



NILMA PORTELA OLIVEIRA

**VARIAÇÃO GENOTÍPICA ENVOLVENDO Fe,
Zn E FITATOS EM SOJA VISANDO
BIOFORTIFICAÇÃO**

LAVRAS - MG

2015

NILMA PORTELA OLIVEIRA

**VARIAÇÃO GENOTÍPICA ENVOLVENDO Fe, Zn E FITATOS EM
SOJA VISANDO BIOFORTIFICAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Valdemar Faquin

Coorientador

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme

LAVRAS - MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Oliveira, Nilma Portela.

Varição genotípica envolvendo Fe, Zn e fitatos em soja
visando biofortificação / Nilma Portela Oliveira. – Lavras :
UFLA, 2015.

78 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Valdemar Faquin.

Bibliografia.

1. Expressão de genes. 2. Biofortificação. 3. Glycine max.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

NILMA PORTELA OLIVEIRA

**VARIAÇÃO GENOTÍPICA ENVOLVENDO Fe, Zn E FITATOS EM
SOJA VISANDO BIOFORTIFICAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2015.

Dr. Luciano Vilela Paiva	UFLA
Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dra. Maria Lígia de Souza Silva	UFLA
Dr. André Rodrigues dos Reis	UNESP

Dr. Valdemar Faquin
Orientador

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme
Coorientador

LAVRAS - MG

2015

*A minha mãe e aos meus irmãos,
exemplos de dignidade, caráter e solidariedade e, pelo carinho e apoio sempre
dados a mim.*

*Aos meus sobrinhos,
pela alegria que me proporcionam e pelo estímulo de lutar por um futuro
melhor.*

Dedico

*“Quando iniciamos a vida,
cada um recebe um bloco de mármore
e as ferramentas necessárias para convertê-lo em escultura.
Podemos arrastá-lo intacto pela vida toda,
podemos reduzi-lo a cascalho,
ou podemos dar-lhe uma forma gloriosa.”*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente guiando os meus passos para que eu possa encontrar a melhor direção a seguir em busca dos meus anseios mais profundos

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Aos professores Dr. Valdemar Faquin e Dr. Luiz Roberto (Bebeto), exemplos de profissionalismo e vida, pelo apoio, durante todo o tempo de convivência, pelos ensinamentos atualizados e, principalmente, pela credibilidade depositada em mim.

Aos membros da banca, Dr. Luciano Vilela Paiva, Dr. Evaristo Mauro de Castro, Dra. Maria Lígia de Souza Silva e Dr. André Rodrigues dos Reis pelas valiosas contribuições e orientações seguras.

Aos funcionários do Departamento de Ciência do Solo, Geila, Dirce, Luciane (Ritinha), Cristina, José Roberto (Pezão), Roberto e João Gualberto pela boa vontade, dedicação, alegre convívio e amizade.

Aos colegas e amigos, Corguinha, Mina, Geila, Kalyinka, Paulo Boldrin, Paulo Ribeiro, Paulo Pinho, Fabrício, Alisson, Robert e Corrie, pelo auxílio nos trabalhos e relacionamento agradável no dia a dia.

A vocês, Marilena, Paulinha, Malú, Viviane, Julian, Alfredão, Cris Brito, Danilo, Adriana, minha pequena grande Ana da Costa, pela sincera amizade.

Às irmãs de república, Helen, Andressa, Bibiane e Fernanda pela paciência, compreensão e cumplicidade.

Aos amigos de Piumhi, em especial Ana Flávia, que mesmo distantes, tornam a felicidade presente em minha vida.

Aos antigos amigos e aos outros que fiz durante esses anos em Lavras, e que por sincronicidade nos encontramos.

RESUMO GERAL

Elementos metálicos tais como Fe e Zn possuem papéis vitais no ciclo de vida das plantas e são importantes para o seu adequado crescimento e em partes comestíveis de plantas contendo esses minerais proporcionam benefícios na dieta humana e animal. Porém, um dos principais problemas da biodisponibilidade desses elementos é a presença de metais pesados tóxicos e antinutrientes tais como os fitatos. Os fitatos possuem capacidade de quelatar diversos elementos minerais, especialmente, Fe e Zn o que interfere de sobremaneira a capacidade de absorção e utilização pelo organismo. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar: 1) a variabilidade genotípica de cultivares de soja e o efeito desta diversidade na produtividade de grãos (kg ha^{-1}), altura de plantas e de inserção de primeira vagem, bem como, na concentração de Fe, Zn, fósforo (P) e fitatos em grãos; 2) a variação genotípica em plântulas de cultivares brasileiras de soja em reposta às condições de Zn suficiente e deficiência de Zn, e o efeito dos tratamentos sobre o crescimento de plantas, características nutricionais e expressão relativa de genes-chave envolvidos na homeostase do Zn. Os resultados do primeiro experimento indicaram que há variação genotípica para produtividade de grãos (kg ha^{-1}), altura de plantas, altura de inserção de primeira vagem, bem como para os teores (nos grãos), de Fe, Zn, P e fitatos entre as cultivares de soja cultivadas comercialmente no Brasil. Verificaram-se baixas correlações ou não significativas entre os parâmetros avaliados, exceto a relação entre P e fitatos ($r = 0,733$). A diversidade encontrada entre as cultivares de soja oferece potenciais genótipos, tais como AS 8197RR, M 7908RR e FMS BRS 262, para o desenvolvimento de cultivares com maiores habilidades em acumular nutrientes em grãos. No segundo experimento, as variedades de soja exibiram diferença em termos de tamanho total de raiz e crescimento de plantas em reposta aos tratamentos, o que sugeriu variabilidade entre as variedades em acumular Zn. Três variedades de soja (TMG 1174 RR, BRS 257 e SYN 9070RR) exibiram sintomas de deficiência de Zn mais evidentes que as demais. As diferentes habilidades que as variedades de soja apresentaram parecem estar associadas à alguma alteração na expressão relativa de genes envolvidos na absorção e assimilação de Zn. Na soja, os genes ZIP1, IRT3 e NAS2 são mais expressos sob deficiência de Zn. De acordo com os resultados, certas variedades de soja, tais como, BRS213, BRS 800A e BRS 790 RG podem ser utilizadas para a obtenção de variedades com maiores habilidades em acumular Zn em partes comestíveis bem como para o crescimento sob condições de solos com relativa baixa concentração de Zn.

Palavras-chave: *Glycine max*. Zinco. Ferro. Biofortificação. Expressão de genes.

GENERAL ABSTRACT

Metals such as Iron (Fe) and Zinc (Zn) play vital functions in the plants life cycle. They are essential for the proper plants growth, and their presence in edible parts of plants improves animals and human diet. However, one of the major issues related to their bioavailability is the presence of heavy and toxic metals, and antinutrients such as phytates. Phytates can chelate various minerals, specially Fe and Zn, what interferes in their absorptive capacity by the organism. This work was performed aiming to: (i) assess the genotypic variability of soybean cultivars and the effect of this diversity in the grain productivity, plants height and of the insertion of the first pod, as well as the content of Fe, Zn, phosphorus (P) and phytates in the grain; (ii) assess the genotypic variation in seedlings of soybean cultivars from Brazil, under zinc content variations, and the effect of treatments in plants growth, nutritional characteristics, and relative expression of key genes involved in the zinc homeostasis. Results obtained in the first trial showed that there is genotypic variation for the grain productivity, plants height and of the insertion of the first pod, as well as the content of Fe, Zn, P and phytates in the grain of commercial soybean cultivars from Brazil. Weak correlation among assessed parameters were found, except between P and phytates ($r = 0.733$). The diversity found among soybean cultivars provided potential genotypes, such as AS 8197RR, M 7908RR and FMS BRS 262, for the obtainment of cultivars with high capacity in accumulating nutrients in the grain. In the second trial, soybean cultivars showed differences in terms of roots size and plants growth per treatment, what suggested variability among cultivars in accumulating zinc. Three soybean cultivars, namely TMG 1174 RR, BRS 257 and SYN 9070 RR, showed evident symptoms of zinc deficiency, more than in other cultivars. These different capacities seem to be associated with some changes in the relative expression of genes involved in the absorption and assimilation of zinc. The ZIP1, IRT3 and NAS2 genes were well expressed under zinc deficiency conditions. Therefore, some soybean cultivars, such as BRS213, BRS 800A and BRS 790 RG may be used for the obtainment of varieties with high capacity in accumulating zinc in edible parts of plants, as well as for plants growth under low content of zinc in the soil.

Key-words: *Glycine max*. Zinc. Iron. Biofortification. Genes expression.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 11
2	REFERENCIAL TEÓRICO 13
2.1	Importância do Fe e Zn na alimentação humana 13
2.2	Fe e Zn nas plantas e no ambiente 15
2.3	Alternativas para aumento dos teores de Fe e Zn na dieta humana e redução de fitatos 17
2.4	A cultura da soja 20
	REFERÊNCIAS 23
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 28
	ARTIGO 1 Variação genotípica nas características agronômicas e nos teores de Fe, Zn, P e fitatos em cultivares de soja 28
	ARTIGO 2 Genotypic variation of zinc accumulation in soybean seedlings 55

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos é crescente no mundo atual, visto que, a população tem aumentado ao longo dos anos. Com isso, o setor agrícola precisa produzir quantidades suficientes de produtos alimentícios para suprir tal demanda. Além disso, há uma crescente demanda por produtos agrícolas de melhor qualidade nutricional com o intuito de minimizar as ocorrências de carência de nutrientes.

A produção agrícola tem acompanhado o crescimento populacional, mas, os problemas de deficiência nutricional têm aumentado afetando principalmente os países em desenvolvimento. Atualmente, a desnutrição é consequência principalmente da carência de vitamina A, I, Fe, Zn e Se. Na população brasileira, a deficiência de Fe é a mais generalizada; crianças e gestantes são as mais afetadas. A dieta diária da população é baseada em cereais e alimentos de baixo custo (ex: arroz, mandioca e feijão) e que geralmente são pobres em Fe e Zn. Existem outros fatores que interferem na baixa ingestão de Fe e Zn e Se, são eles: baixo teor desses elementos no solo; fatores antinutricionais como metais pesados e fitatos, sendo esse último, fonte de P nas sementes de plantas e é encontrado nestas na forma livre e também complexado a proteínas e minerais. O complexo formado pelo ácido fítico e íons minerais (fitatos) é insolúvel, o que afeta de sobremaneira a biodisponibilidade dos minerais.

Pesquisas têm tido atualmente como foco os efeitos do aumento da produtividade nas concentrações de minerais no produto que geralmente é a parte comestível da planta, seja por melhoramento genético ou agrônomico. E, uma variedade de estudos têm demonstrado que as concentrações de vários

minerais são baixas em genótipos com maior capacidade produtiva (REDDY; RAMESH; LONGVAH, 2005).

Para contornar essa situação, tem sido visada a produção de alimentos biofortificados, que consiste num aumento da concentração de nutrientes nas partes comestíveis das plantas através da introdução pela adubação das plantas e via melhoramento genético com o intuito de atender a necessidade humana. O uso de variações genóticas, intra e interespecíficas, no melhoramento de plantas visando à biofortificação, tem despertado muito interesse devido ao potencial de aplicação na melhoria da qualidade dos alimentos.

A produção de soja possui grande importância econômica mundial, sendo cerca de 7% desta produção destinada diretamente à alimentação humana e ao desenvolvimento de sementes e o restante (93%) é voltado para a alimentação animal (farelo ou concentrado proteico). A partir do grão, a indústria alimentícia retira diversos componentes nutricionais: óleo, proteínas, fibras e resíduos (AMARAL, 2006).

A soja é um alimento considerado completo, pois possui em sua composição proteínas (42%), carboidratos (33%), lipídeos (20%), e resíduos (5%), além de vitaminas e minerais. Em função disso o seu enriquecimento com Fe, Zn seria uma alternativa de combate à desnutrição (AMARAL, 2006).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variação genotípica quanto aos teores de Fe, Zn, fitatos sem cultivares de soja, bem como a expressão relativa de genes envolvidos na homeostase do Zn.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste tópico, serão exploradas informações sobre a importância do Fe e Zn na alimentação humana, ocorrências desses elementos no ambiente, alternativas para aumento dos teores de Fe e Zn na dieta humana e também serão relatados aspectos importantes sobre a cultura da soja.

2.1 Importância do Fe e Zn na alimentação humana

A alimentação é fonte primária de nutrientes para a população humana e um dos maiores desafios que o setor de produção agrícola tem encontrado atualmente é de produzir alimentos em quantidades suficientes para o suprimento da demanda populacional mundial. Além disso, há uma crescente demanda por produtos agrícolas de melhor qualidade nutricional visando combater a ocorrência de deficiências de nutrientes. Segundo Lopes, Guilherme e Silva (2003), estima-se que a produtividade média de grãos deverá atingir cerca de 4,5 toneladas ha⁻¹ em 2025. Em 2014/2015, a projeção de produção de cereais é de 2.472 milhões de toneladas (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2015b), enquanto que, a população atingiu o patamar 7,2 bilhões de habitantes e deverá aumentar em mais de dois bilhões até 2050 (UNITED NATIONS, 2014).

A produção agrícola tem acompanhado o crescimento populacional e medidas de distribuição de renda têm reduzido a fome mundial na última década, mas, os problemas de deficiência nutricional têm aumentado, afetando quase metade da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, especialmente mulheres grávidas, adolescentes e crianças (KHUSH et al., 2012). Atualmente, a desnutrição, consequência direta da deficiência de minerais e vitaminas, tem ocorrido principalmente pelas

deficiências de Fe, I, Se, Vitamina A e Zn. Deficiências nutricionais têm afetado mais de três bilhões de pessoas no mundo. Deficiências em Fe são comuns e afetam aproximadamente 60% da população mundial (SOUZA et al., 2013; WHITE; BROADLEY, 2009). Estima-se que, um terço da população mundial esteja habitando países considerados alarmantes no que diz respeito à deficiência de Zn, sendo sugerido que um quinto da população não esteja ingerindo quantidades satisfatórias desse nutriente (HOTZ; MCCLAFFERTY, 2007; SOUZA et al., 2013; WHITE; BROADLEY, 2009).

Na população brasileira, a desnutrição pela deficiência de Fe é a mais generalizada. Gestantes e crianças são as mais afetadas, devido principalmente a fatores socioeconômicos (BRESSANI, 2000; SILVA et al., 2002; VELU et al., 2013). São relativamente incipientes as informações sobre a ocorrência da deficiência de Zn e Se no Brasil. Pesquisadores observaram que os valores de Zn em diversos gêneros alimentícios consumidos no Brasil eram normais e compatíveis em relação aos padrões internacionais (FERREIRA et al., 2002).

Para uma adequada nutrição em Fe, recomenda-se, por exemplo, mulheres com idade entre 19-50 anos, uma ingestão de 15 mg dia⁻¹ (WELCH, 2002). E, a recomendação diária para ingestão de Zn é de 12 mg dia⁻¹ para mulheres adultas e de 15 mg dia⁻¹ para homens adultos (ZOU et al., 2014). A deficiência de Fe durante a infância e adolescência prejudica o crescimento, o desenvolvimento mental e a capacidade de aprendizagem. Em adultos, ela diminui a capacidade de atividade física. Anemia grave, muitas vezes induzida por deficiência de Fe, aumenta o risco de morte de mulheres no parto (HARVESTPLUS, 2015a). O Zn é essencial para a sobrevivência, pois, exerce mais funções no corpo humano do que qualquer outro mineral, além disso, compõe diversos sistemas enzimáticos, portanto, possui papel relevante na manutenção dos tecidos do corpo e do sistema imunológico, bem como para o

crescimento e desenvolvimento normal do ser humano (HARVESTPLUS, 2015b).

De acordo com o relatado, verifica-se a importância da presença de tais elementos (Fe e Zn) na dieta diária da população humana. A desnutrição é causada principalmente pela falta de nutrientes na dieta, sendo que, frutas, legumes e produtos de origem animal são ricos em Fe e Zn, mas esses alimentos não estão frequentemente ao alcance dos menos favorecidos financeiramente. Geralmente sua dieta diária consiste principalmente de alguns alimentos básicos de baixo custo (ex.: arroz, mandioca, milho, trigo e feijão) e que geralmente são pobres em Fe e Zn (CAKMAK, 2008; VELU et al., 2013).

Existem outros importantes fatores que interferem na baixa ingestão de Fe e Zn pela população, são esses: baixo teor do elemento no solo; perdas na qualidade nutricional devido ao sistema de industrialização, por exemplo, o polimento do arroz acarreta perda de minerais dos grãos; fatores antinutricionais, como metais pesados tóxicos e fitatos que reduzem a absorção de elementos minerais (principalmente micronutrientes) pelo organismo animal e humano. Os fitatos são encontrados em relativamente altas concentrações nas sementes de plantas. Sua função é de reserva de P e representa até 2,3% do peso seco de semente de leguminosas. Sua estrutura lhe confere alta capacidade quelante e antioxidante. A carência de elementos minerais em populações que se alimentam de fontes vegetais também se relaciona à ação quelante de elementos minerais pelos fitatos (LAZZARI, 2006).

2.2 Fe e Zn nas plantas e no ambiente

A concentração de Fe e Zn nos vegetais pode refletir a abundância no ambiente de crescimento destas. Sua transferência do solo para as plantas é parte do ciclo biogeoquímico. No solo, podem ter origem natural ou antropogênica.

As ações naturais de adição destes elementos ao solo compreendem o intemperismo das rochas e minerais, além das emissões vulcânicas, enquanto as ações antropogênicas incluem a construção de aterros sanitários, as atividades industriais e de mineração e aplicações de corretivos, de fertilizantes e de pesticidas, entre outras (DRISCOLL; OTTON; IVERFELDT, 1994).

Os teores de Fe e Zn nos solos estão estreitamente relacionados com o material de origem, como dito anteriormente. Em função da ação do intemperismo nas rochas matrizes, os elementos passam então a fazer parte do solo e podem estar disponíveis para as plantas que, por conseguinte, por meio dos produtos agrícolas, podem entrar na cadeia alimentar (DRISCOLL; OTTON; IVERFELDT, 1994; LAZZARI, 2006). Quando os solos apresentam baixos teores de elementos essenciais às plantas, como acontece com muita frequência em solos muito intemperizados, o fornecimento via fertilizante se faz necessário. O entendimento do comportamento geoquímico de Fe e Zn no solo é fundamental para a escolha de práticas de manejo e definição de políticas públicas que envolvam qualidade do solo e dos recursos hídricos (LOPES; GUILHERME; SILVA, 2003). O Fe e Zn podem estar na forma solúvel, trocável, fixada aos minerais do solo, precipitada com outros componentes, na biomassa e complexada com a matéria orgânica (DRISCOLL; OTTON; IVERFELDT, 1994; WHITE; BROADLEY, 2009).

O Fe e Zn são exemplos de elementos minerais que podem apresentar potencial tóxico para as plantas, animais e homens quando em quantidades elevadas no solo. Esses elementos têm como particularidade: o interesse agrônomo pelo Fe e Zn, por serem micronutrientes de plantas, exigidos em pequenas doses e com faixa estreita de concentração entre o ótimo e o adequado nos seres vivos (SILVA, 2006). A disponibilidade destes pode ser afetada pelas reações mediadas biologicamente e redução/oxidação sequenciais ocorrendo no solo, dentre outros (WHITE; BROADLEY, 2009).

As plantas possuem duas estratégias para aquisição de Fe a partir do solo. Na estratégia I, na qual as espécies gramináceas não participam, as raízes acidificam a rizosfera e liberam ácidos orgânicos e compostos fenólicos para aumentar as concentrações de Fe^{3+} (insolúvel) na solução do solo. Estes compostos são capazes de quelatar o Fe^{3+} , que é subsequentemente reduzido à Fe^{2+} através de redutases férricas na membrana plasmática das células epidérmicas das raízes. A estratégia II ocorre nas gramíneas, os fitosideróforos que são derivados estruturais do ácido mugineico (aminoácido não proteico) são liberados na rizosfera para quelatar o Fe^{3+} e o complexo Fe^{3+} -fitosideróforo é absorvido pelas células das raízes. Os fitosideróforos possuem especificidade química o que confere habilidades contrastantes das diferentes gramíneas em adquirir Fe (WHITE; BROADLEY, 2009).

É frequentemente assumido que, a maioria do Zn é transportada via simplasto pelas células da raiz para o xilema, embora uma fração substancial possa atingir o xilema através do apoplasto. O Zn pode ser absorvido através da membrana plasmática de células da raiz como Zn^{2+} , ou como um complexo Zn-fitosideróforo (BROADLEY et al., 2007; WHITE; BROADLEY, 2009).

2.3 Alternativas para aumento dos teores de Fe e Zn na dieta humana e redução de fitatos

Para que seja possível a produção de alimentos em quantidade e qualidade adequadas, é necessário um sistema de produção agrícola integrado, no qual o manejo da fertilidade do solo, a adubação e o melhoramento de plantas visem não só o aumento de produtividade, mas também a segurança alimentar e a sua capacidade de fornecer nutrientes e vitaminas de forma apropriada (MORAES, 2008).

O baixo teor de elementos minerais nas partes comestíveis das plantas se deve em parte, ao melhoramento genético vegetal voltado para ganho em produtividade sem a devida consideração pela melhoria da qualidade. Em trabalhos relativamente recentes, foi demonstrado que, ao longo dos anos, o aumento de produtividade obtido por intermédio do melhoramento vegetal apresenta relação inversa ao teor de micronutrientes em grãos (GARVIN; WELCH; FINLEY, 2006; LAZZARI, 2006; MURPHY; REEVES; JONES, 2008).

A utilização de variações genotípicas, intra e interespecíficas, no melhoramento de plantas visando a biofortificação, com Fe e Zn, por exemplo, bem como a introdução desses na adubação das plantas, têm despertado muito interesse devido ao potencial de aplicação na melhoria da qualidade dos alimentos visando atender a necessidade humana ou animal (KHUSH et al., 2012; RÍOS et al., 2008).

A variação genotípica quanto ao teor de Fe e Zn pode estar relacionada ao estado nutricional das plantas nos vários estádios de desenvolvimento. Há também, crescente interesse no conhecimento da relação entre teores de micronutrientes e de elementos tóxicos e de antinutrientes na parte comestível de plantas, visando à seleção de cultivares que apresentem maiores teores de micronutrientes e baixos de elementos tóxicos e, ou, antinutrientes (AMARAKOON et al., 2012; JING; LIANQING; GENXING, 2009; LAZZARI, 2006).

Existem várias barreiras ao acúmulo de Fe e Zn nas partes comestíveis que precisam ser melhor compreendidas. Estas barreiras são consequências do refinamento dos mecanismos homeostáticos que regulam a absorção, translocação e redistribuição de metais em plantas, permitindo teores em níveis adequados e, ou, não tóxicos de nutrientes e também de metais pesados tóxicos nos tecidos vegetais (WELCH; GRAHAM, 2004).

Os fatores que afetam a absorção radicular e o transporte de Fe e Zn para parte aérea e redistribuição podem estar relacionados a mecanismos de interações entre a planta e o ambiente e à adaptação das espécies vegetais ao meio. Sabe-se que a seleção genética para aumentar ou decrescer a absorção de um íon pode favorecer outros íons, pois, um gene ou grupo de genes controla a absorção de um ou mais íons (LAZZARI, 2006; MCLAUGHLIN; PARKER; CLARKE, 1999). Por outro lado, o aumento do teor de P, por exemplo, em grãos pode não ser desejável, mesmo quando não altera o teor total de Fe. Sabe-se que a biodisponibilidade do Fe pode ser reduzida com o incremento do P nos grãos, devido a maior parte do P das sementes ser armazenada na forma de fitatos, que no organismo humano age como “quelante” dos íons Ca, Fe, Zn, etc., impedindo a absorção desses elementos e assim afetando sua biodisponibilidade (HOTZ; MCCLAFFERTY, 2007). Define-se, biodisponibilidade como sendo a proporção do nutriente nos alimentos que é efetivamente absorvida e utilizada. Tal conceito engloba o processo de assimilação, transporte e conversão de um nutriente para suas formas biologicamente ativas (GERMANO; CANNIATI-BRAZACA, 2002).

O ácido fítico (AP) (Mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate) é a principal forma de armazenamento de P em sementes de cereais e legumes, que são alimentos básicos em todo o mundo. O AP representa cerca de 50 a 85% do total de P em sementes (AKOND et al., 2011; THAVARAJAH et al., 2010). Normalmente, o AP é depositado durante o desenvolvimento da semente como um misto de sal de fitatos de Fe, Zn, Ca, Mg, e K (DORIA et al., 2009; THAVARAJAH et al., 2010), também pode ser encontrado complexado à proteínas e na forma livre. O AP além de se ligar a elementos essenciais tais como Fe e Zn em sementes, também forma complexos com micronutrientes em outros alimentos durante a digestão intestinal (THAVARAJAH et al., 2010). Os complexos formados (fitatos) pelo AP e íons minerais são insolúveis o que afeta

de sobremaneira a biodisponibilidade dos minerais (AKOND et al., 2011; MA et al., 2005). Dessa forma, a seleção de genótipos de plantas que possuem baixos teores de fitatos nas partes comestíveis apresenta potencial para melhorar o valor nutricional das mesmas (YUAN et al., 2009).

Existe ampla variabilidade genética para os teores de nutrientes presentes nas partes comestíveis das culturas, mas, essa variabilidade também existe para teores de antinutrientes, sendo essas variações, uma importante estratégia para o melhoramento de plantas visando biofortificação (RIOS et al., 2009; WHITE; BROADLEY, 2009).

2.4 A cultura da soja

A soja é uma cultura que possui grande importância econômica, tanto no âmbito nacional quanto mundial. Para a safra de 2014/2015, a estimativa da produção mundial de soja é de 314,37 milhões de toneladas, um aumento de 10,8% em relação as 283,74 milhões de toneladas produzidas na safra de 2013/2014 (USDA, 2015a) e, o consumo mundial em 2014/2015 está estimado em 286,25 milhões de toneladas (USDA, 2015b).

O Brasil ocupa o segundo lugar no *Ranking* mundial de produção de soja, sendo sua produção na safra de 2014/2015 estimada em 95,5 milhões de toneladas (recorde), um aumento de 8,8 milhões em relação à safra anterior (USDA, 2015a). A projeção de consumo e exportação brasileira de soja para a mesma safra é de 40,75 e 46,0 milhões de toneladas (USDA, 2015b). E, a produtividade de grãos está estimada em 3,03 toneladas ha⁻¹, 5,2% maior que a do ano anterior. O aumento na produtividade é atribuído ao clima benéfico nas maiores áreas de produção de soja no Brasil, Mato Grosso e Paraná. Estes dois estados são responsáveis por 44% da área total (31,5 milhões de hectares) de produção de soja no Brasil (USDA, 2015a).

De toda a produção mundial de soja, cerca de 7% é destinado diretamente à alimentação e ao desenvolvimento de sementes. O restante (93%) destina-se à alimentação animal, como ração na forma de farelo ou concentrado proteico. Do grão, a indústria alimentícia extrai diversos componentes nutricionais: óleo, proteínas, fibras e resíduos (AMARAL, 2006).

A soja tem sido utilizada de forma relevante como alimento e medicamento nos países asiáticos; já no ocidente é mais conhecida pelo seu valor proteico e lipídico. O público alvo de consumo da soja tem aumentado, como vegetarianos, alérgicos ao leite de vaca, e sua presença na dieta do consumidor tem aumentado ao longo dos anos, com a evolução tecnológica, melhora de sabor e, fazendo parte de grande número de alimentos industrializados (CAMARGO, 2008).

Como a alimentação é um fator importante e decisivo na qualidade de vida, ela deve ser composta pelos alimentos necessários não somente para a nutrição básica do organismo, de forma balanceada, mas também rica em componentes que produzem efeitos metabólicos e, ou, fisiológicos benéficos, sendo capaz de prevenir doenças e promover saúde. Entre os alimentos desta categoria, a soja figura como um dos alimentos mais estudados e completos. A soja pode ser considerada um alimento completo, pois, têm em sua composição proteínas (42%), carboidratos (33%), lipídeos (20%) e resíduos (5%), além de vitaminas e minerais (AMARAL, 2006).

Na soja, os pesquisadores Wiersma e Moraghan (2013) encontraram em sementes uma média de teores de Fe e Zn de 70 e 34 mg kg⁻¹, respectivamente. E, Lazzari (2006) encontrou teores fitatos que variaram entre 1 e 2,3% do peso seco da semente. Os fitatos são encontrados nos cotilédones das leguminosas como inclusões nos corpos proteicos. Nesses, o ácido fítico (AP) encontra-se na forma de ácido livre e também complexado a proteínas e minerais (fitatos). Como dito anteriormente, o complexo formando fitatos pelo AP e íons minerais

(ex. Fe e Zn) é insolúvel, o que afeta de sobremaneira a biodisponibilidade destes (AKOND et al., 2011; MA et al., 2005). Diante do exposto pode-se inferir que estudos sobre características nutricionais da soja podem então promover a sua incorporação à dieta alimentar da população humana e animal.

REFERÊNCIAS

AKOND, A. S. M. G. M. et al. Minerals Zn Fe Ca and Mg and antinutrient (Phytic Acid) constituents in common bean. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 235-243, 2011.

AMARAKOON, D. et al. Iron-, zinc-, and magnesium-rich field peas (*Pisum sativum* L.) with naturally low phytic acid: a potential food-based solution to global micronutrient malnutrition. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 27, n. 1, p. 8-13, Aug. 2012.

AMARAL, V. M. G. **A importância da soja como alimento funcional para qualidade de vida e saúde**. 2006. 71 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BRESSANI, R. Micronutrient policies for agriculture in Latin America. **Food and Nutrition Bulletin**, Davis, v. 21, n. 4, p. 538-541, 2000.

BROADLEY, M. R. et al. Zinc in plants. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 173, n. 4, p. 677-702, Jan. 2007.

CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? **Plant and Soil**, The Hague, v. 302, n. 1/2, p. 1-17, Nov. 2008.

CAMARGO, M. F. **Produção de soja para consumo humano uma estratégia de mercado para o pequeno produtor**. 2008. 111 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DORIA, E. et al. Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (*Zea mays* L.) low phytic acid mutant. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 967-978, Jan. 2009.

DRISCOLL, C. T.; OTTON, J. K.; IVERFELDT, A. Trace metals speciation and cycling. In: BEDRICH, M.; CERNY, J. (Ed.). **Biogeochemistry of small**

catchments: a tool for environmental research. New York: Wiley, 1994. p. 299-322.

FERREIRA, K. S. et al. Concentrações de zinco em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 49, n. 283, p. 309-3019, 2002.

GARVIN, D. F.; WELCH, R. M.; FINLEY, J. W. Historical shifts in the seed mineral micronutrient concentration of US hard red winter wheat germplasm †‡. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, n. 13, p. 2213-2220, Oct. 2006.

GERMANO, R. M. de A.; CANNIATI-BRAZACA, S. G. Importância do ferro em nutrição humana Importance of iron in human nutrition. **Nutrire**, São Paulo, v. 24, p. 85-104, dez. 2002.

HARVESTPLUS. **Iron**. Disponível em:
<<http://www.harvestplus.org/content/iron>>. Acesso em: 16 jan. 2015a.

HARVESTPLUS. **Zinc**. Disponível em:
<<http://www.harvestplus.org/content/zinc>>. Acesso em: 16 jan. 2015b.

HOTZ, C.; MCCLAFFERTY, B. From harvest to health: challenges for developing biofortified staple foods and determining their impact on micronutrient status. **Food and Nutrition Bulletin**, Davis, v. 28, n. 2, p. 271-279, 2007.

JING, S. H. I.; LIANQING, L. I.; GENXING, P. A. N. Variation of grain Cd and Zn concentrations of 110 hybrid rice cultivars grown in a low-Cd paddy soil. **Journal of Environmental Sciences**, New York, v. 21, n. 2, p. 168-172, 2009.

KHUSH, G. S. et al. Biofortification of crops for reducing malnutrition. **Plant Biotechnology Reports**, London, v. 6, n. 3, p. 195-202, Jan. 2012.

LAZZARI, E. N. **Análise de ácido fítico e minerais nos processos de maceração e cocção de soja**. 2006. 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

LOPES, A. S. D.; GUILHERME, L. R. G.; SILVA, C. A. P. **Vocação da terra**. 2. ed. Sao Paulo: Nagy, 2003. 23 p.

MA, G. et al. Phytate, calcium, iron, and zinc contents and their molar ratios in foods commonly consumed in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 26, p. 10285-90, Dec. 2005.

MORAES, M. F. de. Relação entre nutrição de plantas, qualidade de produtos agrícolas e saúde humana. **Informa es Agronômicas**, Piracicaba, n. 135, p. 21-23, set. 2008.

MURPHY, K. M.; REEVES, P. G.; JONES, S. S. Relationship between yield and mineral nutrient concentrations in historical and modern spring wheat cultivars. **Euphytica**, Wageningen, v. 163, n. 3, p. 381-390, Oct. 2008.

REDDY, B. V.; RAMESH, S.; LONGVAH, T. Prospects of breeding for micronutrients and β -Carotene-Dense sorghums. **International Sorghum and Millets Newsletter**, Southampton, v. 46, n. 1, p. 10-14, 2005.

R IOS, J. J. et al. Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 248-255, May 2008.

RIOS, S. D. A. et al. Biofortifica o: culturas enriquecidas com micronutrientes pelo melhoramento genético. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 56, n. 6, p. 713-718, 2009.

SILVA, D. G. et al. Anemia ferropriva em crianç as de 6 a 12 meses atendidas na rede pública de saúde do município de Viçosa, Minas Gerais Iron deficiency anemia in 6 to 12-month - old infants attended at the public health service of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 301-308, 2002.

SILVA, M. L. de S. **Avaliação do comportamento de elementos traço essenciais e não essenciais em solo contaminado sob cultivo de plantas**. 2006. 112 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2006.

SOUZA, G. A. de et al. Evaluation of germplasm effect on Fe, Zn and Se content in wheat seedlings. **Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology**, Shannon, v. 210, p. 206-213, Sept. 2013.

THAVARAJAH, D. et al. Phytic acid and Fe and Zn concentration in lentil (*Lens culinaris* L.) seeds is influenced by temperature during seed filling period. **Food Chemistry**, Oxford, v. 122, n. 1, p. 254-259, 2010.

UNITED NATIONS. **The world population situation in 2014**. New York, 2014. Disponível em: <<http://www.un.org/en/development/desa/population/>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World agricultural production**. Washington, 2015a. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World agricultural supply and demand estimates**. Washington, 2015b. Disponível em: <<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

VELU, G. et al. Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. **Journal of Cereal Science**, London, v. 59, n. 3, p. 365-372, May 2013.

WELCH, R. M. The impact of mineral nutrients in food crops on global human health. **Plant and Soil**, The Hague, v. 247, n. 1, p. 83-90, Nov. 2002.

WELCH, R. M.; GRAHAM, R. D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 396, p. 353-364, 2004.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets--iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, Cambridge, v. 182, n. 1, p. 49-84, 2009.

WIERSMA, J. V.; MORAGHAN, J. T. Within-seed distribution of selected mineral elements among soybean genotypes that vary in iron efficiency. **Crop Science**, Madison, v. 53, n. 5, p. 2051-2062, 2013.

YUAN, F. J. et al. Effects of two low phytic acid mutations on seed quality and nutritional traits in soybean (*Glycine max* L. Merr). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 9, p. 3632-3638, May 2009.

ZOU, T. et al. Biofortification of soybean sprouts with zinc and bioaccessibility of zinc in the sprouts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 94, n. 14, p. 3053-3060, Nov. 2014.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Variação genotípica nas características agronômicas e nos teores de Fe, Zn, P e fitatos em cultivares de soja

ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NBR 6022 (ABNT, 2003)

RESUMO

A dieta básica de grande parte da população mundial se dá por meio de cereais. Estes geralmente possuem teores de Fe e Zn aquém da demanda nutricional dos humanos. Outros fatores que podem interferir substancialmente na baixa ingestão de Fe e Zn são os fatores antinutricionais presentes nas partes comestíveis das plantas, tais como, metais pesados e fitatos. Os fitatos possuem capacidade de quelatar diversos elementos minerais, especialmente Fe e Zn, o que interfere sobremaneira a capacidade de absorção e utilização desses elementos pelo organismo. Neste contexto, objetivou-se avaliar a variação genotípica quanto à produtividade de grãos (kg ha^{-1}), altura de plantas e de inserção de primeira vagem, bem como para os teores nos grãos, de Fe, Zn, P e de fitatos em 24 cultivares de soja comercialmente cultivadas no Brasil. Os resultados mostraram que há variação genotípica para produtividade de grãos (kg ha^{-1}), altura de plantas e de inserção de primeira vagem, bem como para os teores nos grãos, de Fe, Zn, P e de fitatos entre as cultivares de soja cultivadas comercialmente no Brasil. Verificaram-se baixas correlações ou não significativas entre as variáveis avaliadas, exceto para a relação entre P e fitatos ($r = 0,733$). A diversidade encontrada entre as cultivares de soja oferece potenciais genótipos, tais como AS 8197RR, M 7908RR e FMS BRS 262, para desenvolver cultivares com maiores habilidades em acumular nutrientes em grãos.

Palavras-chave: Biofortificação. Antinutriente. Micronutrientes. Qualidade nutricional. *Glycine max*

1 INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos é crescente no mundo atual, visto que, a população tem aumentado ao longo dos anos. Com isso o setor agrícola precisa produzir quantidades suficientes de produtos alimentícios para suprir tal demanda. Além disso, há uma crescente demanda por produtos agrícolas de melhor qualidade nutricional com intuito de minimizar as ocorrências de deficiência nutricional. A deficiência nutricional em micronutrientes tais como Fe e Zn, tem afetado principalmente os países em desenvolvimento especialmente mulheres grávidas, adolescentes e crianças (KHUSH et al., 2012; MAYER; PFEIFFER; BEYER, 2008). Estima-se que mais de 60% da população mundial possui deficiência em Fe, 30% ou mais em Zn (SOUZA et al., 2013; WHITE; BROADLEY, 2009).

A deficiência de Fe pode causar anemia nutricional, gestações problemáticas, raquitismo, baixa resistência a infecções, disfunção mental de longa duração, diminuição do aproveitamento e conversão de energia do alimento e, prejuízos no desenvolvimento neuromotor. Níveis insuficientes de Zn no organismo humano podem causar retardo no crescimento, atraso na maturidade esquelética e sexual, dermatite, diarreia, queda de cabelo e prejuízos no sistema de imunidade com consequente aumento da susceptibilidade à infecção (WELCH, 2002). Esta situação é atribuída à produção de alimentos em condições de solos com baixa disponibilidade desses minerais às plantas e, ou, dieta baseada em alimentos com baixos teores dos mesmos, geralmente de baixo custo (ex: arroz e mandioca), e pode ser agravada pela falta e, ou baixa ingestão

de alimentos de origem animal, os quais apresentam maiores teores desses micronutrientes em suas composições (CAKMAK, 2008; VELU et al., 2013).

Outros fatores que podem interferir substancialmente na baixa ingestão de Fe e Zn são os fatores antinutricionais, tais como, metais pesados e ácido fítico (AP). O AP (Mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate) é a principal forma de armazenamento de P em sementes de cereais e legumes, que são alimentos básicos em todo o mundo. O AP representa cerca de 50 a 85% do total de P em sementes (AKOND et al., 2011; THAVARAJAH et al., 2010). Normalmente, AP é depositado durante o desenvolvimento da semente como um misto de sais de fitatos de Fe, Zn, Ca, Mg, e K (DORIA et al., 2009; THAVARAJAH et al., 2010), também pode ser encontrado complexado a proteínas e na forma livre. O AP além de se ligar a elementos essenciais tais como Fe e Zn em sementes também forma complexos com micronutrientes em outros alimentos durante a digestão intestinal (THAVARAJAH et al., 2010). Os complexos formados (fitatos) pelo AP e íons minerais são insolúveis o que afeta de sobremaneira a biodisponibilidade dos minerais (AKOND et al., 2011; MA et al., 2005). Baixos teores de fitatos nas partes comestíveis das plantas apresentam potencial para melhorar o valor nutricional das mesmas (YUAN et al., 2009).

Para contornar essa situação, tem sido visada a produção de alimentos biofortificados, que consiste num aumento da concentração de nutrientes nas partes comestíveis das plantas através da introdução na adubação das plantas e via melhoramento genético, com o intuito de atender a necessidade humana. O uso de variações genotípicas, intra e

interespecíficas, no melhoramento de plantas visando a biofortificação, tem despertado muito interesse devido ao potencial de aplicação na melhoria da qualidade dos alimentos (KHUSH et al., 2012; RÍOS et al., 2008).

A seleção de cultivares com maiores teores de minerais, níveis reduzidos de fatores antinutricionais e com características agronômicas favoráveis acabaria por aumentar a biodisponibilidade de minerais e assim seria possível a produção de alimentos biofortificados (AMARAKOON et al., 2012). A soja é um alimento considerado relativamente completo, pois possui em sua composição proteínas (42%), carboidratos (33%), lipídeos (20%) e resíduos (5%), além de vitaminas e minerais (AMARAL, 2006). Em função disso o seu enriquecimento com Fe e Zn seria uma alternativa de combate à desnutrição.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variação genotípica quanto as suas características agronômicas e quanto aos teores de Fe, Zn, P e de fitatos nos grãos de 24 cultivares de soja comercialmente cultivadas no Brasil e identificar cultivares com potencial para biofortificação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local, delineamento experimental e avaliações agronômicas

O experimento foi conduzido no município de Rio Verde (GO) pelo Centro Tecnológico da COMIGO (CTCo) situado na região sudoeste de Goiás (17°46'03''S, 51°01'50''W e 836 m de altitude). O solo da área experimental foi classificado como Latossolo Vermelho distrófico com histórico de uso para grãos de acordo com a classificação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (2013). O regime pluviométrico durante a condução do experimento foi de 1.042 mm; safra 2010/2011.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com 24 tratamentos, sendo estes compostos por três cultivares de soja convencional e 21 cultivares de soja transgênica (Tabela 1), com três repetições. Cada parcela foi composta por nove linhas espaçadas de 0,5 metro com 10 metros de comprimento, perfazendo uma área de 40 m² por parcela. A área útil para amostragem foi representada pelas sete fileiras centrais, desprezando-se 0,5 m de cada extremidade.

A adubação utilizada no plantio foi de 400 kg ha⁻¹ do formulado 02-20-18. Todos os tratos culturais necessários foram realizados de acordo com o protocolo do CTCo. Amostra composta do solo foi coletada a 20 cm de profundidade para caracterização dos atributos químicos e físicos (Tabela 2) segundo metodologia descrita por Souza et al. (2011).

Quando as plantas de soja atingiram maturação plena dos grãos, foram coletadas 10 plantas dentro da área útil em cada bloco e foram

medidas a altura de planta e altura de inserção de primeira vagem com o auxílio de trena metálica. A produtividade de grãos foi determinada no final da colheita e a umidade padronizada em 13%.

Tabela 1 Cultivares de soja comercialmente cultivadas no Brasil e empresa detentora

Cultivar	Empresa detentora
5G770 RR ²	DOW AGROSCIENCES
ANTA 82 RR ²	RELMO
AS7307RR ²	AGROESTE
AS8197 RR ²	AGROESTE
BRS 7561 RR ²	EMBRAPA
BRS 7760 RR ²	EMBRAPA
BRS 7860 RR ²	EMBRAPA
BRS 8160 RR ²	EMBRAPA
CD241 RR ²	COODETEC
FM/BRS245RR ²	FUNDAÇÃO MERIDIONAL
FM/BRS262 ¹	FUNDAÇÃO MERIDIONAL
FM/BRS283 ¹	FUNDAÇÃO MERIDIONAL
FM/BRS284 ¹	FUNDAÇÃO MERIDIONAL
IGRA 626 RR ²	IGRA SEMENTES
IGRA 818 RR ²	IGRA SEMENTES
M-7211 RR ²	MONSANTO
M-7639 RR ²	MONSANTO
M-7908 RR ²	MONSANTO
NA 7255RR ²	NIDERA
NA 7337 RR ²	NIDERA
P98Y11 RR ²	PIONER
P98Y12 RR ²	PIONER
P98Y30 RR ²	PIONER
SYN 9078 RR ²	SYNGENTA

¹ Cultivar de soja convencional

² Cultivar de soja transgênica Roundup Ready®

Tabela 2 Atributos químicos e físicos de solo classificado como Latossolo Vermelho distrófico

Atributos Químicos															
pH	P	K	Zn	Cu	Mn	Fe	B	S	Ca	Mg	Al	H+Al	T	m	V
H ₂ O	mg dm ⁻³						cmol _c dm ⁻³						-%		
5,6	18	61	4,7	1,0	7,8	34,3	0,6	12,8	2,5	0,5	0,2	3,6	6,8	6,0	46
Atributos Físicos															
Areia			Silte			Argila			MO						
----- % -----															
45			5			50			2,9						

T = capacidade de troca de cátion a pH 7, m = índice de saturação por alumínio, V = índice de saturação por bases, MO = teor de matéria orgânica

2.2 Análise química de nutrientes e de fitatos nos grãos.

Para quantificação dos nutrientes, as amostras foram secas em estufa, a 65 °C, até peso constante. Em seguida, foram moídas em moinho de aço inoxidável tipo Wiley equipado com peneira com malha de 0,38 mm e, submetido à digestão nítrico-perclórica para análise de P, conforme descrito por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). A leitura de P foi feita por colorimetria e para determinação de Zn e Fe as amostras foram submetidas à extração em forno de micro-ondas (CEM[®]) pelo método USEPA 3051A (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA, 2007) e, utilizou-se “Tomato Leaves”, NIST 1573^a como referência.

A extração de fitatos foi realizada de acordo com Nappi et al. (2006) com algumas modificações. Pesou-se 0,5 g de amostra de grãos moídos (diâmetro ≤ 0,7mm) em tubos de centrífuga e adicionou-se 10 mL

de HCl 0,5M e submeteu-se esse material à agitação mecânica por 2h sob temperatura ambiente. Após este período, centrifugou-se a suspensão em 1.500 rpm durante 15 min e temperatura de 10 °C, posteriormente retirou-se uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante e acrescentou a este 22,5 mL de água ultrapura perfazendo-se um total de 25 mL.

As amostras foram purificadas empregando-se coluna SAX de acordo com Nappi et al. (2006) e, algumas modificações foram introduzidas. O extrato de 25 mL foi transferido para a coluna SAX. Posteriormente, lavou-se a coluna com 2 mL de água ultrapura. Finalmente, os fitatos foram eluídos com 2 mL de HCl 2M e coletado em tubos de centrífuga.

Os teores de fitatos foram quantificados de acordo com Blair et al. (2012); com adaptações. O pH da amostra foi ajustado para 3 com NaOH. Após este procedimento, completou-se o volume do eluído para 3 mL com solução de HCl 2M com pH igual a 3. Posteriormente, acrescentou-se 1 mL de reagente de Wade (0,03% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,3 % ácido sulfossalicílico em água ultrapura) e procedeu-se agitação da solução em vórtex por 5 segundos. Foi deixado descansar por 5 minutos e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 500 nm, usando-se água ultrapura para calibrar o aparelho.

2.3 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a análises de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-knott; foram obtidas também as estimativas de correlação de Pearson entre as variáveis

avaliadas, ao nível de significância de 5%, com auxílio do R 2.15.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009), bem como a construção dos gráficos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características agronômicas

Observa-se pela Figura 1 que houve variação genotípica quanto à produtividade de grãos (kg ha^{-1}), altura (cm) e altura de inserção da primeira vagem (cm) entre as cultivares de soja estudadas.

A produtividade média de grãos apresentada pelas cultivares foi de 3.307 kg ha^{-1} , variando de 2.700 a 3.904 kg ha^{-1} (Figura 1A), sendo essa variação cerca de 31%. Vale lembrar que, a produtividade brasileira de soja em 2014 foi de aproximadamente 2.880 kg ha^{-1} (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2015).

Cultivares de soja desejáveis são aquelas que apresentam maiores produtividades, altura de plantas entre 60 e 80 cm e inserção de primeira vagem acima de 10 cm. A altura de plantas e de inserção da primeira vagem apresenta efeitos diretos e indiretos sobre a produtividade, pois existe uma tendência de plantas mais altas e com menor altura de inserção da primeira vagem apresentarem um maior número de vagens. Vale destacar que, plantas que possuem altura superior a 80 cm e inserção de primeira vagem inferior a 10 cm podem acarretar em perdas durante a colheita mecanizada (PIRES et al., 2012).

Nas Figuras 1B e 1C, pode-se observar que as plantas de soja exibiram uma altura média de 77 cm com variação entre 58 e 108 cm, ou seja, de 46%, ao passo que, as alturas de inserção da primeira vagem variaram entre 11 e 26 cm com uma média de 17 cm e percentagem de variação de 58%. Esses resultados mostram que existem genótipos que

atendem às características desejáveis de cultivar de soja quanto à altura de plantas e de inserção de primeira vagem (e.g. CD241RR, FM BRS284 e P98Y11RR).

A variação genotípica encontrada entre as cultivares de soja quanto às características avaliadas pode fornecer informações para a tomada de decisão no processo de seleção de cultivares que possuam características agronômicas favoráveis.

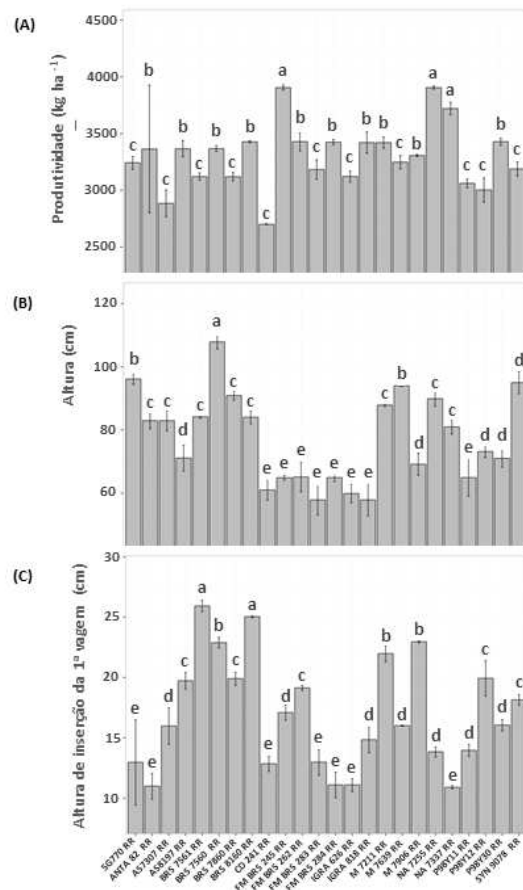


Figura 1 Características agrônômicas de Cultivares de soja comercialmente cultivadas no Brasil

Legenda: Produtividade (A), Altura de planta (B) e Altura de inserção da 1ª vagem (C). Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). Barras de erro padrão indicam erro padrão da média.

3.2 Teores de Fe, Zn, P e fitatos

As diferentes espécies vegetais, bem como cultivares de mesma espécie possuem capacidades distintas em absorver e translocar e

acumular nutrientes, tais como, Zn, Fe e P. Essa capacidade também pode ser influenciada por diversos fatores relacionados ao ambiente e à adaptação das mesmas (GREGORIO et al., 2000; WHITE; BROADLEY, 2009). Vale ressaltar que existe na literatura informações de uma ampla variabilidade genética para os teores de nutrientes presentes nas partes comestíveis das culturas, mas, essa variabilidade também existe para teores de antinutrientes; sendo essas variações uma importante estratégia para o melhoramento de plantas visando biofortificação (RIOS et al., 2009; WHITE; BROADLEY, 2009).

Observa-se pelas Figuras 2 e 3 que houve variação genotípica para os teores de nutrientes (Fe, Zn e P) e de fitatos nos grãos das variedades de soja.

O teor médio de Fe encontrado nos grãos das diferentes cultivares de soja foi de 78 mg kg^{-1} com valores variando entre 58 a 163 mg kg^{-1} , variação de 64% (Figura 2A) enquanto que, o teor médio de Zn foi de 40 mg kg^{-1} , variando entre 31 até 48 mg kg^{-1} (Figura 2B) ou seja, uma diferença de cerca de 35% entre as cultivares. Wiersma e Moraghan (2013) encontraram em sementes de soja uma média de teores de Fe e Zn de 70 e 34 mg kg^{-1} , respectivamente.

Para uma adequada nutrição em Fe, por exemplo, mulheres com idade entre 19 - 50 anos, recomenda-se uma ingestão de 15 mg dia^{-1} (WELCH, 2002). E, a recomendação diária para ingestão de Zn é 12 mg dia^{-1} para mulheres adultas e 15 mg dia^{-1} para homens adultos (ZOU et al., 2014). A dieta básica de uma grande porção da população mundial se dá por meio de cereais (CAKMAK, 2008; VELU et al., 2013).

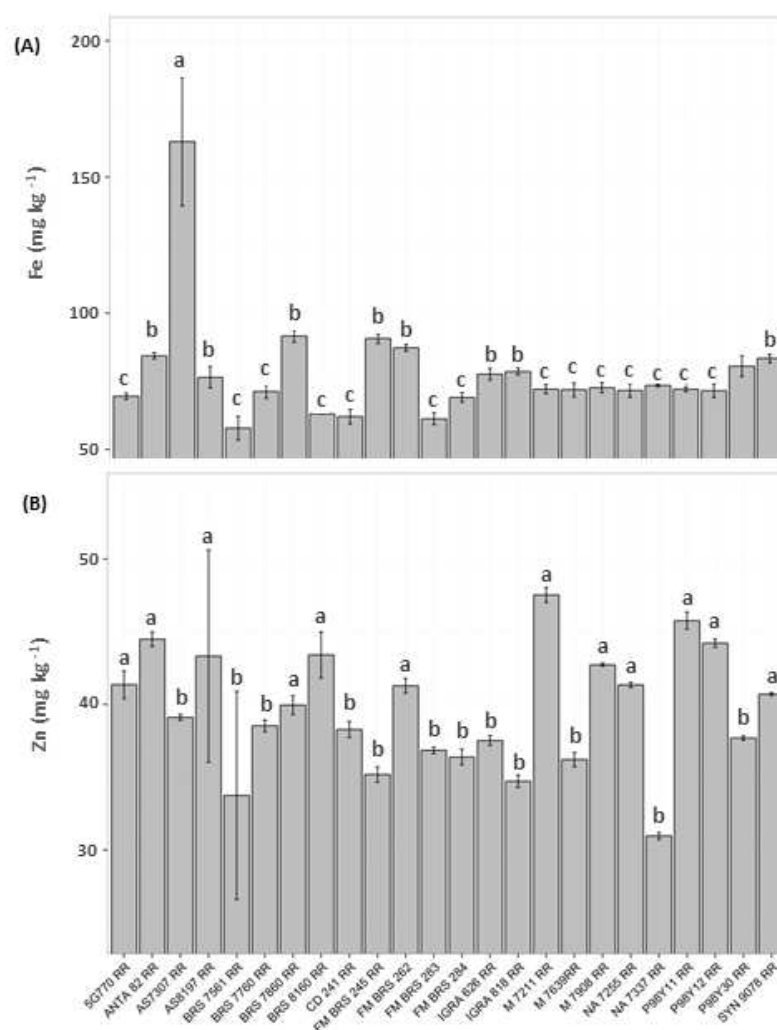


Figura 2 Teores médios de Fe (A) e Zn (B) nos grãos de cultivares de soja comercialmente cultivadas no Brasil

Legenda: Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). Barras de erro padrão indicam erro padrão da média.

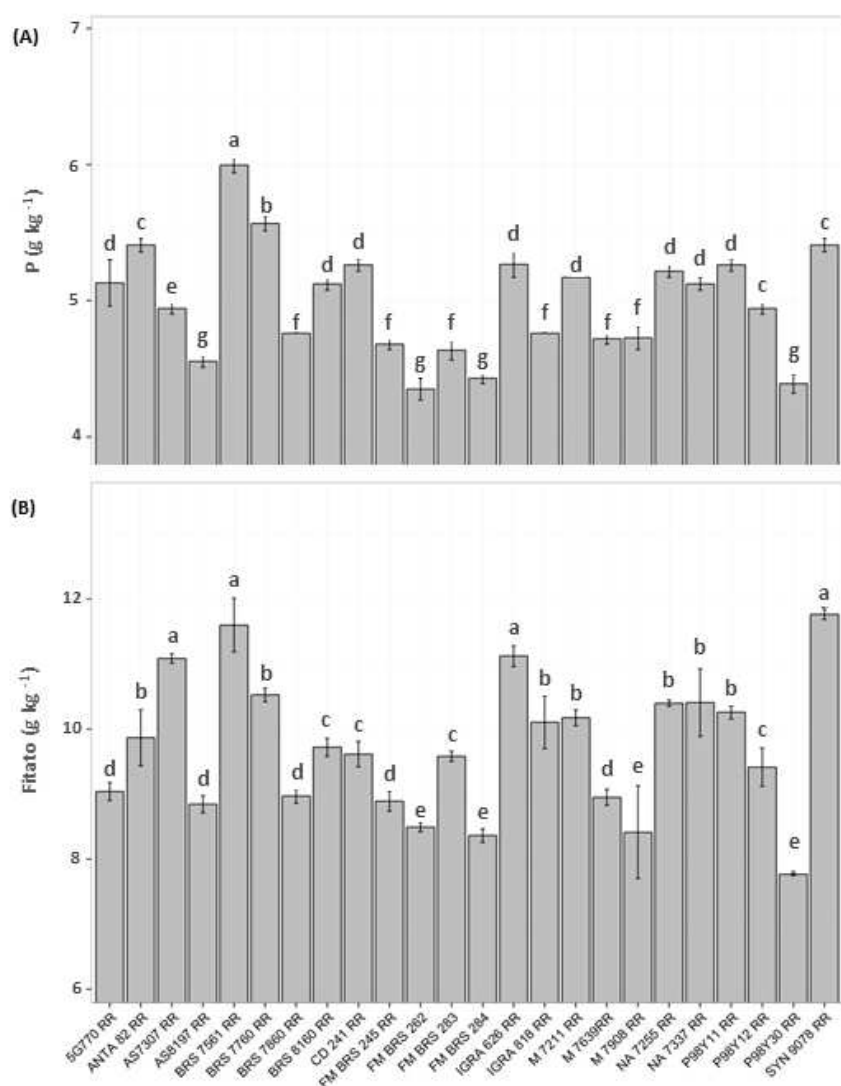


Figura 3 Teores médios de P (A) e de fitatos (B) nos grãos de cultivares de soja comercialmente cultivadas no Brasil

Legenda: Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). Barras de erro padrão indicam erro padrão da média.

Tem sido relatado que cereais e legumes são ricos em minerais tais como Fe e Zn , mas a disponibilidade desses minerais é usualmente baixa devido à presença do fatores antinutricionas, como por exemplo os fitatos (CAKMAK, 2008; VELU et al., 2013).

Avaliou-se também a concentração de P nos grãos de soja nas cultivares em estudo, devido à existência de alta correlação entre a concentração total de P e de fitatos em sementes (RABOY; DICKINSON, 1993; RABOY; DICKINSON; BELOW, 1984). Nota-se, pela Figura 3A, que a variação genotípica entre as cultivares na concentração de P nos grãos foi de aproximadamente 27% (4,35 - 6,00 g kg⁻¹) com valores médios de 4,99 g kg⁻¹ de P nos grãos.

A variação do teor de fitatos nos grãos entre as cultivares de soja foi de 7,7 a 11,8 g kg⁻¹, sendo a variação desses valores de 35%, e 10 g kg⁻¹ o teor médio de fitatos (Figura 3B). O baixo teor de fitatos encontrado em grãos de diversas cultivares de soja apresenta potencial para melhorar o seu valor nutricional (YUAN et al., 2009). Assim, os resultados obtidos neste estudo oferecem informações importantes para tal propósito.

3.3 Correlações entre características agronômicas, nutrientes e fitatos nos grãos

Observa-se pela Tabela 3 baixas correlações ou não significativas entre as variáveis avaliadas, exceto para a relação entre P e fitatos ($r = 0,733$). Esse valor é inferior ao valores de $r = 0,94$ e $r = 0,99$ encontrados por Lolas, Palamidis e Markakis (1976) e Raboy, Dickinson e Below

(1984), respectivamente, em sementes de soja. Essa relativamente alta correlação é possivelmente devido aos fitatos representarem de 50% a 85% do fósforo total em sementes (AKOND et al., 2011; THAVARAJAH et al., 2010).

As baixas e não significativas correlações entre o teor de fitatos e os teores de Fe e Zn nos grãos de soja apresentadas neste trabalho (Tabela 3) estão de acordo com o que tem sido observado em várias espécies, tais como, em grãos de sorgo (REDDY; RAMESH; LONGVAH, 2005), semestes de feijão (AKOND et al., 2011; CICHY et al., 2005) e também em sementes de soja (RABOY; DICKINSON; BELOW, 1984).

Tabela 3 Coeficientes de correlação entre produtividade de grãos (kg ha^{-1}) (PD), altura de plantas (ALP), altura de inserção de primeira vagem (ALIV), teores de Ferro (Fe), Zinco (Zn), fósforo (P) e de fitatos nos grãos de 24 cultivares de soja comercialmente cultivadas no Brasil

	PD	ALP	ALIV	Fe	Zn	P	Fitatos
PD		0,129	0,039	-0,081	-0,101	-0,193	-0,174
ALP			0,323*	0,073	0,150	0,420*	0,267*
ALIV				-0,057	0,223	0,170	0,037
Fe					0,032	-0,176	0,142
Zn						0,054*	-0,033
P							0,733*

*Significante em $p = 0,05$.

Vale ressaltar a grande importância da capacidade produtiva de partes comestíveis das plantas entre os diferentes genótipos e a influência

da mesma na concentração de nutrientes visando a biofortificação. No presente estudo, embora baixa e não significativa, notou-se uma correlação negativa entre produtividade de grãos e teores de nutrientes (Tabela 3). Segundo White e Broadley (2009), pesquisas têm tido recentemente como foco os efeitos do aumento da produtividade nas concentrações de minerais no produto que geralmente é a parte comestível da planta, seja por melhoramento genético ou agrônomico. E, uma variedade de estudos têm demonstrado que as concentrações de vários minerais são baixas em genótipos mais produtivos. Essa redução nos teores de nutrientes muitas vezes coincide com a elevação no peso de massa seca de grãos, concluindo-se que, em grande parte, essa diminuição pode ser oriunda do “efeito de diluição” (FAQUIN, 2005).

Pode-se citar a baixa e negativa correlação encontrada entre produtividade de sementes e concentração de Fe e Zn em genótipos de sorgo (REDDY; RAMESH; LONGVAH, 2005). Na cultura do trigo, por exemplo, diversos autores relatam similar e negativa relação entre as concentrações de Fe, Zn, Mg, Se e P com a produtividade dos grãos observada entre os genótipos (GARVIN; WELCH; FINLEY, 2006; MCDONALD; GENC; GRAHAM, 2008; MONASTERIO; GRAHAM, 2000), embora essa relação seja fortemente influenciada pelo ambiente. Porém, nem sempre correlações negativas entre a concentração de nutrientes e produtividades de partes comestíveis são observadas entre genótipos de plantas cultivadas (WHITE; BROADLEY, 2009).

3.4 Identificação de cultivares com potencial para biofortificação

Em geral, pode-se notar que existe variabilidade entre as 24 cultivares de soja cultivadas comercialmente no Brasil quanto às características agronômicas, teores de nutrientes e antinutriente podendo assim fornecer informações para a seleção de material genético para fins de biofortificação. Sabe-se que a cultivar “ideal” para fins de biofortificação é aquela que apresenta altos teores de micronutrientes tais como, Fe e Zn, e de baixos teores de antinutrientes (e.g. fitatos) e que ainda apresente características agronômicas desejáveis. Existe uma alta relação entre a concentração total de P e de fitatos em sementes (RABOY; DICKINSON; BELOW, 1984).

Diante disso, ao avaliar a variação genotípica entre cultivares de soja quanto às características agronômicas (produtividade, altura de planta, altura de inserção de primeira vagem) e quanto aos teores de nutrientes (Fe, Zn e P) e de fitatos foi possível identificar três cultivares de soja que melhor atendem aos quesitos supracitados e portanto, possuem potencial para biofortificação, sendo essas, duas cultivares de soja transgênica Roundup Ready[®] (AS 8197RR e M 7908RR) e uma de soja convencional (FMS BRS 262).

4 CONCLUSÕES

Existe variabilidade genética para produtividade (kg ha^{-1}), altura de plantas, altura de inserção de primeira vagem, bem como para os teores de ferro, zinco, fósforo e de fitatos nos grãos entre as 24 cultivares de soja comercialmente cultivadas no Brasil.

Considerando-se a produtividade de grãos (kg ha^{-1}), altura de plantas, altura de inserção de primeira vagem, os teores de ferro, zinco, fósforo e de fitatos nos grãos, as cultivares AS 8197RR, M 7908RR e FMS BRS 262 podem ser apropriadas para biofortificação.

ARTICLE 1 Genotypic variation of agronomic characters and content of Fe, Zn, P and Phytates in soybean cultivars

ABSTRACT

The diet of the majority of world population is based in cereals, which generally contain contents of Iron (Fe) and Zinc (Zn) below the demand. Other factors which may interfere in the low ingestion of these nutrients are antinutritional factors found in edible parts of plants, such as heavy metals and phytates. Phytates can chelate various minerals, specially Fe and Zn, what interferes in their absorptive capacity and use by the organism. The purpose of this work was to assess the genotypic variation of 24 commercial soybean cultivars from Brazil, in relation to grain productivity, plants height and of the insertion of the first pod, as well as the content of Fe, Zn, phosphorus (P) and phytates in the grain. According to results, there is genotypic variation for all parameters estimated here. Weak correlation among these parameters were found, except between P and phytates ($r = 0.733$). The diversity found among soybean cultivars provided potential genotypes, such as AS 8197RR, M 7908RR and FMS BRS 262, for the obtainment of cultivars with high capacity in accumulating nutrients in the grain.

Key-words: Biofortification. Antinutrient. Micronutrient. Nutritional quality. *Glycine max*.

REFERÊNCIAS

AKOND, A. S. M. G. M. et al. Minerals Zn Fe Ca and Mg and antinutrient (Phytic Acid) constituents in common bean. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 235-243, 2011.

AMARAKOON, D. et al. Iron-, zinc-, and magnesium-rich field peas (*Pisum sativum* L.) with naturally low phytic acid: a potential food-based solution to global micronutrient malnutrition. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 27, n. 1, p. 8-13, Aug. 2012.

AMARAL, V. M. G. **A importância da soja como alimento funcional para qualidade de vida e saúde**. 2006. 71 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BLAIR, M. W. et al. Inheritance of seed phytate and phosphorus levels in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and association with newly-mapped candidate genes. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 30, n. 3, p. 1265-1277, Feb. 2012.

CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? **Plant and Soil**, The Hague, v. 302, n. 1/2, p. 1-17, Nov. 2008.

CICHY, K. A. et al. Inheritance of seed zinc accumulation in navy bean. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 3, p. 864-870, May 2005.

DORIA, E. et al. Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (*Zea mays* L.) low phytic acid mutant. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 967-978, Jan. 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Rio de Janeiro, 2013. 353 p.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005. 183 p.

GARVIN, D. F.; WELCH, R. M.; FINLEY, J. W. Historical shifts in the seed mineral micronutrient concentration of US hard red winter wheat germplasm †‡. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, n. 13, p. 2213-2220, Oct. 2006.

GREGORIO, G. B. et al. Breeding for trace mineral density in rice. **Food and Nutrition Bulletin**, Davis, v. 21, n. 4, p. 382-386, 2000.

KHUSH, G. S. et al. Biofortification of crops for reducing malnutrition. **Plant Biotechnology Reports**, London, v. 6, n. 3, p. 195-202, Jan. 2012.

LOLAS, G. M.; PALAMIDIS, N.; MARKAKIS, P. The phytic acid-total phosphorus relationship in barley, oats, soybeans, and wheat. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 53, n. 6, p. 867-871, 1976.

MA, G. et al. Phytate, calcium, iron, and zinc contents and their molar ratios in foods commonly consumed in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 26, p. 10285-90, Dec. 2005.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MAYER, J. E.; PFEIFFER, W. H.; BEYER, P. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 166-170, Apr. 2008.

MCDONALD, G. K.; GENC, Y.; GRAHAM, R. D. A simple method to evaluate genetic variation in grain zinc concentration by correcting for differences in grain yield. **Plant and Soil**, The Hague, v. 306, n. 1/2, p. 49-55, May 2008.

MONASTERIO, I.; GRAHAM, R. D. Breeding for trace minerals in wheat. **Food and Nutrition Bulletin**, Davis, v. 21, n. 4, p. 392-396, 2000.

NAPPI, G. U. et al. Validação de métodos para determinação dos ácidos fítico e oxálico em multimistura. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 811-820, 2006.

PIRES, L. P. M. et al. Desempenho de genótipos de soja , cultivados na região centro-sul do Estado do Tocantins, safra 2009/2010. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 2, p. 214-223, 2012.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and enviroment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2009. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

RABOY, V.; DICKINSON, D. B. Phytic acid levels in seeds of glycine max and G. soja by Phosphorus Status. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 6, p. 1300-1305, Nov. 1993.

RABOY, V.; DICKINSON, D. B.; BELOW, F. E. Variation in seed total phosphorus, phytic acid, Zinc, Calcium, Magnesium, and protein among lines of glycine max and G. soja. **Crop Science**, Madison, v. 24, p. 431-434, June 1984.

REDDY, B. V.; RAMESH, S.; LONGVAH, T. Prospects of breeding for micronutrients and β -Carotene-Dense sorghums. **International Sorghum and Millets Newsletter**, Southampton, v. 46, n. 1, p. 10-14, 2005.

RÍOS, J. J. et al. Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 248-255, May 2008.

RIOS, S. D. A. et al. Biofortificação: culturas enriquecidas com micronutrientes pelo melhoramento genético. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 56, n. 6, p. 713-718, 2009.

SOUZA, G. A. de et al. Evaluation of germplasm effect on Fe, Zn and Se content in wheat seedlings. **Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology**, Shannon, v. 210, p. 206-213, Sept. 2013.

SOUZA, R. F. de et al. Carbonate-silicate ratio for soil correction and influence on nutrition, biomass production and quality of palisade grass. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 526-534, Sept./Oct. 2011.

THAVARAJAH, D. et al. Phytic acid and Fe and Zn concentration in lentil (*Lens culinaris* L.) seeds is influenced by temperature during seed filling period. **Food Chemistry**, Oxford, v. 122, n. 1, p. 254-259, 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World agricultural production**. Washington, 2015. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils**. Washington, 2007. 30 p.

VELU, G. et al. Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. **Journal of Cereal Science**, London, v. 59, n. 3, p. 365-372, May 2013.

WELCH, R. M. The impact of mineral nutrients in food crops on global human health. **Plant and Soil**, The Hague, v. 247, n. 1, p. 83-90, Nov. 2002.

WELCH, R. M.; GRAHAM, R. D. Breeding crops for enhanced micronutrient content. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, n. 1, p. 205-214, Aug. 2002.

WELCH, R. M.; GRAHAM, R. D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 396, p. 353-364, 2004.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets--iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, Cambridge, v. 182, n. 1, p. 49-84, 2009.

WIERSMA, J. V.; MORAGHAN, J. T. Within-seed distribution of selected mineral elements among soybean genotypes that vary in iron efficiency. **Crop Science**, Madison, v. 53, n. 5, p. 2051-2062, 2013.

YUAN, F. J. et al. Effects of two low phytic acid mutations on seed quality and nutritional traits in soybean (*Glycine max* L. Merr). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 9, p. 3632-3638, May 2009.

ZOU, T. et al. Biofortification of soybean sprouts with zinc and bioaccessibility of zinc in the sprouts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 94, n. 14, p. 3053-3060, Nov. 2014.

ARTIGO 2 Genotypic variation of zinc accumulation in soybean seedlings

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NORMA DO
PERIÓDICO CIÊNCIA E AGROTECNOLOGIA**

ABSTRACT

Zinc (Zn) is an essential mineral for the humans, animals and plants metabolism. The increasing of its concentration may be a practicable alternative to reduce nutritional complications in crops, resulting from zinc deficiency in the soil, especially in developing countries. Aiming to assess the genotypic variation in seedlings of soybean cultivars (*Glycine max* (L.) Merrill.), under treatment using adequate ($1\mu\text{M ZnSO}_4$) and no ($0\mu\text{M ZnSO}_4$) contents of zinc; and the effect of these treatments in plants growth, nutritional characteristics and relative expression of key genes involved in the zinc homeostasis; 15 cultivars were selected. Soybean seedlings were kept under treatment for two weeks. According to results, all cultivars showed differences in terms of roots size and plants growth per treatment, what suggested variability among cultivars in accumulating zinc. Three soybean cultivars, namely TMG 1174 RR, BRS 257 and SYN 9070 RR, showed evident symptoms of zinc deficiency, more than in other cultivars. These different capacities seem to be associated with some changes in the relative expression of genes involved in the absorption and assimilation of zinc. The ZIP1, IRT3 and NAS2 genes were well expressed under zinc deficiency conditions. Therefore, some soybean cultivars, such as BRS213, BRS 800A and BRS 790 RG were found to be potential for the obtainment of varieties with high capacity in accumulating zinc in edible parts of plants, as well as for plants growth under low content of zinc in the soil.

Key-words: *Glycine max*. Zinc deficiency. Iron. Nutritive solution. Interaction among minerals. Genes expression.

RESUMO

O Zn é um elemento essencial para o metabolismo humano, animal e também das plantas. O aumento da concentração de Zn em plantas cultivadas pode ser uma alternativa viável para atenuar as complicações nutricionais causadas pela deficiência de Zn no mundo, especialmente em países em desenvolvimento. Foram selecionadas 15 cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill.] com o objetivo de avaliar a variação genotípica em resposta aos tratamentos de Zn suficiente ($1\mu\text{M ZnSO}_4$) e deficiência de Zn ($0\mu\text{M ZnSO}_4$) quanto ao crescimento de plantas, características nutricionais e expressão relativa de genes-chave envolvidos na homeostase de Zinco. As plântulas de soja permaneceram sob os tratamentos durante duas semanas. As cultivares de soja exibiram diferença em termos de tamanho total de raiz e crescimento de plantas em resposta aos tratamentos indicando variabilidade genotípica entre as cultivares em acumular Zn. Três cultivares de soja (TMG 1174 RR, BRS 257 e SYN 9070RR) exibiram sintomas de deficiência de Zn mais evidentes que as demais. As diferentes habilidades que as cultivares de soja apresentaram parecem estar associadas à alguma alteração na expressão relativa de genes envolvidos na absorção e assimilação de Zn. Na soja, os genes ZIP1, IRT3 e NAS2 são mais expressos sob deficiência de Zn. De acordo com os resultados, cultivares de soja, tais como, BRS213, BRS 800A e BRS 790 RG apresentam potencial para obtenção de cultivares com maiores habilidades em acumular Zn em partes comestíveis bem como, para o crescimento sob condições de solos com relativa baixa concentração em Zn.

Palavras-chave: *Glycine max*. Deficiência de Zn. Ferro. Solução nutritiva. Interação entre minerais. Expressão de genes

1 INTRODUCTION

Micronutrients are some of the most important requirement in human nutrition and their deficiency is a well-known health problem worldwide, which affects more than 3 billion people in the world. Deficiencies in Zn are common and estimated to affect over 30 percent of the global population. Zn is an essential element for humans, plants and animals. Zn is required for the activity of a large number of proteins, such as transcription factors and metalloenzymes (SADEGHZADEH, 2013). Biofortification of crops is an important strategy for improving the mineral status of staple foods with respect to micronutrients, namely Zn. Genetic and agronomic biofortification have focused on enhancing the efficiency of elemental uptake and accumulation in plants (YIN; YUAN, 2012).

One of the major reasons for the widespread occurrence of Zn deficiency in humans is due a diet consisting of a high proportion of staple foods (vegetables) with low Zn bioavailable, especially in developing countries (SADEGHZADEH, 2013). Vegetables are inherently very low in Zn concentrations in edible parts, particularly when grown on Zn-deficient soils (CAKMAK, 2008). Most soils with low plant-available Zn can be treated with Zn fertilizers to correct crop Zn deficiency. Moreover, Zn fertilizers may be unavailable or unaffordable in developing countries. Due of the widespread Zn deficiency problems and difficulties in alleviating this deficiency with fertilizers, the development of crops that are efficient Zn accumulators, especially under low soil Zn conditions, could be an alternative for improving Zn deficiency tolerance, grain productivity and micronutrient quality (SADEGHZADEH, 2013). Genotypic variation within a crop species affects their ability to accumulate nutrient, such as Zn. Substantial genetic variation in Zn accumulation has been reported in many crops (KLING; MENKIR; DIXON, 2000; SOUZA et al., 2014; WELCH; GRAHAM, 2002).

Transporter and others types of proteins are involved in uptake and transport of cationic micronutrients in cells. Generally, the genes encoding the Zn transporter proteins are expressed in response to Zn deficiency. But, the role of these proteins in genotypic variation for Zn deficiency tolerance or Zn accumulation is not sufficiently clear (CAKMAK, 2008). Hence, making use of genotypic variation and investigation of the transcripts levels' key genes in Zn uptake and assimilation pathways are achievable and can be an effective method to get information for Zn biofortification purpose in crops.

Brazil is one of the majors the world's producer and exporter of soybeans and products (soy oil and soymeal). Soybean (*Glycine max*) is a crop that has satisfactory amounts of proteins, carbohydrates, lipids, vitamins, and minerals. As a result, its enrichment with Zn would be an alternative to combat malnutrition of human and animals (ZOU et al., 2014). Exploiting genotypic variation is likely to be effective in providing information for breeding varieties that simultaneously accumulate high levels of Zn and contribute nutritional improvements in soybean.

The newly grown plants has been used to evaluate genotypes for resistance to metal toxicities and deficiency in divers crops including soybean (GRAHAM et al., 1992, 1993; HUANG; GRAHAM, 1990) . We examined 15 seedlings of Brazilian soybean varieties to gain a better understand mineral nutrition in soybean genotypes in response to Zn sufficient and deficiency on seedlings growth as well as on Zn accumulation and the expression of some genes involved in Zn homeostasis. The effects of Zn treatments on Fe accumulation in these soybean varieties were also examined to give a general view of these mineral interactions in soybean plants.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials and treatments

The experiment was performed in a climate chamber, at Laboratory of Genetics, Wageningen University, Wageningen, Netherlands. Seeds of fifteen of selected Brazilian soybean varieties were germinated on germination paper. The 7-day-old seedlings were transferred to 600 mL polyethylene pots containing half strength Hoagland's nutrient solution (HOAGLAND; ARNON, 1950) containing $1\mu\text{M}$ ZnSO_4 . The pH buffer 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) was added at 2mM and the pH was set at 5.5 using potassium hydroxide (KOH). After 6 days, the soybean seedlings were supplied with Zn sufficient/control ($1\mu\text{M}$ ZnSO_4) and Zn deficient ($0\mu\text{M}$ ZnSO_4). The experiments were disposed in completely randomized design in a 15 x 2 factorial scheme, by means of 15 soybean varieties and two levels of Zn (0 and $1\mu\text{M}$ ZnSO_4), with seven replicates. After 2 weeks of Zn deficient exposure or control seedlings were harvested. Three biological replicates were harvested and frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -86°C until use in RT-PCR and four biological replicates were used for all other analysis.

2.2 Root architecture

The ability of seedlings of Brazilian soybean varieties to tolerate Zn deficiency was tested through total root length by scan. The roots were preserved in their respective nutrient solution at 4°C until measurements. Roots were gently rinsed for at least 3 minutes under distilled water. Then they were arranged in a tray with a shallow film of distilled water to avoid overlapping of roots and subsequently scanned. Total root lengths of four biological replicates were measured using WinRHIZO (REGENT INSTRUMENTS, 2014).

2.3 Assessment of Zn and Fe concentrations

For Zn and Fe analyses, shoot samples were digested in a CEM® Mars-5 microwave oven system (CEM Corporation, Matthews, NC, USA), following the USEPA 3051A method (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA, 2007). The Zn and Fe contents in the digested solutions were determined by flame atomic absorption spectrometry. To check the accuracy of elemental determinations were used NIST standard reference material (SRM 1573a Tomato Leaves), which was found satisfactory, 100.2 for Zn and 72.7% for Fe. Roots did not produced biomass sufficient to analyze mineral concentration of them.

2.4 RNA isolation, reverse Transcripton, design of Primers and quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted from shoots and roots as described by (OÑATE-SÁNCHEZ; VICENTE-CARBAJOSA, 2008). The RNA concentration and quality were determined using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). All RNA samples had a A260:230 ratios of over 2.1 and a A260:A280 ratio of 2.1, so the quality of RNA was good enough for further qRT-PCR analysis. Reverse Transcription into cDNA were performed by iScript™ cDNA Synthesis Kit from Bio-Rad using 1µg of RNA. For the normalization of ZIP1, IRT3 and NAS2 expression in soybean seedlings was used ACT3 as reference gene. Primers pairs (Table 1) representing one reference gene (ACT3) and another genes (ZIP1, IRT3 and NAS2) were designed and tested by 'Primer 3' (UNTERGASSER et al., 2012). qRT-PCR were operated by using the kit of iQTMSYBR Green Supermix (Bio-Rad), including 5µL of iQ SYBR Green Supermix, 3µM of forward and reverse primers, and 3 µL of 10 times diluted cDNAs (corresponding to 3ng/µL RNA) in a total volume of 10µL. Three biological repeats per treatment and two technical repeats per

biological repeat were included in the qRT-PCR analysis. The qRT-PCR was carried out by heating the reactions 3 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 10 seconds at 95°C and 30 seconds at 55°C. Then, 10 seconds at 95°C and posteriorly changed to 65°C and was increased 5°C continuously during the heating until 95°C. The relative transcript levels (RTLs) were calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). For all gene, expression of their respective shoot transcripts in the variety TMG 1174 RR under Zn sufficient (1µM ZnSO₄) was used as the calibration (RTL = 1).

Table 1 List of primers used in the study

genes	forward primer (5'-3',top)	acession
	reverse primer (5'-3', bottom)	
ACT3	TGCATTGCTTCCAGACAAAT GTGTCTGGATCGGTGGTTCT	BW674478.1
ZIP1	GCTTTCGAGAACCTCACGTC TCATGCCCTGATTCCTTTTC	AY029321.1
IRT3	CATCGCTTCCATTCTCCTCT TGAAGGGAAACTTGGACCAC	Glyma06g05460.4
NAS2	CCGCTTTGAAGGAGTACGAG GACAACCGAATTGACGACCT	Glyma03g39050.1

2.5 Statistical analyses

Data were statistically evaluates through analysis of variance (ANOVA) at 95% confidence, tests following the Tukey's test used to compare mean values. The statistical software used was Sisvar 5.3 Build 77 (FERREIRA, 2011). Where needed, Pearson correlations were performed in the Minitab 17 statistical software (MINITAB INC, 2014).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Total root length and seedlings growth in response to Zn sufficient and Zn deficiency

The new center of attention of plant breeding programs has been the exploration of genotypes with high quality of food crops and as much as possible high productivity of grains (MAYER; PFEIFFER; BEYER, 2008; SOUZA et al., 2013). The heavier grains attribute to better germination and seedling growth (SOUZA et al., 2014). Thus, the genotypic variation of soybean based on growth of seedlings could be helpful to find a potential variety for biofortification purpose.

The genotypic variation on Zn sufficient and tolerance of Zn deficiency was evaluated in selected Brazilian soybean varieties to understand growth dynamic based on three parameters: total root length, deficiency symptoms and growth rate (dry weight).

Total root length of soybean seedlings varied in these selected Brazilian soybean varieties grown under Zn sufficient ($1\mu\text{M ZnSO}_4$) (Figure 1). An over to 1.7 fold difference in total root length was detected in these soybean varieties grown hydroponically in normal conditions (the values ranged from 361 to 644 cm, ($p\leq 0.05$; $n=4$)).

In comparison with other tissues of plants root growth is more rapidly affected upon metal exposure (CARVALHO et al., 2013), for that reason root length has previously been suggested to be an efficient parameter to evaluate metal deficiency. As expected, total root length measurements confirmed the effect of Zn deficiency ($0\mu\text{M ZnSO}_4$), on Brazilian soybean varieties. However, most of these soybean varieties (eleven) were not affected by Zn deficiency on root length ($p\leq 0.05$; $n=4$) (Figure 1).

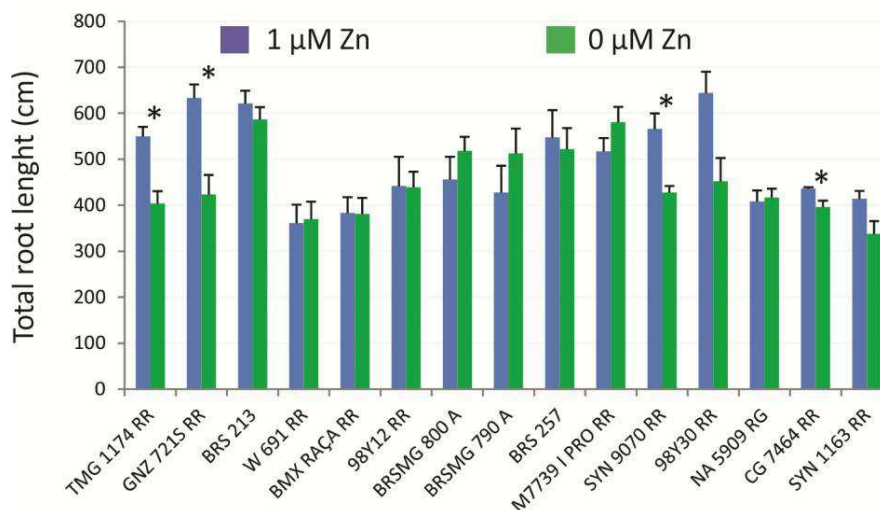


Figure 1 Effect of Zn sufficient ($1\mu\text{M ZnSO}_4$) and Zn deficiency ($0\mu\text{M ZnSO}_4$) on total root length in seedlings of Brazilian soybean varieties. Asterisks above the column indicate significant difference at $p \leq 0.05$ for Zn conditions. Error bars indicate the standard error of the mean ($n=4$).

The soybean varieties plant exhibited light green of young leaves starting in the first week of Zn deficiency exposure and reduced growth rate at Zn deficiency ($0\mu\text{M ZnSO}_4$), confirming their sensibility to Zn deficiency. Severity of Zn deficiency symptoms in the absence of Zn was less pronounced in twelve varieties than TMG 1174 RR, BRS 257 and SYN 9070RR (Figure 2). Our results are in agreement with Hafeez, Khanif and Saleem (2013) who described the Zn deficiency symptoms first appear on young leaves as Zn is immobile under conditions of deficiency of this metal. Zinc deficient plants are lack vigor; give patchy appearance with short and thin stems.

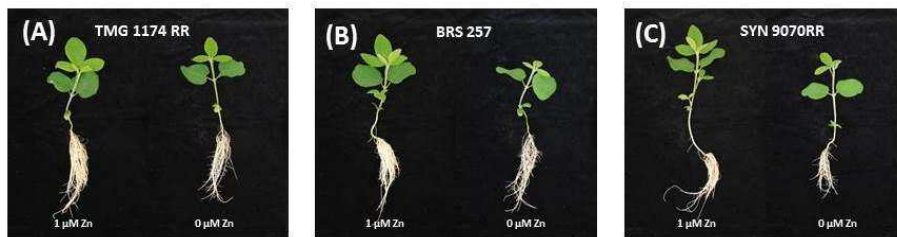


Figure 2 Seedlings of Brazilian soybean varieties after 2 weeks of exposure to Zn sufficient ($1\mu\text{M ZnSO}_4$) and Zn deficiency ($0\mu\text{M ZnSO}_4$).

As shown in Figure 3, these soybean varieties exhibited up to 1.7-fold difference in their shoot biomass (Figure 3A) and over 2.3-fold in roots (Figure 3B) when they grew in the Zn sufficient conditions. The exposure to Zn deficiency was expected to affect biomass of these soybean varieties, production decreased notably, but were not significantly ($p\leq 0.05$; $n=4$) in ten varieties for shoot (Figure 3A) and in twelve varieties for roots when comparing plants grown at Zn sufficient conditions (Figure 3B). Zinc deficiency affects the absorption of water and nutrients from substrate and thus resulting in growth reduction in the plant (HAFEEZ; KHANIF; SALEEM, 2013).

These results indicate that soybean seedlings exhibits genetic variation for growth dynamic in utilization of Zn at the Zn sufficient and deficiency.

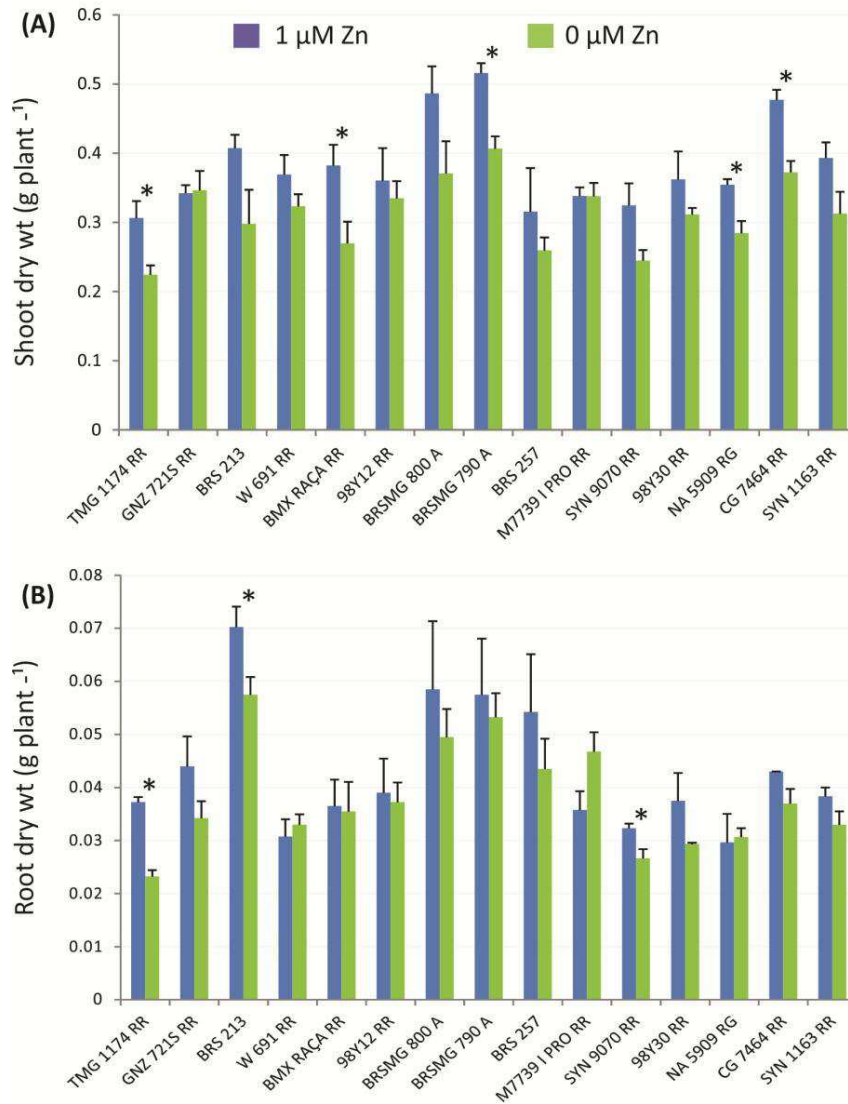


Figure 3 Effect of Zn sufficient (1μM ZnSO₄) and Zn deficiency (0μM ZnSO₄) on dry weights of the shoot (A) and root (B) in seedlings of Brazilian soybean varieties. Asterisks above the column indicate significant difference at $p \leq 0.05$ between Zn sufficient and Zn deficiency. Error bars indicate the standard error of the mean (n=4).

3.2 Accumulation of Zn in shoots

Plants demand the suitable balance of Zn for normal growth and optimum yield. Zn deficiencies also decrease the amount of Zn in grain and reduce its nutritional quality (SADEGHZADEH, 2013). In general, soybean and others crops have Zn deficiency as a common problem especially when grown on alkaline calcareous and sandy soils of low organic matter contents (AHMAD et al., 2012; ALLOWAY, 2008; SADEGHZADEH, 2013).

The potential productivity and quality of food crops may be regulated by genetic factors along with physiological and biochemical factors which determine crop nutrient uptake; and these factors differ among plant species, cultivars, tissues and organs (REDDY; TUCKER; DUNN, 1987; SOUZA et al., 2013; WHITE; BROADLEY, 2009).

The evaluation of genotypic variation of Zn accumulation can be useful to identify cultivars that can remain productive even in Zn deficiency conditions and also for a potential of better crop nutritional quality (SADEGHZADEH, 2013).

Zn accumulation on shoot were measured from plants growing in hydroponic conditions after 2 weeks of exposure to Zn sufficient ($1\mu\text{M ZnSO}_4$) and Zn deficiency ($0\mu\text{M ZnSO}_4$) to examine the Zn status and the genetic variation of soybean seedlings varieties (Figure 4). The biomass production of roots was not enough to analyze mineral concentration of them.

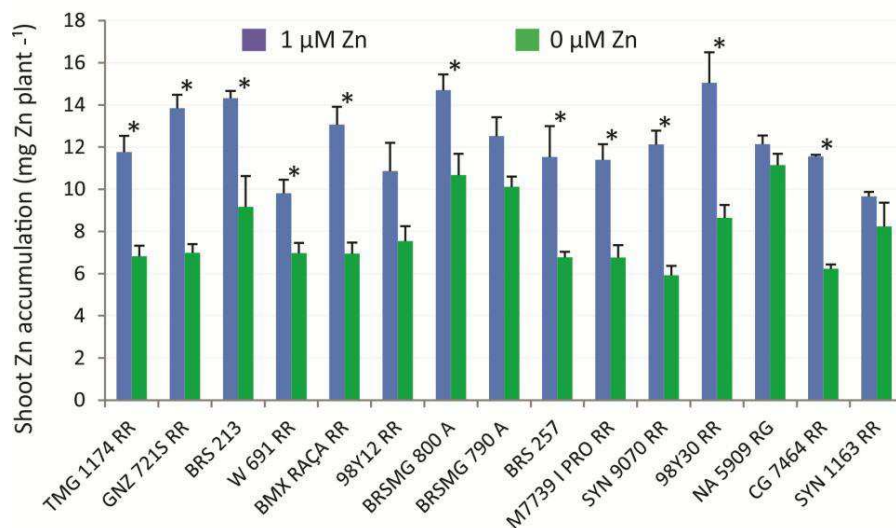


Figure 4 Effect of Zn sufficient ($1\mu\text{M ZnSO}_4$) and Zn deficiency ($0\mu\text{M ZnSO}_4$) on Zn accumulation in seedlings of Brazilian soybean varieties. Asterisks above the column indicate significant difference at $p \leq 0.05$ between Zn sufficient and Zn deficiency. Error bars indicate the standard error of the mean ($n=4$).

As shown in Figure 4, the fifteen soybean varieties showed different capacity to accumulate Zn, when they grew in normal conditions. These soybean varieties exhibited over 1.5-fold variation on their Zn accumulation when they grew in the nutrient solution with Zn sufficient, ranging from 9.7 to 15.0 mg plant⁻¹ DW ($p \leq 0.05$; $n=4$). A general reduction of Zn accumulation was observed under Zn deficiency and for four of these soybean varieties (98Y12 RR, BRSMG 790 A, NA 5909 RG, SYN 1163 RR) was not significant (Figure 4).

The variations among these soybean varieties are in agreement with other reports demonstrating that soybean varieties have different ability in utilization of Zn (GRAHAM et al., 1993; MOTTAGHIAN et al., 2008) and

different tolerance of Zn deficiency (AHMAD et al., 2012; GRAHAM et al., 1993).

3.3 Zn sufficient and Zn deficiency on Fe accumulation

Metals such as Zn and Fe have vital roles in life cycle of plant and very important for normal growth plants and edible parts of the plant will provide benefits for animal and human nutrition (KOBRAEE et al., 2011). Antagonism between Zn and Fe is well known. Understanding of mineral accumulation in soybean is a prerequisite to develop Zn rich soybean without negative effects on iron accumulation and other nutritional characteristics.

The exposure to Zn sufficient and Zn deficient is expected to affect the plant nutrient status in different forms according to the genotypic variation, such as Fe, which often interacts with Zn. To see whether Zn deficiency affected the accumulation of Fe, we measured this mineral accumulation in response to Zn sufficiency and deficiency and examined their interactions.

When these plants soybean grown on Zn sufficient, different levels of Fe were accumulated in the soybean varieties showing genetic variation in response to this treatment (Figure 5). The soybean varieties exhibited 2.3-fold variation in Fe accumulation among soybean varieties, ranging from 22.6 to 51.8 mg plant⁻¹.

In general the Fe accumulation of these soybean varieties was increased under Zn deficiency, but, did not change much in response to that condition. The data agree with other publications showing that Zn deficiency condition could increase Fe accumulation in plants (HAFEEZ; KHANIF; SALEEM, 2013). In contrast, Fe accumulation was significantly suppressed by Zn deficiency in two lines (NA 5909 RG, CG 7464 RR). There were negative correlation between the Zn and Fe accumulation in the shoots, but was not significant according with (KOBRAEE et al., 2011) who found a negative correlation between Zn and Fe concentration on shoots of soybean which also was not significant.

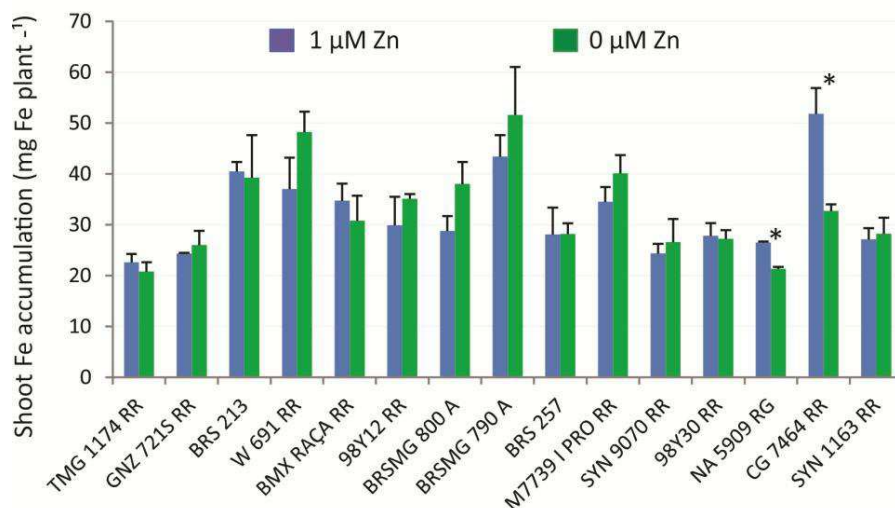


Figure 5. Effect of Zn sufficient ($1\mu\text{M ZnSO}_4$) and Zn deficiency ($0\mu\text{M ZnSO}_4$) on Fe accumulation in seedlings of Brazilian soybean varieties. Asterisks above the column indicate significant difference at $p \leq 0.05$ between Zn sufficient and Zn deficiency. Error bars indicate the standard error of the mean ($n=4$).

3.4 Expression of genes involved in Zn metabolism.

We investigated the transcript levels of three key genes (ZIP1, IRT3 and NAS2) in response to Zn sufficient and Zn deficient in shoots and roots of soybean varieties by quantitative RT-PCR. These genes have important functions of Zn metabolism in plants. Thus, examination of expression of these genes in shoots and roots should help us to gain a better understanding of Zn assimilation and translocation in soybean.

In general, the relative expression level of the genes ZIP1, IRT3 and NAS2) in response to Zn sufficient and Zn deficient in shoots and roots varied depending on cultivars (Figure 6). The genotypic variation among these soybean

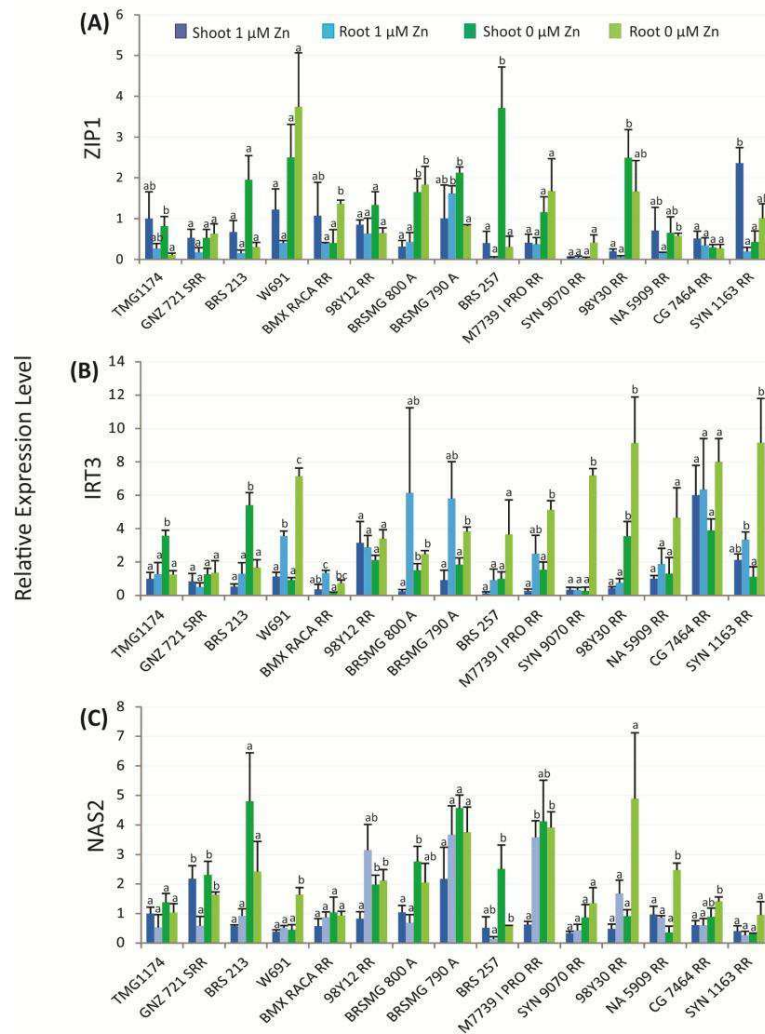


Figure 6 Relative expression of genes involved in Zn homeostasis in response to Zn sufficient ($1\mu\text{M}$ ZnSO_4) and Zn deficiency ($0\mu\text{M}$ ZnSO_4) in seedlings of Brazilian soybean varieties. Transcript levels were measured in shoot and root by qRT-PCR. The expression of shoot in the variety TMG 1174 RR Zn sufficient samples was set to 1. Data are means of two technical trials with three biological repeats. Letters above the bars indicate significant difference between the four columns for each variety at the 5% level as judged by Tukey's statistical method. Error bars indicate the standard error of the mean (n=3).

varieties occasioned Zn accumulation at different levels when exposed to Zn sufficient and Zn deficiency. The different capacity to accumulate Zn in response to both conditions was found to be associated with altered expression of ZIP1, IRT3 and NAS2.

Zinc influx facilitators, members of the Zrt- and Irt related protein (ZIP) family of metal transporters, are involved in zinc uptake in plants. ZIP1 and IRT3 are functionally characterized as zinc uptake transporters (ASSUNÇÃO et al., 2010). ZIP1 which participate in control of metal influx (IDE, 1998; LÓPEZ-MILLÁN; ELLIS; GRUSAK, 2004; MOREAU et al., 2002; RAMESH et al., 2003) and IRT3 are also involved in transmembrane transport (BROADLEY et al., 2007; CHIANG; LO, 2006; LIN et al., 2009; TALKE; HANIKENNE; KRÄMER, 2006).

As shown in Figure 6A, when the soybean varieties were exposed to Zn deficiency was observed increased of the relative expression of ZIP1 in shoots (9 fold) of three varieties (BRSMG 800 A, BRS 257, 98Y30 RR) and in roots (up to 3 fold) of three varieties (BMX RACA RR, BRSMG 800 A, NA 5909 RG). In contrast, relative expression of ZIP1 in roots of another variety (BRSMG 790 A) responded differently to Zn deficiency.

Examination of IRT3 expression in these soybean varieties revealed that in general IRT3 levels of expression was most strongly expressed gene in roots (Figure 6B). These gene was up-regulated in response to Zn deficiency for shoots and roots, but significantly high expression in that conditions was observed in shoots (7 fold) of four varieties (TMG 1174 RR, BRS 213, BRSMG 800 A, 98Y30 RR) and in roots (up to 11 fold) of three varieties (W 691 RR, SYN 9070RR, 98Y30 RR) ($p \leq 0.05$; $n=3$).

Nicotianamine synthase genes (NAS) encoding enzymes that catalyse the synthesis of NA (nicotianamine) and they are more highly expressed in roots. NA is a high affinity metal chelator and play a role in long-distance of

metal (ALVAREZ-FERNÁNDEZ et al., 2014; DEINLEIN et al., 2012; SINCLAIR; KRÄMER, 2012; TALKE; HANIKENNE; KRÄMER, 2006). Compared to Zn sufficient conditions (1 μ M ZnSO₄), in these soybean varieties, NAS2 expression was up-regulated under Zn deficiency (Figure 6C). Significantly high levels of expression of NAS2 were seen under Zn deficient conditions (1 μ M ZnSO₄) in shoots (2.5 fold) of two varieties (98Y12 RR, BRSMG 800 A) and in roots (up to 3 fold) of five varieties (GNZ 721S RR, W 691 RR, BRS 257, NA 5909 RG, CG 7464 RR) ($p \leq 0.05$; $n=3$) (Figure 6C).

The data are agreement with other studies showing that ZIP1, IRT3 and NAS2 genes are also up-regulated under Zn deficiency in others plants (ASSUNÇÃO et al., 2010; TALKE; HANIKENNE; KRÄMER, 2006).

4 CONCLUSION

These results suggest that genotypic variation for response to Zn sufficient and Zn deficiency in terms of plant growth as well as Zn and Fe accumulation is present in soybean seedlings.

The different ability of soybean varieties to accumulate Zn treatment appeared to be associated to an altered expression of genes involved in Zn uptake and assimilation. The genes ZIP1, IRT3 and NAS2 are up-regulated under Zn deficiency in soybean.

In consideration of the Zn accumulation, plant growth and the interaction with Fe, the Brazilian soybean varieties such as BRS213, BRS 800A e BRS 790 RG may be a very useful genetic resource in developing soybean varieties for growth on low zinc soils and in physiological studies to understand differing approaches to nutrient accumulation in edible tissues/organs and particularly, in biofortification purpose.

REFERENCES

AHMAD, W. et al. Zinc deficiency in soil, crops and humans. **Agrochimica**, Pisa, v. 56, n. 2, p. 65-97, 2012.

ALLOWAY, B. J. **Zinc in soils and crop nutrition**. Brussels: International Zinc Association, 2008. 137 p.

ALVAREZ-FERNÁNDEZ, A. et al. Metal species involved in long distance metal transport in plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, Jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3971170>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

ASSUNÇÃO, A. G. L. et al. Arabidopsis thaliana transcription factors bZIP19 and bZIP23 regulate the adaptation to zinc deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 22, p. 10296-10301, June 2010.

BROADLEY, M. R. et al. Zinc in plants. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 173, n. 4, p. 677-702, Jan. 2007.

CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? **Plant and Soil**, The Hague, v. 302, n. 1/2, p. 1-17, Nov. 2008.

CARVALHO, M. T. V. et al. Gomphrena claussenii, the first South-American metallophyte species with indicator-like Zn and Cd accumulation and extreme metal tolerance. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, June 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23750166>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

CHIANG, H.; LO, J. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn / Cd hyperaccumulator arabidopsis halleri: a genomic survey with cDNA microarray. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 40, n. 21, p. 6792-6798, 2006.

DEINLEIN, U. et al. Elevated nicotianamine levels in Arabidopsis halleri roots play a key role in zinc hyperaccumulation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 2, p. 708-23, Feb. 2012.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GRAHAM, M. J. et al. Response of soybean genotypes to boron , zinc and manganese deficiency in tissue culture. **Plant and Soil**, The Hague, v. 150, n. 2, p. 307-310, 1993.

GRAHAM, M. J. et al. Soybean genotype evaluation for iron deficiency chlorosis using sodium bicarbonate and tissue culture. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 15, n. 8, p. 1215-1225, Aug. 1992.

HAFEEZ, B.; KHANIF, Y. M.; SALEEM, M. Role of zinc in plant nutrition: a review. **American Journal of Experimental Agriculture**, Delaware, v. 3, n. 2, p. 374-391, Apr./June 2013.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. 34 p. (Circular California Agricultural Experiment Station, 347).

HUANG, C.; GRAHAM, R. Resistance of wheat genotypes to boron toxicity is expressed at the cellular level. **Plant and Soil**, The Hague, v. 126, n. 2, p. 295-300, 1990.

IDE, D. A. E. Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 12, p. 7220-7224, June 1998.

KLING, J. G.; MENKIR, A.; DIXON, A. Genetic variation in total carotene, iron, and zinc contents of maize and cassava genotypes. **Food and Nutrition Bulletin**, Davis, v. 21, n. 4, p. 419-422, 2000.

KOBRAEE, S. et al. Influence of micronutrient fertilizer on soybean nutrient composition. **Indian Journal of Science & Technology**, New Delhi, v. 4, n. 7, p. 763-769, July 2011.

LIN, Y. F. et al. Arabidopsis IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 182, n. 2, p. 392-404, Jan. 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; ELLIS, D. R.; GRUSAK, M. A. Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, n. 4, p. 583-596, Mar. 2004.

MAYER, J. E.; PFEIFFER, W. H.; BEYER, P. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 166-170, Apr. 2008.

MINITAB INC. **Meet Minitab 17**. Disponível em: <<http://www.minitab.com>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

MOREAU, S. et al. GmZIP1 encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 7, p. 4738-46, Feb. 2002.

MOTTAGHIAN, A. et al. Leaf and Seed micronutrient accumulation in soybean cultivars in response to integrated organic and chemical fertilizers application. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Lahore, v. 11, n. 9, p. 1227-1233, 2008.

OÑATE-SÁNCHEZ, L.; VICENTE-CARBAJOSA, J. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. **BMC Research Notes**, London, v. 1, Oct. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18937828>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

RAMESH, S. A. et al. Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice 1. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 1, p. 126-134, Sept. 2003.

REDDY, M. R.; TUCKER, M. R. A. Y.; DUNN, S. J. Effect of manganese on concentrations of Zn, Fe, Cu and B in different soybean genotypes. **Plant and Soil**, The Hague, v. 97, n. 1, p. 57-62, 1987.

REGENT INSTRUMENTS. **Image analysis for plant science WinRHIZO root architecture with fractals measurements**. Quebec, 2014. Disponível em: <http://regent.qc.ca/assets/winrhizo_software.html>. Acesso em: 10 nov. 2014.

SADEGHZADEH, B. A review of zinc nutrition and plant breeding. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 13, n. 4, p. 905-927, Dec. 2013.

SINCLAIR, S. A.; KRÄMER, U. The zinc homeostasis network of land plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 1823, n. 9, p. 1553-1567, Sept. 2012.

SOUZA, G. A. de et al. Evaluation of germplasm effect on Fe, Zn and Se content in wheat seedlings. **Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology**, Shannon, v. 210, p. 206-213, Sept. 2013.

SOUZA, G. A. de et al. Genotypic variation of zinc and selenium concentration in grains of Brazilian wheat lines. **Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology**, Shannon, v. 224, p. 27-35, July 2014.

TALKE, I. N.; HANIKENNE, M.; KRÄMER, U. Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 142, n. 1, p. 148-167, Sept. 2006.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.
Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils.
Washington, 2007. 30 p.

UNTERGASSER, A. et al. *Primer3--new capabilities and interfaces.* **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, n. 15, June 2012. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22730293>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

WELCH, R. M.; GRAHAM, R. D. Breeding crops for enhanced micronutrient content. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, n. 1, p. 205-214, Aug. 2002.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets--iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, Cambridge, v. 182, n. 1, p. 49-84, 2009.

YIN, X.; YUAN, L. **Phytoremediation and biofortification two sides of one coin.** New York: Springer, 2012. 81 p.

ZOU, T. et al. Biofortification of soybean sprouts with zinc and bioaccessibility of zinc in the sprouts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 94, n. 14, p. 3053-3060, Nov. 2014.

(VERSÃO PRELIMINAR)