

**GUILHERME JORDAN SOUZA VÉRAS**

**TRATAMENTO INDUSTRIAL DE SEMENTES COM TIAMETOXAM E  
INOCULANTES NA SOJICULTURA: DESVENDANDO O METABOLISMO DESSA  
TECNOLOGIA**

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

Orientador: Geraldo Humberto Silva

Coorientadores: Frederico Garcia Pinto  
Willian Rodrigues Macedo

**RIO PARANAÍBA - MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba**

T

V978t  
2021

Véras, Guilherme Jordan Souza, 1996-  
Tratamento industrial de sementes com tiametoxam e  
inoculantes na sojicultura [recurso eletrônico]: desvendando o  
metabolismo dessa tecnologia / Guilherme Jordan Souza Véras.  
– Rio Paranaíba, MG, 2021.  
32 f: il. (algumas color.).

Orientador: Geraldo Humberto Silva.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.  
DOI: <http://doi.org.br/1047328/ufvcrp.2021.001>

1. Metabolômica. 2. Tratamento de sementes.  
3. Tiametoxam. I. Universidade Federal de Viçosa. Instituto de  
Ciências Agrárias. Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal).  
II. Título.

633.34

**GUILHERME JORDAN SOUZA VÉRAS**

**TRATAMENTO INDUSTRIAL DE SEMENTES COM TIAMETOXAM E  
INOCULANTES NA SOJICULTURA: DESVENDANDO O METABOLISMO DESSA  
TECNOLOGIA**

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

APROVADA: 28 de julho de 2021.

Assentimento:



Guilherme Jordan Souza Vêras

Autor



Geraldo Humberto Silva

Orientador

*A minha mãe Fátima, pela atenção, carinho e  
apoio durante todos esses anos.*

*A meu pai Wellington e a você Daniela, pelo  
acolhimento, cuidado e auxílio, contribuindo  
para essa formação.*

*A meu irmão Pedro e minha avó Terezinha, que  
são partes importantes e sempre estarão  
presentes na minha vida!*

*A você Iago pelo companheirismo e vivência  
nesses momentos!*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus Jeová, por sempre estar disposto a me ouvir e conceder o que foi e é, necessário a essa realização.

À Universidade Federal de Viçosa – Campus de Rio Paranaíba, e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal pela possibilidade de aprendizado e oportunidades que possibilitassem essa conquista.

A meus pais Wellington e Fátima que contribuíram para minha formação como pessoa, instruindo de quais são as melhores escolhas e o direcionamento para o melhor caminho, também pelos cuidados, conselhos e amizade.

A minha avó Terezinha, meu irmão Pedro e a minha amiga Dani, por sempre se preocuparem e no possível e impossível me ajudarem.

A todos meus amigos que contribuíram me dando apoio, e de forma direta ou indireta fizeram hoje ser possível essa realização.

A todos professores e profissionais que nos transmitiram seus conhecimentos e práticas de forma a possibilitar crescimento profissional, e fornecendo ferramentas para que este seja contínuo.

A empresa COOPADAP por tornar possível a realização deste trabalho disponibilizando área, produtos, ferramentas e auxílio teórico e prático para obtenção dos resultados que foram matéria prima para a realização desta dissertação.

Agradeço aos professores Geraldo, Willian, Frederico e Wellington pelo auxílio durante a pesquisa, transmissão de conhecimentos e construção desse material. Também pela orientação, paciência e esforço.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“As palavras só tem sentido se nos ajudam a ver o mundo melhor. Aprendemos palavras para melhorar os olhos.”*

(Rubem Alves)

## RESUMO

VÉRAS, Guilherme Jordan Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa *Campus* Rio Paranaíba, julho de 2021. **Tratamento industrial de sementes com tiametoxam e inoculantes na sojicultura: desvendando o metabolismo dessa tecnologia.** Orientador: Geraldo Silva. Coorientadores: Frederico Garcia Pinto e Willian Rodrigues Macedo.

Os tratamentos industriais de sementes (TS) possibilitam um maior controle de patógenos, a adição de microrganismos, revestimento de sementes ou pellets, tratamento com compostos fisiológicos, aumento da produtividade, rendimento e um menor impacto ambiental no uso de defensivos. O uso de pesticidas no TS é uma tecnologia recente, utilizada como ferramenta importante para a proteção das culturas. Entre os pesticidas amplamente utilizados, destaca-se o tiametoxam, um neonicotinóide com características de bioativador, não possuindo uma descrição completa e holística de sua ação metabólica nos tecidos vegetais. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas metabólicas e fisiológicas de plantas de soja submetidas ao TS com tiametoxam e inoculantes (*Bradyrhizobium elkanni* e *B. japonicum*). A metabolômica não direcionada e as trocas gasosas abordadas foram utilizadas para entender o impacto do TS nas plantas de soja. Foi possível traçar o perfil metabólico dessas plantas submetidas ao tratamento, permitindo verificar o efeito em três principais vias vegetais: metabolismo de defesa, metabolismo de nitrogênio e metabolismo de carboidratos, todas sendo melhoradas. Verificou-se também que apesar da não alteração de parâmetros fotossintéticos pelo uso do TS, houve maior síntese de metabolitos de importância aos mais diversos aspectos vegetais. A ação metabólica do tratamento industrial de sementes na cultura da soja, proporciona um efeito positivo para o desenvolvimento inicial da cultura.

Palavras-chave: Metabolômica. Tratamento de sementes. Tiametoxam.

## ABSTRACT

VÉRAS, Guilherme Jordan Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa *Campus* Rio Paranaíba, July, 2021. **Industrial treatment of seeds with tiametoxam and inoculants in soybean crop: unvreviling the metabolism of this technology.** Adviser: Geraldo Silva. Co-advisers: Frederico Garcia Pinto and Willian Rodrigues Macedo.

Industrial seed treatments (TS) enable greater control of pathogens, the addition of microorganisms, coating of seeds or pellets, treatment with physiological compounds, increased productivity, yield and a lower environmental impact in the use of pesticides. The use of pesticides in the TS is a new technology, used as an important tool for crop protection. Among the widely used pesticides, tiametoxam stands out, a neonicotinoid with bioactivator characteristics, without a complete and holistic description of its metabolic action in plant tissues. The aim of this study was to evaluate the metabolic and physiological responses of soybean plants submitted to TS with thiamethoxam and inoculants (*Bradyrhizobium elkanni* and *B. japonicum*). Undirected metabolomics and gas exchanges addressed were used to understand the impact of TS on soybean plants. It was possible to trace the metabolic profile of these plants submitted to treatment, allowing to verify the effect in three main plant pathways: defense metabolism, nitrogen metabolism and carbohydrate metabolism, all of which are being improved. It was also found that despite the non-alteration of photosynthetic parameters by the use of TS, there was greater synthesis of metabolites of importance to the most diverse plant aspects. The metabolic action of industrial seed treatment in soybean crop provides a positive effect for the initial development of the crop.

Keywords: Metabolomics. Seed treatment. Thiamethoxam.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1 Condições experimentais e tratamento de sementes .....	12
2.2 Análise biométrica, trocas gasosas foliares e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	12
2.3 Extração de metabólitos para análise por GC-MS .....	13
2.4 Análise metabolômica não direcionada baseada em GC-MS.....	14
2.5 Processamento de dados GC-MS .....	14
2.6 Análise estatística .....	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	15
CONCLUSÕES .....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27

## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), considerada uma das principais commodities do agronegócio é pertencente à família Fabaceae. Mundialmente ocupa cerca de 122,68 milhões de hectares, com uma produção total na safra 2019/2020 de 337,14 milhões de toneladas dos grãos (Dukhnytskyi 2019). Sua destinação se divide no uso da farinha dos grãos, 80% do total, podendo ser destinada para alimentação humana (3%), ou animal (97%). Ou ainda no uso do óleo, 20% do total, sendo utilizada para produção de alimentos (68%), biodieséis e biogás (25%) ou ainda uso industrial (7%) (Rigo, 2015). Seu avanço tanto em área cultivada, como em produtividade, se deve ao melhoramento genético, tecnologias de cultivo e práticas culturais (Beutler and Centurion 2004).

Todavia os parâmetros de melhoria citados podem ser manejados pelos técnicos responsáveis, o que não acontece com algumas características do meio de cultivo. Em situações onde o solo não contribui para um desenvolvimento inicial de forma plena das plântulas, medidas preventivas devem ser tomadas no sentido de aumento do vigor de sementes, fornecendo assim as plântulas, uma maior proteção e aparato para sobrevivência (Rodrigues et al. 2017). O estado de vigor das sementes estará relacionado tanto ao estabelecimento da população inicial de plantas, ao seu desenvolvimento e por fim seu rendimento (Hampton 2002).

Essa proteção pode ser garantida pelos tratamentos industriais de sementes (TS), por meio desses se torna possível um maior controle de patógenos, a adição de microrganismos (fixação de N<sub>2</sub>, aumento da absorção de nutrientes, promoção do crescimento), revestimento de sementes ou pellets, tratamento com compostos fisiológicos (aumento da taxa de germinação e desempenho), aumento da produtividade, rendimento e um menor impacto ambiental no uso de defensivos, visto a quantidade destes, a serem utilizados, ser menor e direcionada ao alvo (Taylor 1990; da Cunha et al. 2015; Rossman et al. 2018). Esses processos podem ser utilizados de forma individual ou em associação.

O uso de microrganismos no tratamento de sementes, possibilita o ganho de diversos benefícios, que são citados na literatura. Em associação com vegetais, esses microrganismos podem produzir fito hormônios, beneficiando assim as plântulas em seu desenvolvimento inicial, com a síntese de auxina (Sukumar et al. 2013), giberelina (Sidorova et al. 2018), citocinina (Boivin et al. 2016) e etileno (Rautela et al. 2019). Outros possíveis ganhos do uso dessa tecnologia é a indução a resistência a estresses e doenças (Forouzi et al. 2020), maior solubilização de fósforo (Rodriguez et al. 2004) e a fixação biológica do nitrogênio (Hungria

et al. 2020). Na cultura da soja o uso de inoculantes, com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, aumenta a ocorrência da fixação biológica, fornecendo a quantidade necessária de nitrogênio para seu desenvolvimento e produção. As principais formas de bactérias identificadas para essa aquisição são *Bradyrhizobium elkanni* ou *B. japonicum* (Hoffmann and Nogueira Cardoso 2001).

Atualmente, a indústria de sementes também tem investido esforços no desenvolvimento de novas tecnologias de TS, esses buscam pesticidas que possam agregar maiores benefícios aos agricultores (Bortoletto et al. 2017). O pesticida tiametoxam é reconhecido como um inseticida eficaz que atua no receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), classificado como Grupo 4A (Comitê de Ação de Resistência a Inseticidas - IRAC) (Jeschke and Nauen 2008). Este pesticida é utilizado no controle de insetos, via aplicação direta ou tratamento de sementes, sendo que as doses utilizadas para cada método se diferenciam grandemente em suas quantidades. Desta forma mesmo que possua classificação de periculosidade ambiental nível 3 (perigoso), suas baixas doses e de forma a serem aplicadas via tratamento de sementes, diminui os danos ambientais (Hladik et al. 2017). Sendo por exemplo recomendada a depender da situação doses que variam de 50-300 ml para cada 100 Kg de soja tratadas (Goa 2020). O tiametoxam é usado em pelo menos sessenta e quatro países em mais de cem culturas, sendo o segundo neonicotinóide mais comercializado em todo o mundo (Elbert et al. 2008).

Sua molécula também mostra efeitos positivos na fisiologia e metabolismo vegetal para muitas culturas, como feijão (Cataneo et al. 2010), trigo (Macedo and Castro 2011), arroz (Macedo et al. 2013a; Lanka et al. 2017), milho (Afifi et al. 2015), soja (Cataneo et al. 2010; Bortoletto et al. 2017) e pastagens (Macedo et al. 2013b) (Ge et al. 2019). Devido aos efeitos proeminentes no vigor das plantas, ganhos no influxo de água, transporte de íons ou ativando o metabolismo primário e secundário, essa molécula foi classificada como bioativador (Macedo et al. 2013b, a). No entanto, esses efeitos benéficos foram estudados isoladamente, com foco em vias bioquímicas específicas. Para maior esclarecimento a cerca dessas relações usamos neste trabalho uma abordagem metabolômica.

Esses efeitos advindos do uso de pesticidas as culturas tratadas, ao sistema solo e os seus microrganismos, e a relação entre esses ainda não é clara, ocorrendo na literatura benefícios e também efeitos danosos ao sistema a depender da classe de pesticida e produto utilizado. Em um trabalho conduzido com a cultura do arroz, submetida a tratamento com pesticida diclofop-metil (herbicida), foi possível verificar aumento da riqueza, e número de microrganismos da rizosfera do sistema. De acordo com o trabalho essa resposta foi possível

pela maior taxa de exsudação radicular, e assim disponibilidade para os microrganismos. Porém esse tratamento proporcionou maior transcrição do gene para desnitrificação, e da ocorrência desse processo, alterando assim o ciclo de nitrogênio (Qian et al. 2018).

Estudando a junção do uso dos fungicidas, piraclostrobina e tiofanato-metílico, com o inseticida fipronil, e a pré-inoculação no tratamento de sementes de soja, verificou-se morte celular das bactérias fixadoras, sendo para as *B. elkanii* quase sem células viáveis detectáveis após 15 dias de tratamento. Além disso ocorreu redução no tamanho das colônias, com alterações em suas morfologias (Rodrigues et al. 2020).

Essa análise de impacto dos pesticidas utilizados nos cultivos agrícolas, como possíveis biorreguladores, ou sob redução de interferentes, deve considerar seus efeitos diretos (o pesticida sobre os microrganismos do sistema) e indireta (resposta da planta afetada sobre os micro) (Duke 2018). Exemplo dessa situação é o uso do glifosato sobre espécies vegetais suscetíveis ao herbicida, além de sua ação direta, o uso deste pesticida reduz as defesas vegetais à infecções bacterianas, intensificando assim sua ação herbicida (Kishore and Shah 1988). Fato contrário, que também pode ser observado é o uso de pesticidas herbicidas induzirem resistência vegetal a microrganismos (Li et al. 2003).

A metabolômica é uma abordagem utilizada para investigar alterações nos perfis metabólicos de uma planta, em resposta a estímulos externos como o TS (Eloh et al. 2016). A cromatografia gasosa por espectrometria de massa (GC-MS) é uma técnica analítica amplamente utilizada na metabolômica vegetal (Fiehn O et al. 2000). A espectrometria de massa é uma ferramenta em grande desenvolvimento, possibilitando estudos metabolômicos globais, o desenvolvimento de marcadores metabólicos e assim auxiliando em programas de melhoramento genético para soja (Das et al. 2017).

As abordagens metabolômicas podem se dividir em direcionadas ou não, sendo as direcionadas para trabalhos que objetivam a verificação de metabólitos conhecidos de uma amostra. Desta forma buscam estudar metabólitos do desenvolvimento natural de indivíduos, ou sob perturbações bióticas e abióticas (Douglas et al. 2015; An et al. 2017; Ribbenstedt et al. 2018). Na abordagem metabolômica não direcionada, busca-se identificar quantos metabólitos forem possíveis diante de um situação, ou tratamento exposto, possibilitando inclusive a identificação de metabólitos biomarcadores para aquele fenômeno (Ribbenstedt et al. 2018). Pela espectrometria de massas, e o estudo da metabolômica não direcionada é possível traçar o perfil de diversas classes de metabólitos, tornando-se uma ferramenta de escolha acerca dos metabólitos alterados frente alguma modificação ambiental. Assim

continuamente são esclarecidos os mecanismos moleculares vegetais, possibilitando uma biologia preditiva para o futuro (Das et al. 2017).

A metabolômica torna-se útil na compreensão do papel dos metabólitos, no crescimento e desenvolvimento das plantas (Hong et al. 2016; Ravi et al. 2020). Com o crescimento do mercado para o tratamento industrial de sementes usando pesticidas, é essencial entender as vias bioquímicas holisticamente afetadas por estes compostos. Por esse motivo nossa pesquisa teve como objetivo descobrir a via metabólica do tratamento de sementes de soja, submetidas a tiametoxam e inoculantes pela abordagem metabolômica não direcionada em GC-MS.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Condições experimentais e tratamento de sementes

As sementes de soja foram cultivadas em campo na Cooperativa Agrícola do Alto Paranaíba - COOPADAP (19° 15' 33" S e 46° 05' 28" W), Brasil, durante a safra 2019/2020. As plantas pertencem à cultivar M5917-IPRO (Monsoy, Brasil), e foram submetidas a dois tratamentos: controle (T1) (em pré plantio sem uso de pesticidas e inoculantes) e um tratamento industrial de sementes composto por Tiametoxam e os inoculantes *B.elkanii* e *B. Japonicum*, já bem estabelecido pela empresa conjunta COOPADAP (T2) (Tabela 1). O delineamento experimental foi Inteiramente Casualizado (DIC) com o manejo da cultura adotado neste experimento seguindo as práticas comuns das fazendas da região, as sementes foram cultivadas em 25 de outubro de 2019 e a colheita foi realizada em 19 de março de 2020, completando um ciclo de 146 dias.

**Tabela 1.** Tratamentos e doses aplicados em sementes de soja (inseticidas + inoculantes + revestimento).

Tratamentos	Ingrediente ativo	Nome comercial	Doses do produto comercial
1	Sem uso de pesticida ou inoculante	-	-
2	Tiametoxam + polímero + <i>B.elkanii</i> + <i>B. Japonicum</i> + pó secante	Cruiser® + Incotec® polímero + Nitragin® Power + pó secante*	200* + 100* + 330* + 400* + 150#

\*mililitros para 100 quilogramas de sementes; # gramas para 100 quilogramas de sementes.

### 2.2 Análise biométrica, trocas gasosas foliares e fluorescência da clorofila *a*

As trocas gasosas foliares (TGF) e a fluorescência da clorofila *a* (FCa) foram avaliadas nos estádios V2 e V4, usando um sistema portátil de trocas gasosas (LI-6400XT, LI-COR Inc., Lincoln, NE, EUA) equipado com uma câmara de fluorescência integrada (LI-

6400-40, LI-COR Inc.). As análises de TGF foram compostas dos parâmetros: condutância estomática (Gs), transpiração (E), evapotranspiração (ETR), eficiência quântica do fotossistema 2 (PSII), taxa de fotossíntese líquida (A), eficiência intrínseca do uso da água (WUE i), eficiência instantânea do uso da água (WUE) e concentração interna de carbono (Ci). Esses parâmetros foram verificados sob uma radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  no nível foliar, sob condições ambientais de temperatura, concentração de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e déficit de pressão de vapor (VPD).

Após o registro dos parâmetros de TGF determinou-se o parâmetro de FCa, a partir do qual foram determinados o coeficiente de extinção fotoquímico (qP), o coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ), o rendimento quântico real do fotossistema II ( $\phi\text{PSII}$ ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) (Genty et al. 1990; Maxwell and Johnson 2000).

### **2.3 Extração de metabólitos para análise por GC-MS**

Para ambos os tratamentos, cada repetição foi composta por 3 folhas coletadas de plantas, dentro do tratamento, estas foram levadas ao laboratório e imediatamente maceradas em nitrogênio líquido. As amostras homogeneizadas (~ 10 mg) foram pesadas em tubos Eppendorf e extraídas com 1 mL de metanol contendo 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ribitol (padrão interno). As amostras foram agitadas em vórtex por 5 segundos, sonicadas por 15 minutos e depois centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o mesmo procedimento foi aplicado ao resíduo restante, mas agora usando 1 mL de água. Depois disso, ambos os sobrenadantes foram misturados para reações de derivatização. Essa quantidade de folhas de soja foi extraída para cada amostra e todas as medições de metabólitos foram normalizadas fisicamente para essa massa. O padrão interno também foi usado para normalizar o conjunto de dados. 400  $\mu\text{L}$  do volume da amostra foram coletados em um frasco de vidro, secos durante a noite em um forno de recirculação de ar forçado a 40°C. As alíquotas secas foram metoxiladas em piridina com 50  $\mu\text{L}$  de 15 mg / mL de cloridrato de metoxiamina e, em seguida, trimetilsililadas com 50  $\mu\text{L}$  de MSTFA (N-metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida) + 1% de reagente TMCS (clorotri-metilsilano). As amostras de controle de qualidade (CQ) foram preparadas reunindo alíquotas de todas as amostras de folhas de soja e processadas usando o mesmo procedimento utilizado para as amostras experimentais. As amostras de CQ foram analisadas por GC-MS antes, no meio e após as injeções das amostras para garantir que a deriva instrumental fosse mínima.

## 2.4 Análise metabolômica não direcionada baseada em GC-MS

Os extratos derivatizados foram analisados por GC-MS (Vieira-Potter et al., 2018). O perfil metabólico foi realizado utilizando um sistema de cromatografia acoplado a um espectrômetro de massa Shimadzu GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Foi utilizada uma coluna capilar DB-5MS (30 m × 250 µm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme; Restek, EUA). A separação cromatográfica foi alcançada com uma temperatura da coluna de 80 °C por 2 min, depois aumentada de 5 °C / min a 315 °C e mantida a 315 °C por 12 min, e um fluxo constante de 1,0 ml / min de gás hélio. O volume de injeção foi de 1 µL com uma proporção de 10: 1. A varredura de espectros de massa foi de 50 a 650 m/z, na faixa do modo de varredura completa, com uma velocidade de varredura de 5 varreduras s<sup>-1</sup>. As temperaturas da interface e da fonte de íons foram de 280 e 240 °C, respectivamente. A voltagem do detector foi de 1,2 kV, e o modelo de impacto eletrônico (EI) foi selecionado para metabolizar a ionização a 70 eV. Uma mistura de alcanos padrão (C9-C30) foi usada para cálculos de controle de qualidade GC-MS e índices de retenção.

## 2.5 Processamento de dados GC-MS

Os dados brutos do GC-MS foram convertidos para o formato "abf" usando o software conversor ABF (<https://www.reifycs.com/AbfConverter/>). Em seguida, a extração de picos brutos, o alinhamento de picos, a análise e a identificação de deconvolução foram processados usando o software MS-DIAL ([http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics\\_Software/MS-DIAL/index.html](http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-DIAL/index.html)) (Lai et al., 2018). Os parâmetros de aquisição de dados foram utilizados da seguinte forma: Detecção de pico: Método de suavização: Média móvel ponderada linear; Nível de suavização: 2 digitalizações; Largura média do pico: 20 varreduras; Altura mínima do pico: 1000 amplitudes. Parâmetros de deconvolução: valor da janela Sigma: 0,5; Corte dos espectros EI: 10 amplitudes. Configurações de identificação: use índice de retenção; Arquivo MSP: banco de dados FiehnLib (Kind et al., 2009); Tolerância ao RI: 30; Tolerância à RT: 0,5; tolerância m/z: 0,5; Semelhança de EI cortada: 70%; Pontuação de identificação cortada: 70%. Como mencionado anteriormente, os picos dos metabólitos foram normalizados para o ribitol padrão interno e para cada peso de folhas de soja, e os valores normalizados foram utilizados para comparações estatísticas.

A identificação do metabólito foi realizada comparando os espectros de massa experimental e o índice de retenção calculado (IR) com a biblioteca espectral de massa / IR do FiehnLib usando o MS-DIAL. Além disso, o software do sistema automatizado de

deconvolução e identificação espectral de massa (AMDIS) (Stein 1999) foi usado para confirmar os componentes da amostra. Os dados foram deconvoluídos usando AMDIS e identificados por correspondência espectral (similaridade  $\geq 80\%$ ) com a biblioteca espectral de massa do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST 2014).

## 2.6 Análise estatística

Toda a normalização dos dados, análises estatísticas, análise de vias metabólicas e visualização foram realizadas usando o Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>), um programa de código aberto baseado no R projetado especificamente para a metabolômica (Chong et al. 2018). Os valores não presentes em 50% dos dados foram removidos da análise. Os valores ausentes foram substituídos por um pequeno valor (metade do valor positivo mínimo nos dados originais), e os dados foram relativos ao desvio padrão filtrado, soma normalizada, log2 transformado e dimensionado automaticamente.

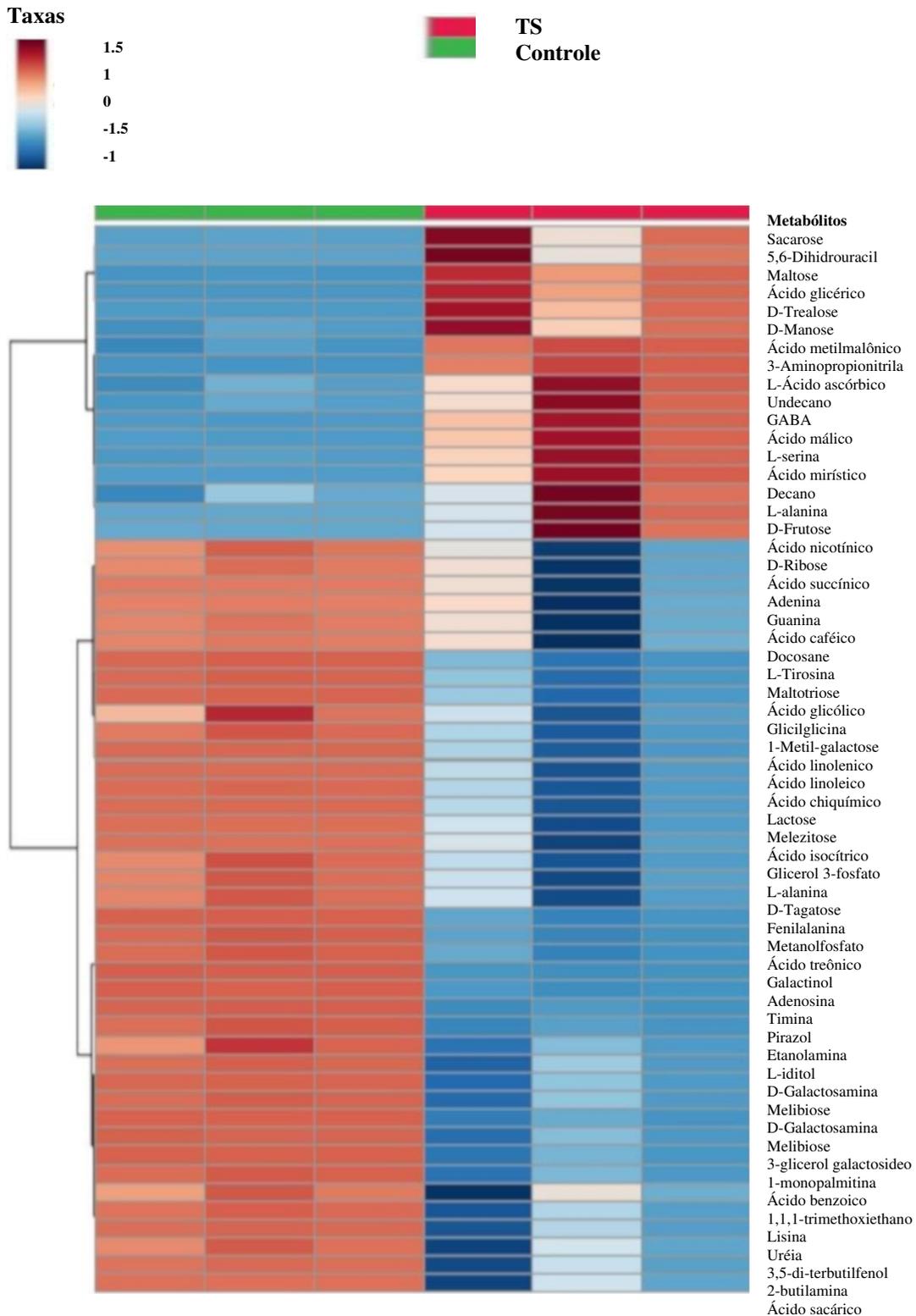
Os metabólitos foram comparados (controle versus tratamento industrial de sementes) por meio do teste t de Student, e um mapa de calor de características significativamente diferentes foi gerado para identificar os metabólitos de agrupamento. O nível de significância considerado foi de  $P < 0,05$ . Para identificar as vias metabólicas alteradas pelo tratamento industrial de sementes, foram considerados cinquenta e oito potenciais biomarcadores identificados em *Arabidopsis thaliana*. Assim sendo realizado teste t de Student usando o MetaboAnalyst 4.0, com base na biblioteca de vias metabólicas KEGG.

Para análise dos parâmetros fotossintéticos (Item 2.1) foram adotadas análises multivariadas, por análise de componentes principais (PCA), identificando assim possíveis agrupamentos entre todas as variáveis dependentes. Os dados foram transformados e padronizados para homogeneizar as escalas, sendo em seguida calculados os valores dos vetores de Eigen para determinar a importância de cada variável (McGarigal et al. 2000). O software PAST - Paleontological Statistics foi aplicado para análise de PCA (Hammer et al. 1990).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

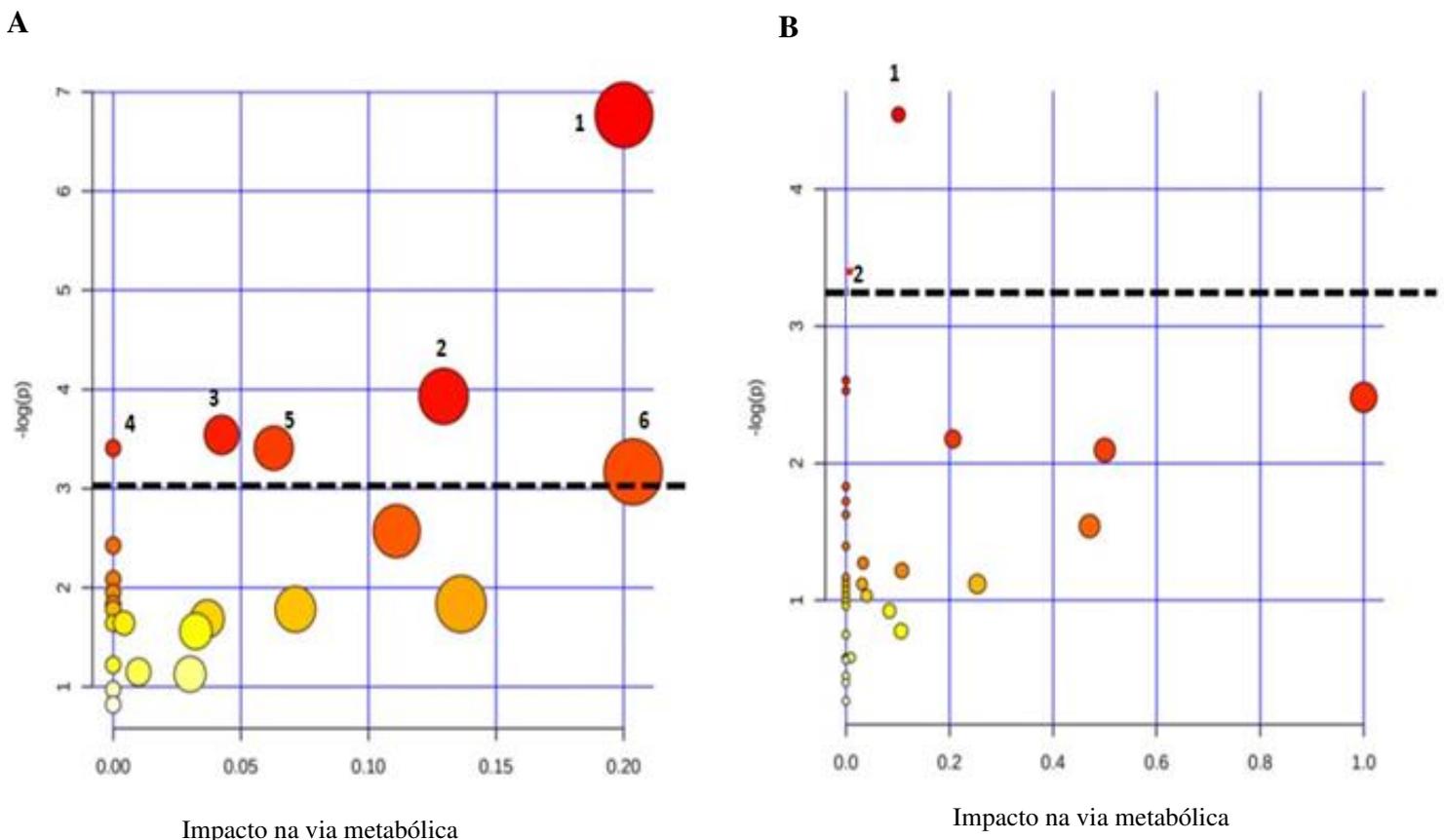
Nas amostras de folhas de soja, foram contabilizados 259 metabólitos, entre eles 120 (46,33%) foram identificados. Entre os metabólitos identificados, 58 (48,33%) apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em suas taxas relativas entre os tratamentos. Desses, 41 (70,69%) em abundância elevada no grupo TS (tratamento industrial de sementes) e 17

(29,3%) no grupo controle (Tabela 1). Após essa verificação foi gerado um mapa de calor, baseado nos grupos dos componentes principais dos 58 metabólitos identificados, sendo classificados por seus valores de p no teste t de Student (Figura 1). Esses dados revelaram um agrupamento claro e distinto entre os tratamentos, pelos metabólitos mais importantes ao crescimento das plantas (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa de calor dos 58 metabólitos identificados que apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. As colunas representam as amostras de cada tratamento (conjunto verde = tratamento industrial de sementes; conjunto vermelho = tratamento controle). Cada linha representa um metabólito. Os quadrados de cores representam a abundância dos metabólitos, onde vermelho escuro (maior abundância) e azul escuro (menor abundância).

Também foi possível notar alterações em rotas metabólicas, no sentido de uma menor ocorrência seis vias bioquímicas foram desreguladas: metabolismo do amido e sacarose; metabolismo de alanina, aspartato e glutamato; metabolismo da galactose; metabolismo de cianoaminoácido; metabolismo de glioxilato e dicarboxilato; e metabolismo de glicina, serina e treonina. No entanto, duas vias bioquímicas foram reguladas positivamente: biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano e metabolismo de purina (Figura 2- Tabela 2).



- 1- Metabolismo de amido e sacarose;
- 2- Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato;
- 3- Metabolismo da galactose;
- 4- Metabolismo do cianoaminoácido;
- 5- Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato;
- 6- Metabolismo glicina, serina e treonina.

- 1- Metabolismo da fenilalanina, tirosina e triptofano;
- 2- Metabolismo de purina.

**Figura 2.** Alterações em vias metabólicas, regulação para inibição das vias (A) e estímulo as vias (B) em plantas de soja (58 DAP). O tamanho e as cores dos círculos revelaram a magnitude das vias metabólicas afetadas (amarelo = menor relevância; vermelho = maior relevância; círculos pequenos = menor impacto na via, círculos grandes = maior impacto na via) de acordo com a relevância estatística e os valores de impacto na via (PI) resultantes Análise Quantitativa de Enriquecimento (QEA) e Análise de Topologia de Rede (NTA), respectivamente. A linha pontilhada representa o ponto de corte de significância em  $P < 0,05$ .

**Tabela 2.** *P*-valor dos 58 metabólitos (apresentaram diferença significativa) encontrados na análise metabolômica.

Metabólitos	Taxa (TS/Controle)	<i>P</i> -valor
Ácido treônico	1.1438	3.54 <sup>-8</sup>
Galactinol	1.1546	1.46 <sup>-7</sup>
Adenosina	2.1522	5.53 <sup>-7</sup>
Fenilalanina	1.4295	1.17 <sup>-5</sup>
Timina	36.891	1.59 <sup>-5</sup>
D-Tagatose	16.59	1.86 <sup>-5</sup>
Ácido metilmalônico	0.88652	3.19 <sup>-5</sup>
3-Aminopropionitrila	0.59292	3.87 <sup>-5</sup>
Metanolfosfato	1.723	4.08 <sup>-5</sup>
Melibiose	1.3271	5.72 <sup>-5</sup>
1-monopalmitina	1.6186	0.000189
Ácido benzoico	1.7963	0.000304
Docosane	1.3115	0.00033
Maltose	0.66667	0.000438
3-glicerol galactosideo	1.4658	0.00053
Ácido glicérico	0.89685	0.000713
L-Tirosina	1.597	0.000802
L-itol	1.9874	0.000979
D-Galactosamina	1.9527	0.001026
Pirazol	1.471	0.001302
Maltotriose	1.8528	0.001378
Etanolamina	1.0563	0.00178
1-Metil-galactose	1.2925	0.003108
Trealose	0.79445	0.003437
GABA	0.8067	0.003632
Glicilglicina	1.3496	0.003983
Ácido linoleico	1.7635	0.004417
Lisina	1.3401	0.004488
Uréia	1.2353	0.004507
Ácido málico	0.86767	0.004876
Ácido chiquímico	1.6291	0.004992
Ácido linolenico	1.4704	0.006201
D-manose	0.81134	0.007473

L-serina	0.7254	0.007647
Ácido isocítrico	1.3165	0.007746
Ácido mirístico	0.38501	0.007931
2-butilamina	1.0316	0.009215
Glicerol 3-fosfato	1.6614	0.01045
Lactose	1.1003	0.010476
Alanina	0.8480	0.010671
L-Ácido ascórbico	0.56822	0.012172
Ácido sacarico	1.3236	0.012248
Undecano	0.72762	0.014231
Melezitose	1.3639	0.014325
3,5-di-terbutilfenol	1.1698	0.014784
Ácido glicólico	1.1003	0.016557
Sacarose	0.49073	0.01832
5,6-Dihidrouracil	0.78502	0.023752
Ácido nicotínico	1.2751	0.02423
Ácido succínico	1.2748	0.033798
D-Ribose	1.1955	0.035206
1,1,1-trimethoxiethano (Triethyl orthoacetate)	1.1564	0.035787
Guanina	1.4532	0.03698
L-alanina	0.61714	0.037755
D-Frutose	0.85408	0.041648
Decano	0.80529	0.04211
Ácido caféico	1.4982	0.042514
Adenina	1.2617	0.045652

---

De acordo com prévio trabalho sob avaliação metabolômica, as rotas de açúcares, nitrogênio e compostos envolvidos com a fotoquímica, são primordiais a serem observados em estudos metabólicos (Mutava et al. 2015). Além disso, também foi demonstrado que estresses abióticos estão diretamente relacionados a alterações em várias vias metabólicas celulares, incluindo metabolismo de carboidratos, aminoácidos e peptídeos (Fraire-Velazquez and Emmanuel 2013). Os tratamentos de sementes podem reverter essas alterações, ou serem efetivos a ponto de nem mesmo ocorrer diferenciação de metabólitos frente a déficits.

As avaliações metabolômicas permitiram verificar no grupo de plantas originadas de TS, uma maior taxa de açúcares e álcoois de açúcares, sendo monossacarídeos (D-ribose, D-tagatose), dissacarídeos (melibiose, lactose), trissacarídeos (maltotriose e melezitose), açúcares reduzidos (galactinol) e açúcares oxidados (ácido treônico, ácido sacárico, ácido glicólico). A tolerância a curto prazo de uma espécie ou cultivar, a estresses abióticos pode ser derivada de um ajuste nas taxas de açúcares (Bajji et al. 2001; Anami et al. 2009). De acordo com estudos prévios, uma modificação no metabolismo para maior acúmulo de açúcares, confere a essas plantas maior resistência a estresses abióticos, sendo principalmente a seca. Essa maior taxa desempenha papel osmoprotetor e regula um ajuste de influxo hídrico aos vegetais (Singh et al. 2015). Essa importância ainda pode ser demonstrada, pois o grupo dos açúcares e aminoácidos, são os primeiros metabólitos como resposta, quando espécies vegetais são submetidas a condições de estresse (Fàbregas and Fernie 2019). No presente trabalho nota-se tanto aumento de espécies de açúcares quanto aminoácidos, podendo esse TS ser uma indução a uma maior tolerância a condições de estresse.

Relacionando-se esses resultados com a análise de impacto das vias metabólicas, (Figura 2) é possível notar um desbalanço no metabolismo de amido/sacarose, glioxilato e galactose e que estes fatos contrariam as maiores taxas de açúcares. O ciclo do glioxilato ocorre em concorrência com o ciclo de Krebs, na síntese de glicose a partir de acetil-CoA. Isso pode ser explicado por uma redução na utilização dos assimilados, por inibição das enzimas sacarose sintase/invertase, ou redução no carregamento do floema. Esses mecanismos impedem a redução excessiva da taxa de açúcares, o crescimento pela expansão celular, mas principalmente restringe a perda de água dos tecidos (Daie 1989; Huber and Huber 1996; Sturm and Tang 1999; Bajji et al. 2001).

Também foi possível observar maior taxa de aminoácidos (fenilalanina, tirosina, lisina e alanina) em plantas originadas do TS. A fenilalanina, utilizada como substrato da fenilalanina amônia-liase (PAL) possui entre suas funções a mitigação de estresses abióticos e bióticos, biossíntese de lignina e antocianinas (atração de insetos polinizadores) (MacDonald

and D’Cunha 2007). Alguns parâmetros de adaptação a condições de estresse abiótico, sendo principalmente hídrico incluem a síntese de osmoprotetores, e a indução a biossíntese da lignina, característica favorecida pela aplicação do TS (Shulaev et al. 2008). Em pesquisa anterior, foi identificada forte conexão na sinalização do tiametoxam ao metabolismo dos fenilpropanóides das plantas, onde esse pesticida regulava a fenilalanina amônia-liase em plantas de trigo (Macedo and Castro 2011). No presente trabalho foi observado o mesmo comportamento utilizando a metabolômica, ocorrendo regulação positiva da biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano em plantas de soja originadas do tratamento conjunto com tiametoxam (Figura 2).

Em contrapartida nota-se pela análise das vias metabólicas, uma inibição nas rotas de aminoácidos pelas vias da aspartato/glutamato/alanina, dos cianoaminoácidos e da glicina/serina/treonina. No presente trabalho notou-se redução nas taxas de L-alanina, forma alternativa de aquisição de N pelos vegetais, sendo que esta pode ser formada pela conversão do glutamato. Esta redução pode ter sido resposta da manutenção de outras formas de N do ciclo, como é o caso do aspartato ou glutamato, porém esses metabolitos não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Dessa forma permitindo a formação de aminoácidos, como foi verificado, mesmo com a redução das taxas de alanina (Forde and Lea 2007).

A via que envolve a produção dos metabolitos serina e glicina, está envolvida na fotorrespiração que acontece principalmente em espécies C3, caso da soja. Nessas condições a partir do fosfoglicerato é produzida serina, que é convertida a glicina. Plantas originadas de sementes submetidas ao TS, mostraram menores taxas desses aminoácidos, o que é um indicativo de menor ocorrência da rota de fotorrespiração, esse fenômeno não só proporciona menor rentabilidade de açúcares produzidos para as plantas, como possui maior custo energético em sua ocorrência. Nesse sentido plantas sob TS apresentam um metabolismo com respostas na metabolômica, com otimização fotossintética, podendo contribuir para um melhor desempenho em campo (Busch 2020).

Mesmo que essas vias relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, tenham ocorrência reduzida pelo TS, o metabolismo de purinas aumentou. Purinas são alcaloides do metabolismo secundário, originadas de aminoácidos tais como glicina e L-glutamina. Compostos do metabolismo secundário, possuem importância no desenvolvimento vegetal desempenhando atividades contra herbivoria, patógenos, competição entre espécies vegetais e na defesa a estresses abióticos (Cui et al. 2019).

Também foi observada crescente abundância de nucleotídeos para as plantas de soja originadas do tratamento com tiametoxam e inoculantes (*Bradyrhizobium elkanni* e *B.*

*japonicum*). Esses metabólitos são considerados extremamente importantes para todos os organismos vivos, por sua relação direta com a síntese de ácidos nucleicos, de produtos primários (sacarose, polissacarídeos, fosfolipídios) e secundários (Stasolla et al. 2003). A maior abundância foi visualizada para timina (pirimidina), adenina e guanina (ambas purinas), comprovando que os tratamentos exigiam das plantas um metabolismo mais refinado no fluxo bioenergético.

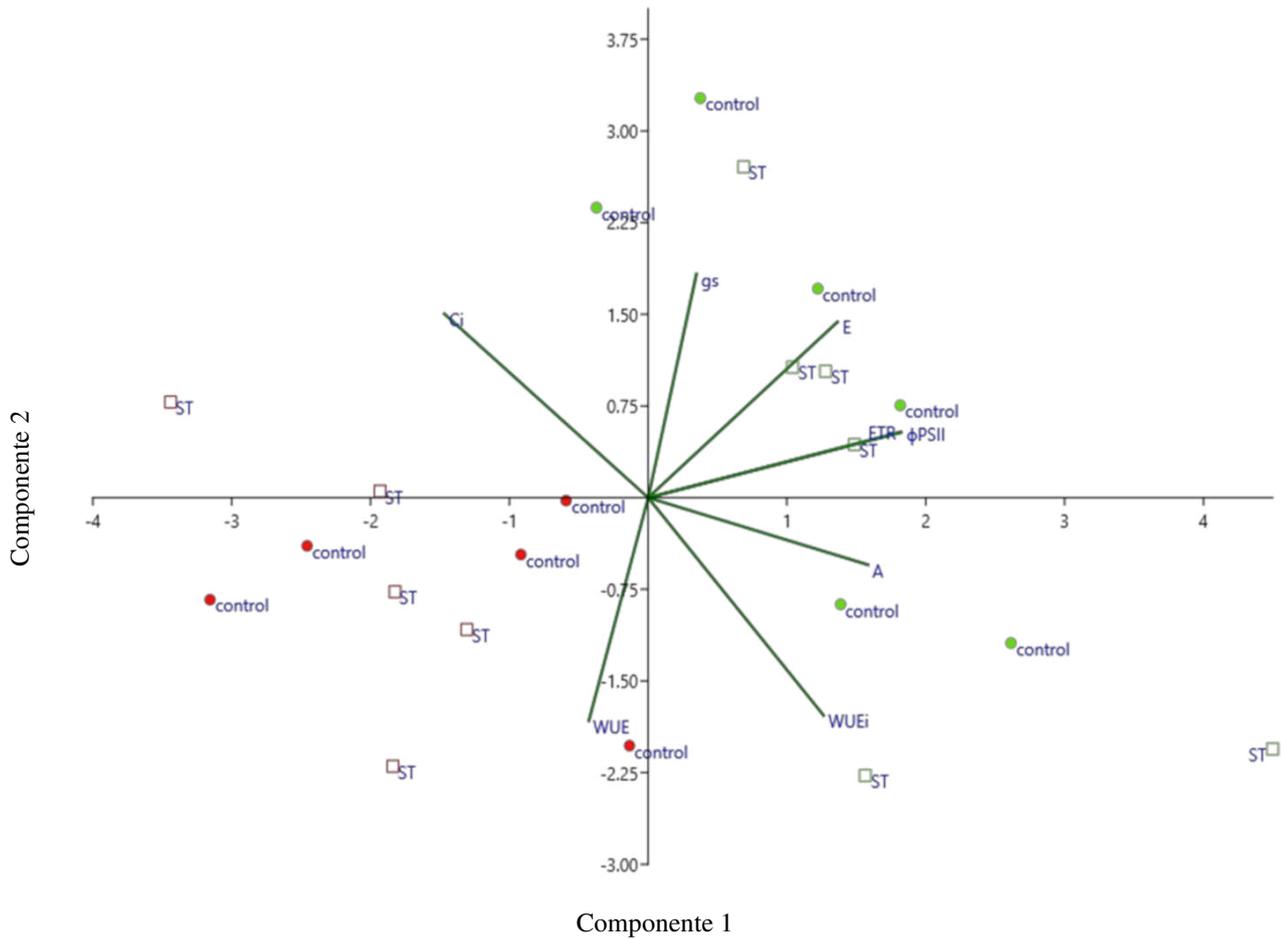
Ocorreu também maior taxa de ácidos orgânicos ácido treônico, benzóico, glicólico, succínico, ácido linoléico, linolênico, chiquímico e caféico. O ácido caféico, é um metabólito envolvido no gerenciamento de estresses vegetais, sendo esses bióticos e/ou abióticos, podendo também ser utilizado na síntese de lignina (Riaz et al. 2018).

Os resultados observados mostram uma abundância considerável de adenosina em plantas originadas do TS, o nucleosídeo é a fonte mais proeminente de duas moléculas essenciais para a bioenergética das plantas, difosfato de adenosina (ADP) e trifosfato de adenosina (ATP) (Flörchinger et al. 2006). Esse cenário é justificado pela atividade da nitrogenase (enzima que catalisa a FBN) nas bactérias, requerindo alto consumo de energia (Good 2018). Em relação à fonte metabólica de nitrogênio para nutrição vegetal, verificamos o aumento quantitativo de uréia nas plantas do grupo TS. Essa pode ter sido absorvida diretamente do solo ou originada do catabolismo da arginina, para remobilização do nitrogênio dos tecidos de origem (Witte 2011).

Além disso, outros metabólitos são descritos como envolvidos na defesa vegetal e foram observados em abundância elevada no grupo TS. O galactinol (precursor da rafinose), é um importante composto relacionado à defesa das plantas, atuando contra o estresse biótico e abiótico (Meyer et al. 2018), possuindo também ação protetora contra o estresse oxidativo (Nishizawa et al. 2008). A etanolamina que possui papel na embriogênese, no desenvolvimento de órgãos e formação da membrana celular, age também com indução da tolerância ao estresse vegetal (Rajaeian and Ehsanpour 2015). E o pirazol que é considerado uma classe importante de compostos com atividades biológicas (Palacios et al. 1999) e como regulador de crescimento de plantas (Silva et al. 2002).

Para as análises de trocas gasosas e fluorescência de clorofila *a*, realizadas nos estádios fenológicos V2 e V4, adotamos a análise multivariada para entender o potencial agrupamento dessas variáveis (Figura 3). Através da análise de componentes principais (PCA) nota-se que os 2 componentes são capazes de explicar mais de 81,30% da variabilidade das amostras, sendo 49,45% explicados pelo PC1 e 31,87% pelo PC2. Assim pode-se considerar

que o mapa bidimensional apresentado é adequado para avaliar as relações entre as variáveis fisiológicas analisadas, uma vez que explica grande parte da variabilidade dos dados.



**Figura 3.** Gráfico biplot para tratamento de sementes em relação ao fisiológico em duas fases fenológicas V2 (símbolos verdes) e V4 (símbolos vermelhos). Os símbolos quadrados representam o tratamento industrial de sementes (ST) e os círculos representam o tratamento de controle (controle). Parâmetros avaliados: condutância estomática (gs), transpiração (E), evapotranspiração (ETR), eficiência quântica do fotossistema 2 (PSII), taxa de fotossíntese líquida (A), eficiência intrínseca do uso da água (WUEi), eficiência instantânea do uso da água (WUE) e concentração interna de carbono (Ci).

É possível verificar um agrupamento dos parâmetros em relação ao estágio fenológico avaliado (estádios V2 e V4), independente do tratamento utilizado. Essa separação temporal entre os pontos de amostragem, mostrou um desempenho fotossintético contrastante, evidenciado principalmente pela correlação negativa do WUE durante o estágio V4. A análise dos componentes principais (ACP) para os dados de trocas gasosas em estágio V2, demonstraram que as plantas tiveram maior atividade fotossintética e maior correlação entre as variáveis analisadas, quando comparadas as plantas em estágio V4, fenômeno que já era esperado.

Em estágio fenológico V2 a absorção de água e nutrientes do solo pelas plantas de soja, se torna suficiente para mantê-la, deixando de depender assim das reservas de suas folhas cotiledonares. Ocorre também fase de maturação das folhas, aumento da eficiência fotossintética, ganhos no crescimento das plantas e início da nodulação, com a fixação biológica de nitrogênio (Neumaier et al. 2000). Sendo assim as maiores correlações entre os parâmetros fotossintéticos visualizados em estágio V2 esperadas.

A compreensão das mudanças metabólicas que ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento das plantas, pode fornecer uma nova visão dos mecanismos fisiológicos e sua relação com estas (Hong et al. 2016). Verificando se que não ocorreu alteração na associação dos parâmetros dos componentes, na ACP, independentemente do tratamento utilizado, nota-se que a adoção do TS não influenciou esses parâmetros.

No entanto dado que as avaliações dos parâmetros fotossintéticos e metabolômicos foram realizadas em mesmo estágio, pode ser considerado um estudo comparativo do uso do TS, para essas características. Apesar da não alteração de parâmetros de trocas gasosas, a análise metabolômica realizada em estágio V4 permitiu a verificação de maior síntese e presença de metabolitos como, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, ácidos orgânicos e nucleotídeos em plantas originadas do TS. Essa maior taxa dos metabolitos como já justificada pela literatura, condiciona a essas plantas características como tolerância a estresses, resposta osmoprotetora, síntese de lignina, antocianinas, ácidos nucleicos, produtos primários e secundários, sinalização, defesa sistêmica e papel contra estresses oxidativos.

## CONCLUSÕES

Consideramos que o uso das análises metabolômicas e fisiológicas associadas são ferramentas extremamente importantes para elucidar mecanismos ainda desconhecidos, como para o tratamento de plantas com pesticidas. Foi possível traçar o perfil metabólico de plantas de soja submetidas ao tratamento industrial de sementes, interação entre tiametoxam e inoculantes (*Bradyrhizobium elkanni* e *B. japonicum*), permitindo verificar o efeito proeminente do tratamento industrial de sementes em três principais vias vegetais: metabolismo de defesa, metabolismo de nitrogênio e metabolismo de carboidratos. Entre essas vias, todas são melhoradas com o tratamento com tiametoxam e inoculantes (*Bradyrhizobium elkanni* e *B. japonicum*). Verificou se também que apesar da não alteração de parâmetros fotossintéticos pelo uso do TS, houve maior síntese de metabolitos de importância aos mais diversos aspectos vegetais. Consideramos que a ação metabólica do tratamento industrial de sementes na cultura da soja proporciona um efeito positivo para o desenvolvimento inicial da cultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afifi M, Lee E, Lukens L, Swanton C (2015) Thiamethoxam as a seed treatment alters the physiological response of maize (*Zea mays*) seedlings to neighbouring weeds. *Pest Manag Sci* 71:505–514. <https://doi.org/10.1002/ps.3789>
- An PNT, Yamaguchi M, Fukusaki E (2017) Metabolic profiling of *Drosophila melanogaster* metamorphosis: a new insight into the central metabolic pathways. *Metabolomics* 13:1–13. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1167-1>
- Anami S, De Block M, MacHuka J, Van Lijsebettens M (2009) Molecular improvement of tropical maize for drought stress tolerance in Sub-Saharan Africa. *CRC Crit Rev Plant Sci* 28:16–35. <https://doi.org/10.1080/07352680802665305>
- Bajji M, Lutts S, Kinet JM (2001) Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Sci* 160:669–681. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00443-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00443-X)
- Beutler AN, Centurion JF (2004) Soil compaction and fertilization in soybean productivity. *Sci Agric* 61:626–631. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162004000600010>
- Boivin S, Fonouni-Farde C, Frugier F (2016) How auxin and cytokinin phytohormones modulate root microbe interactions. *Front Plant Sci* 7:1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01240>
- Bortoletto WV, Macedo WR, de Oliveira TC, Souza DS (2017) Agrochemicals and storage times on soybean seed vigor. *Pesqui Agropecu Bras* 52:129–132. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017000200007>
- Busch FA (2020) Photorespiration in the context of Rubisco biochemistry, CO<sub>2</sub> diffusion and metabolism. *Plant J* 101:919–939. <https://doi.org/10.1111/tpj.14674>
- Cataneo AC, Ferreira LC, Carvalho JC, et al (2010) Improved germination of soybean seed treated with thiamethoxam under drought conditions. *Seed Sci Technol* 38:248–251. <https://doi.org/10.15258/sst.2010.38.1.27>
- Chong J, Soufan O, Li C, et al (2018) MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res* 46:W486–W494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>
- Cui G, Zhang Y, Zhang W, et al (2019) Response of Carbon and Nitrogen Metabolism and Secondary Metabolites to Drought Stress and Salt Stress in Plants. *J Plant Biol* 62:387–399. <https://doi.org/10.1007/s12374-019-0257-1>

- da Cunha RP, Corrêa MF, Schuch LOB, et al (2015) Different treatments of seeds on the development of soybean plants | Diferentes tratamentos de sementes sobre o desenvolvimento de plantas de soja. *Cienc Rural* 45:1761–1767. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140742>
- Daie J (1989) Phloem loading of sucrose: Update and opportunities in molecular biology. *Plant Mol Biol Report* 7:106–115. <https://doi.org/10.1007/BF02669626>
- Das A, Rushton PJ, Rohila JS (2017) Metabolomic profiling of soybeans (*Glycine max* L.) reveals the importance of sugar and nitrogen metabolism under drought and heat stress. *Plants* 6:199–208. <https://doi.org/10.3390/plants6020021>
- Douglas G, Hale AB, Crabtree MJ, et al (2015) A requirement for Gch1 and tetrahydrobiopterin in embryonic development. *Dev Biol* 399:129–138. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.12.025>
- Duke SO (2018) Interaction of Chemical Pesticides and Their Formulation Ingredients with Microbes Associated with Plants and Plant Pests. *J Agric Food Chem* 66:7553–7561. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02316>
- Dukhnytskyi B (2019) World agricultural production. *Ekon APK* 59–65. <https://doi.org/10.32317/2221-1055.201907059>
- Elbert A, Matthias H, Bernd S, et al (2008) Mini-review Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag Sci* 64:1099–1105. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Eloh K, Sasanelli N, Maxia A, Caboni P (2016) Untargeted Metabolomics of Tomato Plants after Root-Knot Nematode Infestation. *J Agric Food Chem* 64:5963–5968. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02181>
- Fábregas N, Fernie AR (2019) The metabolic response to drought. *J Exp Bot* 70:1077–1085. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery437>
- Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, et al (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol* 18:1157–61
- Flörchinger M, Zimmermann M, Traub M, et al (2006) Adenosine stimulates anabolic metabolism in developing castor bean (*Ricinus communis* L.) cotyledons. *Planta* 223:340–348. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0091-1>
- Forde BG, Lea PJ (2007) Glutamate in plants: Metabolism, regulation, and signalling. *J Exp Bot* 58:2339–2358. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm121>
- Forouzi A, Ghasemnezhad A, Nasrabad RG (2020) Phytochemical response of Stevia plant to growth promoting microorganisms under salinity stress. *South African J Bot* 000:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.04.001>

- Fraire-Velazquez S, Emmanuel V (2013) Abiotic Stress in Plants and Metabolic Responses. *Abiotic Stress - Plant Responses Appl Agric*. <https://doi.org/10.5772/54859>
- Ge G, Jiao W, Cui C, et al (2019) Thiamethoxam Metabolism and Metabolic Effects in Cell Suspension Culture of Tea (*Camellia sinensis* L.). *J Agric Food Chem* 67:7538–7546. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07011>
- Genty B, Harbinson J, Baker NR (1990) Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and non-respiratory conditions. *Plant Physiol Biochem* 28:1–30
- Goa I (2020) Cruiser® 350 fs. 1–21
- Good BA (2018) Toward nitrogen-fixing plants. 359:
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (1990) PAST: PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS. *Plant Physiol Biochem* 28:1–10
- Hampton J (2002) What is seed quality? *Seed Sci Technol* 30:1–10
- Hladik ML, Bradbury S, Schulte LA, et al (2017) Neonicotinoid insecticide removal by prairie strips in row-cropped watersheds with historical seed coating use. *Agric Ecosyst Environ* 241:160–167. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.03.015>
- Hoffmann LV, Nogueira Cardoso EJB (2001) Inibição da colonização por *Bradyrhizobium elkanii* mas não por *Glomus intraradices* em soja pelo ativador de defesa vegetal BTH. *Sci Agric* 58:795–799. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000400022>
- Hong J, Yang L, Zhang D, Shi J (2016) Plant metabolomics: An indispensable system biology tool for plant science. *Int J Mol Sci* 17:. <https://doi.org/10.3390/ijms17060767>
- Huber SC, Huber JL (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:431–444. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.431>
- Hungria M, Nogueira MA, Campos LJM, et al (2020) Seed pre-inoculation with *Bradyrhizobium* as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems. *Agron J* 1–15. <https://doi.org/10.1002/agj2.20392>
- Jeschke P, Nauen R (2008) Review Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag Sci* 64:1084–1098. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Kishore GM, Shah DM (1988) Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu Rev Biochem* 57:627–663. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.003211>
- Lanka SK, Senthil-Nathan S, Blouin DJ, Stout MJ (2017) Impact of Thiamethoxam Seed Treatment on Growth and Yield of Rice, *Oryza sativa*. *J Econ Entomol* 110:479–486.

- <https://doi.org/10.1093/jee/tox043>
- Li Y, Sun Z, Zhuang X, et al (2003) Research progress on microbial herbicides. *Crop Prot* 22:247–252. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00189-8](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00189-8)
- MacDonald MJ, D’Cunha GB (2007) A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem Cell Biol* 85:273–282
- Macedo WR, Araújo DK, Castro PR de C e. (2013a) Unravelling the physiologic and metabolic action of thiamethoxam on rice plants. *Pestic Biochem Physiol* 107:244–249. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.08.001>
- Macedo WR, Castro PR de C e. (2011) Thiamethoxam: Molecule moderator of growth, metabolism and production of spring wheat. *Pestic Biochem Physiol* 100:299–304. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.05.003>
- Macedo WR, Fernandes GM, Possenti RA, et al (2013b) Responses in root growth, nitrogen metabolism and nutritional quality in *Brachiaria* with the use of thiamethoxam. *Acta Physiol Plant* 35:205–211. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1064-1>
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* 51:659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- McGarigal K, Cushman S, Stafford S (2000) *Multivariate Statistics for Wildlife Ecology Research*. New York
- Meyer T, Vigouroux A, Aumont-Nicaise M, et al (2018) The plant defense signal galactinol is specifically used as a nutrient by the bacterial pathogen *Agrobacterium fabrum*. *J Biol Chem* 293:7930–7941. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001856>
- Mutava RN, Prince SJK, Syed NH, et al (2015) Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: A comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. *Plant Physiol Biochem* 86:109–120. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.11.010>
- Neumaier N, Nepomuceno AL, Farias JRB, Oya T (2000) Estádios de desenvolvimento da cultura de soja. *Estresse em Soja* 19–44
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol* 147:1251–1263. <https://doi.org/10.1104/pp.108.122465>
- Palacios F, Ochoa De Retana AM, Pagalday J (1999) A regioselective synthesis of 5-pyrazolones and pyrazoles from phosphazenes derived from hydrazines and acetylenic esters. *Tetrahedron* 55:14451–14458. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)00890-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00890-X)
- Qian H, Zhu Y, Chen S, et al (2018) Interacting effect of diclofop-methyl on the rice

- rhizosphere microbiome and denitrification. *Pestic Biochem Physiol* 146:90–96. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.002>
- Rajaeian SO, Ehsanpour AA (2015) Physiological responses of tobacco plants (*Nicotiana rustica*) pretreated with ethanolamine to salt stress. *Russ J Plant Physiol* 62:246–252. <https://doi.org/10.1134/S1021443715020156>
- Rautela A, Rani J, Debnath (Das) M (2019) Green synthesis of silver nanoparticles from *Tectona grandis* seeds extract: characterization and mechanism of antimicrobial action on different microorganisms. *J Anal Sci Technol* 10:. <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0163-z>
- Ravi S, Young T, Macinnis-Ng C, et al (2020) Untargeted metabolomics in halophytes: The role of different metabolites in New Zealand mangroves under multi-factorial abiotic stress conditions. *Environ Exp Bot* 173:103993. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.103993>
- Riaz U, Kharal MA, Murtaza G, et al (2018) Prospective Roles and Mechanisms of Caffeic Acid in Counter Plant Stress: A Mini Review. *Pakistan J Agric Res* 32:. <https://doi.org/10.17582/journal.pjar/2019/32.1.8.19>
- Ribbenstedt A, Ziarrusta H, Benskin JP (2018) Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. *PLoS One* 13:1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207082>
- RIGO A (2015) Obtenção E Caracterização De Farinhas De Soja Obtenção E Caracterização De Farinhas De Soja. Univ Reg Integr Do Alto Uruguai E Das Missões Uri - Erechim Dep Ciências Agrárias Programa Pós-Graduação Em Eng Aliment Aline Andressa
- Rodrigues LA, Alves CZ, Rego CHQ, et al (2017) Humic acid on germination and vigor of corn seeds. *Rev Caatinga* 30:149–154. <https://doi.org/10.1590/1983-21252017v30n116rc>
- Rodrigues TF, Bender FR, Sanzovo AWS, et al (2020) Impact of pesticides in properties of *Bradyrhizobium* spp. and in the symbiotic performance with soybean. *World J Microbiol Biotechnol* 36:1–16. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02949-5>
- Rodriguez H, Gonzalez T, Goire I, Bashan Y (2004) Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* 91:552–555. <https://doi.org/10.1007/s00114-004-0566-0>
- Rossmann DR, Byrne AM, Chilvers MI (2018) Profitability and efficacy of soybean seed treatment in Michigan. *Crop Prot* 114:44–52. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.08.003>
- Shulaev V, Cortes D, Miller G, Mittler R (2008) Metabolomics for plant stress response.

- Physiol Plant 132:199–208. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01025.x>
- Sidorova, Asaturova, Homyak AI (2018) Biologically active metabolites of bacillus subtilis and their role in the control of phytopathogenic microorganisms. Sel'skokhozyaistvennaya Biol 53:29–37. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.1.29eng>
- Silva VLM da, Silva AMS da, Pinto DCGA (2002) Síntese e transformação de 5-estiril-3-(2-hidroxifenil) pirazóis. Universidade de Aveiro
- Singh M, Kumar J, Singh S, et al (2015) Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. Rev Environ Sci Biotechnol 14:407–426. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9372-8>
- Stasolla C, Katahira R, Thorpe TA, Ashihara H (2003) Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. J Plant Physiol 160:1271–1295. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01169>
- Stein SE (1999) An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. J Am Soc Mass Spectrom 10:770–781. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(99\)00047-1](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(99)00047-1)
- Sturm A, Tang GQ (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. Trends Plant Sci 4:401–407. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01470-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01470-3)
- Sukumar P, Legué V, Vayssières A, et al (2013) Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. Plant, Cell Environ 36:909–919. <https://doi.org/10.1111/pce.12036>
- Taylor AG (1990) Selected Seed Treatments. New York 321–339. <https://doi.org/10.1002/celc.201300060>
- Witte CP (2011) Urea metabolism in plants. Plant Sci 180:431–438. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.010>