

**TEORES DE ISOFLAVONAS NO GRÃO E RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS EM CULTIVARES DE SOJA SUBMETIDAS AO
ALAGAMENTO, EM DIFERENTES ESTÁDIOS**

CAMILA ARGENTA FANTE

2008

CAMILA ARGENTA FANTE

**TEORES DE ISOFLAVONAS NO GRÃO E RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS EM CULTIVARES DE SOJA SUBMETIDAS AO
ALAGAMENTO, EM DIFERENTES ESTÁDIOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Fante, Camila Argenta.

Teores de isoflavonas no grão e respostas fisiológicas em cultivares de soja submetidas ao alagamento, em diferentes estádios / Camila Argenta

Fante. -- Lavras : UFLA, 2008.

48 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. *Glycine max*. 2. Hipoxia. 3. Crescimento de plantas. 4. Isoflavonas.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.32204128

CAMILA ARGENTA FANTE

**TEORES DE ISOFLAVONAS NO GRÃO E RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS EM CULTIVARES DE SOJA SUBMETIDAS AO
ALAGAMENTO, EM DIFERENTES ESTÁDIOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 11 de julho de 2008

Profa. Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart UNILAVRAS

Prof. Dr. Luiz Édson Mota de Oliveira UFLA

Prof. Dr. José Donizeti Alves

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

AGRADECIMENTOS

Agradecer é a comprovação da necessidade que temos do outro. É quando admitimos que sozinhos não teríamos chegado onde chegamos.

Por isso, agradeço a Deus por ter-me dado forças, sabedoria, luz e responsabilidade.

A minha família, em especial meus pais, Rudnei e Tânia, por ter me concedido a oportunidade de estudar e me aperfeiçoar e por todo o apoio, amor, paciência, segurança e respeito, incondicionais e infindáveis.

Ao Leandro, pelo carinho, incentivo, compreensão e apoio.

Ao meu orientador, Prof. José Donizeti Alves, pela orientação, atenção, confiança e conselhos oferecidos durante esses dois anos de convívio profissional.

Ao programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao CNPq, órgão que me concedeu a bolsa de estudos.

Aos funcionários e amigos Lena, Joel, Odorêncio, Evaristo, Tanhan, Izonel e Celem, pelo auxílio incansável.

Ao Sidnei, Marcelo, Paôla, Ilisandra, Neidi, Dani, André, Meline e Manu, pela fiel ajuda nas tarefas do laboratório. A Agda e Humberto, pelo companheirismo, força e horas contínuas de estudo.

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA, pela dedicação, contribuição ao conhecimento e pela convivência amigável.

Aos demais amigos e colegas do Setor de Fisiologia Vegetal.

A todas as pessoas que souberam contribuir com um pouco de si para a realização de mais este sonho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Soja e alagamento.....	4
2.2 Soja, um alimento funcional.....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Época e localização do experimento.....	11
3.2 Material vegetal.....	11
3.3 Indução dos tratamentos e condução do experimento.....	11
3.4 Avaliação do crescimento.....	12
3.5 Análises de carboidratos.....	12
3.6 Análise de proteínas e enzimáticas.....	13
3.7 Análise isoflavonas.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Análises na planta.....	17
4.2 Análises no grãos.....	31
5 CONCLUSÃO.....	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

RESUMO

FANTE, Camila Argenta. **Teores de isoflavonas no grão e respostas fisiológicas em cultivares de soja submetidas ao alagamento, em diferentes estádios.** 2008. 48 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

O estresse imposto às plantas pelo alagamento do solo constitui uma barreira para o crescimento e a produtividade das mesmas. A identificação de cultivares de soja tolerantes à inundação, e que produzam maiores teores de isoflavonas, compostos responsáveis pelo princípio nutracêutico, torna-se necessária na medida em que a soja vem sendo utilizada na alimentação humana e para o benefício da saúde. Dessa forma, o presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar os níveis de tolerância e o comportamento das cultivares de soja ao alagamento em diferentes estádios de desenvolvimento, por meio de análise de matéria seca, de açúcares solúveis totais e de amido e analisar a resposta das mesmas em relação aos teores de isoflavonas. As cultivares BRS 267, BRS 257 e BRS 213 foram submetidas a 15 dias de alagamento, nos estádios V6 e V8 e 11 dias sob estresse, no estádio R4. Os resultados revelam que a cultivar BRS 213 foi a mais tolerante ao alagamento, uma vez que apresentou, em média, o menor decréscimo na produção de matéria seca. Observou-se também que as cultivares BRS 267, BRS 213 e BRS 257 apresentaram maior enfolhamento quando alagadas nos estádios V6, V8 e R4, respectivamente. Do mesmo modo, essas cultivares obtiveram maior produção de grãos e maiores teores de amido e açúcares solúveis totais nas folhas, quando comparadas ao controle, nesses mesmos estádios. Avaliou-se, ainda, a tolerância das plantas ao alagamento por meio da atividade enzimática radicular das enzimas álcool desidrogenase e piruvato descarboxilase. Sendo assim, as três cultivares apresentaram maior atividade das referidas enzimas quando submetidas ao alagamento. Em relação às isoflavonas em cada cultivar, o alagamento promoveu aumento desses compostos somente no estádio R4 da BRS 267, permanecendo constante nas demais cultivares.

* Comitê: Prof. Dr. José Donizeti Alves (orientador) – UFLA. Profa. Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart (co-orientadora) – UNILAVRAS.

ABSTRACT

FANTE, Camila Argenta. **Isoflavon levels in grain and physiological responses in the soybean cultivars submitted to flooding, at different stages.** 2008. 48 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

The stress imposed on plants by soil flooding constitute a barrier for growth and yield. The identification of soybean cultivars tolerant to flooding and that produce high level of isoflavon compounds responsible for nutraceutic principle, become necessary due the utilization of soybean in human nutrition and is beneficial for health. In this way, the present study to verify the tolerance levels and soybean cultivars responses to flooding in various developmental stages using dry mater accumulation, total soluble sugar, starch and isoflavon levels. The cultivars BRS 267, BRS 257 and BRS 213 were submitted to 15 days of flooding, in the stage V6 and V8, and 11 days from the same stress in stage R4. The results showed that BRS 213 was the most tolerant to flooding, showing the lower decrease in dry matter production. It was observed a higher leaf development in the cultivars BRS 267, BRS 213 and BRS 257 when the flooding was applied in the stages V6, V8 and R4 respectively. In the same way, these cultivars showed highest grain production, starch and total soluble sugars in leaves, when compared with control, in the same stage. It was also evaluated the flooding tolerance based in the root enzyme activity like alchool desidrogenase and piruvate descarboxilase. The threee cultivars showed higher activity when submitted to flooding. In relation to isoflavon in each cultivar, the flooding promoted na increase of these compounds only in stage R4 from BRS 267, remaining constant in the other cultivars.

* Guidance Committee: José Donizeti Alves – UFLA; Patrícia de Fátima Pereira Goulart - UNILAVRAS

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine Max* (L.) Merrill) é uma cultura de grande valor comercial e industrial. Seus benefícios na alimentação e para a saúde são conhecidos pelos chineses há milênios, mas somente nos últimos anos passou a ser considerada alimento funcional, ou seja, aquele que, além das funções nutricionais básicas, produz efeitos benéficos à saúde, sendo seguro para o consumo sem supervisão médica.

O valor econômico da cultura está relacionado à composição das sementes, sendo o teor protéico, muitas vezes, um dos principais determinantes do valor da soja (Maehler et al., 2003; Hernandez-Sebastian et al., 2005). Em média, a soja possui 40% de proteínas, 20% de lipídios (óleo), 5% de minerais e 34% de carboidratos. Não possui amido e cada 100 g de grãos contém 230 mg de cálcio, 580 mg de fósforo, 9,4 mg de ferro, 1 mg de sódio, 1900 mg de potássio, 220 mg de magnésio e 0,1 mg de cobre. Além da proteína e dos ácidos graxos, a soja oferece algumas vitaminas e outros compostos, como as isoflavonas (Park et al., 2002; Lanna et al., 2005).

O preço da soja é determinado pela negociação do grão nas principais bolsas de mercadoria. No mundo, a produção é de 216,3 milhões de toneladas com 92,6 milhões de hectares plantados, movimentando aproximadamente 215 bilhões de dólares ao ano. Os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais do grão e o Brasil ocupa o segundo lugar, com aproximadamente 21 milhões de hectares plantados, produzindo 57,9 milhões de toneladas de soja por ano. O estado de Mato Grosso é o maior produtor brasileiro de soja (Conab, 2007).

Um dos fatores determinantes da redução da produtividade das mais variadas espécies de plantas é a deficiência de oxigênio no solo, causada pelo

excesso de água, que pode ser provocado por excesso de chuvas e solos de várzea, entre outras situações. Sob essas condições, a respiração aeróbica das plantas e de microrganismos reduz rapidamente a concentração do oxigênio na solução do solo, levando à formação de um ambiente hipóxico (baixa concentração de oxigênio) ou anóxico (ausência de oxigênio), culminando com o desaparecimento das plantas sensíveis. A baixa concentração de O₂ (Drew, 1997; Bacanamwo & Purcell, 1999; Dennis et al., 2000; Vartapetian et al., 2003) e o excesso de CO₂ (Boru et al., 2003) junto às raízes são os principais fatores determinantes de prejuízos às plantas, em condições de inundação do solo.

No Brasil, a soja tem recebido atenção considerável por seus benefícios para a saúde humana, prevenindo doenças crônicas. As isoflavonas, compostos fenólicos, compreendem as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína e ocorrem naturalmente nos grãos de soja, das quais a genisteína é o principal fator na prevenção do câncer (Coward et al., 1993; Liggins et al., 2000; Messina, 2000). A concentração de isoflavonas nos grãos de soja é geneticamente controlada e influenciada pelas condições ambientais (Tsukamoto et al., 1995; Boydak et al., 2002; Góes-Favoni et al., 2004; Caldweel, 2005).

Com o aumento da procura por alimentos à base de soja no Brasil, diversos produtos têm sido lançados no mercado e pouco se conhece quanto à presença e à concentração de isoflavonas. Autores sugerem que compostos presentes na soja, necessários para a sua atividade funcional, as isoflavonas são aumentadas quando a soja é cultivada em áreas alagadas (Bennett et al., 2004; Al-Tawaha et al., 2007). Por esse motivo, são necessários mais estudos para o conhecimento e a seleção de cultivares capazes de produzir soja com alto teor desses compostos.

A exploração de áreas alagadas com espécies de importância econômica depende da identificação não somente de plantas que possam sobreviver à

inundação do solo, mas que também apresentem rendimentos capazes de trazer retorno econômico e benéfico para a saúde humana. Por isso a cultura da soja aparece como uma boa alternativa.

Este trabalho foi realizado com os objetivos de verificar os níveis de tolerância e o comportamento das cultivares de soja ao alagamento em diferentes estádios de desenvolvimento, analisando a resposta das mesmas em relação aos teores de isoflavonas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Soja e alagamento

A soja dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria e pelas indústrias química e de alimentos. O seu cultivo em solos hidromórficos é de grande interesse em diversas regiões do mundo, especialmente nas regiões nas quais o arroz irrigado é o principal produto. A limitação ou a falta de oxigênio livre são comuns também em solo alagado, como resultado do excesso de chuvas e de inundações. Nessas situações, a troca gasosa é reduzida para níveis extremamente baixos (Drew, 1997; Vartapetian & Jackson, 1997; Dennis et al., 2000; Blokhina et al., 2003; Jackson & Colmer, 2005).

O efeito do estresse por saturação hídrica do solo sobre as plantas é complexo e dependente do estágio de desenvolvimento da planta e da duração desse estresse (Schoffel et al., 2001). Os resultados sobre qual o estágio em que as plantas são mais tolerantes à saturação hídrica do solo não são conclusivos.

O conceito de estresse está intimamente relacionado ao de tolerância ao estresse, que é a aptidão da planta para enfrentar um ambiente desfavorável. Desse modo, a capacidade para sobreviver ao estresse é regida por mecanismos que conferem tolerância. Todos esses mecanismos podem ocorrer por meio da combinação de processos comportamentais, morfológicos, anatômicos, fisiológicos e bioquímicos e dependem de processos moleculares.

A difusão de gases da atmosfera até o solo é fortemente afetada em áreas alagadas ou sujeitas ao alagamento temporário (Drew, 1997; Bacanamwo & Purcell, 1999; Dennis et al., 2000). A soja é tolerante à falta do oxigênio, mas é sensível a níveis elevados do dióxido de carbono na zona da raiz (Boru et al.

2003). O alagamento periódico durante o ciclo da cultura afeta adversamente seu crescimento e produtividade.

A severidade do estresse ao alagamento depende de muitos fatores, incluindo a duração do alagamento, a variedade da cultura, o estado do crescimento, o tipo do solo, os níveis de fertilidade, os patógenos e as condições do alagamento. Espécies diferem em tolerância ao alagamento e cultivares de soja apresentam mecanismos diferentes para sobreviver nesse meio. Esses mecanismos ocorrem em níveis moleculares e bioquímicos e resultam em alterações na aparência da planta e também no seu desempenho (Vantoi et al., 2006).

De acordo com Bacanamwo & Purcell (1999), a identificação de cultivares de soja tolerantes à inundação pode requerer a seleção de plantas que consigam manter o crescimento nessas condições, o que é proporcional às mudanças que ocorrem na morfologia das raízes. Alternativamente, o aumento da tolerância requer alterações genéticas para produzir aerênquima constitutivo entre outras alterações morfofisiológicas.

Raízes, rizomas e outros órgãos da planta obtêm oxigênio para a respiração da atmosfera gasosa do solo. Mas, quando o solo se torna excessivamente molhado, a transferência de O_2 do ar para dentro do solo é efetivamente bloqueada porque os maiores poros do solo, que são usualmente preenchidos por ar, ficam preenchidos por água. Qualquer oxigênio dissolvido que permanece no solo é rapidamente consumido por microrganismos e plantas, e o solo não é mais, por muito tempo, apto para suprir oxigênio. O aerênquima (tecidos com alta proporção de espaços ou lacunas cheios de gás) oferece à planta uma estratégia alternativa para obter oxigênio. A lacuna interconectada, se estendendo debaixo do solo até dentro dos caules e folhas, faz um sistema interno de aeração, habilitando partes da planta para sobreviver ou crescer, por

um tempo, em um ambiente que é deficiente de O₂ ou completamente desprovido de mesmo (Drew et al., 2000; Dantas et al., 2001).

Liao & Lin (2001) afirmam que o excesso de água no solo causa redução imediata na troca de gases entre a planta e o ambiente. O estresse experimentado pelas raízes sob inundação intensifica-se com o tempo, com a passagem de hipoxia para anoxia e pela ação das toxinas produzidas por bactérias anaeróbicas do solo. A anoxia ou a hipoxia sofridas pelo sistema radicular alteram o metabolismo celular, provocando queda imediata na respiração das raízes, tanto em plantas tolerantes como nas intolerantes.

Sabe-se que o déficit é mais prejudicial que o excesso de água para a soja (Sallam & Scott, 1987). Quanto ao estágio de desenvolvimento, acredita-se que a fase reprodutiva seja a mais afetada pelo excesso de água no solo, principalmente o florescimento. No entanto, nos estádios vegetativos, os efeitos podem ser significativos (Sá et al., 2004).

Sallam & Scott (1987) e Bacanamwo & Purcell (1999) estudaram o efeito do alagamento em plantas de soja e concluíram que os tratamentos reduziram significativamente o crescimento foliar e radicular da planta. No entanto, Scott et al. (1989) observaram que a tolerância à inundação varia entre as cultivares, sendo algumas delas mais susceptíveis no estágio reprodutivo do que no vegetativo.

A falta de oxigênio afeta a nutrição mineral, a produção e a alocação de reguladores de crescimento, a fotossíntese, a respiração e a alocação de carboidratos. Em decorrência de vários processos na planta, podem ser observados danos, como clorose, epinastia e abscisão de folhas, diminuição da taxa de crescimento e hipertrofia do caule, formação de raízes adventícias e/ou superficiais, redução no crescimento de raízes e formação de aerênquimas. Enfim, dependendo da duração e da intensidade do estresse causado pela baixa

disponibilidade de oxigênio, pode até levar a planta à morte (Almeida et al., 2003).

Alguns autores (Maehler et al., 2003; Bennett et al., 2004) estudaram o efeito da irrigação em certos períodos do ciclo de plantas de soja e perceberam que, em períodos críticos, a irrigação proporciona maior disponibilidade hídrica com melhores condições para absorção de nutrientes, resultando em maior redistribuição de assimilados para os grãos. Nesses mesmos estudos observou-se, também, que o conteúdo de proteínas nos grãos foi semelhante, em plantas controle e em plantas que sofreram o estresse. Já Al-Tawaha et al. (2007) revelaram que a irrigação teve impacto muito limitado sobre as concentrações de proteínas e óleo, não sendo os principais efeitos observados. Boydak et al. (2002) observaram que, quando a irrigação foi aplicada no décimo segundo dia após a emergência, houve significativa diferença no teor de proteínas com relação aos outros tratamentos, o que demonstra que a irrigação parece ter influência sobre a composição da semente.

2.2 Soja, um alimento funcional

A soja, leguminosa originária da China, é um dos produtos agrícolas de maior importância no agronegócio brasileiro, já que o país é o segundo maior produtor mundial. Atualmente, é o alimento que mais oferece possibilidades para o desenvolvimento de produtos funcionais. Além disso, esta é uma cultura que vem recebendo grande interesse, devido à excelente combinação que apresenta entre produtividade (normalmente acima de duas toneladas pro hectare), teores de proteína (em torno de 40%) e óleo no grão (em torno de 20%).

A soja é utilizada como alimento devido ao seu elevado teor protéico, muito embora também possua, em sua composição química, outras substâncias,

como os isoflavonóides que são relacionados a importantes propriedades biológicas como atividade antioxidante (Esaki et al., 1998; Esaki et al., 1999; Park et al., 2001), antifúngica (Naim et al., 1974), propriedades estrogênicas (Han et al, 2002; Messina, 2000), anticancerígena (Coward et al., 1993; Peterson & Barnes, 1993; Denis et al., 1999; Liggins et al., 2000; Messina, 2000) e contra a osteoporose (Messina, 1999; Liggins et al., 2000).

Outros efeitos benéficos das isoflavonas incluem a redução do risco de doenças cardiovasculares (Tikkanem et al., 1998; Liggins et al., 2000; Messina, 2000), pois podem afetar os níveis de colesterol total no sangue por meio da redução de frações LDL e do aumento de HDL (Chiari et al., 2004; Han et al, 2002). Desse modo, são substâncias que atuam de maneira protetora na camada que recobre internamente as artérias. Além disso, esses compostos podem atenuar os sintomas da menopausa (Kurzer, 2000).

O maior interesse dos pesquisadores é na farmacologia e na fisiologia das isoflavonas, pois elas apresentam estrutura não esteroideal, mas comportam-se como estrógenos, na maioria dos sistemas biológicos (Esteves & Monteiro, 2001).

As isoflavonas são compostos pertencentes ao grupo dos flavonóides, que possuem três anéis benzeno em sua estrutura, da classe dos fitoestrógenos e estão amplamente distribuídas no reino vegetal (Park et al., 2001). O grão de soja contém, basicamente, três tipos de isoflavonas que se apresentam, normalmente, em quatro diferentes formas, que são: glicosiladas (daidzina, genistina e glicitina), acetilglicosiladas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina), malonilglicosiladas (malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina) e a forma estrutural não conjugada, aglicona (daidzeína, genisteína e gliciteína).

As formas malonil são as mais abundantes na soja *in natura*. Quando submetida a processamentos nos quais sejam utilizadas altas temperaturas e pressão, elas são convertidas nas formas acetil e estas, a formas glicosídicas (Park et al., 2001; Góes-Favoni et al., 2004). A isoflavona genisteína tem grande poder de controle de células cancerosas. Esta aglicona foi capaz de inibir o crescimento de células tumorais da próstata humana, quando comparada à sua forma glicosilada. Além disso, foi relatado que a atividade antioxidante da genisteína, ou de outras isoflavonas agliconas, é superior à das glicosilisoflavonas. Góes-Favoni et al. (2004) afirmam que produtos não-fermentados têm concentrações de isoflavonas duas a três vezes maiores que produtos fermentados, entretanto, a distribuição dos constituintes difere nesses dois grupos. Produtos fermentados apresentam, principalmente, formas agliconas enquanto os produtos não-fermentados apresentam maiores concentrações de glicosídeos.

As concentrações desses compostos são relativamente grandes na soja e as principais isoflavonas encontradas são a daidzeína, a genisteína e a gliciteína. Do total de isoflavonas, dois terços são de glicosídeos conjugados de genisteína, sendo o restante composto de conjugados de daidzeína e pequenas quantidades de gliciteína. Já nos produtos fermentados de soja, predominam genisteína e daidzeína, devido à ação de glicosidases bacterianas (Esteves & Monteiro, 2001).

Adaptação das práticas, como data de plantio, adubação, irrigação e controle de ervas daninhas, pode ser utilizada para aumentar as concentrações de isoflavonas em soja (Vyn et al., 2002; Bennett et al., 2004; Al-Tawaha & Seguin, 2006). Segundo Al-Tawaha et al. (2007), a irrigação resulta em algumas das maiores concentrações de isoflavonas em grãos de soja, tendo um dos tratamentos irrigados apresentado aumento de 45% na concentração total de

isoflavonas, em comparação ao tratamento não irrigado. Neste mesmo estudo, a irrigação aumentou os teores de daidzeína, genisteína, gliciteína e isoflavonas totais em 117%, 44%, 50% e 60%, respectivamente, em relação ao controle, em uma das cultivares em estudo. Bennett et al. (2004) relataram aumentos de 130% a 280% na concentração total de isoflavonas em grãos de plantas irrigadas, em relação a plantas não irrigadas. Do mesmo modo, Caldwell et al. (2005) e Lozovaya et al. (2005) concluíram que a resposta a irrigação pode aumentar, dependendo da cultivar, a concentração de isoflavonas em soja.

As características genéticas do grão, bem como as condições climáticas (temperatura durante a fase de enchimento de grãos), influenciam no teor de isoflavonas (Tsukamoto et al., 1995; Boydak et al., 2002; Góes-Favoni et al., 2004; Caldweel, 2005).

Kudou et al. (1991) e Carrão-Panizzi et al. (1999) afirmam que o acúmulo de isoflavonas ocorre durante o enchimento dos grãos (entre 35 e 60 dias depois do florescimento), quando genistina e malonilgenistina tendem a acumular no final do período de desenvolvimento e daidzina e malonildaidzina estão presentes, em altas concentrações, durante todo o período de maturação. Segundo Lozovaya et al. (2005), baixas temperaturas durante o desenvolvimento das sementes levam a uma maior concentração de isoflavonas, no entanto, essa resposta é dependente também do fator genético de cada cultivar.

Portanto, justifica-se a realização do presente estudo, em razão da carência de trabalhos que realizem a quantificação de isoflavonas em cultivares de soja submetidas ao alagamento, em diferentes estádios de desenvolvimento e que verifiquem também os níveis de tolerância destas plantas à inundaçãõ.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Época e localização do experimento

O presente trabalho foi desenvolvido, de janeiro a abril de 2007, na área experimental do setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, a 918 m de altitude, nas coordenadas 21°14'S de latitude e 45°00'W de longitude GRW.

3.2 Material vegetal

Foram utilizadas plantas de soja das cultivares BRS 267, BRS 257 e BRS 213, específicas para alimentação humana, cedidas pela Embrapa Soja, Londrina-PR.

3.3 Indução dos tratamentos e condução do experimento

Sementes das três cultivares de soja foram semeadas em vasos com capacidade para 8 litros (dimensões de 25 cm de diâmetro e 23 cm de altura), contendo, como substrato, solo previamente adubado com calcário ($0,68 \text{ kg.m}^{-3}$), fósforo (5 kg.m^{-3}) e potássio ($2,5 \text{ kg.m}^{-3}$). Inicialmente, foram colocadas sete sementes por vaso, à profundidade aproximada de 3 cm, sendo realizado desbaste das plantas aos 10 dias após a emergência, deixando-se apenas três plantas por vaso. Após o desbaste, foi realizada adubação com magnésio (30 mg.kg^{-1}), nitrogênio (300 mg.kg^{-1}) e micronutrientes (boro $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$; zinco 10 mg.kg^{-1} ; ferro 5 mg.kg^{-1} ; manganês 3 mg.kg^{-1} ; cobre $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ e molibdênio $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$).

Ao atingirem os estádios V6 (plantas com sexto nó), V8 (plantas com oitavo nó) e R4 (formação de vagens), as plantas foram submetidas ao alagamento. Para tanto, os vasos foram colocados, individualmente, dentro de

recipientes maiores (28 cm de diâmetro e 26 cm de altura), sem vazão de água. Em seguida foi adicionada água, tomando-se o cuidado de mantê-la a 2 cm acima do nível do solo. Para o tratamento controle, as plantas foram irrigadas, diariamente, permanecendo o solo próximo à capacidade de campo.

No dia da indução dos tratamentos, foram selecionados 12 vasos, dos quais seis foram alagados e os outros seis foram deixados como controle na capacidade de campo. Após 15 dias de alagamento nos estádios V6 e V8 e 11 dias no estágio R4, coletaram-se plantas de três vasos de cada tratamento, para as análises bioquímicas e de crescimento. Os demais vasos permaneceram na capacidade de campo até o final do experimento.

3.4 Avaliação de crescimento

Na época de cada avaliação, foi determinada a massa seca de raiz, caule e folhas, obtida após quatro dias em estufa, a 70°C. A produção também foi determinada analisando-se a matéria seca e o número de grãos por planta.

3.5 Análises de carboidratos

Das amostras de folhas e raízes colocadas em estufa, a 70°C, foram retirados 300 mg de matéria seca, que foram macerados em 5 mL do extrator tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,6, submetendo-se ao banho-maria, a 40°C, por 30 minutos. O extrato foi centrifugado, a 10.000 x g por 20 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em 5 mL do extrator, submetido à centrifugação e, ao final, os sobrenadantes reunidos e utilizados para a quantificação de açúcares solúveis totais.

Para a extração do amido, o precipitado foi novamente ressuspensionado com 8 mL do tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8. As amostras foram submetidas ao banho-maria, a 40°C, adicionando-se 2 mL da enzima

amiloglucosidase (12,6 unidades). Os tubos permaneceram em banho-maria por 2 horas e, em seguida, as amostras foram centrifugadas, a 20.000 x g por 18 minutos, sendo o sobrenadante coletado e o volume completado para 15 mL.

Para a quantificação dos açúcares solúveis totais e do amido, foi utilizado o método da Antrona, segundo metodologia descrita por Yemm e Willis (1954).

3.6 Análises de proteínas e enzimáticas

Proteínas totais

As proteínas de raízes foram extraídas pela maceração de 300 mg do material em nitrogênio líquido. Adicionaram-se 800 µL do tampão de extração (Hepes 200 mM pH 7,5, β-mercaptoetanol, glicerol 87%, PVPP 6%), seguido de centrifugação, a 13.000 x g, por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi coletado para a quantificação.

As proteínas no grão foram extraídas pela maceração de 100 mg do material fresco em nitrogênio líquido. Para extração da gordura, acrescentaram-se 300 µL de éter e 300 µL de água ao material macerado, que foi armazenado, a 4°C, por 30 minutos. Realizou-se uma centrifugação a 10.000 x g e o sobrenadante foi descartado. Ao pellet adicionou-se 1 mL de tampão borato 0,02 M pH 9,0 seguido de centrifugação, a 14.000 x g, por 3 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 750 µL de tampão desnaturante, composto por Tris HCl 0,02M pH 8,6; SDS 1%; β-mercaptoetanol 0,3% e glicerol 8,3%. As amostras foram aquecidas, a 90°C, por 2 minutos.

A quantificação das proteínas foi realizada segundo a metodologia de Bradford (1976) e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 595 nm. Os

resultados foram calculados com base na curva padrão de BSA (soro albumina bovina).

Gel de proteínas totais no grão

A eletroforese das proteínas do grão foi realizada pelo método SDS-PAGE, em que foram aplicados 20 µg de proteínas de cada amostra por canaleta e, como padrão, utilizou-se um marcador de peso molecular de 213.000 a 8.000 daltons, em gel de poliacrilamida 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). O tampão de corrida utilizado foi tris-glicina acrescido de SDS pH 8,3 e a corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical, a 4°C, com voltagem constante, a 60V, por, aproximadamente, 7 horas. Terminada a corrida, os géis foram corados em solução de Comassie Blue R-250 overnight e descorados em solução de etanol 5%, ácido acético 10% e água 85%, conforme Alfenas (2006).

Análises enzimáticas

A atividade radicular da enzima álcool desidrogenase (ADH) foi determinada segundo a metodologia descrita por Hanson et al. (1986), a atividade da lactato desidrogenase (LDH) segundo Hoffman et al. (1986) e a atividade da piruvato descarboxilase (PDC) segundo metodologia descrita por Kato-Noguchi (2000). A atividade da ADH foi monitorada pela redução do NAD⁺, a 340 nm, por 3 minutos, em um meio de reação incubado a 28°C, contendo tampão Tris HCl 1 M, pH 8,0, NAD⁺ 10 mg mL⁻¹ e etanol 50%. A atividade da LDH também foi monitorada pela redução do NAD⁺, a 340 nm, por 3 minutos, em um meio de reação incubado a 28°C, contendo tampão Tris HCl 1 M, pH 8,0, NAD⁺ 10 mg mL⁻¹, MgCl₂ 100 mM e lactato de sódio 60%. E a

atividade da PDC foi medida pela oxidação do NADH, a 340 nm, por 3 minutos em meio de reação incubado a 28°C, contendo tampão MES 0,085 M pH 6,5, tiamina pirofosfato 0,5 mM, MgCl₂ 0,5 mM, NADH 0,15 mM, 14 unidades de ADH e piruvato de sódio 10 mM.

Gel de atividade da ADH

A eletroforese foi realizada pelo método PAGE não-desnaturante em gel de poliacrilamida a 7%. Os extratos foram quantificados e 15 µg de proteína foram aplicadas em cada canaleta. O tampão de corrida utilizado foi tris-glicina pH 8,3 e a corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical, a 4°C e voltagem constante, a 100 V, por, aproximadamente, 4 horas. Terminada a corrida, os géis foram incubados, no escuro, a 30°C em uma solução de Tris-HCl, 0,1M, pH 7,5 contendo NAD⁺, PMS, MTT e etanol, conforme Alfenas (2006).

3.7 Análise de isoflavonas

Extração: amostras de 100 mg de grãos moídos foram colocadas em tubos de ensaio contendo 4 ml de etanol 70% e 0,1% de ácido acético, e deixadas em temperatura ambiente por 1 hora, sob agitação constante. Após a extração, 1,5 ml do extrato foi centrifugado, a 14.000 rpm, por 15 minutos, a 5°C. Em seguida, foram transferidas 500µL do extrato para tubos do autoinjeter de amostras do cromatógrafo líquido, e 20µL do extrato foram utilizados para a análise de quantificação das isoflavonas.

Análise em HPLC: a separação e a quantificação das isoflavonas foram realizadas de acordo com a metodologia preconizada por Berhow (2002), em cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo 2690, com injetor automático de amostras. Utilizou-se, para tanto, uma coluna de fase reversa do tipo ODS C18

(YMC Pack ODS-AM Column), com 250 mm de comprimento x 0,4 mm de diâmetro interno e partículas de 5µm.

Para a separação das isoflavonas, adotou-se o sistema de gradiente linear binário, tendo como fases móveis: 1) metanol contendo 0,025% de ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A) e 2) água destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% de TFA (solvente B). A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A, que, aos 40 minutos, atingiu a concentração de 100% para, em seguida, retornar a 20%, aos 41 minutos e permanecer nessas condições até os 60 minutos. Portanto, o tempo total de corrida para cada amostra foi de 60 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/min e a temperatura, durante a corrida, de 25°C. Para a detecção das isoflavonas, foi utilizado o detector de arranjo de foto diodo da marca Waters, modelo 996, ajustado para o comprimento de onda igual a 260 nm. Para a identificação dos picos correspondentes a cada uma das isoflavonas, foram utilizados padrões de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína, da marca Sigma, solubilizados em metanol (grau HPLC), nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL, 0,0125 mg/mL, 0,0250 mg/mL, 0,0500 mg/mL e 0,1000 mg/mL. Para a quantificação das 12 formas de isoflavonas, por padronização externa (área dos picos), foram utilizados os padrões como referência, bem como o coeficiente de extinção molar de cada uma delas para o cálculo das outras formas (malonil e acetil).

O experimento foi realizado em esquema de blocos ao acaso, com três repetições e os resultados foram avaliados por análise de variância (ANAVA) e teste de Tukey quando adequado, utilizando-se o programa de análise estatística Sisvar (Ferreira, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises na planta

A resposta das cultivares de soja ao alagamento variou de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta e do órgão analisado (Figuras 1 e 2). Para a cultivar BRS 267, o alagamento promoveu diminuição no conteúdo de matéria seca no estágio V6 para folha, no estágio V8 para os três órgãos em estudo e R4 para a raiz. A cultivar BRS 257 apresentou queda na matéria seca de folha, caule e raiz apenas no estágio V6. A matéria seca das folhas e raízes da BRS 213 diminuiu no estágio V6, tendo, no estágio V8, a matéria seca de raiz aumentado nas plantas submetidas ao estresse.

Estes resultados revelaram que, de maneira geral, o alagamento das plantas influenciou negativamente o crescimento das cultivares de soja. Este resultado também foi obtido por Bacanamwo & Purcell (1999), que observaram diminuição na matéria seca total de plantas com 14 dias de alagamento, em relação às plantas controle.

Um fator importante a ser considerado na avaliação do nível de tolerância da soja ao alagamento é a produção de matéria seca. Pires et al. (2002) verificaram diferença na matéria seca de raiz entre plantas alagadas e controle e afirmaram que as cultivares não apresentam a mesma resposta quando submetidas ao estresse pela falta de oxigênio. Rhine (2006) observou que todas as cultivares se recuperaram vegetativamente depois do alagamento. No entanto, as plantas foram mais tolerantes ao estresse aplicado no estágio vegetativo do que aquele aplicado no estágio reprodutivo, tendo a menor tolerância sido observada nas plantas alagadas no estágio R5.

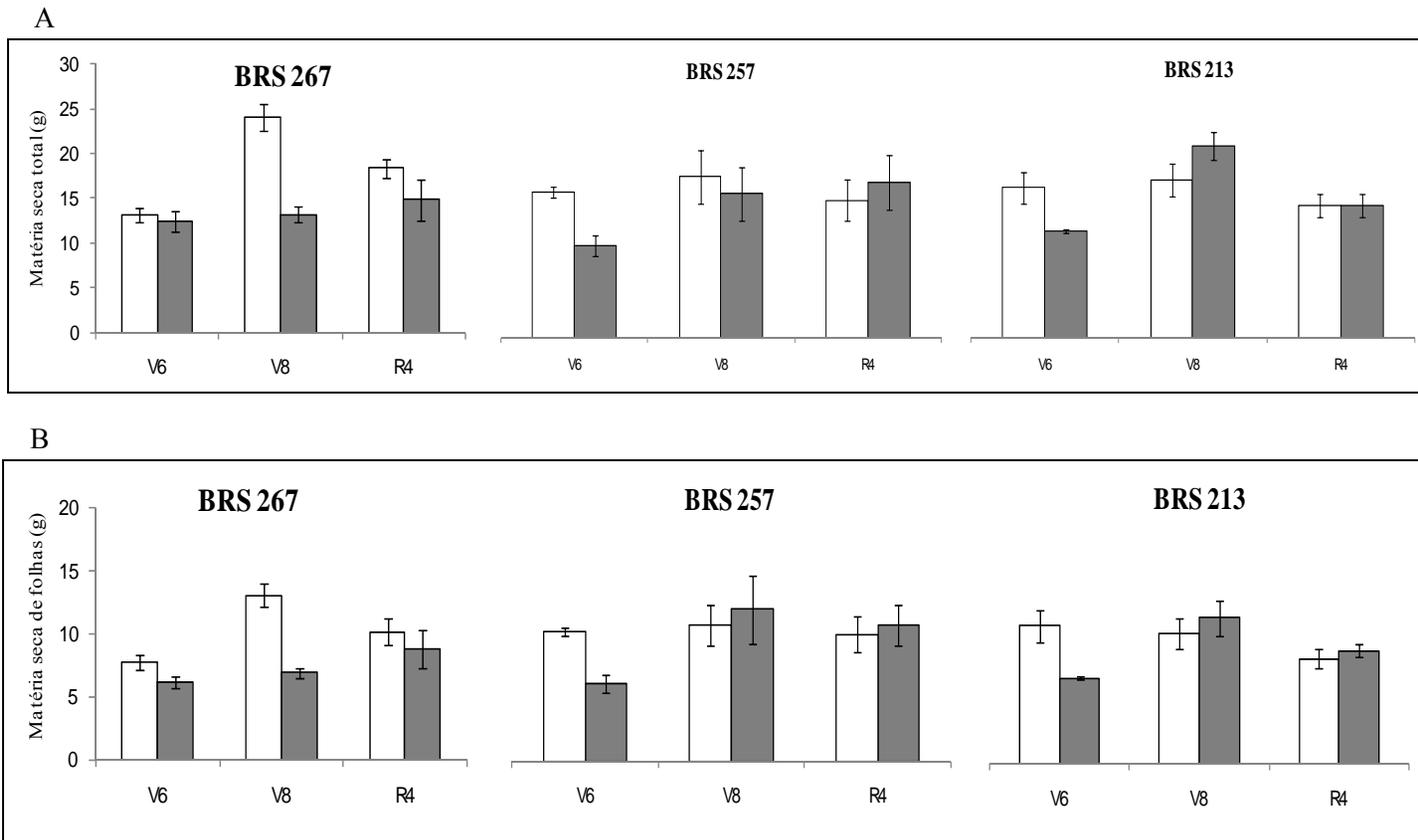


FIGURA 1. Matéria seca total (A) e matéria seca de folhas (B) de três cultivares de soja. Controle (□) e alagadas (■) nos estádios V6, V8 e R4. Barras representam o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2008.

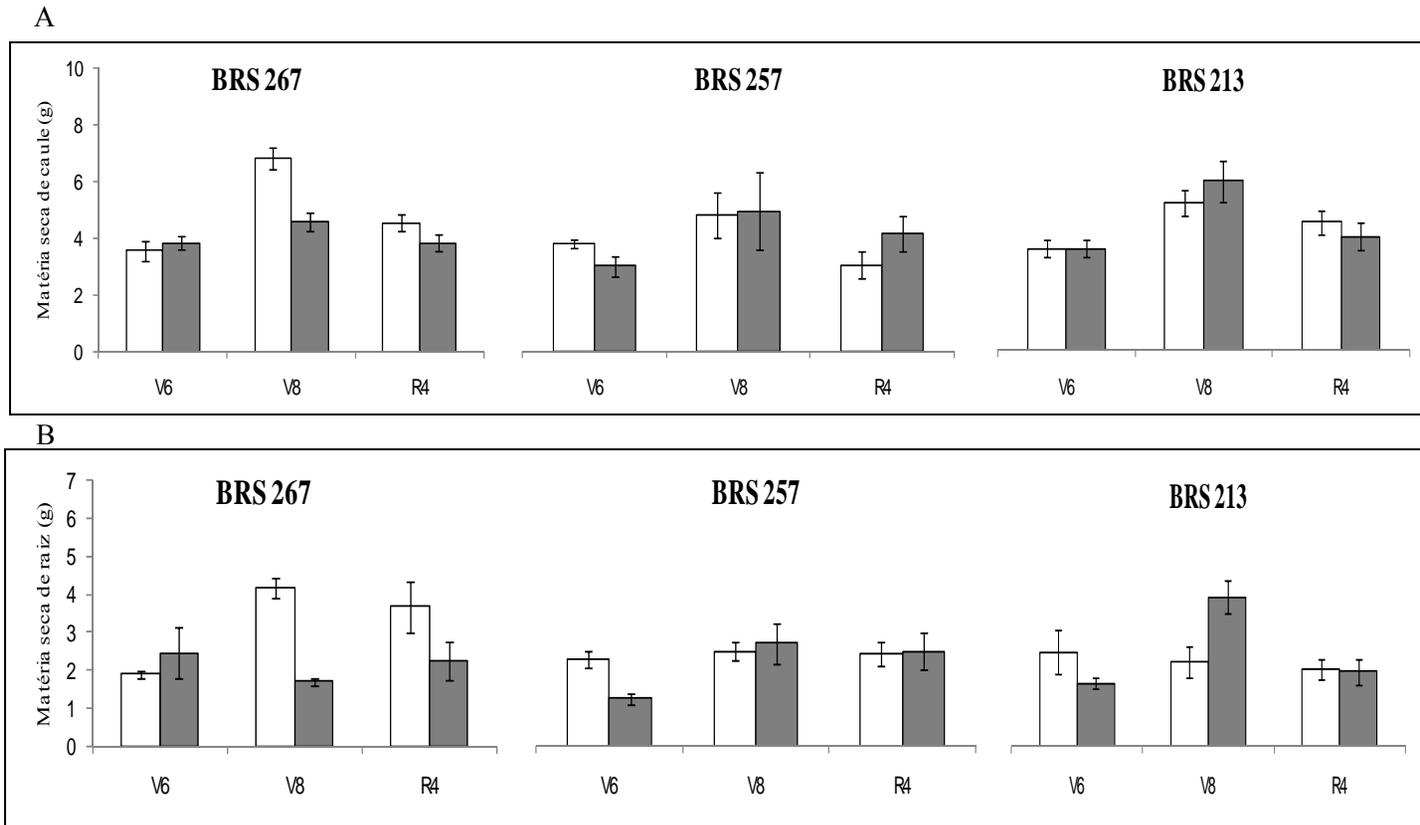


FIGURA 2. Matéria seca de caule (A) e matéria seca de raiz (B) de três cultivares de soja. Controle (□) e alagadas (■) nos estádios V6, V8 e R4. Barras representam o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Quando se comparam as três cultivares em estudo, verifica-se que a cultivar de soja BRS 213 foi a mais tolerante ao alagamento, uma vez que apresentou, em média, o menor decréscimo de matéria seca, 2,4%, em relação ao controle não alagado. Para este genótipo, vale destacar que, no estágio V8, o alagamento promoveu resposta positiva no crescimento radicular das raízes em 21%, resultado observado também por Pires et al. (2002), que estudaram duas cultivares de soja alagadas por 21 dias. No último estágio (R4), não houve variação entre o crescimento dos órgãos de plantas alagadas e não alagadas. A cultivar BRS 257 ficou na posição intermediária, decrescendo em 5% a matéria seca sob estresse e a BRS 267 foi a mais sensível, diminuindo sua massa seca total em 27 %.

Os principais efeitos do alagamento no solo foram verificados nas raízes das plantas, as quais apresentam mudanças anatômico-morfológicas para se adaptarem ao ambiente de hipoxia (Pires et al., 2002; Boru et al., 2003.) Acredita-se que esta adaptação à falta de oxigênio prolongada seja devido a mecanismos, como o crescimento de raízes laterais, o surgimento de raízes adventícias e a formação de aerênquima, ocorrendo também formação de rachaduras no caule que resultaram em hipertrofia.

Boru et al. (2003) também observaram que as plantas sobrevivem a duas semanas sem oxigênio, mostrando-se muito tolerantes ao excesso de água e de anaerobiose, o que sugere que as plantas de soja não são susceptíveis em situação de solo alagado.

Quanto à matéria seca dos grãos, as três cultivares do tratamento controle apresentaram produções semelhantes (Figura 3A). No entanto, quando as plantas foram submetidas ao alagamento, comparativamente ao controle, apresentaram diferentes respostas, dependendo do estágio no qual foram submetidas ao estresse. Quando as plantas foram alagadas no estágio V6, a cultivar que mais se destacou foi a BRS 267. As demais, além da menor

produção, quando alagadas, apresentaram-se inferiores aos seus respectivos controles. No estádio V8, BRS 213 mostrou maior produção, quando alagada. BRS 267 e BRS 257 tiveram produção reduzida, inclusive em relação ao controle. Para o estádio R4, apesar de nenhuma cultivar sob alagamento ter produzido menos que o seu respectivo controle, verificou-se superioridade de produção da cultivar BRS 257.

No entanto, em um estudo com plantas de soja expostas ao estresse por saturação hídrica do solo, Schoffel et al. (2001) observaram que, a partir do estádio V6, as plantas apresentaram maior produção em relação ao alagamento aplicado nos outros estádios. Segundo Cho & Yamakawa (2006) e Cho et al. (2006), a acumulação de biomassa é reduzida pelo período de alagamento em soja, e o estresse pela falta de oxigênio diminui a fotossíntese e o rendimento de grãos.

Uma boa produtividade depende de um grande aporte de carboidratos das folhas até os grãos que, por sua vez, é dependente de uma eficiente fotossíntese, garantida com um bom enfolhamento das plantas. No caso deste estudo, verifica-se que, para cada estádio de desenvolvimento, a cultivar que mais investiu no crescimento vegetativo, quando em situação de alagamento, apresentou, no final do seu ciclo, maior produção de grãos. Assim, as cultivares BRS 267, BRS 213 e BRS257, que mais se destacaram na produção de grãos (Figura 3A), quando o alagamento ocorreu nos estádios V6, V8 e R4, respectivamente, foram as mesmas que apresentaram maior grau de enfolhamento quando alagadas nestes mesmos estádios (Figura 1B).

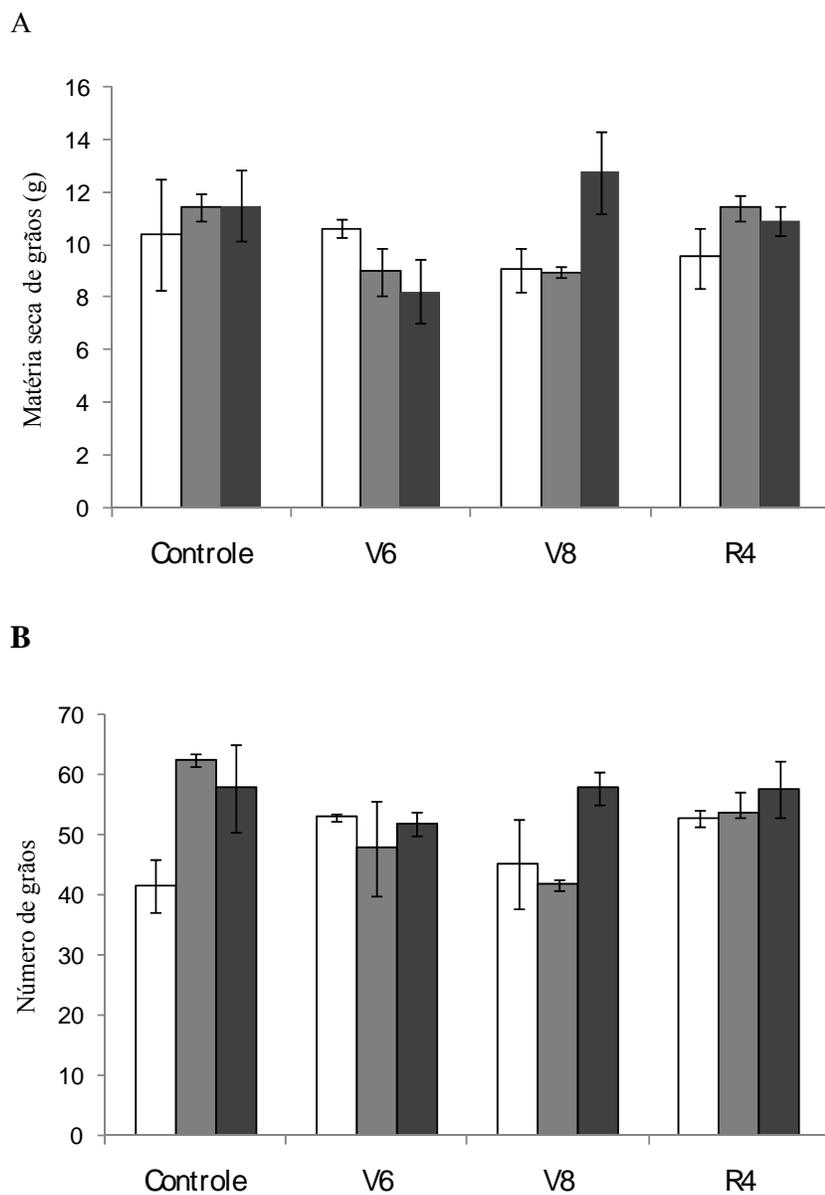


FIGURA 3. Matéria seca de grãos (A) e número de grãos (B). BRS 267 (□); BRS 257 (■) e BRS 213 (■), alagadas nos estádios V6, V8 e R4. Barras representam o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Estes resultados sugerem, para estas cultivares, a existência de boa relação fonte e dreno em que, por meio do número de grãos (Figura 3B), pode-se observar que as maiores produções foram decorrentes de grãos maiores.

Apesar de a fotossíntese não ter sido mensurada, a análise de carboidratos revela que este processo estava sendo operado em taxas satisfatórias. Verifica-se que, de maneira geral, todas as cultivares apresentaram, nas folhas, maiores teores de amido (Figura 4A) e de açúcares solúveis totais (Figura 5A), sob condições de alagamento. Nas raízes, apesar de pequenas variações, os valores das concentrações de amido não foram muito discrepantes entre plantas alagadas e controle (Figura 4B). Já para os açúcares solúveis totais radiculares (Figura 5B), não foi observado um padrão regular entre plantas alagadas e controle, nos diferentes estádios.

Variações nas concentrações desses açúcares podem ser atribuídas a diferentes graus de degradação de amido, translocação para as raízes, alocação dos carbonos em matéria seca e aproveitamento no metabolismo respiratório, dependentes da idade da planta.

Os resultados sugerem que o alagamento do solo causa redução na taxa de translocação de carboidratos das folhas para as raízes e diminuição do crescimento e das atividades metabólicas das raízes, que passam a demandar menor quantidade de carboidratos. Desse modo, tais transformações podem provocar acúmulo de fotossintatos nas folhas, na forma de amido (Liao & Lin, 2001; Dias-Filho, 2005).

O que se verifica é que as cultivares BRS 267, BRS 213 e BRS 257, que apresentaram maiores produções (Figura 3) e maior enfolhamento (Figura 1B), quando alagadas nos estádios V6, V8 e R4, respectivamente, foram as mesmas que apresentaram, nas folhas, maiores teores de amido (Figura 4A) e açúcares solúveis totais (Figura 5A). A translocação de açúcares solúveis das folhas para as raízes é bastante afetada pelo alagamento e é reduzida em numerosas espécies

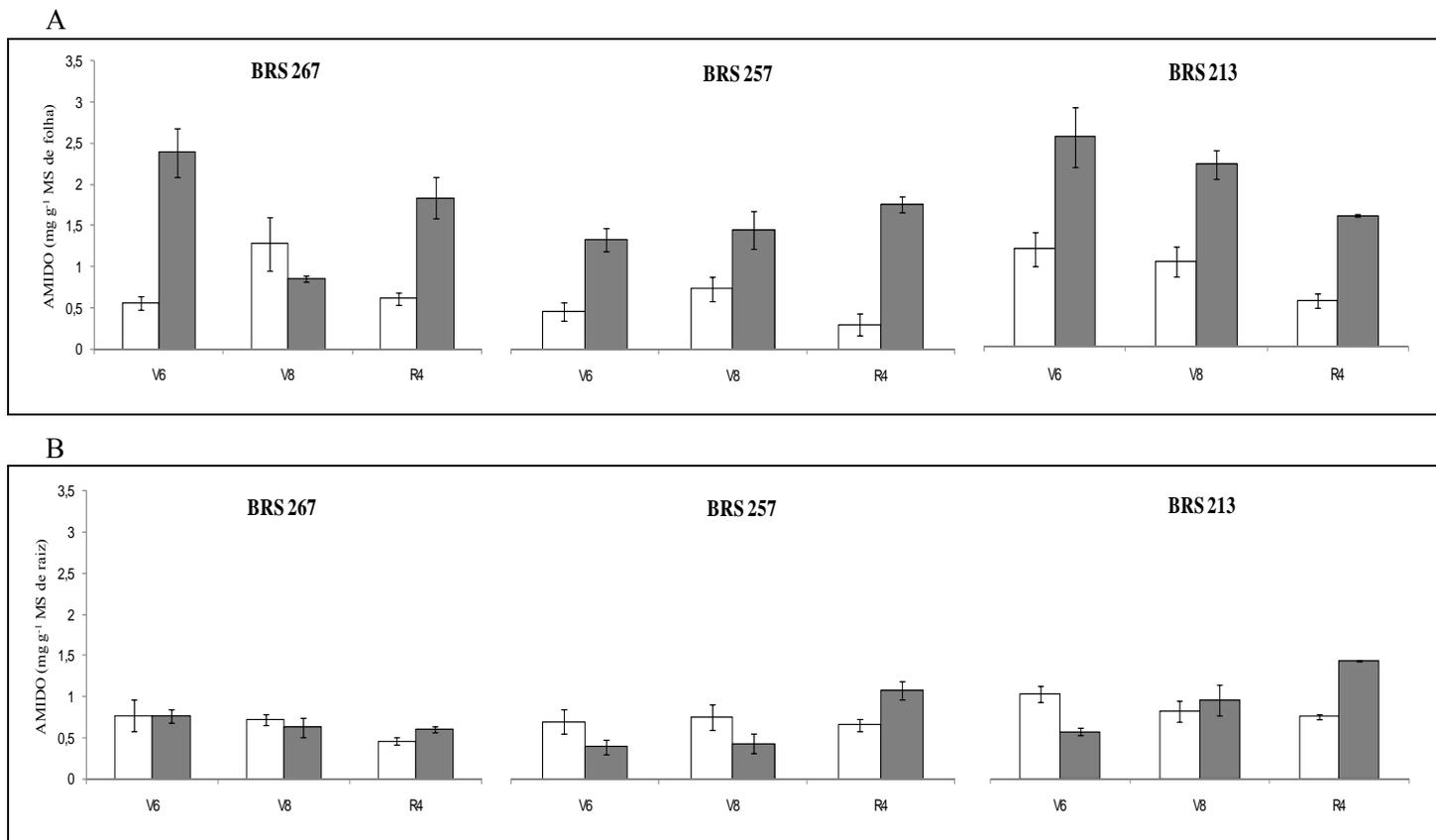


FIGURA 4. Teor de amido em folhas (A) e raízes (B) de três cultivares de soja. Controle (□) e alagadas (■) nos estádios V6, V8 e R4. A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2008.

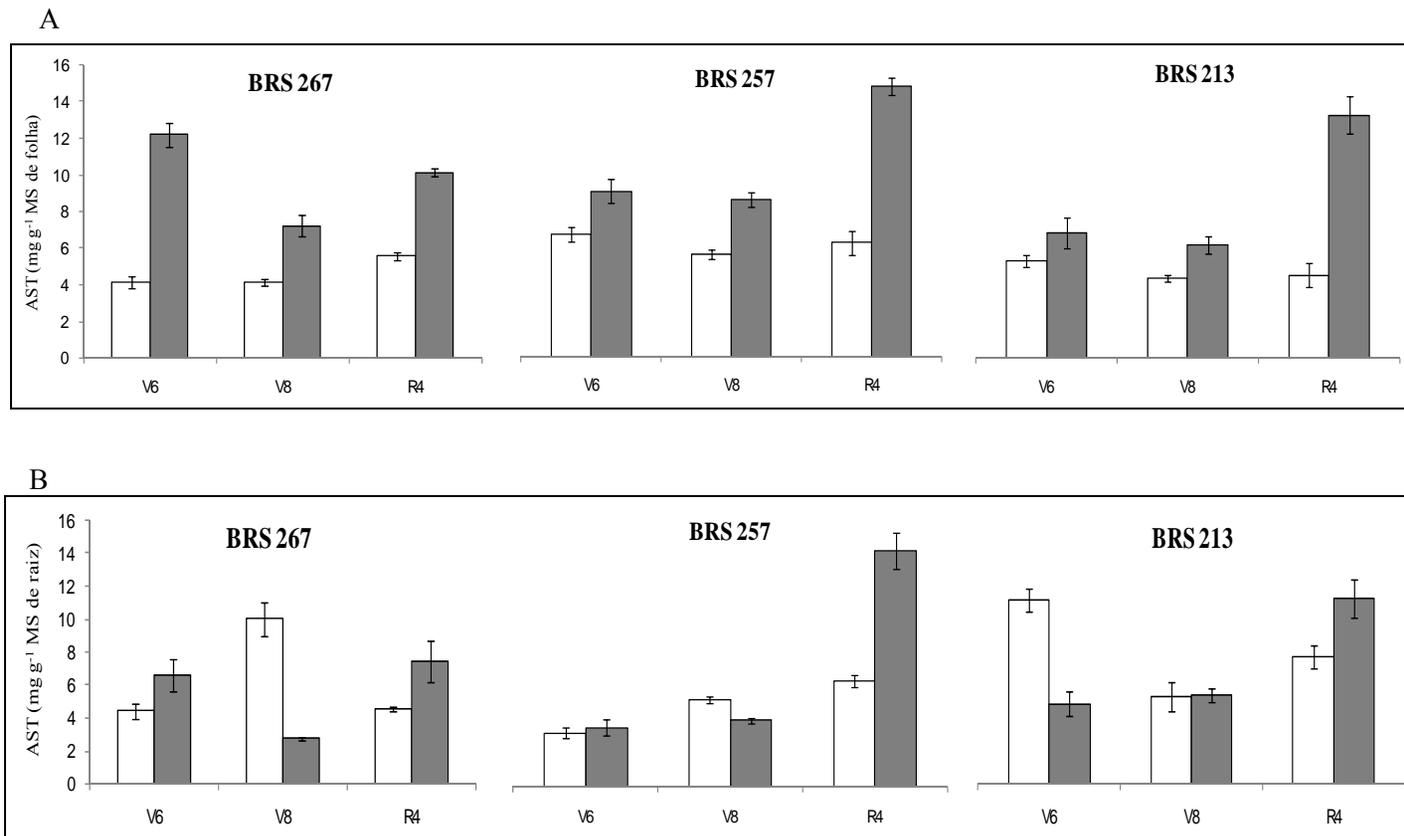


FIGURA 5. Teor de açúcares solúveis totais em folhas (A) e raízes (B) de três cultivares de soja. Controle (□) e alagadas (■) nos estádios V6, V8 e R4. A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2008.

não-tolerantes. Desse modo, os açúcares solúveis produzidos na fotossíntese tendem a se acumular nas folhas e não são translocados para as raízes, onde são necessários para manter a via glicolítica em funcionamento. Portanto, a maior disponibilidade de substrato respiratório, como a glicose, pode ser determinante na sobrevivência dos tecidos das raízes em ambientes anóxicos (Drew, 1997; Vartapetian & Jackson, 1997; Amarante & Sodek, 2006).

A respiração anaeróbica é muito menos eficiente do que a aeróbica na produção de ATP por molécula de glicose utilizada. Sendo assim, Vartapetian & Jackson (1997) afirmam que os tecidos das raízes necessitam de grandes quantidades de açúcares para que possa ser gerado ATP suficiente para manter as células funcionando em condições anóxicas.

A análise dos crescimentos vegetativo e reprodutivo das cultivares submetidas ao alagamento temporário das raízes, em diferentes estádios de desenvolvimento, revelou que, apesar dos diferentes graus de tolerância entre elas, todas conseguiram crescer e produzir sementes. Isso mostra que as plantas, de alguma maneira, desenvolveram mecanismos de sobrevivência ao alagamento. Segundo Sousa & Sodek (2002), as plantas respondem a condições anaeróbicas por meio de mudanças na expressão de genes. Juntamente com a piruvato descarboxilase (PDC), a indução da álcool desidrogenase (ADH) é associada com a capacidade de sobrevivência das plantas sob anoxia. Preiszner et al. (2001) afirmam que o gene da ADH em plantas é induzido pela hipoxia ou anoxia e também pelo calor, desidratação e frio. Eles relatam a seqüência e a estrutura do promotor da ADH em soja e perceberam que ele é induzido pela anoxia, mas não responde ao frio ou a algum fermento. Assim, a hipoxia induz a expressão de genes necessários para melhorar a tolerância das plantas ao estresse pelo alagamento.

Desse modo, um dos mecanismos de tolerância a hipoxia é a ativação ou a síntese de polipeptídios anaeróbicos. Para testar esta hipótese foi verificada,

nas raízes, a atividade das enzimas álcool desidrogenase (Figura 6A), piruvato descarboxilase (Figura 6B) e lactato desidrogenase (Figura 7A). Todas as cultivares apresentaram maior atividade radicular das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, quando submetidas ao alagamento. Esta última revelada também por análise em gel de poliacrilamida (Figura 8). Esse mesmo padrão de resposta, de maneira geral, não foi observado para a enzima lactato desidrogenase. O teor de proteínas nas raízes das três cultivares de soja em estudo mostrou-se, de maneira geral, maior nas plantas alagadas em relação a seus controles (Figura 7B).

Na ausência de oxigênio, cessam o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, o ciclo do ácido tricarboxílico não pode operar e o ATP pode ser produzido apenas por fermentação. Assim, as raízes, primeiramente, começam a fermentar piruvato a lactato, pela ação da lactato desidrogenase (LDH). Em um pH ácido, a LDH é inibida e a piruvato descarboxilase é ativada, produzindo acetaldeído que é, por sua vez, reduzido a etanol pela álcool desidrogenase. Essa modificação da rota ocorre por causa dos diferentes ótimos de pH das enzimas citosólicas envolvidas. Ou seja, a PDC e a ADH catalisam a descarboxilação do piruvato a acetaldeído e a redução do acetaldeído a etanol, com oxidação do NADH (Kimmerer, 1987).

Este mesmo autor observou que a ADH foi induzida pela hipoxia nas raízes de soja e de algodão que, após um período sob borbulho, reduziu a fermentação, pois diminuiu os níveis de acetaldeído e etanol. Kato-Noguchi (2007), em estudo com arroz, observou aumento não significativo na atividade da LDH em plantas com 48 horas de anoxia. No entanto, o estresse aumentou a atividade da ADH nas cultivares. A vantagem da indução da ADH em anoxia foi mencionada como sendo a aceleração da rota etanólica da fermentação, que foi também apoiada por estudos com ADH em milho e em *arabidopsis* (Johnson et al., 1994; Ellis et al., 1999).

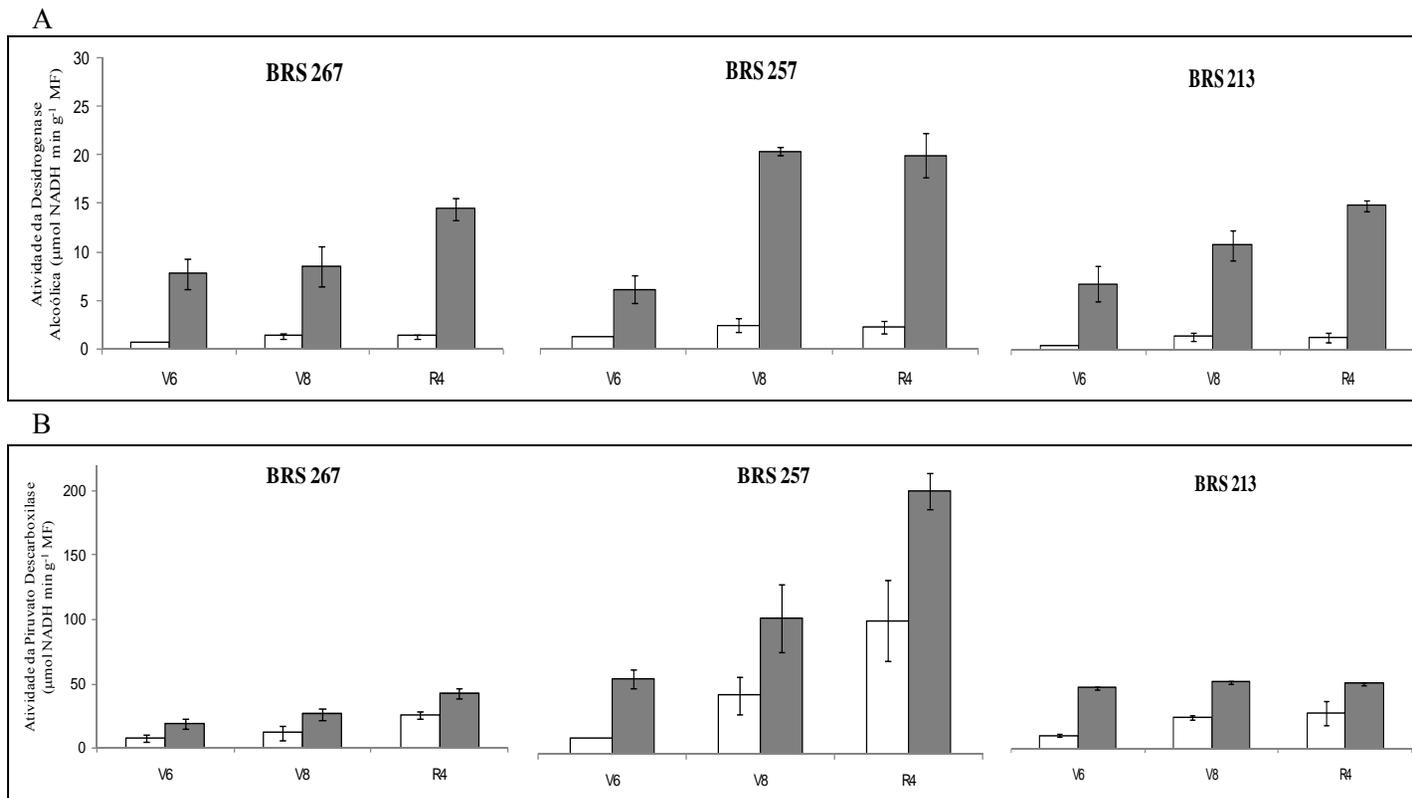


FIGURA 6: Atividade da desidrogenase alcoólica (A) e piruvato descarboxilase (B), em raízes de três cultivares de soja. Controle (□) e alagadas (■) nos estádios V6, V8 e R4. A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2008.

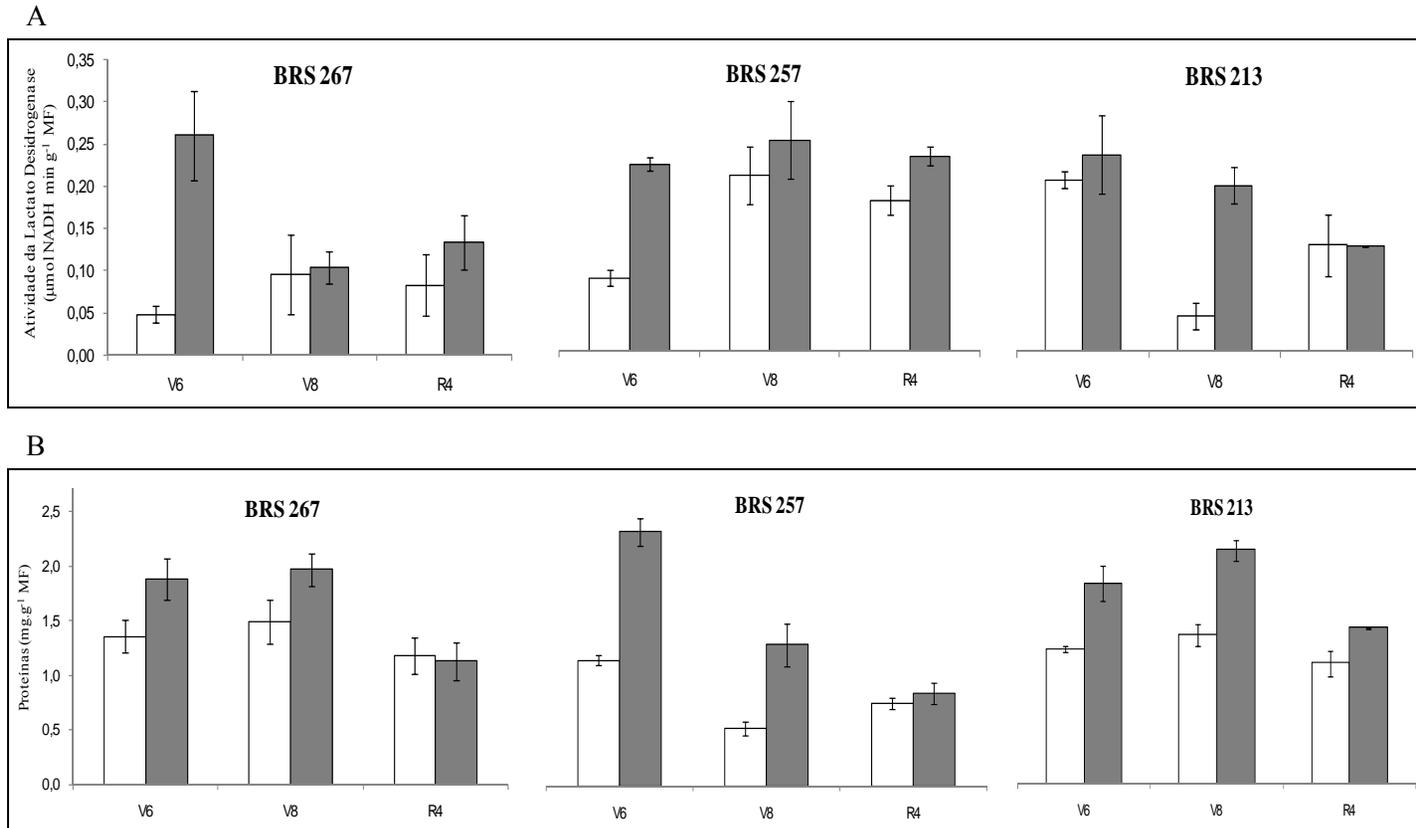


FIGURA 7. Atividade da lactato desidrogenase (A) e teor de proteínas (B), em raízes de três cultivares de soja. Controle (□) e alagadas (■) nos estádios V6, V8 e R4. A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2008.

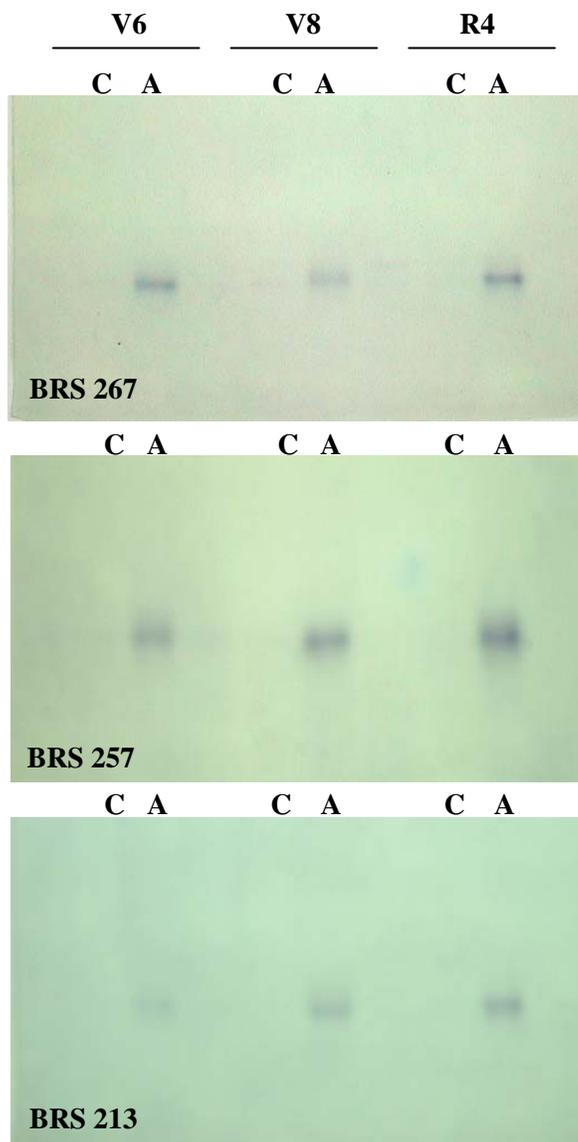


FIGURA 8: Gel de atividade da desidrogenase alcoólica de raízes de três cultivares de soja. C = controle e A = alagada nos estádios V6, V8 e R4. UFLA, Lavras, MG, 2008.

4.2 Análises no grão

As proteínas nos grãos (Figura 9) apresentaram, para a cultivar BRS 267, em todos os estádios de desenvolvimento, menores teores quando submetidas ao alagamento. Por outro lado, as cultivares BRS 257 e BRS 213, quando alagadas, diferiram do seu controle apenas no estágio R4, apresentando maior teor na primeira e menor na segunda, respectivamente. Apesar de comprovadamente existir uma relação inversa entre os teores de ácidos graxos e concentração de proteínas em sementes de soja, estes fatores são herdados como características quantitativas e sofrem grande influência do meio ambiente (Santos, 2006).

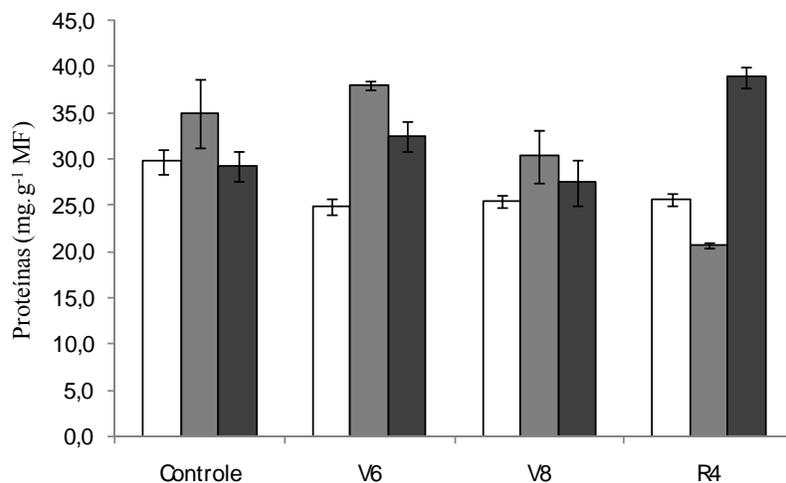


FIGURA 9: Teor de proteínas totais em grãos de soja. BRS 267 (□); BRS 257 (■) e BRS 213 (■), alagadas em três estádios V6, V8 e R4. A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Dados encontrados na literatura indicam que a concentração de proteínas é aumentada sob altas temperaturas (Dwivedi et al., 1996). Os fatores genéticos e a temperatura durante o período reprodutivo afetam também os teores de óleo

nos grãos (Oliva et al., 2006). Apesar do controle genético, a concentração de proteínas da soja é influenciada pela disponibilidade de nitrogênio. Como o nitrogênio da fixação simbiótica vai para a formação da semente, a maximização do processo de fixação pode contribuir com uma maior concentração de nitrogênio e, conseqüentemente, de proteínas nos grãos de soja (Ávila et al., 2007). Os teores de proteínas das sementes de soja são também influenciados pelo ambiente, principalmente durante o período de enchimento dos grãos.

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida revelou que as três cultivares apresentaram, em todos os estádios de desenvolvimento, o mesmo padrão de bandas relativas às proteínas totais, independentemente do tratamento (Figura 10), padrão também observado por Pinto et al. (1995). Pode-se observar também a presença das enzimas ADH em todas as cultivares e da lipoxigenase na BRS 267. As cultivares BRS 257 e BRS 213 não apresentam as enzimas lipoxigenases (LOX), podendo, então, prevenir o desenvolvimento do sabor desagradável observado em produtos de soja.

O alagamento, além de ter provocado alterações morfológicas e bioquímicas nas plantas, provocou alterações quantitativas e qualitativas na composição bioquímica do grão. Em relação às isoflavonas, verificam-se alterações em sua concentração nas três cultivares (Tabela 1). Na cultivar BRS 267, o alagamento promoveu aumento apenas no estágio R4, não diferindo nos outros estádios. Nas outras cultivares, independentemente do estágio em que os estresse foi aplicado, o teor de isoflavonas permaneceu constante. Segundo Cadwell et al. (2004) e Lozovaya et al. (2005), ocorre um aumento mínimo no conteúdo de isoflavonas entre os tratamentos. Ao comparar os teores de isoflavonas das três cultivares, em cada tratamento, observou-se que a cultivar BRS 267 apresentou as menores concentrações para as plantas alagadas, nos três

estádios. BRS 257 e BRS 213 não diferiram nos estádios V6 e R4, tendo a primeira sido superior no estágio V8.

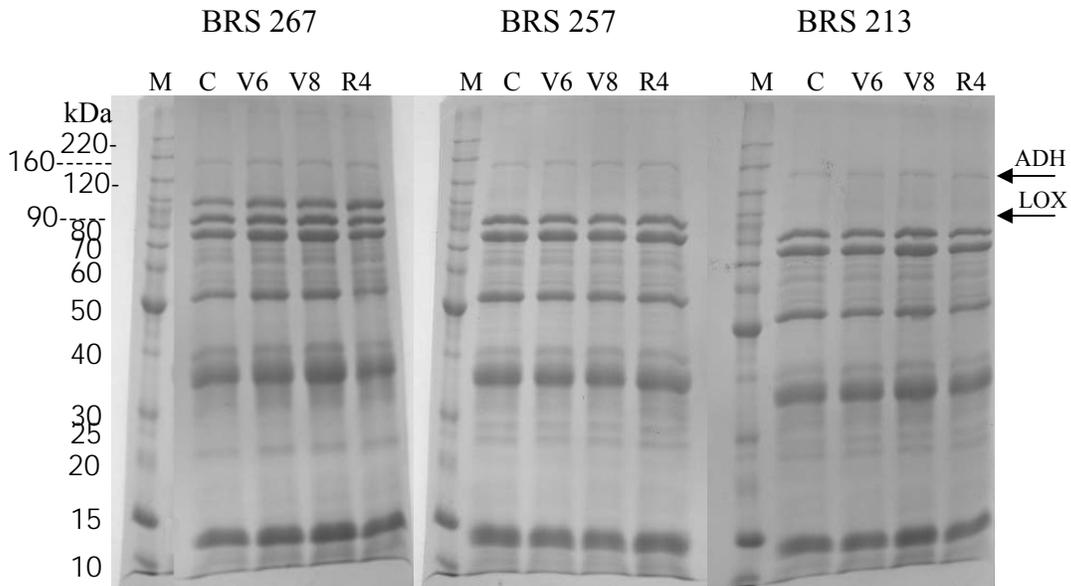


FIGURA 10: Análise eletroforética SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5% de proteínas extraídas dos grãos de três cultivares de soja alagadas nos estádios V6, V8 e R4. Marcador (M); Controle (C). UFLA, Lavras, MG, 2008.

TABELA 1. Concentração de isoflavonas totais em grãos de soja, com e sem inundação.

Total ISF (mg IF 100g⁻¹ amostra)				
Tratamentos				
	Controle	V6	V8	R4
BRS 267	503,3 Ba*	373,3 Bb	361,0 Bc	678,0 Ab
BRS 257	602,0 Aa	654,6 Aa	671,0 Aa	708,6 Aa
BRS 213	619,6 Aa	649,3 Aa	505,3 Ab	526,6Aa

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, $p < 0,05$, pelo teste de Tukey. Maiúsculas comparam tratamentos em cada cultivar e minúsculas comparam cultivares em cada tratamento.

As variações na concentração total destes isoflavonóides foram decorrentes de variações individuais de cada um dos tipos estudados. Para a cultivar BRS 267, o aumento na concentração total das isoflavonas no estádio R4 foi devido à daidzina (Tabela 2), à genistina (Tabela 3), à malonil daidzina (Tabela 4) e à malonil genistina (Tabela 5) e a diminuição, em relação às outras cultivares, foi devido, principalmente, à malonil daidzina (Tabela 4).

Estudos afirmam que diferentes teores de isoflavonas são encontrados para cada cultivar, isso porque são geneticamente determinados, podendo ser afetados pelo meio ambiente (Graham, 1991; Carrão-Panizzi et al., 1999; Park et al., 2001; Carrão-Panizzi et al., 2003; Bennett et al., 2004; Ribeiro et al., 2007). Desse modo, Pinto et al. (2005) afirmam que valores elevados de temperatura e umidade relativa tendem a diminuir a quantidade de formas malonil, formando glicosídeos e agliconas.

TABELA 2. Concentração de daidzina em grãos de soja, com e sem inundação.

Daidzina (mg IF 100g⁻¹ amostra)				
Cultivares	Tratamentos			
	Controle	V6	V8	R4
BRS 267	22,60 Ba*	19,30 Bb	24,70 Ba	43,20 Aa
BRS 257	27,09 Aa	29,75 Aab	34,90 Aa	39,70 Aa
BRS 213	20,05 Aa	32,90 Aa	22,54 Aa	26,96 Ab

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, $p < 0,05$, pelo teste de Tukey. Maiúsculas comparam tratamentos em cada cultivar e minúsculas comparam cultivares em cada tratamento.

TABELA 3. Concentração de genistina em grãos de soja, com e sem inundação.

Genistina (mg IF 100g⁻¹ amostra)				
Cultivares	Tratamentos			
	Controle	V6	V8	R4
BRS 267	28,10 Ba*	24,40 Ba	26,20 Ba	45,90 Aa
BRS 257	24,10 Aa	29,60 Aa	31,20 Aa	35,30 Ab
BRS 213	25,39 Aa	27,54 Aa	21,07 Aa	25,71 Ab

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, $p < 0,05$, pelo teste de Tukey. Maiúsculas comparam tratamentos em cada cultivar e minúsculas comparam cultivares em cada tratamento.

TABELA 4. Concentração de malonil daidzina em grãos de soja, com e sem inundação.

Malonil daidzina (mg IF 100g⁻¹ amostra)				
Cultivares	Tratamentos			
	Controle	V6	V8	R4
BRS 267	142,00 ABb*	86,30 Bb	94,20 Bb	190,90 Ab
BRS 257	202,90 Aa	213,50 Aa	222,40 Aa	246,70 Aa
BRS 213	215,70 Aa	231,13 Aa	190,98 ABa	158,86 Bb

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, p<0,05, pelo teste de Tukey. Maiúsculas comparam tratamentos em cada cultivar e minúsculas comparam cultivares em cada tratamento.

TABELA 5. Concentração de malonil genistina em grãos de soja, com e sem inundação.

Malonil genistina (mg IF 100g⁻¹ amostra)				
Cultivares	Tratamentos			
	Controle	V6	V8	R4
BRS 267	250,1 Aa*	151,90 Bb	172,30 Bb	322,40 Aa
BRS 257	260,1 Aa	309,20 Aa	307,10 Aa	294,60 Aa
BRS 213	310,8 Aa	308,10 Aa	221,66 Bb	247,31 ABb

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, p<0,05, pelo teste de Tukey. Maiúsculas comparam tratamentos em cada cultivar e minúsculas comparam cultivares em cada tratamento

Uma vez que os tipos de isoflavonas encontradas em maior quantidade no grão são de glicosiliso flavonas, é necessária a conversão dessas formas para agliconas, pois estas resultam em quantidades maiores de compostos benéficos à saúde humana. Segundo Grun et al. (2001), em produtos derivados de grãos de soja, como tofu, quando submetidos a determinados tratamentos térmicos, as formas malonil sofrem biotransformações e se tornam agliconas, aumentando, assim, os teores de componentes responsáveis pelos efeitos funcionais. Com isso, a isoflavona genisteína (Tabela 6), principal responsável pelo efeito nutracêutico da soja, não apresentou, neste estudo, seus teores mais elevados devido, provavelmente, ao processo de extração e quantificação padrão utilizado no Centro Embrapa Soja-Londrina, PR. Neste Centro, o protocolo não submete o extrato a nenhum tratamento térmico.

Desse modo, vários autores relatam que os níveis de isoflavonas agliconas aumentam devido ao processamento e os teores de formas malonil reduzem pela clivagem dos grupos ésteres e pelo calor a que é submetido o extrato (Kudou et al., 1991; Park et al., 2001; Park et al., 2002; Carrão-Panizzi et al., 2003; Lui et al., 2003; Chiari et al., 2004; Góes-Favoni et al., 2004; Ciabotti et al., 2006).

TABELA 6. Concentração de genisteína em grãos de soja, com e sem inundação.

Genisteína (mg IF 100g⁻¹ amostra)				
Tratamentos				
	Controle	V6	V8	R4
BRS 267	1,42 Ba*	4,57 Aa	ND Ba	ND Bb
BRS 257	1,24 Aa	0,96 Ab	0,93 Aa	1,33 Aa
BRS 213	1,69 Aa	0,98 Ab	1,24 Aa	2,40 Aa

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, $p < 0,05$ pelo teste de Tukey. Maiúsculas comparam tratamentos em cada cultivar e minúsculas comparam cultivares em cada tratamento. ND = Não Detectado.

5 CONCLUSÃO

As cultivares BRS 267, BRS 213 e BRS257 apresentaram maior crescimento vegetativo, maior produção de grãos, maiores teores de amido e açúcares solúveis totais nas folhas, quando o alagamento ocorreu nos estádios V6, V8 e R4, respectivamente.

BRS 213 foi a que apresentou a maior tolerância ao alagamento.

Todas as cultivares apresentaram maior atividade das enzimas álcool desidrogenase e piruvato descarboxilase, em relação ao controle, quando submetidas ao alagamento, nos três estádios de desenvolvimento.

O alagamento promoveu aumento nos teores totais de isoflavonas nas plantas alagadas no estágio R4 da cultivar BRS 267, permanecendo constante nas demais cultivares.

A cultivar BRS 213 foi a que apresentou maiores teores de isoflavona genisteína, em relação às outras duas cultivares.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa, Ed. UFV, 2006. 627 p.

ALMEIDA, A. M.; VRIEZEN, W. H.; STRAETEN, D. Molecular and Physiological mechanisms of flooding avoidance and tolerance in rice. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 50, n. 6, p. 743-751, Nov./Dec. 2003.

AL-TAWAHA, A. M.; SEGUIN, P. Effects of seeding date, row spacing, and weeds on soybean seed isoflavone concentration. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 86, n. 4, p. 1079-1082, Oct. 2006.

AL-TAWAHA, A. M.; SEGUIN, P.; SMITH, D. L.; BONNELL, R. B. Irrigation level affects isoflavone concentration of early maturing soya bean cultivars. **Journal Agronomy & Crop Science**, Oxford, v. 193, n. 4, p. 238-246, Aug. 2007.

AMARANTE, L.; SODEK, L. Waterlogging effect on xylem SAP glutamine of nodulated soybean. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 50, n. 3, p. 405-410, Sept. 2006.

ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; MANDARINO, J. M. G.; ALBRECHT, L. P.; VIDIGAL FILHO, P. S. Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 111-127, 2007.

BACANAMWO, M.; PURCELL, L. C. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 334, p. 689-696, May 1999.

BENNETT, J. O.; OLIVER, Y.; HEATHERLY, L. G.; KRISHNAN, H. B. Accumulation of genistein and daidzein, soybean isoflavones implicated in promoting human health, is significantly elevated by irrigation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 25, p. 7574-7579, Dec. 2004.

BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. (Ed.). **Flavonoids in the living cell**. New

York: Klusher Academic, 2002. p. 61-76. (Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 505).

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 2, p. 179-194, Jan. 2003.

BORU, G.; VANTOAI, T.; ALVES, J.; HUA, D.; KNEE, M. Responses of soybean to oxygen deficiency and elevated root-zone carbon dioxide concentration. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 4, p. 447-453, Mar. 2003.

BOYDAK, E.; ALPASLAN, M.; HAYTA, M.; GERCEK, S.; SIMSEK, M. Seed composition of soybeans grown in the Harran region of Turkey as affected by row spacing and irrigation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 16, p. 4718-4720, July 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-258, 1976.

CALDWELL, C. R.; BRITZ, S. J.; MIRECKI, R. M. Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] grown in controlled environment. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 4, p. 1125-1129, Feb. 2005.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M. C. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1787-1795, out. 1999.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; SIMÃO, A. S.; KIKUCHI, A. Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, p. 897-902, ago. 2003.

CHIARI, L.; PIOVESAN, N. D.; NAOE, L. K.; JOSÉ, I. C.; VIANA, J. M. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Genetic parameters relating isoflavone and protein content in soybean seeds. **Euphytica**, Dordrecht, v. 138, n. 1, p. 55-60, 2004.

CHO, J. W.; JI, H. C.; YAMAKAWA, T. Comparison of photosynthetic response of two soybean cultivars to soil flooding. **Journal of the Faculty of Agriculture**, Kyushu University, Fukuoka, v. 51, n. 2, p. 227-232, Feb. 2006.

CHO, J. W.; YAMAKAWA, T. Effects on growth and seed yield of small seed soybean cultivars of flooding conditions in paddy Field. **Journal of the Faculty of Agriculture**, Kyushu University, Fukuoka, v. 51, n. 2, p. 189-193, Feb. 2006.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M. F. P.; MANDARINO, J. M. G.; TARONE, A. G. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 920-929, set./out. 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. SigaBrasil - Sistema de Informações Geográficas da Agricultura Brasileira. **Produção brasileira de soja**. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/conabweb/geotecnologia/sigabrasil/html_sigabrasil/mostra_imagem.php?MUNUF=../mapa_producao_agricola/soja.jpg>. Acesso em: 2 jun. 2008.

COWARD, L. BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 11, p. 1961-1967, Nov. 1993.

DANTAS, B. F.; ARAGÃO, C. A.; ALVES, J. D. Cálcio e o desenvolvimento de aerênquimas na atividade da celulose em plantulas de milho submetidas a hipoxia. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 251-257, abr./jun. 2001.

DENIS, L.; MORTON, M. S.; GRIFFITHS, K. Diet and its preventive role in prostatic disease. **European Urology**, Basel, v. 35, n. 5/6, p. 377-387, May/June 1999.

DENNIS, E. S.; DOLFERUS, R.; ELLIS, M. RAHMAN, M.; WU, Y.; HOEREN, F. U.; GROVER, A.; ISMOND, K.P.; GOOD, A. G.; PEACOCK, W.J. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 342, p. 89-97, Jan. 2000.

DIAS-FILHO, M. B. Opções forrageiras para áreas sujeitas à inundação ou alagamento temporário. In: PEDREIRA, C. G. S.; MOURA, J. C.; DA SILVA, S. C.; FARIA, V. P. **Teoria e prática da produção animal em pastagens**: anais do 22. simpósio sobre manejo da pastagem. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 71-93.

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 223-250, 1997.

- DREW, M. C.; HE, C.; MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 123-127, Mar. 2000.
- DWIVEDI, S. L.; NIGAM, S. N.; RAO, R. C. N.; SINGH, U.; RAO, K. V. S. Effect of drought on oil, fatty acids and protein contents of groundnut seeds. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 48, n. 2/3, p. 125-133, Oct. 1996.
- ELLIS, M.H.; DENNIS, E.S.; PEACOCK W.J. Arabidopsis roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, n. 1, p. 57-64, Jan. 1999.
- ESAKI, H.; ONOZAKI, H. MORIMITSU, Y.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Potent antioxidative isoflavones isolated from soybean fermented with *Aspergillus saitoi*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 62, n. 4, p. 740-746, Apr. 1998.
- ESAKI, H.; WATANABE, R.; ONOZAKI, H.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Formation mechanism for potent antioxidative *o*-dihydroxyisoflavones in soybean fermented with *Aspergillus saitoi*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, n. 5, p. 851-858, May 1999.
- ESTEVEES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 43-52, 2001.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 - sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000.
- GÓES-FAVONI, S. P.; BELÉIA, A. D. P.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 582-586, out./dez. 2004.
- GRAHAM, T. L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, n. 2, p. 594-603, Feb. 1991.
- GRUN, I. U.; ADHIKARI, K.; LI, C.; LI, Y.; LIN, B.; ZHANG, J.; FERNANDO, L. N. Hanges in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2839-2843, June 2001.
- HAN, K. K.; SOARES JÚNIOR, J. M.; HAIDAR, M. A.; GIRÃO, J. B.; NUNES, M. G.; LIMA, G. R.; BARACAT, E. C. Efeitos dos fitoestrogênios

sobre alguns parâmetros clínicos e laboratoriais no climatério. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 8, p. 547-552, set. 2002.

HANSON, A. D.; JACOBSEN, J. V.; ZWAR, J. A. Regulated expression of three alcohol dehydrogenase genes in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 75, n. 3, p. 573-581, July 1984.

HOFFMAN, N. E.; BENT, A. F.; HANSON, A. D. Induction of lactate dehydrogenase isozymes by oxygen deficit in barley root tissue. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, n. 3, p. 658-63, Nov. 1986.

JACKSON, M. B.; COLMER, T. D. Response and adaptation by plants to flooding stress. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 4, p. 501-505, Sept. 2005.

JOHNSON, J. R.; COBB, B.G.; DREW, M. C. Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of Adh1 null *Zea mays* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 1, p. 61-67, May 1994.

KATO-NOGUCHI, H. Evaluation of the importance of lactate for the activation of ethanolic fermentation in lettuce roots in anoxia. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 109, n. 1, p. 28-33, 2000.

KATO-NOGUCHI, H.; MOROKUMA, M. Ethanolic fermentation and anoxia tolerance in four rice cultivars. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, n. 2, p. 168-173, Feb. 2007.

KIMMERER, T. W. Alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase activity in leaves and roots of eastern cottonwood (*Populus deltoids* Bartr.) and soybean (*Glycine max* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 4, p. 1210-1213, Aug. 1987.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill). **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 55, n. 9, p. 2227-2233, Sept. 1991.

KURZER, M. S. Hormonal effects of soy isoflavonas: Studies in premenopausal and postmenopausal women. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 3, p. 660S-661S, Mar. 2000.

LANNA, A. C.; JOSÉ, I. C.; OLIVEIRA, M. G. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Effect of temperature on polyunsaturated fatty acid

accumulation in soybean seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 2, p. 213-222, Apr./June 2005.

LIAO, C. T.; LIN, C. H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Proceedings National Science Council**, New York, v. 25, n. 3, p.148-157, 2001.

LIGGINS, J., BLUCK, L. J. C., RUNSWICK, S., ATKINSON, C., COWARD, W.A., BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein contents of fruits and nuts. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 326-331, June 2000.

LOZOVAYA, V. V.; LYGIN, A. V.; ULANOV, A. V.; NELSON, R. L.; DAYDÉ, J.; WIDHOLM, J. M. Effect of temperature and soil moisture status during seed development on soybean seed isoflavone concentration and composition. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 5, p. 1934-1940, Sept./Oct. 2005.

LUI, M. C.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; PARK, Y. K. Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 206-212, dez. 2003. Suplemento.

MAEHLER, A. R.; COSTA, J. A.; PIRES, J. L. F.; RAMBO, L. Qualidade de grãos de suas cultivares de soja em função da disponibilidade de água no solo e arranjo de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 213-218, mar./abr. 2003.

MESSINA, M. J. Legumes and soybean: na overview of the nutritional profiles and health effects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 70, n. 3, p. 439S-450S, 1999. Supplement S.

MESSINA, M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavonas) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 36, n. 4, p. S71-S77, 2000. Supplement.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; ZILKAH, S.; BIRK, Y.; BONDI, A. Soybean isoflavones. Characterization, determination and antifungal activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 22, n. 5, p. 806-810, Sept./Oct. 1974.

OLIVA, M. L.; SHANNON, J. G.; SLEPER, D. A.; ELLERSIECK, M. R.; CARDINAL, A. J.; PARIS, R. L.; LEE, J. D. Stability of fatty acid profile in soybean genotypes with modified seed oil composition. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 5, p. 2069-2075, Sept./Oct. 2006.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Ciência y Tecnologia Alimentaria**, Reynosa, v. 3, n. 3, p. 156-160, 2001.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil- β -glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 130-135, maio/ago. 2002.

PETERSON, G.; BARNES, S. Genistein and biochanin: a inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. **The Prostate**, Birmingham, v. 22, n. 4, p.335-345, 1993.

PINTO, L. R.; SADER, R.; LEMOS, V.G.M. Identificação bioquímica de cultivares de soja (*Glycine max* L. merrill) através da eletroforese em gel de poliacrilamida. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 96-100, 1995

PINTO, M. D.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Effect of storage temperature and water activity on the content and profile of isoflavones, antioxidant activity, and in vitro protein digestibility of soy protein isolates and defatted soy flours. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 16, p. 6340-6346, Aug. 2005.

PIRES, J. L. F.; SOPRANO, E.; CASSOL, B. Adaptações morfofisiológicas da soja em solo inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 1, p. 41-50, jan. 2002.

PREISZNER, J.; VANTOAI, T. T.; HUYNH, L.; BOLLA, R. I.; YEN, H. H. Structure and activity of a soybean Adh promoter in transgenic hairy roots. **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, n. 8, p. 763-769, Dec. 2001.

RHINE, M. D. **Reaction of soybean cultivars to waterlogged soils**. 2006. 33 p. Thesis (Master of Science) - University of Missouri, Columbia.

RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPO, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 1, p. 19-24, Feb. 2007.

SÁ, J. S.; CRUCIANI, D. E.; MINAMI, K. Efeitos de inundações temporárias do solo em plantas de ervilha. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1,

p. 50-54, jan./mar. 2004.

SALLAM, A.; SCOTT, H. D. Effects of prolonged flooding on soybeans during early vegetative growth. **Soil Science**, Baltimore, v. 144, n. 1, p. 61-66, July 1987.

SANTOS, E. L. **Influência do genótipo sobre as concentrações de proteína e óleo em sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**. 2006. 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SCHOFFEL, E. R.; SACCOL, A. V.; MANFRON, P. A.; MEDEIROS, S. L. P. Excesso hídrico sobre os componentes do rendimento da cultura da soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 7-12, jan./fev. 2001.

SCOTT, H. D.; DEANGULO, J.; DANIELS, M. B.; WOOD, L. S. Flood duration effects on soybean growth and yield. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, n. 4, p. 631-636, July/Aug. 1989.

SOUSA, C. A. F.; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 14, n. 2, p. 83-94, 2002.

TIKKANEN, M. J.; WAHALA, K.; OJALA, S.; WIHMA, V.; ADLERCREUTZ, H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 6, p. 3106-3110, Mar. 1998.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 5, p. 1184-1192, May 1995.

VANTOAI, T.T.; BORU, G.; ZHANG, J. Flooding tolerance of crops. In: LAL, R. (Ed.). **Encyclopedia of soil science**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. v. 1, p. 711-713.

VARTAPETIAN, B. B.; ANDREEVA, I. N.; GENEROZOVA, I. P.; POLYAKOVA, L. I.; MASLOVA, I. P.; DOLGIKH, Y. I.; STEPANOVA, A. Y. Functional electron microscopy in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 2, p. 155-172, Jan. 2003.

VARTAPETIAN, B. B.; JACKSON, M. B. Plant adaptations to anaerobic stress. **Annals of Botany**, London, v. 79, p. 3-20, Jan. 1997. Supplement A.

VYN, T. J.; YIN, X.; BRUULSEMA, T. W.; JACKSON, C. C.; RAJCAN, I.; BROUDER, S. M. Potassium fertilization effects on isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) merr.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 12, p. 3501-3506, June 2002.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.