

EFEITO DA TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO DE SOJA E NO ESTABELECIMENTO DE MUDAS: UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA MULTIPLATAFORMA

Catherine P. Almeida¹; Caline G. Ferraz¹; Tiago Venâncio²; Leonardo Zambotti-Villela³; Paulo Roberto Ribeiro.¹

¹Metabolomics Research Group, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

²Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos.

³Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Palavras-Chave: perfil metabólico, fisiologia, análise multivariada.

Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das culturas mais importantes do mundo por conta de sua aplicação na indústria. Seu grão é bastante versátil sendo matéria prima de produtos na indústria de combustível, química, alimentos e na agroindústria (RODRIGUES et al, 2021; CANTELLI, 2016;). A soja é uma planta sensível ao estresse térmico, principalmente na fase reprodutiva, onde o aumento da temperatura causa danos que reduzem sua produtividade (NAHAR; HASANUZZAMAN e FUJITA, 2016).

As altas temperaturas comumente promovem alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas, podendo danificar as membranas, influenciar na relação água e nutrientes, causar danos às proteínas, o que afeta todos os aspectos do desenvolvimento das plantas (RUCHEL et al, 2020; NAZ et al, 2018). Após a exposição a altas temperaturas, imediatamente acontecem mudanças no nível molecular, onde o dano mais extenso é a desnaturação e degradação de proteínas e o aumento da fluidez dos lipídios da membrana (LIPIEC et al, 2013).

Durante a maturação das sementes as altas temperaturas podem diminuir seu peso, vigor, a taxa de germinação e a taxa de crescimento de plântulas. Sementes de soja colhidas de plantas expostas a altas temperaturas desde a sua germinação tiveram seu peso reduzido, acarretando na redução da taxa de germinação, de forma que o peso do eixo das mudas das plantas foi reduzido em 11%. Os resultados sugeriram que o estresse térmico abreviou a duração do período reprodutivo, resultando na produção de sementes mais leves e com vigor reduzido (DORNBOS e MULLEN, 1991). A exposição de plantas de soja a períodos crescentes de alta temperatura intensifica a redução no vigor das sementes, aumentando a produção de sementes, por essas plantas, com menor qualidade física (EGLI et al 2005).

O estresse térmico diminuiu a eficiência fotoquímica em 5,8%, a taxa fotossintética (12,7%) e os níveis de sacarose nas plantas de soja (DJANAGUIRAMAN e PRASAD, 2010). Também houve uma diminuição na atividade das enzimas superóxido dismutase (13,3%), catalase (44,6%) e peroxidase (42,9%) e um aumento da atividade do radical superóxido e teor de peróxido de hidrogênio quando comparado a condição controle. As temperaturas de 38/28 °C (dia/noite) resultaram em dano oxidativo a soja, aumentando o vazamento de eletrólitos da membrana plasmática e diminuindo a capacidade da mesma reter solutos e água (DJANAGUIRAMAN e PRASAD, 2010).

Sementes de soja de genótipos sensíveis e tolerantes ao calor tiveram seus perfis metabólicos investigados sob altas temperaturas. Foram identificados metabólitos antioxidantes, como flavonoides, fenilpropanóides e precursores de ascorbato, tais metabólitos foram encontrados

em maior concentração nas sementes que apresentam o genótipo tolerante ao calor, sugerindo que a maior abundância de moléculas antioxidantes pode ser responsável pela maior tolerância ao estresse térmico durante o desenvolvimento das sementes (CHEBROLU et al, 2016).

Devido ao crescimento na emissão de gases, a temperatura ambiente mundial tende a aumentar, acentuando ainda mais o aquecimento global (HANSEN et al, 2023). Portanto, torna-se extremamente importante a investigação dos processos moleculares e fisiológicos subjacentes a esse estresse ambiental, para possibilitar o desenvolvimento estratégico de cultivares mais resistentes a condições ambientais adversas. O presente trabalho teve como objetivos a avaliação da germinação de sementes de soja frente as altas temperaturas, otimização de um protocolo de extração e quantificação de metabólitos primários a partir de sementes e plântulas e avaliação do perfil metabólico de sementes e plântulas de soja em resposta as altas temperaturas via Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN) e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS).

Material e Métodos

Germinação de sementes

Os testes foram conduzidos com três repetições de 50 sementes (para cada condição de temperatura), as sementes foram acondicionadas em rolos de papel do tipo germitest. O germinador utilizado foi uma câmara vertical do tipo B.O.D, as sementes foram germinadas a 28/22 °C (dia/noite) com fotoperíodo de 14 horas, e a 36/24 °C (dia/noite) com fotoperíodo de 14 horas. As contagens foram feitas com 24, 48, 72 e 96 horas, na contagem final a porcentagem de sementes germinadas foi estabelecida. As sementes germinadas foram coletadas com 2,5 cm de raiz. Endospermas e as raízes foram separados e armazenados em tubos Falcon. As amostras foram liofilizadas durante 24 horas e maceradas com ajuda de um bastão de vidro até se transformarem em um pó fino.

Estabelecimento das plântulas

Quatro repetições de 30 sementes foram acondicionadas em rolos de papel do tipo germitest a 28/22 °C (dia/noite) com fotoperíodo de 14 horas. Após dois dias, metade das sementes germinadas foram transferidas para outro germinador a 36/24 °C (dia/noite) com fotoperíodo de 14 horas. Nas duas condições de temperatura, a coleta foi feita quando as raízes atingiram treze centímetros. As raízes e os endospermas foram coletados separadamente e armazenados em tubos Falcon. As amostras foram liofilizadas durante 24 horas e maceradas com ajuda de um bastão de vidro até se transformarem em um pó fino.

Análise metabolômica via Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H , COSY, e HSQC, foram adquiridos nos espectrômetros Bruker 9,4 e 14,1 testa. Inicialmente, foram realizados alguns testes para definir quais seriam as melhores condições para uma extração mais eficiente dos metabólitos. Os testes foram conduzidos variando a proporção dos solventes metanol:água e as temperaturas 25 e 50 °C. Os melhores resultados foram fornecidos em metanol:água (25:75) a 25°C.

Para análises foram pesados 40 mg de cada amostra, solubilizadas em 700 μL da mistura metanol:água (25:75) com tampão fosfato, levadas ao banho ultrassônico por 5 minutos a 25 °C, e, posteriormente a centrifuga por 5 minutos a 25 °C, 14000 rpm. 500 μL do sobrenadante foram coletados e transferidos para tubos de 5 mm.

Análise metabolômica via Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

Para a análise via GC-MS, 5 mg das amostras foram pesados, a extração foi feita com clorofórmio, metanol e água. A fase aquosa foi liofilizada e derivatizadas por sililação. Para curva de calibração foram utilizados padrões de uma série de alcanos. Uma solução padrão foi preparada contendo 80 µL de hexano e 10 µL dos padrões C20 e C40, totalizando 100 µL.

Análise estatística multivariada

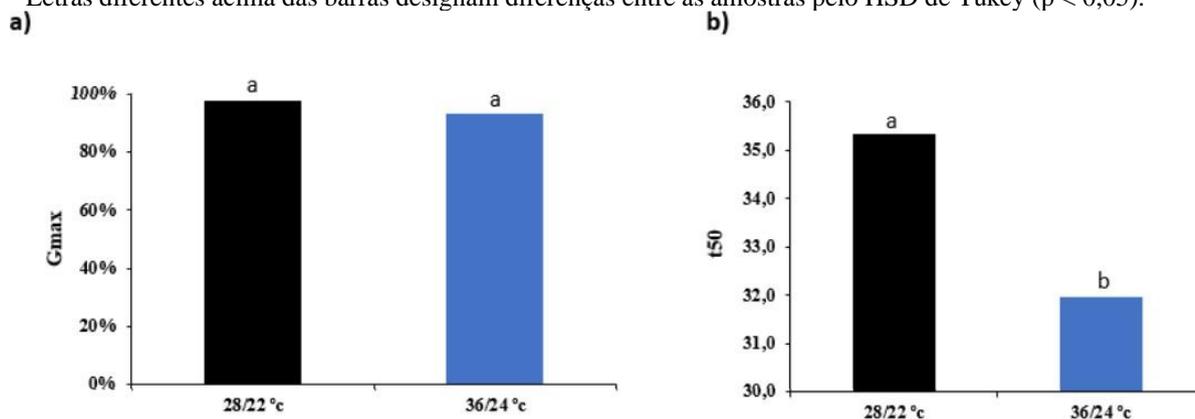
O conjunto de dados dos metabólitos obtidos via RMN de ^1H e GC-MS foram carregados e normalizados no MetaboAnalyst 5.0. As análises incluíram Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLSDA), análise hierárquica de agrupamento, mapa de calor, pontuações de Importância Variável na Projeção (VIP).

Resultados e Discussão

Na temperatura ótima as sementes apresentaram 98% de germinação máxima, já em 36/24°C taxa de germinação ficou em 93% (figura 1a). Sendo assim, não houve diferença significativa entre os dois tratamentos, o que significa que o aumento da temperatura não afetou a viabilidade das sementes. A Velocidade de germinação, medida como t50, seguiu um padrão diferente a porcentagem de germinação máxima. Na condição controle foram necessárias 35,3 horas para que 50% das sementes germinassem e sob estresse foram necessárias 32 horas (figura 1b), isto é, o aumento da temperatura aumentou a velocidade de germinação, demonstrando que as sementes de soja possuem alta plasticidade em resposta à diferentes temperaturas. Sementes degenótipos variados de trigo para pão indiano (*Triticum aestivum* L.) demonstraram maior velocidade na germinação em condições de estresse (25°C) quando comparado ao controle (20°C), isso pode ser atribuído a maior taxa de mobilização das reservas energéticas nas sementes (SHARMA et al, 2022). Temperaturas acima da ideal para a porcentagem máxima de germinação, comumente acelera a velocidade com que a semente germina, porém apenas sementes com alto vigor e viabilidade conseguem germinar (ROBERTS, 1988).

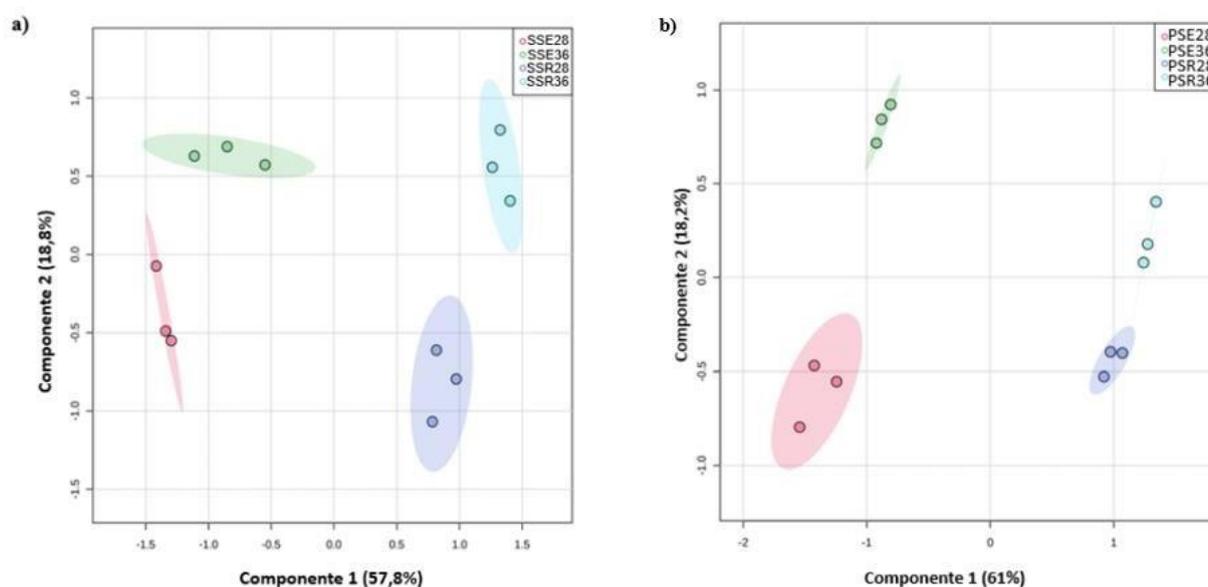
Figura 1a) Porcentagem de germinação máxima b) tempo médio de germinação das sementes de soja

Letras diferentes acima das barras designam diferenças entre as amostras pelo HSD de Tukey ($p < 0,05$).



No total foram identificados 21 metabólitos nas amostras de sementes e plântulas via RMN e 16 via GC-MS, incluindo aminoácidos, ácidos graxos, ácidos orgânicos e carboidratos. Inicialmente a análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi feita para avaliar de forma geral como as amostras de semente e plântula de soja se agrupavam em termos de metabolôma associado a temperatura e aos diferentes tecidos da planta. Nas amostras de semente e plântula (figura 2ª e b) ficou claro que ao longo do eixo x existe uma separação entre o metabolôma dos tecidos (raiz e endosperma) e ao longo do eixo y a separação está associada com a temperatura.

Figura 2. Análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) do perfil de metabólitos das amostras a) semente b) plântula



As diferenças do comportamento das amostras em termos de metabolôma podem ser explicadas pelo comportamento de alguns metabólitos através da Importância Variável na Projeção (VIP, figura 2b). O VIP é a medida da importância de cada variável no modelo PLS-DA, resumindo a contribuição de cada variável (BANERJEE et al, 2013), neste caso, metabólitos. Uma vez que a média quadrática dos VIP scores é igual a 1, o critério maior que 1 é utilizado para selecionar as variáveis (CHONG et al, 2019). A seguir são apresentados os gráficos de VIP para os tecidos de sementes (figura 3a e b) e plântulas (figura 4a e b) avaliados individualmente.

Figura. Metabolitos que explicam as diferenças no metabolôma do a) endosperma e b) raiz nas sementes de soja

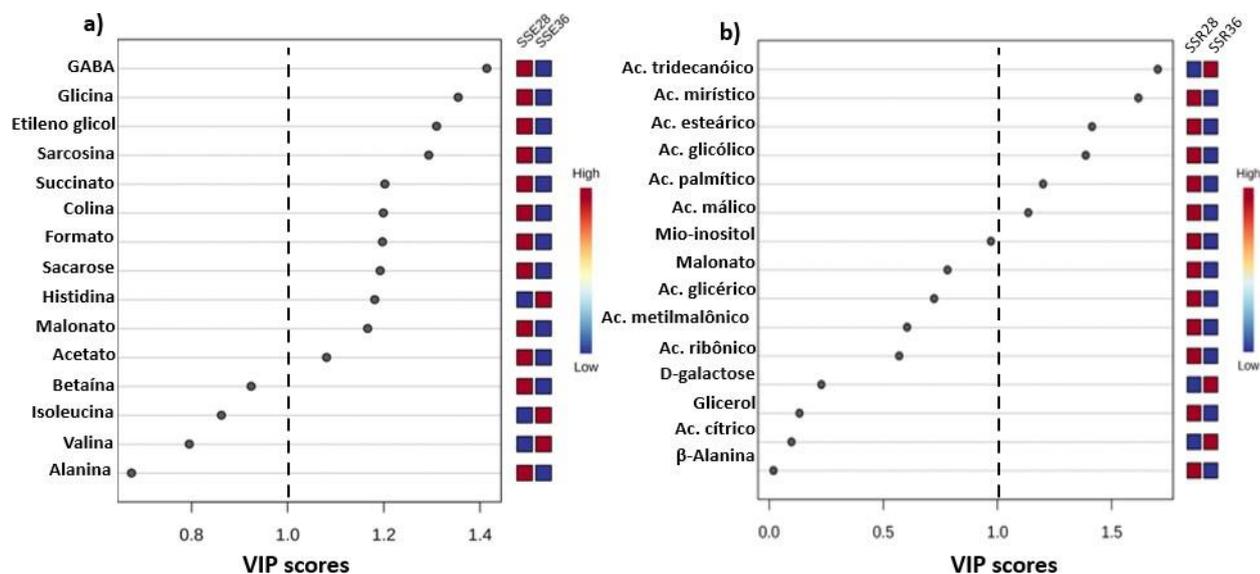
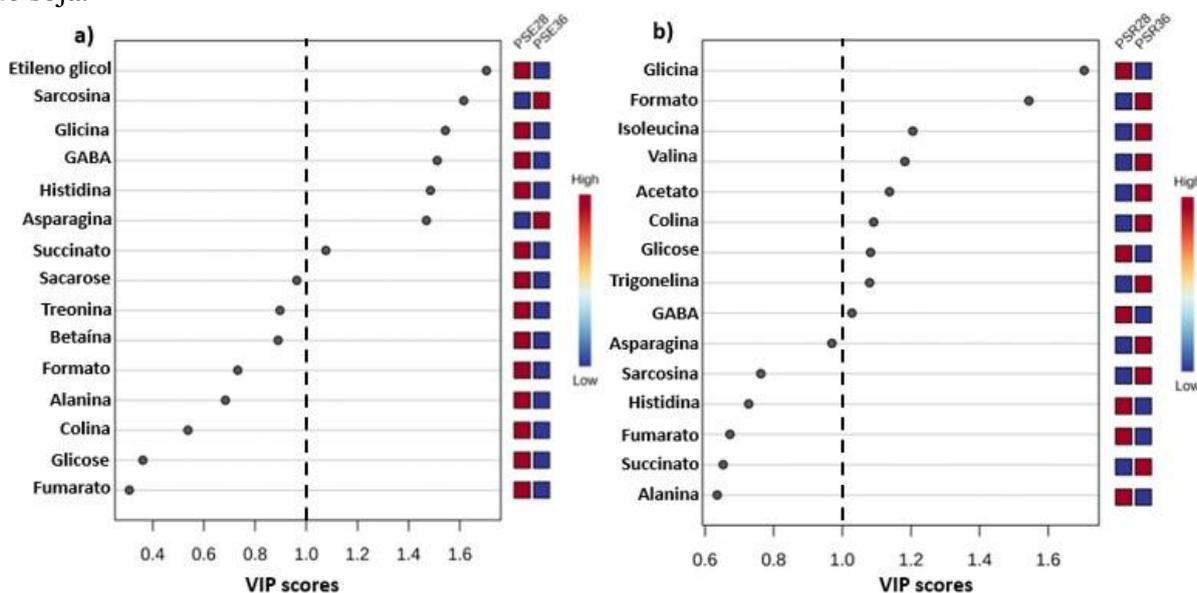


Figura 4. Metabolitos que explicam no metabolôma do a) endosperma e b) raiz nas plântulas de soja.



Aminoácidos como a valina, isoleucina e histidina foram acumulados nas sementes e plântulas, esses compostos fornecem blocos de construção para a síntese de proteínas e também são importantes em muitas redes metabólicas que controlam o crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando como precursores de metabólitos secundários protetores, como alcaloides e glicosídeos. Os níveis de valina e isoleucina foram aumentados em raízes de tomateiro bravo (*Solanum nigrum*) sob estresse de metais pesados (XU et al, 2012), em tecidos vegetais frente ao estresse hídrico (JOSHI et al, 2010) e nas sementes de soja com genótipos tolerantes a altas temperaturas (CHEBROLU et al, 2016). Mudanças de canola (*Brassica napus* L.) cultivadas sob altas temperaturas apresentam um acúmulo de histidina (VIANA et al, 2022;). Portanto, o

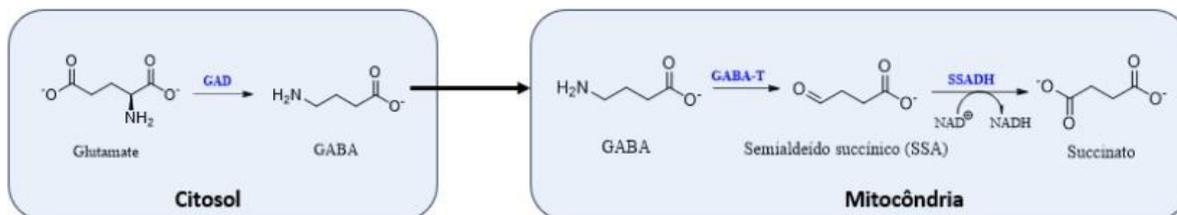
acúmulo de histidina, isoleucina e valina na raiz de sementes de soja pode estar contribuindo para desenvolvimento das sementes e estabelecimento das plântulas.

O GABA é um metabólito bastante discutido no que se refere as respostas das plantas frente a estresses, diversos estudos apontam sua rápida e ampla produção na resposta a estresses abióticos (BAXTER et al, 2007). O GABA é sintetizado para atuar como uma molécula osmoprotetora, podendo induzir a tolerância ao calor. No 68 endosperma das sementes de soja houve uma redução do GABA, sugerindo que seu catabolismo foi aumentado a 36°C. Uma vez que o GABA atua como uma molécula de sinalização, eram esperados níveis maiores deste metabólito nas sementes estressadas em comparação com as germinadas em condições normais. Uma das hipóteses que estes resultados podem levantar é que sementes de soja quando submetidas as altas temperaturas não adotam esse mecanismo de defesa e sinalização.

Um dos produtos do catabolismo do GABA através da via shunt GABA é o succinato (figura 5), ácido orgânico intermediário do ciclo de Krebs. O succinato também apresentou níveis reduzidos nas sementes, ou seja, o succinato que foi catabolizado pode estar sendo utilizado para alimentar o ciclo de Krebs, que é uma via chave na produção de energia e para os processos metabólicos que conduzem as defesas da planta (ANSARI, 2021).

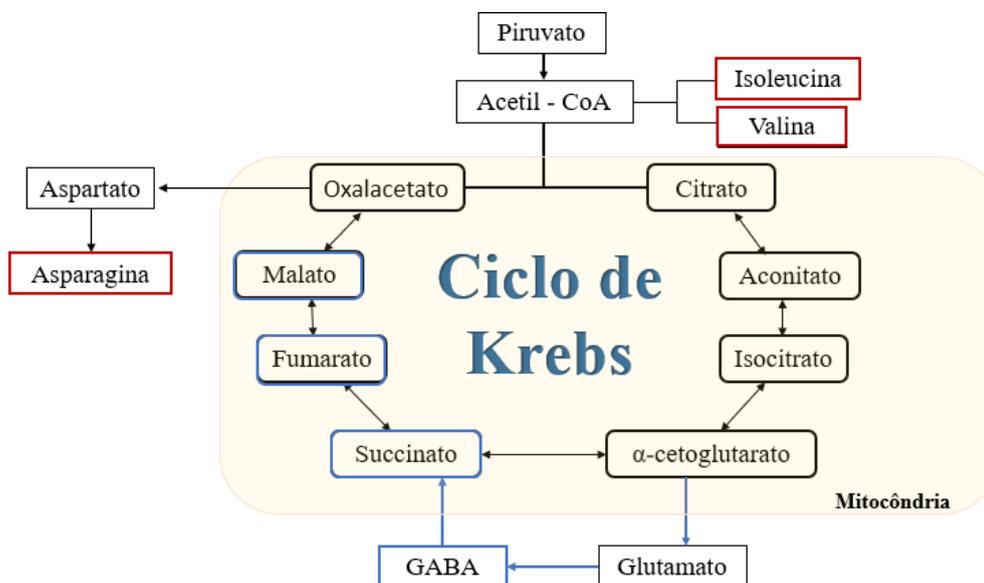
Figura 5. Via de degradação do GABA (shunt GABA).

O GABA é sintetizado a partir do glutamato via glutamato descarboxilase (GAD) no citosol. Na mitocôndria, a enzima GABA transaminase (GABA-T) catalisa a produção de semialdeído succínico (SSA), que produz succinato e NADH através da ação da enzima semialdeído succínico desidrogenase (SSADH).



Para além da redução de GABA e succinato, a redução de fumarato corrobora com a hipótese de que, sob altas temperaturas, os intermediários do ciclo de Krebs (figura 6) estão sendo consumidos possivelmente para alimentar o ciclo e aumentar sua atividade.

Figura 6. Representação esquemática do ciclo de Krebs e via GABA shunt
As setas em azul representam a via GABA shunt de forma simplificada.



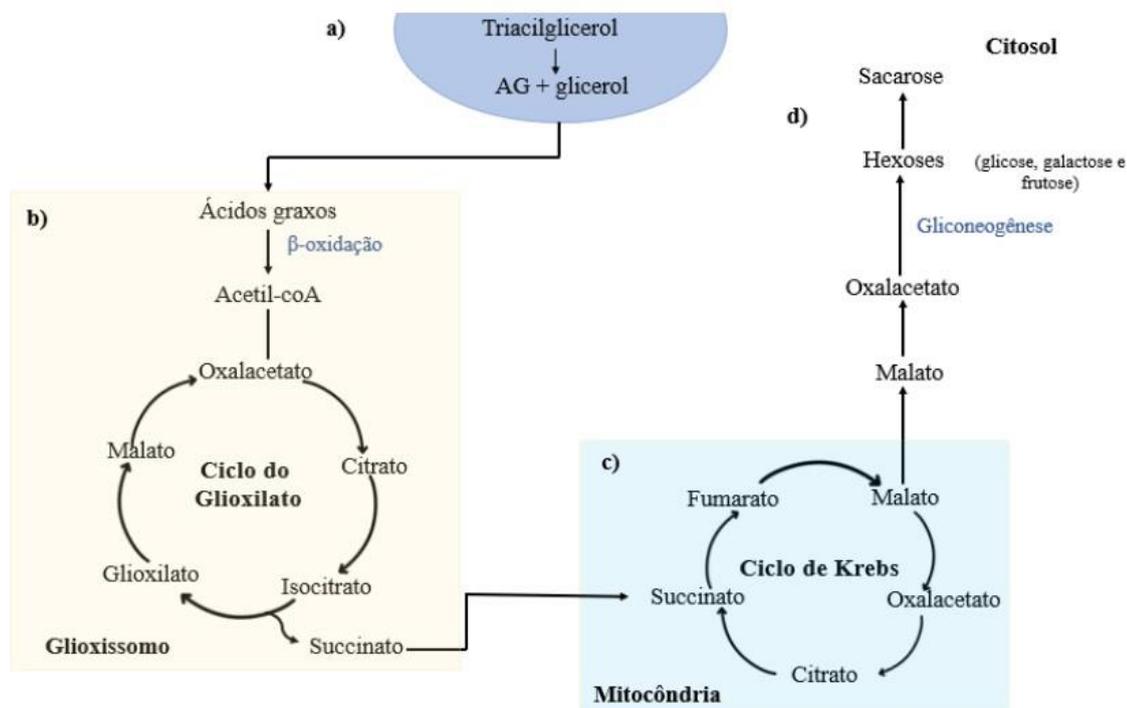
Portanto, a redução de succinato, fumarato e GABA estão regulando a resposta principal das sementes a temperatura de modo que acontece uma mobilização para o fornecimento de energia através do ciclo de Krebs, uma via intermediária no metabolismo vegetal, que é um dos principais responsáveis por fornecer elétrons para cadeia de transporte de elétrons mitocondrial para produzir ATP (OBATA; FERNIE, 2012).

Nas sementes houve uma redução nos níveis de ácidos graxos, incluindo os ácidos mirístico e esteárico, indicando uma mobilização de lipídeos. Os triacilgliceróis (TGA) são os compostos de armazenamento de energia mais abundantes em sementes de muitas culturas, como girassol (*Helianthus annuus*), milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max L.*). Os TAGs são as principais reservas de ácidos graxos essenciais para a produção de energia durante a germinação das sementes e o estabelecimento inicial de plântulas (XU; SHANKLIN, 2016).

A mobilização dos lipídeos envolve a indução coordenada de algumas vias bioquímicas. A primeira etapa é marcada pela lipólise dos TAGs catalisada pelas lipases para produzir ácidos graxos livres e glicerol (figura 7a), na segunda etapa a Acetil-CoA produzida pela β -oxidação dos ácidos graxos metabolizada no glioxissomo para a produção de succinato (figura 7b), que é então transportado para a mitocôndria, onde é convertido a malato via ciclo de Krebs (figura 7c).

Por fim, o malato produzido na mitocôndria é transportado para o citosol, onde é convertido a hexoses e posteriormente a sacarose através da via da gliconeogênese (figura 7d). Foi registrada uma redução de sacarose no endosperma das sementes e plântulas. A sacarose quanto estar sendo utilizadas para a construção de paredes celulares no endosperma, de modo a apoiar a germinação sob altas temperaturas.

Figura 7. Conversão de lipídios em sacarose. a) lipólise de triacilglicerol; b) β oxidação de ácidos graxos para produzir succinato; c) produção de malato; d) produção de sacarose.



Conclusões

A temperatura é um fator chave na germinação de sementes e estabelecimento de plântulas. Foi notado que o aumento de temperatura não reduziu de forma significativa a germinação, sugerindo que sob altas temperaturas as sementes ativam mecanismos de modo a compensar os efeitos do estresse e manter uma boa taxa de germinação. Através de uma abordagem multiplataforma utilizando RMN de ^1H e GC-MS, foi possível notar que aumento da temperatura provocou mudanças no metaboloma de sementes e plântulas de soja. No geral, houve um aumento nos níveis de aminoácidos, que são metabólitos protetores contra estresses abióticos. Intermediários dos ciclos de Krebs foram reduzidos, o que sugere uma modulação do metabolismo energético, a fim de fornecer energia para a germinação e estabelecimento de plântulas. Nas sementes o metabolismo energético também foi afetado positivamente pelo aumento da β oxidação de ácidos graxos.

Compreender a assinatura metabólica e os mecanismos que são desencadeados quando plantas enfrentam estresses abióticos como altas temperaturas podem ser importante para o desenvolvimento de protocolos de plantio melhorados e de culturas mais resistentes, especialmente no cenário ambiental em que temperaturas anuais tendem a aumentar.

Referências

- ANSARI, Mohammad Israil et al. GABA shunt: a key-player in mitigation of ROS during stress. *Plant Growth Regulation*, v. 94, p. 131-149, 2021.
- BANERJEE, Priyanka et al. Identification of key contributory factors responsible for vascular dysfunction in idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *Plos one*, v. 8, n. 11, p. e80940, 2013.
- BAXTER, Charles J. et al. The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress. *Plant physiology*, v. 143, n. 1, p. 312-325, 2007.

- CANTELLI, K. C. Caracterização de linhagens de soja *Glycine max* (L.) Merrill para produção de brotos. 2016.
- CHEBROLU, Kranthi K. et al. Impact of heat stress during seed development on soybean seed metabolome. *Metabolomics*, v. 12, n. 2, p. 1-14, 2016.
- CHONG, Jasmine; WISHART, David S.; XIA, Jianguo. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Current protocols in bioinformatics*, v. 68, n. 1, p. e86, 2019.
- DJANAGUIRAMAN, Maduraimuthu; PRASAD, PV Vara. Ethylene production under high temperature stress causes premature leaf senescence in soybean. *Functional Plant Biology*, v. 37, n. 11, p. 1071-1084, 2010.
- DORNBOS JR, D. L.; MULLEN, R. E. Influence of stress during soybean seed fill on seed weight, germination, and seedling growth rate. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 71, n. 2, p. 373-383, 1991.
- EGLI, D. B. et al. Air temperature during seed filling and soybean seed germination and vigor. *Crop Science*, v. 45, n. 4, p. 1329-1335, 2005.
- HANSEN, James E. et al. Global warming in the pipeline. *Oxford Open Climate Change*, v. 3, n. 1, p. kgad008, 2023.
- LIPIEC, Jerzy et al. Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. *International Agrophysics*, v. 27, n. 4, p. 463-477, 2013. MARCOS FILHO, J. Deterioração de sementes. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ, v. 12, p. 291-352, 2005.
- NAHAR, Kamrun; HASANUZZAMAN, Mirza; FUJITA, Masayuki. Heat stress responses and thermotolerance in soybean. In: *Abiotic and biotic stresses in soybean production*. Academic Press, 2016. p. 261-284.
- NAZ, N. et al. Influence of heat stress on growth and physiological activities of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Phyton*, v. 87, p. 225, 2018.
- OBATA, Toshihiro; FERNIE, Alisdair R. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 69, p. 3225-3243, 2012.
- RUCHEL, Queli et al. Effect of high temperature and recovery from stress on crop-weed interaction. *Bragantia*, v. 79, p. 582-591, 2020.
- SHARMA, Anket et al. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, v. 24, n. 13, p. 2452, 2019.
- ROBERTS, E. H. Temperature and seed germination. In: *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1988. p. 109-132.
- RODRIGUES, Juliano Mendonça et al. BiP-overexpressing soybean plants display accelerated hypersensitivity response (HR) affecting the SA-dependent sphingolipid and flavonoid pathways. *Phytochemistry*, v. 185, p. 112704, 2021.
- RUCHEL, Queli et al. Effect of high temperature and recovery from stress on crop-weed interaction. *Bragantia*, v. 79, p. 582-591, 2020.
- VIANA, Vívian Ebeling et al. Metabolic profile of canola (*Brassica napus* L.) seedlings under hydric, osmotic and temperature stresses. *Plant Stress*, v. 3, p. 100059, 2022.
- XU, Jin et al. Comparative physiological responses of *Solanum nigrum* and *Solanum torvum* to cadmium stress. *New Phytologist*, v. 196, n. 1, p. 125-138, 2012.
- XU, Changcheng; SHANKLIN, John. Triacylglycerol metabolism, function, and accumulation in plant vegetative tissues. *Annual Review of Plant Biology*, v. 67, p. 179-206, 2016.
- VIANA, Vívian Ebeling et al. Metabolic profile of canola (*Brassica napus* L.) seedlings under hydric, osmotic and temperature stresses. *Plant Stress*, v. 3, p. 100059, 2022.