

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LUANA DE ALMEIDA PEREIRA

**CONTRIBUIÇÃO POR ESTUDOS METABOLÔMICOS POR HPLC-DAD-MS/MS
PARA COMPREENSÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTRESSE DE ALAGAMENTO NO
METABOLISMO ESPECIALIZADO DE SOJA**

ALFENAS/MG

2024

LUANA DE ALMEIDA PEREIRA

**CONTRIBUIÇÃO POR ESTUDOS METABOLÔMICOS POR HPLC-DAD-MS/MS
PARA COMPREENSÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTRESSE DE ALAGAMENTO NO
METABOLISMO ESPECIALIZADO DE SOJA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Química, pela
Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração:
Química de Produtos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula C. P. Bueno

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marisi Gomes Soares

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Pereira, Luana de Almeida.

Contribuição por estudos metabolômicos por HPLC-DAD-MS/MS para compreensão da influência do estresse de alagamento no metabolismo especializado de soja / Luana de Almeida Pereira. - Alfenas, MG, 2024.

70 f. : il. -

Orientador(a): Paula Carolina Pires Bueno.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Glycine Max. 2. Fitoalexinas. 3. Isoflavonas. 4. Alagamento. 5. Estresse hídrico. I. Bueno, Paula Carolina Pires, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

LUANA DE ALMEIDA PEREIRA

**CONTRIBUIÇÃO POR ESTUDOS METABOLÔMICOS POR HPLC-DAD-MS/MS
PARA COMPREENSÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTRESSE DE ALAGAMENTO NO
METABOLISMO ESPECIALIZADO DE SOJA**

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 26 de Julho de 2024.

Profa. Dra. Paula Carolina Pires Bueno Presidente da Banca Examinadora
Instituição: PPGQ-Universidade Federal de Alfenas e Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops - Alemanha

Dra. Isabel Duarte Coutinho
Instituição: NATCROM Soluções Sustentáveis LTDA

Profa. Dra. Raquel Brandt Giordani
Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dra. Laise Rosado de Souza
Instituição: Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology



Documento assinado eletronicamente por **Paula Carolina Pires Bueno, Usuário Externo**, em 30/07/2024, às 10:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_aceso_externo=0, informando o código verificador **1288747** e o código CRC **DAE3C4E4**.

Dedico esta dissertação aos meus pais, Silvia e Lucas, que me ensinaram o valor e a importância do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar minha caminhada e me conceder força, sabedoria e saúde para concluir este trabalho. Agradeço por todas as bênçãos recebidas e por me guiar em cada etapa da minha vida.

À minha orientadora, Professora Dra. Paula Bueno, expresse minha mais profunda gratidão por sua sabedoria, paciência, incentivo e por me conduzir com maestria neste projeto de pesquisa. Agradeço por me proporcionar a oportunidade de aprender e crescer sob sua orientação, por acreditar em meu potencial, pela constante disponibilidade para esclarecer minhas dúvidas e por me transmitir sua paixão pela ciência. Te admiro muito como pessoa e como pesquisadora.

À minha coorientadora, Professora Dra. Marisi, por sua contribuição ao meu trabalho, por suas sugestões perspicazes e por me auxiliar na superação dos desafios. Agradeço por sua gentileza e pelos conhecimentos e experiências compartilhadas.

Às professoras do laboratório LFQMM, Professoras Dras. Dani Chagas e Dani Dias, por me receberem de braços abertos no laboratório e por me proporcionarem um ambiente de aprendizado e pesquisa inspirador.

Aos meus colegas do laboratório LFQMM por sua amizade, colaboração e apoio durante toda a jornada. Agradeço pelos momentos de descontração e pelas valiosas trocas de ideias.

Aos meus pais, Silvia e Lucas, por serem meus maiores incentivadores e por me ensinarem o valor da perseverança e do trabalho duro. Agradeço por todo o amor, apoio e por acreditarem em mim desde o início.

À minha irmã, Maria Heloisa, e à minha sobrinha, Helena, por me proporcionarem momentos de alegria e por me lembrarem da importância da família. Agradeço por todo o carinho e por me fazerem sorrir nos momentos mais difíceis.

À minha avó Geni, agradeço pelas orações e pelo amor incondicional. Sua fé e positividade me inspiraram e me fortaleceram nos momentos mais difíceis. Sou grata por sua presença constante em minha vida e por me ensinar o verdadeiro significado da fé e da esperança.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), por me proporcionar a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho e por me oferecer uma formação de qualidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 da CNPQ (processos #408115/2023-8, 316204/2021-8 e 406837/2021-0).

O presente trabalho foi realizado com o apoio da FAPESP (processos #2017/19702-6 e #2019/08477-7), da “Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)” e a da “Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UNIFAL-MG.

A todos os que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento. Este trabalho é dedicado a todos vocês.

Em um cenário de mudanças climáticas, a soja emerge como um cultivo resiliente, capaz de suportar o estresse hídrico e garantir a segurança alimentar global. Essa característica a torna crucial para a sustentabilidade da agricultura e o bem-estar das populações em todo o mundo.

(Andjelkovic Violeta, 2018)

RESUMO

A soja (*Glycine max*, Leguminosae) é uma das mais importantes culturas alimentícias cultivadas e comercializadas no mundo todo. No entanto, efeitos ambientais (que não podem ser controlados) têm um impacto negativo e significativo na sua qualidade e produtividade. Uma das condições mais difíceis de se administrar é o estresse hídrico, que tem se tornado cada mais comum devido à crescente incidência de fenômenos climáticos como o *El Niño* e *La Niña*. Ter conhecimento sobre as estratégias metabólicas utilizadas pela soja para se adaptar a estresses abióticos é essencial para o desenvolvimento de cultivares com melhor desempenho, uma vez que tais alterações fazem parte das respostas iniciais ao estresse. Na soja, muitos genes relacionados à biossíntese de isoflavonoides são regulados positivamente em resposta ao ataque de patógenos. No entanto, não há muitas evidências disponíveis sobre os efeitos de estresses abióticos sobre a biossíntese deste grupo de metabólitos, e menos ainda em relação ao estresse hídrico. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é compreender como a via biossintética das isoflavonas e fitoalexinas respondem ao alagamento. Para tal, foram cultivados quatro genótipos de soja em condições de controle e de estresse. Os extratos de folhas e raízes foram submetidos à análise metabolômica utilizando HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS. Os dados obtidos foram então filtrados, de forma a obter as informações quantitativas relativas dos metabólitos-alvo incluindo isoflavonas, fitoalexinas e precursores principais. Os resultados foram expressivos nas raízes, mostrando uma redução estatisticamente significativa do precursor glicinol, e subsequente acúmulo de gliceolidinas. As gliceolinas, que são os produtos finais da biossíntese das fitoalexinas, foram reduzidas sob alagamento. A isoflavona glicosilada daidzina foi significativamente acumulada nas folhas com posterior acúmulo de gliceolinas nas raízes. Os resultados trazem luz às importantes modificações na expressão dos metabólitos da via biossintética das isoflavonas e fitoalexinas em soja em resposta ao alagamento.

Palavras-chave: *Glycine max*; fitoalexinas; isoflavonas; alagamento; estresse hídrico

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max*, Leguminosae) is one of the most important crops cultivated and traded worldwide. However, environmental changes (that cannot be controlled) have a significant and negative impact on its quality and productivity. One of the most difficult conditions to manage is the water stress, which has become more common due to the increasing incidence of climatic phenomena such as El Niño and La Niña. Therefore, knowing the strategies used by soybeans to adapt to these threats is essential for developing cultivars with better performance, since changes in plant metabolism are part of the initial responses to stress. In soybeans, many genes related to the isoflavonoids biosynthetic pathway are up-regulated in response to pathogen attack. However, there is not much evidence available on the induction and accumulation of these metabolites under abiotic stresses, and even less under water stresses. Therefore, the aim of this research was to comprehensively how the biosynthetic pathway of isoflavones and phytoalexins in soybeans responds to waterlogging. In the present study, four soybean genotypes were grown under control and waterlogged conditions. Leaf and root extracts were subjected to metabolomics analysis using HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS. The results were significant in the roots, showing a statistically significant reduction in the precursor glycinol, and subsequent accumulation of gliceolidins. Gliceolins, which are the end products of phytoalexin biosynthesis, were reduced under waterlogging. The glycosylated isoflavone daidzin was significantly accumulated in the leaves, with subsequent accumulation of gliceolins in the roots. The results shed light on the important changes in the expression of isoflavone biosynthetic pathway metabolites and phytoalexins in soybeans in response to waterlogging.

Keywords: *Glycine max*; phytoalexins; isoflavones; waterlogging; water stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura química da genisteína, daidzeína e 17 β estradiol.....	21
Figura 2-	Via biossintética dos isoflavonóides na soja (<i>G.max</i>).....	25
Figura 3-	Esquema ilustrativo do conjunto de amostras analisadas no presente estudo.....	28
Figura 4-	Análise da área relativa média dos metabólitos de fitoalexinas e isoflavonas em raízes de soja sob condições de alagamento e controle.....	34
Figura 5-	Análise da área relativa média dos metabólitos de fitoalexinas e isoflavonas em folhas de soja sob condições de alagamento e controle.....	36
Figura 6-	Análise comparativa em Log ₂ Fold change das raízes de soja submetida a condições de alagamento versus controle para cada genótipo.....	37
Figura 7-	Análise comparativa em Log ₂ Fold change das folhas de soja submetida a condições de alagamento versus controle para cada genótipo.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Nome das enzimas envolvidas na via biossintética dos isoflavonoides.....	24
Tabela 2-	Parâmetros do MZmine utilizados para o pré-processamento e extração dos dados espectrométricos de folhas e raízes.....	31
Tabela 3-	Isoflavonas e fitoalexinas detectadas nas raízes de soja (<i>G. max</i>) por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS.....	33
Tabela 4-	Isoflavonas e fitoalexinas detectadas nas folhas de soja (<i>G. max</i>) por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS.....	33
Tabela 5-	Resultados da análise Anova Two-way para as raízes e folhas de soja, mostrando a significância das alterações nos níveis de metabólitos entre os genótipos, entre a condição controle e estresse e na interação genótipo x estresse.....	35
Tabela 6-	Levantamento de estudos sobre as modificações no metabolismo especializado em soja sob o estresse abiótico.....	40

LISTA DE SIGLAS

AREB	<i>Abscisic acid Responsive Element Binding protein</i>
AT	Acetiltransferase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CHR	Chalcona redutase
CHS1	Chalcona sintase 1
DAD	Detecção de arranjo de diodos
DHB	Ácido dihidroxibenzóico
DREB	<i>Dehydration Responsive Element Binding protein</i>
EC	Eletroforese capilar
ESI	Ionização por electrospray
FT	<i>Fourier Transform</i>
FTs	Fatores de transcrição
G2DT	Glicinol 2-dimetilaliltransferase
G4DT	Glicinol 4-dimetilaliltransferase
GLS	Gliceolina sintase
GMs	Geneticamente modificados
HDRH	2'-hidroxidaidzeína redutase
HIDH	2-hidroxiisoflavanona desidratase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFS2	2-hidroxiisoflavanona sintase
I2'H	Isoflavona 2' hidroxilase
IV	Infravermelho
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
MALDI-MSI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging</i>
MG	Minas Gerais
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MT	Maloniltransferase
PAL1	Fenilalanina amônia-liase 1
PTs1	Pterocarpano sintase 1
QTL	Loci de características quantitativas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SEAB	Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná
TF	<i>Transferrin</i>
UGTs	Uridina difosfato glicosiltransferase
UHPLC	<i>Ultra -high Performance Liquid Chromatography</i>
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas
UV	Ultravioleta
C4H	Cinamato 4-hidrosilase
4CL	4-cumarato-CoA ligase
3,9 DPO	3,9-dihidroipterocarpano 6-monooxigenase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	SOJA.....	14
1.2	ESTRESSE HÍDRICO.....	16
1.3	METABOLÔMICA EM ESTUDOS DE ESPÉCIES DE PLANTAS ALIMENTÍCIAS.....	17
1.4	ISOFLAVONOIDES.....	20
1.5	FITOALEXINAS.....	22
1.6	BIOSSÍNTESE DAS ISOFLAVONAS E FITOALEXINAS.....	23
2	JUSTIFICATIVA.....	26
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.1.1	Objetivos Específicos.....	27
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	CULTIVO, SECAGEM, FRAGMENTAÇÃO E EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	27
4.2	ANOTAÇÃO DOS METABÓLITOS ESPECIALIZADOS E ANÁLISE DOS DADOS.....	29
5	RESULTADOS	32
6	DISCUSSÃO.....	39
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	APÊNDICE.....	52

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que devido ao aquecimento global, os eventos climáticos severos como a seca e chuvas podem se intensificar dificultando a capacidade de produção suficiente de alimentos em escala mundial (Loreti *et al.*, 2016). O aumento de temperatura e de cada vez mais longos períodos de seca, por exemplo, têm sido cada vez mais estudados por possuírem efeitos diretos no crescimento e no desenvolvimento de diversas culturas alimentícias (Kim *et al.*, 2017; Lesk *et al.*, 2016). No entanto, os impactos do alagamento na produção de grande parte dos alimentos comercializados não têm sido tão abordados na literatura. O alagamento limita a difusão de gases no solo, reduzindo o oxigênio necessário para que haja uma produção eficiente de ATP por meio da fosforilação oxidativa. Ou seja, uma grande parte de espécies de plantas não podem sobreviver sob condições de alagamento por muito tempo (Armstrong e Drew, 2002; Nishiuchi *et al.*, 2012).

Dentre as plantas que são importantes economicamente, o estresse por alagamento foi amplamente estudado em arroz (Hattori *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2006 e Xu e Mackill, 1996), visto que tal cultura possui uma alta tolerância ao excesso de água no solo se comparada a outros cereais (Coutinho *et al.*, 2018). Apesar disso, na maioria dos cultivos, o estresse por alagamento prejudica o crescimento e o rendimento final dos grãos (Coutinho *et al.*, 2018).

Existe também um outro fator que justifica a necessidade em se estudar e/ou em se desenvolver cultivares mais resistentes ao estresse hídrico. No Japão, assim como no Sul do Brasil, por exemplo, a soja é utilizada em sistemas de rotação de culturas com arroz irrigado, o que contribui para o aumento da fixação de nitrogênio no solo (Sartoril *et al.*, 2016). A rotação de culturas é uma prática recomendada para aumentar o rendimento de grãos de arroz pois permite quebrar o ciclo de insetos-praga, doenças e invasoras, além de promover melhoria das condições químicas e físicas do solo (Gomes e Schuch, 2009; Missio *et al.*, 2010; Scholles e Vargas, 2004; Vernetti Junior, 2009). Todavia, a maioria das cultivares apresentam sensibilidade ao excesso de água impactando e reduzindo o rendimento final (Tougou *et al.*, 2012).

À medida em que a tolerância ao alagamento tem sido estudada em arroz e que os genes correspondentes a estas respostas foram elucidados, estas sequências gênicas têm sido utilizadas como referência para se encontrar uma relação com outras espécies, incluindo a soja (Coutinho *et al.*, 2018). Várias correlações do gene SK e SUB1 do arroz foram encontradas na soja, mas a manifestação de genes SK foi muito baixa em condições de alagamento. De acordo com Syed *et al.* (2015), o gene SUB1A, que é conhecido por permitir tolerância ao alagamento

no arroz, não está presente na soja. Embora a variabilidade genética para o alagamento possa ser detectada entre as cultivares de soja (Van toai *et al.*, 2010), diferentemente do arroz, a soja não se adapta ao alagamento.

Além desses, existe mais um atual motivo como o Rio Grande do Sul que foi atingido pelas enchentes entre abril e maio de 2024 causando a maior catástrofe climática da história no estado. Cerca de 94% dos municípios foram afetados, com a agricultura sendo o setor mais prejudicado. Além disso, em Camaquã, um dos principais municípios produtores de soja do estado, cerca de metade da lavoura ainda estava para ser colhida quando as chuvas chegaram. A Emater-RS estimou que as perdas na safra de soja do estado seriam de 2,714 milhões de toneladas, impactando significativamente a economia local (Emater, 2024).

Sendo assim, estudar os metabólitos presentes na resposta ao estresse por alagamento dentre diferentes cultivares de soja, pode ser válido para identificar as características que contribuem para a tolerância a condições hídricas desfavoráveis (Coutinho *et al.*, 2018).

1.1 SOJA

A soja (*Glycine max*, Leguminosae), tem sua origem na China, mais especificamente no rio Yangtse. Originalmente era uma planta rasteira e sua evolução se deu a partir do cruzamento natural entre duas espécies de soja selvagem. Posteriormente, cientistas da antiga China a domesticaram e a melhoraram, chegando aos grãos que conhecemos hoje (Embrapa, 2022). A família Fabaceae ou Leguminosae é a terceira maior família de plantas do planeta com mais de 20.000 espécies e 750 gêneros distribuídos por todo o mundo (Bueno e Lopes, 2020).

As leguminosas desempenham um papel importante na segurança alimentar, tendo em vista sua alta disponibilidade, a facilidade ao acesso e elevado valor nutricional (Islam *et al.*, 2022). Espécies da subfamília Papilionoideae, à qual pertencem a soja, a ervilha (*Pisum sativum*), o feijão (*Phaseolus vulgaris*), o grão-de-bico (*Cicer arietinum*), e o amendoim (*Arachis hypogaea*), são economicamente importantes e fontes essenciais de proteína (Mousavi-Derazmahalleh *et al.*, 2019). Além disso, as leguminosas contribuem para as práticas agrícolas sustentáveis devido a sua capacidade de estabelecer interações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio e fornecer nitrogênio para as culturas subsequentes (Bueno e Lopes, 2020). A rizosfera presente em tais espécies possui grande importância no desenvolvimento das plantas e na resistência frente ao estresse hídrico. Isto ocorre por estarem presentes na região do solo onde as raízes adquirem água, nutrientes e sais minerais importantes para seu desenvolvimento. Nesta região também é onde se estabelecem as relações com

microorganismos tais como bactérias e fungos que podem produzir e exsudar substâncias químicas pelas raízes (Kim, 2022).

A soja é uma importante fonte de proteína e óleo vegetal, além de possuir nutrientes para o consumo humano e pecuário. Embora os grãos de soja sejam ainda ricos em lipídeos, fibras, carboidratos, vitaminas e minerais consideráveis para uma boa nutrição, os mesmos também possuem isoflavonas, triterpenóides, saponinas e fosfatos de inositol, que são compostos oriundos do metabolismo especializado que desenvolvem um papel importante na saúde (Bueno e Lopes, 2020).

Com uma área plantada de 45.259,6 milhões de hectares, o Brasil é o maior produtor mundial do grão, com uma produtividade de 3.508 kg.ha⁻¹, ficando na frente dos EUA que possui uma área plantada de 34.939,0 milhões de hectares e produtividade de 3.330 kg.há⁻¹. Os estados do Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Paraná são os três maiores produtores de soja sendo que os estados das regiões Norte e Nordeste brasileiros são as áreas de menor produtividade (Conab, 2024; USDA/PSD, 2024). Segundo os dados disponibilizados pela Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (Abiove, 2024), a soja brasileira foi exportada em 2022/2023 na forma de soja em grão (60,7%), farelo de soja (52,2%) e óleo de soja (26,1%). Estima-se que em 2024 o total exportado será entre 94 milhões e 96 milhões de toneladas.

De acordo com o (Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2024), houve um aumento na safra 2023/2024 de soja cerca de 2,3% em relação a safra anterior disponibilizado pela Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná (SEAB), tanto o milho como a soja apresentaram alta nas cotações. Atualmente os preços recebidos pela saca de soja ficam próximo a R\$154,66, com aumento de 25% quando comparado a 2023. No atual cenário nacional, o agronegócio brasileiro segue em alta, com destaque para a soja, que se consolidou como principal produto exportado pelo país. De acordo com os dados disponibilizados pela Conab (2024), em abril deste ano, as exportações de soja em grão totalizaram US\$ 10,6 bilhões, um aumento de 22,5% em relação a abril de 2023.

Apesar da área plantada no Brasil ser maior que a dos EUA, o cenário brasileiro ainda é impactado com perdas de produtividade e de distribuição espacial, principalmente limitadas pela influência de fatores bióticos (bactérias, fungos, protozoários, plantas e animais) e abióticos (radiação solar, água, sais minerais e gases atmosféricos) aos quais as plantas estão constantemente expostas (Fuganti *et al.*, 2017). Dentre os principais fatores que impactam a produtividade da soja, o estresse hídrico é um dos mais importantes, visto que a tolerância a este estresse depende da expressão de múltiplos genes, além de dificuldades inerentes tais como

a intensidade, a duração e a frequência da exposição das plantas às tais variações, bem como às interações planta-solo-atmosfera (Fuganti *et al.*, 2017). Isto, portanto, sustenta a necessidade de desenvolvimento de genótipos mais tolerantes e capazes de se adaptar à ocorrência desses eventos.

Para a soja, estudos relacionados aos mecanismos de tolerância demonstram a existência de sinalização cruzada entre diferentes estresses abióticos, incluindo seca e alagamento (Fukao *et al.*, 2011). Isto é especialmente importante uma vez que o melhoramento desta espécie vinha sendo feito em prol da sua adaptação a solos bem drenados ou mais resistentes às secas, ocasionando perdas de produtividade quando a mesma é cultivada em solos alagados.

A incorporação da cultura da soja e de outras culturas em áreas alagadas ou facilmente inundáveis exige o desenvolvimento de cultivares com tolerância e a compreensão dos mecanismos fisiológicos relacionados a essa tolerância (Bailey-Serres e Voisenek, 2008). Dado o importante potencial econômico da soja e por ser um dos pilares do atual sistema alimentício, o desenvolvimento de cultivares com maior capacidade de adaptação a tais eventos é uma promissora alternativa para a proteção das plantações, redução de custos de produção e aumento da qualidade e produtividade.

1.2 ESTRESSE HÍDRICO

Os fatores ambientais causam grandes preocupações na produção agrícola visto que não podem ser controlados (Yang *et al.*, 2017). A seca é um dos fatores limitantes que pode afetar a produtividade de culturas comercialmente importantes, uma vez que as plantas possuem uma tendência em se adaptar aos estresses ambientais tanto a nível fisiológico e morfológico. Em nível celular e molecular a adaptação se dá através dos mecanismos de defesa mediados por alterações gênicas e metabólicas (Coutinho *et al.*, 2017).

O estresse por alagamento também pode afetar as áreas de cultivo e conseqüentemente a produtividade, uma vez que o oxigênio é essencial para que a atividade aeróbica mitocondrial possa fornecer energia para as células vegetais. Na prática, a deficiência parcial de oxigênio provoca hipóxia. Plantas inteiras em submersão não conseguem produzir energia necessária para o processo de respiração mitocondrial, pois a difusão do oxigênio na água é 10.000 vezes menor do que no ar (Nakayama *et al.*, 2017). Ademais, o excesso de água, no qual podemos denominar como alagamento, influencia de forma significativa a distribuição e na diversidade das espécies de cultivares, além de gerar perdas e baixo rendimento de muitas culturas agrícolas (Nakayama *et al.*, 2017). De acordo com Bailey-Serres *et al.* (2012), o aumento dos

alagamentos está associado com mudanças climáticas que acabam colocando em risco a segurança alimentar da população, uma vez que entre as quatro principais culturas, soja, milho, trigo e arroz, apenas a última possui uma boa resistência no solo encharcado (Bailey-Serres *et al.*, 2012).

Como pontuado, as alterações ambientais incontrolláveis têm um impacto negativo significativo na qualidade e produtividade de todas as culturas alimentícias. O estresse hídrico, neste contexto, é um dos mais difíceis de controlar e tem vindo a tornar-se mais comum devido à crescente incidência de fenômenos climáticos. O El Niño e La Niña, por exemplo, são eventos climáticos que acontecem regularmente aumentando ou resfriando as águas do oceano Pacífico, ocasionando mudanças climáticas que causam trágicos efeitos socioambientais e econômicos no Brasil por conta das secas e enchentes em determinadas regiões (Da Cunha *et al.*, 2011).

1.3 METABOLÔMICA EM ESTUDOS DE ESPÉCIES DE PLANTAS ALIMENTÍCIAS

O uso da metabolômica como ferramenta para se determinar o perfil metabólico de amostras biológicas por meio de alvos definidos tem demonstrado ser uma técnica potente para se revelar perturbações novas e imprevistas no arcabouço metabólico de uma dada espécie ou amostra, refletindo, inclusive, processos adaptativos ou de resposta a um determinado estresse (Coutinho *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2016).

Por definição, a metabolômica é um campo de pesquisa que estuda o metaboloma dos sistemas biológicos. Ele compreende um conjunto de moléculas denominadas de metabólitos primários e secundários, que são considerados os produtos finais da expressão gênica. Tais metabólitos são fundamentais nos processos biológicos, fisiológicos e de defesa das plantas, incluindo respostas a estresses bióticos e abióticos (Bueno e Lopes, 2020). Posto isso, a metabolômica tem como finalidade viabilizar uma visão dos metabólitos que estão presentes nos processos celulares, através de abordagens analíticas capazes de identificar e quantificar os metabólitos. Ainda assim, devido a diversidade química que existe na natureza, não é possível definir um único método analítico ou protocolo capaz de fornecer uma imagem de todo o metaboloma de um organismo (Bueno e Lopes, 2020).

De fato, o estudo de espécies vegetais tem sido beneficiado pela utilização de plataformas que permitem analisar vários metabólitos simultaneamente, permitindo um panorama detalhado e preciso do metabolismo vegetal, bem como características importantes, como crescimento, desenvolvimento e adaptação ao ambiente (Fernie e Schauer, 2008). Sendo assim, a metabolômica favorece a pesquisa e abre caminhos para avanços inovadores na

agricultura, na produção de alimentos e na preservação da biodiversidade.

O metabolismo primário contempla uma série de reações que resultam na assimilação, respiração, transporte e processos de diferenciação que ocorrem nas células. Os produtos finais, tais como carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos geralmente são acumulados em sementes, frutos e tubérculos, e determinam características de qualidade relevantes às espécies que os produzem. Por estar intimamente relacionado ao crescimento e desenvolvimento vegetal, entender as determinantes genéticas e as complexas redes que delineiam o metabolismo primário é fundamental para o melhoramento genético e engenharia metabólica visando à produção de tais compostos (Wen *et al.*, 2015).

Diferentemente do metabolismo primário, porém tão importante como este, os metabólitos especializados, também denominados metabólitos secundários, são pequenas moléculas que são biossintetizadas e quimicamente transformadas durante o metabolismo e que, como tal, proporcionam um indicativo do estado fisiológico de um organismo e estão intimamente correlacionadas com o fenótipo (Patti *et al.*, 2012). Diferentemente dos ácidos nucleicos, que são estruturalmente simples, existem dezenas de milhares de metabólitos especializados com uma imensa variedade de tipos de estrutura (Kopka *et al.*, 2004).

Neste contexto, a metabolômica, em particular, é capaz de fornecer dados a respeito das nuances fenotípicas que, mesmo não fazendo parte do fenótipo visível, permite uma interpretação mais mecanística e funcional acerca da variabilidade vegetal ou da resposta em nível molecular frente aos estresses bióticos e abióticos, bem como na adaptação de plantas ao seu meio ambiente. Uma vez que tais micromoléculas estão condicionadas à expressão gênica e à formação de transcritos, sua análise representa uma abordagem complementar à genômica e transcriptômica convencionais, amplamente utilizadas nos programas de melhoramento vegetal (Summer *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2016). Além disso, tais metabólitos são uma evidência bastante realística do fenótipo, eles refletem a expressão gênica em diferentes processos de regulação, tornando-os imprescindíveis no estudo de modulações do fenótipo frente aos estresses (Ramalingam *et al.*, 2015).

Pesquisas recentes demonstram o aumento do uso conjunto das abordagens metabolômicas alvo e não-alvo para a caracterização fenotípica da variação molecular em espécies modelo tais como *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycocarpum* (tomate) e *Oryza sativa* (arroz), por exemplo. A presença de certos biomarcadores são indicativos de traços valiosos em culturas, bem como são úteis para se examinar as alterações nos perfis de metabólitos de plantas quando submetidas à influência de estresses bióticos e abióticos em culturas tais como soja, aveia e trigo (Turner *et al.*, 2016). Limitações na disponibilidade de nitrogênio, por exemplo,

tem efeito positivo na concentração de compostos fenólicos e glicosídeos iridóides, que por sua vez podem conferir um efeito benéfico na defesa contra antagonistas (Miehe-Steier *et al.*, 2015). Em tal condição, também, os carboidratos são acumulados na forma de amido, sendo que a concentração de aminoácidos e açúcares solúveis diminui (Fritz *et al.*, 2006).

Em *Citrus sinensis* (laranja), por exemplo, quando infectado por *Xylella fastidiosa*, o teor de hesperidina no local da infecção é aumentando, pois a alteração deste metabólito é um indicativo do mecanismo de defesa ao patógeno e essa informação foi obtida utilizando-se técnicas cromatográficas de quantificação (HPLC- UV) e também técnicas de imagem e espectrometria de massas (MALDI - MSI) (Soares *et al.*, 2015). Da mesma forma, o acúmulo de flavonóides em *A. Thaliana* que é favorecido pela influência de estresses tais como o hídrico, níveis inadequados de fosfato, luz, temperatura e radiação UV (Nakabayashi *et al.*, 2014).

Além disso, no desenvolvimento cultivares geneticamente modificadas (GMs) pela inserção de fatores de transcrição (FTs) que atuam sobre a regulação de determinados genes, podem ocorrer alterações nos produtos finais das vias metabólicas induzidas pelas plantas na proteção contra o estresse. No estudo de Funganti-Pagliarini *et al.* (2017), a cultivar comercial de soja BR16 geneticamente modificada com o fator de transcrição AREB (*Abcisic acid Responsive Element Binding protein*) demonstrou melhor performance em condições de déficit hídrico, quando comparado com cultivares de soja convencionais ou geneticamente modificadas com fator de transcrição DREB (*Dehydration Responsive Element Binding protein*). Os estudos comparando-se o perfil metabólico destas linhagens de soja geneticamente modificadas permitiram observar diferenças para os metabólitos daidzina e malonildaidzina. Sob déficit hídrico, observou-se o desaparecimento da substância daidzina e aumento de malonildaidzina no cultivar BR16, sendo o inverso observado na soja geneticamente modificada com o fator de transcrição AREB (dados ainda não publicados). Da mesma forma, a integração de dados transcriptômicos com dados metabolômicos obtidos por RMN no estudo de Coutinho *et al.* (2017), demonstram o aumento do catabolismo de aminoácidos em soja convencional (BR16) quando cultivada em condições de déficit hídrico. Além disso, os resultados também indicam importantes mudanças na glicólise e ciclo do ácido tricarbóxicos, em decorrência de várias mudanças na expressão gênica frente ao estresse.

Devido à alta complexidade química dessas amostras, à variabilidade biológica inerente à maioria dos organismos e às limitações dinâmicas das abordagens experimentais, a análise quantitativa e qualitativa de todo o metaboloma de um sistema biológico é um objetivo muito ambicioso e ainda está longe de ser alcançado. Não há uma única técnica analítica capaz de analisar um metaboloma como um todo, obstáculo que tem sido vencido através da extração

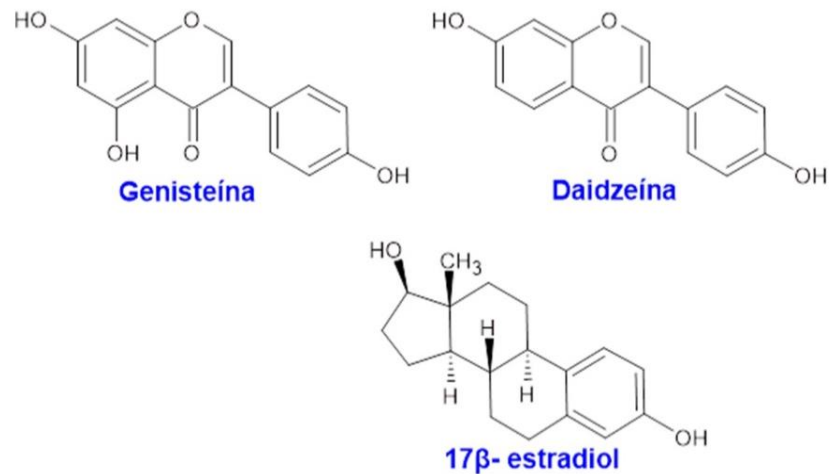
seletiva e análises paralelas usando combinação de tecnologias para se obter uma visão mais completa possível do metaboloma (Ernst *et al.*, 2014). Dentre elas estão os métodos baseados em espectroscopia de infravermelho (IV), a ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (ESI-MS, MS/MS, MALDI), a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada aos mais variados tipos de detectores (UV, DAD, MS, RMN), a eletroforese capilar (EC) acoplada à detecção no UV, fluorescência ou MS e cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) (Summer *et al.*, 2003; Glauser *et al.*, 2013).

Em síntese, a metabolômica contribui no desenvolvimento de cultivares mais resistentes a estresses bióticos e abióticos e através do investimento em plataformas analíticas para a análise de metabólitos vegetais e na elucidação de respostas metabólicas a diferentes tipos de estresse, a mesma possibilita a criação de cultivares mais fortes, produtivas, resistentes a doenças e tolerantes a estresses ambientais, contribuindo para a segurança alimentar, a sustentabilidade da agricultura e a preservação do meio ambiente (Ferne e Schauer, 2008).

1.4 ISOFLAVONOIDES

Os isoflavonoides são substâncias fenólicas e representam um grupo importante nas leguminosas. Estima-se que, até o momento, mais de 2400 isoflavonoides tenham sido identificados em mais de 300 espécies de plantas (Al-Maharik, 2019). Estruturalmente, tais compostos podem ser subdivididos em diferentes subclasses de acordo com o grau de oxidação no esqueleto (Trush e Pal'ove-Balang, 2023). As principais subclasses incluem isoflavonas, isoflavononas, isoflavanos, rotenóides, coumestanos e pterocarpanos. As isoflavonas são substâncias que podem trazer benefícios significativos para a saúde humana, uma vez que desempenham um papel importante nas vias de sinalização celular. Além disso, apresentam estrutura química semelhante aos estrógenos humanos, como por exemplo o 17 β -estradiol (Figura 1). Por apresentarem atividade estrogênica são conhecidos também como fitoestrogênios. É interessante pontuar que tais substâncias são encontradas naturalmente e de forma abundante nos grãos de soja (Kim, 2022; Křížová, 2019).

Figura 1- Estrutura química da genisteína, daidzeína e 17β-estradiol



Fonte: Autora (2024).

Quando consumimos soja e seus derivados, as isoflavonas são hidrolisadas no intestino liberando as agliconas, daidzeína, genisteína e gliciteína que são substâncias biologicamente ativas (Kim, 2022). Além disso, atividades antiangiogênicas, antioxidantes e anticancerígenas foram atribuídas às tais substâncias em estudos com soja, trevo vermelho (*Trifolium pratense L.*), lótus (*Lotus japonicus*), grão de bico (*Cicer retinum L.*), alfafa (*Medicago sativa L.*) e kudzu (*Pueraria lobata L.*) (Bellow *et al.*, 2012; Birt *et al.*, 2001; Foudah e Abdel-Kader, 2017; Křížová, 2019; Reiter *et al.*, 2008; Ryan-Borches *et al.*, 2006). Em plantas, os isoflavonoides são liberados pelas raízes e demonstram um papel importante na adaptação ambiente biológico como agentes defensivos e moléculas sinalizadoras. Este mecanismo induz a formação de nódulos e a fixação simbiótica do nitrogênio (Kim, 2022). Além do mais, há pesquisas que enfatizam o acúmulo de isoflavonoides em caso de estresses abióticos e que os mesmos podem estar envolvidos na defesa antioxidante, na absorção de radiação UV e na quelação de metais (Trush e Pal'ove-Balang, 2023).

Os nódulos da soja são órgãos simbióticos que se formam e localizam nas raízes através de uma interação complexa entre as plantas de soja e rizóbios (Kim, 2022). Diversas leguminosas sintetizam isoflavonoides em quantidades reduzidas; no entanto, os rizóbios (que são bactérias fixadoras de nitrogênio) podem causar ativação de genes específicos que são responsáveis pela codificação das enzimas fundamentais na formação de isoflavonoides (Křížová, 2019).

De acordo com os estudos de Krizová *et al.* (2019) e Nakai *et al.* (2020), as principais

isoflavonas encontradas na soja são a genisteína e a daidzeína. Tais substâncias possuem reconhecidas propriedades anticancerígenas, antioxidantes, anti-inflamatórias e cardioprotetoras. Estudos apontaram que a genisteína pode reduzir o risco de câncer de mama, próstata e cólon, além de atuar na prevenção de doenças cardíacas e osteoporose. Assim como a genisteína, a daidzeína que é outro tipo de isoflavona encontrada em grande quantidade na soja, apresenta propriedades antioxidantes e anticancerígenas, principalmente no câncer de mama e próstata. Além das propriedades mencionadas, as isoflavonas da soja também têm sido associadas à redução dos sintomas da menopausa, melhora da saúde óssea, efeito protetor contra doenças cardiovasculares e modulação do sistema imunológico (Kim, 2022).

1.5 FITOALEXINAS

As fitoalexinas são metabólitos especializados de origem vegetal que constituem um dos componentes do mecanismo de defesa induzido das plantas. São sintetizados e acumulados localmente em resposta à elicitores bióticos e abióticos, tais como patógenos, ferimentos, congelamento, luz UV e exposição a produtos químicos agrícolas (Feng, *et al.*, 2007; Romagnolo *et al.*, 2012 e Simons, *et al.*, 2011). O maior grupo de fitoalexinas é o do tipo pterocarpano, que se encontram principalmente em plantas da família Leguminosae tais como a soja, a ervilha (*Pisum sativum*), o grão-de-bico, a luzerna (*Medicago sativa*), o amendoim (*Arachis hypogaea*) e o tremoço (*Lupinus angustifolius*) (Ahuja; Kissen e Bones, 2012).

As fitoalexinas foram identificadas em pelo menos 75 espécies de plantas, incluindo vegetais crucíferos, soja, alho, tomate, arroz, feijão e batata. Evidências pré-clínicas sugerem que esses compostos possuem propriedades anticancerígenas incluindo inibição da atividade microbiana, proliferação celular, invasão e metástase, estimulação hormonal e efeitos estimuladores na expressão de enzimas metabolizadoras (Banmji e Corbitt, 2017; Romagnolo *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado nas raízes de soja, foi observado que a concentração de gliceolinas após a inoculação com *Fusarium solani* foi maior em uma cultivar parcialmente resistente do que em uma cultivar suscetível. Isso sugere que a capacidade de produzir quantidades suficientes de gliceolinas rapidamente em resposta à infecção por *F. solani* é importante para proporcionar resistência parcial a esse fungo (Lozovaya *et al.*, 2004). Outro exemplo, foi a inoculação de sementes de soja em germinação com os patógenos *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oligosporus*. Como resultado, houve também a estimulação na produção de gliceolinas, embora a quantidade formada dependesse do tipo de

infecção por patógeno (Feng *et al.*, 2007).

1.6 BIOSÍNTESE DAS ISOFLAVONAS E FITOALEXINAS

Para sintetizar os isoflavonoides específicos das leguminosas (Figura 2), é necessário a atuação da via dos fenilpropanoides, onde a primeira enzima envolvida é a fenilalanina amônia-liase (PAL, Tabela 1) que inicia convertendo a fenilalanina em ácido cinâmico. Em seguida, ocorre uma reação de hidroxilação que é catalisada pela ação da enzima cinamato 4-hidrosilase (C4H) que converte o ácido cinâmico em ácido *p*-cumárico que, posteriormente, é convertido em *p*-cumaroil-CoA pela ação da enzima 4-cumarato-CoA ligase (4CL1). Deste modo, a enzima chalcona sintase (CHS) juntamente com três unidades de moléculas de malonil-CoA formam a naringenina. A catálise pela ação das enzimas chalcona redutase (CHR) e chalcona sintase (CHS) sintetizam a liquiritigenina que é um intermediário para síntese das isoflavonas. Posteriormente, a enzima 2-hidroxiisoflavanona sintase (IFS2), que é a enzima chave dos isoflavonoides, juntamente com a enzima 2-hidroxiisoflavanona desidratase (HIDH) produzem a daidzeína que é a precursora tanto para a formação das isoflavonas quanto para formação das fitoalexinas.

Na formação das isoflavonas, a daidzeína é convertida em daidzina onde é adicionado uma molécula de glicose através da ação da enzima uridina difosfato glicosiltransferase (UGTs). Em seguida, a enzima maloniltransferase (MT) converte a daidzina em 6''-*O*-malonildaidzina; a 6''-*O*-acetildaidzina é produzida pela enzima acetiltransferase (AT).

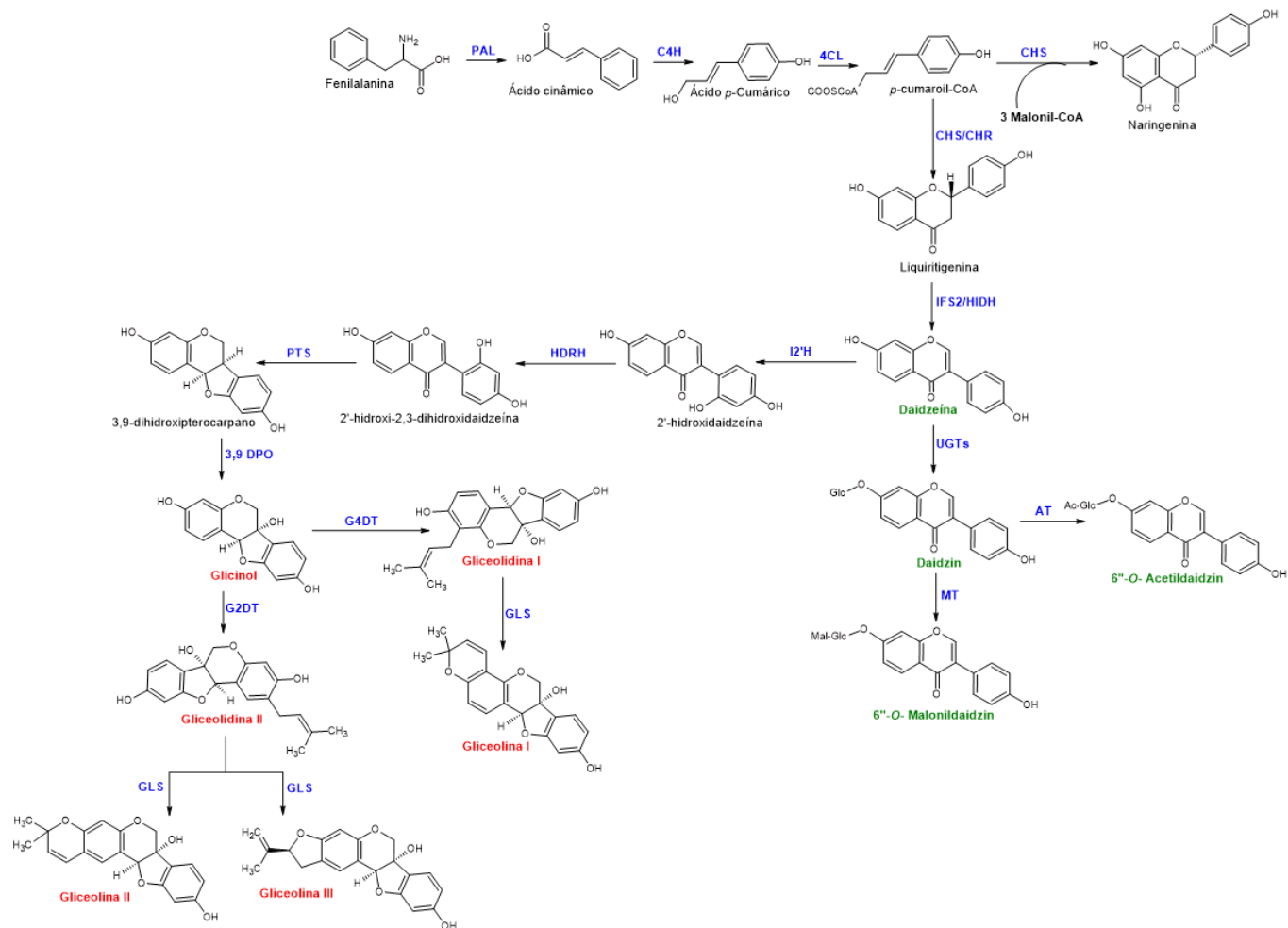
Já para formação das fitoalexinas, a daidzeína sofre reações químicas de ciclização e hidroxilação através das ações das enzimas isoflavona 2'-hidroxilase (I2'H), 2'-hidroxidaidzeína redutase (HDRH) e pterocarpano sintase (PTS1) formando o 3,9-dihidroxipterocarpano que, através da ação da enzima 3,9-dihidroxipterocarpano 6a-monooxigenase (3,9-DPO) origina o glicinol que é o precursor não prenilado das gliceolinas I/II/III e gliceolidinas I/II. As enzimas glicinol 4-dimetilaliltransferase (G4DT) e glicinol 2-dimetilaliltransferase (G2DT) prenilam o glicinol em gliceolidinas I e II, respectivamente. Ademais, a etapa final das fitoalexinas consiste na atuação da enzima gliceolina sintase (GLS) que por meio da ciclização converte a gliceolidina I em gliceolina I e a gliceolidina II em gliceolinas II e III.

Tabela 1- Nome das enzimas envolvidas na via biossintética dos isoflavonoides

Gene	Proteína
PAL1	Fenilalanina amônio-liase
4CL1	4-cumarato-CoA ligase
C4H	Cinamato 4-hidrosilase
CHS1	Chalcona sintase 1
CHR	Chalcona redutase
CHS	Chalcona sintase
IFS2	2-hidroxiisoflavanona sintase
HIDH	2-hidroxiisoflavanona desidratase
UGTs	Uridina difosfato glicosiltransferase
AT	Acetiltransferase
MT	Maloniltransferase
I2'H	Isoflavona 2'-hidroxilase
HDRH	2'-hidroxiidzeína redutase
PTS1	Pterocarpano sintase 1
3,9 DPO	3,9-dihidroxipterocarpano 6a-monooxigenase
G4DT	Glicinol 4-dimetilaliltransferase
G2DT	Glicinol 2-dimetilaliltransferase
GLS	Gliceolina sintase

Fonte: Autora (2024).

Figura 2- Via biossintética dos isoflavonoides na soja (*G. max*)



Fonte: Autora (2024).

Legenda: As abreviaturas das enzimas são mencionadas na Figura e seus respectivos nomes foram descritos na Tabela 1. As siglas na cor azul representam as enzimas; a escrita em vermelho representa as fitoalexinas e a escrita em verde representa as isoflavonas.

2 JUSTIFICATIVA

As cultivares de soja desenvolvidas BR4, BR16, BRS184 e E45, sendo as três primeiras susceptíveis ao estresse hídrico e a última moderadamente resistente, têm sido objeto de estudos fisiológicos, genômicos e transcriptômicos pelos pesquisadores da empresa brasileira de pesquisa agropecuária – Embrapa (Coutinho *et al.*, 2018; Nakayama *et al.*, 2017). Portanto, este estudo tem o apoio e está em consonância com os interesses técnico-científicos da Embrapa, a qual disponibilizou o acesso às amostras destes genótipos submetidos às diferentes condições controladas de estresses hídricos.

No estudo de Coutinho *et al.* (2018), tais cultivares (BR4 e E45) foram avaliadas do ponto de vista metabolômico não-alvo utilizando-se técnicas de análise de dados obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN). Por esta técnica, metabólitos primários foram prioritariamente detectados e avaliados. Os metabólitos especializados, por sua vez, foram brevemente descritos neste trabalho e um detalhamento das classes e identidades químicas abrangente ainda não havia sido realizado. Já as amostras BRS184 e BR16 fazem parte de um conjunto de amostras do projeto financiado pela FAPESP “Abordagens ômicas integradas para a avaliação da dinâmica micromolecular fenotípica de cultivares de *Glycine max* (soja) geneticamente modificados com vistas a tolerância à estresses hídricos”, e cujos resultados metabolômicos e transcriptômicos ainda não foram publicados.

Assim, o motivo principal do presente estudo é que ainda pouco se sabe a respeito de como o metabolismo secundário de soja, que é uma planta modelo, e de outras espécies alimentícias é afetado pelo estresse hídrico. Portanto, a execução deste trabalho também se justifica no importante potencial econômico da soja que, por ser um dos pilares do atual sistema alimentício, o desenvolvimento de cultivares com maior capacidade de adaptação a tais eventos é uma promissora alternativa para a proteção das plantações, redução de custos de produção e aumento da qualidade e produtividade. Espera-se que esta pesquisa contribua para um melhor conhecimento de cultivares susceptíveis e resistentes a condições de alagamento, elencando metabólitos indicadores destas desejáveis características de resistência e, inclusive, fomentando o desenvolvimento e registro de cultivares de grande valor tecnológico agregado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo descrever a forma como a via biossintética das isoflavonas e fitoalexinas respondem ao estresse hídrico, mais especificamente, à condição de alagamento em quatro genótipos de soja (a citar, os genótipos BR4, BR16, BRS184 e E45), os quais foram submetidos a condições de cultivo controle e hipóxia induzida por alagamento.

3.1.1 Objetivos Específicos

- a) analisar e interpretar os dados obtidos por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS visando à análise quantitativa relativa dos metabólitos especializados biossintetizados pelos quatro genótipos de soja submetidos a hipóxia induzida por alagamento;
- b) evidenciar os metabólitos indicadores dos possíveis mecanismos de adaptação da soja durante o alagamento;
- c) descrever de que forma os sete metabólitos monitorados são alterados na via biossintética dos isoflavonoides da soja sob estresse por alagamento.

4 METODOLOGIA

4.1 CULTIVO, SECAGEM, FRAGMENTAÇÃO E EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

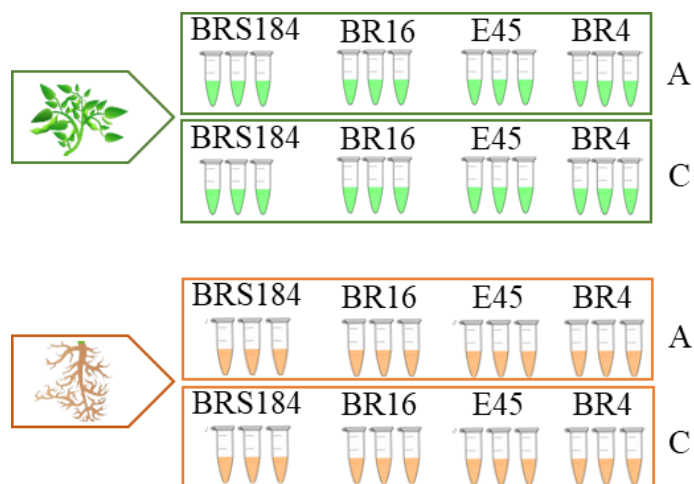
Para este estudo, quatro diferentes genótipos de soja foram cultivados e disponibilizados pela Embrapa Soja (Londrina/PR). Tais genótipos contemplaram três cultivares convencionais sensíveis ao alagamento (BR4, BR16 e BRS184) e uma cultivar moderadamente resistente (E45). Estes genótipos foram cultivados sob duas diferentes condições (controle e alagamento). As sementes pré-germinadas foram inoculadas com *Bradirhizobium japonicum* e transferidas para vasos de 1 L contendo o substrato composto por uma mistura de solo e areia (1:1).

As plântulas foram mantidas em condições de estufa com um ciclo de luz/obscuridade de 12/12 h, a 28 ± 2 °C e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e foram cultivadas em condições ótimas até ao estágio V3 e depois sujeitas a estresse por alagamento. Para o efeito, foi adicionada água

às plantas até 3-5 cm acima do nível do solo durante 15 dias. As plantas de controle foram mantidas em condições ideais. Após 15 dias, as folhas e as raízes foram colhidas, limpas e secas.

No presente estudo, as amostras foram analisadas em triplicata, totalizando 48 amostras (24 amostras de folhas e 24 de raízes), como pode ser conferido na Figura 3, a seguir:

Figura 3- Esquema ilustrativo do conjunto de amostras de folhas (em verde) e raízes (em marrom) analisadas no presente estudo



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A letra A representa o grupo em condição de alagamento e a letra C representa o grupo em condição controle.

Para as análises metabolômicas, folhas e raízes foram processadas de acordo com o protocolo desenvolvido e executado previamente a este trabalho, durante o pós-doutorado realizado pela orientadora no ano de 2019. Sucintamente, o material vegetal coletado já estabilizado e desidratado em estufa de ar circulante à 40 °C foi fragmentado em moinho analítico de facas com o auxílio de nitrogênio líquido e o tamanho de partículas uniformizado por tamização. Para as análises, as amostras foram preparadas na concentração de 40 mg de pó por mililitro de solvente extrator para as raízes, e a 10 mg/mL para as folhas. O solvente utilizado foi uma mistura de água e metanol 1:1 (v/v). A extração foi feita por 20 min, com o auxílio de um banho de ultrassom, à temperatura ambiente. Além disso, durante o preparo das amostras, ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) foi utilizado como padrão interno, no solvente de extração, na concentração de 400 µg/mL para a normalização dos dados. Após as extrações, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi filtrado numa membrana de PDPE 0,22 µm diretamente para vial de 1,5 mL para análise cromatográfica utilizando-se HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS.

O método cromatográfico para a análise das diferentes classes de metabólitos especializados presentes nas amostras de soja foi otimizado via planejamento fatorial e análise da superfície de resposta, visando à obtenção do maior número de picos resolvidos nos cromatogramas. Para isto, foram injetados uma quantidade de 10 µL de cada extrato numa coluna cromatográfica Ascentis® Express C18 (150 x 4,6 mm, 2,7 µm) (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) protegida por uma pré-coluna da mesma fase estacionária, mantida a 32 °C. As separações cromatográficas foram realizadas a uma vazão de 0,9 mL/min, em gradiente de eluição composto por fase A (água com 0,1% de ácido fórmico) e fase B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico), começando em 5% de B de 0 a 2 min, depois de 5% a 25% de B de 2 a 18 min, de 25% a 100% de B de 18 a 26 min, mantendo-se a 100% de B até 30 min. O acondicionamento foi feito voltando à condição inicial de 5% de B até 31 min, e mantendo-se a 5% de B até 36 min. Os dados de MS foram adquiridos em modo negativo e positivo utilizando um intervalo de MS de m/z 50-1300. O equipamento foi calibrado internamente com ácido trifluoroacético (TFA) durante cada injeção.

Os parâmetros de MS já foram estabelecidos previamente da seguinte forma: pressão do gás nebulizador, 5,0 Bar; fluxo de gás de secagem, 10,5 L/min; tensão do capilar, 3600 V; desvio da placa terminal: 450 V, temperatura da fonte de ionização, 220 °C; taxa de aquisição de espectros, 2 espectros/s. A fragmentação automática de MS/MS foi realizada para os quatro íons mais intensos por espectro, e foi realizada aplicando um gradiente de energia de dissociação induzida pela colisão (CID) de 20 a 65 eV, de acordo com a massa de origem. Todos os dados de MS foram previamente analisados com o software Bruker Compass DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics, Boston, MA, EUA).

4.2 ANOTAÇÃO DOS METABÓLITOS ESPECIALIZADOS E ANÁLISE DOS DADOS

A elaboração do banco de dados de metabólitos especializados já conhecidas em *G. max* foi construído através de informações recentes da literatura, e a partir da obtenção e análise dos dados cromatográficos e espectrométricos obtidos durante o estudo. Como a abordagem utilizada foi a metabolômica-alvo, a anotação dos metabólitos foi feita com base nos valores de massa/carga (m/z) e dos perfis de fragmentação obtidos por espectrometria de massas tanto para as folhas quanto para as raízes. Os espectros de massas dos sete metabólitos alvos monitorados encontram-se no (Apêndice I).

Os dados espectrométricos de massa bruta (modo positivo) foram convertidos para o formato de dados .mzXML utilizando o software MSConvert

(www.proteowizard.sourceforge.net). Os dados em .mzXML foram, então, alinhados, desconvoluídos e filtrados usando o software MZmine 3 com base nos parâmetros descritos na (Tabela 2). Os dados de massas na matriz de dados foram localizados, bem como a massa/carga do padrão interno DHB. As matrizes de dados resultantes foram obtidas separadamente para folhas e raízes.

As matrizes de dados das folhas e raízes foram organizadas no Microsoft Excel 2013 (Microsoft, EUA). Com o auxílio das Tabelas 3 e 4, os metabólitos alvos foram filtrados, tratados e organizados de acordo com o nome do metabólito, o tecido (raízes ou folhas); os genótipos (BR4, E45, BR16 e BRs184), a condição (controle ou alagamento). A partir dos valores, foi realizada a análise estatística ANOVA Two-way através do software Prism (versão 8.0.2. GraphPad software©, La Jolla, CA, USA) que permitiu avaliar simultaneamente os efeitos de dois fatores independentes (genótipo e condição de controle ou alagamento) sobre a variável dependente (expressão dos metabólitos alvos). Os dados da análise estatística Anova Two-way se encontram no (Apêndice II).

Essa análise foi importante neste estudo, pois permitiu identificar não apenas a influência individual de cada fator (genótipo e condição de controle ou alagamento) na expressão dos metabólitos, mas também as interações entre esses fatores. Além disso, este método de análise possibilitou determinar se as diferenças observadas na expressão dos metabólitos entre os genótipos e as condições (controle e alagamento) foram estatisticamente significativas. Por fim, os resultados foram também expressos em Log₂ Fold change.

Tabela 2- Parâmetros do MZmine 3 utilizados para o pré-processamento e extração dos dados espectrométricos de folhas e raízes de soja analisadas

Parâmetros (Batch mode)		BR4 e E45		BRS184 e BR16		
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas	
Mass Detection – MS1	Retention time	0-33 min	0-33 min	0.01-33 min	0.1-33 min	
	Noise Level	1E2	1E2	5E1	5E1	
Mass Detection – MS2	Retention time	0-33 min	0-33 min	0.01-33 min	0.1-33 min	
	Noise Level	1E2	1E2	5E1	5E1	
Chromatogram Builder	MS level	1	1	1	1	
	Min consecutive scans	2	2	2	2	
	Min Intensity for consecutive scans	5E1	5E1	5E1	5E1	
	Min Absolute height	1E2	1E2	1E2	1E2	
	M/z Tolerance (ppm)	0.015 or 20	0.015 or 20	0.0015 or 20	0.0015 or 20	
	M/S1 to MS2 precursor tolerance (m/z)	0.015 or 20	0.015 or 20	0.0015 or 20	0.0015 or 20	
Chromatogram deconvolution	Min Relative Feature Height	10%	10%	10%	10%	
	Min required signals	1	1	1	1	
	Min signal intensity absolute	1E2	1E2	1E2	1E2	
	Chromatographic threshold	50%	50%	50%	50%	
	Min search range RT/Mobility	0.05	0.05	0.1	1	
	Min relative height	10%	10%	10%	10%	
	Min absolute height	1E2	1E2	1E2	1E2	
	Min ratio peak top/edge	1.7	1.7	1.7	1.7	
	Peak duration range (min)	0.09-2.00	0.09-2.00	0.09-2.00	0.09-2.00	
	M/z tolerance (ppm)	0.015 or 20	0.015 or 20	0.001 or 10	0.001 or 10	
	Isotopic peak grouper	RT tolerance	0.05	0.05	0.05	0.05
		Maximum charge	2	2	2	2
M/z Tolerance (ppm)		0.015 or 20	0.015 or 20	0.0015 or 20	0.0015 or 20	
Join Aligner	Weight for m/z	3	3	3	3	
	RT tolerance	0.5	0.5	0.5	1	
Peak Finder	Weight for RT	1	1	1	1	
	Intensity tolerance	50%	50%	50%	50%	
	m/z tolerance	0.015 or 20	0.015 or 20	0.0015 or 20	0.0015 or 20	
	RT tolerance	2	2	2	1	

Fonte: Autora (2024).

5 RESULTADOS

Os metabólitos anotados com seus respectivos tempos de retenção e massa/carga (m/z) estão descritos na Tabela 3 para raízes e Tabela 4 para folhas. Para completar os dados, a massa molecular e os fragmentos de massas foram obtidos através do banco de dados e da literatura. Para calcular o erro em partes por milhão (ppm) utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{(m/z \text{ teórico} - m/z \text{ experimental}) \times 10^6}{m/z \text{ teórico}}$$

Todos os metabólitos-alvo foram encontrados tanto nas folhas quanto nas raízes de soja, porém em diferentes concentrações relativas. Todos os metabólitos anotados foram detectados com os íons na forma $[M+H]^+$. Os valores de tempo de retenção foram apresentados como sendo a média do conjunto de dados das amostras E45 e BR4, as quais foram analisadas em dias diferentes das amostras BRS184 e BR16. Logo, além das variações de tempo de retenção entre análises em tempos diferentes, há de se considerar também o pequeno, mas presente efeito de matriz. Por conseguinte, a análise e curadoria dos respectivos espectros de massas foram essenciais para a anotação correta dos picos cromatográficos observados em cada tipo de amostra (raízes e folhas). Espectros representativos de cada metabólito encontram-se dispostos no Apêndice I desta dissertação.

Com base nos dados das áreas relativas de cada substância anotada na matriz de dados e, após normalização contra a massa pesada (mg) e a área do padrão interno (ácido 2,5-dihidroxibenzóico, DHB, detectado na forma de $[M+H]^+ = 155.0321$ em 8.6 minutos, a matriz de dados foi normalizada dividindo a área dos metabólitos pela a área do padrão interno e em seguida foi submetida à análise estatística.

Assim, a Figura 4 apresenta ao resultado da análise da área relativa média de fitoalexinas e isoflavonas em raízes de soja sob a condição de alagamento e de controle. Os metabólitos glicinol e gliceolidinas I/II foram significativamente alterados durante o estresse hídrico em relação às amostras controle, com nível de significância de $p < 0,05$. O teor relativo de glicinol foi reduzido, enquanto que o teor das gliceolidinas foi aumentado de forma significativa nas plantas submetidas a alagamento. Já para as gliceolinas, apesar de os resultados não serem estatisticamente significativos, nota-se uma diminuição do teor nas amostras sob estresse em relação ao controle.

Tabela 3- Isoflavonas e fitoalexinas detectadas nas raízes de soja (*G. max*) por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS

Classe	Nome da substância	Fórmula Molecular	tR* (minutos)	Teórico [M+H] ⁺	Experimental* [M+H] ⁺	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS
Pterocarpano	Glicinol	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	10.29	273.0757	273.0737	7.324	255
Isoflavona	Daidzina	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	13.84	417.1180	417.1164	3.836	255
Isoflavona	6"-O-Malonildaizina	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	16.63	503.1184	503.1137	9.342	255
Isoflavona	6"-O-Acetildaizina	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₀	18.40	459.1286	459.1200	18.731	255
Isoflavona	Daidzeína	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	20.94	255.0652	255.0649	1.176	-
Pterocarpano	Gliceolina I/II/III	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	23.71	321.1074**	321.1119**	14.14	321
Pterocarpano	Gliceolidina I/II	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	23.84	323.1231***	323.1254***	7.118	323, 267

Fonte: Autora (2024).

Legenda: *Corresponde à média dos valores obtidos para as amostras BR4 e E45; **Teórico para [M+H]⁺ = 339.1227 (Calculado = 339.1227 - 18.01528 = 321.1074); *** Teórico para [M+H]⁺ = 341.1384 (Calculado = 341.1384 - 18.01528 = 323.1231).

Tabela 4- Isoflavonas e fitoalexinas detectadas nas folhas de soja (*G. max*) por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS

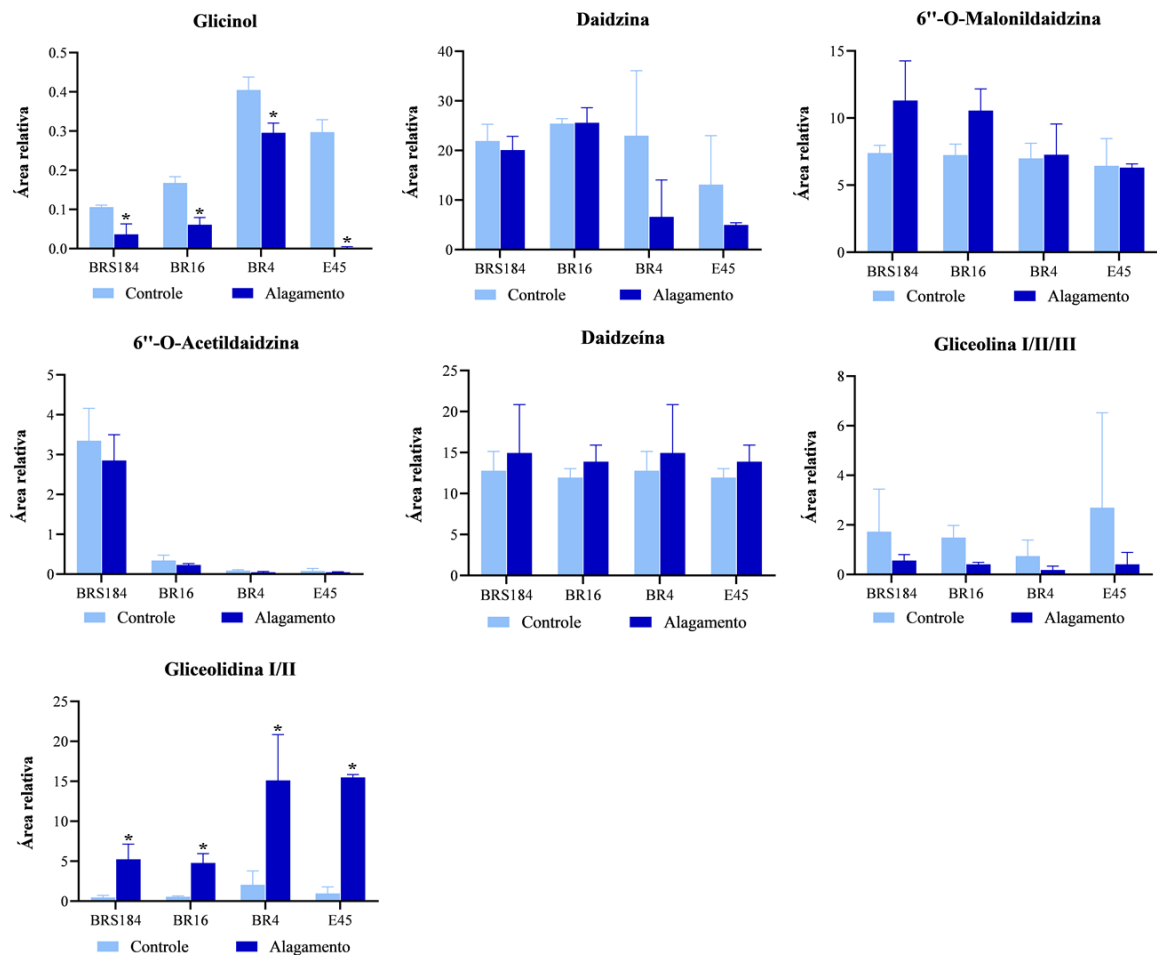
Classe	Nome da substância	Fórmula molecular	tR* (minutos)	Teórico [M+H] ⁺	Experimental* [M+H] ⁺	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS
Pterocarpano	Glicinol	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	10.27	273.0757	273.0738	6.958	255
Isoflavona	Daidzina	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	13.87	417.1180	417.1141	9.350	255
Isoflavona	6"-O-Malonildaizina	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	16.37	503.1184	503.1128	11.131	255
Isoflavona	6"-O-Acetildaizina	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₀	18.10	459.1286	459.1553	58.154	255
Isoflavona	Daidzeína	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	21.00	255.0652	255.0635	6.665	-
Pterocarpano	Gliceolina I/II/III	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	23.66	321.1074*	321.0601**	147.303	321
Pterocarpano	Gliceolidina I/II	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	23.89	323.1231**	323.0972***	80.155	323, 267

Fonte: Autora (2024).

Legenda: *Corresponde à média dos valores obtidos para as amostras BR4 e E45; **Teórico para [M+H]⁺ = 339.1227 (Calculado = 339.1227 - 18.01528 = 321.1074); *** Teórico para [M+H]⁺ = 341.1384 (Calculado = 341.1384 - 18.01528 = 323.1231).

Com a complementação da análise Anova Two-Way, foi evidenciado que o teor de glicinol nas raízes de soja variou significativamente entre os genótipos, sob estresse por alagamento e na interação entre genótipo e estresse ($p < 0,05$). O mesmo foi observado para a gliceolidina I/II. Já para os metabólitos daidzina e acetildaidzina, a diferença significativa foi apenas entre os genótipos. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas para os metabólitos malonildaidzina, daidzeína e gliceolina I/II/III (Tabela 5, Apêndice II).

Figura 4 - Análise da área relativa média de fitoalexinas e isoflavonas em raízes de soja sob condições de alagamento e controle



Fonte: Autora (2024).

Legenda: O asterisco indica um resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação às amostras controle.

Tabela 5- Resultados da análise Anova Two-way para as raízes e folhas de soja, mostrando a significância das alterações nos níveis de metabólitos entre os genótipos, entre a condição controle e estresse e na interação genótipo x estresse

Metabólito	Raízes			Folhas		
	Genótipo	Estresse	Genótipo x Estresse	Genótipo	Estresse	Genótipo x Estresse
Glicinol	< 0,0001	0,0065	0,0002	< 0,0001	0,7986	0,7244
Daidzina	0,0042	0,1091	0,4248	< 0,0001	0,0051	0,0017
6"-O-Malonildaidzina	0,0887	0,0714	0,2558	0,0001	0,0102	0,0679
6"-O-Acetildaidzina	< 0,0001	0,4838	0,8544	0,0001	0,9815	0,066
Daidzeína	0,9209	0,4155	0,9998	0,0075	0,1324	0,0232
Gliceolina I/II/III	0,6923	0,1600	0,8227	0,002	0,8804	0,433
Gliceolidina I/II	0,0057	0,0118	0,0187	0,0938	0,0244	0,1707

Fonte: Autora (2024).

Nota: São mostrados os valores de valor de P (p-value), sendo que os resultados significativos ($p < 0,05$) são destacados em negrito.

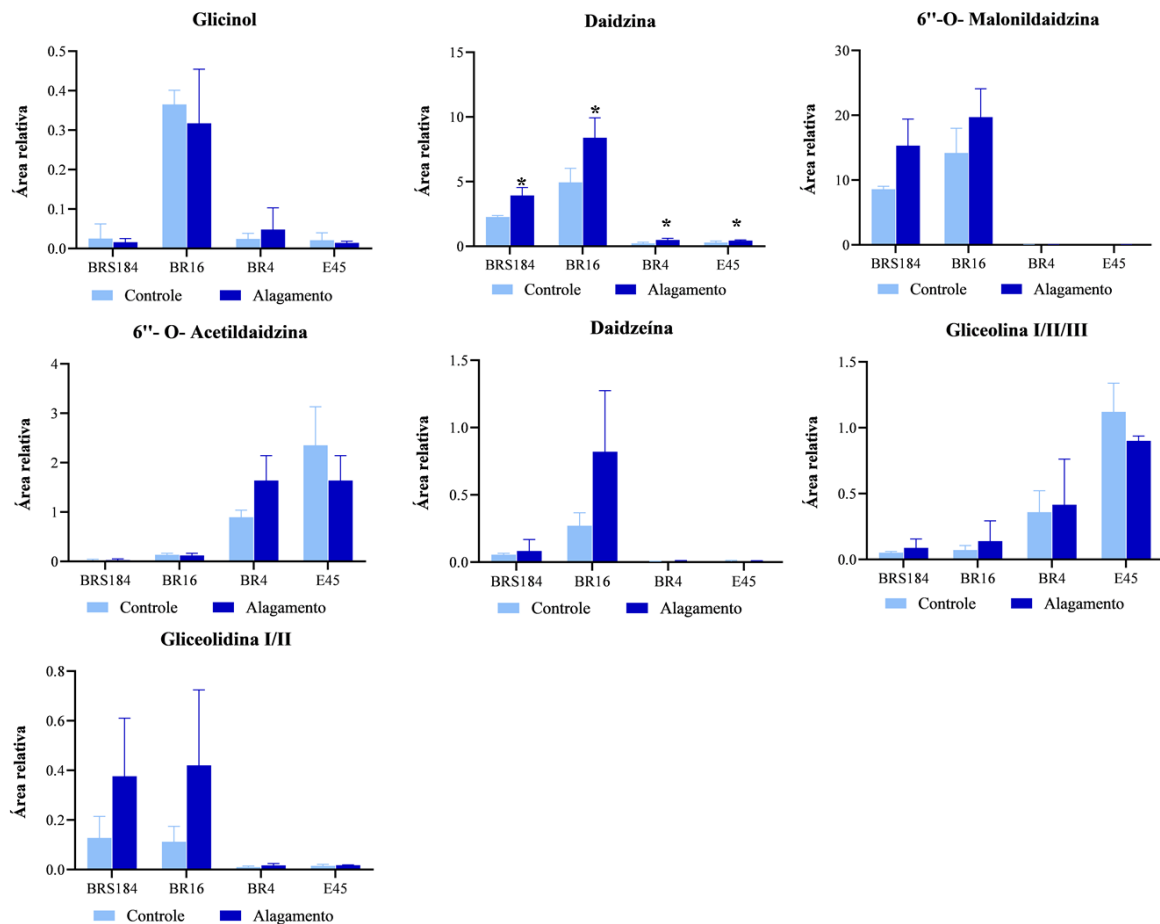
A Figura 5 também apresenta a análise da área relativa média de fitoalexinas e isoflavonas sob condição de alagamento e controle, no entanto, em folhas. Os resultados indicam que o teor da daidzina foi significativamente alterado (aumentado) durante o estresse hídrico em relação às amostras controle, com nível de significância de $p < 0,05$. Similarmente às raízes, é possível observar uma tendência de diminuição do glicinol a aumento das gliceolidinas, na condição de alagamento.

Os resultados com base na análise estatística Anova Two-way para as folhas de soja mostraram que os metabólitos daidzina e daidzeína foram alterados tanto no genótipo quanto pela interação entre genótipo estresse, para ambos ($p < 0,05$) (Tabela 5, Apêndice II).

No caso dos metabólitos glicinol, acetildaidzina e gliceolina I/II/III, a quantidade desses metabólitos foi modificada apenas pelo genótipo. Já para o metabólito malonildaidzina, a quantidade foi afetada tanto pelo genótipo quanto pelo estresse, mas sem interação entre eles. Por fim, a quantidade do metabólito gliceolidina I/II foi alterada apenas pelo tipo de estresse ao qual a planta foi submetida.

Figura 5 - Análise da área relativa média de fitoalexinas e isoflavonas em folhas de soja sob

condições de alagamento e controle

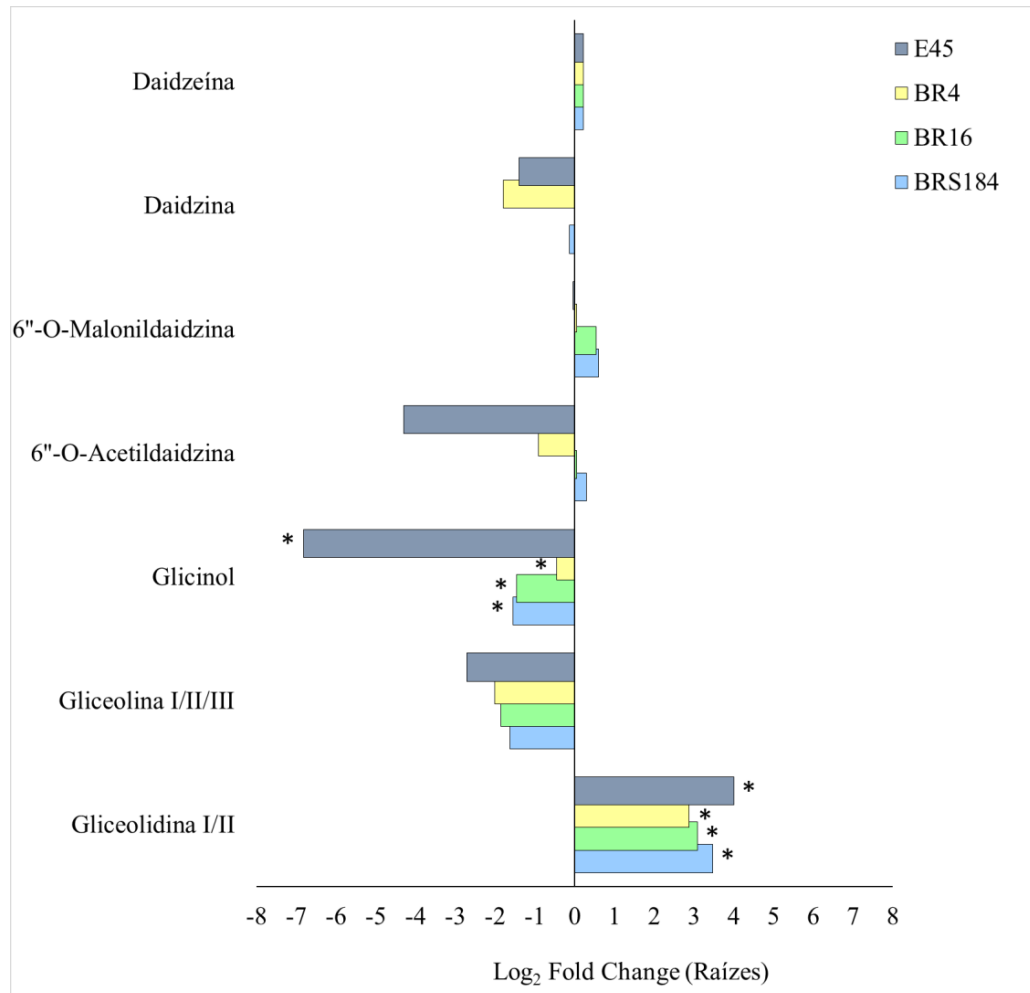


Fonte: Autora (2024).

Legenda: O asterisco indica um resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação às amostras controle.

A Figura 6 representa uma análise comparativa com os dados expressos em Log₂ Fold change nas raízes de soja em condições de alagamento em relação ao controle. Corroborando com os gráficos anteriores, observa-se uma diminuição estatisticamente significativa do metabólito glicinol e um aumento das gliceolidinas I/II ($p < 0,05$). Já a Figura 7 apresenta os resultados da análise comparativa em Log₂ Fold change nas folhas de soja em condições de alagamento em relação ao controle. A análise demonstrou que a daidzina aumentou significativamente com o nível de confiança ($p < 0,05$) em todas as amostras, exceto no genótipo E45, que é classificado como moderadamente resistente ao alagamento. Além disso, outro dado interessante que é evidenciado na Figura 7 (porém sem significância estatística) é o aumento da daidzeína, 6''-O-malonildaidzina, e gliceolidinas I/II nas folhas de todos os genótipos e aumento das gliceolinas I/II/III em todos os genótipos, exceto E45. Observa-se também a menor resposta relativa, em Fold change, de todos os metabólitos-alvos nas folhas se comparado com as raízes.

Figura 6- Análise comparativa em Log_2 Fold change das raízes de soja submetida a condições de alagamento *versus* controle para cada genótipo

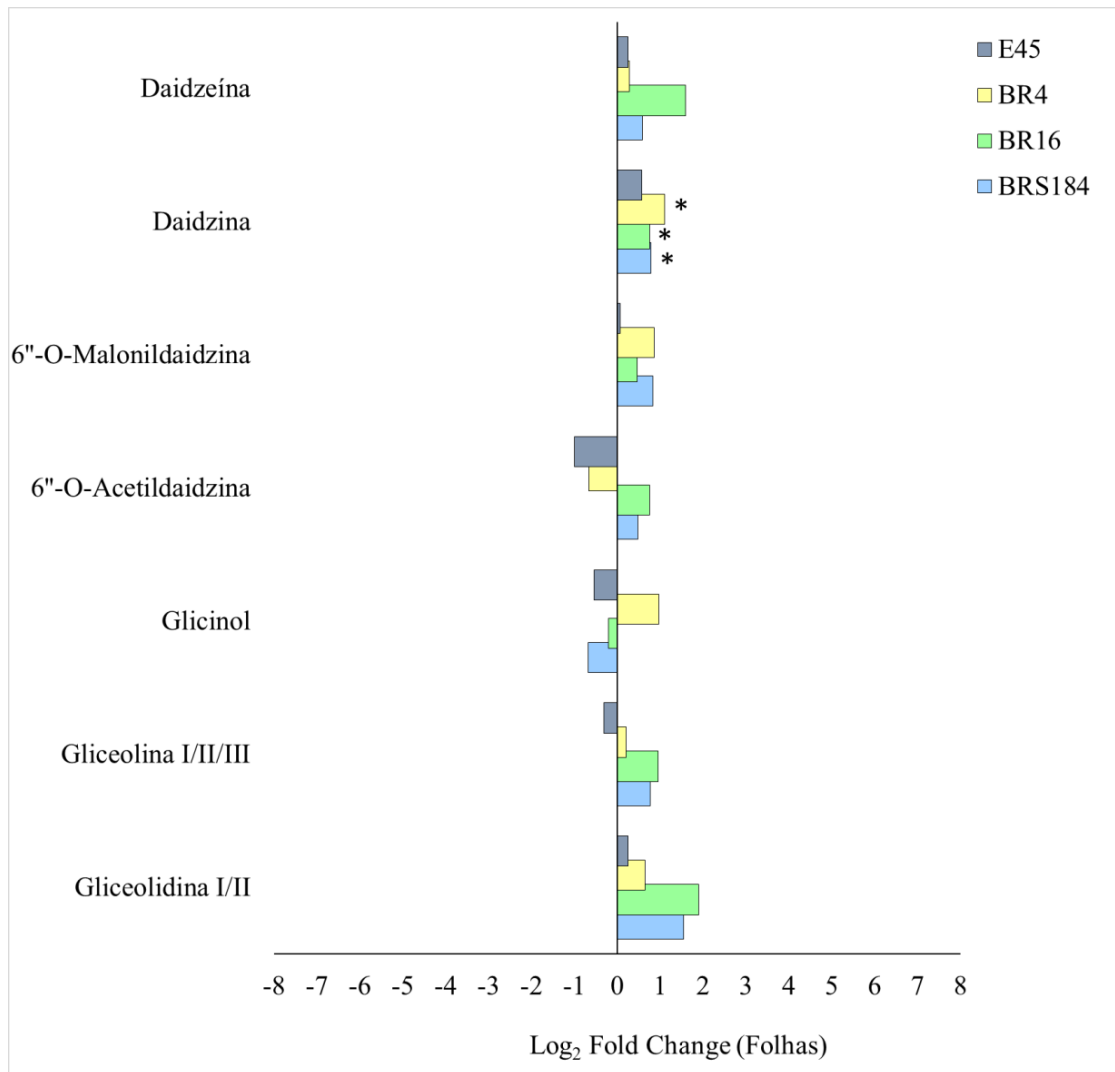


Fonte: Autora (2024).

Legenda: Os compostos que foram significativamente alterados durante o estresse por alagamento estão assinalados com um asterisco (* $p < 0,05$).

Figura 7- Análise comparativa em Log_2 Fold change das folhas de soja submetida a

condições de alagamento *versus* controle para cada genótipo



Fonte: Autora (2024).

Legenda: Os compostos que foram significativamente alterados durante o estresse por alagamento estão assinalados com um asterisco (*p<0,05).

6 DISCUSSÃO

Sabe-se que, em soja, muitos genes biossintéticos de isoflavonóides são regulados positivamente em resposta ao ataque de patógenos. No entanto, não há muitas evidências disponíveis sobre o acúmulo desses metabólitos em estresses abióticos, e menos ainda durante estresses hídricos. É interessante pontuar que são raros os estudos de modificações na biossíntese de metabólitos especializados em soja em condições relacionadas ao estresse hídrico, como pode ser observado na Tabela 6, a seguir. Este dado é ainda mais impactante, quando se observa que nenhum estudo incluiu uma análise abrangente de uma via metabólica específica, iniciando-se nos principais precursores até os produtos finais.

Tabela 6- Levantamento de estudos sobre as modificações no metabolismo especializado em soja sob estresses abióticos.

Classe	Metabólitos	Tecido	Principais resultados	Estresse	Metodologia	Referência
Isoflavonoides	Biochanina, gliciteína, daidzeína, genisteína, glicitina, daidzina, genistina, 6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenisteína, 6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina.	Grãos	Sob a condição de estresse salino houve um aumento na concentração dos metabólitos daidzina, genistina, 6''-O-malonildaidzina e 6''-O-malonilgenistina. No entanto, glicitina; 6''-O-malonilglicitina, 6''-O-acetildaidzeína e 6''-O-acetilgenisteína diminuíram.	Salino	HPLC-UV-ESI/MS	Wei Wu <i>et al.</i> , 2008 J. Agric. FoodChem.
Isoflavonoides e Flavonoides	Daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, gliciteína, glicitina, malonildaidzina, malonilgenistina, malonilglicitina, formononetina, ononina, kaemferol/luteína, naringenina, naringina, quercetina e quercimeritrina.	Folhas	Embora alguns metabólitos especializados foram identificados sob condição de estresse salino, o alvo deste estudo foram as alterações que ocorreram nos metabólitos primários sob esta mesma condição.	Salino	GC/MS e LC-FT/MS	Lu <i>et al.</i> , 2013 J. Agric. FoodChem.
Isoflavonoides	Daidzin; daidzeína e malonildaidzina	Folhas e raízes	No estresse hídrico estes metabólitos foram mais acumulados nas raízes do que nas folhas, no entanto sob a condição de estresse por alagamento os mesmos foram identificados em menores concentrações se comparado com o controle.	Hídrico (Alagamento)	LC-MS/MS RMN	Coutinho <i>et al.</i> , 2018 Environmental and Experimental Botany
Fenilpropanoides; alcaloides e flavonoides	Ácido felúrico, ácido chiquímico, ácido salicílico, ácido cinâmico, ácido dehidroascórbico,	Folhas	Este estudo teve como alvo os metabólitos primários, no entanto, dentre os metabólitos especializados identificados,	Hídrico (Seca)	GC/MS	Wang <i>et al.</i> , 2019 Acta Physiologiae Plantarum

	fitol, fluoreno e 5-metoxitripmanina.		evidenciou que o ácido ferúlico e o ácido salicílico podem atuar como antioxidantes e conferir resistência para a soja sob estresse hídrico.			
Isoflavonoides	Daidzeína, daidzin, genisteína, formononetina, coumestrol, naringenina, liquiritigenina e Kaempferol	Folhas e raízes	Houve um acúmulo do metabólito coumestrol nas raízes de soja decorrente da desidratação. O mesmo foi apontado como um marcador útil no estresse hídrico por seca.	Hídrico (Seca)	Osmometria	Rabara, <i>et al.</i> , 2017 BioMed Research International
Isoflavonoides	Daidzina, 6- <i>O</i> -malonildaidzina, 6- <i>O</i> -malonilgenistina, daidzeína, gliceolinas I/II/III e β prenil genisteína	Folhas, raízes, sementes	A condição de estresse ácido induziu a biossíntese da fitoalexina gliceolina nos tecidos vegetais.	Acidez	UPLC	Jahan e Kovich 2019 Plant signaling & behavior
Ácido fenólicos; flavonoides; alcaloides e terpenoides.	<i>p</i> -coumasterol, ácido rosmarínico, ácido isoclorogênico, luteolina-6-8-di- <i>C</i> -glucosídeo, <i>N</i> - <i>p</i> -coumaroil, indol, triptamina, saponina α A, saponina β e, ácido cítrico, ácido-6-amino hexanoico, catequina, ácido-2-metilsuccínio e ácido 6-aminocaproico.	Folhas	Esses metabólitos desempenharam um papel importante na resistência ao estresse hídrico por seca nas duas variantes de soja estudadas. Houve um aumento significativo dos ácidos fenólicos e flavonoides sob esta condição.	Hídrico (Seca)	UPLC-MS	Wang <i>et al.</i> , 2022 Botanical Studies
Isoflavonoides	Daidzeína, gliciteína, genisteína, daidzina, glicitina, genistina, acetildaidzina, acetilglicitina, acetilgenistina, malonildaidzina, malonilglicitina e malonilgenistina.	Folhas e raízes	Após a exposição à radiação UV-B todas as isoflavonas aumentaram, exceto a daidzina, glicitina, genisteína e malonilglicitina.	Radiação UV-B	HPLC	Lim <i>et al.</i> , 2020 Food chemistry

Fonte: Autora (2024).

Por conseguinte, tendo como objetivo principal contribuir com o entendimento sobre a forma como a via biossintética das isoflavonas e fitoalexinas respondem ao estresse hídrico, mais especificamente, à condição de alagamento, no presente trabalho quatro genótipos de *G. max* (BR4, BR16, BRS184 e E45) foram submetidos à hipóxia induzida por alagamento em diferentes experimentos. A análise e interpretação dos dados permite ampliar o conhecimento acerca das alterações que podem ocorrer nesta espécie em função do estresse hídrico por alagamento.

Com base nos resultados obtidos é possível observar uma maior concentração destes metabólitos (dadzina e gliceolidina) nas raízes se comparado as folhas. Em geral, em leguminosas, estas substâncias são características, porém encontradas em concentrações na ordem de nanomolares ou micromolares (Liu e Murray, 2016; Trush e Pal'ove-Balang, 2023). Neste contexto, é importante ainda considerar que é nas raízes onde se encontram os rizóbios, ou seja, as bactérias de solo que induzem a formação de nódulos em leguminosas e que transformam o nitrogênio em formas utilizáveis para planta hospedeira. Por estarem localizadas no solo, estão altamente susceptíveis a alterações hídricas. Além disso, o comprometimento hipóxico na respiração mitocondrial ocorre justamente nas raízes, impactando também a forma como a simbiose nos nódulos radiculares fixa o nitrogênio (Tao Wang *et al.*, 2021; Xiaolong ke *et al.*, 2022).

Portanto, a maior concentração e expressiva alteração destes metabólitos em raízes sugere uma possível relação com os organismos simbiontes presentes neste órgão. De fato, os isoflavonoides podem atuar no controle da nodulação e já é conhecido que tais metabólitos têm sua biossíntese alterada durante os ataques por agentes patogênicos. De acordo com os estudos de Trush e Pal'ove-Balang (2023), os pterocarpanos são produzidos em resposta ao *Oomycetos Aphanomyces*, que é um patógeno fúngico que acomete a ervilha, assim como a daidzeína que inibe o crescimento de *Fusarium culmorum*.

Para as raízes de soja, a análise Anova Two-way evidenciou diferenças significativas entre os genótipos, o estresse e entre a interação entre genótipo x estresse para alguns metabólitos. Vale a pena destacar as variações no teor dos metabólitos glicinol e a gliceolidina I/II, que apresentaram diferenças significativas tanto entre as cultivares avaliadas (evidenciando variações na biossíntese dos metabólitos secundários dependendo do *background* genético), quando na interação genótipo e estresse. O estresse por alagamento causou alteração significativa nesses metabólitos em todos os genótipos, corroborando com o que foi observado na interação entre genótipo x estresse. Isso pode ser atribuído à estratégia de defesa ou de sinalização da planta num possível mecanismo de proteção o estresse oxidativo causado pela

hipóxia. Ainda, sob estresse, a redução estatisticamente significativa do glicinol, seguida do aumento das gliceolidinas I/II nas raízes, sugere um possível consumo do precursor em prol da biossíntese de fitoalexinas, ao final da rota biossintética.

É interessante observar que a isoflavona glicosilada daidzina foi significativamente acumulada nas folhas, porém reduzida nas raízes sob alagamento. É possível que, como precursor dos isoflavonoides, sua biossíntese esteja sendo estimulada nas folhas, com posterior consumo visando a biossíntese de gliceolidinas, que são acumuladas nas raízes.

Similarmente ao glicinol e gliceolidina I/II, a análise estatística evidenciou diferenças significativas nos metabólitos de daidzina e 6''-O-acetildaidzina entre os genótipos, mesmo quando cultivadas sob condição de controle. Isso indica, mais uma vez, a influência dos genes específicos para a produção desses metabólitos. Por outro lado, a ausência de efeitos significativos na interação entre genótipo x estresse pode indicar que na via biossintética das fitoalexinas (Figura 2), as isoflavonas (daidzina e 6''-O-acetildaidzina) apresentam menor sensibilidade às condições de alagamento do que as fitoalexinas (glicinol e gliceolidina I/III).

Os efeitos observados nas raízes fornecem informações valiosas sobre a resposta da soja ao estresse por alagamento em termos da produção de fitoalexinas. As diferenças significativas observadas entre os genótipos e sob estresse para alguns metabólitos, mas não para outros, indicam a complexa interação entre fatores genéticos e ambientais na regulação da resposta ao estresse. Essa observação pode estar atrelada à menor ou maior importância desses metabólitos na resposta da planta ao alagamento.

Já nas folhas, cabe destacar a interação estatisticamente significativa entre os genótipos e entre genótipo x estresse ($p < 0,05$) observada para a daidzina e daizeína. Uma se diferencia da outra pela presença de uma molécula de açúcar ligada à aglicona. A produção de daidzina (molécula glicosilada) significativamente alterada (aumentada) nas folhas das plantas subidas ao alagamento pode sugerir uma possível estratégia da planta em acumular este heterosídeo, que é ponto chave na inflexão da rota biossintética para posterior produção de fitoalexinas. Sabe-se por exemplo, que a biossíntese, o transporte e a homeostase das moléculas de sinalização são estritamente regulados para equilibrar a troca entre crescimento e defesa. As glucosiltransferases (GTs), por exemplo, são usadas para regular o equilíbrio dinâmico dos hormônios vegetais para coordenar a defesa versus o crescimento e outros metabólitos secundários (Zhang *et al.*, 2022). A presença de uma molécula de açúcar confere, adicionalmente, eficiência no transporte e compartimentalização deste precursor pelos diferentes órgãos, tecidos ou células vegetais. Enquanto a glicosilação pode alterar a solubilidade, a estabilidade e o potencial tóxico dos fenilpropanoides, além de influenciar a

compartimentalização e funções biológicas, a (de)-glicosilação representa um ponto de regulação extremamente importante na homeostase dos fenilpropanóides (Roy *et al.*, 2016).

Portanto, assim como no estudo de Trush e Pal'ove-Balang (2023), evidências demonstraram que as vias biossintéticas incluindo as vias do chiquimato e dos fenilpropanóides são ativadas de forma coordenada para a síntese de fitoalexinas fenólicas. Similarmente, outros genes relacionados também são induzidos por estresses bióticos e abióticos. Sendo assim, sugere-se que essas mesmas vias também são ativadas para a síntese de fitoalexinas nos quatro genótipos de soja estudados.

Existem várias outras evidências que expressam acúmulo das fitoalexinas na resistência às doenças após a exposição a um agente patogênico. Uma das principais consequências é, portanto, a produção de altos níveis de gliceolinas no local da infecção. A indução da síntese das gliceolinas foi encontrada tanto em genótipos resistentes e susceptíveis de soja após a infecção por patógenos (Ahuja *et al.*, 2012; Trush e Pal'ove-Balang, 2023). Entretanto, além dos papéis bem conhecidos das isoflavonas e fitoalexinas no ataque de patógenos, o presente estudo acrescenta outra camada sobre o seu significado fisiológico, incluindo estresses abióticos e, mais especificamente como apontado no presente estudo, sob a condição de alagamento.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresentou dados de como a via biossintética dos isoflavonoides na soja sob alagamento é alterada. Foi possível observar uma redução estatisticamente significativa do precursor glicinol e a acumulação das gliceolidinas nas raízes, e acúmulo de daidzeína nas folhas. Deste modo, as fitoalexinas, conhecidas pela sua função no ataque de agentes patogênicos, podem também ser consideradas como promissores marcadores metabólicos na soja durante o estresse hídrico sob alagamento.

Desta forma, os resultados deste estudo fornecem informações importantes sobre a resposta da soja ao estresse por alagamento a nível molecular. A identificação de metabólitos específicos que são afetados pelos diferentes genótipos e pelo estresse podem auxiliar no desenvolvimento de novas variedades de soja mais tolerantes ao estresse por alagamento e com melhor produtividade. Além disso, o estudo dos mecanismos de ação desses metabólitos pode contribuir para a utilização de novas estratégias de manejo do estresse causado pelo alagamento na agricultura. No entanto, pesquisas futuras visado investigar a influência de outros fatores em conjunto, como por exemplo a interação entre nutrientes, estresses abióticos e patógenos na produção desses metabólitos especializados favorecerão significativamente o desenvolvimento de cultivares mais resistentes, melhores adaptadas, com melhor performance e alta produtividade.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, Ishita; KISSEN, Ralph; BONES, Atle M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in plant science**, Norway, v. 17, n. 2, p. 73-90, 2012.
- AL-MAHARIK, Nawaf. Isolation of naturally occurring novel isoflavonoids: Anupdate. **Natural product reports**, [Palestian], v. 36, n. 8, p. 1156-1195, 2019.
- ANDJELKOVIC, Violeta. **Abiotic Stress and Responses to Climate Change**. Belgrado, Sérvia: InTech, 2018.
- ARMSTRONG, William; DREW, Malcolm C. Root growth and metabolism under oxygende-ficiency. In: **Plant roots**, [S.l.], Editor: CRC Press, p. 1139-1187, 2002.
- BAILEY-SERRES, Julia *et al.* Making sense of low oxygen sensing. **Trends in plant science**, California, USA, v. 17, n. 3, p. 129-138, 2012.
- BAILEY-SERRES, Julia.; VOESENEK, La. Flooding stress: acclimations and geneticdiver-sity. **Annual Review of Plant Biology**, California, USA, v. 59, p. 313-339, 2008.
- BAMJI, Sanaya F.; CORBITT, Cynthia. Glyceollins: Soybean phytoalexins that exhibit a wide range of health-promoting effects. **Journal of Functional Foods**, Louisville, v. 34, p. 98-105, 2017.
- BIRT, Diane F.; HENDRICH, Suzanne; WANG, Weiqun. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, Iowa, v. 90, n. 2-3, p. 157-177, 2001.
- BUENO, Paula C. P.; LOPES, Norberto P. Metabolomics to characterize adaptive and signal-ingresponses in legume crops under abiotic stresses. **ACS omega**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 4, p. 1752-1763, 2020.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, v.11 (safra 2022/2023) n. 10. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/monitoramento-agricola>. Acesso em: 20 de Maio de 2024.
- COUTINHO, Isabel D. *et al.* Flooded soybean metabolomic analysis reveals importantpri-mary and secondary metabolites involved in the hypoxia stress response and tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, São Carlos, v. 153, p. 176-187, 2018.
- COUTINHO, Isabel D. *et al.* Integrating high-resolution and solid-state magic angle spinning NMR spectroscopy and a transcriptomic analysis of soybean tissues in response to water defi-ciency. **Phytochemical Analysis**, São Carlos, v. 28, n. 6, p. 529-540, 2017.
- DA CUNHA, Gilberto Rocca *et al.* El Niño/La Niña-Oscilação Sul e seus impactos na agricultura brasileira: fatos, especulações e aplicações. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 2010, p. 19, 2011.

EMBRAPA- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGRÍCOLA. História da Soja no Brasil. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/historia>. Acesso em: 20 de Maio de 2024.

ERNST, Madeleine *et al.* Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural product reports**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 6, p. 784- 806, 2014.

FENG, Shengbao *et al.* Fungal-stressed germination of black soybeans leads to generation of oxooctadecadienoic acids in addition to glyceollins. **Journal of agricultural and food chemistry**, Singapore, v. 55, n. 21, p. 8589-8595, 2007.

FERNIE, Alisdair R.; SCHAUER, Nicolas. Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement?. **Trends in genetics**, Potsdam, v. 25, n. 1, p. 39-48, 2009.

FRITZ, Christina *et al.* Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. **The Plant Journal**, [Potsdam], v.46, n. 4, p. 533-548, 2006.

FOUDAH, Ahmed I.; ABDEL-KADER, Maged Saad. Isoflavonoids. In: **Flavonoids-From Biosynthesis to Human Health**. Lisboa: IntechOpen, 2017.

FUGANTI-PAGLIARINI, Renata *et al.* Characterization of soybean genetically modified for drought tolerance in field conditions. **Frontiers in plant science**, Londrina, v. 8, p. 448, 2017.

FUKAO, Takeshi; YEUNG, Elaine; BAILEY-SERRES, Julia. The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. **The Plant Cell**, California, v. 23, n. 1, p. 412-427, 2011.

GLAUSER, Gaetan *et al.* Ultra-high pressure liquid chromatography–mass spectrometry for plant metabolomics: A systematic comparison of high-resolution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometers. **Journal of chromatography A**, Switzerland, v. 1292, p.151-159, 2013.

HATTORI, Yoko *et al.* The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. **Nature**, [Japan], v. 460, n. 7258, p. 1026-1030, 2009.

HAZRATI, Hossein; FOMSGAARD, Inge S.; KUDSK, Per. Targeted metabolomics unveil alteration in accumulation and root exudation of flavonoids as a response to interspecific competition. **Journal of Plant Interactions**, Dinamarca, v. 16, n. 1, p. 53-63, 2021.

ISLAM, Mohammad Sohidul *et al.* **Soybean and sustainable agriculture for food security: Soybean-Recent Advances in Research and Applications**. Japan: IntechOpen, 2022.

JAHAN, Md Asraful; KOVINICH, Nik. Acidity stress for the systemic elicitation of glyceollin phytoalexins in soybean plants. **Plant signaling & behavior**, Morgantown, v. 14, n. 7, p.1604018, 2019.

- JOHNSON, Caroline H.; IVANISEVIC, Julijana; SIUZDAK, Gary. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. **Nature reviews Molecular cell biology**, California, v. 17, n. 7, p.451-459, 2016.
- KE, Xiaolong *et al.* Phosphoenolpyruvate reallocation links nitrogen fixation rates to root nodule energy state. **Science**, China, v. 378, n. 6623, p. 971-977, 2022.
- KIM, Il-Sup. Current perspectives on the beneficial effects of soybean isoflavones and their metabolites on plants. **Food Science and Biotechnology**, Korea, v. 31, n. 5, p. 515-526, 2022.
- KIM, Jong-Myong *et al.* Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. **Nature Plants**, Yokohama, v. 3, n. 7, p. 1-7, 2017.
- KOH, Kwangoh; YOUN, Jung Eun; KIM, Hee-Seon. Identification of anthocyanins in black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) varieties. **Journal of food science and technology**, Korea, v. 51, p. 377-381, 2014.
- KOPKA, Joachim *et al.* Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. **Genome biology**, Germany, v. 5, p. 1-9, 2004.
- KŘÍŽOVÁ, Ludmila *et al.* Isoflavones. **Molecules**, Czech Republic, v. 24, n. 6, p. 1076, 2019.
- LESK, Corey; ROWHANI, Pedram; RAMANKUTTY, Navin. Influence of extreme weather disasters on global crop production. **Nature**, [Brighton], v. 529, n. 7584, p. 84-87, 2016.
- LIM, You Jin *et al.* Isoflavone accumulation and the metabolic gene expression in response to persistent UV-B irradiation in soybean sprouts. **Food chemistry**, Yongin, v. 303, p. 125376, 2020.
- LIU, Cheng-Wu; MURRAY, Jeremy D. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. **Plants**, Norwich, v. 5, n. 3, p. 33, 2016.
- LORETI, Elena; VAN VEEN, Hans; PERATA, Pierdomenico. Plant responses to flooding stress. **Current opinion in plant biology**, Pisa, v. 33, p. 64-71, 2016.
- LOZOVAYA, Vera V. *et al.* Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Champaign, v. 42, n. 7-8, p. 671-679, 2004.
- LU, Yonghai *et al.* Comparative metabolomics in *Glycine max* and *Glycine soja* under salt stress to reveal the phenotypes of their offspring. **Journal of agricultural and food chemistry**, Hong Kong, v. 61, n. 36, p. 8711-8721, 2013.
- MIEHE-STEIER, Annegret *et al.* Light and nutrient dependent responses in secondary metabolites of *Plantago lanceolata* offspring are due to phenotypic plasticity in experimental grasslands. **PLoS One**, Germany, v. 10, n. 9, 2015.

- MISSIO, Evandro Luiz *et al.* Desempenho de genótipos de soja em solo hidromórfico de várzea. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Rio Grande do Sul, v. 16, n. 1/2, p. 23-29, 2010.
- MOUSAVI-DERAZMAHALLEH, Mahsa *et al.* Adapting legume crops to climate change using genomic approaches. **Plant, Cell & Environment**, Australia, v. 42, n. 1, p. 6-19, 2019.
- NAKABAYASHI, Ryo *et al.* Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. **The Plant Journal**, Japan, v. 77, n. 3, p. 367-379, 2014.
- NAKAI, Shiho; FUJITA, Mariko; KAMEI, Yasutomi. Health promotion effects of soy isoflavones. **Journal of nutritional science and vitaminology**, Tokyo, v. 66, n. 6, p. 502-507, 2020.
- NAKAYAMA, Thiago J. *et al.* Insights into soybean transcriptome reconfiguration under hypoxic stress: Functional, regulatory, structural, and compositional characterization. **PLoS One**, Viçosa, v. 12, n. 11, 2017.
- NISHIUCHI, Shunsaku *et al.* Mechanisms for coping with submergence and waterlogging in rice. **Rice**, Furo-cho, v. 5, p. 1-14, 2012.
- PATTI, Gary J.; YANES, Oscar; SIUZDAK, Gary. Metabolomics: the apogee of the omicstrilogy. **Nature reviews Molecular cell biology**, Saint Louis, v. 13, n. 4, p. 263-269, 2012.
- RABARA, Roel C. *et al.* Comparative metabolome profile between tobacco and soybean grown under water-stressed conditions. **BioMed Research International**, Dallas, v. 2017, 2017.
- RAMALINGAM, Abirami *et al.* Proteomics and metabolomics: two emerging areas for legume improvement. **Frontiers in Plant Science**, Hyderabad, v. 6, p. 1116, 2015.
- ROMAGNOLO, Donato F.; DAVIS, Cindy D.; MILNER, John A. Phytoalexins in cancer prevention. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, Tucson, v. 17, n. 6, p. 2035-2058, 2012.
- RYAN-BORCHERS, Tracy A. *et al.* Soy isoflavones modulate immune function in healthy postmenopausal women. **The American journal of clinical nutrition**, Pullman, v. 83, n. 5, p. 1118-1125, 2006.
- ROY, Julien L. *et al.* Glycosylation is a major regulator of phenylpropanoid availability and biological activity in plants. **Frontiers in Plant Science**, Lille, v.7, p. 735, 2016.
- SARTORI, Gerson Meneghetti Sarzi *et al.* Sistemas de preparo do solo e de semeadura no rendimento de grãos de soja em área de várzea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, p. 492-498, 2016.
- SIMONS, Rudy *et al.* Identification of prenylated pterocarpan and other isoflavonoids in *Rhizopus* spp. elicited soya bean seedlings by electrospray ionisation mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Wageningen, v. 25, n. 1, p. 55-65, 2011.

SOARES, Márcio Santos *et al.* Quantification and localization of hesperidin and rutin in *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* after *Xylella fastidiosa* infection by HPLC-UV and MALDI imaging mass spectrometry. **Phytochemistry**, São Carlos, v. 115, p. 161-170, 2015.

SUMNER, Lloyd W.; MENDES, Pedro; DIXON, Richard A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics. **Phytochemistry**, [Ardmore], v. 62, n. 6, p. 817-836, 2003.

SCHOLLES, Dercio; VARGAS, Luciano Kayser. Viabilidade da inoculação de soja com estirpes de *Bradyrhizobium* em solo inundado. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, Rio Grande do Sul, v. 28, p. 973-979, 2004.

SYED, Naeem H. *et al.* Core clock, SUB1, and ABAR genes mediate flooding and drought responses via alternative splicing in soybean. **Journal of experimental botany**, Canterbury, v. 66, n. 22, p. 7129-7149, 2015.

TOUGOU, Makoto *et al.* Responses to flooding stress in soybean seedlings with the alcohol dehydrogenase transgene. **Plant Biotechnology**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 301-305, 2012.

TURNER, Marie F. *et al.* Non-targeted metabolomics in diverse sorghum breeding lines indicates primary and secondary metabolite profiles are associated with plant biomass accumulation and photosynthesis. **Frontiers in Plant Science**, Fort Collins, v. 7, p. 953, 2016.

TRUSH, Kristina; PAL'OVE-BALANG, Peter. Biosynthesis and role of isoflavonoids in legumes under different environmental conditions. **Plant Stress**, Slovakia, p. 100153, 2023.

USDA, FAS. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, Foreign Agriculture Service. **Global Market Analysis: World Production, Markets and Trade Report**, 2024. Disponível em: <https://www.usda.gov/> Acesso em: 20 de Maio de 2024

VANTOAI, Tara T. *et al.* Flooding Tolerance of Soybean [(L.) Merr.] Germplasm from Southeast Asia under Field and Screen-House Environments. **The Open Agriculture Journal**, Ohio, v. 4, n. 1, 2010.

VERNETII JUNIOR, Francisco de Jesus; DA SILVA GOMES, Algenor; SCHUCH, Luis Osmar Braga. Sucessão de culturas em solos de várzea implantadas nos sistemas plantio direto e convencional. **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v. 15, n. 1-4, 2009.

WANG, Tao *et al.* Light-induced mobile factors from shoots regulate rhizobium-triggered soybean root nodulation. **Science**, China, v. 374, n. 6563, p. 65-71, 2021.

WEN, Weiwei *et al.* Genetic determinants of the network of primary metabolism and their relationships to plant performance in a maize recombinant inbred line population. **The Plant Cell**, Germany, v. 27, n. 7, p. 1839-1856, 2015.

XU, Kenong; MACKILL, David J. A major locus for submergence tolerance mapped on rice chromosome 9. **Molecular Breeding**, [China], v. 2, p. 219-224, 1996.

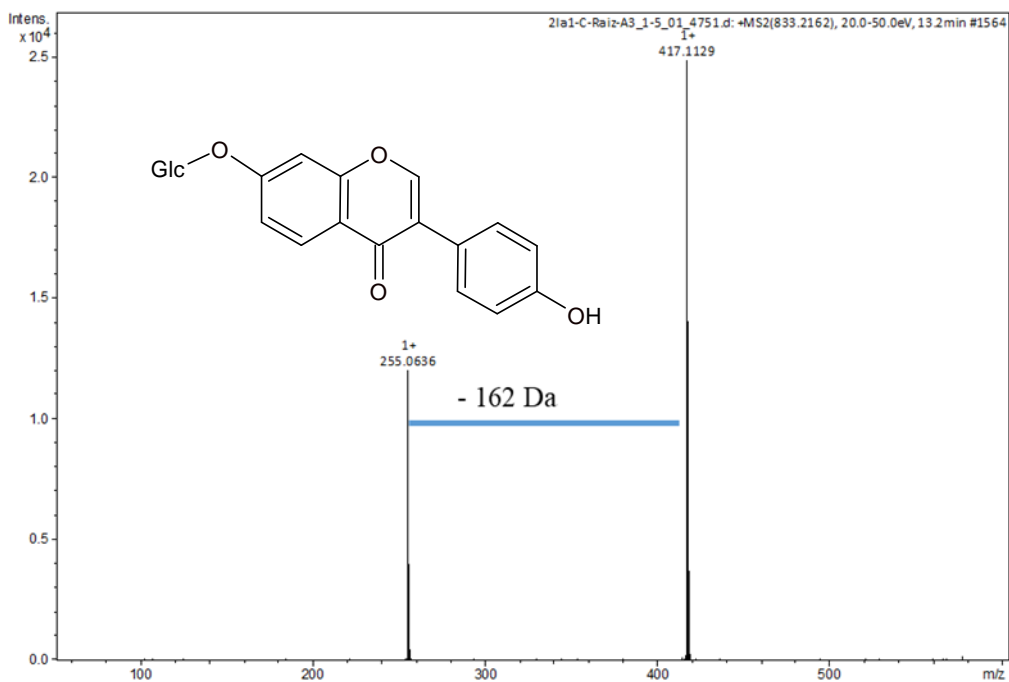
XU, Kenong *et al.* Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. **Nature**, China, v. 442, n. 7103, p. 705-708, 2006.

YANG, Huijuan *et al.* Biochemical and transcriptomic analyses of drought stress responses of LY1306 tobacco strain. **Scientific Reports**, China, v. 7, n. 1, p. 17442, 2017.

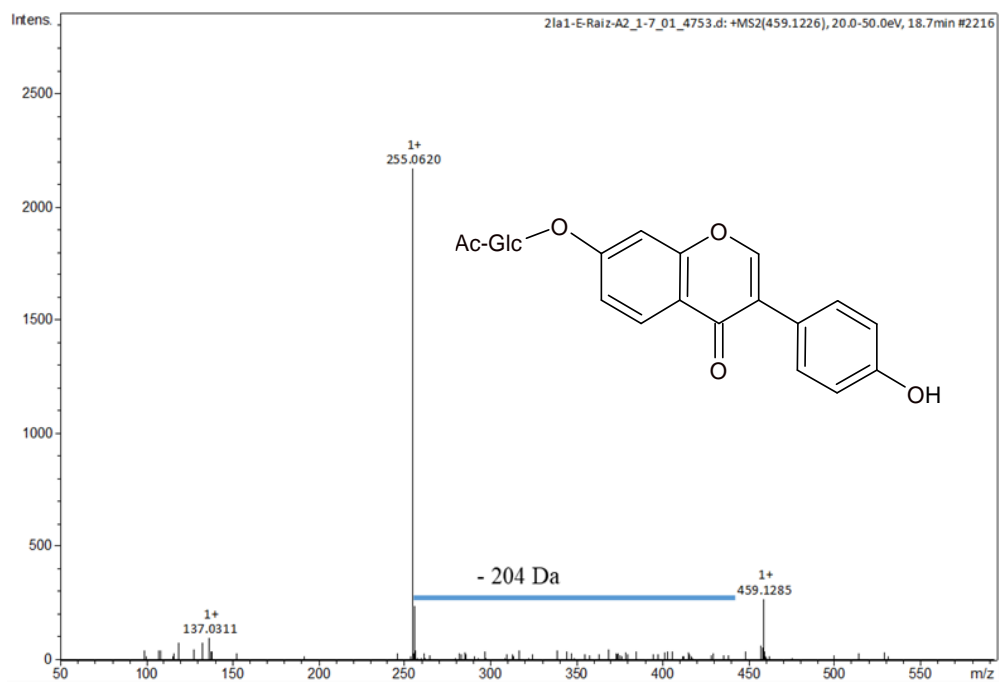
ZHANG, Wenjin, *et al.* Glycosylation of plant secondary metabolites: Regulating from chaos to harmony. **Environmental and Experimental Botany**, China, v. 194, p. 104703, 2022.

APÊNDICE A- Espectros de massas obtidos em modo positivo representando os isoflavonoides anotados em folhas e raízes de soja utilizando HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS.

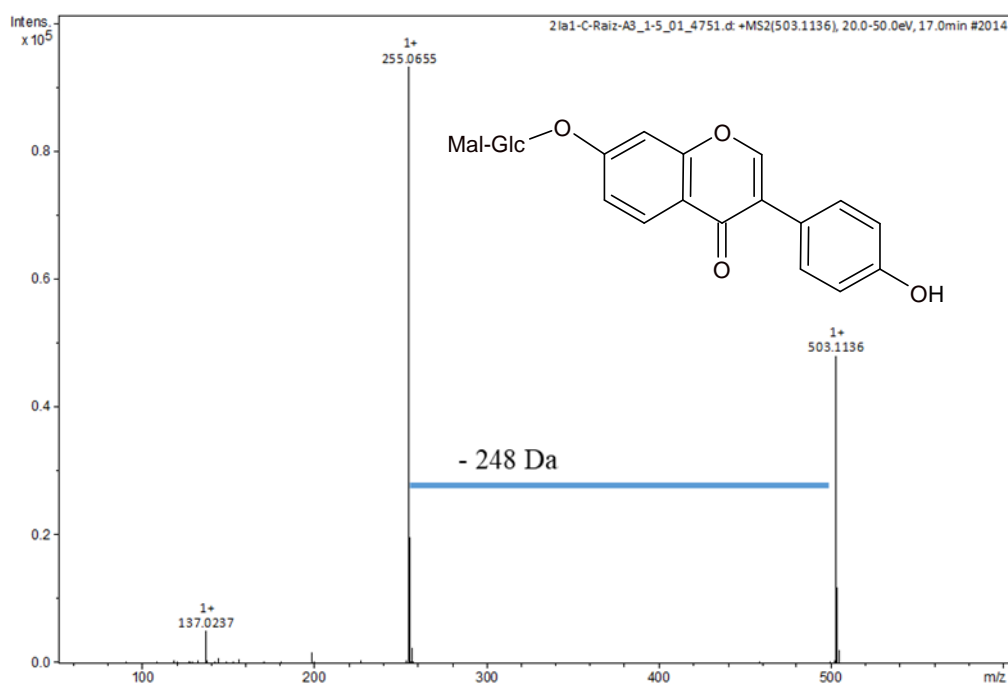
A. Espectro de massas da daidzina, indicando a perda neutra correspondente a uma molécula de glicose (162 Da).



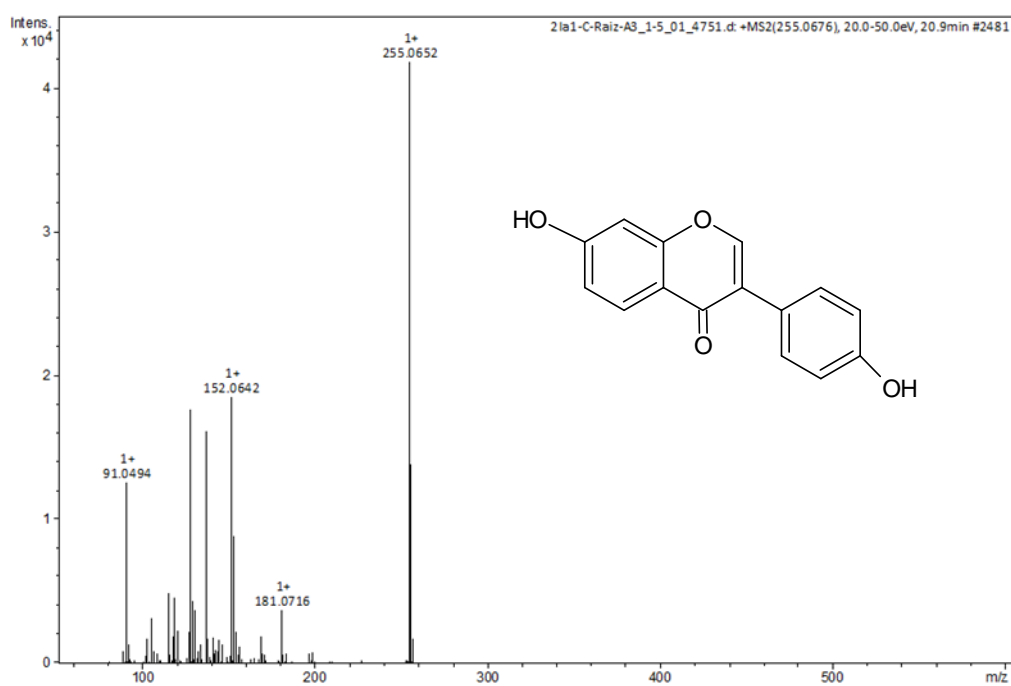
B. Espectro de massas da 6''-O-acetildaidzina indicando a perda neutra correspondente a uma molécula de glicose (162 Da) e do grupo acetil (42 Da).



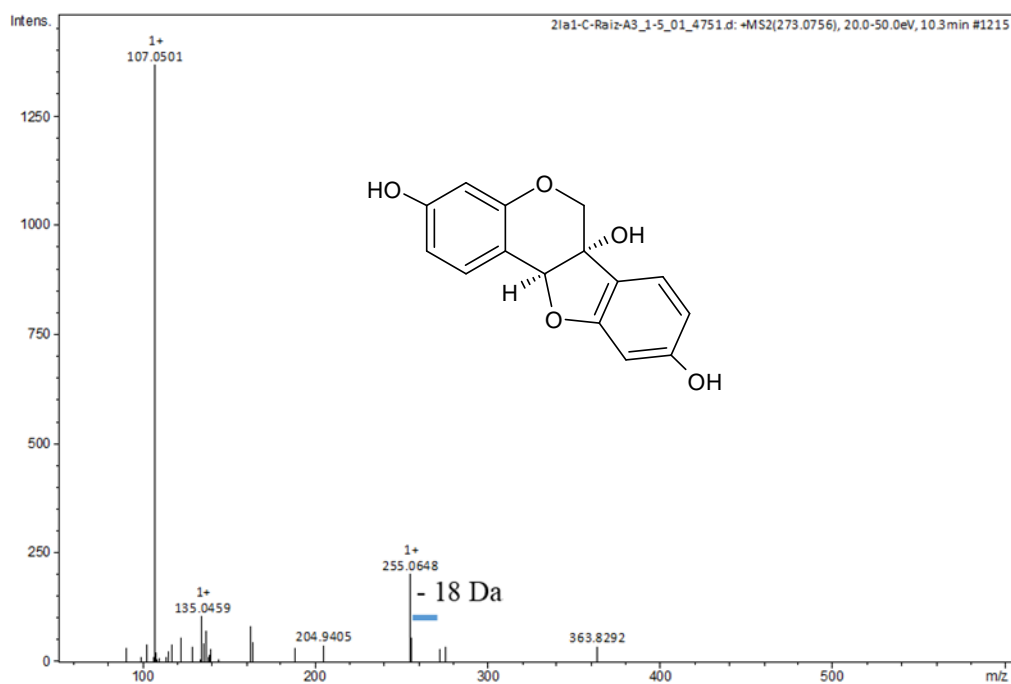
C. Espectro de massas da 6''-O-malonildaidzina indicando a perda neutra correspondente a uma molécula de glicose (162 Da) e do grupo malonil (86 Da).



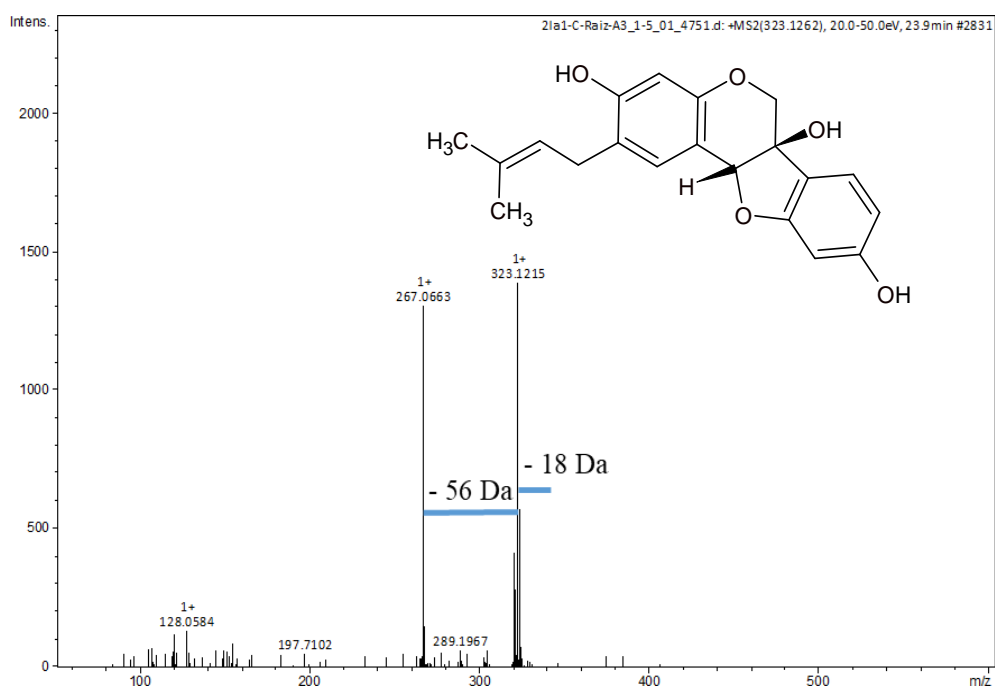
D. Espectro de massas da daidzeína evidenciando o sinal da molécula protonada [M+H]⁺.



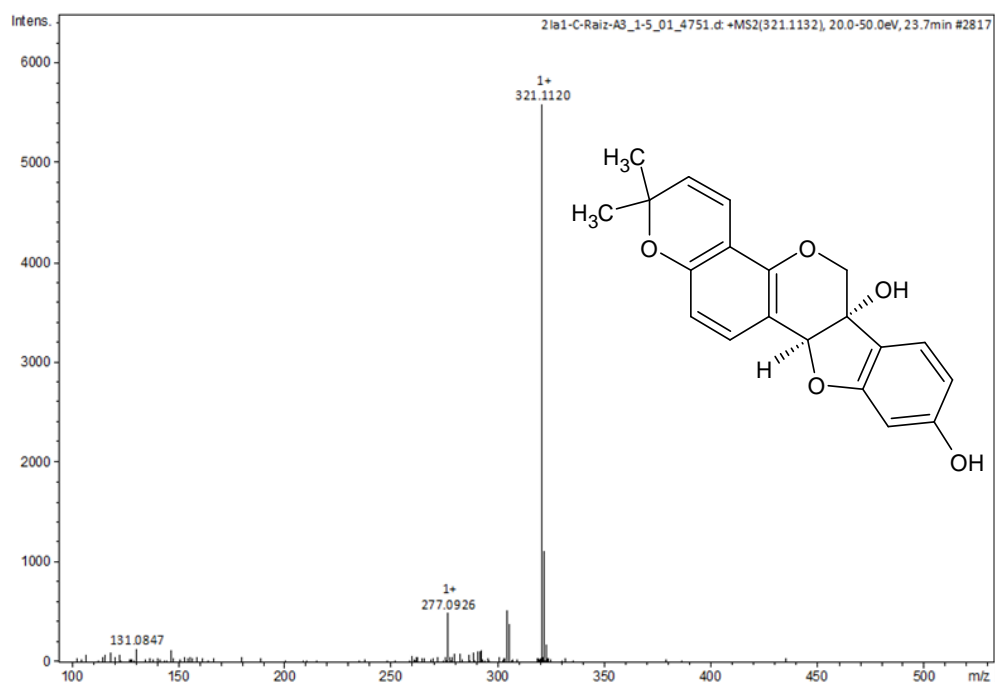
E. Espectro de massas do glicinol indicando uma perda neutra correspondente a uma molécula de água (18 Da).



F. Espectro de massas da gliceolidina indicando uma perda neutra correspondente a uma molécula de água (18 Da) e de um grupo prenila (56 Da).



G. Espectro de massas da gliceolina. O íon observado em 321.1220 corresponde à molécula ionizada após a perda de água ($321.090 + 18.01528 = 339.10528$).



APÊNDICE B- Dados estatísticos de raízes e folhas de soja obtidos pela ANOVA Two-Way

Glicinol

Tissue: Raízes

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Genotype	60,28	<0.0001	****	Yes
Abiotic Stress	27,77	0,0065	**	Yes
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	10,18	0,0002	***	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	0,06181	0.005951 to 0.1177	Yes	*	0,0329
BR4 vs. BRS184	0,2988	0.2429 to 0.3546	Yes	****	<0.0001
E45 vs. BRS184	0,1915	0.1356 to 0.2473	Yes	****	<0.0001
BR4 vs. BR16	0,237	0.1811 to 0.2928	Yes	****	<0.0001
E45 vs. BR16	0,1297	0.07383 to 0.1855	Yes	***	0,0008
E45 vs. BR4	-0,1073	-0.1631 to -0.05142	Yes	**	0,0023
Flooding					
BR16 vs. BRS184	0,02484	-0.03102 to 0.08069	No	ns	0,4727
BR4 vs. BRS184	0,2593	0.2035 to 0.3152	Yes	****	<0.0001
E45 vs. BRS184	-0,03364	-0.08949 to 0.02222	No	ns	0,2581
BR4 vs. BR16	0,2345	0.1786 to 0.2903	Yes	****	<0.0001
E45 vs. BR16	-0,05848	-0.1143 to -0.002621	Yes	*	0,0415
E45 vs. BR4	-0,2929	-0.3488 to -0.2371	Yes	****	<0.0001

Daidzina

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Genotype	43,36	0,0042	**	Yes
Abiotic Stress	11,96	0,1091	ns	No
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	11,64	0,4248	ns	No

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	3,488	-21,27 to 28,25	No	ns	0,9591
BR4 vs. BRS184	1,077	-23,69 to 25,84	No	ns	0,9986
E45 vs. BRS184	-8,813	-33,58 to 15,95	No	ns	0,6314
BR4 vs. BR16	-2,411	-27,17 to 22,35	No	ns	0,9855
E45 vs. BR16	-12,3	-37,06 to 12,46	No	ns	0,3908
E45 vs. BR4	-9,89	-34,65 to 14,87	No	ns	0,5514
Flooding					
BR16 vs. BRS184	5,476	-19,29 to 30,24	No	ns	0,8672
BR4 vs. BRS184	-13,47	-38,23 to 11,30	No	ns	0,326
E45 vs. BRS184	-15,11	-39,88 to 9,649	No	ns	0,2497
BR4 vs. BR16	-18,94	-43,71 to 5,819	No	ns	0,1314
E45 vs. BR16	-20,59	-45,35 to 4,173	No	ns	0,0995
E45 vs. BR4	-1,647	-26,41 to 23,12	No	ns	0,9952

6''-O-Malonildaidzina

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Genotype	29,66	0,0887	ns	No
Abiotic Stress	16,74	0,0714	ns	No
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	15,8	0,2558	ns	No

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	-0,154	-5,561 to 5,253	No	ns	0,9996
BR4 vs. BRS184	-0,4051	-5,812 to 5,002	No	ns	0,9932
E45 vs. BRS184	-0,9507	-6,357 to 4,456	No	ns	0,9257
BR4 vs. BR16	-0,251	-5,658 to 5,156	No	ns	0,9984
E45 vs. BR16	-0,7967	-6,203 to 4,610	No	ns	0,9537
E45 vs. BR4	-0,5456	-5,952 to 4,861	No	ns	0,984
Flooding					
BR16 vs. BRS184	-0,7432	-6,150 to 4,663	No	ns	0,9617
BR4 vs. BRS184	-4,037	-9,443 to 1,370	No	ns	0,1419
E45 vs. BRS184	-4,997	-10,40 to 0,4096	No	ns	0,0679
BR4 vs. BR16	-3,293	-8,700 to 2,113	No	ns	0,251
E45 vs. BR16	-4,254	-9,660 to 1,153	No	ns	0,1199
E45 vs. BR4	-0,9605	-6,367 to 4,446	No	ns	0,9236

6''-O-Acetilaidzina

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Genotype	93,85	<0,0001	****	Yes
Abiotic Stress	0,4155		0,4838 ns	No
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	0,5034		0,8544 ns	No

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	-3,003	-4,489 to -1,517	Yes	**	0,0017
BR4 vs. BRS184	-3,257	-4,743 to -1,771	Yes	**	0,0011
E45 vs. BRS184	-3,264	-4,749 to -1,778	Yes	**	0,0011
BR4 vs. BR16	-0,2545	-1,740 to 1,231	No	ns	0,9306
E45 vs. BR16	-0,2607	-1,747 to 1,225	No	ns	0,9261
E45 vs. BR4	-0,006237	-1,492 to 1,480	No	ns	>0,9999
Flooding					
BR16 vs. BRS184	-2,623	-4,109 to -1,137	Yes	**	0,0036
BR4 vs. BRS184	-2,807	-4,293 to -1,321	Yes	**	0,0025
E45 vs. BRS184	-2,807	-4,293 to -1,321	Yes	**	0,0025
BR4 vs. BR16	-0,1846	-1,670 to 1,301	No	ns	0,9711
E45 vs. BR16	-0,1841	-1,670 to 1,302	No	ns	0,9713
E45 vs. BR4	0,0005237	-1,485 to 1,486	No	ns	>0,9999

Daidzeina

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Genotype	2,535	0,9209	ns	No
Abiotic Stress	11,97	0,4155	ns	No
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	0,03456	0,9998	ns	No

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	-0,8383	-9,491 to 7,815	No	ns	0,9858
BR4 vs. BRS184	0	-8,653 to 8,653	No	ns	>0,9999
E45 vs. BRS184	-0,8383	-9,491 to 7,815	No	ns	0,9858
BR4 vs. BR16	0,8383	-7,815 to 9,491	No	ns	0,9858
E45 vs. BR16	0	-8,653 to 8,653	No	ns	>0,9999
E45 vs. BR4	-0,8383	-9,491 to 7,815	No	ns	0,9858
Flooding					
BR16 vs. BRS184	-1,06	-9,713 to 7,593	No	ns	0,9722
BR4 vs. BRS184	0	-8,653 to 8,653	No	ns	>0,9999
E45 vs. BRS184	-1,06	-9,713 to 7,593	No	ns	0,9722
BR4 vs. BR16	1,06	-7,593 to 9,713	No	ns	0,9722
E45 vs. BR16	0	-8,653 to 8,653	No	ns	>0,9999
E45 vs. BR4	-1,06	-9,713 to 7,593	No	ns	0,9722

Gliceolina I/II/III

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Genotype	6,985	0,6923	ns	No
Abiotic Stress	18,37	0,16	ns	No
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	4,502	0,8227	ns	No

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	-0,2426	-4,820 to 4,334	No	ns	0,9976
BR4 vs. BRS184	-0,9914	-5,568 to 3,586	No	ns	0,8737
E45 vs. BRS184	0,9648	-3,612 to 5,542	No	ns	0,8819
BR4 vs. BR16	-0,7488	-5,326 to 3,828	No	ns	0,9386
E45 vs. BR16	1,207	-3,370 to 5,784	No	ns	0,7993
E45 vs. BR4	1,956	-2,621 to 6,533	No	ns	0,5021
Flooding					
BR16 vs. BRS184	-0,1502	-4,727 to 4,427	No	ns	0,9994
BR4 vs. BRS184	-0,3753	-4,952 to 4,202	No	ns	0,9912
E45 vs. BRS184	-0,1493	-4,726 to 4,428	No	ns	0,9994
BR4 vs. BR16	-0,2251	-4,802 to 4,352	No	ns	0,998
E45 vs. BR16	0,0008653	-4,576 to 4,578	No	ns	>0,9999
E45 vs. BR4	0,2259	-4,351 to 4,803	No	ns	0,998

Gliceolidina I/II

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Genotype	21,09	0,0057	**	Yes
Abiotic Stress	55,27	0,0118	*	Yes
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	14,49	0,0187	*	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	0,09159	-6,744 to 6,927	No	ns	>0,9999
BR4 vs. BRS184	1,584	-5,252 to 8,419	No	ns	0,8514
E45 vs. BRS184	0,4925	-6,343 to 7,328	No	ns	0,994
BR4 vs. BR16	1,492	-5,343 to 8,327	No	ns	0,8713
E45 vs. BR16	0,4009	-6,434 to 7,236	No	ns	0,9967
E45 vs. BR4	-1,091	-7,926 to 5,744	No	ns	0,9425
Flooding					
BR16 vs. BRS184	-0,4506	-7,286 to 6,385	No	ns	0,9954
BR4 vs. BRS184	9,881	3,046 to 16,72	Yes	**	0,0097
E45 vs. BRS184	10,26	3,426 to 17,10	Yes	**	0,0081
BR4 vs. BR16	10,33	3,496 to 17,17	Yes	**	0,0078
E45 vs. BR16	10,71	3,877 to 17,55	Yes	**	0,0065
E45 vs. BR4	0,3804	-6,455 to 7,216	No	ns	0,9972

Glicinol

Tissue: Folhas

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Genotype	89,19	<0,0001	****	Yes
Abiotic Stress	0,1208		0,7986 ns	No
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	0,7702		0,7244 ns	No

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	0,34	0,1887 to 0,4914	Yes	***	0,001
BR4 vs. BRS184	-0,000789	-0,1521 to 0,1506	No	ns	>0,9999
E45 vs. BRS184	-0,004343	-0,1557 to 0,1470	No	ns	0,9996
BR4 vs. BR16	-0,3408	-0,4922 to -0,1895	Yes	***	0,001
E45 vs. BR16	-0,3444	-0,4957 to -0,1930	Yes	***	0,0009
E45 vs. BR4	-0,003554	-0,1549 to 0,1478	No	ns	0,9998
Flooding					
BR16 vs. BRS184	0,3012	0,1499 to 0,4526	Yes	**	0,0019
BR4 vs. BRS184	0,0322	-0,1192 to 0,1835	No	ns	0,8792
E45 vs. BRS184	-0,001486	-0,1528 to 0,1499	No	ns	>0,9999
BR4 vs. BR16	-0,269	-0,4204 to -0,1177	Yes	**	0,0034
E45 vs. BR16	-0,3027	-0,4541 to -0,1514	Yes	**	0,0018
E45 vs. BR4	-0,03368	-0,1850 to 0,1177	No	ns	0,8651

Daidzina

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?		
Genotype	84,28	<0,0001	****	Yes		
Abiotic Stress	5,976		0,0051 **	Yes		
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	5,579		0,0017 **	Yes		
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control						
BR16 vs. BRS184	2,677	1,466 to 3,888	Yes	**	0,0011	
BR4 vs. BRS184	-2,041	-3,252 to -0,8302	Yes	**	0,0045	
E45 vs. BRS184	-1,978	-3,188 to -0,7667	Yes	**	0,0053	
BR4 vs. BR16	-4,718	-5,929 to -3,507	Yes	****	<0,0001	
E45 vs. BR16	-4,655	-5,866 to -3,444	Yes	****	<0,0001	
E45 vs. BR4	0,06353	-1,147 to 1,274	No	ns	0,9976	
Flooding						
BR16 vs. BRS184	4,46	3,249 to 5,671	Yes	****	<0,0001	
BR4 vs. BRS184	-3,433	-4,644 to -2,222	Yes	***	0,0003	
E45 vs. BRS184	-3,494	-4,705 to -2,283	Yes	***	0,0002	
BR4 vs. BR16	-7,893	-9,104 to -6,682	Yes	****	<0,0001	
E45 vs. BR16	-7,954	-9,165 to -6,743	Yes	****	<0,0001	
E45 vs. BR4	-0,06099	-1,272 to 1,150	No	ns	0,9979	

6"-O- Malonildaidizina

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Genotype	86,01	0,0001	***	Yes
Abiotic Stress	3,66	0,0102	*	Yes
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	3,742	0,0679	ns	No

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	5,597	-0,5410 to 11,74	No	ns	0,0714
BR4 vs. BRS184	-8,561	-14,70 to -2,423	Yes	*	0,0115
E45 vs. BRS184	-8,554	-14,69 to -2,416	Yes	*	0,0116
BR4 vs. BR16	-14,16	-20,30 to -8,020	Yes	***	0,0009
E45 vs. BR16	-14,15	-20,29 to -8,013	Yes	***	0,0009
E45 vs. BR4	0,006895	-6,131 to 6,145	No	ns	>0,9999
Flooding					
BR16 vs. BRS184	4,382	-1,756 to 10,52	No	ns	0,1626
BR4 vs. BRS184	-15,3	-21,43 to -9,159	Yes	***	0,0006
E45 vs. BRS184	-15,3	-21,44 to -9,165	Yes	***	0,0006
BR4 vs. BR16	-19,68	-25,82 to -13,54	Yes	***	0,0001
E45 vs. BR16	-19,69	-25,82 to -13,55	Yes	***	0,0001
E45 vs. BR4	-0,006436	-6,144 to 6,132	No	ns	>0,9999

6''- O- Acetildaidzina

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Genotype	80,61	0,0001	***	Yes
Abiotic Stress	0,0008232	0,9815	ns	No
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	7,975	0,066	ns	No

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	0,1156	-0,8987 to 1,130	No	ns	0,9773
BR4 vs. BRS184	0,8731	-0,1412 to 1,887	No	ns	0,0881
E45 vs. BRS184	2,331	1,317 to 3,345	Yes	***	0,0009
BR4 vs. BR16	0,7575	-0,2568 to 1,772	No	ns	0,1418
E45 vs. BR16	2,216	1,201 to 3,230	Yes	**	0,0011
E45 vs. BR4	1,458	0,4438 to 2,472	Yes	**	0,01
Flooding					
BR16 vs. BRS184	0,09447	-0,9198 to 1,109	No	ns	0,9873
BR4 vs. BRS184	1,612	0,5975 to 2,626	Yes	**	0,0061
E45 vs. BRS184	1,612	0,5975 to 2,626	Yes	**	0,0061
BR4 vs. BR16	1,517	0,5030 to 2,532	Yes	**	0,0082
E45 vs. BR16	1,517	0,5030 to 2,532	Yes	**	0,0082
E45 vs. BR4	0	-1,014 to 1,014	No	ns	>0,9999

Daidzeina

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Genotype	57,62	0,0074	**	Yes
Abiotic Stress	5,931	0,1324	ns	No
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	15,44	0,0232	*	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	0,2148	-0,1432 to 0,5729	No	ns	0,2605
BR4 vs. BRS184	-0,05041	-0,4085 to 0,3077	No	ns	0,9591
E45 vs. BRS184	-0,0504	-0,4085 to 0,3077	No	ns	0,9591
BR4 vs. BR16	-0,2652	-0,6233 to 0,09281	No	ns	0,1454
E45 vs. BR16	-0,2652	-0,6233 to 0,09282	No	ns	0,1454
E45 vs. BR4	0,000009333	-0,3581 to 0,3581	No	ns	>0,9999
Flooding					
BR16 vs. BRS184	0,7365	0,3784 to 1,095	Yes	**	0,0016
BR4 vs. BRS184	-0,0772	-0,4353 to 0,2809	No	ns	0,8751
E45 vs. BRS184	-0,07731	-0,4354 to 0,2808	No	ns	0,8747
BR4 vs. BR16	-0,8137	-1,172 to -0,4556	Yes	***	0,0009
E45 vs. BR16	-0,8138	-1,172 to -0,4557	Yes	***	0,0009
E45 vs. BR4	-0,0001087	-0,3582 to 0,3580	No	ns	>0,9999

Gliceolina I/II/III

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Genotype	86,4	0,0002	***	Yes	
Abiotic Stress	0,03415	0,8804	ns	No	
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	2,15	0,433	ns	No	

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	0,02008	-0,4417 to 0,4819	No	ns	0,9986
BR4 vs. BRS184	0,3082	-0,1536 to 0,7699	No	ns	0,1975
E45 vs. BRS184	1,069	0,6072 to 1,531	Yes	***	0,0008
BR4 vs. BR16	0,2881	-0,1737 to 0,7499	No	ns	0,2364
E45 vs. BR16	1,049	0,5871 to 1,511	Yes	***	0,0009
E45 vs. BR4	0,7608	0,2990 to 1,223	Yes	**	0,0051
Flooding					
BR16 vs. BRS184	0,05152	-0,4103 to 0,5133	No	ns	0,9787
BR4 vs. BRS184	0,3277	-0,1341 to 0,7894	No	ns	0,1657
E45 vs. BRS184	0,8125	0,3507 to 1,274	Yes	**	0,0036
BR4 vs. BR16	0,2761	-0,1857 to 0,7379	No	ns	0,2626
E45 vs. BR16	0,761	0,2992 to 1,223	Yes	**	0,0051
E45 vs. BR4	0,4848	0,02305 to 0,9466	Yes	*	0,041

Gliceolidina I/II

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Genotype	39,38	0,0938	ns	No
Abiotic Stress	13,15	0,0244	*	Yes
Interaction: Genotype x Abiotic Stress	12,63	0,1707	ns	No

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control					
BR16 vs. BRS184	-0,01542	-0,3759 to 0,3450	No	ns	0,9987
BR4 vs. BRS184	-0,1172	-0,4776 to 0,2432	No	ns	0,6888
E45 vs. BRS184	-0,1131	-0,4736 to 0,2473	No	ns	0,7099
BR4 vs. BR16	-0,1018	-0,4622 to 0,2587	No	ns	0,767
E45 vs. BR16	-0,0977	-0,4581 to 0,2627	No	ns	0,7869
E45 vs. BR4	0,004081	-0,3564 to 0,3645	No	ns	>0,9999
Flooding					
BR16 vs. BRS184	0,04404	-0,3164 to 0,4045	No	ns	0,9724
BR4 vs. BRS184	-0,3596	-0,7201 to 0,0008241	No	ns	0,0505
E45 vs. BRS184	-0,3588	-0,7193 to 0,001630	No	ns	0,0509
BR4 vs. BR16	-0,4037	-0,7641 to -0,04321	Yes	*	0,0313
E45 vs. BR16	-0,4029	-0,7633 to -0,04241	Yes	*	0,0315
E45 vs. BR4	0,000806	-0,3596 to 0,3613	No	ns	>0,9999