação altera a coloração e a estrutura do dossel, fenômenos diretamente relacionados com suas propriedades reflectivas. A limitação de água também pode diminuir a velocidade da germinação ou até impedi-la. Em trabalhos relacionados com embebição, considerando-se diferentes tamanhos de sementes, têm-se constatado que as sementes de menor tamanho atingem teores de água superiores aos observados para sementes de maior tamanho (Caleroet al., 1981; Souza, 1996; Beckert et al., 2000; Costa et al., 2004). Esse fato está relacionado à maior área de contato por unidade de massa, nas sementes menores.

O desenvolvimento de cultivares tolerantes a seca não é uma tarefa fácil, já que essa característica depende de um mecanismo fisiológico complexo (Casagrande et al., 2001; Texeira et al., 2008). No entanto, o conhecimento antecipado de indicadores morfológicos de respostas da soja à condições hídricas tende a auxiliar o empreendedor agrícola na busca de estratégias mais seguras para as tomadas de decisões (Martorano et al., 2014).

O presente trabalho visou identificar parâmetros morfológicos, fisiológicos e de tamanho das sementes de diferentes variedades de soja submetidas à limitação de água, que permitam selecionar tais variedades em tolerante, intermediária e suscetível, ao estresse hídrico.

2. Material e métodos

Os experimentos foram instalados no laboratório de Fitopatologia, Bioquímica e Biologia Molecular localizado na Universidade Federal de Viçosa / *Campus* de Rio Paranaíba e no laboratório de Fisiologia e Bioquímica, localizado no Instituto de Botânica da Secretária do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. As análises foram conduzidas em incubadora BOD (Biochemicaloxygendemand), em condições controladas de temperatura a 25^{o}C e fotoperíodo de 12 horas. Foram utilizados vasos plásticos de 300 mL preenchidos com areia lavada de granulometria média, para o plantio de dois tamanhos de sementes de soja (6,5 mm e 5,5 mm) de oito variedades comerciais (Anta 82; BRSMG 811c RR; CD 250 RR; MG/BR 46 (Conquista); BRS Favorita RR; M-7908 RR; BMX Potência RR e BRSMG 68 (Vencedora)).

Irrigação diária, com água suficiente para elevar a umidade do substrato de cultivo à capacidade de campo, foi realizada até as plântulas atingirem o estádio V1 (Fehr e Caviness, 1977), a partir do qual foram submetidas à dois tratamentos: plântulas irrigadas (controle) e não-irrigadas (tratamento com déficit hídrico).

As avaliações morfológicas foram realizadas conforme Mohammadiaet al. (2012), com modificações. Avaliou-se a massa fresca das folhas unifolioladas, folhas cotiledonares, epicótilo, hipocótilo, raiz completa, raiz secundária e raiz principal. Aferiu-se também o comprimento do epicótilo, hipocótilo e raiz principal. As mensurações foram realizadas utilizando balança de precisão e régua milimétrica. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, no esquema fatorial 8 x 2 x 2 x 6, para testar os efeitos de oito variedades comerciais de soja, dois tamanhos de sementes, duas condições hídricas e tempo de duração dos tratamentos de seis dias.

Baseando-se nos resultados obtidos das análises morfológicas, foram selecionadas sementes de tamanho 6,5 mm de três variedades de soja supostamente tolerante, intermediária e susceptível ao déficit hídrico, para serem submetidas à determinação da fluorescência da clorofila *a*. Para tal, foi realizado o delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições, no esquema fatorial

3x 2 x 7 (três variedades de soja, duas condições hídricas e sete dias - duração total do tempo de tratamento). Foi realizado o monitoramento da eficiência quântica potencial do fotossistema II (Fv/Fm) nas plântulas no estádio V1, utilizando um fluorômetro portátil (O5sp – Opti-Sciences, Inc., Tyngsboro, MA) que utiliza pulso modulado para determinar este parâmetro de fluorescência da clorofila *a*. O Fv/Fm foi determinado na face adaxial das folhas após 30 minutos de adaptação ao escuro. Os dados obtidos foram avaliados por meio de análise de variância e a comparação das médias através do teste t a 5 % de significância, com uso do programa Sisvar (Ferreira, 2008), sem necessidade de transformação dos dados.

Para a identificação das estruturas que melhor representou a resposta das plântulas ao efeito do estresse hídrico, utilizou-se a análise fatorial pelo método de componentes principais, utilizando o programa STATISTICA (Hill &Lewicki, 2007).

3. Resultados e discussão

Com base nas variáveis morfológicas (massa fresca das folhas unifolioladas, folhas cotiledonares, epicótilo, hipocótilo, raiz completa, raiz secundária, raiz principal e comprimento do epicótilo, hipocótilo e raiz principal) das oito variedades de soja submetidas aos tratamentos controle e de déficit hídrico verificou-se que o tempo de duração do estresse influenciou diretamente na resposta da planta a seca. A distinção das variedades quanto ao nível de sensibilidade ao estresse hídrico no presente estudo se deu em função do tempo em dias, onde observaram-se diferenças estatísticas significativas entre a maioria das variáveis analisadas a partir do quarto dia de tratamento (Tabela 1). O resultado da análise de variância demonstrou a existência de interações significativas, entre variedades e condição hídrica, para todas as variáveis determinadas (Tabelas 1), apenas para avaliações da maioria dos tamanhos das estruturas foi que não houve diferença entre as condições hídricas.

Analisando os dados da Tabela 2, observou-se que a variedade BRSMG 811c RR submetida a irrigação apresentou maior massa fresca de folhas unifoliola das, diferindo estatisticamente das demais. A mesma variedade submetida ao tra-

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as estruturas morfológicas analisadas 4 dias após inicio do déficit hídrico (DAI) e 6 DAI, de oito variedades de soja, peneira 6,5 mm, sob irrigação e com indução de déficit hídrico

FV	FOLHAS UNIFOLIOLADAS		EPICOTILO		HIPOCOTILO		RAIZ COMPLETA		RAIZ SECUNDARIA	
	4 DAI	6 DAI	4 DAI	6 DAI	4 DAI	6 DAI	4DAÍ	6 DAI	4 DAI	6 DAI
F Variedades	97,1 **	80,9 **	21,7 **	36,3 **	56,6 **	101,6 **	27,1 **	21,1 **	29,0 **	21,0 **
F Condição Hídrica	130,5 **	643,2 **	29,6 **	402,5 **	38,2 **	419,8 **	97,8 **	635,0 **	27,3 **	304,5 **
F (V x CH)	33,8 **	43,2 **	9,6 **	30,2 **	5,0 **	45,8 **	18,7 **	34,8 **	13,7 **	30,6 **
CV (%)	9,6	13,3	11,7	13,6	8,7	10,7	10,4	12,9	17,5	16,5

FV	FOLHAS COTILEDONARES		TAMANHO EPICOTILO		TAMANHO HIPOCOTILO		RAIZ PRINCIPAL		TAMANHO DA RAIZ PRINCIPAL	
	4 DAI	6 DAI	4 DAI	6 DAI	4 DAI	6 DAI	4DAÍ	6 DAI	4 DAI	6 DAI
F Variedades	9,8 **	33,6 **	16,3 **	28,0 **	36,4 **	72,1 **	56,4 **	18,8 **	13,6 **	18,9 **
F Condição Hídrica	68,6 **	714,7 **	1,3 ns	90,9 **	2,8 ns	2,4 ns	144,7 **	519,5 **	2,8 ns	0,6 ns
F (V x CH)	14,6 **	62,5 **	8,3 **	12,1 **	5,4 **	5,3 **	31,9 **	28,6 **	7,4 **	11,2 **
CV (%)	12,2	10,9	8,4	8,4	7,6	8,3	8,9	15,3	11,9	11,2

[1] FV: fonte de variação; [ns] não significativo; e ** significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

tamento com suspensão da rega apresentou um valor de massa fresca de folhas unifolioladas bem inferior ao tratamento controle e sem diferença significativa quando comparada as outras variedades. Isso possivelmente está relacionado a sensibilidade desta variedade ao déficit hídrico. A variedade M-7908 RR que diferiu estatisticamente no segundo e terceiro dia após inicio do déficit hídrico (DAI), teve uma redução de 26,1% e 14,3%, não diferenciando estatisticamente entre controle e tratamento, no quarto e sexto DAI, respectivamente, mostrando assim uma recuperação média de 11,8% entre o dia quatro e seis.

Segundo Taiz e Zeiguer (2013), em condições de estresse hídrico, as plantas tendem a aumentar a massa das raízes, de forma a cobrirem uma maior área em busca de água, conseguindo assim tolerar o déficit hídrico. No presente estudo, a variedade M-7908 RR tratamento, aumentou gradativamente sua massa em comparação com o controle, indo de 12% a mais que a controle no quarto DAI, para 20% no sexto, sendo a única a obter aumentos em ambos os dias.

Resposta das plantas a agentes estressores é um processo dinâmico e diretamente dependente da intensidade e duração do estresse (Taiz&Zeiger, 2013). As etapas de tal resposta podem ser classificadas em fases, a fase de alarme, a fase de aclimatação, fase de manutenção e a fase de exaustão (Kosováet al., 2011). A fase inicial de alarme provoca um choque nas plantas não-aclimatadas, e como consequência há a diminuição no nível de tolerância ao estresse. Na fase de aclimatação ocorre um aumento da tolerância da planta, que é contínua na fase de manutenção, quando uma homeostase recém criada é mantida sob as condições de estresse. Se a duração das condições adversas for prolongada, a planta alcança a fase de exaustão, onde pode ocorrer a diminuição do nível de tolerância ao estresse em decorrência da desestabilização da homeostase induzida pelo agente estressor.

Os resultados indicaram que as variedades de soja analisadas responderam de forma distinta ao déficit hídrico. Na Figura 1 é apresentada a massa fresca das diferentes estruturas da variedade M-7908 RR submetidas aos dois tratamentos hídricos. Houve diferença significativa entre os tratamentos apenas em relação a massa fresca das folhas unifolioladas no segundo e terceiro dia de restrição hídrica, após esse período verificou-seuma recuperação ao longo

Tabela 2. Massa fresca das estruturas avaliadas nas variedades de soja, peneira 6,5 mm, sob irrigação (C) e com indução de déficit hídrico (T), 4 e 6 dias após o início do déficit hídrico (DAI)

VARIEDADE	FOLHAS UNIFOLIOLADAS				FOLHAS COTILEDONARES			
	4 DAI		6 DAI		4DAÍ		6 DAI	
	T	C	T	C	T	C	T	C
Anta 82	0,07 Aa	0,14 Aabc	0,01 Aa	0,17 Bab	0,35 Aabc	0,63 Bab	0,09 Aa	0,52 Ba
BRSMG 811c RR	0,10 Aa	0,25 Bc	0,05 Aa	0,31 Bb	0,26 Aab	0,75 Bb	0,08 Aa	0,62 Ba
CD 250 RR	0,12 Aa	0,11 Aab	0,02 Aa	0,10 Aa	0,55 Acd	0,63 Aab	0,11 Aab	0,64 Ba
MG/BR 46 (Conquista)	0,05 Aa	0,09 Aa	0,01 Aa	0,11 Aab	0,23 Aa	0,53 Bab	0,04 Aa	0,49 Ba
BRS Favorita RR	0,08 Aa	0,08 Aa	0,05 Aa	0,12 Aab	0,49 Abcd	0,51 Aa	0,19 Aabc	0,51 Ba
BMX Potência RR	0,11 Aa	0,11 Aab	0,02 Aa	0,13 Aab	0,39 Aabc	0,54 Bab	0,10 Aa	0,51 Ba
M-7908 RR	0,17 Aa	0,23 Abc	0,18 Aa	0,21 Aab	0,67 Ad	0,61 Aab	0,58 Ac	0,54 Aa
BRSMG 68 (Vencedora)	0,09 Aa	0,10 Aab	0,10 Aa	0,11 Aab	0,57 Acd	0,52 Aa	0,53 Abc	0,39 Aa
dms variedade	0,129		0,200		0,235		0,432	
dms condição hídrica	0,081		0,126		0,148		0,272	

Continuação...

VARIEDADE	EPICOTILO				TAMANHO EPICOTILO			
	4 DAI		6 DAI		4DAÍ		6 DAI	
	T	C	T	C	T	C	T	C
Anta 82	0,12 Aa*	0,23 Bab	0,01 Aa	0,23 Ba	10,7 Aa	14,4 Bab	10,1 Aab	14,7 Aa
BRSMG 811c RR	0,11 Aa	0,18 Aa	0,05 Aa	0,19 Ba	10,9 Aa	10,4 Aa	8,2 Aa	10,9 Aa
CD 250 RR	0,23 Aab	0,34 Bb	0,06 Aa	0,30 Ba	15,6 Aa	18,4 Ab	10,8 Aab	16,0 Ba
MG/BR 46 (Conquista)	0,18 Aab	0,19 Aa	0,02 Aa	0,21 Ba	11,9 Aa	14,8 Aab	10,3 Aab	17,6 Ba
BRS Favorita RR	0,21 Aab	0,25 Aab	0,12 Aab	0,21 Aa	15,0 Aa	14,9 Aab	11,9 Aab	12,9 Aa
BMX Potência RR	0,17 Aab	0,18 Aa	0,05 Aa	0,23 Ba	13,1 Aa	12,2 Aa	11,4 Aab	17,3 Ba
M-7908 RR	0,26 Ab	0,20 Aa	0,29 Ab	0,23 Aa	15,2 Aa	10,8 Ba	17,1 Ab	14,3 Aa
BRSMG 68 (Vencedora)	0,17 Aab	0,18 Aa	0,21 Aab	0,26 Aa	13,8 Aa	13,3 Aa	17,3 Ab	18,6 Aa
dms variedade	0,130		0,228		4,93		8,08	
dms condição hídrica	0,082		0,143		3,10		5,09	

VARIEDADE	HIPOCOTILO				TAMANHO HIPOCOTILO			
	4 DAI		6 DAI		4DAÍ		6 DAI	
	T	C	T	C	T	C	T	C
Anta 82	0,24 Aa	0,36 Aa	0,04 Aa	0,24 Aa	10,3 Aa	11,8 Aab	9,5 Aab	8,7 Aa
BRSMG 811c RR	0,22 Aa	0,26 Aa	0,09 Aab	0,25 Aa	10,7 Aa	8,4 Aa	8,1 Aa	8,0 Aa
CD 250 RR	0,28 Aa	0,39 Aa	0,08 Aab	0,29 Aa	9,2 Aa	11,2 Aab	7,9 Aa	7,3 Aa
MG/BR 46 (Conquista)	0,42 Aa	0,44 Aa	0,03 Aa	0,41 Ba	13,9 Aa	14,5 Aab	13,0 Aab	14,8 Aa
BRS Favorita RR	0,46 Aa	0,49 Aa	0,34 Aab	0,44 Aa	14,0 Aa	15,3 Ab	18,2 Ab	14,8 Aa
BMX Potência RR	0,23 Aa	0,32 Aa	0,02 Aa	0,24 Ba	9,3 Aa	11,1 Aab	8,6 Aa	8,9 Aa
M-7908 RR	0,33 Aa	0,31 Aa	0,38 Ab	0,40 Aa	11,0 Aa	9,4 Aab	12,0 Aab	13,5 Aa
BRSMG 68 (Vencedora)	0,23 Aa	0,23 Aa	0,29 Aab	0,21 Aa	9,3 Aa	9,3 Aab	12,3 Aab	10,3 Aa
dms variedade	0,271		0,335		6,17		9,44	
dms condição hídrica	0,171		0,211		3,88		5,94	

Continuação...

VARIEDADE	RAIZ COMPLETA				RAIZ SECUNDARIA			
	4 DAI		6 DAI		4DAÍ		6 DAI	
	T	C	T	C	T	C	T	C
Anta 82	0,13 Aa	0,28 Ba	0,06 Aa	0,27 Aa	0,05 Aa	0,05 Aa	0,03 Aab	0,03 Aa
BRSMG 811c RR	0,14 Aa	0,44 Ba	0,05 Aa	0,33 Ba	0,07 Aabc	0,23 Bb	0,03 Aab	0,12 Bab
CD 250 RR	0,40 Ab	0,38 Aa	0,11 Aa	0,37 Ba	0,16 Abc	0,15 Aab	0,05 Aab	0,17 Bb
MG/BR 46 (Conquista)	0,30 Aab	0,32 Aa	0,02 Aa	0,45 Ba	0,06 Aab	0,11 Aa	0,00 Aa	0,15 Bb
BRS Favorita RR	0,30 Aab	0,43 Aa	0,14 Aa	0,49 Ba	0,07 Aab	0,09 Aa	0,05 Aab	0,14 Bab
BMX Potência RR	0,19 Aa	0,40 Ba	0,07 Aa	0,45 Ba	0,08 Aabc	0,13 Aab	0,04 Aab	0,18 Bb
M-7908 RR	0,47 Ab	0,42 Aa	0,36 Aa	0,30 Aa	0,19 Ac	0,15 Aab	0,12 Ab	0,09 Aab
BRSMG 68 (Vencedora)	0,29 Aab	0,34 Aa	0,28 Aa	0,37 Aa	0,10 Aabc	0,11 Aa	0,10 Aab	0,14 Aab
dms variedade	0,214		0,364		0,118		0,112	
dms condição hídrica	0,135		0,229		0,074		0,071	

VARIEDADE	RAIZ PRINCIPAL				TAMANHO DA RAIZ PRINCIPAL			
	4 DAI		6 DAI		4DAÍ		6 DAI	
	T	C	T	C	T	C	T	C
Anta 82	0,09 Aab	0,22 Bab	0,03 Aa	0,21 Ba	16,6 Ab	13,8 Aabc	14,0 Aa	12,2 Aab
BRSMG 811c RR	0,05 Aa	0,17 Ba	0,02 Aa	0,19 Ba	16,2 Ab	12,4 Aab	12,7 Aa	12,7 Aab
CD 250 RR	0,21 Abc	0,21 Aab	0,06 Aa	0,17 Aa	15,0 Aab	8,2 Ba	13,3 Aa	7,0 Ba
MG/BR 46 (Conquista)	0,24 Ac	0,19 Aab	0,02 Aa	0,25 Ba	8,8 Aa	11,9 Aab	11,5 Aa	12,2 Aab
BRS Favorita RR	0,21 Abc	0,33 Bb	0,09 Aa	0,33 Ba	16,5 Ab	14,4 Aabc	11,5 Aa	12,6 Aab
BMX Potência RR	0,08 Aab	0,24 Bab	0,02 Aa	0,28 Ba	16,8 Ab	15,4 Abc	15,0 Aa	21,5 Bc
M-7908 RR	0,25 Ac	0,23 Aab	0,22 Aa	0,19 Aa	15,3 Aab	19,8 Bc	15,7 Aa	10,4 Ba
BRSMG 68 (Vencedora)	0,18 Aabc	0,21 Aab	0,16 Aa	0,20 Aa	16,5 Ab	19,0 Abc	15,6 Aa	18,0 Abc
dms variedade	0,147		0,233		7,12		6,48	
dms condição hídrica	0,092		0,146		4,48		4,08	

*Médias seguidas da mesma letra, minúscula, para a comparação entre genótipos, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e maiúscula para a comparação entre regimes hídricos, na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de t de Student a 5% de probabilidade

da fase de alarme,evitando assim a exaustão metabólica. Entretanto, 80% das estruturas das plantas submetidas a restrição de água não diferiram do tratamento controle ao longo do tempo. As variedades M-7908 RR e BRSMG 68 apresentaram comportamentos semelhantes e também os melhores desempenhos nas análises de massa fresca, sinalizando uma boa resposta diante da restrição de água. Tais variedades foram classificadas como tolerantes ao déficit hídrico. Resultado semelhante foi relatado por Catuchiet al. (2012) estudando as respostas de biomassa e área foliar nas cultivares BR 48 (tolerante) e EMBRAPA 16 (sensível). Neste estudo houve redução das características de ambos os cultivares, exceto da massa seca da raiz da cultivar Embrapa 48, que se manteve inalterado sob condições de restrição de água. Segundo Santos &Carlesso (1998) este fenômeno ocorreu devido a uma expansão do sistema radicular para atingir áreas mais profundas, onde ainda há umidade.

Outras variedades submetidas ao déficit hídrico apresentaram diferenças significativas de massa fresca quando comparadas ao controle, a partir do quarto dia de tratamento (Figura 2). Verificou-se que o tempo prolongado de seca afetou significativamente o desempenho da Anta 82 e BRSMG 811c RR nos testes de biomassa fresca. Essas variedades foram mais sensíveis ao estresse, não apresentando uma recuperação durante a fase de manutenção. Também foi observado que a maioria das plantas selecionadas apresentaram uma resposta intermediária ao estresse imposto, como foi o caso da CD 250 RR, MG/BR 46 (Conquista), BRS Favorita RR e BMX Potência RR. Analisando a Figura 3, verificou-se que parâmetros de biomassa fresca de algumas estruturas da soja BRS Favorita RR não foram significativamente diferentes aos encontrados no tratamento controle. A resposta dessa variedade ao estresse foi observada tardiamente, já que houve diminuição da massa fresca da raiz completa e de folhas cotiledonares no sexto dia de tratamento.

Nóbrega et al. (2009), avaliando germinação e crescimento de plântulas de soja em detrimento a agentes estressores, ocasionados por possíveis interações alelopáticas, aferiu o comprimento, massa fresca e seca do hipocótilo, pelos quais não detectou diferenças significativas para estas estruturas em resposta ao estresse. No presente trabalho também foram observados que massa fresca, tamanho do epicótilo e tamanhoda raiz principal nãoapresentaram diferenças em

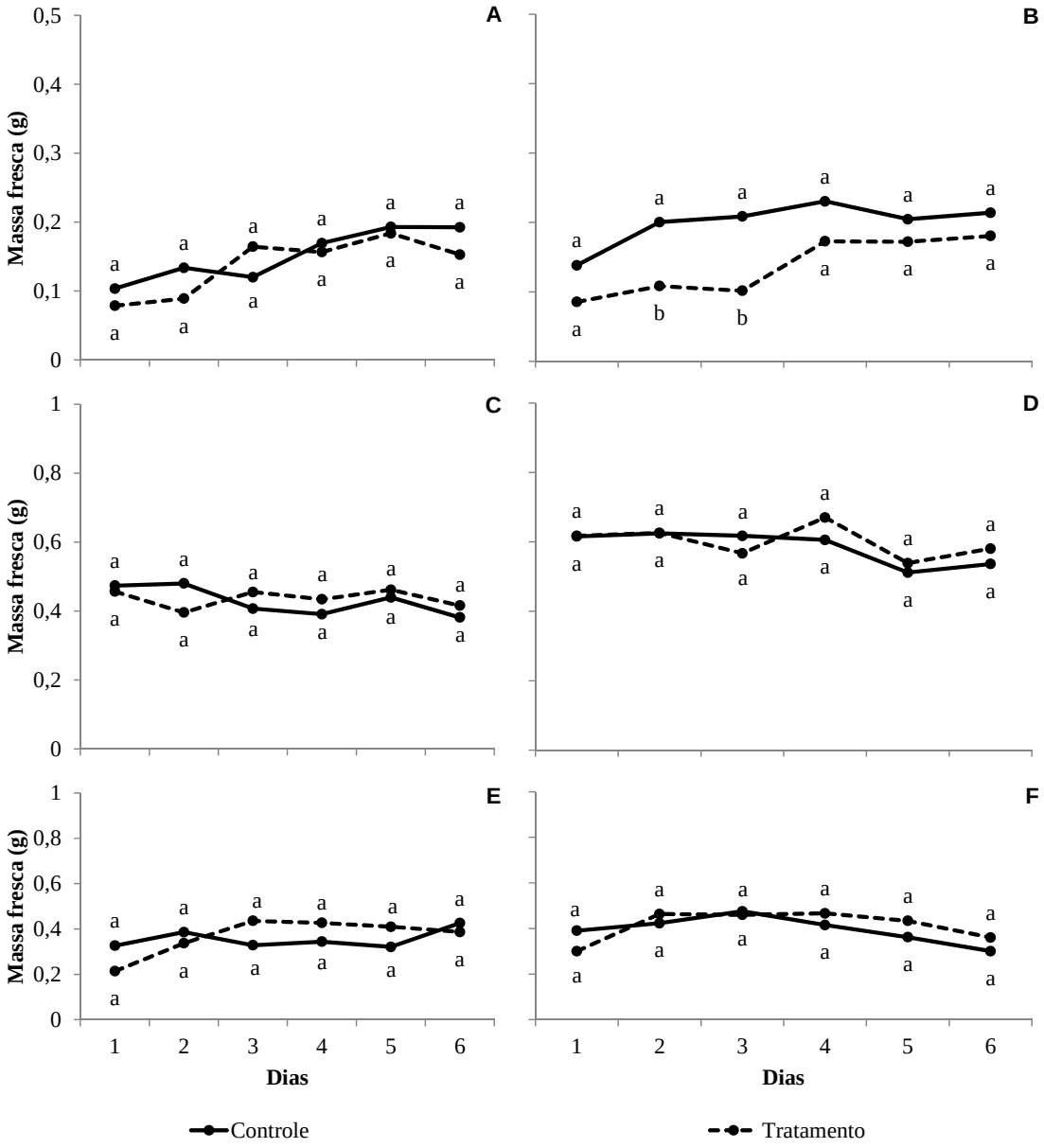

Figura 1. Valores médios de massa fresca (g) de folhas unifolioladas (A;B), folhas cotiledonares (C;D) e raízes completas (E;F) oriundas de sementes 5,5 mm (A;C;E) e 6,5 mm (B;D;F) da variedade de soja M-7908 RR submetida a irrigação (controle) e a restrição hídrica (tratamento) em função do tempo

relaçãoao tratamento controle. Dessa forma infere-se que análises biométricas de tais estruturas não são indicadas como parâmetros de seleção de variedades de plântulas de soja submetidas ao déficit hídrico.A massa fresca da raiz secundária

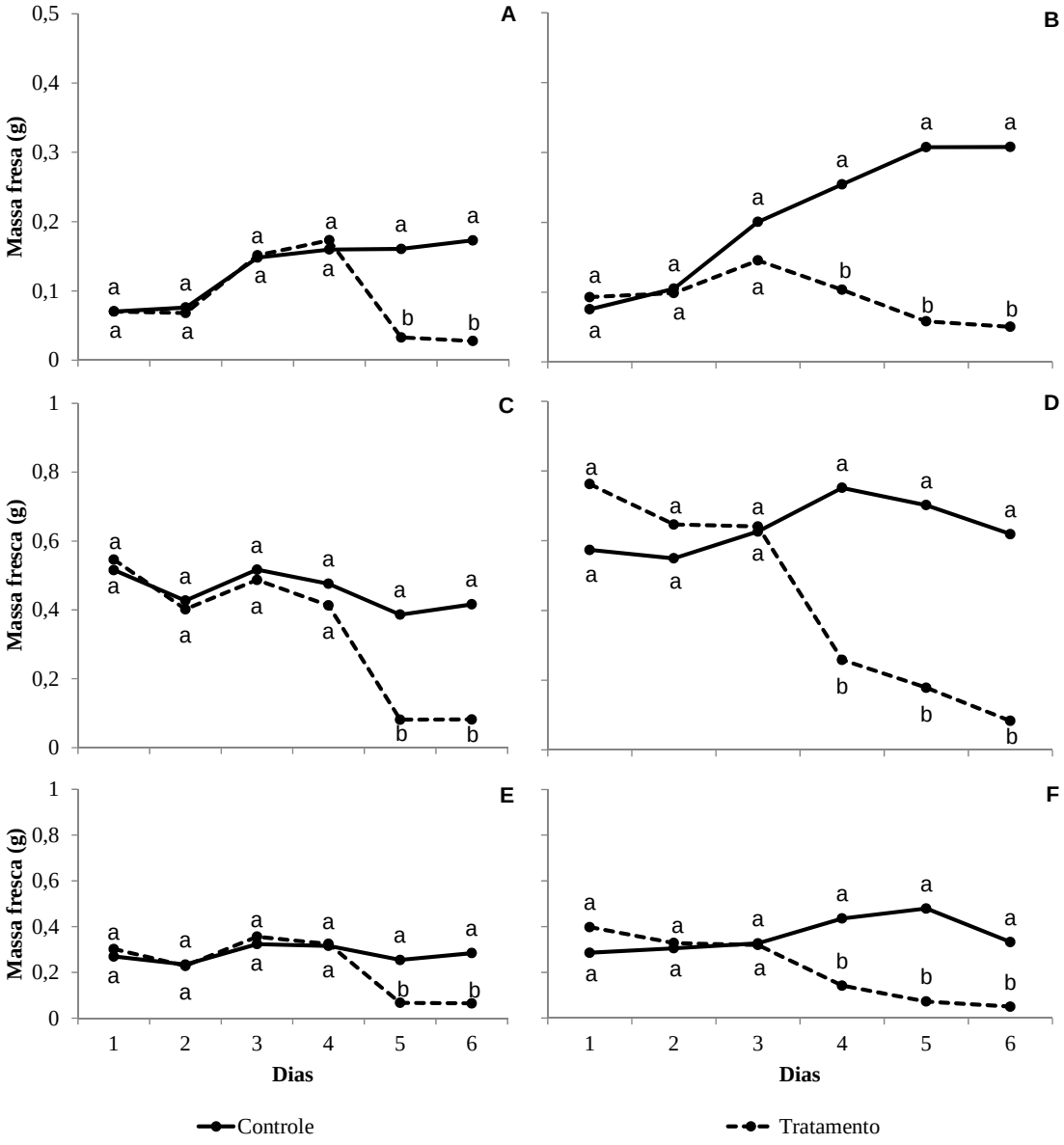

Figura 2. Valores médios de massa fresca (g) de folhas unifolioladas (A;B), folhas cotiledonares (C;D) e raízes completas (E;F) oriundas de sementes 5,5 mm (A;C;E) e 6,5 mm (B;D;F) da variedade de soja BRSMG 811c RR submetida a irrigação (controle) e a restrição hídrica (tratamento) em função do tempo

eda raiz principal, apesar de boa representatividade nos efeitos do estresse hídrico sobre as plântulas, não foram utilizados para as análises subsequentes por considerar que a variável raiz completa é satisfatória para representar os efeitos no sistema radicular.

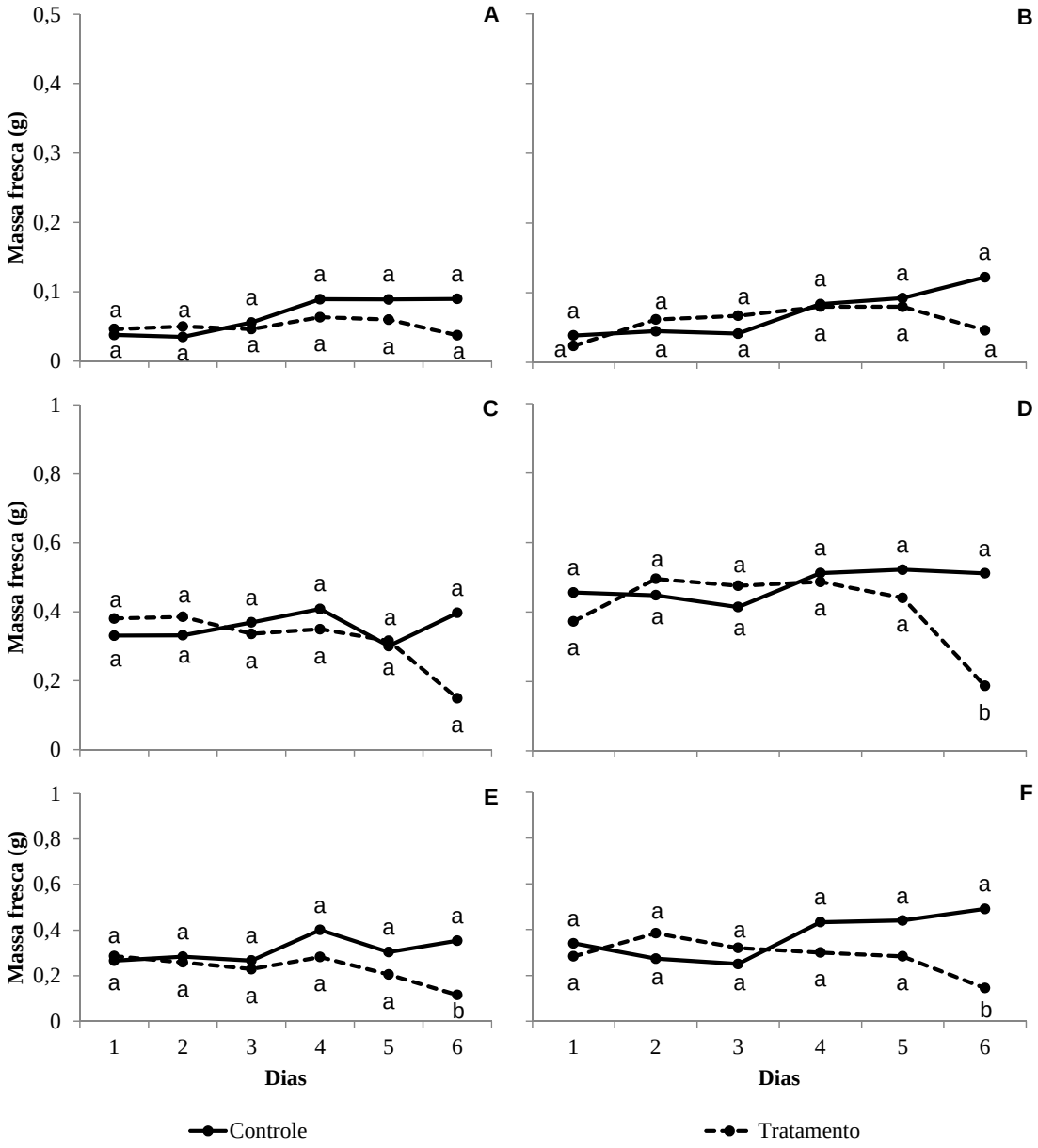

Figura 3. Valores médios de massa fresca (g) de folhas unifolioladas (A;B), folhas cotiledonares (C;D) e raízes completas (E;F) oriundas de sementes 5,5 mm (A;C;E) e 6,5 mm (B;D;F) da variedade de soja BRS Favorita RR submetida a irrigação (controle) e a restrição hídrica (tratamento) em função do tempo

Segundo Neumaieret al. (2000), a redução da biomassa de plântulas de soja sob condições de déficit hídrico está relacionada à diminuição das taxas de fotossíntese. Notou-se que as variedades sensíveis tiveram maior perda na produção de massa fresca do que as variedades tolerantes, principalmente na estrutura da folha cotiledonar de sementes 6,5 mm. Tal fato pode ser justificado por estas estarem mudando de heterotróficas para autotróficas, mas ainda são dependentes das reservas cotiledonares.

Quanto ao tamanho das sementes, sabe-se que a limitação de água pode diminuir a velocidade de germinação ou até impedi-la e afetar o desenvolvimento das plantas. A primeira etapa na seqüência de eventos da germinação é a embebição, um tipo de difusão que ocorre quando as sementes absorvem água (Costa et al., 2004). Em condições de deficiência hídrica sementes de diferentes tamanhos podem apresentar comportamentos distintos. No entanto, não foi observada diferença entre os tamanhos de sementes testados no que se refere ao desenvolvimento de plântulas em resposta a diminuição do potencial hídrico (Figuras 1, 2 e 3).

Foram realizadas determinações da fluorescência da clorofila, que continuam a ser o principal método para estudar a regulação fotossintética e a resposta das plantas aos estímulos ambientais (Wituszynskaet al., 2013). A medição da fluorescência da clorofila em resposta a luz modulada permite determinar uma grande variedade de limitações bioquímicas e biofísicas da fotossíntese. Além disso, permite monitorar um aumento rápido na fluorescência ao proporcionar informação sobre a atividade fotoquímica do fotossistema II e sobre o destino provável da energia absorvida. A Tabela 3 apresenta o efeito da ausência de água no fotossistema II. Houve diminuição da eficiência quântica potencial do fotossistema II no primeiro dia da suspensão de rega na variedade tolerante, a qual veio a se recompor e normalizar seus processos fisiológicos, enquanto que a variedade sensível, após o sétimo dia, começou a não mais manter o pleno funcionamento de sua atividade fotossintética, iniciando sua diferenciação entre tratamento e controle. Estas diminuições em Fv/Fm se deve ao aumento da excitação de energia no fotossistema II, e sua diminuição pode estar relacionada a um baixo fluxo no transporte de elétron, refletindo numa menor taxa fotossintética (Zobiole et al., 2011). Sob condições de déficit hídrico, ocorre redução da concentração intercelular de CO_2, em razão do fechamento estomático, gerando decréscimos na assimilação do CO_2 e na eficiência quântica do fotossistema II (Baker, 2004). Além disso, podem ocorrer limitações em componentes não estomáticos, com danos nos centros de reação do fotossistema II, os quais podem apresentar reversão parcial após reidratação (Angelopouloset al. 1996). Para Casagrande et al. (2001), o déficit hídrico pode afetar a eficiência do processo fotossintético, de forma direta, na desidratação do citoplasma, e indiretamente, com fechamento estomático. A máxima eficiência quântica do fotossistema II

(Fv/Fm), em que a razão reflete a máxima eficiência com que a luz absorvida pelo complexo antena do fotossistema II é convertida em energia química (Fritsche-Neto & Borem, 2011), tem se mostrado como boa referência para diagnosticar a integridade do sistema fotossintético em diferentes espécies em condições de estresse e como método de triagem para seleção de genótipos eficientes no uso da água.

Tabela 3. Monitoramento da eficiência quântica potencial do fotossistema II, em três variedades de soja, submetidas a dois tratamentos hídricos por 7 dias consecutivos[(1)]

Variedades	Condição	Dia						
		1	2	3	4	5	6	7
BRSMG 811c RR	Tratamento	0,775 a	0,783 a	0,797 a	0,791 a	0,791 a	0,782 a	0,507 b
	Controle	0,785 a	0,792 a	0,791 a	0,791 a	0,798 a	0,813 a	0,813 a
BRS Favorita RR	Tratamento	0,793 a	0,806 a	0,801 a	0,802 a	0,804 a	0,806 a	0,798 a
	Controle	0,787 a	0,791 a	0,799 a	0,804 a	0,820 a	0,825 a	0,819 a
M-7908 RR	Tratamento	0,662 b	0,786 a	0,798 a	0,804 a	0,810 a	0,807 a	0,790 a
	Controle	0,782 a	0,792 a	0,803 a	0,795 a	0,815 a	0,818 a	0,822 a

[(1)]Médias seguidas de letras iguais entre as condições hídricas dentro de cada cultivar, não diferem pelo teste de t de Student, a 5% de probabilidade

Em conformidade a este trabalho, no experimento realizado por Catuchiet al. (2012), seus resultados das avaliações de biomassa se assemelhara aos dados de atividade fotossintética das plantas, os resultados de biomassa, no geral, foram reduzidos pela deficiência hídrica. Justificando tal resultado, eles afirmam que isso ocorreu em função da queda na atividade fotossintética das plantas causada pelo déficit hídrico, o que resultou em decréscimo no acúmulo de carboidratos.

A análise fatorialpelo método dos componentes principais vem sendo utilizado para reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema mais conveniente para a análise de dados. Neste método é possível a redução do número de variáveis e julgar a importância delas do ponto de vista estatístico(Santiet al., 2012). Na Figura 4 buscou-se identificar as estruturas que apresentaram melhor resposta ao estresse por déficit hídrico através de uma interpretação biológica dos dados em um sistema mais conveniente, sendo observado que as que tiveram o escore mais alto no componente principal 1, que detêm a maior representatividade, respondendo por 44,1%, foram raiz completa e suas frações e as folhas cotiledonares e unifolioladas.

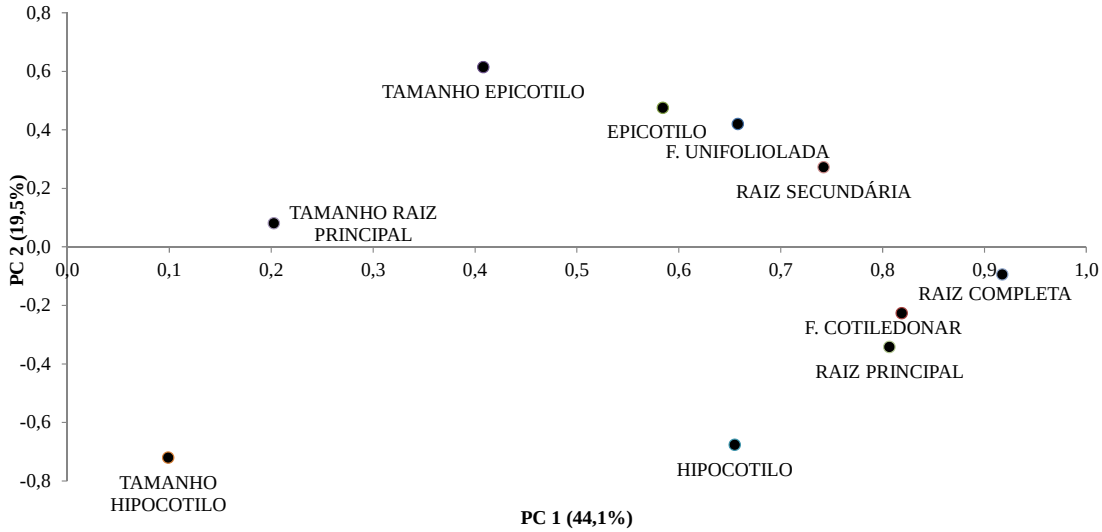

Figura 4. Plotagem dos escores dos componentes quanto às relações entre as variáveis das estruturas avaliadas

4. Conclusões

1. Características morfológicas que melhor distinguem-se em déficit hídrico: Folha unifolioladas; Folha cotiledonar e Raiz completa.
2. Análise da eficiência quântica potencial do fotossistema II é representativo a análise de massa fresca de folha unifolioladas.
3. Reação ao estresse hídrico: Sensível (Anta 82 e BRSMG 811c RR); Intermediária (CD 250 RR; MG/BR 46 (Conquista); BRS Favorita RR; BMX Potência RR); Tolerante (M-7908 RR; BRSMG 68 (Vencedora)).

5. Referências bibliográficas

ANGELOPOULOS, K.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C. Inhibition of photosynthesis in olive trees (Olea europaea L.) during water stress and rewatering.**J. Exp. Bot.**, v. 47, p.1093-1100, 1996.

BAKER, N, R, e ROSENQVIST, E. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **J. Exp. Bot.**, v.55, p.1607-
1621, 2004.

BECKERT, O.P.; MIGUEL, M.H.; MARCOS FILHO, J. Absorção de água e potencial fisiológico em sementes de soja de diferentes tamanhos. Scientia Agrícola, Piracicaba, v.57, p. 671-675, 2000.

CALERO, E.; WEST, S.H.; HINSON, K. Water absorption of soybean associate causal factors.Crop Science, Madison, v.21, p.926-933, 1981.

CASAGRANDE, E.C.; FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P.K.; BRETON, M.C.; NEPOMUCENO, A.L. expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.168-184, 2001.

CATUCHI, T.A.; GUIDORIZZI, F.V.C.; GUIDORIZI, K.A.; BARBOSA, A.M.; SOUZA, G.M. Respostas fisiológicas de cultivares de soja à adubação potássica sob diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p.519-527, 2012.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasilia: Conab, 2013. 66p.

COSTA, P.R., CUSTÓDIO, C.C.; NETO, N.B.M.; MARUBAYASHI, O.M. Estresse hídrico induzido por manitol em sementes de soja de diferentes tamanhos. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, p.105-113, 2004.

FARIAS, J.R.B.; NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja.**Londrina: Circular Técnico 48, 2007. 9p.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Arnes: State University of Science and Technology, 1977. 11p.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36‑41, 2008.

FRITSCHE-NETO, R. e BOREM, A. **Melhoramento de plantas para condições de estresse abióticos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 250p.

HILL, T.; LEWICKI, P. **STATISTICS**: Methods and Applications. Tulsa: StatSoft Inc., 2007. 304p.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I.T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v.74, p.1301-1322, 2011.

MARTORANO, L.G. BERGAMASCHI, H.; DIAS, C.T.S.; DALMAGO, G.A.; FARIA, R.T.; HECKLER, B.M. Differential expression in soybean leaf during water deficit in Brazil management system. **International Journal of AgriScience.**v.4, p.1-15, 2014.

MOHAMMADI, P.P.; MOIENI, A.; HIRAGA, S.; KOMATSU, S. Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings.**Journal of Proteomics**, v.75, p.1906-1923, 2012.

NEUMAIER, N., NEPOMUCENO, A.L., FARIAS, J.R.B. Estresses de ordem ecofisiológica. In: Bonato, E. R. (ed.). **Estresses em soja**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, p.46-65, 2000.

NÓBREGA, L.H.P.; LIMA, G.P. DE; MARTINS, G.I; MENEGHETTI, A.M. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de soja (*Glycine max* L. Merrill) sob cobertura vegetal. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, p.461-465, 2009.

SANTI, A.L.; AMADO, T.J.C.; CHERUBIN, M.R.; MARTIN, T.N.; PIRES, J.L.; FLORA, L.P.D.; BASSO, C.J. Análise de componentes principais de atributos químicos e físicos do solo limitantes à produtividade de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.1346-1357, 2012.

SANTOS, R.F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.2, p.287-294, 1998.

SOUZA, F.H.D. Características físicas das sementes de *Calopogonium mucunoides* Desv. associadas à qualidade fisiológica e ao padrão de absorção de água. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.18, p.33-40, 1996.

TAIZ, LINCON; ZEIGER, EDUARDO. **Fisiologia vegetal.** Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.

TEXEIRA, L.R.; BRACCINI, A. de L. e; SPERANDIO, D.; SCAPIM, C.A.; SCHUSTER, I.; VIGANÓ, J. Avaliação de cultivares de soja quanto à tolerância ao estresse hídrico em substrato contendo polietileno glicol. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, p.217-223, 2008.

WITUSZYNSKA, W.; GALAZKA, K.; RUSACZONEK, A.; VANDERAUWERA, S.; BREUSEGEM, F.V.; KARPINSKI, S. Multivariableenvironmentalconditionspromotephotosyntheticadaptationpotential in *Arabidopsisthaliana*. **JournalofPlantPhysiology**, v.170, p.548-559, 2013.

ZOBIOLE, L.H.S.; OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; BIFFE, D.F. prevenção de injúrias causadas por glyphosate em soja rr por meio do uso de aminoácido. **Planta Daninha**, v. 29, p.195-205, 2011.

CAPÍTULO II - PERFIL METABÓLICO DA SOJA SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO

Resumo

O objetivo deste trabalho foi identificar as variações no metabolismo de três variedades de soja, selecionadas como tolerante, intermediária e suscetível, quando submetidas ao déficit hídrico. Utilizaram-se três variedades comerciais de soja submetidas a duas condições hídricas: irrigada (controle) enão irrigada (tratamento). De cada variedade foram retiradas seis repetições das raízes, folhas cotiledonares e folhas unifolioladas, além das sementes, nas quais separou os cotilédones e o eixo embrionário. Metade das amostras foi utilizada para realizar o cálculo do teor relativo de água nos tecidos e a outra metade foi congelada em nitrogênio liquido, aferido o peso congelado e realizando a extração e posteriormente a derivatização para análise do perfil metabólico por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). Os dados foram analisados com auxilio de programas de bioinformática. Realizou-se a normalização dos dados, e com estes valores, a análise fatorial pelo método dos componentes principais e teste de t de Student a 5% significância. Os resultados da análise de fatores permitiram distinguir as variedades M-7908 RR, BRS Favorita RR e BRSMG 811c RR, em tolerante, intermediária e suscetível ao déficit hídrico. As análises de média do perfil metabólico permitiu identificar os compostos que diferiram estatisticamente na variedade tolerante (aumento de sacarose, glicose e glicerol na folha unifoliolada), intermediária e na suscetível (aumento da glicose na folha cotiledonar).Entre as reduções no metabolismo, os principais metabólitos descritos foram ácidos orgânicos, aminoácidos e carboidratos, podendo concluir que as alterações ocorridas se devem à ajustamentos de funções essenciais como fotossíntese e respiração, ou para regulação da pressão osmótica através da concentração de solutos.

Termos para indexação:*Glycine max*, metabolômica, déficit hídrico, metabolismo responsivo.

1. Introdução

A metabolômica é uma área das ciências "ômicas" que caracteriza os fenótipos dos metabólitos, através de um estudo sistemático do endógeno, bem como os processos biológicos específicos em que estão envolvidos (Schock et al., 2010), realizando a ligação destes com os seus genótipos correspondentes, permitindo identificar o metaboloma (Resende, 2010; Putri et al., 2013). Abordagens metabolômicas podem lançar à vista os mecanismos bioquímicos de adaptação das plantas em resposta a estresses ambientais. A aplicação de técnicas de "ômicas" pode, portanto, facilitar o desenvolvimento de cultivares de soja tolerante aos estresses ambientais (Komatsu et al., 2013).

A homeostase bioquímica é bastante complexa, pois envolve todas as reações do metabolismo, ou seja, representa os ajustes metabólicos necessários para que o organismo possa manter-se funcional (Prisco & Gomes Filho, 2010). Em condições de baixa disponibilidade de água no solo, vários processos metabólicos nas plantas podem ser influenciados, como o fechamento estomático, o declínio na taxa de crescimento, o acúmulo de solutos e antioxidantes e a expressão de genes específicos de resposta ao estresse (Silva et al., 2002). A biologia molecular assume papel-chave na identificação pontual de genes envolvidos nas respostas ao déficit hídrico, o que permitirá futuramente a identificação e a compreensão de rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas à seca (Casagrande et al., 2001).

Condições de estresse abiótico são as principais limitações da agricultura moderna. Embora muitos genes associados à resposta da planta ao estresse tenham sido identificados e utilizados para gerar plantas tolerantes, o sucesso dessa estratégia torna-se limitado devido ao pouco conhecimento bioquímico e metabolômico de resposta da planta (Reguera et al., 2012).

O presente trabalho visou identificar as variações no metabolismo primário de três variedades de soja, selecionadas como tolerante, intermediária e suscetível, quando submetidas ao déficit hídrico.

2. Material e métodos

O experimento foi instalado no laboratório de Fisiologia e Bioquímica, localizado no Instituto de Botânica da Secretária do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, conduzido em incubadora BOD (Biochemical oxygen demand), em condição controlada de temperatura a 25^{o}C, com fotoperíodo de 12 horas e irrigação diária, com água suficiente para elevar a umidade do substrato de cultivo à capacidade de campo. Foram utilizados vasos plástico de 300mL, preenchidos com areia lavada de granulometria média. No presente estudo foi selecionado o estádio V1, segundo a classificação dos estádios de desenvolvimento da soja, proposta por Fehr e Caviness (1977), a partir do qual as plântulas foram submetidas a dois tratamentos hídricos: plantas com irrigação diária necessária para o desenvolvimento da cultura (controle) e plantas submetidas ao déficit hídrico por suspenção total de rega (tratamento). No quarto dia de tratamento realizou-se a coleta das raízes, folhas cotiledonares e folhas unifolioladas, além das sementes, nas quais foram separados os cotilédones e o eixo embrionário. Os experimentos foram realizados com seis repetições.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3 x 2, para testar os efeitos de três variedades comerciais de soja (BRSMG 811c RR; BRS Favorita RR; M-7908 RR) eduas condições hídricas (controle e tratamento).

As amostras foram divididas ao meio, metade foi submetida apesagem da massa fresca, e posteriormente imersas em tubosfalcon, preenchidos com água, por 24h para aferir a massa turgida.Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa a 100^{o}C por 24h para a identificaçãoda massa seca e para a realizaçãodo cálculo do teor relativo de água nos tecidos.

A outra metade das amostras foicongelada em nitrogênio líquido, aferida a massa congelada e homogeneizada com a ajuda de um almofariz e pistilo. Aproximadamente 100 mg de material foi utilizado para extração e derivatização. O material foi extraído em 500 µL de metanol:clorofórmio:água (MCA) na proporção de 12:5:1 e 50 µL do padrão interno adonitol (0,2 mg mL^{-1} de piridina) agitado em vórtex e aquecido a 60ºC por 30 minutos, sob constante agitação. O material foi centrifugado a 13000 rpm por 2 minutos e a fase aquosa (superior) transferida para novos tubos de 1,5 mL e a ela adicionado 350 µL de água. A mistura foi agitada e após 5 minutos centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos.

Trezentos µL da fase polar (fase superior) foram coletados e secos à vácuo, sendo então armazenados a -80°C até derivatização.

A derivatização para análise do perfil metabólico foi realizada seguindo método descrito previamente por (Roessneret al., 2001) adaptado à espécie vegetal analisada (soja).Para derivatização, 200 µL de piridina, 50 µL de Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 µL de cloridrato de metoxilamina (0,2 mg mL^{-1} piridina) foram adicionados ao material seco, submetidos à agitação e aquecidos a 75ºC durante 1 hora. As amostras foram então transferidas para frascos de vidro, os quais foram lacrados, e injetados automaticamente em um sistema GC/MS (Agilent GC 6890 e MSD 5973N, Agilent Technologies, USA). A corrida no cromatógrafo foi executada com o auxílio de uma coluna HP1701 de 30 m com 0,25 µm de espessura (Supelco, Bellfonte, CA). A temperatura de injeção ajustada a 230°C, a interface a 250°C, e a fonte de íons a 150°C. O gás hélio foi usado como gás carreador a um fluxo de 1 mL min^{-1}. A análise foi conduzida sob a seguinte programação de temperatura: 5 min de aquecimento a 70°C, seguido de uma rampa na temperatura do forno de 5°C min^{-1} até 280°C e 1 min de aquecimento a 310°C. O espectro de massas foi armazenado a uma taxa de 2 varreduras s^{-1} na faixa de 50 a 650 m/z. Os dados gerados foram analisados através do programa Chemstation (Agilent Technologies, EUA) e os picos detectados comparados com padrões autênticos e com a NIST 08 Mass Spectral Library e confirmados através do cálculo do índice de Kovats.

Os valores do teor relativo de água e das massas congeladas foram utilizados para calcular a massa seca utilizada nas análises, os resultados foram normalizados para massa seca e para o padrão interno adonitol. Posteriormente foi realizada a normalização dos valores médios da variedade M-7908 RR na condição sem estresse hídrico.

Para a identificação do nível de tolerância ao déficit hídrico, através das respostas metabólicas, em cada tecido coletado, utilizou-se a análise de fatores pelo método dos componentes principais, utilizando o programa STATISTICA (Hill & Lewicki, 2007).

A variação no perfil metabólico foi analisada por meio de análise de variância e a comparação das médias através do teste t a 5 % de significância, com uso do programa Sisvar (Ferreira, 2008).

3. Resultados e discussão

O poder da metabolômica reside na aquisição dos resultados analíticos em que os metabolitos de um sistema celular são quantificados e feitos à extração dos elementos mais significativos, utilizando uma ferramenta de análise de dados diferenciada (PUTRI et al., 2013). A análise fatorial pelo método dos componentes principais realizada no presente estudo baseou-se na decomposição espectral da matriz, onde o modelo permitiu a estimação das cargas fatoriais e das variâncias especificas utilizando o método mais simples dos componentes principais. Assim podemos explicar a variância total atribuída ao modelo e as variáveis que mais explicam o modelo fatorial, de forma a ter uma interpretação biológica (Ferreira, 2011; Cruz & Carneiro, 2003).

Os componentes 1 e 2 da Figura 1 (A), contribuíram para explicar em 49,5% a variância total, sendo possível observar uma clara separação das amostras em dois grupos, correspondendo às amostras do controle e do tratamento, com pouca exceção para os scores da M-7908 RR controle, que apresenta maior dispersão na área dos scores dos tratamentos. A análise do perfil metabólico dos dados do componente 1 indicou maiores pesos para ácido threônico, diamonovalerolactam, asparagina e glicose, respondendo juntos por 56,8%.

Na Figura 1 (B), a representação dos componentes é de 49,1%, no entanto não há uma separação evidente entre as condições hídricas.Observou-se uma dispersão maior para a variedade tolerante, M-7908 RR, e uma menor distribuição dos scores no gráfico para a variedade suscetível, BRSMG 811c RR. Os metabólitos que tiveram maior peso na representação do componente 1 foram frutose, galactose e glicose, acumulando 42,7% de representatividade neste componente.

A Figura 1 (C) mostra a classificação do conjunto de dados, onde o componente 1 e o componente 2 contribuíram para explicar em 61,9% a variância dos mesmos. A análise do gráfico de distribuição fatorial das amostras em estudo revelou novamente que as variedades tiveram uma distribuição proporcional ao seu nível de tolerância ao déficit hídrico. As variáveis que mais foram representadas pelo modelo fatorial foram glicose, frutose, mio-inositol e galactose, as quais explicaram 41,2% do componente 1.

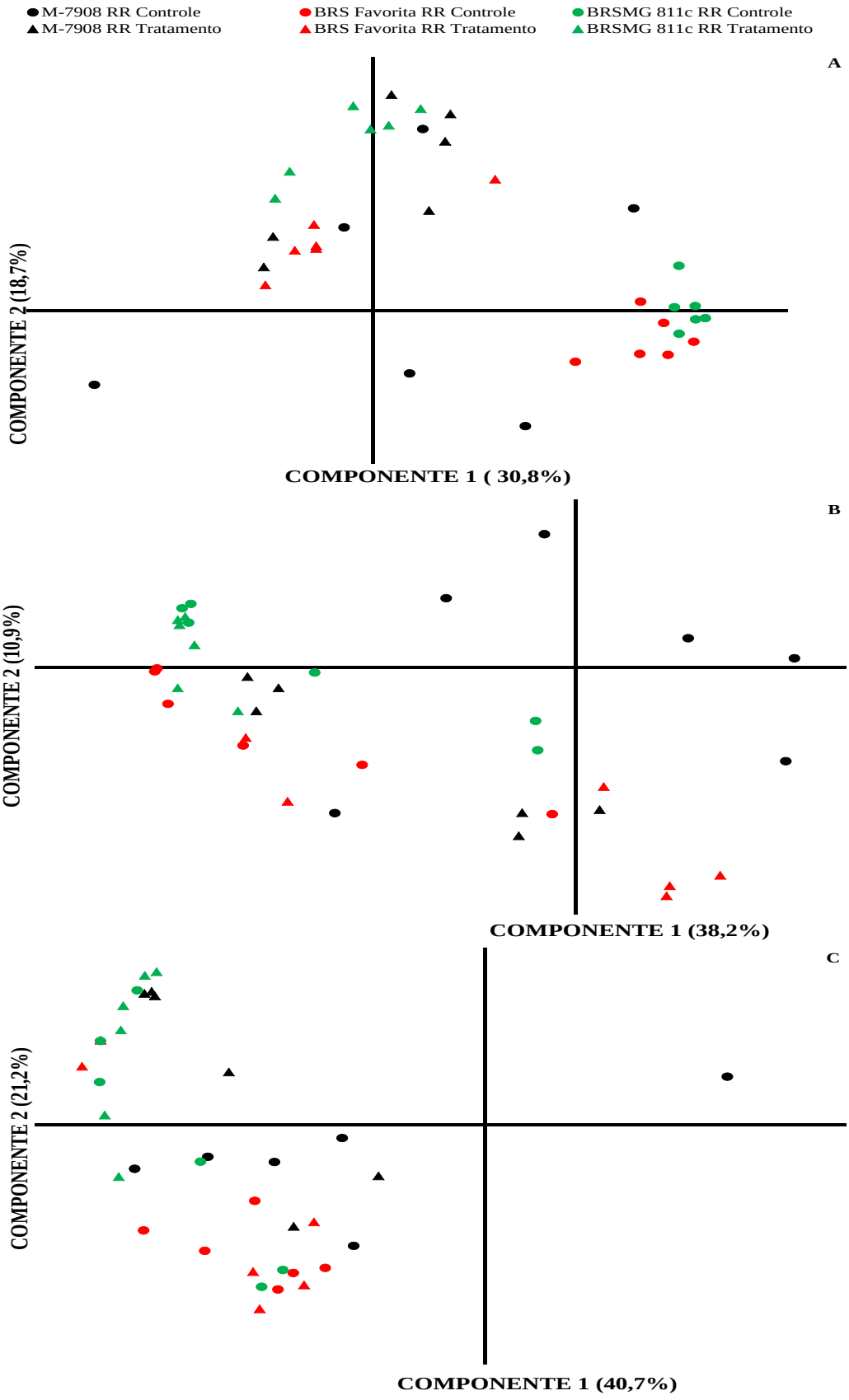

Figura 1. Análise fatorial pelo método de componentes principais das estruturas de três variedades de soja. (A) Folhas unifolioladas, (B) Folhas cotiledonares, (C) Raiz

A estratégia de tolerância permite às plantas manter a atividade metabólica com a evolução do déficit hídrico e declínio do conteúdo relativo de água (Fioreze et al., 2011).Através da Figura 1, observou-se maior dispersão conjunta dos scores dos tratamentos e dos controles da variedade tolerante, enquanto nas suscetíveis, os mesmos, se concentram. Segundo Casagrande et al. (2001), quando a água é perdida pela célula, processos regulatórios são iniciados e o metabolismo celular é ajustado às novas condições, justificando assim a distribuição para as folhas unifolioladas, onde os scores de tratamento e controle das variedades mais suscetíveis concentram-se distantes entre si.

Sob condições de estresse hídrico podem ocorrer mudanças fisiológicas e bioquímicas, tais como diminuição nas atividades fotoquímicas, redução da fixação de CO2, acúmulo de osmólitos e osmoprotetores e alteração no metabolismo de carboidratos (Gimenez et al., 2010). Hummelet al. (2010) tem sugerido que plantas submetidas a déficit hídrico experimentam uma limitação metabólica, pela redução da difusão de CO2 devido o fechamento dos estômatos, resultando em uma menor taxa de carbono (C) assimilado.

O total de carbono assimilado na fotossíntese é usualmente mais do que a metade despendida no processo de respiração necessária para o crescimento e manutenção, mas esse balanço pode mudar sob condições de estresse hídrico. Muito embora a fotossíntese possa ser reduzida em até 100 % sob condições drásticas de falta d'água, a taxa de respiração pode aumentar ou diminuir sob o estresse, mas nunca se tornar totalmente paralisada (Flexaset al., 2005). No presente estudo, as reduções dos metabolitos no tratamento com déficit hídrico foram detectadas em folhas unifoliolada da BRS Favorita RR, pela diminuição de serina, putrescina, ácido butírico, ácido threônico, ácido malônico e galactopiranosídeo. Na variedade BRSMG 811c RR houve redução no acido glicérico, acido cítrico e lisina, em M-7908 RR não ocorreu redução, conforme apresentado na Figura 2.

Nas folhas unifolioladas da M-7908 RR em estresse hídrico houve aumento de sacarose, glicose e glicerol, maior concentração de valina e mio-inositol em BRS Favorita RR e BRSMG 811c RR, respectivamente. Para Sugiharto (2004), isso se deve ao fato do déficit de água aumentar a expressão das enzimas que assimilam carbono, especialmente a sacarose fosfato sintase (STS), aumentando o conteúdo de sacarose, que atua como um osmoprotetor e mantém

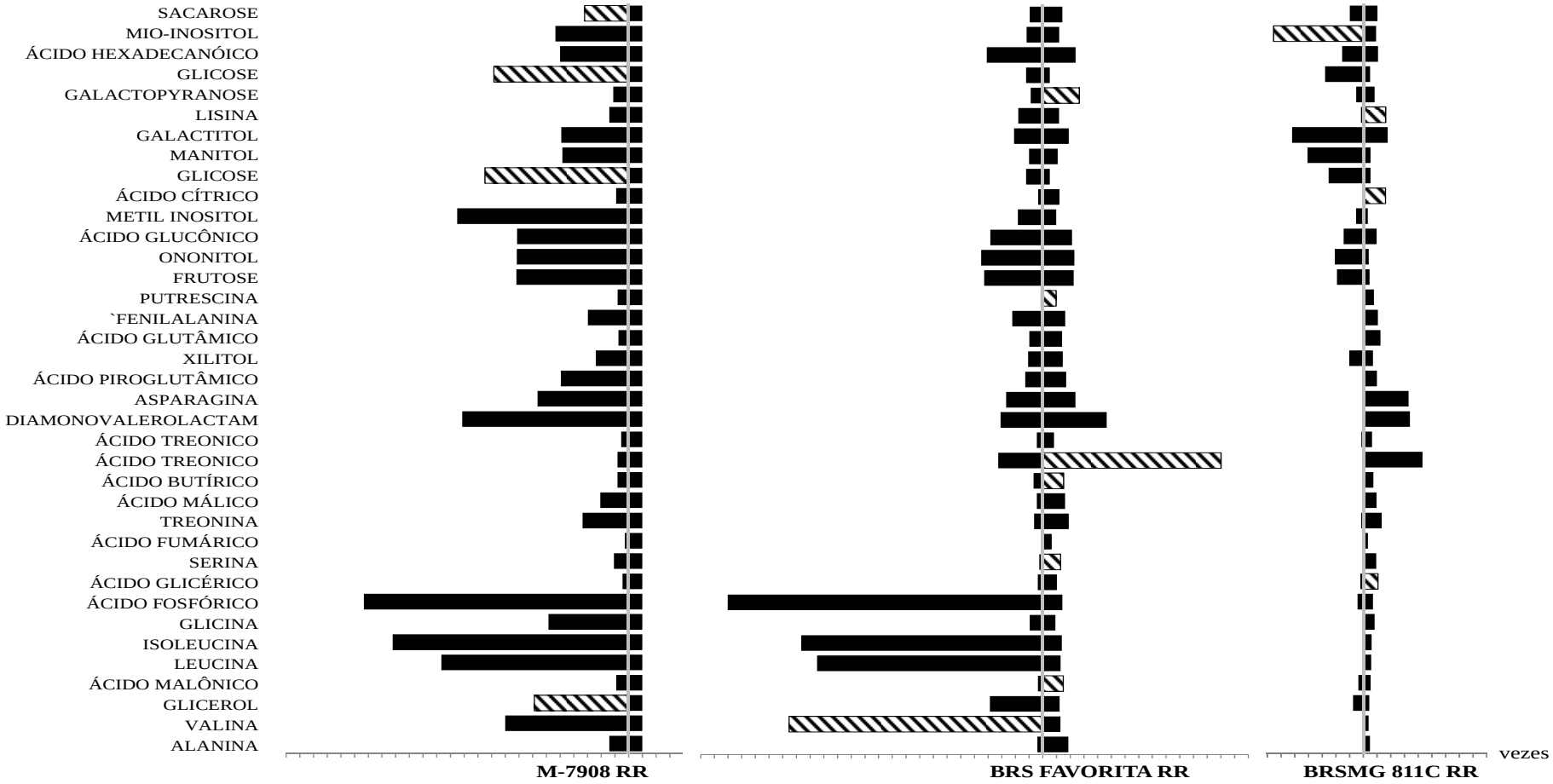

Figura 2. Perfil metabólico expresso nas folhas unifolioladas de três variedades de soja, normalizadas pelo controle da variedade M-7908 RR, onde o tratamento submetido ao déficit hídrico esta a esquerda do eixo central da pirâmide e o controle a direita em cada variedade respectivamente. Barras hachuradas diferem estatisticamente de seu tratamento oposto pelo teste de t de Student à 5% de probabilidade

um gradiente potencial favorável de água através da célula da membrana. A síntese de sacarose na soja é codificada por apenas um gene, o Gm_SUS1, que está presente nos tecidos, tais como raízes e folhas, justificando assim, o maior tempo de turgescência das folhas da variedade M-7908 RR em contra partida as outras (Abid et al., 2009).

Chaves Filho &Stacciarini-Seraphin (2001) afirmaram que a importância e contribuição dos solutos envolvidos no ajustamento osmótico em resposta à baixa disponibilidade de água variam com a espécie, sendo que os principais solutos acumulados em soja são aminoácidos, glicose, frutose e sacarose, o que está em conformidade com o presente estudo.

Em folhas cotiledonares de M-7908 RR houve redução de ácido ascórbico, ácido chiquímico e na produção de galactopiranosideo. Figura 3, em BRSMG 811c RR houve reduçãode ácido cítrico e glicerol.Em BRS Favorita RRhouve reduçãona produção de sacarose, xilose, pinitol, manitol, estigmasterol, beta-sitosterol, mio-inositol, xilitol, eritritol, e dos ácidos octadecanóico, hexadecanóico, tetradecanóico, butírico, gálico, etilgálico, succínico, malônico, piroglutâmico, glicérico e do ácido fosfórico.

Nas variações metabólicas das folhas cotiledonares, apenas a glicose sofreu acréscimo significativo nas plântulas que foram submetidas ao déficit hídrico. Podendo ser explicado na variedade BRSMG 811C RR, padrão susceptível, onde pode ter ocorrido a gliconeogênese, que não é comum em plantas, mas pode ocorrer em algumas sementes de espécies que armazenam uma grande quantidade de carbono sob a forma de óleo. Após a germinação, muito do óleo é convertido em açucares via gliconeogênese, que é então usada para suportar o crescimento (Nelson & Cox, 2006). Abid et al. (2009), sugere que a gliconeogênese tem um importante papel fisiológico, como um ponto de entrada para carboidrato no metabolismo celular em condição de estresse abiótico.

A Figura 4 apresenta o perfil metabólico expresso em raízes. Observou-se que não houve aumento significativo dos metabólitos em nenhuma das variedades analisadas. O perfil encontrado nas raízes da BRSMG 811c RR permaneceu sem alteração significativa, nas demais, o metil-inositol, diamonovalerolactam, ácido dodecanóico e acido fumárico reduziram na variedade M-7908 RR e na BRS Favorita RR, houve redução da sacarose, frutose,

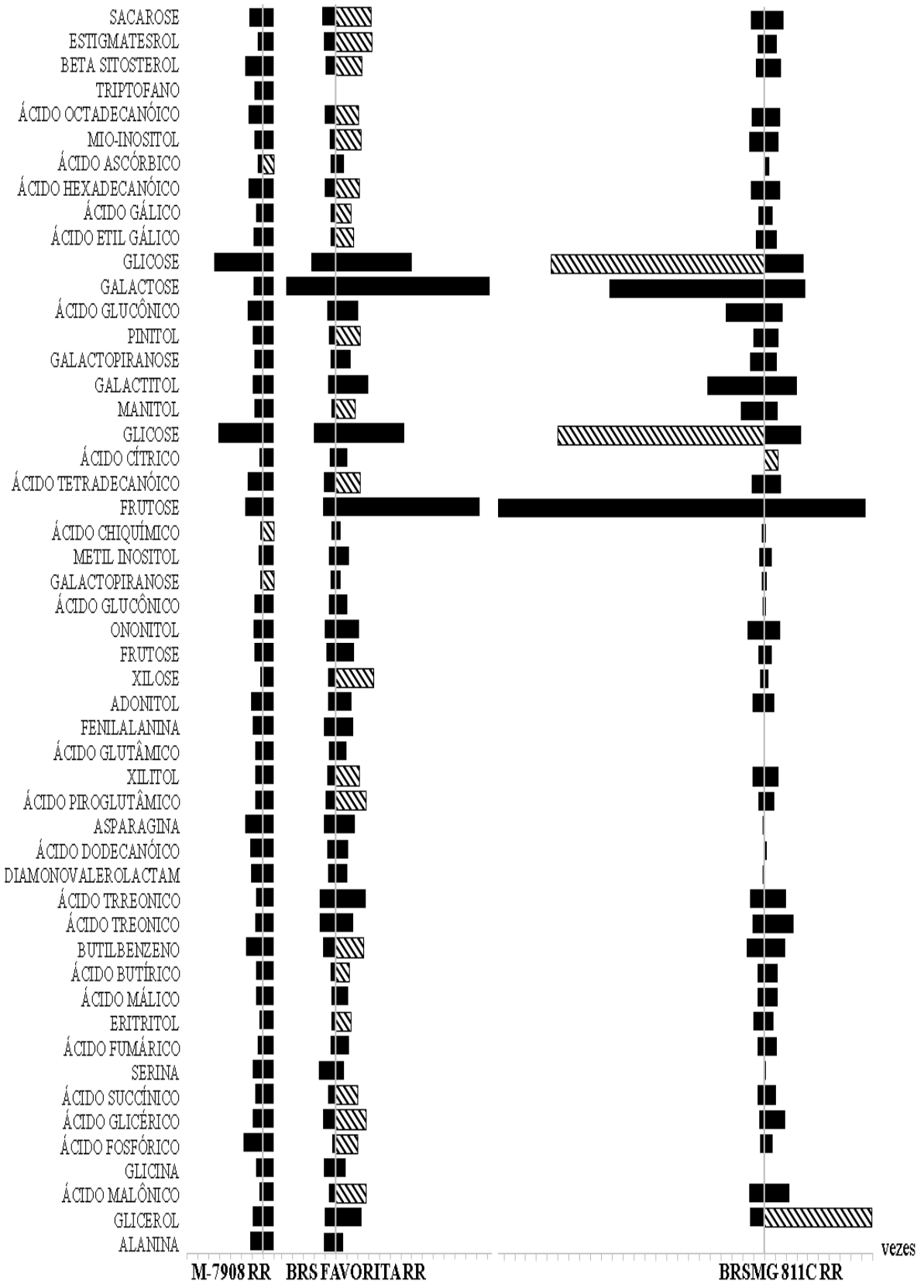

Figura 3. Perfil metabólico expresso nas folhas cotiledonares de três variedades de soja, normalizadas pelo controle da variedade M-7908 RR, onde o tratamento submetido ao déficit hídrico esta a esquerda do eixo central da pirâmide e o controle a direia em cada variedade respectivamente. Barras hachuradas diferem estatisticamente de seu tratamento oposto pelo teste de t de Student à 5% de probabilidade

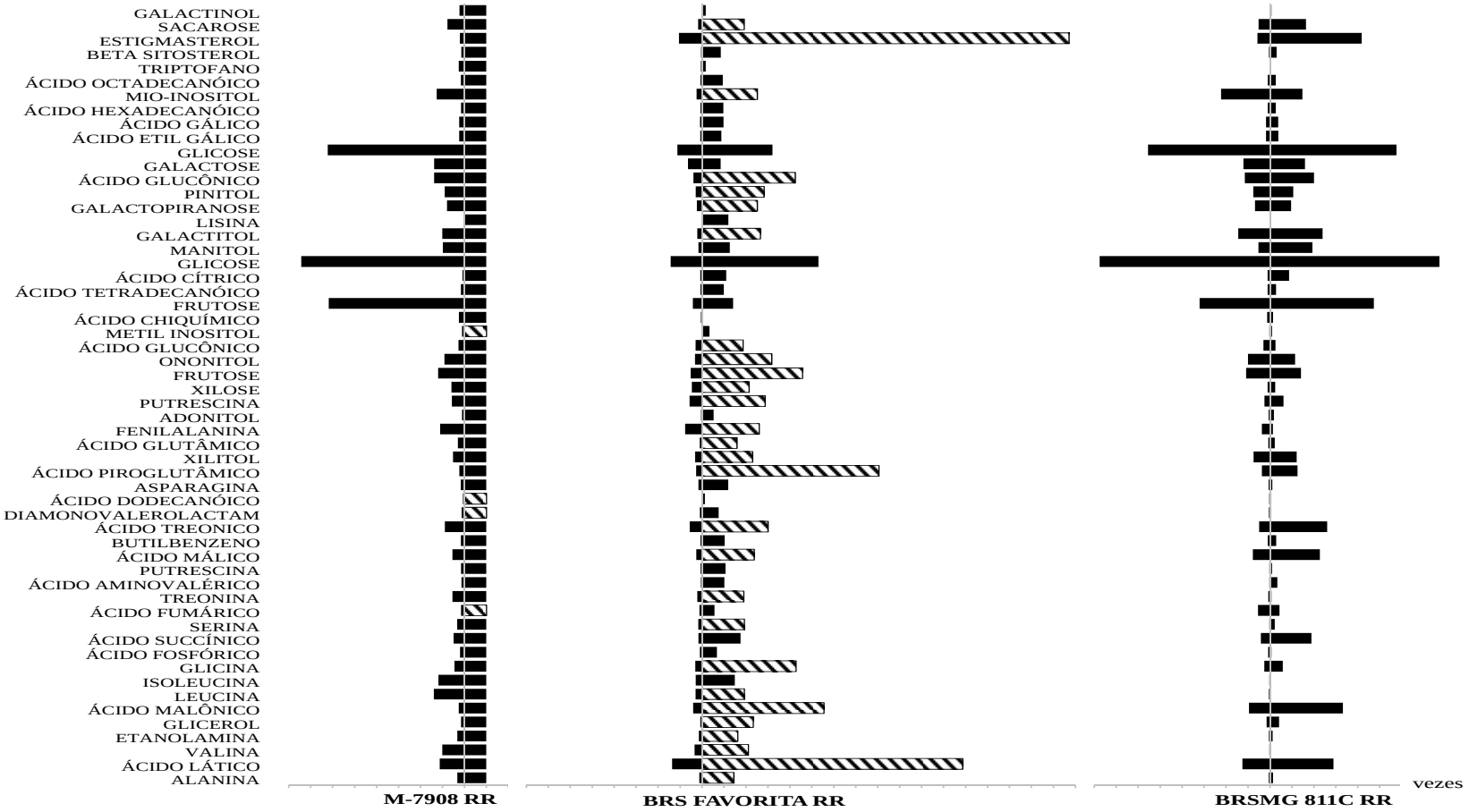

Figura 4. Perfil metabólico expresso nas raízes de três variedades de soja, normalizadas pelo controle da variedade M-7908 RR, onde o tratamento submetido ao déficit hídrico esta a esquerda do eixo central da pirâmide e o controle a direita em cada variedade respectivamente. Barras hachuradas diferem estatisticamente de seu tratamento oposto pelo teste de t de Studentà 5% de probabilidade

xilose, galactopiranosideo, fenilalanina, etanolamina, glicina, treonina, putrescina, serina, leucina, valina, alanina, estigmasterol, mio-inositol, pinitol, galactitol, ononitol, xilitol, glicerol, além dos ácidos glucônico, glutâmico, piroglutâmico, treônico, málico, malônico e do ácido lático. Segundo Gimenez et al. (2010), em condições de estresse, desenvolve-se uma estreita correlação entre déficit hídrico e metabolismo de açúcares, que se reflete sobre o complexo de sinalização celular controlado pelos próprios açúcares e que exercem um controle permanente sobre os processos de transdução de sinais e da transcrição em plantas, induzindo a uma sinalização que promove maior rigidez sobre todas as atividades de crescimento da planta.

Um importante metabólito nas sementes de soja é o mio-inositol, responsável pela formação de ácido fítico, uma completa eliminação desta via irá interromper muitos outros percursos bioquímicos necessários para a germinação, o que por sua vez são fundamentais no eixo e cotilédone para o desenvolvimento embrionário (Abidet al., 2009). Para o perfeito desenvolvimento inicial das sementes, foi realizada a análise do perfil metabólico destas e observou-se variações significativas entre ácido cítrico, ácido málico e ácido fumárico, os quais diferiram as variedades suscetíveis e intermediária, da variedade tolerante, que apresentou uma menor concentração destes no cotilédone. Apesar destas alterações entre as variedades, a quantidade de metabólitos presente em cada variedade era compatível com suas necessidades iniciais, como pode ser observado nas Figuras 5 e 6.

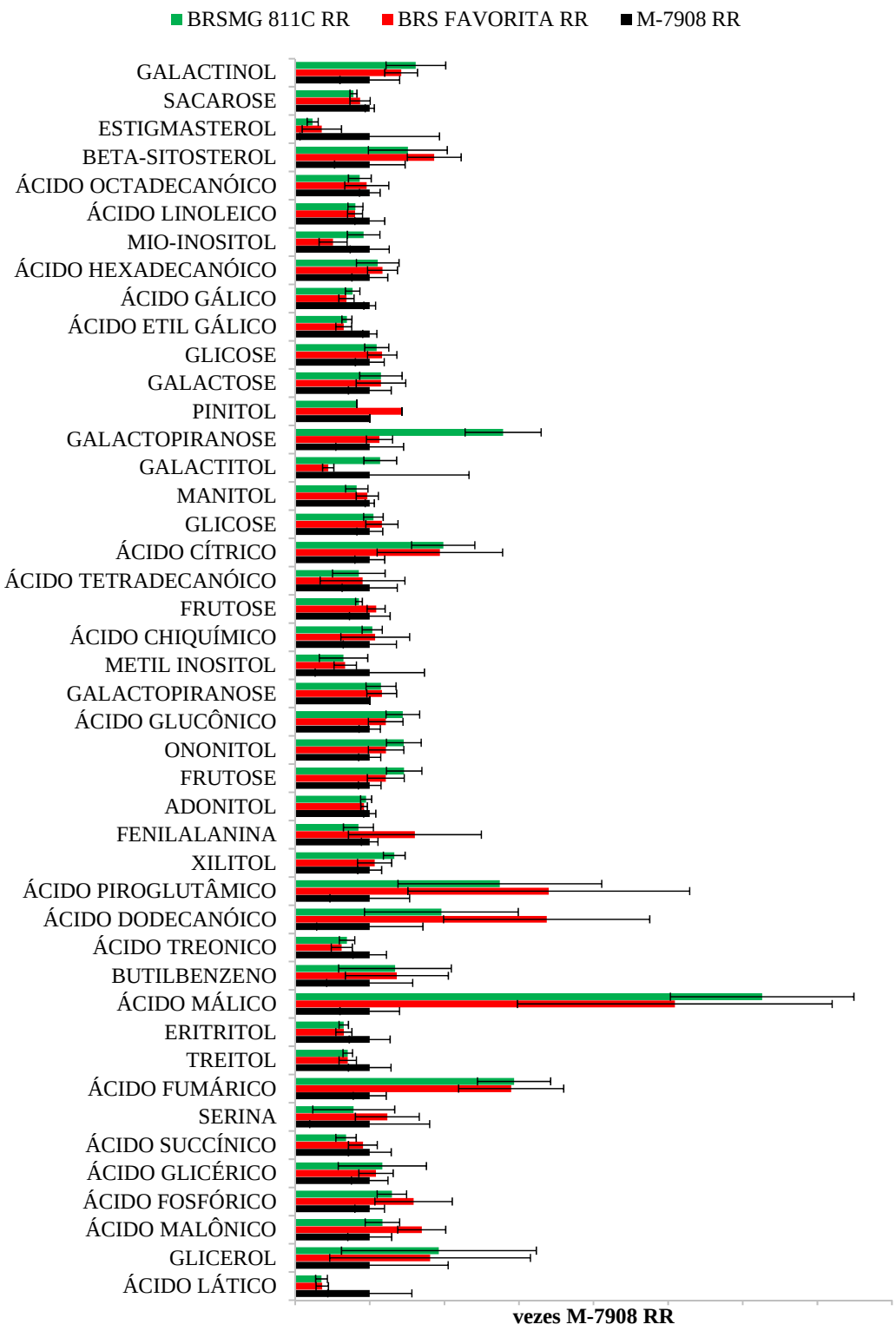

Figura 5. Metabólitos expressos nos cotilédones de três variedades de soja

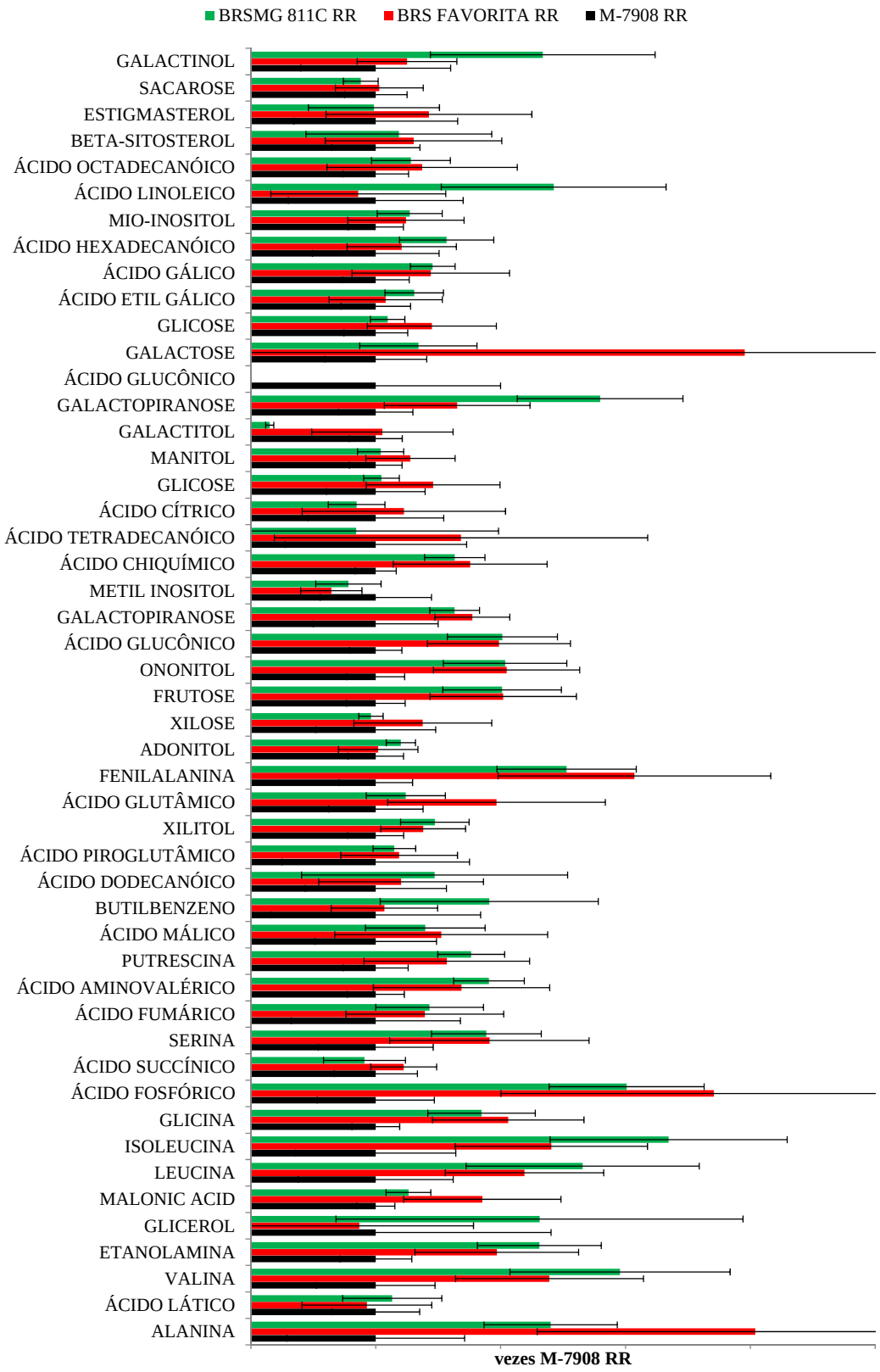

Figura 6. Metabólitos expressos nos eixos embrionários de três variedades de soja

4. Conclusões

1. De forma geral os principais metabólitos descritos são ácidos orgânicos, aminoácidos e carboidratos.
2. Os aumentos nos teores de metabólitos nos tratamentos são osmorreguladores, para regulação da pressão osmótica através da concentração de solutos.
3. As reduções observadas se devem a diminuição em funções como a fotossíntese e a respiração.

5. Referências bibliográficas

ABID, G.; SOULEYMANE SILUE, S.; MUHOVSKI, Y.; JACQUEMIN, J.; TOUSSAINT, A.; BAUDOIN, J. Role of myo-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development. **Gene,** v.439, p.1–10, 2009.

CASAGRANDE, E.C.; FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P.K.; BRETON, M.C.; NEPOMUCENO, A.L. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 2, p.168-184, 2001.

CHAVES FILHO, J.T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (Solanum lycocarpum St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. **Revista brasileira botânica**, São Paulo, v.24, p.199-204, 2001.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.**Vicosa: UFV. 585p. 2003.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Arnes: State University of Science and Technology, 11p. 1977.

FERREIRA, D.F. **Estatística multivariada.**2 ed., Lavras: Ed. UFLA, 676p. 2011.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36‑41, 2008.

FIOREZE, S.L.; PIVETTA, L.G.; FANO, A.; MACHADO, F.R.; GUIMARÃES, V.F. Comportamento de genótipos de soja submetidos a déficit hídrico intenso em casa de vegetação. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 3, p.342-349, 2011.

FLEXAS, J.; GALME´S, J.; RIBAS-CARBO, M.; MEDRANO, H.The effects of drought in plant respiration.Advances in Photosynthesis and Respiration.**Plant Respiration: from Cell to Ecosystem,** Dordrecht, p.85–94. 2005.

GIMENEZ, D.F.J.; MORAES, F.E.; LAIA, M.L.; DABBAS, K.M.; NODA, R.W.; SUZUKI, J.; ZINGARETTE, S.M.; FERRO, M.I.T. Análise da expressão gênica em cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico utilizando a técnica de macroarranjo de cDNA. **Científica**, Jaboticabal, v.38, p.57-68, 2010.

HILL, T.; LEWICKI, P. **STATISTICS**: Methods and Applications. Tulsa: StatSoft Inc., 304p. 2007.

HUMMEL, I.; PANTIN, F.; SULPICE, R.; PIQUES, M.; ROLLAND, G.; DAUZAT, M.; CHRISTOPHE, A.; PERVENT, M.; BOUTEILLÉ, M.; STITT, M.; GIBON, Y.; MULLER, B. Arabidopsis Plants Acclimate to Water Deficit at Low Cost through Changes of Carbon Usage: An Integrated Perspective Using Growth, Metabolite, Enzyme, and Gene Expression Analysis. **Plant Physiology,** Montpellier, v.154, p.357-372, 2010.

KOMATSU, S.; SHIRASAKA, N.; SAKATA, K. 'Omics' techniques for identifying flooding–response mechanisms in soybean.**Journal of proteomics**, v.10, p.1016-1026, 2013.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica.** 4ed. São Paulo: SARVIER, 1202 p., 2006.

PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, E. **Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas.**Fortaleza: INCTSal, 18 p., 2010.

PUTRI, S.P.; YAMAMOTO, S.; TSUGAWA, H.; FUKUSAKI, E. Current metabolomics: Technological advances. **Journal of Biosciences and Bioengeneering** v.1, p.9-16, 2013.

REGUERA, M.; PELEG, Z.; BLUMWALD, E. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops.**Biochimica Et Biophysica Acta**, v.2, p.186-194, 2012.

RESENDE, N.M. **Análises metabólica e metabolômica de atleta olímpico: Uma nova proposta para um nexus bioquímico.** 2010. 95f. Dissertação (mestrado) - Pós-graduação em genética e bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

ROESSNER, U.; LUEDEMANN, A.; BRUST, D.; FIEHN, O.; LINKE, T.; WILLMITZER; L.; FERNIE, A.R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **Plant Cell**, v.13, p.11–29, 2001.

SILVA, S.R.S.; DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A.; CASALI, V.W.D.; NASCIMENTO, E.A.; PINHEIRO, A.L. Efeito do estresse hídrico sobre

características de crescimento e a produção de óleo essencial de Melaleuca alternifolia Cheel. **Acta Scientiarum**, v. 24, p.1363-1368, 2002.

SCHOCK, T.B.; STANCYK, D.A.; THIBODEAUX, L.; BURNETT, K.G.; BURNETT, L.E.; BOROUJERDI, A.F.B.; BEARDEN, D.W. Metabolomic analysis of Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*, hemolymph following oxidative stress. **Metabolomics**; v.6, p.250–262. 2010.

SUGIHARTO, B. Biochemical And Molecular Studies On Sucrose-Phosphate Synthase And Drought Inducible-Protein In Sugarcane (Saccharum officinarum). **Jurnal ILMU DASAR**. v.5, p.62-67, 2004.

CONCLUSÕES GERAIS

As alterações nas estruturas morfológicas, confirmadas pelas avaliações fisiológicas, demonstraram a variedade M-7908 RR, como a que melhor se adaptou a condição de déficit hídrico, expressando em suas análises bioquímicas, maior concentração de açucares, sendo estes fortes indicadores na resposta à limitação hídrica e na aclimatação dessas plantas ao estresse. E a variedade BRSMG 811c RR, identificada como suscetível, apresentou uma maior concentração dos açúcares nas folhas unifolioladas devido à via da gliconeogênese.