

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA – PPGBOT**



**QUANTIFICAÇÃO DE FLUXOS METABÓLICOS AO LONGO DA GERMINAÇÃO
E CRESCIMENTO INICIAL DE *Glycine max* (L.) Merr. (FABACEAE)**

Brasília/DF

2015

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA - PPGBOT**

THIAGO BATISTA MOREIRA

**QUANTIFICAÇÃO DE FLUXOS METABÓLICOS AO LONGO DA GERMINAÇÃO
E CRESCIMENTO INICIAL DE *Glycine max* (L.) Merr. (FABACEAE)**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Botânica pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica – PPGBOT da Universidade de Brasília.

Orientador: Thomas Christopher Rhys Williams

Brasília/DF

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Moreira, Thiago Batista

Quantificação de fluxos metabólicos ao longo da germinação e crescimento inicial de *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae)/ por Thiago Batista Moreira. 2015

89 f.; il.

Orientador: Thomas Christopher Rhys Williams

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, 2015

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MOREIRA, T. B.. **Quantificação de fluxos metabólicos ao longo da germinação e crescimento inicial de *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae)**. Brasília: Instituto de Biologia, Departamento de Botânica – Universidade de Brasília, 2015, 92 f.
Dissertação de Mestrado

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Thiago Batista Moreira

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Quantificação de fluxos metabólicos ao longo da germinação e crescimento inicial de *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae).

GRAU: Mestre

ANO: 2015

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Nome: Thiago Batista Moreira

Email: moreiratb@live.com

**À meus pais José e Sileide que sempre
investiram e acreditaram em mim.**

À Deus, por permitir caminhar mais um passo em minha caminhada.

Aos meus pais, José e Sileide, por aceitarem a difícil missão de me educar, por fazerem de mim uma pessoa melhor e por todo o apoio.

Ao meu orientador, Thomas Williams, que me orientou com toda a paciência durante todo mestrado, apesar das várias viagens que necessitou fazer. Por toda a ajuda nos experimentos e também nos momentos de coleta. Além das várias conversas que tivemos que me tranquilizavam e mostravam que tudo daria certo.

Ao meu irmão, Lucas, que me auxiliou em algumas ilustrações.

À minha namorada, Rebeca, que esteve ao meu lado por todo esse momento, ouvindo as chorumelas de que meu trabalho não estava bom o suficiente. Por me tranquilizar em momentos de prazos apertados.

Ao meu amigo Álvaro César por ceder um espaço em sua casa no período de conclusão da dissertação.

À família da Rebeca, tio Moacir, tia Nélcia, Débora e Samuka, que me receberam muito bem em sua casa fazendo dela minha segunda casa e família.

Aos companheiros de laboratório Estela, Marina, Lucas e Raquel que proporcionaram tardes de análises mais divertidas ao longo desses dois anos.

Aos professores Cristiane, Sarah, Fabian, Luiz e Wagner que através das bancas contribuíram pertinentemente com meu trabalho.

Aos professores Paulo, Micheline, Pujol, Naomi e Heloisa aos quais trabalhei boa parte da minha graduação e que me ajudaram a progredir assim como criar o gosto por pesquisa. para enfrentar o mestrado.

Aos meus amigos do Núcleo de Vida Cristã – NVC que sempre estão do lado nos momentos de relaxar e “resenhar”.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para eu estar aqui hoje.

*Do Senhor é a terra e tudo o que nela existe,
o mundo e os que nele vivem.*

Salmos 24:1 (NVI)

RESUMO

Durante o crescimento heterotrófico, as plântulas dependem completamente das reservas armazenadas na semente. Tais reservas proporcionam o carbono e o nitrogênio necessário para a produção de biomassa, bem como poder redutor e ATP necessários para a manutenção e crescimento. Embora, conhecimentos detalhados dos processos metabólicos responsáveis pela mobilização das reservas durante esse momento do desenvolvimento sejam evidentes, a utilização das reservas e a contribuição de cada uma para o balanço de carbono, de nitrogênio e de energia em plântulas permanecem ainda obscuras. Na tentativa de elucidar essas questões utilizou-se da análise de balanço de fluxos (ABF) para estudar o metabolismo e a mobilização de reservas durante a germinação e o crescimento inicial em plântulas de soja. Para tanto, primeiramente realizou-se uma caracterização extensiva da biomassa das plântulas durante a germinação e crescimento inicial com o objetivo de determinar as restrições para o ABF. Um modelo metabólico baseado no genoma de *Arabidopsis thaliana* foi adaptado possibilitando a degradação de reservas não contempladas no modelo original, além de possibilitar o transporte de metabólitos entre os cotilédones e o eixo. As simulações do metabolismo levou em conta a alta eficiência do metabolismo aplicando uma função objetivo da minimização de fluxos de todas as reações ativadas. Os resultados das simulações mostraram que a degradação dos açúcares solúveis e o aumento da concentração de aminoácidos livres ocorreram durante a germinação. Nos períodos subsequentes a germinação, houve a degradação de ácidos graxos pela β -oxidação e ativação do ciclo do glioxalato, e um transporte significativo de metabólitos entre os cotilédones e o eixo. Os resultados obtidos demonstraram que diferentes tipos de reservas são utilizados de forma coordenada para atender as necessidades do crescimento das plântulas e auxiliam a prever modificações no metabolismo e na composição de reservas das sementes ou a atividade enzimática no metabolismo em diferentes condições as quais as plântulas podem ser submetidas durante a germinação e o crescimento inicial.

Palavras-chave: análise de balanço de fluxos, fluxos metabólicos, crescimento inicial, *Glycine max*, germinação, mobilização de reservas

ABSTRACT

During heterotrophic growth seedlings depend entirely upon the reserves previously stored within the seed. Such reserves provide the carbon and nitrogen necessary for the production of new biomass, as well as the reducing power and ATP necessary for cell maintenance and growth. Whilst we have detailed knowledge of the metabolic processes responsible for mobilization of seed reserves, how the degradation of different reserves is coordinated and how each type of reserve contributes to the carbon, nitrogen and energy balance of the seedling remains unclear. To address these questions we used flux balance analysis (FBA) to study metabolism and reserve mobilisation during initial growth of soybean seedlings. This firstly involved the extensive characterisation of seedling biomass during initial growth with the aim of determining constraints for FBA. A pre-existing genome scale stoichiometric metabolic model was then adapted to allow the analysis of reserve degradation and the transport of metabolites between cotyledons and the growing seedling. FBA indicated extensive shifts in primary metabolism during seedling growth. The first day of post-germinative growth was characterised by degradation of raffinose series sugars and amino acids released from protein. Subsequent days saw the activation of the glyoxylate cycle and significant transport of metabolites between cotyledons and the growing seedling. These data help reveal how different types of reserves are used in a coordinated fashion to meet the needs of the growing seedling and may help to predict the effects of manipulation of seed reserve composition or enzyme activity on metabolism and growth.

Key-words: Flux Balance Analysis, metabolic fluxes, initial growth, Glycine max, germination, reserve mobilization

Lista de Figuras

- Figura 1. Partes da plântula de soja.24
- Figura 2. Delineamento experimental de germinação e crescimento inicial de soja ao longo do tempo. Os círculos representam os potes e os números nos círculos representam a quantidade de sementes em cada pote. Var. 313 - BRS 313 [Tieta]; Var. RC - MG/BR46 [Conquista].....29
- Figura 3. Comprimento dos eixos durante a germinação e crescimento inicial da soja e nomenclatura utilizada.30
- Figura 4. Proporção dos constituintes de massa fresca ao longo da germinação e crescimento inicial da soja. A: cotilédones e B eixo da variedade BR/MG46 [Conquista]. C: cotilédones e D: eixo da variedade BRS 313 [Tieta]. Teor de água calculado a partir da diferença entre massa seca e massa fresca.....39
- Figura 5. Proporções de açúcares solúveis totais (AST) em porcentagem de massa seca ao longo da germinação e crescimento inicial em soja. A: cotilédones e B eixo da variedade BR/MG46 [Conquista]. C: cotilédones e D: eixo da variedade BRS 313 [Tieta]. Os valores correspondem às médias de cinco repetições \pm erro padrão40
- Figura 6. Proporção de amido em porcentagem de massa seca ao longo da germinação e crescimento inicial em soja. A: cotilédones e B eixo da variedade BR/MG46 [Conquista]. C: cotilédones e D: eixo da variedade BRS 313 [Tieta]. Os valores correspondem às médias de cinco repetições \pm erro padrão.43
- Figura 7. Proporção de parede celular em porcentagem de massa seca ao longo da germinação e crescimento inicial em soja. A: cotilédones e B eixo da variedade BR/MG46 [Conquista]. C: cotilédones e D: eixo da variedade BRS 313 [Tieta]. Os valores correspondem às médias de cinco repetições \pm erro padrão.44
- Figura 8. Proporção de proteínas totais em porcentagem de massa seca ao longo da germinação e crescimento inicial em soja. A: cotilédones e B eixo da variedade BR/MG46 [Conquista]. C: cotilédones e D: eixo da variedade BRS 313 [Tieta]. Os valores correspondem às médias de cinco repetições \pm erro padrão.45
- Figura 9. Proporção de ácidos graxos totais em porcentagem de massa seca ao longo da germinação e crescimento inicial de soja. A: cotilédones e B eixo da variedade BR/MG46 [Conquista]. C: cotilédones e D: eixo da variedade BRS 313 [Tieta]. Os valores correspondem às médias de cinco repetições \pm erro padrão.46
- Figura 10. Concentração de AST e sua variação no tegumento ao longo da germinação e crescimento inicial em soja variedade BR/MG46 [Conquista]. Quantidades em micrograma

de açúcar (μg) por miligrama de massa seca. Os valores correspondem à soma das quantidades dos açúcares identificados em CLAE.	49
Figura 11. Perfil metabólico dos cotilédones da variedade BR/MG46 [Conquista] ao longo da germinação e crescimento inicial de soja. As estrelas indicam diferenças estatísticas significativas das quantidades de compostos em relação aos valores obtidos em 24h.....	53
Figura 12. Perfil metabólico da eixo da variedade BR/MG46 [Conquista] ao longo da germinação e crescimento inicial de soja. As estrelas indicam diferenças estatísticas significativas das quantidades de compostos em relação aos valores obtidos em 24h.....	54
Figura 13. Perfil metabólico em cotilédones da variedade BRS 313 [Tieta] ao longo da germinação e crescimento inicial de soja. As estrelas indicam diferenças estatísticas significativas das quantidades de compostos em relação aos valores obtidos em 24h.....	56
Figura 14. Perfil metabólico da eixo da variedade BRS [Tieta] ao longo da germinação e crescimento inicial de soja. As estrelas indicam diferenças estatísticas significativas das quantidades de compostos em relação aos valores obtidos em 24h.....	57
Figura 15. Comparação da variação das reservas ao longo da germinação e crescimento inicial de duas variedades de soja. À esquerda os gráficos são referentes aos cotilédones e à direita aos eixos.....	60
Figura 16. Representação dos fluxos metabólicos em cotilédones e eixo durante a germinação e crescimento inicial de soja em 24-48h. A caixa no centro da figura representa o transporte pelo floema. As linhas pontilhadas indicam magnitudes de fluxos menores que $0,1 \text{ mmol.pln}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e as linhas preenchidas fluxos $\geq 0,1 \text{ mmol.pln}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Nem todos os fluxos estão representados na figura.....	67
Figura 17. Representação dos fluxos metabólicos em cotilédones e eixo durante a germinação e crescimento inicial de soja em 48-72h. A caixa no centro da figura representa o transporte pelo floema. As linhas pontilhadas indicam magnitudes de fluxos menores que $0,1 \text{ mmol.pln}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e as linhas preenchidas fluxos $\geq 0,1 \text{ mmol.pln}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Nem todos os fluxos estão representados na figura.....	68
Figura 18. Representação dos fluxos metabólicos em cotilédones e eixo durante a germinação e crescimento inicial de soja em 72-96h. A caixa no centro da figura representa o transporte pelo floema. As linhas pontilhadas indicam magnitudes de fluxos menores que $0,1 \text{ mmol.pln}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e as linhas preenchidas fluxos $\geq 0,1 \text{ mmol.pln}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Nem todos os fluxos estão representados na figura.....	69

Lista de Tabelas

- Tabela 1. Relação dos açúcares solúveis e suas concentrações quantificadas em CLAE em cotilédones de soja *Glycine max* (L.) Merr. nas variedades BR/MG46 [Conquista] e BRS 313 [Tieta] durante a germinação e crescimento inicial. 41
- Tabela 2. Relação dos açúcares solúveis e suas concentrações quantificadas em CLAE em eixos de soja *Glycine max* (L.) Merr. nas variedades BR/MG46 [Conquista] e BRS 313 [Tieta] durante a germinação e crescimento inicial. 42
- Tabela 3. Relação dos ácidos graxos e suas concentrações quantificadas em CGEM em cotilédones de soja *Glycine max* (L.) Merr. nas variedades BR/MG46 [Conquista] e BRS 313 [Tieta] durante a germinação e crescimento inicial. 47
- Tabela 4. Relação dos ácidos graxos e suas concentrações quantificadas em CGEM em eixos de soja *Glycine max* (L.) Merr. nas variedades BR/MG46 [Conquista] e BRS 313 [Tieta] durante a germinação e crescimento inicial. 48
- Tabela 5. Relação dos açúcares encontrados nos tegumentos da variedade BR/MG46 [Conquista], e suas quantidades de açúcar por massa seca ao longo da germinação e crescimento inicial. 49
- Tabela 6. Relação dos açúcares e compostos mais abundantes identificados nos exudados de floema da variedade BR/MG46 [Conquista]. Os compostos analisados pelo perfil metabólico estão em unidades relativas à 24h. 51
- Tabela 7. Relação das literaturas consultadas que foram utilizadas para a construção do modelo. 59

Lista de Abreviações

- AAs: Aminoácidos, 48
ABF: Análise do Balanço de Fluxos, 17
ACET: Acetato, 60
ACET-COA: Acetil-Coenzima A, 60
ACP: Proteínas Carreadoras de Grupos Acil, 61
AFM: Análise de Fluxos Metabólicos, 16
AGr: Ácidos Graxos, 58
ALA: Alanina, 63
AMG: Amiloglucosidase, 32
AOs: Ácidos Orgânicos, 48
ARG: Arginina, 61
ASN: Asparagina, 62
ASP: Aspartato, 61
AST: Açúcares Solúveis Totais, 31
ATP: Adenosina Trifosfato, 61
bSAC: Sacarose presente na biomassa, 60
CGEM: Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas, 34
CIT: Citrato, 61
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, 32
CYS: Cisteína, 62
CYTc: Citocromo C, 61
DHAP: Dihidroxiacetona-Fosfato, 60
EMAGs: Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos, 34
EST: Estaquiase, 62
FAD: Dinucleotídeo de Flavina e Adenina Oxidado, 63
FADH₂: Dinucleotídeo de Flavina e Adenina Reduzida, 63
FRU: Frutose, 60
FRU-6P: Frutose-6-Fosfato, 60
FUM: Fumarato, 61
GABA: Ácido Gama-Aminobutírico, 62
GAP: Gliceraldeído-3-Fosfato, 60
GLC: Glicose, 60
GLC-1P: Glicose-1-Fosfato, 62
GLC-6P: Glicose-6-Fosfato, 60
GLN: Glutamina, 63
GLT: Glutamato, 61
GLY: Glicina, 61
GLYOX: Glioxalato, 61
HIS: Histidina, 62
ILE: Isoleucina, 61
ISOCIT: Isocitrato, 61

LEU: Leucina, 61
LYS: Lisina, 61
MAL: Malato, 61
MET: Metionina, 62
MS: Massa Seca, 43
MSTFA: N-metil-N-(trimetilsilil) Trifluoroacetamida, 35
NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Hidreto, 61
NaOH: Hidróxido de Sódio, 32
NH₄⁺: Amônia, 61
NSF: National Science Foundation, 25
O₂: Oxigênio, 61
Oligossacarídeos de Série Rafínósica, 20
OXACET: Oxaloacetato, 61
PC: Parede Celular, 60
PEP: Fosfoenolpiruvato, 60
PHE: Fenilalanina, 62
PRO: Prolina, 63
PYR: Piruvato, 60
Q: Ubiquinona, 61
RAF: Rafinose, 62
SAC: Sacarose, 62
SER: Serina, 62
SUC: Succinato, 61
SUC-COA: Succinil-Coenzima A, 61
TCA: Ciclo do Ácido Tricarboxílico, 61
THR: Treonina, 61
TRP: Triptofano, 62
TYR: Tirosina, 61
UDP-GAL: Uridina Difosfato-Galactose, 63
UDP-GLC: Uridina Difosfato-Glicose, 60
USDA: United States Department of Agriculture, 25
USDOE: United States Department of Energy, 25
VAL: Valina, 61
VER: Verbascose, 62
xSAC: Sacarose externa ao modelo (tegumento), 60
XYL-5P: Xilulose-5-Fosfato, 60
 α -GAL: α -D-Galactose, 62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL	18
2.2. RESERVAS E MOBILIZAÇÃO	19
2.3. ANÁLISE DOS FLUXOS METABÓLICOS	20
2.4. SOJA (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.)	23
3. JUSTIFICATIVA	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. OBJETIVO GERAL	27
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	28
5.2. MATERIAL VEGETAL	28
5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
5.4. MONTAGEM E CONDIÇÕES DO EXPERIMENTO	29
5.5. COLETA E ARMAZENAMENTO	29
5.6. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA	31
5.6.1. Extração e Quantificação de Açúcares Solúveis Totais (AST)	31
5.6.2. Extração e Quantificação de Amido	32
5.6.3. Extração de Compostos Solúveis e Quantificação de Parede Celular	33
5.6.4. Quantificação de Nitrogênio Total e Cálculo da Quantidade de Proteínas	33
5.6.5. Extração, Derivatização e Quantificação de Ácidos Graxos	34
5.6.6. Perfil Metabólico	34
5.6.7. Obtenção e Perfil do Exudado de Floema	36
5.6.8. Extração e Quantificação de Compostos no Tegumento	36
5.6.9. Modelagem e Quantificação dos Fluxos	37

5.7.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
6.	RESULTADOS	38
6.1.	BIOMASSA	38
6.2.	AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS (AST)	39
6.3.	AMIDO	41
6.4.	PAREDE CELULAR	42
6.5.	PROTEÍNAS TOTAIS	43
6.6.	ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS	44
6.7.	TEGUMENTO	47
6.8.	EXUDADO DE FLOEMA	49
6.9.	PERFIL METABÓLICO	50
6.10.	COMPARAÇÃO BIOQUÍMICA ENTRE AS VARIEDADES	57
6.11.	CONSTRUÇÃO DO MODELO	57
6.12.	MODELAGEM METABÓLICA	60
7.	DISCUSSÃO	68
7.1.	ABSORÇÃO DE ÁGUA E CRESCIMENTO DAS PLÂNTULAS	68
7.2.	METABOLISMO DE CARBOIDRATOS	68
7.3.	METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS	72
7.4.	METABOLISMO DE PROTEÍNAS	74
7.5.	TRANSPORTE NO FLOEMA	76
8.	CONCLUSÃO	78
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
	ANEXO I – Tabela de Composição de Aminoácidos das Proteínas de Soja	90
	ANEXO II – Tabela de Composição de Açúcares de Parede Celular de Soja	91
	ANEXO III – Relação das Reações Modificadas e Adicionadas ao Modelo	92

1. INTRODUÇÃO

A germinação, importante processo no desenvolvimento da planta, inicia-se a partir da hidratação dos tecidos do embrião e finaliza após a protrusão da radícula através do tegumento e a sua curvatura (Bewley & Black 1994). Ela é dependente de fatores externos (p. ex. disponibilidade de água, oxigênio, temperatura) e internos (p. ex. reativação do metabolismo, embebição dos tecidos etc.) que podem determinar o sucesso germinativo do embrião. Após a germinação, inicia-se um rápido crescimento celular devido ao alongamento do eixo embrionário que possibilita que a plântula emerja no solo (Bewley & Black 1994). Essa fase do desenvolvimento é considerada a mais crítica do desenvolvimento, pois, as plântulas heterotróficas são dependentes das reservas presentes nos cotilédones ou endosperma, além de altamente vulneráveis a estresses ambientais (Castro et al. 2004; Buckeridge et al. 2004a). Ao alcançar o estágio juvenil, as plântulas tornam-se independentes das reservas e desenvolvem tanto o sistema radicular quanto a capacidade fotossintética para mantê-las vivas (Melo et al. 2004).

Como fonte de nutrição as sementes contêm quantidades significativas de substâncias, sendo as principais os carboidratos, lipídeos e proteínas (Bewley & Black 1994). Essas reservas são utilizadas na formação dos componentes estruturais e no fornecimento de energia durante o crescimento (Ziegler 1995; Buckeridge et al. 2004a). A quantidade e a qualidade das reservas variam com a espécie e as condições ambientais durante o enchimento dos grãos (Rotundo & Westgate 2009; Spears et al. 1997).

O estudo da utilização das reservas nos processos de germinação e crescimento inicial ajuda a compreender a forma de utilização das reservas durante o metabolismo da planta nos seus estágios iniciais. Tais informações sobre o metabolismo e a mobilização de reservas apresentam grande interesse agrônomico e comercial (Dixon & Sumner 2003), como a engenharia metabólica para produção de compostos de interesse e melhoramento de espécies.

Em resposta à demanda por conhecimento desses processos metabólicos alguns métodos foram desenvolvidos. Uma das metodologias empregadas é a Análise de Fluxos Metabólicos (AFM), que utiliza isótopos estáveis de carbono para a determinação de fluxos na rede metabólica (Libourel & Shachar-Hill 2008) e objetiva uma quantificação detalhada dos fluxos no metabolismo primário central (Dieuaide-Noubhani & Alonso 2014). Entretanto,

a AFM não é muito adequada para a aplicação em plantas, devido às características complexas das redes metabólicas, tais como a redundância e a compartimentalização das vias. (Entwistle & Rees 1988; Borchert et al. 1993).

Como alternativa ao AFM desenvolveu-se outro método denominado Análise do Balanço de Fluxos (ABF) (Sweetlove & Ratcliffe 2011). ABF utiliza-se das informações da matriz estequiométrica e das medidas de entrada (reservas) e saída (biomassa) para determinar uma distribuição de fluxo ótima num modelo de metabolismo (Grafahrend-Belau et al. 2014; Sweetlove & Ratcliffe 2011). Uma das vantagens do ABF é a facilidade de cobrir grandes redes metabólicas (Sweetlove & Ratcliffe 2011) e por isso tem se mostrado uma poderosa ferramenta na análise dos fluxos (Grafahrend-Belau et al. 2014) e já tem sido aplicado com sucesso em sistemas vegetais, por exemplo, *Arabidopsis thaliana* (Poolman et al. 2009; Dal'Molin et al. 2010; Radrich et al. 2010; Williams et al. 2010; Kleessen et al. 2012) entre outras. Por isso, ABF representa uma possível ferramenta para o entendimento do metabolismo durante a germinação e o crescimento inicial da planta.

A soja é uma espécie de leguminosa domesticada no oriente por volta do século XI a.C. Atualmente, é um dos grãos mais comercializados do mundo. No Brasil, sua produtividade foi de 81,5 milhões de toneladas em 2013 (Conab 2013) e nos Estados Unidos cerca de 82,6 milhões de toneladas do grão. Essa alta produção ocorre em resposta à sua utilização em vários ramos, por exemplo, na alimentação humana e animal (Conab 2008), produção de biodiesel e exportações (Embrapa 2004). Algumas características colocam a soja como possível modelo para estudos de germinação e crescimento em espécies leguminosas. São elas: ser desprovida de endosperma, logo, suas reservas localizam-se somente nos cotilédones (Carlson 1973); sua composição química é importante, por ser uma das leguminosas com maior teor de proteínas (40-45%) (Nielsen 1996); e, as informações genômicas e do metabolismo já se encontram em base de dados como o SoyBase (Grant & Shoemaker 2006) e SoyCyc. Dessa forma, estudos do metabolismo e quantificação dos fluxos na germinação e crescimento inicial da soja, podem fornecer informações importantes para estudos agrônômicos e biotecnológicos no beneficiamento dos grãos de soja.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL

A germinação é um importante processo no ciclo de vida das plantas com sementes, pois, uma nova geração surge e possibilita a propagação e manutenção da espécie. É um processo biológico natural em que as sementes saem de seu estágio de latência, uma vez que as condições necessárias para o crescimento e desenvolvimento, tais como umidade, temperatura e nutrientes, dentre outros fatores são ofertados (Sangronis & Machado 2007). Atualmente, é consenso que a embebição marca o início do processo de germinação (Castro et al. 2004). Porém, sua finalização ainda é motivo de discussões e envolve alguns critérios. A germinação a partir do critério fisiológico é completa quando uma parte do embrião, geralmente a radícula, penetra e trespassa os tecidos ao qual está envolvida e se curva pelo gravitropismo (Labouriau 1983; Cardoso 2004). Já o critério agrônomico ou tecnológico leva em conta a emergência da plântula através da superfície do solo (Cardoso 2004). Para Bewley & Black (1994) é incorreto considerar germinação a emergência da plântula no solo, pois a germinação será finalizada, muitas vezes, antes da plântula ser visível na superfície do solo. Assim, germinação *stricto sensu* não inclui o crescimento da plântula que começa quando a germinação finaliza (Bewley & Black 1994).

Alguns fatores externos são importantes e responsáveis para a germinação. Tais fatores são: disponibilidade de água, a temperatura, o oxigênio e a luz. A disponibilidade de água é imprescindível, pois, a absorção de água por embebição é que inicia o processo de germinação e um nível adequado de hidratação é que permitirá a reativação do processo metabólico (Castro et al. 2004). A temperatura, geralmente na faixa de 20-30 °C mostra-se adequada à germinação de muitas espécies subtropicais e tropicais (Aguiar et al. 1993). A temperatura pode influenciar na composição das sementes (Piper & Boote 1999; Thomas et al. 2003) bem como em altas temperaturas pode inibir a germinação (Toh et al. 2008). A temperatura pode influenciar no sucesso, quando se encontra na faixa considerada ótima; ou morte da semente, quando ultrapassa os limites máximo e mínimo da faixa ótima de cada espécie. O oxigênio é importante para as reações metabólicas, entre elas principalmente, a respiração. A ativação das sementes pela luz está ligada aos pigmentos denominados fitocromos, que dependendo do comprimento de onda do espectro a que tiver exposta poderá inibir ou estimular a germinação e sua sensibilidade varia com a espécie.

No processo de germinação, alguns eventos internos, tais como: a embebição, a reativação do metabolismo e síntese de DNA, RNA e proteínas; a respiração e ativação de enzimas e organelas; são fundamentais. A embebição, frequentemente, funciona num padrão trifásico de absorção e hidratação por água (Bewley & Black 1994; Castro et al. 2004). A fase I é rápida, depende de fatores puramente físicos e atinge sua maior absorção. Na fase II, são ativados os processos metabólicos necessários para o desenvolvimento do embrião, esta fase é dependente da temperatura e do potencial hídrico da semente. Finalmente, a fase III há um novo aumento do conteúdo de água da semente devido ao aumento do volume do embrião (protrusão da radícula) e inicia o alongamento celular, esta fase é considerada a mais crítica do desenvolvimento, visto que as plântulas são altamente vulneráveis aos estresses ambientais Koizumi & Kano (2014) demonstraram através de ressonância magnética esse padrão de entrada de água na semente de soja durante o processo de embebição. Meyer et al. (2007) descreveu com detalhes o processo de embebição em soja assim como a cinética nesse momento.

O primeiro sinal que a germinação se completou é, geralmente, um aumento no comprimento e massa fresca da radícula. Os primeiros estágios no desenvolvimento são caracterizados por um período de rápida divisão celular e alongamento do eixo (Nielsen 1996). Bewley & Black (1994) dividem em dois tipos de germinação. O tipo epígea, o hipocótilo se alonga e eleva os cotilédones para cima do solo; e, o tipo hipógea, o epicótilo se alonga elevando as folhas e mantendo os cotilédones sob o solo. No crescimento pós-germinativo, o período de esgotamento das reservas deve coincidir com o estágio em que as plântulas apresentam um sistema radicular e estruturas fotossintéticas bem desenvolvidas; caso contrário, as plântulas tendem a morrer (Kitajima 1996).

2.2. RESERVAS E MOBILIZAÇÃO

As reservas em sementes possuem basicamente duas funções, a manutenção e o desenvolvimento do embrião até a formação da plântula que apresente a capacidade de se manter de forma autotrófica (Buckeridge et al. 2004a; Melo et al. 2004). As reservas se encontram geralmente nos tecidos em toda semente, inclusive no embrião e são utilizadas na germinação, após a hidratação dos tecidos, para o crescimento inicial da plântula.

As sementes contêm quantidades significativas de substâncias estocadas como fonte de nutrição (Bewley & Black 1994). As principais substâncias armazenadas são os carboidratos, os lipídeos (fontes de energia e carbono) e proteínas (fonte de carbono,

nitrogênio e enxofre) (Buckeridge et al. 2004a) que são utilizados na formação de componentes estruturais durante o crescimento (Ziegler 1995). A composição química das sementes é determinada, em última análise, por fatores genéticos, por isso, pode variar muito entre espécies diferentes; bem como, pelas condições ambientais e práticas agronômicas durante o desenvolvimento e maturação da semente (Bewley & Black 1994).

Os principais compostos derivados de carboidratos que atuam como reserva em sementes são os oligossacarídeos de série rafínósica (OSRs), o amido, os polissacarídeos de parede celular (Buckeridge et al. 2004a), as hemiceluloses e açúcares livres (Bewley & Black 1994). Os principais lipídeos são encontrados em corpos lipídicos na forma de triglicerídeos ou ácidos graxos livres podendo compor cerca de 60% da massa de algumas oleaginosas. Os ácidos palmítico (16:0), oleico (18:1 Δ^9) e linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$) são ácidos graxos que geralmente ocorrem em maior frequência e quantidade (Buckeridge et al. 2004a). Os principais grupos de proteína de reserva podem ser separados com base na sua solubilidade de acordo com as “frações de Osborne”. São elas as prolaminas, encontradas principalmente em sementes de cereais e gramíneas; as glutelinas, importante estoque de enxofre; as globulinas, principal proteína de reserva em sementes de dicotiledôneas; e, as albuminas, também presentes em dicotiledôneas (Osborne 1924; Bewley & Black 1994; Buckeridge et al. 2004a).

A mobilização de reservas funciona através de reações químicas dos tipos degradativas (catabolismo) e/ou sintéticas (anabolismo), ambas catalisadas por enzimas, que formam parte de uma rede metabólica. Existem diversas abordagens que justificam o estudo da mobilização de reservas. Por exemplo, a agrônomo-tecnológica, visa aspectos importantes de aplicação tecnológica em plantas, como a melhoria na qualidade de espécies cultivadas para produção de alimentos e o melhoramento genético destas. Outra abordagem, a puramente biológica, na qual se tenta compreender aspectos fisiológicos, ecológicos, celulares e bioquímicos dos diferentes processos de mobilização de reservas (Buckeridge et al. 2004b). Informações sobre o metabolismo possibilitam o seu entendimento e a partir disso fornecer informações que poderão ser utilizadas na manipulação metabólica de interesse agrônomo e comercial (Dixon & Sumner 2003).

2.3. ANÁLISE DOS FLUXOS METABÓLICOS

As plantas apresentam um sistema metabólico substancialmente mais complexo que outros organismos (Allen et al. 2009; Sweetlove & Ratcliffe 2011). Isso ocorre por causa dos muitos aspectos que são interligados no sistema vegetal, por exemplo; o fato de ser

ectotérmica e autotrófica, ser sésil e, assim, estar sujeita às inúmeras condições ambientais (Sweetlove & Ratcliffe 2011). Como consequência dessas características, as plantas apresentam um vasto repertório químico (Allen et al. 2009) para defesa contra patógenos ou competição no ambiente onde se encontra, e também uma extensa compartimentalização celular (ap Rees 1987). Uma reação específica de uma via metabólica em plantas pode ocorrer em mais de um compartimento e, em casos extremos, pode ocorrer duplicação de uma via inteira em dois ou mais compartimentos (Kruger & Ratcliffe 2008). Assim, considerando que as vias podem interagir e estar duplicadas em mais de um compartimento, não se pode estudar essas vias de forma isolada, mas as considerando como parte de uma rede metabólica. Assim, a manipulação de forma racional dos fluxos dentro das redes requer ferramentas que podem analisar a rede como um todo, ao invés de se focar em passos ou vias individuais (Kruger & Ratcliffe 2008).

No metabolismo central, o funcionamento de cada enzima, assim como as vias, é dependente do estado operacional de toda a rede metabólica (Kruger & Ratcliffe 2008; Sweetlove & Ratcliffe 2011). Nos últimos anos, os esforços foram direcionados na mensuração dos fluxos em nível de rede (Sweetlove & Ratcliffe 2011). Uma das metodologias empregadas é a Análise dos Fluxos Metabólicos (AFM), que se baseia no estado estacionário do metabolismo, ou seja, admite que os pools de metabólitos se mantenham constantes ao longo do tempo. A metodologia de AFM é uma aproximação para a determinação dos fluxos dos metabólitos contendo isótopos estáveis de carbono, o qual é disponibilizado no meio para a planta (Libourel & Shachar-Hill 2008; Allen et al. 2009). O objetivo do AFM é uma quantificação detalhada de todos os fluxos no metabolismo central (Dieuaide-Noubhani & Alonso 2014). Entretanto, essa aproximação não é muito adequada para estudos com plantas, por que as redes metabólicas são complexas, com vias redundantes e compartimentalizadas (Entwistle & Rees 1988; Borchert et al. 1993).

Essas limitações tem direcionado a procura por alternativas de aproximações complementares para caracterizar as redes metabólicas em plantas (Sweetlove & Ratcliffe 2011). Análise do Balanço de Fluxos (ABF) surgiu como alternativa para a análise dos fluxos em redes metabólicas, acompanhando estudos em microbiologia (Borodina & Nielsen 2005). Como o AFM, o ABF é uma abordagem de modelagem baseada em restrições, na qual os fluxos do estado estacionário em uma rede metabólica são previstos pela aplicação de restrições de balanço de massas para um modelo de rede, com base numa matriz estequiométrica das reações (Sweetlove & Ratcliffe 2011). Assim, em outras palavras, ABF

utiliza as informações da matriz estequiométrica e as medidas de entrada e saída para determinar uma distribuição de fluxo ótima (Grafahrend-Belau et al. 2014).

Uma das vantagens do ABF é a facilidade em cobrir redes metabólicas muito extensas, e seus modelos podem ser construídos utilizando informações da decodificação do genoma (Sweetlove & Ratcliffe 2011). Porém, as informações não fornecem os sentidos das reações, configurando uma limitação na utilização de dados genômicos. Para a compreensão dos sentidos das reações seria necessário saber a energia livre de Gibbs ou o sentido de cada reação (Sweetlove & Ratcliffe 2011); todavia, em termos experimentais, se torna impossível medir todas elas, necessitando de aproximações teóricas para estimar padrões das energias (Jankowski et al. 2008). Em adição, não requer informações de parâmetros cinéticos, somente da estequiometria das reações, que são conhecidas assim como de uma função objetivo (*objective function*, inglês), necessária para identificar a redistribuição ótima dos fluxos, entre todos os possíveis, no estado estacionário (Grafahrend-Belau et al. 2009).

Dessa forma, ABF se mostra como uma poderosa ferramenta para a análise dos fluxos e tem sido aplicado com sucesso em muitos sistemas vegetais e fotossintetizantes, por exemplo, em *Arabidopsis thaliana* (Poolman et al. 2009; Dal'Molin et al. 2010; Radrich et al. 2010; Williams et al. 2010; Kleessen et al. 2012), em plantas e em sementes de *Hordeum* (L.) (cevada) (Grafahrend-Belau et al. 2009; Rolletschek et al. 2011; Grafahrend-Belau et al. 2013), em folhas de *Zea mays* (L.) (milho) (Dal'Molin et al. 2010; Saha et al. 2011), em sementes de *Brassica napus* (Schwender et al. 2006), em algas verdes (Cogne et al. 2011; Boyle & Morgan 2009) e em bactérias fotoautotróficas (Knoop et al. 2010; Montagud et al. 2010). Cabe mencionar que ABF é aplicado para estudar diferentes aspectos do metabolismo, tais como deleção de genes (Edwards & Palsson 2000; Förster et al. 2003) e vias redundantes (Van Dien & Lidstrom 2002).

Tomados em conjunto essas informações indicam que ABF representa uma ferramenta útil de entendimento do metabolismo e que pode ser aplicado a processos como a germinação e crescimento inicial em plantas, desde que possuam o seu genoma sequenciado. Neste contexto, utilizando-se dados experimentais de utilização das reservas e produção de biomassa como restrições ao modelo é possível compreender o funcionamento geral da rede metabólica e fluxos metabólicos relacionados à germinação e crescimento inicial de plantas.

2.4. SOJA (*Glycine max* (L.) Merr.)

A soja é uma espécie leguminosa oriunda da China (Morse 1950) que emergiu como espécie domesticada por volta do século XI a.C. (Hymowitz 1970), chegando à outros países (e.g. Coréia e Japão) por volta do século III (Nagata 1959; Embrapa 2004). No Ocidente, especificamente na Europa, a soja chegou somente ao fim do século XV (Rocha 2009). Devido a fatores climáticos a tentativa de cultivo foi fracassada na Europa. No fim do século XIX, os Estados Unidos iniciaram a exploração comercial da soja para forrageio e, por volta de 1920, como grãos para alimentação.

No Brasil, a introdução da soja se deu aproximadamente no final do século XIX por volta de 1882 na região da Bahia, (Santos 1988; Black 2000). A maior utilização da soja se deu a partir dos anos 40 do século XX (Marcos Filho et al. 1982). O caminho da soja no Brasil se assemelhou ao observado nos Estados Unidos, primeiramente sendo utilizada como forrageio para animais, transcorrendo assim, todo o país e atualmente está presente em todos os estados brasileiros (Albrecht 2009). Nos últimos anos, o cultivo da soja tem ocupado uma área aproximada de 27,7 milhões de hectares com uma produção de 81,5 milhões de toneladas (Conab 2013) atrás somente dos Estados Unidos, que apresentam uma área plantada de cerca de 30,8 milhões de hectares e produtividade de 82,6 milhões de toneladas (USDA 2013).

A alta produção de grãos de soja é devida à sua utilização em vários ramos da economia. Em função do seu elevado valor nutricional (Hadley & Hymowitz 1973) é utilizado na alimentação humana e animal (Conab 2008), podendo ser transformada em diversos alimentos proteicos, tais como farinha, leite, proteína texturizada, dentre outros alimentos e na prevenção de doenças (Gitzelmann & Auricchio 1965). Além disso, tem sido amplamente utilizada na indústria para a fabricação de outros tipos de derivados, como tintas, vernizes e combustíveis, como o biodiesel (Embrapa 2004), que vem sendo testado por várias instituições de pesquisa, em diversas cidades brasileiras (Rocha 2009). Isso configura um significativo aumento da demanda do produto no Brasil, além da demanda de exportações para outros países (Embrapa 2004).

A semente de soja, como em muitas outras leguminosas, é desprovida de endosperma e consiste de um tegumento (testa) que envolve um embrião grande e bem desenvolvido (Carlson 1973) (Figura 1). O embrião consiste em dois grandes e suculentos cotilédones, uma plúmula com dois primórdios foliares bem desenvolvidos (epicótilo) e um eixo hipocótilo-radícula que repousa em uma rasa depressão formada nos cotilédones (Carlson 1973; Muller

1981). Assim, por não possuir endosperma, as reservas para o crescimento do embrião encontram-se somente nos cotilédones. Na embebição, as sementes de soja absorvem, por toda sua superfície, aproximadamente 50% de seu peso em água (Filho & Amabile 1996). Em condições adequadas de umidade e temperatura, a radícula emerge a partir de uma ruptura no tegumento na região da micrópila em um ou dois dias (Williams 1950). A soja apresenta germinação do tipo epígea, ou seja, o hipocótilo é responsável pela elongação e elevação dos cotilédones acima do solo (Carlson 1973).

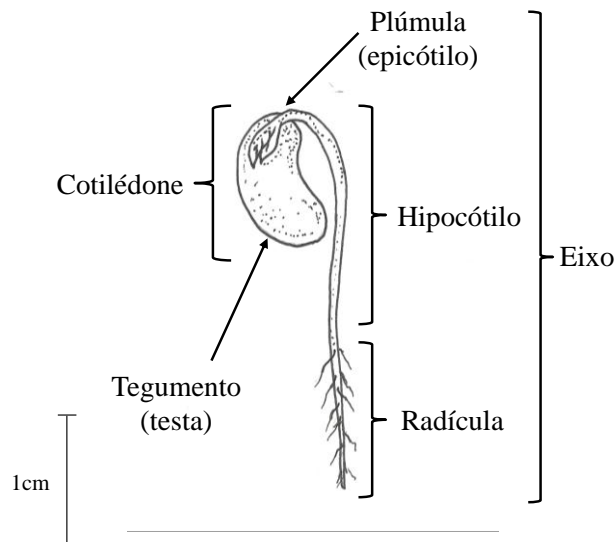


Figura 1. Partes da plântula de soja.

A composição química de reservas da soja é importante, tanto para a exploração comercial, quanto para os processos de germinação e crescimento inicial, principalmente, por causa da quantidade de proteínas totais. As variedades cultivadas de soja contêm de 20 a 35% de carboidratos (Morais & Silva 1996; Moreira 1999), das quais a maioria encontrada na semente madura é sacarose (41-68%), estaquiose (12-35%) e rafinose (5-16%) (Nielsen 1996). Na maturidade fisiológica, o teor de amido corresponde a cerca de 1-3% da massa seca (Yazdi-Samadi et al. 1977) e teores ainda menores são encontrados em sementes verdes (Morais & Silva 1996). O teor de proteína varia de 40-45%, composta de 70-80% de proteínas de reserva 11S e 7S conhecidas como glicinina e β -conglucina (Nielsen 1996). Por causa da predominância de proteínas, a soja desempenha um papel fundamental na determinação das propriedades funcionais e nutricionais de alimentos derivados dela (Nielsen 1996). O teor de lipídeos varia de 15-25% dependendo da variedade (Moreira 1999). Em soja são encontrados por volta de 15% de ácidos graxos saturados e 85% de insaturados incluindo cerca de 1-3% de

substâncias não saponificáveis como os esteroides, tocoferóis e vitamina A (Morais & Silva 1996).

Em estudos com plantas cultivadas de interesse comercial, o mapeamento genético das mesmas é importante e funcional. Para a soja, o projeto de sequenciamento do genoma foi um projeto interinstitucional realizado por três grupos: National Science Foundation (NSF), United States Department of Energy (USDOE) e United States Department of Agriculture (USDA) (Jackson et al. 2006). O mapa genético específico para a soja já se encontra hospedado no SoyBase (Grant & Shoemaker 2006) e também um banco de dados de reações metabólicas no SoyCyc.

Devido a esse conjunto de características, seu uso é justificado como modelo para alguns estudos. Por isso, neste trabalho usou-se a soja como modelo para estudos de fluxos metabólicos durante a germinação e crescimento inicial, principalmente devido ao seu tipo de semente (reservas localizadas somente nos cotilédones) e por sua composição.

3. JUSTIFICATIVA

A germinação e o crescimento inicial são processos importantes no desenvolvimento em plantas e representam fases críticas e de maior vulnerabilidade. A mobilização de reservas durante esses processos possui importante papel durante o desenvolvimento inicial e contribui para o fornecimento de energia, carbono e nitrogênio para o crescimento da plântula. Além da necessidade de entender a mobilização de reservas nesse contexto, o entendimento acerca do metabolismo durante a germinação e crescimento inicial em plantas é ainda necessário nesses períodos iniciais do desenvolvimento. O estudo do metabolismo central em plantas, se mostra complexo devido à quantidade de vias metabólicas examinadas simultaneamente, além da compartimentalização e duplicação de determinadas vias metabólicas. Portanto, a análise do metabolismo central como um todo carece de ferramentas apropriadas. A análise de balanço de fluxos (ABF) permite a análise do metabolismo a partir da quantificação de fluxos metabólicos obedecendo ao equilíbrio do balanço de matéria e energia, bem como às restrições impostas a partir de dados experimentais. A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) foi escolhida para o estudo devido à sua composição de reservas e informações genômicas e metabólicas, além de sua importância comercial. Dessa forma, esse estudo pode fornecer subsídios para outros estudos sobre o metabolismo em outras condições e em outras espécies, com as modificações necessárias para cada estudo, além de fornecer informações que poderão ser utilizadas em contextos agronômicos e biotecnológicos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

- Quantificar os fluxos metabólicos ao longo da germinação e crescimento inicial utilizando Análise de Balanço de Fluxos (ABF) em *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae) na variedade BR/MG46 [Conquista]

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um sistema experimental para avaliar os fluxos metabólicos ao longo da germinação e crescimento inicial da soja;
- Analisar a composição bioquímica da biomassa em cotilédones e eixo ao longo germinação e crescimento inicial;
- Analisar o perfil de metabólitos primários;
- Estruturar e atualizar informações da matriz estequiométrica do modelo para as simulações;
- Utilizar os dados experimentais como forma de restrição de entradas e saídas no modelo, visando à quantificação de fluxos durante a germinação e crescimento inicial;
- Testar confiabilidade da aplicação do modelo a partir dos dados de perfil metabólico.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

O trabalho foi realizado nos laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais e de Bioquímica Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília – DF, Brasil.

5.2. MATERIAL VEGETAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) foi utilizada para os experimentos devido à sua composição e às informações que se encontram nos bancos de dados genômicos (GenBank) e metabólicos (SoyCyc, AraCyc e PlantCyc).

As sementes foram adquiridas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa (Cenargen) em duas variedades cultivadas BRS 313 [Tieta] (Moreira et al. 2010; Weber et al. 2010) e BR/MG46 [Conquista]. A primeira variedade apresenta massa média de 12,2 a 13,0g em 100 sementes¹. A composição por semente é de 22,0 a 22,9% de teor de óleo e de 35,3 a 37,2% de teor de proteína (Embrapa Soja, 2011). A segunda variedade apresenta massa média de 15,5g e sua composição é de 19,7% de teor de óleo e de 42,7% de teor de proteína.

Para evitar a perda de viabilidade de germinação, as sementes foram mantidas em frascos de vidros vedados e armazenadas em câmaras frias (temperatura ± 4 °C) até o início dos experimentos.

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento consistiu em crescer 450 sementes de cada variedade por 12, 24, 48 e 96h (Figura 2). As sementes foram acondicionadas em potes para o crescimento. Foram destinadas cinco potes por variedade por tempo, isto é, cada pote representou uma unidade experimental e cada conjunto de cinco potes por variedade representaram as repetições biológicas. No tempo de 12h, foram dispostas 50 sementes por pote para fornecer a quantidade de massa necessária para análise nesse tempo. Nos tempos restantes, foram dispostas dez sementes por potes. Cada conjunto de dez potes foi coletado no seu respectivo

¹ Cálculo utilizado para comparação de massas entre diferentes tipos de grãos.

tempo, ou seja, após 12, 24, 48, 72 e 96h de crescimento. O total do experimento foi de 50 potes e 900 sementes.

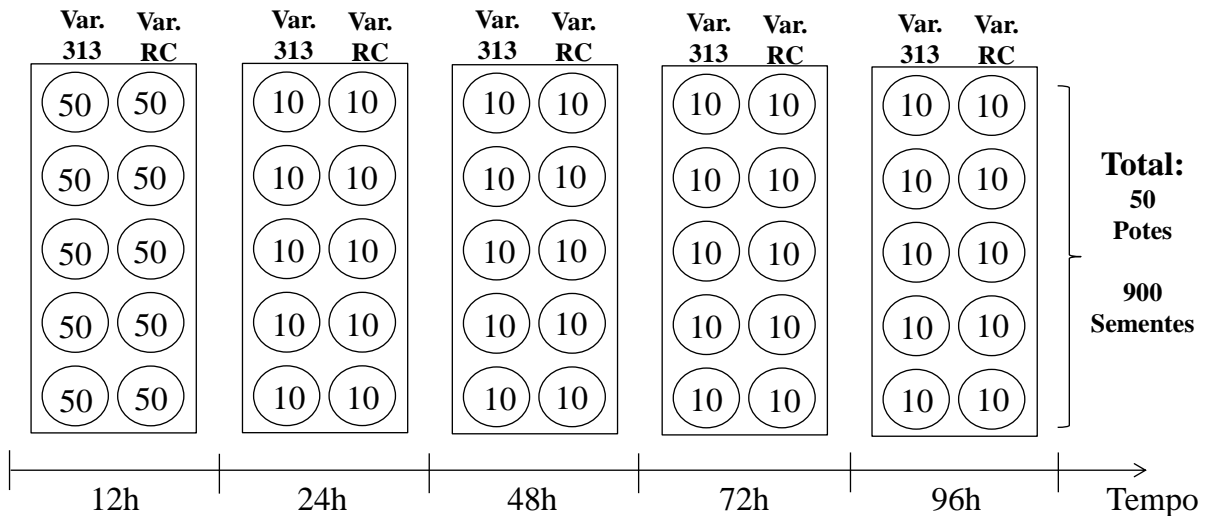


Figura 2. Delineamento experimental de germinação e crescimento inicial de soja ao longo do tempo. Os círculos representam os potes e os números nos círculos representam a quantidade de sementes em cada pote. Var. 313 - BRS 313 [Tieta]; Var. RC - MG/BR46 [Conquista].

5.4. MONTAGEM E CONDIÇÕES DO EXPERIMENTO

As sementes foram lavadas por cinco minutos com água destilada, repetido o processo por três vezes. O primeiro tempo estabelecido foi o de 12h, no qual as sementes foram embebidas em água destilada e coletadas após 12h. O meio para o cultivo da soja seguiu o método estabelecido por LeVan et al. (2008) com algumas modificações. Em potes de plástico de 500 mL o fundo foi recoberto com algodão hidrófilo e papel filtro, este evita que as raízes enrosquem no algodão e dificulte a coleta. O algodão foi umedecido com 25 mL de água destilada. As sementes foram organizadas sobre o conjunto algodão/papel filtro de modo que não estejam em contato com as laterais do pote ou em contato umas com as outras. As sementes foram recobertas com cerca 200 g areia umedecida com 12 mL de água destilada. A areia foi previamente lavada com água destilada e esterilizada em estufa a 120 °C. Os potes preparados foram etiquetados com o respectivo dia de coleta e mantidos no escuro a temperatura de 25 °C em câmara de germinação, até o momento de coleta.

5.5. COLETA E ARMAZENAMENTO

A Figura 3 demonstra os estágios de crescimento alcançados pelas plântulas ao longo do tempo. As coletas foram feitas ao final de cada tempo determinado. Após 12h de

embebição, quando se é possível separar os órgãos (cotilédones e eixo); após 24h, onde se observou a germinação de pelo menos 85% das sementes; e, após 48h, 72h e 96h. Os horários de coleta para todos os dias foram por volta das 14 horas do dia, exceto em 12h no qual a coleta foi realizada às 22 horas, pois se iniciou a embebição pela manhã do mesmo dia. Para padronizar a coleta aplicou-se o critério de comprimento dos eixos, ≥ 1 cm em 24h, ≥ 2 cm em 48h, ≥ 7 cm em 72h e ≥ 15 cm em 96h, para as plântulas a serem coletadas. O comprimento utilizado em cada tempo foi determinado a partir de testes prévios.

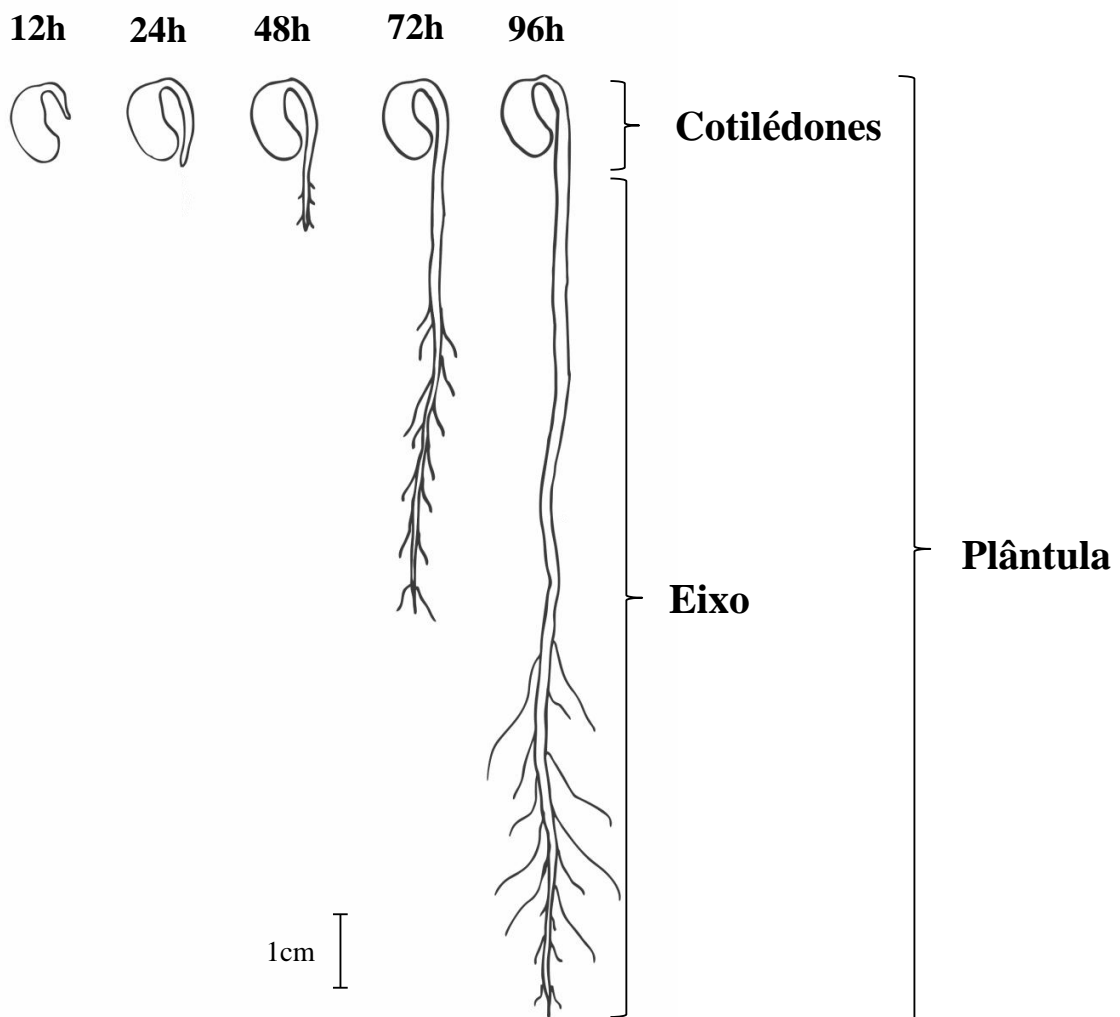


Figura 3. Comprimento dos eixos durante a germinação e crescimento inicial da soja e nomenclatura utilizada.

As sementes selecionadas foram coletadas destacando os cotilédones do eixo. Os cotilédones foram agrupados e pesados separadamente, assim os eixos de cada pote. O material vegetal foi pesado para o cálculo do teor de água absorvido. Imediatamente após a pesagem, os órgãos foram envolvidos em envelopes de papel alumínio etiquetados, que foram

congelados em nitrogênio líquido e mantidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. O material congelado foi liofilizado por 48h, para a remoção de água dos tecidos. Após a liofilização, o material foi novamente pesado obtendo-se sua massa seca, que foi utilizada nos cálculos da variação da massa pelo consumo de reservas durante o tempo de crescimento. O material liofilizado foi triturado em almofariz com pistilo e armazenados em microtubos de plástico de 2 mL a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.6. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA

O padrão de utilização das reservas durante a germinação e o crescimento inicial foi caracterizado bioquimicamente pela identificação dos compostos e a variação das quantidades ao longo do tempo.

5.6.1. Extração e Quantificação de Açúcares Solúveis Totais (AST)

Os AST foram extraídos a partir de 10 mg da biomassa seca dos cotilédones e do eixo. A extração foi feita utilizando 500 μL de etanol 80% (v/v) e incubada em banho-maria a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos (Praxedes et al. 2006). Após a incubação a mistura foi centrifugada a 11.000g por 10 minutos e o sobrenadante coletado para outro microtubo com a devida identificação. O procedimento foi repetido por quatro vezes até completar o volume aproximado de 2 mL de sobrenadante. A biomassa restante foi utilizada também para extrair amido, logo, foi necessário secar a biomassa para eliminação do etanol em capela de exaustão ou concentrador a vácuo, para que não interfira na ação das enzimas utilizadas no método de extração.

Os extratos etanólicos foram secos em concentrador a vácuo à temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ressuspendido em 250 μL de água ultra pura. Para a eliminação de proteínas que possam ter sido extraídas pelo método foi adicionado 1 mL de acetona PA a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ e incubadas em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12h. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados a 11.000g por 10 minutos à temperatura de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Thermo Scientific, Nova York – EUA). O extrato foi novamente seco para a retirada da acetona e ressuspendido em 1 mL de água ultra pura. Os tubos foram centrifugados a 11.000g por 30 minutos para que qualquer impureza seja depositada no fundo do microtubo e evitar entupimento da coluna de separação. Para se encaixar na amplitude de detecção do equipamento de análise foi necessário diluir as amostras 20 vezes num volume de 1 mL. A quantidade injetada é de 500 μL da amostra diluída, que são pipetadas em microtubo específico com tampa e filtro.

Os AST no extrato foram quantificados e identificados utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector amperométrico pulsado (ICS 3000, Dionex Corporation) em uma coluna (Carbopak PA-10, Dionex Corporation), por eluição com água ultra pura (74%) e hidróxido de sódio (NaOH) a 200mM (26%), com $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ por 35 minutos. Para a curva padrão foram utilizados os seguintes açúcares: glicose, frutose, sacarose, rafinose, estaquiase, verbascose e maltose; nas seguintes concentrações: 0,75; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Santos & Buckeridge 2004).

5.6.2. Extração e Quantificação de Amido

A extração e quantificação do amido seguiu o método da α -amilase (Amaral et al. 2007). Na extração, $480 \mu\text{L}$ de α -amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* ($120 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) (cód. E-ANAAM, MEGAZYME, Irlanda), diluída em tampão fosfato-salino (PBS, 10 mM pH 6,5) foram adicionadas à biomassa que restou da extração de AST. As amostras foram incubadas a 75°C por 30 minutos. Foi adicionado o mesmo volume da solução com a enzima e repetida a incubação. Após esta incubação, $480 \mu\text{L}$ de amiloglicosidase (AMG) de *Aspergillus niger* ($30 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) (cód.E-AMGPU, MEGAZYME, Irlanda), diluída em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5 foi adicionada aos tubos. As amostras foram incubadas a 50°C por 30 minutos, seguindo os mesmos passos da primeira incubação. Para finalizar a reação das e precipitá-las, $100 \mu\text{L}$ de ácido perclórico (Sigma-Aldrich) 0,8M foi acrescentado à solução em cada microtubo.

A quantificação do amido dos extratos foi feita através da glicose liberada no processo de hidrólise. Para tal, foi necessário centrifugar as soluções por pelo menos $11.000g$ por 2 minutos. A quantificação foi feita a partir de $20 \mu\text{L}$ do extrato pipetado em poço de microplaca de espectrofotômetro (96 poços) e adicionado de $300 \mu\text{L}$ do reagente Glicose PAP Liquiform (CENTERLAB, Brasil), contendo as enzimas glicose-oxidase ($\sim 11000 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) e peroxidase ($\sim 700 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), $290 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol pH 7,5. Após 15 min, o teor de glicose foi determinado a partir da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro de microplaca com comprimento de onda 510 nm. A curva padrão utilizada foi feita a partir da solução de glicose (SIGMA) à $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, nas concentrações de 0; 2,5; 5; 10,0; 17,5 e $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguindo o mesmo procedimento da pipetagem das amostras, ou seja, $20 \mu\text{L}$ da solução de glicose e $300 \mu\text{L}$ da solução de Glicose PAP. Todas as leituras foram feitas em triplicata, admitindo-se coeficientes de variação até 5% entre elas.

5.6.3. Extração de Compostos Solúveis e Quantificação de Parede Celular

A extração da parede celular foi feita a partir de 100 mg da biomassa liofilizada de cotilédones e aproximadamente 30 mg da biomassa do eixo². O método consiste na extração de todos os compostos solúveis do material vegetal, restando somente o material insolúvel da biomassa formado principalmente pela parede celular.

Para a extração, 1 mL de tampão de extração (água:ácido acético:fenol), na proporção de 2:1:2 (v/v), foi adicionado à biomassa em microtubos de plástico, seguindo de agitação em vortex. Os microtubos foram centrifugados a 3.200g por seis minutos, descartando o sobrenadante. Estes passos são repetidos por três vezes. Os reagentes utilizados no tampão de extração são tóxicos e foi necessário lavar as amostras para a retirada do tampão. As amostras foram lavadas com 1 mL de água ultra pura por quatro vezes, através da agitação e centrifugação, seguido do descarte do sobrenadante (Sriram et al. 2006). Após a última lavagem com água adicionou-se 1 mL de acetona para auxiliar na secagem do resíduo insolúvel. O resíduo foi seco em concentrador à vácuo a temperatura de 30 °C. O resíduo insolúvel remanescente foi pesado dentro dos microtubos. Após a extração, a massa do microtubo final (microtubo + resíduo remanescente) foi subtraída da massa do microtubo inicial (microtubo + biomassa), para obter a massa final de parede celular em relação à massa seca da biomassa.

5.6.4. Quantificação de Nitrogênio Total e Cálculo da Quantidade de Proteínas

As quantificações de proteína total foram feitas pelo processo de combustão da biomassa em analisador de carbono, nitrogênio e enxofre (CN-628S, Leco, St. Joseph - Mi, EUA). Foram utilizados 100 mg da biomassa seca de cotilédones e entre 15 e 20 mg da biomassa dos eixos. As amostras foram previamente secas em estufas à temperatura de 60 °C por pelo menos 12h. Após a secagem, as amostras foram pesadas em folhas de estanho as quais foram vedadas para a retirada de ar.

A combustão foi feita em excesso de oxigênio ($H_2O < 3$ ppm, $C_nH_m < 5$ ppm) (White Martins) à 950 °C. O gás hélio (He) ($H_2O < 3$ ppm, $O_2 < 2$ ppm) foi utilizado como gás carreador à pressão de 669 mmHg. A curva padrão foi feita utilizando padrões certificados previamente secos em estufa à 80 °C por 2h. Os padrões utilizados foram folha de pomar

² As massas diferenciadas para cada órgão analisado devem-se à quantidade de biomassa disponível para cada análise.

(Leco 502-055 - 44 a 52% C e 2,0 a 2,8% N) e fenilalanina (Leco 502-642 - 65,4% C e 8,5% N). Para alcançar pontos mais baixos na curva foi utilizado o padrão de folhas (25, 50, 100 e 150 mg) e em pontos mais altos a fenilalanina (25 e 50 mg), todos em triplicatas.

Os resultados obtidos representam a quantidade de nitrogênio total encontrado na amostra. Deste modo, para encontrar as quantidades de proteínas foi necessário converter os valores de nitrogênio total para proteína através de um fator determinado pelo método Kjeldahl (Kjeldahl 1883). Para valores mais concisos utilizou-se do fator de conversão determinado para grãos de soja (5,71) estabelecidos por (Greenfield & Southgate 2003). O cálculo consiste em multiplicar o fator determinado pela porcentagem do nitrogênio total obtido pelas análises.

5.6.5. Extração, Derivatização e Quantificação de Ácidos Graxos

Os ácidos graxos foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs) diretamente a partir de 5 mg de biomassa seca dos cotilédones e do eixo, utilizando metanol-ácido clorídrico (Laurens et al. 2012). A mistura metanol e ácido clorídrico, metila os ácidos graxos diretamente na biomassa. A reação foi feita dentro de microtubos de vidro com tampas de vedação, para evitar a evaporação dos reagentes durante a incubação. A incubação foi feita em placa aquecedora a 85 °C por uma hora. Após esse tempo, as amostras foram resfriadas à 25°C e foi adicionado 1 mL de hexano para a extração dos EMAGs da biomassa seca para o solvente. Os tubos foram levemente agitados e deixados incubar por uma hora, para que os EMAGs sejam diluídos no hexano, formando duas fases no microtubo. A fase superior (cerca de 500 µL) foi retirada e pipetada um novo tubo.

Um microlitro do extrato foi injetado e instantaneamente volatilizado. A nuvem formada é dividida com relação de *split* de 30:1, isto é, uma parte segue para a análise e o restante é descartado. O perfil dos ácidos graxos nas amostras foi determinado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CGEM) (Agilent, 7890-5975) utilizando uma coluna de 30 metros tipo INNOWAX (Laurens et al. 2012). EMAGs foram identificados utilizando a biblioteca NIST e quantificados utilizando curvas de calibração construídas a partir de uma mistura de EMAGs padrões específico para grãos.

5.6.6. Perfil Metabólico

A extração e derivatização das amostras para o perfil metabólico foi feita com base no método metanol-ribitol (Lisec et al. 2006), com modificações. A solução de extração foi

preparada com uma mistura de 1.400 μL de metanol PA (Sigma-Aldrich) e 60 μL de Adonitol (Sigma-Aldrich) à 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em água ultra pura para cada amostra, equivalentemente. O Adonitol foi utilizado como padrão interno de concentração conhecida, utilizado como controle para eventuais perdas no processo de extração. A extração foi feita a partir de 5 mg da biomassa seca e adicionada da solução de extração. Em um termoagitador a mistura foi incubada a 1000 rpm a 70 °C por 10 minutos. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 11.000g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um microtubo de vidro. Ao sobrenadante foram adicionados 750 μL de clorofórmio a -20 °C e 1.450 μL de água ultra pura a 4 °C e agitada por 10 segundos. A solução foi novamente centrifugada a 440g por 15 minutos. Da fase polar ou superior da solução, foram retirados 150 μL e transferido para um microtubo de plástico. Essa amostra foi seca em concentrador à vácuo a 25 °C por 2h. As amostras foram mantidas à temperatura de -20 °C até a sua derivatização.

Antes do processo de derivatização, as amostras passaram pelo concentrador à vácuo por 30 minutos, para eliminar qualquer presença de água. Após esse processo, 40 μL de cloridrato de metoxiamina (Sigma-Aldrich) à 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em piridina PA, foi adicionado nos microtubos e agitadas por duas horas à 37 °C em placa aquecedora com agitador a 900 rpm. O reagente foi preparado imediatamente no início do processo. Logo após o tempo de incubação do primeiro reagente, 70 μL de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) (Sigma-Aldrich) foi adicionado no microtubo e incubado à 37 °C por 30 minutos em placa aquecedora com agitador a 900 rpm. Durante o processo de derivatização os reagentes condensaram na parede ou tampa dos tubos, sendo necessária a centrifugação após cada incubação. Da solução derivatizada, 100 μL foram transferidos para tubos de microvolume de vidro (*inserts*).

A solução derivatizada foi analisada em cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas (CGEM). Os parâmetros de análise dos compostos das amostras seguiu o protocolo de Lise et al. (2006). Parâmetros de injeção: 1 μL da amostra a 230 °C foi injetada no modo com divisão (*split*), em duas proporções 10:1 em cotilédones e 30:1 para eixo devido às concentrações. O gás carreador foi o gás hélio com fluxo de 1,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A taxa de fluxo foi mantida constante com o controle de pressão eletrônico ativado. Parâmetros cromatográficos: a cromatografia foi realizada com coluna capilar 30 m HP-5. A temperatura do programa começou com 70 °C por 5 minutos, seguido de um aumento de 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até a temperatura de 330 °C e mantido nessa temperatura por 10 minutos. Parâmetros da espectrometria de massas: a faixa de massa registrada foi de m/z 70 para m/z 600 e a corrente

de polarização do filamento foi de -70 V, e o detector de voltagem será de aproximadamente 1700-1850 V.

5.6.7. Obtenção e Perfil do Exudado de Floema

Para obtenção do material vegetal necessário para a análise do exudado de floema utilizou-se dos mesmos métodos descritos acima na seção. Neste caso não foi coletado o exudado referente à 12h. A análise e identificação dos compostos que foram transportados via floema seguiu o método descrito em Tetyuk et al (2013), com modificações. Após cada tempo determinado as sementes germinadas foram coletadas. Foram feitas secções transversais no eixo das plântulas na divisão entre o hipocótilo e a radícula para expor o floema. Após a secção, as partes seccionadas foram imediatamente submersas numa solução a 20 mM de Na₂-EDTA por uma hora. Passado esse tempo a parte seccionada foi lavada com água destilada corrente e depois submersa em água ultra pura em tubos de 15 mL por pelo menos seis horas.

Após a coleta o exudado foi congelado em N₂ e liofilizado por 48h. Após a liofilização do exudado foi ressuscitado em dois mililitros de água ultra pura. Os exudados foram analisados em CLAE para identificação e quantificação dos açúcares seguindo a mesma metodologia descrita na seção 5.6.1. Açúcares Solúveis Totais (AST); e, CGEM para a identificação dos outros metabólitos seguindo a mesma metodologia descrita na seção 5.6.6. Perfil Metabólico.

5.6.8. Extração e Quantificação de Compostos no Tegumento

Os tegumentos foram coletados durante a coleta dos exudados de floema e também não foram coletados os tegumentos referentes à 12h.

Foram extraídos e analisados os açúcares solúveis totais utilizando os mesmos métodos para a determinação de AST. A partir de 10 mg da massa seca do tegumento utilizando 1 mL de etanol 80% uma única vez. O extrato foi seco e ressuscitado em 1 mL de água ultra pura e analisado em CLAE sem diluição utilizando as mesmas configurações de análises para AST.

O perfil metabólico também foi feito em tegumentos. A partir de 10 mg do tecido triturado seguindo os mesmos procedimentos de extração, derivatização e análise, descritos acima.

5.6.9. Modelagem e Quantificação dos Fluxos

Um modelo de metabolismo de *Arabidopsis thaliana* (Cheung et al. 2013) com modificações foi utilizado como base para a modelagem. O modelo foi duplicado para representar ambos os órgãos (cotilédones e eixo). Reações de transporte no floema a partir das informações de exudados do floema foram adicionadas ao modelo. Os dados experimentais das quantificações das reservas da biomassa foram utilizados para o cálculo dos fluxos que foram utilizados pelo modelo. O cálculo dos fluxos foi feito a partir da diferença entre os tempos, por exemplo, a diferença de sacarose em 48h em relação à 24h. Os valores dos fluxos foram calculados em milimol por plântula por dia (a cada 24h). Os dados obtidos pela quantificação das reservas da biomassa foram utilizados como restrições ao modelo, isto é, obrigações às quais o modelo é obrigado a cumprir, por exemplo, a ativação de determinada rota metabólica para sintetizar certa quantidade de parede celular no eixo. O tipo de modelagem utilizada é do tipo estrutural que leva em conta somente a matriz estequiométrica e seus compostos. A função objetivo (*object function*) utilizada foi a da minimização da soma de todos os fluxos do modelo, ou seja, o modelo forçou as reações a ter valores mínimos possíveis para atender as restrições impostas.

O software utilizado foi o ScrumPy (Poolman 2006). ScrumPy é um pacote de modelagem metabólica que tem sido desenvolvido pela Oxford Brookes Universities Cell Systems Modelling Group, é um software utilizado para a definição e análise de modelos metabólicos que utiliza a linguagem de programação Python. O ScrumPy possui recursos para modelagem cinética e estrutural, mas a ênfase está na modelagem estrutural e sua característica de maior relevância é a análise de modelos de grande porte (escala genômica).

5.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Cada pote com dez sementes representou uma unidade amostral do experimento que forneceu a quantidade de biomassa para as análises. Os valores foram ajustados para a massa correspondente de uma semente. Para os dados de biomassa foi aplicado o teste ANOVA (um critério) com Tukey a posteriori, em ambas as variedades. As análises de variâncias foram feitas entre os tempos de crescimento. Para os dados de perfil metabólico foi aplicado o teste T comparando valores aos valores obtidos em 24h pelo próprio programa VANTED 2.5. O teste T também foi aplicado na comparação dos dados de quantificação da biomassa entre as variedades ao longo do tempo. O software utilizado foi o BioStat 5.3.

6. RESULTADOS

6.1. BIOMASSA

As análises de biomassa foram feitas a partir da pesagem de massa fresca, massa seca e por cálculos de teor de água (Figura 4). A massa fresca correspondeu à soma da massa seca ao teor de água adquirido pelos tecidos durante a embebição e os processos subsequentes. As mudanças na massa fresca foram semelhantes nas duas variedades. Em cotilédones (Figura 4A e 4C), observou-se que as proporções entre os componentes de massa fresca mantiveram-se ao longo do tempo. A massa seca apresentou valores pouco acima de 40%, com uma diminuição significativa (de cerca de 3%) nos tempos finais.

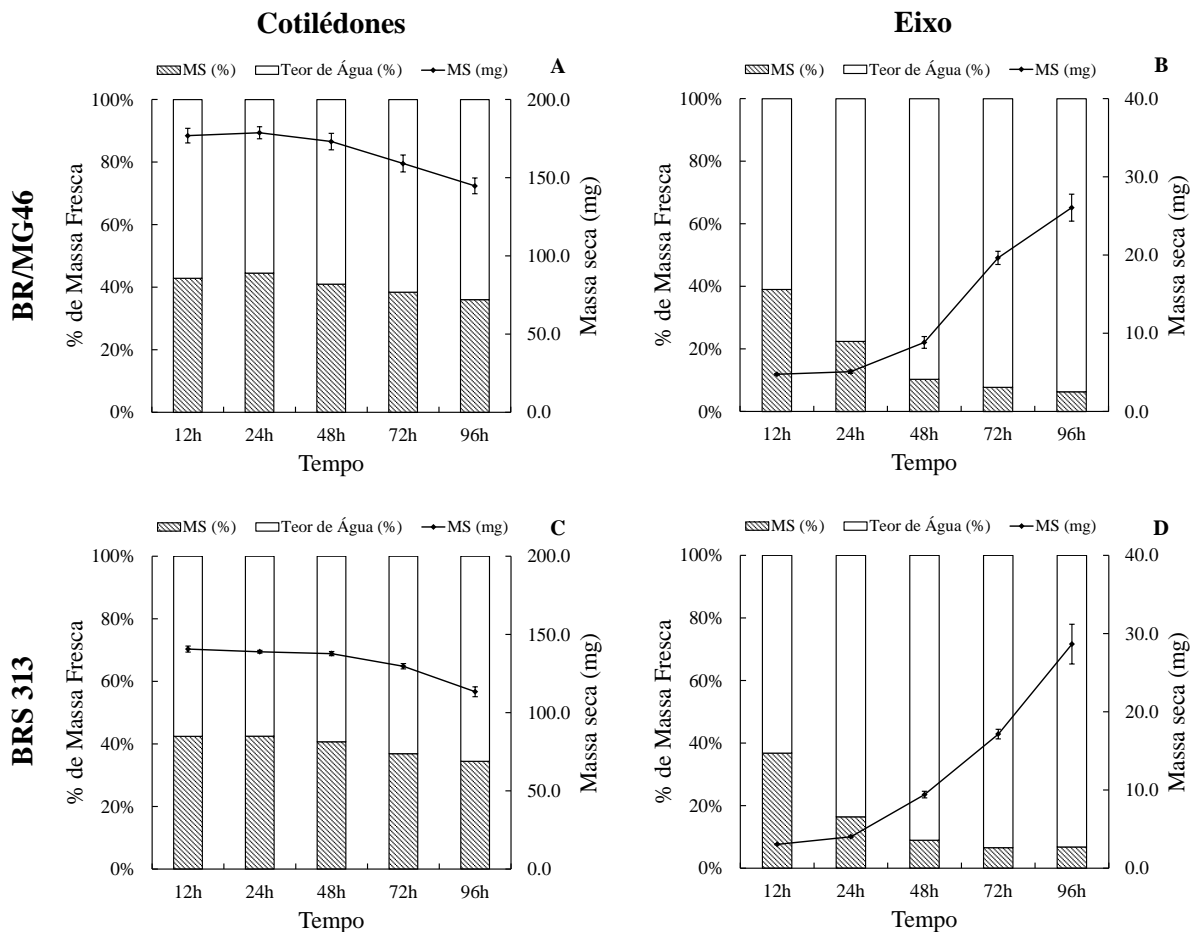


Figura 4. Proporção dos constituintes de massa fresca ao longo da germinação e crescimento inicial da soja. A: cotilédones e B eixo da variedade BR/MG46 [Conquista]. C: cotilédones e D: eixo da variedade BRS 313 [Tieta]. Teor de água calculado a partir da diferença entre massa seca e massa fresca.

Em eixo (Figura 4B e 4D), a proporção do teor de água no tecido aumenta ao longo do tempo em relação à massa seca, todavia, o aumento de massa seca pode ser observado na

mesma figura pela linha que indica um ganho da massa seca ao longo do tempo, porém, a proporção de massa seca diminui em relação ao teor de água em eixo. Em vista disso, constatou-se que nos estágios iniciais de desenvolvimento a água constitui a maior parte do volume e massa fresca em eixo.

6.2. AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS (AST)

Os açúcares solúveis totais (AST) em cotilédones (Figura 5A e 5C) representaram cerca de 8% da massa seca nas sementes não germinadas e diminui rapidamente ao longo do tempo da germinação e crescimento inicial em relação à massa seca. As proporções de AST variaram de forma semelhante em ambas as variedades.

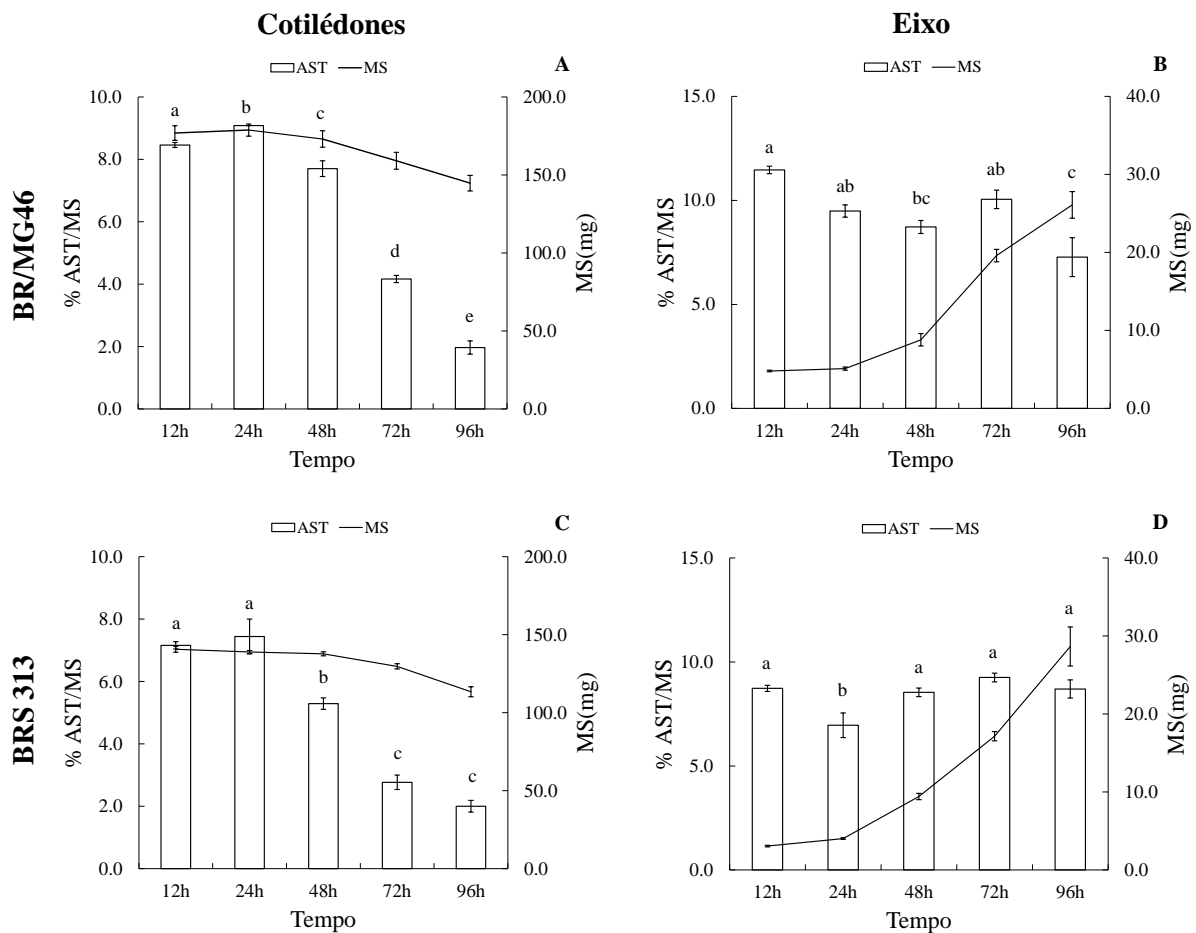


Figura 5. Proporções de açúcares solúveis totais (AST) em porcentagem de massa seca ao longo da germinação e crescimento inicial em soja. A: cotilédones e B eixo da variedade BR/MG46 [Conquista]. C: cotilédones e D: eixo da variedade BRS 313 [Tieta]. Os valores correspondem às médias de cinco repetições \pm erro padrão

Em eixo (Figura 5B e 5D), os AST representam aproximadamente 12% da massa seca diminuindo suas proporções ao longo do crescimento inicial com um leve aumento em 72h

observado na BR/MG46 [Conquista] e quantidades praticamente constantes na variedade BRS 313 [Tieta]. As proporções de AST oscilam por volta de 10% na variedade BR/MG46 [Conquista] e por volta de 8% na variedade BRS 313 [Tieta].

Nas Tabelas 1 estão descritas as quantidades dos principais açúcares encontrados em cotilédones. A estaquiase, a rafinose e principalmente a sacarose foram os açúcares dominantes encontrados em 12h. A estaquiase e a rafinose, diminuíram suas quantidades rapidamente a partir de 72h. A verbascose ocorre em baixas concentrações nos primeiros tempos e não foi mais detectada a partir de 48h. As concentrações de sacarose aumentam nos primeiros tempos alcançando o ápice em 48h e decrescendo a partir de 72h. A glicose e a frutose tiveram suas maiores concentrações em 24h, decrescendo em 48h e tornando aumentar nos tempos seguintes. Padrão similar foi observado em ambas as variedades.

Tabela 1. Relação dos açúcares solúveis e suas concentrações quantificadas em CLAE em cotilédones de soja *Glycine max* (L.) Merr. nas variedades BR/MG46 [Conquista] e BRS 313 [Tieta] durante a germinação e crescimento inicial.

Açúcares	Var.	Massa ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$)				
		12h	24h	48h	72h	96h
Glicose	BR/MG46	0,45 \pm 0,13	0,45 \pm 0,34	0,38 \pm 0,03	0,53 \pm 0,03	1,18 \pm 0,11
	BRS 313	-	2,18 \pm 1,92	0,36 \pm 0,01	0,48 \pm 0,05	0,84 \pm 0,11
Frutose	BR/MG46	0,14 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02	0,16 \pm 0,03	0,47 \pm 0,04	0,82 \pm 0,15
	BRS 313	0,13 \pm 0,01	3,73 \pm 3,62	0,18 \pm 0,02	0,37 \pm 0,05	0,41 \pm 0,06
Sacarose	BR/MG46	50,83 \pm 0,94	58,46 \pm 1,01	60,30 \pm 0,87	36,59 \pm 1,33	16,16 \pm 2,30
	BRS 313	38,91 \pm 0,78	48,20 \pm 6,75	45,87 \pm 1,67	24,89 \pm 2,18	17,98 \pm 1,95
Rafinose	BR/MG46	6,52 \pm 0,12	5,80 \pm 0,43	3,26 \pm 0,57	0,90 \pm 0,04	1,22 \pm 0,54
	BRS 313	6,19 \pm 0,07	2,94 \pm 0,30	1,17 \pm 0,09	-	-
Estaquiase	BR/MG46	26,35 \pm 0,29	25,79 \pm 0,67	12,94 \pm 1,77	3,18 \pm 0,18	0,33 \pm 0,33
	BRS 313	25,50 \pm 0,42	16,99 \pm 3,64	5,33 \pm 0,47	1,95 \pm 0,27	0,79 \pm 0,04
Verbascose	BR/MG46	0,35 \pm 0,14	0,28 \pm 0,12	-	-	-
	BRS 313	0,88 \pm 0,02	0,38 \pm 0,16	-	-	-
Maltose	BR/MG46	-	-	-	-	-
	BRS 313	-	-	-	-	-

* Valores em média e erro padrão. ** MS = massa seca

Na Tabela 2 estão descritas as quantidades dos principais açúcares encontrados em eixo. Semelhante ao encontrado nos cotilédones os açúcares em maior abundância são a estaquiase, a rafinose e a sacarose. As quantidades de estaquiase e rafinose decrescem a partir de 12h e não foram detectadas em 48. A verbascose possui o mesmo padrão observado em cotilédones. A maltose somente foi detectada a partir de 72 na variedade BRS 313 [Tieta] alcançando concentrações menores que 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$ em 72h. Já a glicose e a frutose

aumentam gradativamente até alcançar concentrações máximas em 72h e começar a diminuir a partir de 96h. Os campos que não possuem valores correspondem a quantidades não detectáveis pelo método ou ausência do açúcar.

Tabela 2. Relação dos açúcares solúveis e suas concentrações quantificadas em CLAE em eixos de soja *Glycine max* (L.) Merr. nas variedades BR/MG46 [Conquista] e BRS 313 [Tieta] durante a germinação e crescimento inicial.

Açúcares	Var.	Massa ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$)				
		12h	24h	48h	72h	96h
Glicose	BR/MG46	0,75 ± 0,16	8,91 ± 1,91	26,87 ± 0,87	36,73 ± 1,62	33,90 ± 1,37
	BRS 313	0,36 ± 0,36	10,26 ± 2,57	24,55 ± 0,73	36,37 ± 1,10	36,24 ± 2,09
Frutose	BR/MG46	0,11 ± 0,01	7,24 ± 1,68	44,26 ± 1,54	51,55 ± 2,18	31,67 ± 8,32
	BRS 313	0,08 ± 0,01	17,74 ± 0,67	46,92 ± 0,96	48,48 ± 0,81	42,55 ± 2,15
Sacarose	BR/MG46	39,68 ± 2,06	58,93 ± 2,39	16,11 ± 1,03	12,24 ± 0,77	6,93 ± 2,36
	BRS 313	11,42 ± 0,36	33,12 ± 5,65	13,92 ± 0,98	7,56 ± 0,43	7,40 ± 0,27
Rafinose	BR/MG46	9,78 ± 0,19	4,51 ± 0,97	-	-	-
	BRS 313	9,13 ± 0,17	2,32 ± 0,26	-	-	-
Estaquiose	BR/MG46	61,75 ± 0,45	15,16 ± 2,73	-	-	-
	BRS 313	62,33 ± 0,96	6,15 ± 3,16	0,02 ± 0,02	-	-
Verbascose	BR/MG46	2,60 ± 0,09	0,13 ± 0,12	-	-	-
	BRS 313	3,99 ± 0,12	-	-	-	-
Maltose	BR/MG46	-	-	-	-	0,25 ± 0,15
	BRS 313	-	-	-	0,12 ± 0,12	0,84 ± 0,03

* Valores em média e erro padrão. ** MS = massa seca

6.3. AMIDO

Os teores de amido em cotilédones (Figura 6A e 6C) aumentaram durante o crescimento inicial, esse padrão foi observado em ambas as variedades. A porcentagem de amido na massa seca em relação às outras reservas é baixa, e atinge valores de cerca de 7% de massa seca em cotilédones. Os teor de amido após 72h foi estatisticamente significativo em relação aos tempos anteriores, correspondendo a um aumento de cerca de 3%.

Em eixo (Figura 6B e 6D), o padrão das proporções de amido difere entre as variedades. As maiores proporções de amido foram de cerca de 7% em ambas as variedades, porém em momentos diferentes. Na variedade BR/MG46 [Conquista] o pico ocorreu em 48h enquanto que na variedade BRS313 [Tieta] ocorreu em 24h. O padrão observado em BR/MG46 [Conquista] foi de um aumento na proporção de amido até 48h seguido da diminuição gradual após esse tempo. Em BRS 313 [Tieta] houve um aumento significativo entre 12h e 48h (cerca de 6%) seguido de uma diminuição gradual ao longo do tempo. As proporções de amido contribuem pouco para a alteração na biomassa seca total mensurada.

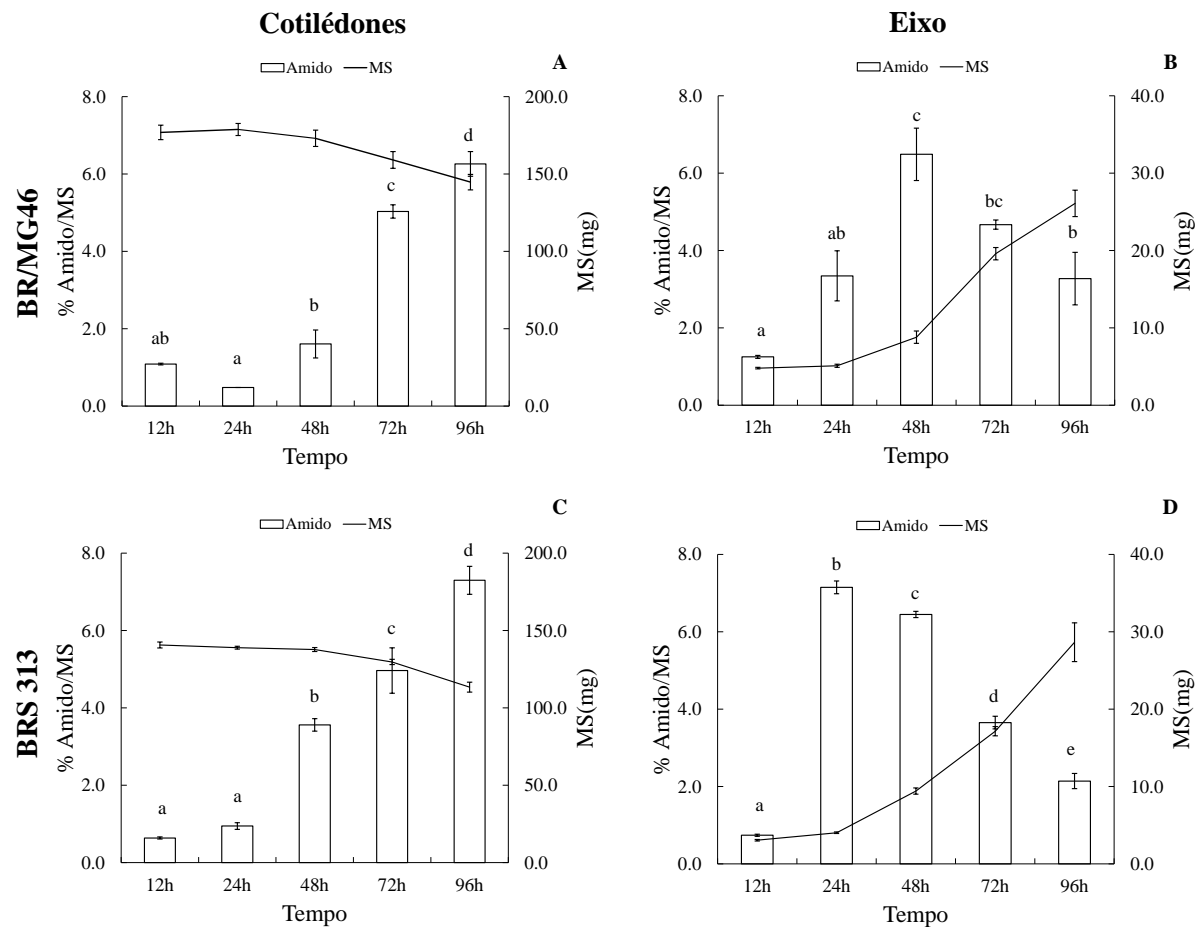


Figura 6. Proporção de amido em porcentagem de massa seca ao longo da germinação e crescimento inicial em soja. A: cotilédones e B eixo da variedade BR/MG46 [Conquista]. C: cotilédones e D: eixo da variedade BRS 313 [Tieta]. Os valores correspondem às médias de cinco repetições \pm erro padrão.

6.4. PAREDE CELULAR

Em cotilédones (Figura 7A e 7C), as proporções de parede celular estiveram em torno dos 30% da massa seca. Na variedade BR/MG46 [Conquista] houve uma diminuição de aproximadamente 7% da massa de parede celular em 96h (Figura 7A), por outro lado na variedade BRS 313 [Tieta] (Figura 7C) as proporções não diferiram significativamente.

Em eixo (Figura 7B e 7D), as quantidades de parede celular em relação à massa seca foram semelhantes às encontradas em cotilédones (cerca de 30%). Em 12h o valor encontrado corresponde ao encontrado no eixo, ou seja, não houve crescimento e, conseqüentemente, nem ganho de massa seca na forma de parede celular.

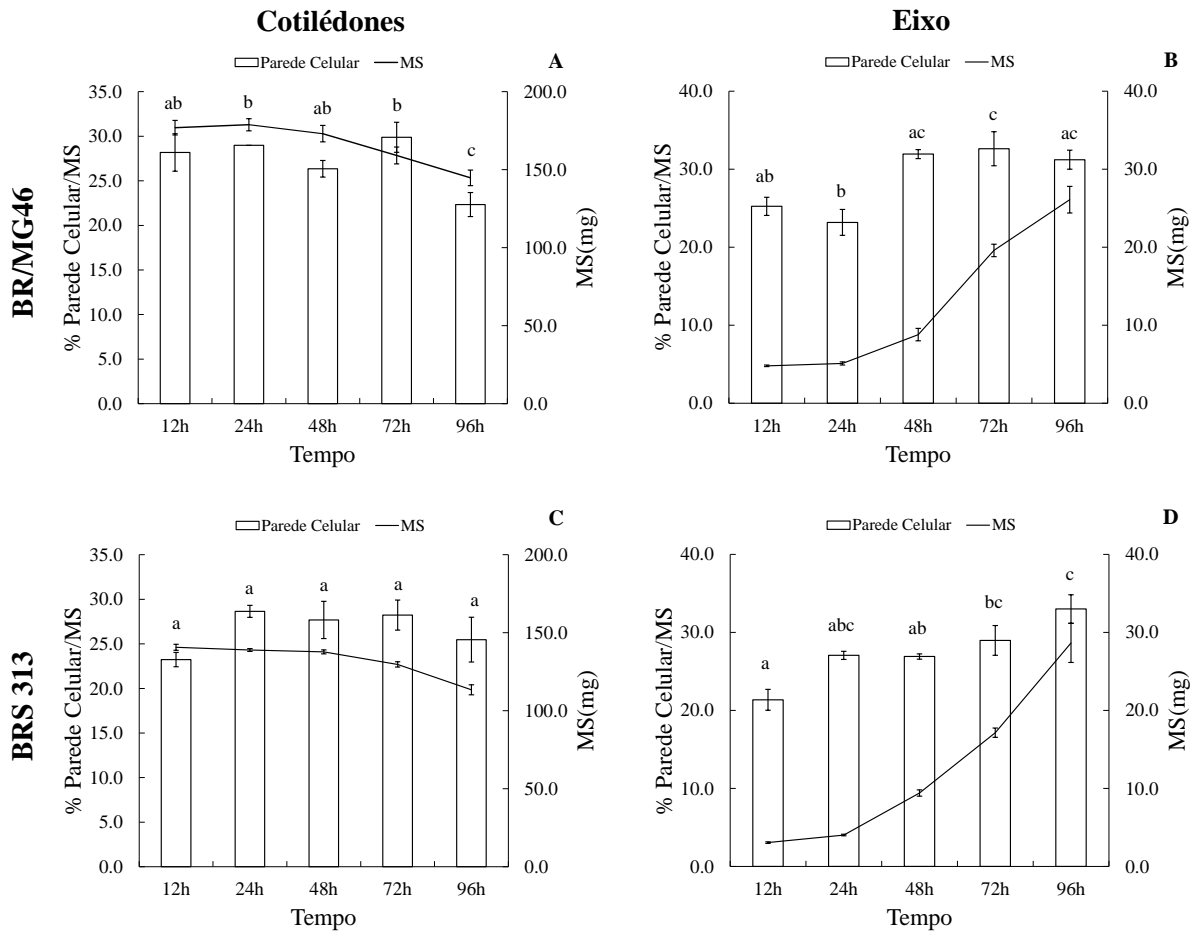


Figura 7. Proporção de parede celular em porcentagem de massa seca ao longo da germinação e crescimento inicial em soja. A: cotilédones e B eixo da variedade BR/MG46 [Conquista]. C: cotilédones e D: eixo da variedade BRS 313 [Tieta]. Os valores correspondem às médias de cinco repetições \pm erro padrão.

Na variedade BR/MG46 [Conquista] (Figura 7B) isso corresponde a 20% e na BRS 313 [Tieta] (Figura 7D) a 25% da massa seca. Observa-se um aumento sutil que alcança e ultrapassa os 30% em ambas as variedades durante o crescimento. A variação da proporção de parede celular condiz com a variação observada na massa seca (MS)

6.5. PROTEÍNAS TOTAIS

As proteínas compreendem uma quantidade de 40% da massa seca tanto em cotilédones quanto em eixo. Em cotilédones da variedade BR/MG46 [Conquista] (Figura 8A), observa-se uma elevação de 5 a 7% no teor de proteína, comparado com a semente. Em BRS 313 [Tieta] (Figura 8C), a variação foi de 2,5% em 48h na mesma comparação.

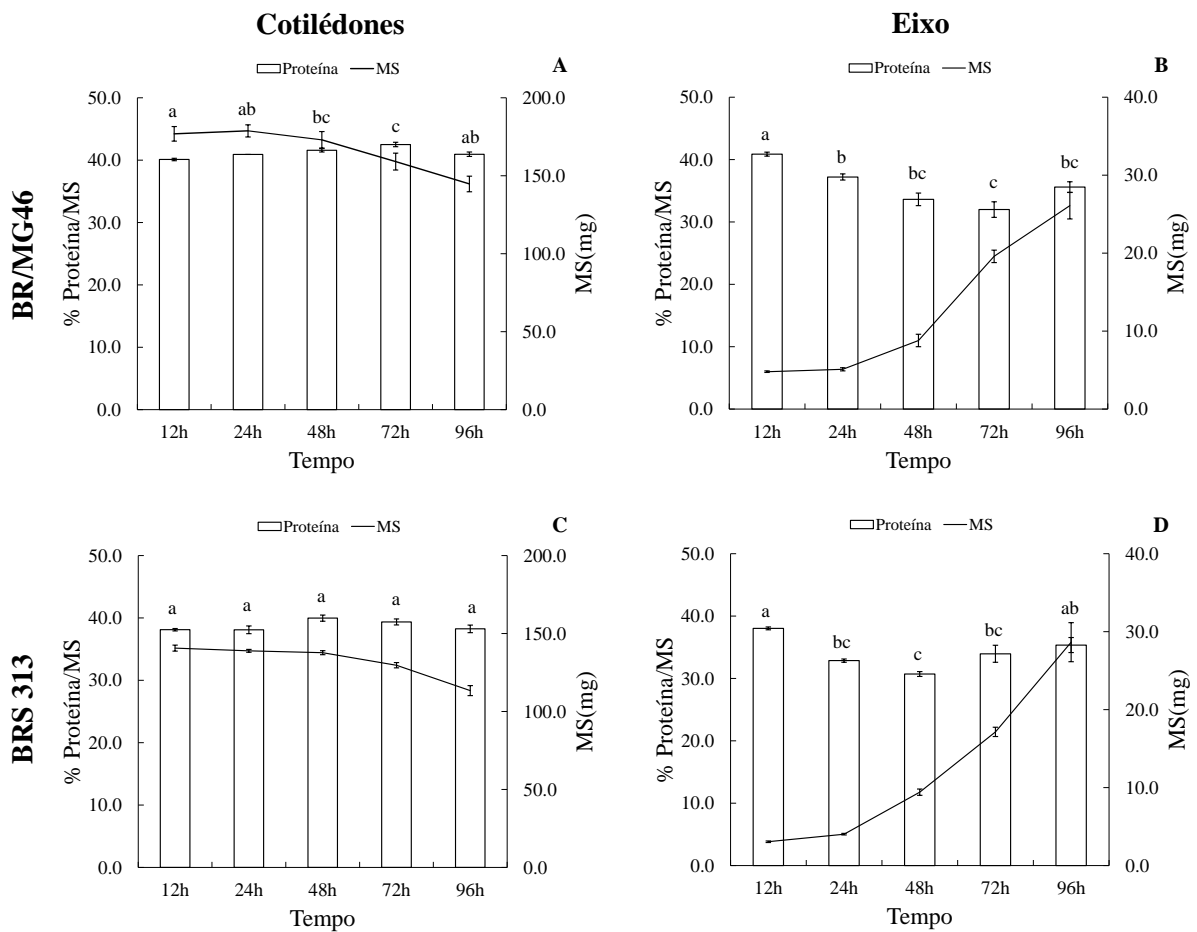


Figura 8. Proporção de proteínas totais em porcentagem de massa seca ao longo da germinação e crescimento inicial em soja. A: cotilédones e B eixo da variedade BR/MG46 [Conquista]. C: cotilédones e D: eixo da variedade BRS 313 [Tieta]. Os valores correspondem às médias de cinco repetições \pm erro padrão.

As Figuras 8B e 8B representam as quantidades de proteína total em eixo das variedades BRMG/46 [Conquista] e BRS 313 [Tieta], respectivamente. Na Figura 8B em 12h, as quantidades de proteína foram cerca de 40%, diminuindo gradativamente até cerca de 30% em 72h se mantendo até 96h, a diferença significativa foi em relação à 12h. Na Figura 8D, o padrão observado foi semelhante, porém em 96h as proporções de proteína total alcançaram valores semelhantes aos observados em 12h.

6.6. ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS

A proporção de ácidos graxos totais em cotilédones compreendeu cerca de 25% da massa seca e cerca de 10% na eixo em ambas as variedades (Figura 9).

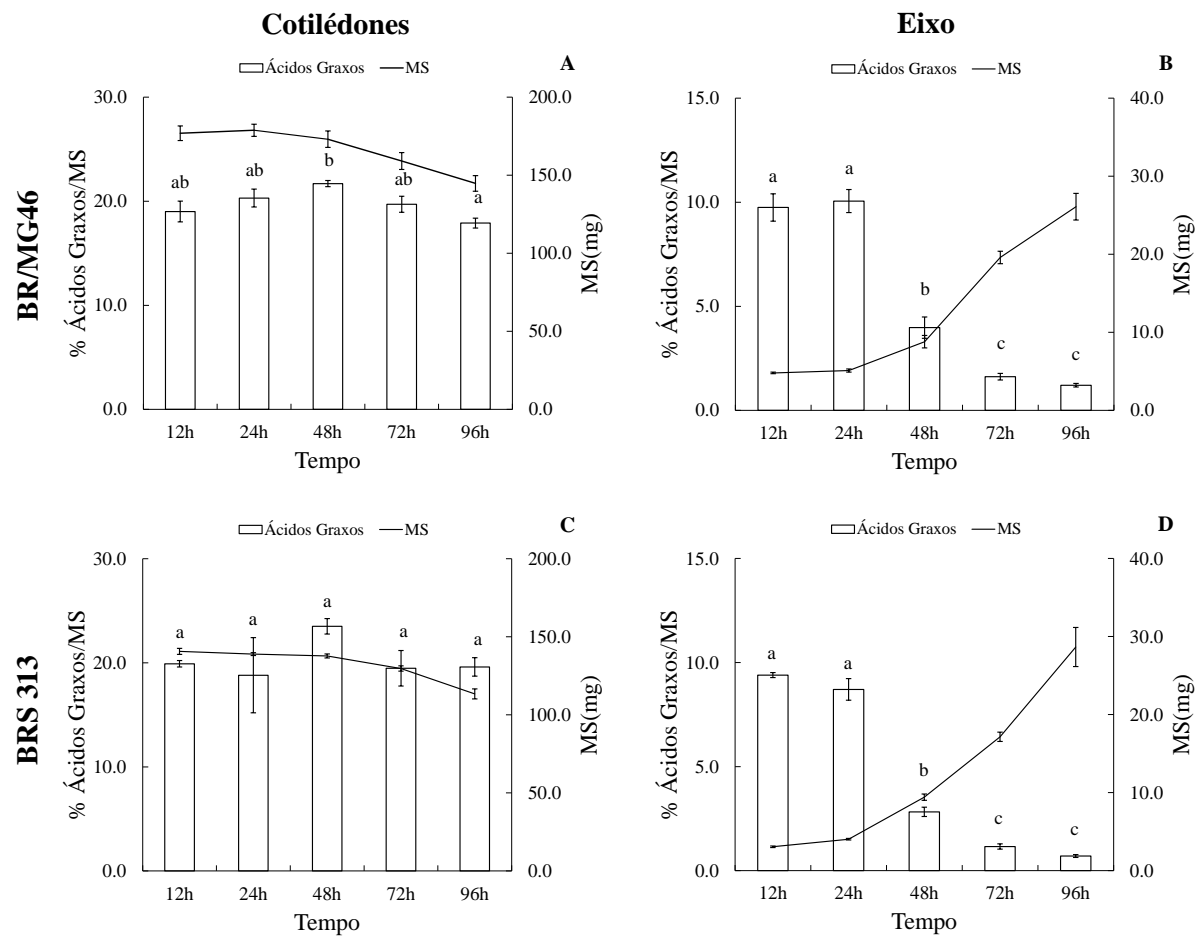


Figura 9. Proporção de ácidos graxos totais em porcentagem de massa seca ao longo da germinação e crescimento inicial de soja. A: cotilédones e B eixo da variedade BR/MG46 [Conquista]. C: cotilédones e D: eixo da variedade BRS 313 [Tieta]. Os valores correspondem às médias de cinco repetições \pm erro padrão.

A variação das proporções de ácidos graxos em cotilédones na variedade BR/MG46 [Conquista] (Figura 9A), somente apresentou diferença significativa em relação ao tempo de 48h e 96h, com valores semelhantes a esses nos outros tempos apresentados. A variedade BRS 313 [Tieta] (Figura 9C) não apresentou diferenças significativas ao longo do tempo. Em eixo (Figura 9B e 9D), houve uma diminuição da proporção de ácidos graxos em relação aos tempos iniciais, em ambas as variedades. Essa variação correspondeu à cerca de 8% de massa seca.

Na Tabela 3 são listados ácidos graxos encontrados em cotilédones e suas concentrações ao longo do crescimento. Em cotilédones, os ácidos graxos mais abundantes foram o ácido linoleico (C18:2), que representa aproximadamente 60% da quantidade total de ácidos graxos; em segundo lugar, o ácido oleico (C18:1), com cerca de 20%. Os ácidos palmítico

(C16:0) e α -linolênico (C18:3) estão por volta de 10% da massa seca. Os ácidos mirístico (C14:0) e araquídico (C20:0) representam proporções de aproximadamente 1%.

Tabela 3. Relação dos ácidos graxos e suas concentrações quantificadas em CGEM em cotilédones de soja *Glycine max* (L.) Merr. nas variedades BR/MG46 [Conquista] e BRS 313 [Tieta] durante a germinação e crescimento inicial.

Ác. Graxo	Var.	Massa ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$)				
		12h	24h	48h	72h	96h
Ácido Mirístico (C14:0)	BR/MG46	0,02 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01	0,19 \pm 0,00	0,18 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01
	BRS 313	0,06 \pm 0,00	0,23 \pm 0,00	0,22 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01
Ácido Palmítico (C16:0)	BR/MG46	25,36 \pm 1,52	24,74 \pm 1,15	27,05 \pm 0,47	23,95 \pm 1,12	22,10 \pm 0,62
	BRS 313	26,69 \pm 0,37	30,06 \pm 0,26	28,57 \pm 1,03	22,79 \pm 2,17	22,90 \pm 1,16
Ácido Esteárico (C18:0)	BR/MG46	6,30 \pm 0,41	6,13 \pm 0,24	6,70 \pm 0,15	6,12 \pm 0,23	5,81 \pm 0,30
	BRS 313	7,45 \pm 0,10	8,46 \pm 0,12	8,04 \pm 0,28	6,60 \pm 0,63	6,69 \pm 0,34
Ácido Oléico (C18:1) ^{A9}	BR/MG46	43,67 \pm 1,78	35,96 \pm 1,77	39,08 \pm 1,14	35,02 \pm 1,22	31,67 \pm 1,93
	BRS 313	43,49 \pm 0,53	43,22 \pm 1,16	39,37 \pm 1,10	32,21 \pm 3,00	32,28 \pm 1,56
Ácido Linoléico (C18:2) ^{A9,12}	BR/MG46	97,45 \pm 5,06	119,01 \pm 5,00	125,46 \pm 1,48	114,79 \pm 4,49	106,56 \pm 2,36
	BRS 313	108,08 \pm 2,08	90,19 \pm 36,68	143,72 \pm 4,78	120,28 \pm 10,33	120,74 \pm 5,50
Ácido α-Linolênico (C18:3) ^{A9,12,15}	BR/MG46	16,74 \pm 1,20	16,52 \pm 0,65	17,90 \pm 0,22	16,45 \pm 0,77	12,18 \pm 3,10
	BRS 313	12,65 \pm 0,21	15,22 \pm 0,43	14,46 \pm 0,47	12,16 \pm 1,05	12,64 \pm 0,75
Ácido Araquídico (C20:0)	BR/MG46	0,59 \pm 0,04	0,53 \pm 0,02	0,61 \pm 0,01	0,56 \pm 0,03	0,52 \pm 0,04
	BRS 313	0,68 \pm 0,01	0,71 \pm 0,01	0,69 \pm 0,02	0,58 \pm 0,05	0,60 \pm 0,03

* Valores em média e erro padrão. ** MS = massa seca

Em eixo (Tabela 4) as proporções são semelhantes às encontradas em cotilédones, exceto pela proporção diferente de ácido oleico (cerca de 2%) e pela maior proporção de ácido α -linolênico (cerca de 30%).

Tabela 4. Relação dos ácidos graxos e suas concentrações quantificadas em CGEM em eixos de soja *Glycine max* (L.) Merr. nas variedades BR/MG46 [Conquista] e BRS 313 [Tieta] durante a germinação e crescimento inicial.

Ác. Graxo	Var.	Massa ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$)				
		12h	24h	48h	72h	96h
Ácido Mirístico (C14:0)	BR/MG46	0,05 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,00
	BRS 313	0,07 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Ácido Palmítico (C16:0)	BR/MG46	15,62 ± 1,07	13,84 ± 0,88	5,22 ± 0,76	2,09 ± 0,21	1,29 ± 0,11
	BRS 313	15,67 ± 0,22	11,86 ± 0,74	3,41 ± 0,37	0,90 ± 0,21	0,32 ± 0,12
Ácido Estearico (C18:0)	BR/MG46	2,54 ± 0,18	2,33 ± 0,17	0,69 ± 0,14	0,15 ± 0,03	0,05 ± 0,03
	BRS 313	2,80 ± 0,04	2,09 ± 0,17	0,48 ± 0,07	0,06 ± 0,03	-
Ácido Oléico (C18:1) ^{A9}	BR/MG46	0,59 ± 0,37	4,21 ± 0,63	0,80 ± 0,27	0,42 ± 0,18	0,25 ± 0,16
	BRS 313	-	2,24 ± 0,44	0,55 ± 0,22	0,26 ± 0,11	0,02 ± 0,02
Ácido Linoléico (C18:2) ^{A9,12}	BR/MG46	54,57 ± 3,24	58,33 ± 3,16	22,18 ± 2,85	8,09 ± 0,96	6,09 ± 0,52
	BRS 313	58,10 ± 0,74	53,39 ± 3,18	16,00 ± 1,30	6,30 ± 0,72	3,65 ± 0,43
Ácido α-Linolênico (C18:3) ^{A9,12,15}	BR/MG46	23,85 ± 1,72	21,37 ± 1,28	10,61 ± 1,22	5,30 ± 0,26	4,25 ± 0,13
	BRS 313	17,09 ± 0,23	17,01 ± 0,77	7,57 ± 0,35	3,97 ± 0,23	2,94 ± 0,16
Ácido Araquídico (C20:0)	BR/MG46	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01
	BRS 313	0,24 ± 0,06	0,27 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00

* Valores em média e erro padrão. ** MS = massa seca

A variação dos ácidos graxos observados em cotilédones (Tabela3) se assemelha à variação das proporções dos ácidos graxos totais em relação à massa seca observada (Figuras 9A e 9C). Isto é, um aumento em 48h de crescimento diminuindo nos tempos subsequentes. Em eixo, o padrão da utilização dos ácidos graxos seguiu da diminuição ao longo do tempo de crescimento, o mesmo foi observado nas proporções (Figuras 9B e 9D), inclusive um pequeno aumento observado para os ácidos oleico e linoleico em 24h.

Comparando-se as duas variedades não se observaram diferenças significativas nas concentrações dos ácidos graxos individualmente e também nas quantidades totais relativas observadas na Figura 15.

6.7. TEGUMENTO

As análises da composição do tegumento foram feitas à posteriori das análises de quantificação de biomassa e das simulações do modelo, portanto, a análise foi realizada somente na variedade BR/MG46 [Conquista]. Na Figura 10, demonstra soma total das concentrações de AST e sua variação ao longo do crescimento. Na Tabela 5 estão listados os açúcares identificados e as quantidades por massa seca.

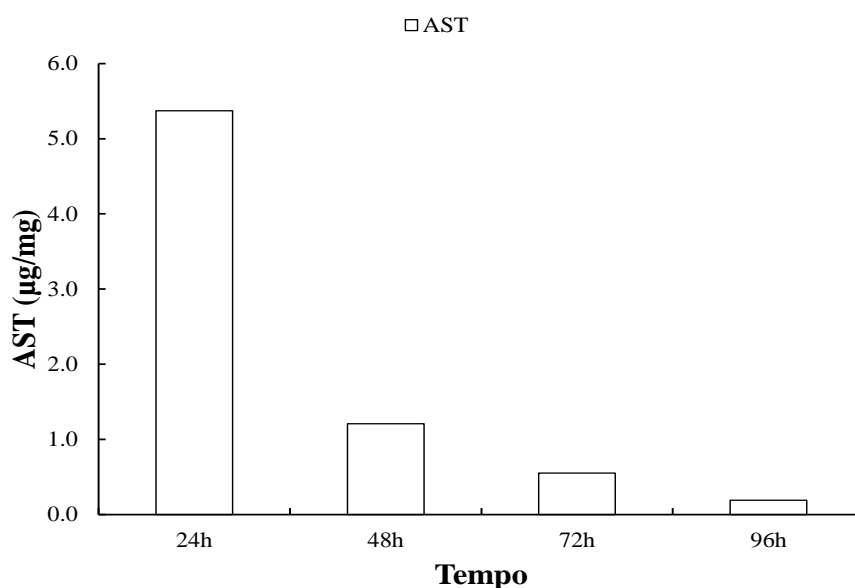


Figura 10. Concentração de AST e sua variação no tegumento ao longo da germinação e crescimento inicial em soja variedade BR/MG46 [Conquista]. Quantidades em micrograma de açúcar (μg) por miligrama de massa seca. Os valores correspondem à soma das quantidades dos açúcares identificados em CLAE.

A sacarose foi o açúcar mais abundante constituindo 60% da composição de AST no tegumento em 24h, embora sua concentração decresça ao longo do tempo. Frutose, glicose, rafinose e estaquiase compreenderam cerca de 1% cada uma em 24h. Os oligossacarídeos de série rafinósica (OSR) não foram encontrados a partir de 48h. Nas análises de perfil metabólico do tegumento não foram encontrados ácidos orgânicos (AOs) e aminoácidos(AAs).

Tabela 5. Relação dos açúcares encontrados nos tegumentos da variedade BR/MG46 [Conquista], e suas quantidades de açúcar por massa seca ao longo da germinação e crescimento inicial.

Açúcares	Massa ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}$)			
	24h	48h	72h	96h
Glicose	0.597	0.103	0.090	0.048
Frutose	0.646	0.038	0.037	0.033
Sacarose	3.258	0.924	0.425	0.109
Rafinose	0.086	-	-	-
Estaquiase	0.744	0.142	-	-
Verbascose	0.041	-	-	-
Maltose	-	-	-	-
Total	5.371	1.207	0.552	0.189

*MS = Massa Seca

6.8. EXUDADO DE FLOEMA

A análise de exudado de floema também foi aplicada somente na variedade BR/MG46 [Conquista]. Na Tabela 6 estão listados os açúcares e suas concentrações encontradas no exudado de floema em todos os tempos analisados. A concentração de glicose e frutose aumenta ao longo do tempo e supera a concentração de sacarose após 96h. A concentração de sacarose aumenta até 72h e a partir desse momento começa a decrescer. Dos OSRs, a estaquiase apresentou maior concentração no floema em 24h e diminuiu rapidamente desaparecendo após 72h. A rafinose aumentou no floema gradativamente até alcançar valores próximos à $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A verbascose foi detectada somente 24h em concentrações muito baixas em relação aos outros açúcares. A concentração dos OSRs em relação à concentração total dos açúcares encontrados corresponde a aproximadamente 20% em 24h e diminui nos tempos seguintes para cerca de 3% da concentração total. A maltose também foi detectada em baixas concentrações possuindo padrão semelhante ao observado nos outros açúcares.

Os compostos identificados pelo perfil metabólico foram comparados em valores relativos aos obtidos em 24h. Os compostos listados na Tabela 6 são os compostos encontrados em maior abundância nos exudados. Os dados apresentados não correspondem à concentração dos compostos no floema, mas sim a variação dos compostos ao longo do tempo em relação à quantidade analisada em 24h.

Tabela 6. Relação dos açúcares e compostos mais abundantes identificados nos exudados de floema da variedade BR/MG46 [Conquista]. Os compostos analisados pelo perfil metabólico estão em unidades relativas à 24h.

Açúcares	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)			
	24h	48h	72h	96h
Glicose	21.7	78.2	231.0	349.9
Frutose	18.5	79.0	281.1	436.7
Sacarose	201.1	221.3	345.7	179.1
Rafinose	8.5	5.0	17.6	29.6
Estaquiose	47.6	4.9	0.0	0.0
Verbascose	2.6	0.0	0.0	0.0
Maltose	1.4	2.0	6.8	10.8

Compostos	UnitArb/mL			
	24h	48h	72h	96h
GABA	1.0	3.2	14.1	15.0
Asparagina	1.0	1.2	14.4	30.4
Pinitol	1.0	1.1	3.7	4.1
Serina	1.0	7.4	27.8	42.3
Succinato	1.0	4.1	11.7	15.2
Mio-Inositol	1.0	1.5	6.4	5.5

*UnitArb = unidades arbitrárias

6.9. PERFIL METABÓLICO

As Figuras 11 e 12 correspondem ao perfil metabólico em cotilédones e eixo da variedade BR/MG46 [Conquista], respectivamente. Nas figuras não foi compreendido todo o metabolismo, somente os compostos detectados e as vias aos quais estão relacionados, de forma resumida. As setas não necessariamente indicam o sentido da reação, mas somente quais compostos estão interligados no metabolismo. As quantificações de perfil metabólico estão notadas em valores relativos à 24h, exceto os dados para AST e amido.

Os dados de AST e amido apresentados na figura são os mesmos apresentados anteriormente. Para alguns AAs observou-se um aumento gradual nos seus níveis, ao passo que outros, como a tirosina e o triptofano, oscilam ao longo do tempo e não apresentam o padrão observado nos outros AAs. Alguns AOs que participam do ciclo dos ácidos tricarboxílicos foram detectados.

Em eixo (Figura 12), o padrão de utilização dos açúcares de série rafínósica foi uma diminuição acentuada se comparado ao que ocorreu em cotilédones. A sacarose também

diminuiu, ao passo que houve um aumento de glicose e frutose. O amido aumentou, porém não na mesma proporção que em cotilédones. Os AAs apresentaram padrão semelhante ao observado em cotilédones. A glicina e o aspartato oscilaram em níveis relativamente altos se comparados com a maioria dos AAs. Os AOs ocorreram em maior quantidade em eixo assim como se detectou a presença de succinato.

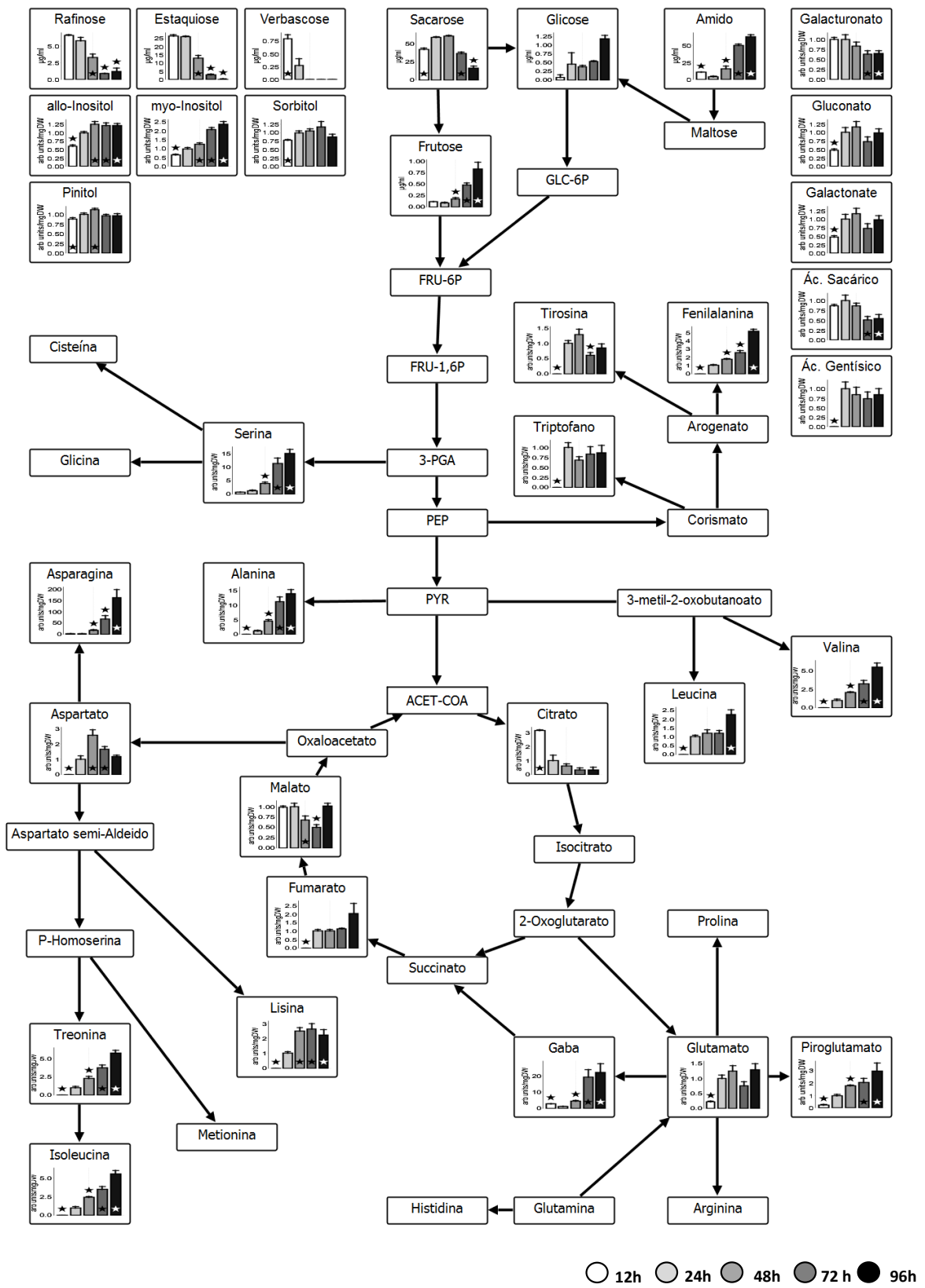


Figura 11. Perfil metabólico dos cotilédones da variedade BR/MG46 [Conquista] ao longo da germinação e crescimento inicial de soja. As estrelas indicam diferenças estatísticas significativas das quantidades de compostos em relação aos valores obtidos em 24h

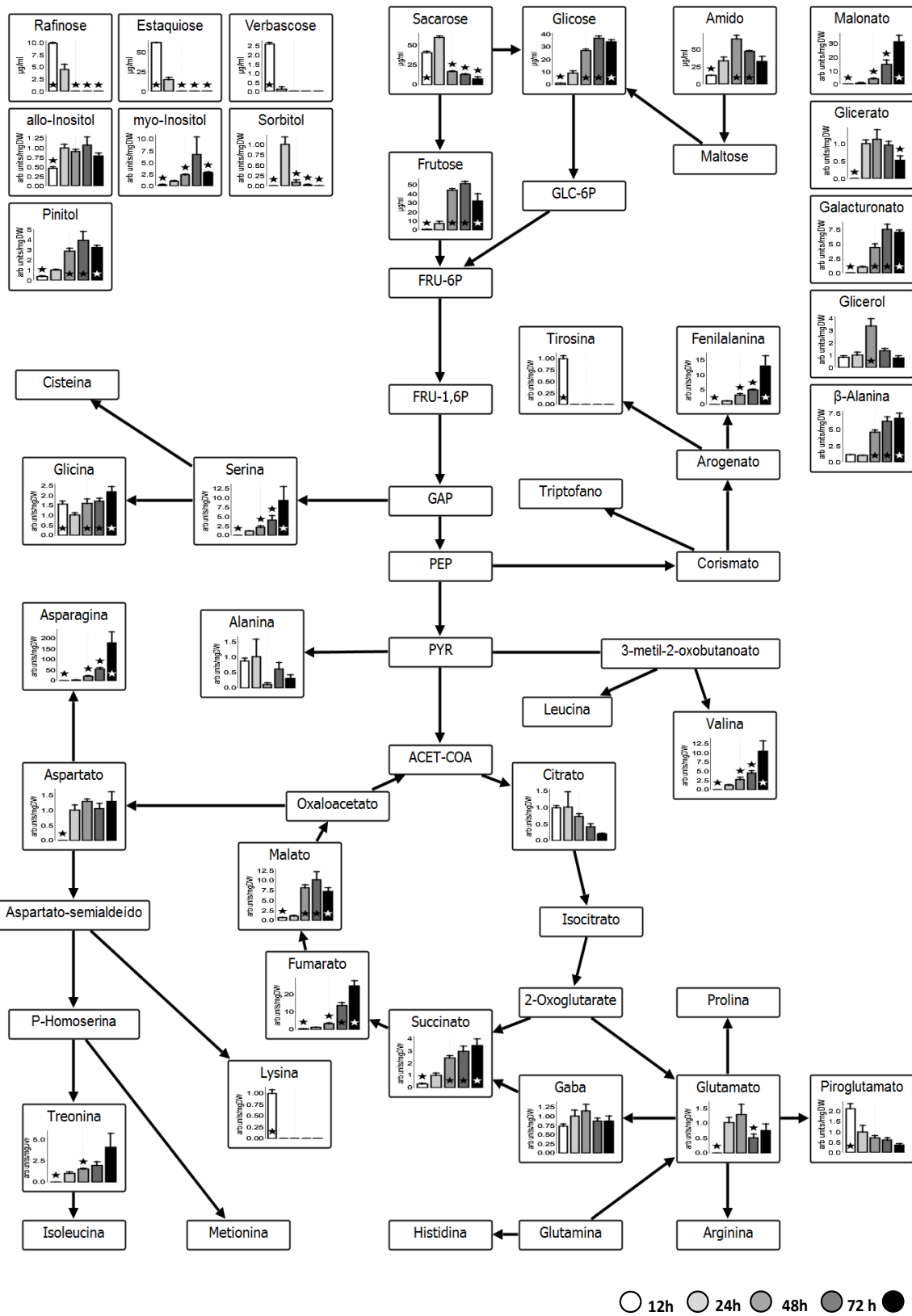


Figura 12. Perfil metabólico da eixo da variedade BR/MG46 [Conquista] ao longo da germinação e crescimento inicial de soja. As estrelas indicam diferenças estatísticas significativas das quantidades de compostos em relação aos valores obtidos em 24h

As Figuras 13 e 14 correspondem ao perfil metabólico em cotilédones e eixo da variedade BRS [Tieta], respectivamente. Para alguns AAs observou-se um aumento gradual nos seus níveis. Diferentemente do observado para a variedade BR/MG46 [Conquista], a tirosina só foi detectada em 12h e o triptofano não foi detectado nas análises. Outros AAs como a tirosina e o triptofano, oscilam ao longo do tempo e não apresentam o mesmo padrão observado em outros AAs. Alguns AOs que participam do ciclo dos ácidos tricarbóxicos foram detectados.

Em eixo (Figura 14) os açúcares da série rafínósica diminuíram de forma acentuada se comparado ao que ocorreu em cotilédones. A sacarose também diminuiu assim como houve um aumento de glicose e frutose. O amido aumentou, porém não na mesma proporção em que ocorreu em cotilédones. Os AAs tiveram padrão semelhante ao que ocorreu em cotilédones. A glicina e o aspartato oscilaram em níveis relativamente altos se comparados com os outros AAs. Os AOs ocorreram em maior quantidade em eixo assim como detectou-se a presença de succinato.

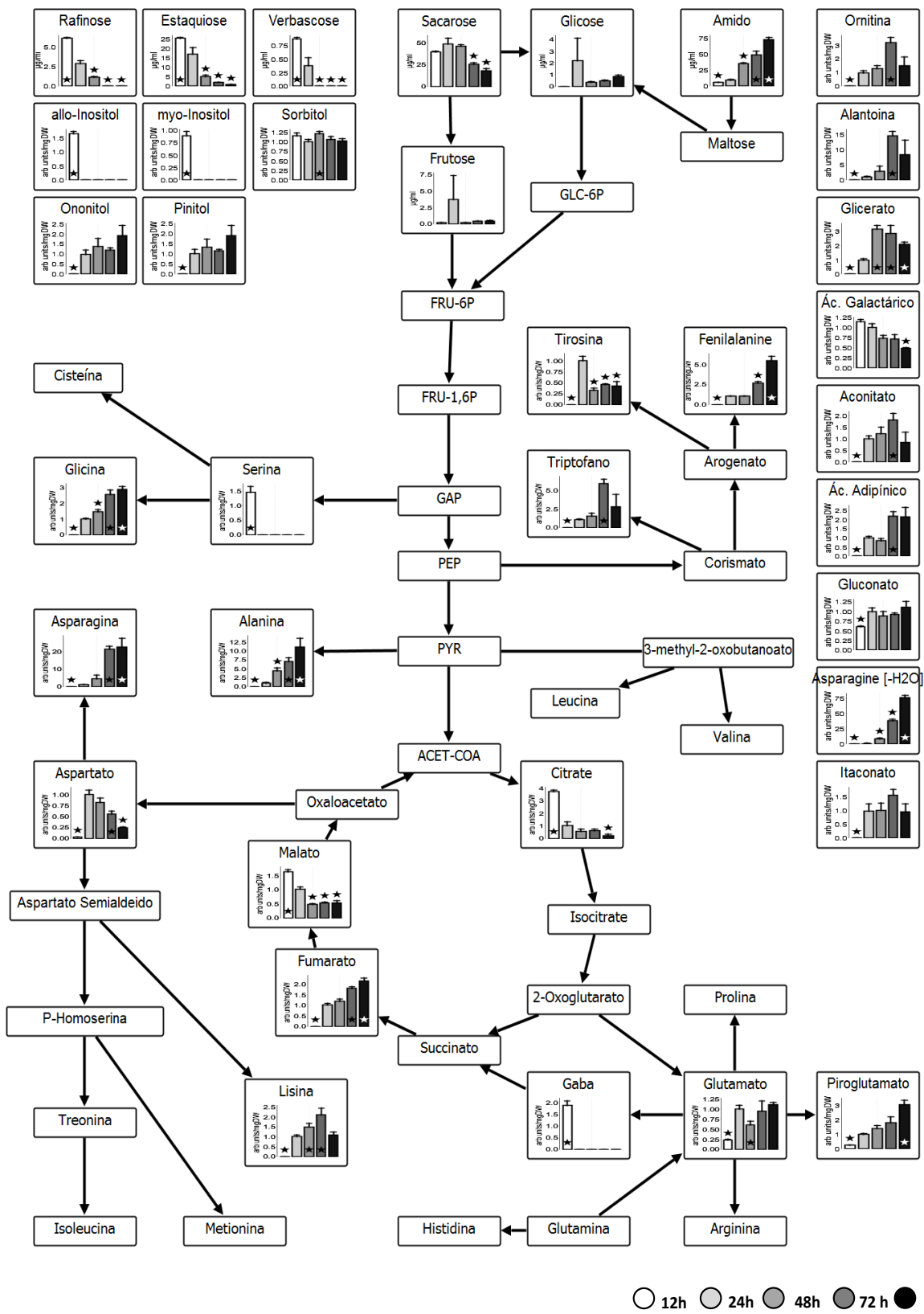


Figura 13. Perfil metabólico em cotilédones da variedade BRS 313 [Tieta] ao longo da germinação e crescimento inicial de soja. As estrelas indicam diferenças estatísticas significativas das quantidades de compostos em relação aos valores obtidos em 24h

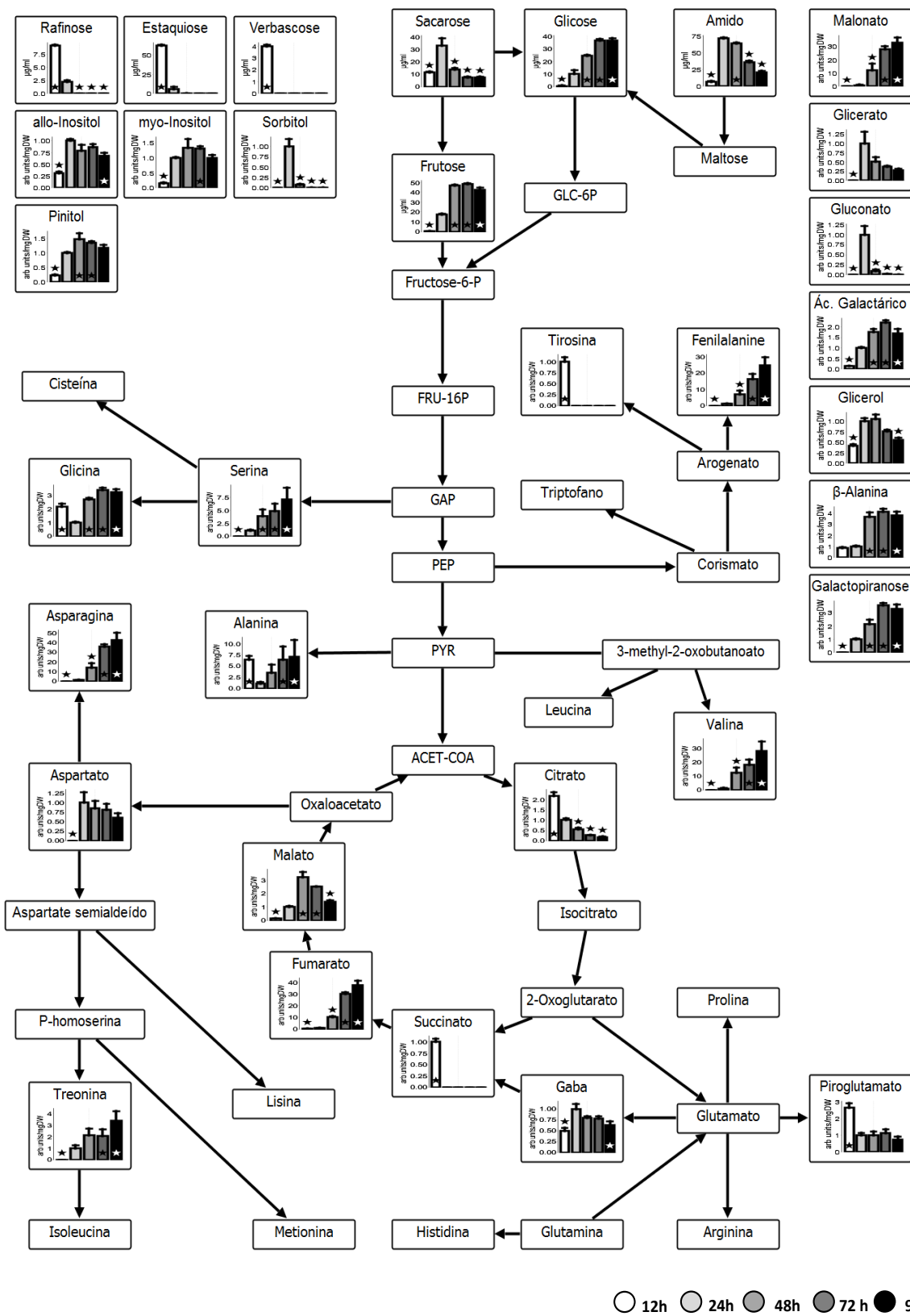


Figura 14. Perfil metabólico da eixo da variedade BRS [Tieta] ao longo da germinação e crescimento inicial de soja. As estrelas indicam diferenças estatísticas significativas das quantidades de compostos em relação aos valores obtidos em 24h

6.10. COMPARAÇÃO BIOQUÍMICA ENTRE AS VARIEDADES

A escolha de duas variedades foi realizada a partir da diferença da massa de 100 sementes de cada uma. Entretanto, a proporção da composição de reservas em cotilédones assim como o padrão de utilização das reservas por ambas as variedades foram bastante semelhantes, como se pode observar na Figura 15. Foram comparadas as proporções de cada reserva em cada tempo analisado. Asteriscos representam diferenças significativas entre cada tempo das reservas analisadas nas duas variedades. Apesar de apresentarem algumas diferenças estatísticas significantes em alguns pontos, as diferenças foram insignificantes em termos do balanço de carbono para o modelo e, assim, o efeito dessas diferenças sobre os fluxos também serão insignificantes.

6.11. CONSTRUÇÃO DO MODELO

A base para a construção do modelo utilizado neste estudo foi o modelo apresentado por Cheung et. al. (2013). Os autores utilizaram a modelagem por ABF para prever o gasto energético de manutenção da planta sob condições de estresse. O modelo foi montado a partir de informações do AraCyc, que é o banco de dados de reações metabólicas baseadas no genoma de *Arabidopsis thaliana*. Entretanto algumas informações precisaram ser adicionadas, pois, o modelo foi originalmente utilizado no estudo de crescimento e produção de biomassa e, conseqüentemente, as reações necessárias para descrever a degradação foram, em alguns casos, perdidas ou não adicionadas ao modelo.

Desta forma, as reações da matriz estequiométrica foram buscadas em outros bancos de dados de reações metabólicas como o SoyCyc e o PlantCyc além de dados da literatura que auxiliassem a construção do modelo para vias específicas. As informações sobre as reações metabólicas dos bancos de dados são provenientes de evidências de genes que codificam determinadas enzimas as quais são necessárias para o metabolismo. As informações sobre a presença dessas enzimas ou o gene que a codifica foram consultadas na literatura ou a partir do alinhamento de sequências de DNA ou AAs com outras espécies de plantas. As reações que não constavam nos bancos de dados foram buscadas na literatura específica para cada caso e os trabalhos consultados para completar modelo estão listados na Tabela 7 assim como o processo e os compostos envolvidos

O modelo foi testado utilizando reservas distintas separadamente como únicas fontes de carbono e/ou nitrogênio para o metabolismo. O objetivo dos testes foi identificar rotas

metabólicas quebradas, ou seja, faltando algumas reações, ou mesmo ausentes, que seriam rotas inteiras que não existiam no modelo. As reservas testadas foram AAs, ácidos graxos (AGr), AST e PC. Os testes foram feitos com cada tipo de reserva separadamente, ou seja, cada aminoácido foi usado como única fonte de carbono e nitrogênio para o modelo. Dentre os aminoácidos, a HIS não foi degradada, pois não há informações sobre sua rota de degradação em plantas. Outro caso foi o de alguns açúcares provenientes da PC que não foram degradados e por isso precisaram ser acumulados pelo modelo, entre eles a ramnose, a fucose e o galacturonato. Como não foi medido as quantidades de enxofre presentes na biomassa, foi permitido ao modelo equilibrar o balanço de enxofre de acordo com a necessidade a partir de fontes externas que são virtuais e não pertencem à biomassa.

Tabela 7. Relação das literaturas consultadas que foram utilizadas para a construção do modelo.

Reação	Compostos	Literatura
	SO ₄ , GLUT, CYS	Garsed & Read (1977a) Garsed & Read (1977b) Silva et al. (2003)
	SAC	Thorne (1982) Weise et al. (2000)
Transporte no Floema	RAF, EST, VER	Lalonde et al. (2003) Lalonde et al. (2004) Komor et al. (1996)
	SER	Housley et al. (1977)
Formação de Acil-CoA	AGr	Baker et al. (2006)
β-Oxidação	AGr	Baker et al. (2006) Graham (2008)
Biossíntese de AGr	Ác. Arachídico Ác. Linoleico Ác. Linolênico	Fatland et al. (2005) Harwood (1996)
Transportes entre organelas	Compostos Solúveis.	Baker et al. (2006) Footitt et al. (2002) Graham (2008) Linka & Weber (2010)

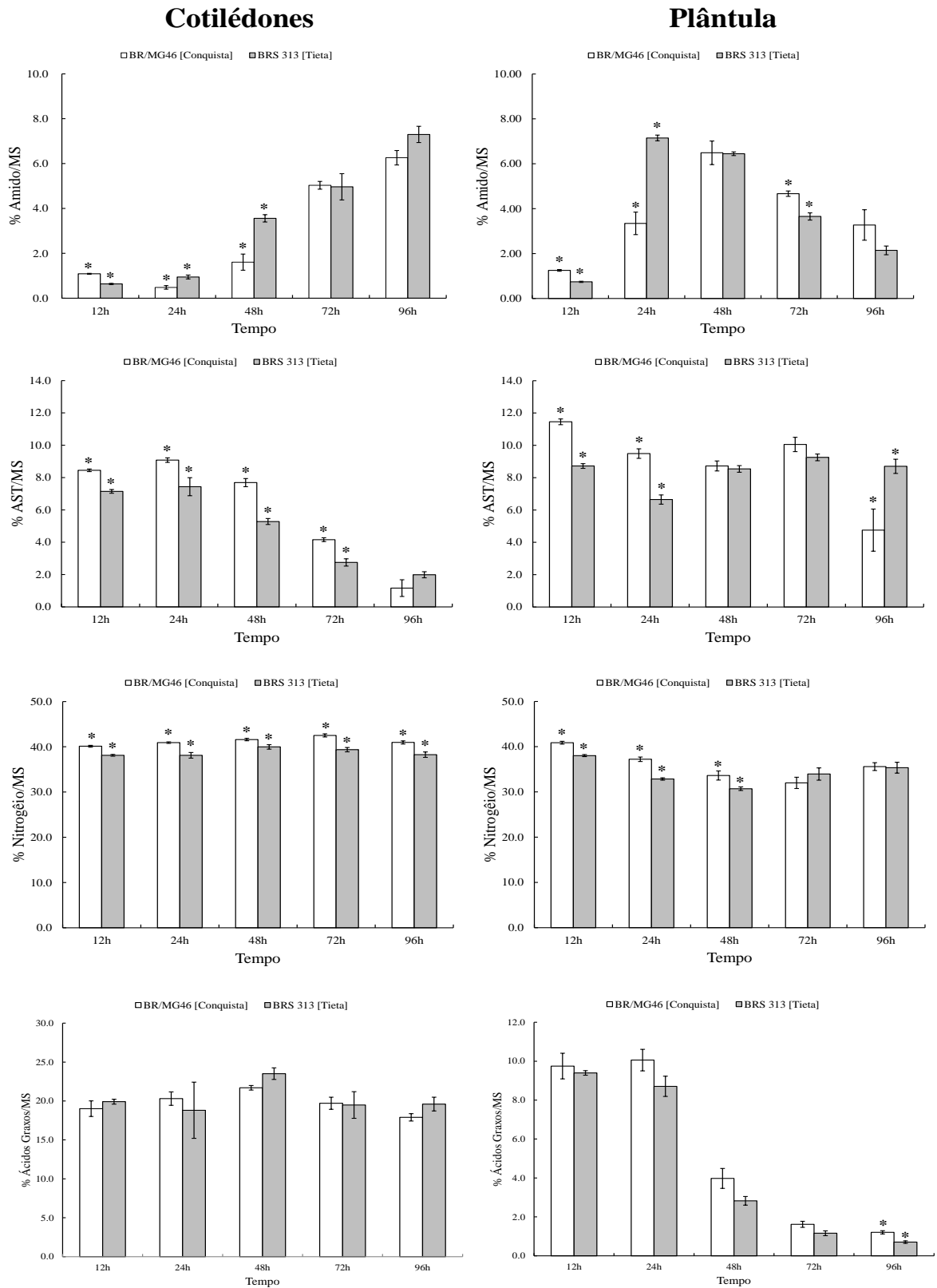


Figura 15. Comparação da variação das reservas ao longo da germinação e crescimento inicial de duas variedades de soja. À esquerda os gráficos são referentes aos cotilédones e à direita aos eixos.

6.12. MODELAGEM METABÓLICA

Nas Figuras 16, 17, 18, os resultados das simulações do modelo são apresentados para cada período 24-48h, 48-72h e 72-96h, respectivamente. As setas pontilhadas indicam fluxo existente, porém com valor³ menor que 0,01 mmol.pln⁻¹.dia⁻¹. As setas preenchidas possuem valores iguais ou maiores que 0,01 mmol.pln⁻¹.dia⁻¹. Essas setas variam a espessura de acordo com a magnitude do fluxo de determinada reação. A ausência de setas indica valor zero para os fluxos. Os fluxos apresentados nas figuras representam uma versão resumida de toda a rede metabólica indicando somente os principais fluxos ou os de maior interesse.

Em cotilédones (Figura 16), para atender às restrições de síntese de amido e de síntese ácidos graxos (AGr) em cotilédones, o modelo orientou-se de forma que o metabolismo das reservas ativesse vias envolvidas na síntese desses compostos. A síntese de amido em cotilédones ocorreu a partir da utilização de duas principais fontes: a sacarose, de origem externa aos cotilédones (xSAC), provavelmente proveniente do tegumento ou, a sacarose presente na biomassa dos cotilédones (bSAC); e, de açúcares, provenientes da degradação de parede celular (PC).

A primeira rota, que utilizou xSAC/bSAC, ocorreu pela hidrólise de sacarose em frutose (FRU) e uridina difosfato-glicose (UDP-GLC) no citosol. A FRU prosseguiu pela via glicolítica produzindo dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP) no citosol. Parte da DHAP foi transportada para o plastídeo e utilizada no ciclo das pentoses fosfato juntamente com a utilização de xilulose-5-fosfato (XYL-5P), proveniente da degradação de PC, produzindo assim frutose-6-fosfato (FRU-6P); o restante de DHAP foi convertido em GAP. A segunda rota proveniente de açúcares derivados da PC ocorreu no citoplasma e utilizou-se principalmente da glicose (GLC) para a síntese de amido. Ambas as rotas acabaram por converter tanto a FRU-6P quanto a GLC em glicose-6-fosfato (GLC-6P), um dos intermediários na rota de síntese de amido.

A síntese de AGr ocorreu nos plastídeos e seus precursores são provenientes da via glicolítica. O GAP produzido pela via glicolítica foi convertido em fosfoenolpiruvato (PEP) no citosol o qual foi transportado para os plastídeos e convertido em piruvato (PYR). O PYR por sua vez foi convertido em acetil-CoA (ACET-COA), também proveniente do acetato (ACET), produzido na mitocôndria durante a síntese de acetoacetato. O ACET-COA

³ Valor definido arbitrariamente para determinar a menor magnitude de fluxo a ser representada nas figuras.

produzido no plastídeo foi convertido em malonil-CoA, que juntamente com as proteínas carreadoras de grupos acil (ACP) são os responsáveis pela produção dos AGr encontrados experimentalmente, atendendo às demandas das restrições de fluxo impostas ao modelo neste período.

A β -oxidação dos AGr esteve desativada em 24-48h, e conseqüentemente, não apresentou nenhum fluxo. Todavia, o ciclo do glioxalato esteve ativo devido à produção de citrato (CIT) e malato (MAL) a partir da produção de acetyl-CoA pela via do crotonil-CoA, resultante da degradação de lisina (LYS). O CIT foi convertido isocitrato (ISOCIT) o qual foi clivado em succinato (SUC) e glioxalato (GLYOX). O SUC foi transportado para a mitocôndria e utilizado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) produzindo fumarato (FUM) e adenosina trifosfato (ATP) através da cadeia de transporte de elétrons. O GLYOX, também resultante da degradação de glicina (GLY), foi utilizado para a formação de MAL no glioxissomo. O MAL produzido no glioxissomo foi transportado para o citosol e depois transportado via antiporte com oxaloacetato (OXACET) para a mitocôndria. O MAL, transportado para a mitocôndria, assim como o produzido pelo TCA, produziu nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto (NADH) e OXACET, que foi novamente envolvido no transporte de MAL para o interior da mitocôndria, numa espécie de ciclo. O NADH foi oxidado em NAD pelo Complexo I da cadeia de transporte de elétrons. Os elétrons foram conduzidos pela ubiquinona (Q) entre o Complexo I e III, e pelo citocromo C (CYTc) para o Complexo IV o qual utiliza o oxigênio (O_2) comoceptor final dos elétrons. Os prótons produzidos em todas as etapas foram bombeados para o espaço intermembrana formando um gradiente necessário para a produção de ATP pelo Complexo V.

Os AAs provenientes da degradação de proteína em cotilédones atuaram como fonte de carbono no TCA (Figura 16). Entre eles valina (VAL) e treonina (THR) para a produção de succinil-CoA (SUC-COA), leucina (LEU) e isoleucina (ILE) na produção de ACET-COA na mitocôndria e tirosina (TYR) na produção de FUM e LYS e GLY na produção de CIT e MAL pela via do glioxalato, como descrito acima. O balanço de nitrogênio esteve ligado principalmente à formação de glutamato (GLT) por diversas fontes, sejam elas diretamente do GLT que compõe a proteína ou a partir da degradação de outros AAs. Por causa disso, assumiu-se a existência de um *pool* de GLT em cotilédones advindos dos diversos compartimentos. A amônia (NH_4^+) também fez parte desse balanço de nitrogênio em cotilédones. A NH_4^+ foi produzida principalmente através da degradação de alguns AAs, como arginina (ARG), GLT e aspartato (ASP). Neste período, a NH_4^+ não foi utilizada em

outros processos e sim estocada no vacúolo. O balanço de enxofre ocorreu pelos aminoácidos cisteína (CYS) e metionina (MET), provenientes da degradação de proteínas. A CYS foi utilizada em sua totalidade para a formação de glutatona (GLUT), a qual foi utilizada para o transporte entre os cotilédones e o eixo.

Alguns AAs não foram utilizados pelo modelo e dessa forma foram acumulados, isto é, saem do modelo e não são utilizados. A histidina (HIS), um dos AAs não degradado pelo modelo, já que não existem informações disponíveis das rotas de degradação. Ademais, a MET e o triptofano (TRP), por algum defeito na rota de degradação desses AAs, e fenilalanina (PHE), que foi convertida em álcool cumarílico, também saem do modelo.

O GLT esteve envolvido em várias etapas de produção de compostos que foram transportados ativamente no floema para o eixo. Foram eles: GLUT, produzida a partir de CYS e GLY; serina (SER) produzida a partir de GAP; asparagina (ASN) produzida a partir de ASP e o ácido gama-aminobutírico (GABA), produzido também a partir de ARG. Os OSRs, que compreendem rafinose (RAF), estaquiose (EST) e verbascose (VER), originam-se da biomassa e também foram transportados pelo floema. Estes açúcares foram transportados de forma passiva, isto é, sem gasto de energia. A EST, além de ser transportada a partir de sua degradação produzindo rafinose, também produziu α -D-galactose (α -GAL) a qual foi utilizada na síntese de PC em cotilédones. Esses OSRs representaram a principal fonte de carbono transportada para o eixo. Os compostos restantes representam as principais fontes de nitrogênio e enxofre para o eixo no modelo. Neste mesmo período a sacarose não é transportada pelo floema. Além dos compostos provenientes dos cotilédones e transportados para o eixo observou-se um remanescente de reservas do embrião que também foram utilizadas no seu metabolismo.

Em eixo os OSRs foram degradados formando sacarose (SAC) e α -GAL. A SAC foi degradada em FRU que também é interconvertida em GLC e UDP-GLC no citoplasma para atender ao acúmulo tanto de FRU como de GLC no eixo. Outra parte da FRU segue na via glicolítica produzindo PYR, o qual também tem sua fonte a partir de MAL, oriundo da via do glicoxalato. O PYR foi utilizado para a produção de ACET-COA na mitocôndria utilizada no TCA para a produção de CIT bem como na produção de vários AAs. A UDP-GLC assim como a α -GAL foram os principais açúcares utilizados para a síntese de PC e amido. A formação dos vários açúcares que compõem a PC se deu a partir da interconversão de UDP-GAL e α -GAL que são provenientes dos cotilédones. A glicose-1-fosfato (GLC-1P)

precursora da via do amido foi produzida a partir da produção de uridina difosfato-galactose (UDP-GAL) que é um dos açúcares utilizados na síntese de PC. A GLC-1P foi convertida em GLC-6P e transportada para o plastídeo para a síntese de amido. Outra reserva remanescente do embrião utilizada pelo eixo foram os AGr, principalmente os insaturados como o ácido linoleico. A via de β -oxidação e glioxalato estão ativas produzindo MAL e CIT que seguiu para a mitocôndria e foram utilizados no TCA.

Os metabólitos intermediários da via glicolítica foram utilizados também para a síntese de AAs. O PYR foi utilizado para síntese de alanina (ALA), LEU, ILE, VAL e LYS. O PEP para a síntese de PHE e TYR. O GAP através da via das pentoses fosfato produziu os AAs HIS e TRP. A THR e a ARG foram produzidas a partir de ASP que por sua vez foi produzida a partir da degradação da ASN oriunda dos cotilédones e transportada via floema. A prolina (PRO) e glutamina (GLN) foram produzidas a partir de GLT. O GLT advém principalmente dos compostos transportados no floema como a glutamina, que também forneceu CYS e GLY para o eixo; e, o GABA que também forneceu SUC para o TCA. A SER e ASN também foram provenientes dos cotilédones e transportadas via floema. Todos os AAs foram produzidos para atender à demanda de síntese proteica em eixo.

Na Figura 17, observa-se o resultado da simulação da modelagem em 48-72h. Em cotilédones, a bSAC foi utilizada para atender as demandas das restrições, como o acúmulo de FRU e GLC e para a síntese de PC.

Os AGr foram as principais reservas fornecedoras de carbono e energia em cotilédones neste período. Estes são provenientes da biomassa e da produção ocorrida em 24-48h. Pela β -oxidação os AGr foram convertidos em ACET-COA que seguiu pela via do glioxalato para a produção de CIT e MAL. O CIT foi convertido em ISOCIT que retorna para a produção de GLIOX, que será utilizado na produção do malato pela mesma via, e SUC que foi utilizado para transporte para o eixo via floema e produção de FUM e energia no ciclo TCA. O dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH₂), produzido pela desidrogenação do SUC em FUM, foi oxidado em dinucleotídeo de flavina e adenina oxidado (FAD) no Complexo II, reduzindo a ubiquinona que seguiu nos demais Complexos para a produção de energia na forma de ATP. O FUM segue no TCA para a produção de MAL, que em menor quantidade foi convertido em OXACET e o restante utilizado para cotransporte com o SUC proveniente da via do glioxalato entre a mitocôndria e o citosol. O MAL produzido na via do glioxalato é convertido em OXACET e NADH no citosol. O OXACET foi transportado para o

glioissomo e utilizado na produção de MAL e CIT na via do glioxalato e na oxidação de NADH. O OXACET produzido tanto pelo TCA quanto na interconversão do MAL, foi utilizado na via da gliconeogênese, produzindo PEP. Este foi utilizado na via glicolítica inversa produzindo GAP que foi convertido em FRU-6 utilizada para a produção de amido.

Os AAs mantiveram padrão semelhante em todos os período. Entretanto, a SER, transportada via floema foi de origem estritamente proteica, isto é, não foi produzida no metabolismo como em 24-48h. Os compostos transportados via floema foram os mesmos transportados em 24-48h, exceto a VER que não é mais transportada a partir deste período. SUC e SAC também foram transportados a partir do primeiro período de forma ativa. A utilização dos compostos transportados pelo floema em 48-72h e 72-96h seguem o mesmo padrão observado em 24-48h. As diferenças encontradas foram na forma de utilização de SAC como outra fonte de carbono pelo eixo para atender as demandas de FRU e GLC do modelo e como provedora de UDP-GLC como intermediário para a síntese de outros açúcares envolvidos na síntese de PC. O SUC agora transportado via floema entra diretamente para o TCA e utilizado na produção de FUM e FADH₂.

Em eixo o metabolismo direcionou-se sobretudo para a produção de AAs necessários para a síntese de proteínas bem como para a produção de PC e amido em menor quantidade se comparada à síntese proteica. Os AGr são consumidos em maior parte em 24-48h. Não se observou diferenças qualitativas entre 48-72h e 72-96h, onde os AGr foram degradados e produzindo CIT que foi utilizado para a produção de SUC utilizado no TCA e MAL para produção de PYR no plastídeo.

As principais diferenças encontradas nos dois últimos períodos foram os fluxos de energia. Em 48-72h, o fluxo de energia foi maior que em 72-96h e utilizou-se de um maior fluxo proveniente da produção de FADH₂ na desidrogenação de SUC em FUM além do fluxo de NADH proveniente da desidrogenação de MAL em OXACET que também diminui no em 72-96h.

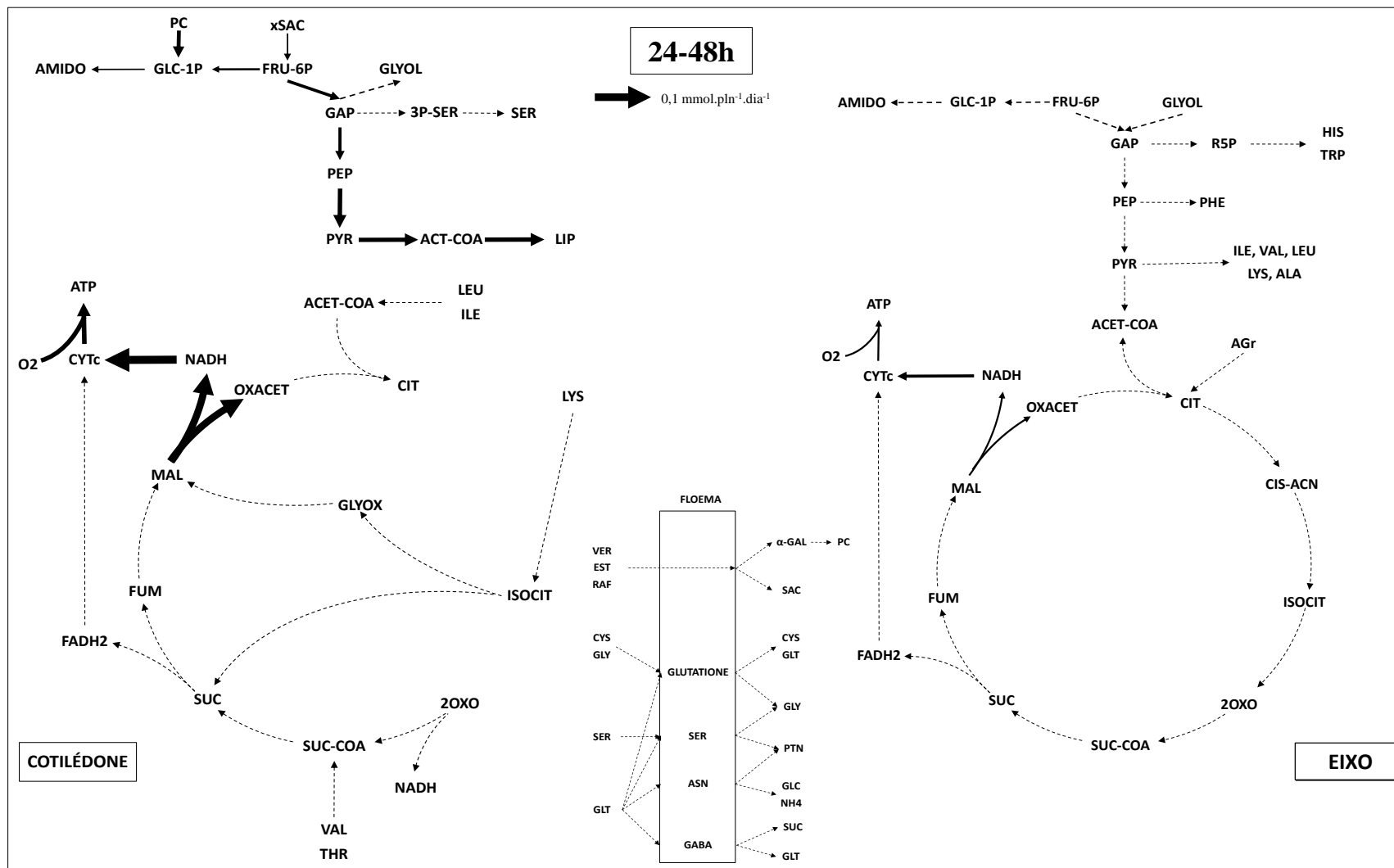


Figura 16. Representação dos fluxos metabólicos em cotilédones e eixo durante a germinação e crescimento inicial de soja em 24-48h. A caixa no centro da figura representa o transporte pelo floema. As linhas pontilhadas indicam magnitudes de fluxos menores que 0,1 mmol.pln⁻¹.dia⁻¹ e as linhas preenchidas fluxos \geq 0,1mmol.pln⁻¹.dia⁻¹. Nem todos os fluxos estão representados na figura.

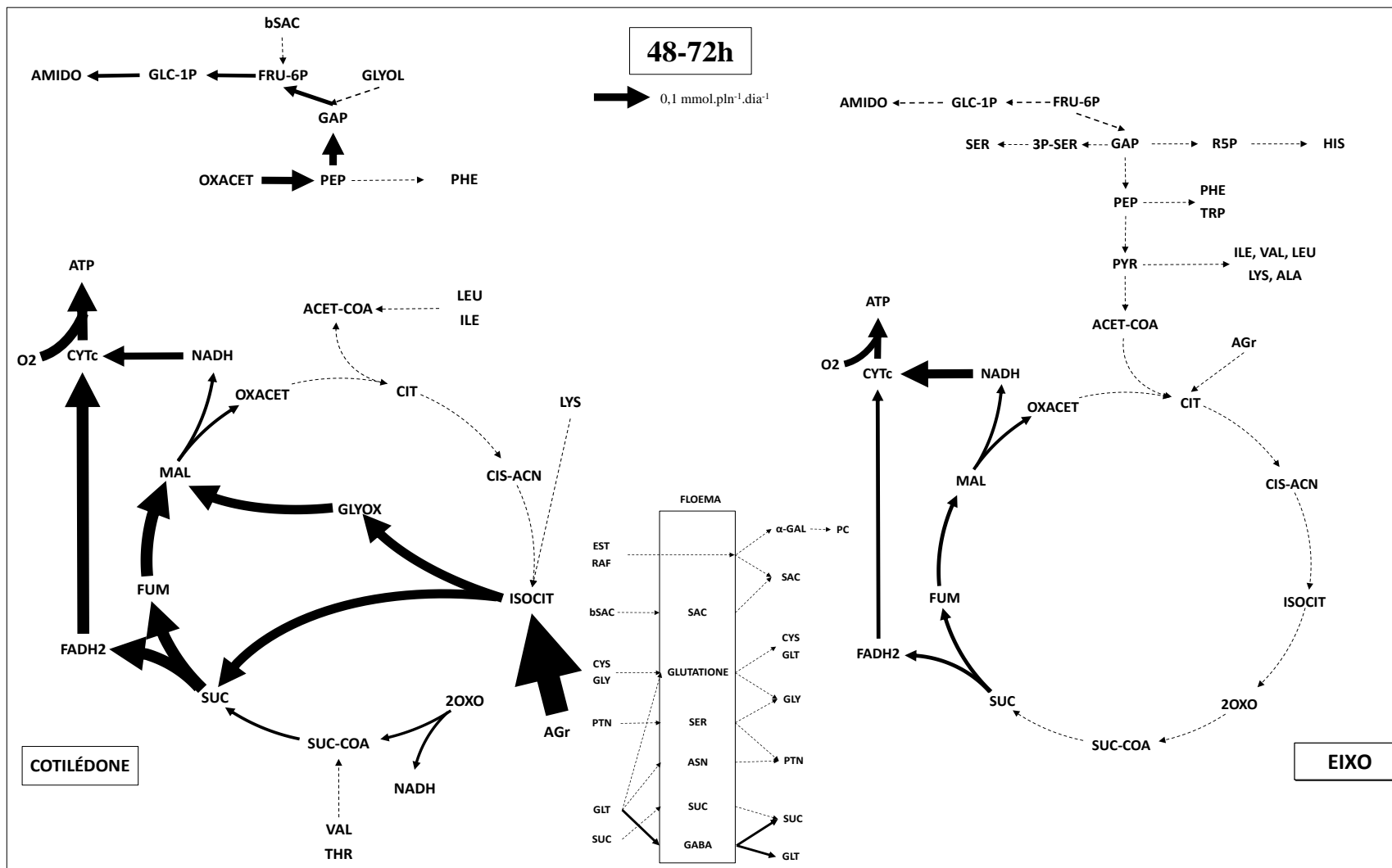


Figura 17. Representação dos fluxos metabólicos em cotilédones e eixo durante a germinação e crescimento inicial de soja em 48-72h. A caixa no centro da figura representa o transporte pelo floema. As linhas pontilhadas indicam magnitudes de fluxos menores que $0,1 \text{ mmol.pln}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e as linhas preenchidas fluxos $\geq 0,1 \text{ mmol.pln}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Nem todos os fluxos estão representados na figura

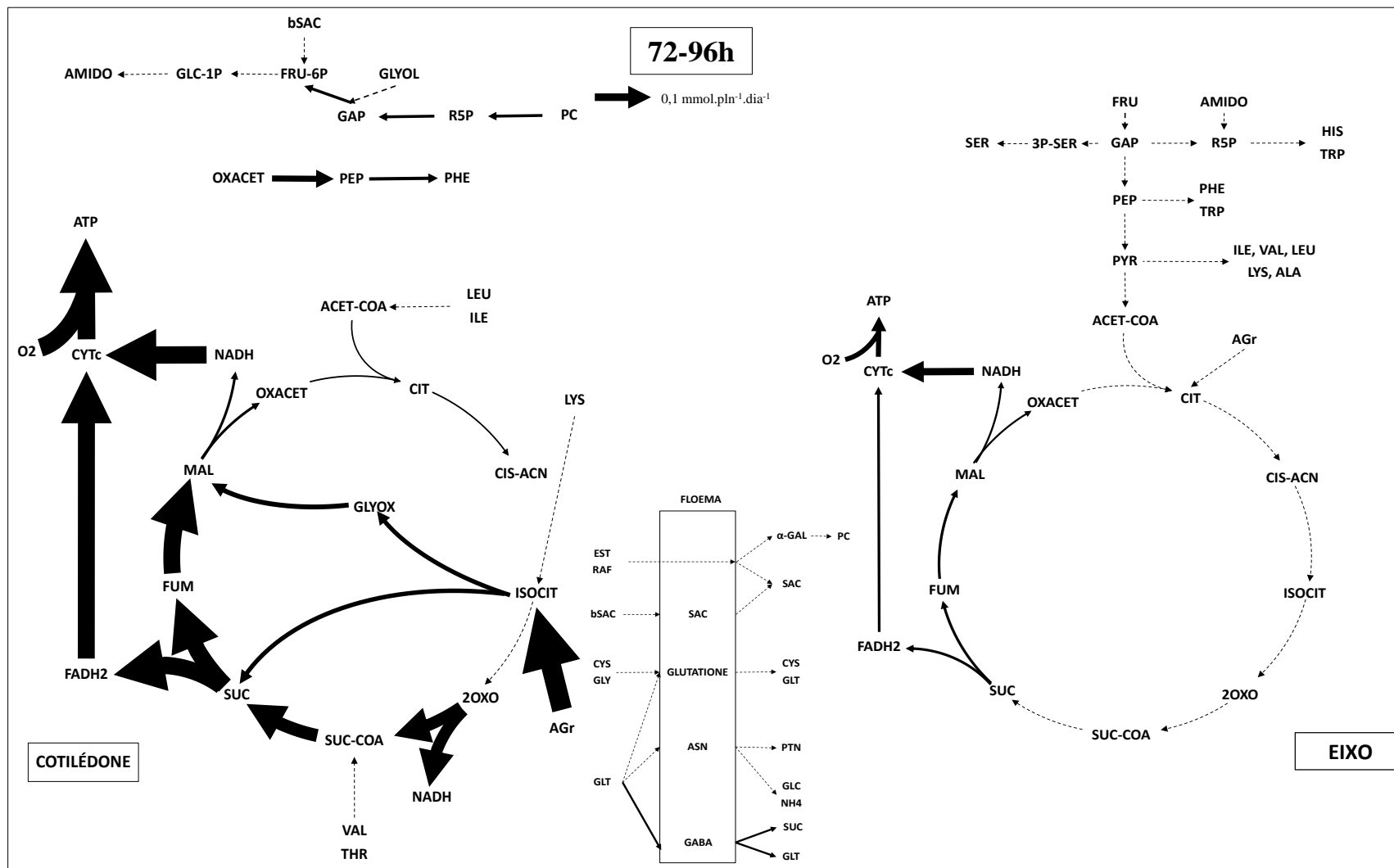


Figura 18. Representação dos fluxos metabólicos em cotilédones e eixo durante a germinação e crescimento inicial de soja em 72-96h. A caixa no centro da figura representa o transporte pelo floema. As linhas pontilhadas indicam magnitudes de fluxos menores que $0,1 \text{ mmol.pln}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e as linhas preenchidas fluxos $\geq 0,1 \text{ mmol.pln}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Nem todos os fluxos estão representados na figura.

7. DISCUSSÃO

7.1. ABSORÇÃO DE ÁGUA E CRESCIMENTO DAS PLÂNTULAS

A redução na massa seca em cotilédones (Figuras 4A e 4C) está relacionada com a mobilização das reservas utilizadas no metabolismo tanto em cotilédones quanto em eixo. Em eixo (Figuras 4A e 4C), o aumento na massa seca está relacionado à síntese de parede celular e proteínas durante o alongamento e divisão celular (Cosgrove 1986). Todavia, foi observado um predomínio da proporção de água em relação à massa seca em eixo. Este fenômeno está diretamente relacionado ao alongamento celular durante o crescimento do eixo, que ocorre a partir da absorção de água por uma diferença de pressão osmótica (Schopfer 2006) gerada pelo desdobramento dos tecidos de reserva e acúmulo de solutos nas células (Egli & TeKrony 1997), provenientes da degradação das reservas. Nas Figuras 4B e 4C o aumento de massa seca é observado, porém, sua proporção na massa fresca em relação ao teor de água é muito menor.

O ganho de água pelos tecidos possui papel importante na germinação e crescimento inicial ao proporcionar o amolecimento e permeabilidade gasosa dos tegumentos (Ferreira & Borghetti 2004), acréscimo ao volume do embrião e dos tecidos de reserva e ativação do metabolismo como a respiração e a translocação de nutrientes (Vilella 1998); e, ocorre em diferentes velocidades nos diferentes tecidos, como observado em soja (McDonald et al. 1988).

7.2. METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

Os carboidratos solúveis em cotilédones parecem ter sido as primeiras reservas utilizadas pelo metabolismo (Figuras 5A e 5C), uma vez que as proporções diminuíram durante o crescimento inicial comparado a outras reservas. Em eixo (Figuras 5B e 5D) as proporções de carboidratos solúveis se mantiveram constantes ao longo do tempo. Cabe mencionar que degradação das reservas está intimamente ligada à demanda de energia durante a germinação (Bewley & Black 1994). Para Peterbauer & Richter (2001) esta energia advém principalmente dos carboidratos solúveis, entre os principais os OSRs e a sacarose. Nos períodos iniciais esses açúcares contribuem para a geração de energia pela célula como mostrado pelo modelo (Figura 16), em adição também observou-se a contribuição de AAs a partir de 24-48h bem como dos AGr após esse período.

Os OSRs foram os açúcares mais rapidamente utilizados em ambos os órgãos (Tabelas 1 e 2). A SAC aumentou inicialmente e diminuiu sua concentração nos tempos finais. Hsu et al. (1973) investigando mudanças nos conteúdos de carboidratos durante a germinação em soja obtiveram resultados semelhantes obtidos aqui. Os autores descreveram uma diminuição nos OSRs em cotilédones logo no início da germinação, seguido de aumentos de sacarose, glicose e frutose, também observados em outras leguminosas (McCleary & Matheson 1974; Buckeridge et al. 1995; Buckeridge & Dietrich 1996). Como observado (Tabelas 1 e 2) os OSRs foram abundantes durante o período pré-germinativo e começam a diminuir logo ao início da germinação, assim como as alterações nos conteúdos de sacarose. East et al. (1972) constataram um aumento em monossacarídeos (GLC e FRU) durante as primeiras 96h. Neste mesmo trabalho, os autores descrevem o desaparecimento da RAF após 96h e de estaquiose após 144h.

Alguns autores têm associado os OSRs à proteção das sementes durante o processo de dessecação (Bailly et al. 2001; Black et al. 1996; Obendorf et al. 2008) através da estabilização das membranas (Crowe et al. 1987) e a longevidade das sementes (Buitink et al. 2000; Koster 1991). Entretanto, muitas das funções relacionadas aos OSRs não foram confirmadas experimentalmente até então (Bentsink 2000; Gurusinghe & Bradford 2001).

Kuo et al. (1988) afirmam que os OSRs degradados durante a germinação e crescimento inicial possuem uma correlação muito próxima ao metabolismo de SAC e o acúmulo de sorbitol em eixo, o que pôde ser observado também em diferentes espécies de leguminosas. Kuo et al. (1990) relatam que o sorbitol foi encontrado em plântulas de soja e parece ser produzido somente durante a germinação, pois não foi encontrado nas sementes nem durante a embebição. Esses mesmos autores encontraram uma alta correlação do acúmulo de sorbitol com concentrações elevadas de glicose e frutose bem como da alta atividade de invertases; ademais, sugerem que esse acúmulo desempenha papel preponderante em facilitar o metabolismo de hexoses durante a germinação. Em adição, os autores afirmam que não há acúmulo de sorbitol e hexoses em cotilédones, possivelmente pela baixa atividade das invertases. O acúmulo de FRU e GLC observado em eixo (Tabela 2) indica o comportamento descrito por Kuo et al. (1990). Entretanto, resultados encontrados nesse estudo diferem dos obtidos por esses autores. As quantidades de sorbitol observadas nas simulações (Figuras 11, 12, 13 e 14) diferem dos resultados encontrados por esses autores. Todavia, as quantidades descritas são relativas aos valores obtidos em 24h e não foram

quantificadas a partir de uma curva de calibração, por isso, será necessária uma quantificação mais acurada do sorbitol e seu padrão de variação.

Na modelagem os OSRs foram transportados pelo floema em sua maioria. Reid (1971) demonstrou em *Trigonella foenum-graecum* (Leguminosae) que a SAC e os OSRs estão presentes em toda a semente, inclusive, em eixo sugerindo que podem ser reservas locais e muito pouco transportadas. A presença desses açúcares foi observada em ambos os órgãos de soja (Tabelas 1 e 2) em consonância com os resultados encontrados por esse autor. Os OSRs são de fato transportados pelo floema pelo menos nos estágios iniciais da germinação e crescimento inicial e correspondem a cerca de 20% dos açúcares transportados em 24h (Tabela 6). Da mesma forma, a SAC foi também encontrada nos exudados em altas concentrações em relação aos outros açúcares, similar aos resultados obtidos por Thorne (1982) que também relatou o transporte de SAC em soja durante a germinação. Os OSRs e a SAC transportados durante esse período estão relacionados com a síntese de parede celular em eixo (Figuras 16, 17 e 18).

A SAC que é transportada pelo floema foi primariamente proveniente da biomassa dos cotilédones. A SAC foi produzida por diversos processos durante a germinação, o que é plausível, pois a SAC é bastante importante no metabolismo das plantas. Por causa disso, não foi possível traçar todas as rotas de produção possíveis com o modelo. Isto posto, todo o conteúdo de SAC encontrado foi chamado de bSAC, ou seja, sacarose proveniente da biomassa.

Em 24-48h foi necessário permitir que o modelo utilizasse uma fonte de carbono externa ao que foi mensurado, pois o balanço de carbono não estava equilibrado. Dessa forma, adicionou-se a xSAC (sacarose externa) (Figura 16) representando uma fonte de carbono externa necessária para equilibrar o balanço de carbono no modelo. Hipotetizou-se que a provável fonte externa de carbono poderia ser de origem tegumentar. Portanto, buscou-se determinar a composição do tegumento e testar a hipótese. Dessa forma, foram encontrados açúcares que poderiam ser a fonte de carbono necessária para equilibrar o balanço de carbono. No entanto, as concentrações observadas (Figura 10 e Tabela 5) não correspondem às quantidades exigidas para equilibrar o balanço de carbono em 24-48h (Figura 16), que são cerca de cem vezes maior que o encontrado no tegumento. Portanto, o tegumento pode contribuir parcialmente para o balanço de carbono fornecendo quantidades inferiores às necessárias para equilibrar o balanço de carbono em cotilédones. Neste contexto, é preciso

investigar o real motivo desse desequilíbrio do balanço e buscar entender a participação do tegumento no fornecimento de algum metabólito para a germinação.

Não sendo importante para o modelo qual a fonte desse carbono externo (denominado xSAC,) ele está relacionado com a produção de AGr e amido em 24-48h (Figura 16). O teor de amido tanto em cotilédones quanto em eixo aumentou ao longo da germinação e crescimento inicial (Figura 6). Esse aumento em soja foi observado em outros trabalhos durante os momentos iniciais de crescimento (Adams et al. 1980; Adams et al. 1981; Webster & Leopold 1977; Brown & Huber 1987). Adams et al. (1981) sugeriram que o amido transitório observado durante a germinação de soja advém de mobilização de lipídeos ao passo que Halmer (1985) sugeriu ser de outras reservas. Por outro lado, Brown & Huber (1987) notaram que o aumento de amido estava relacionado às altas concentrações de açúcares solúveis, principalmente sacarose e rafinose, e sua consequente diminuição ao longo da germinação. Esses resultados também foram observados por Tiné (1997) em *Hymenaea courbaril* (L.) e por Kuo et al. (1988) em *Vigna radiata* (L.) e *Glycine max* (L.). Em adição, Brown & Huber (1988) também sugerem que o acúmulo de amido em cotilédones durante a germinação está positivamente ligado ao crescimento do eixo e funciona como um dreno interno de carboidratos solúveis durante a germinação e crescimento inicial.

Nas simulações a formação de amido ocorre principalmente a partir da utilização dos açúcares provenientes da PC, tanto em 24-48h (Figura 16) quanto em 72-96h (Figura 18). Segundo Buckeridge et al. (2000) após a germinação, de fato se inicia a mobilização dos açúcares de reserva da PC a partir da síntese de enzimas hidrolíticas. Além disso, essa mobilização culmina em um aumento nas concentrações de açúcares solúveis ao mesmo tempo em que se estabelece a relação fonte-dreno entre os cotilédones e o eixo. Assim, essa grande concentração de açúcares solúveis provenientes da degradação da PC pode estar relacionada com aumentos de amido observados (Figuras 6A e 6C) e discutidos acima.

Por outro lado, em 48-72h (Figura 17) a formação de amido ocorre a partir da gliconeogênese com o OXACET produzido no citoplasma derivado do MAL produzido pela degradação dos AGr. Brown & Huber (1987) não relacionam o aumento de amido à degradação de lipídeos pelo menos período pré-germinativo, pois o metabolismo dos lipídeos nesse momento ainda não foi efetivamente iniciado. Entretanto, como discutido acima, a síntese de amido durante a germinação e o crescimento inicial em cotilédones (Figuras 6A e 6C), está relacionada às altas concentrações de açúcares solúveis nos tecidos e, dessa, forma

pode ter diversas origens. Em eixo (Figuras 6B e 6D) a diminuição do teor de amido está relacionada com a utilização pelo metabolismo para a síntese de aminoácidos através do ciclo das pentoses fosfato como observado em 72-96h (Figura 18). A presença de amido logo nos períodos iniciais pode ser explicada da mesma forma discutida acima, ou seja, pela diminuição das concentrações dos açúcares solúveis presentes no eixo.

7.3. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS

As proporções de AGr em cotilédones (Figuras 9A e 9C) não variaram, porém, a quantidade total diminuiu ao longo do crescimento uma vez que a biomassa diminuiu ao longo do tempo. Em eixo (Figuras 9B e 9D), os AGr foram degradados mais acentuadamente. Pôde-se observar que a proporção de AGr diminuiu a partir de 48h. Eastmond et al. (2000) afirmam que os AGr não são utilizados no período pré-germinativo e durante a germinação, mas principalmente no período pós-germinativo onde inicia sua mobilização para o eixo (Eastmond & Graham 2001). De fato, somente observou-se a utilização dos ácidos graxos nesse momento após a germinação em 48-72h (Figura 17) e 72-96h (Figura 18) em ambos os órgãos. A diminuição nos AGr em eixo está relacionada tanto com sua degradação quanto com uma diluição do seu conteúdo nas células devido ao aumento do volume celular acarretado pelo aumento do teor de água.

Os AGr encontrados em maior abundância em cotilédones foram o ácido linoleico, oleico, linoleico (Tabela 3). Em eixo (Tabela 4) os AGr segue um padrão semelhante dos observados em cotilédones, exceto o ácido oleico. Perfil semelhante de AGr foi encontrado por outros autores durante o desenvolvimento da semente de soja ainda ligada à planta mãe (Allen et al. 2009; Fehr et al. 1971).

As concentrações de AGr em cotilédones demonstraram um aumento de todos os AGr em 48h, diminuindo nos tempos subsequentes. Por outro lado, em eixo as concentrações decrescem ao longo da germinação. Joshi et al. (1973) descreveram um comportamento semelhante do metabolismo de AGr durante o período pós-germinativo bem como uma interconversão de ácido oleico para linoleico a partir do sexto dia após a germinação em cotilédones. Mostafa et al. (1987) também descreveram uma mudança na razão entre o total de AGr insaturados e saturados de 6.42:1 para 3.34:1, seis dias após a germinação.

Nas simulações do modelo, em 24-48h (Figura 16) existe uma produção de ácidos graxos a partir da xSAC pela via glicolítica em cotilédones. O acúmulo de lipídeos já foi

observado em *Brassica napus* (L.) (Leguminosae) em resposta aos ácidos ferrúlicos e coumárico por Baleroni et al. (2000); no entanto, para soja, ainda não foi reportado comportamento semelhante. Após 24-48h, os AGr foram oxidados durante β -oxidação para produzir ACET-COA que foi utilizado pelo ciclo do glioxalato para provimento de energia e esqueletos de carbono para os eixos em crescimento (Baker et al. 2006).

Uma parte significativa dos AGr metabolizados é utilizada para manutenção dos tecidos em cotilédones. Os AGr, a partir do ciclo do glioxalato são convertidos em CIT e ISOCIT que posteriormente são convertidos em MAL e SUC com a utilização de OXACET. O MAL e o SUC são utilizados pelo TCA reduzindo os cofatores utilizados na cadeia respiratória FADH e NADH. ap Rees (1980) afirmou que lipídeos não eram substratos utilizados de forma significativa pelas plantas superiores. Por outro lado, Raymond et al. (1992) e Salon et al. (1988) sugeriram que algumas espécies oleaginosas possuem a habilidade de utilizar AGr como substratos para a respiração. Ademais Eastmond & Graham (2001) sugerem que existe uma maior demanda em fornecer esqueletos de carbono para suportar a respiração nos tecidos de reserva, do que para ser transportada para outras células.

A gliconeogênese pôde ser observada em 48-72h (Figura 17) e em 72-96h (Figura 18), produzindo PEP, utilizado para a produção de amido, e PHE em quantidades menores dos que os observados. Em eixo, os AGr presentes nos tecidos são utilizados rapidamente na respiração como discutido acima, entrando no TCA na forma de CIT. Os compostos produzidos pelo ciclo do glioxalato são transportados para a mitocôndria para sustentar a respiração ou são convertidos em OXACET, e se movem para o citosol sustentando a gliconeogênese (Graham 2008). A conversão dos AGr em carboidratos, que serão posteriormente transportados para os órgãos de crescimento, pelo ciclo do glioxalato e pela gliconeogênese, já foi demonstrada em experimentos clássicos de marcação com isótopos radioativos de carbono (Canvin & Beevers 1961).

A ativação do ciclo do glioxalato foi observada em todos os períodos para a utilização dos AGr como fonte de SUC e MAL para o ciclo do TCA, exceto em 24-48h, em que sua ativação ocorre pela utilização da LYS pela via do glutaril-CoA (Figuras 16, 17 e 18). Millhouse et al. (1983) e Falk et al. (1998) mostraram que o ciclo do glioxalato é operante durante germinação e o crescimento inicial de plantas oleaginosas e que existe favorecimento da gliconeogênese e supressão do TCA. Os dados das simulações demonstrou algo diferente do comportamento descrito pelos autores, ou seja, houve também a ativação da gliconeogênese

em cotilédones, porém, ao mesmo tempo a ativação do TCA para a respiração. Em eixo, os compostos advindos do ciclo do glioxalato perpassam por todo o ciclo do TCA e não houve ativação da gliconeogênese.

O perfil de AOs em cotilédones (Figura 11) não são totalmente consistentes com a atividade do modelo. Pois, devido à alta atividade de degradação dos AGr, esperava-se encontrar maiores níveis de AOs no perfil metabólico dos cotilédones da variedade BR/MG46 [Conquista]. Entretanto, as quantidades de CIT, ISOCIT e SUC a partir de 48h são muito baixas ou ausentes se comparadas à atividade do ciclo do glioxalato em 48-72h e 72-96h (Figuras 17 e 18). Por outro lado, observou-se um aumento de FUM que podem ser produtos da reação da succinato desidrogenase. A variação de MAL está relacionada com o transporte para fora da mitocôndria e formação de OXACET no citosol utilizados na gliconeogênese (Eastmond & Graham 2001).

Em eixo (Figura 12), foi possível observar quantidades significativas de CIT que estão relacionadas com a degradação dos AGr. Não houve a produção de SUC através do ciclo do glioxalato em eixo, dessa forma a entrada de carbono no TCA se deu a partir de CIT e MAL. As quantidades de SUC observadas na Figura 12 estão relacionadas principalmente com a transaminação do GABA proveniente dos cotilédones. Conseqüentemente, também se pode observar o aumento das quantidades de FUM proveniente da desidrogenação do SUC em eixo.

Os compostos produzidos no ciclo do glioxalato participaram na produção de aminoácidos, principalmente a SER, que é utilizada no transporte pelo floema para o eixo; e, a PHE que acumula no modelo na forma de álcool coumárico. Em eixo, os compostos da degradação dos AGr também participam da produção de GLT e ASP necessários para a síntese proteica.

7.4. METABOLISMO DE PROTEÍNAS

As proporções de proteínas em cotilédones (Figura 8A e 8C) possuem padrão semelhante ao observado para AGr, isto é, se mantiveram constantes, porém a quantidade total de proteína diminui conforme diminui a biomassa ao longo do tempo. O resultado da quantificação das proteínas (Figura 8) corresponde às proteínas de reserva, pois, o fator de conversão nitrogênio-proteína leva em conta a porcentagem de proteínas de reserva no total de proteínas da soja e é estabelecido também pela composição de aminoácidos das proteínas

(Sosulski & Imafidon 1990). Por outro lado, a ausência de um fator específico para eixo, introduziu um viés às quantidades de proteína quantificadas (Figuras 8B e 8D).

A mobilização das proteínas em cotilédones nas simulações ocorreu em todos os momentos da germinação e crescimento inicial, somente diferindo a magnitude dos fluxos em cada período (Figuras 16, 17 e 18). A forma adotada no modelo leva em conta a degradação da proteína em aminoácidos resumindo todos os passos intermediários da degradação. Em eixo, a mobilização dos aminoácidos se dá no sentido de produção de proteínas neste órgão, porém, isso não limita a degradação das proteínas já presentes em eixo.

Os aminoácidos provenientes da degradação da proteína em cotilédones são utilizados como fonte de carbono, nitrogênio e energia para o metabolismo em cotilédones e em eixos através do transporte pelo floema. Os principais aminoácidos envolvidos na produção de energia e fornecimento de carbono para o TCA foram os aminoácidos de cadeia ramificada (VAL, LEU e ILE) e a THR (Figuras 16, 17 e 18). Esses aminoácidos são transportados para a mitocôndria e entram no TCA na forma de ACET-COA e SUC-COA. Araújo et al. (2010) demonstraram a participação dos aminoácidos de cadeia ramificada e da LYS na provisão de elétrons para a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. Essa provisão de elétrons pode ocorrer de forma direta, pelo transporte de elétrons via flavoproteína transportadora de elétrons; e, de forma indireta pela alimentação do TCA com os produtos provenientes de seu catabolismo (Araújo et al. 2011).

O perfil dos aminoácidos de cadeia ramificada e da THR em cotilédones (Figura 11) são semelhantes e possuem o mesmo padrão. Por um lado, esses aminoácidos parecem não estar relacionados diretamente com sua utilização no TCA, porém, a degradação de proteínas é superior às quantidades utilizadas pelo metabolismo e corrobora os resultados observados para o perfil desses aminoácidos.

Um caso especial observado em cotilédones foi a utilização dos derivados da degradação de LYS pelo ciclo do glioxalato, através da produção de ACET-COA pela via do α -amino adipato em 24-48h (Figura 16). Nesse período o ciclo do glioxalato foi ativado devido a esse mecanismo e não pela degradação de AGr. Stepansky & Galili (2003) também correlacionou a utilização da LYS na produção de ACET-COA pela via do α -amino adipato. Todavia, a utilização do ACET-COA oriundo dessa via metabólica não está necessariamente relacionada com o ciclo do glioxalato, porém, não impede a utilização pelo mesmo. Outra

possibilidade da utilização da LYS é a produção de 2OXO utilizada no TCA (Engqvist et al. 2009).

7.5. TRANSPORTE NO FLOEMA

Os carboidratos transportados no floema são exclusivamente os carboidratos solúveis. Nos dados experimentais (Tabela 6), os carboidratos mais abundantes foram a SAC e a EST nos tempos iniciais e a GLC e a FRU posteriormente. Os principais açúcares transportados no floema na modelagem foram os OSRs e a SAC encontrados em maior abundância nas análises. Entretanto, o transporte dos OSRs foi privilegiado em relação aos outros carboidratos como a SAC, que somente iniciou o transporte a partir de 48-72h, e a GLC e FRU, que não foram transportados em nenhum momento. Isso ocorreu devido ao tipo de carregamento no floema, que para os OSRs ocorre de forma simplástica e sem gasto de energia (Madore 2011; Lalonde et al. 2003; Lalonde et al. 2004; Komor et al. 1996) e para a SAC ocorre de forma apoplástica com gasto de energia (Thorne 1982; Servaites et al. 1979), assim como a GLC e a FRU.

Os aminoácidos transportados pelo floema foram, em sua maioria, provenientes da degradação das proteínas em cotilédones, e no caso da SER pela síntese a partir de GAP (Figura 16). O transporte de aminoácidos pelo floema nas simulações foi feito de forma ativa, semelhante ao observado em SAC e descrito por Servaites et al. (1979) e Lalonde et al. (2003). Os aminoácidos transportados pelo floema foram as principais fontes de nitrogênio para o eixo. A ASN e a SER foram os aminoácidos livres encontrados nos exudados de floema (Tabela 6). Em experimentos sobre os efeitos da temperatura durante a germinação e crescimento inicial também se encontrou evidências da presença desses aminoácidos sendo transportados pelo floema (Duke et al. 1978); em temperaturas próximas à utilizada no presente estudo (cerca de 25°C) os autores encontram concentrações semelhantes de ASN. Em adição, Housley et al. (1977) também evidenciou o transporte de SER durante a germinação e crescimento inicial da soja.

A GLUT foi utilizada nas simulações para o transporte de a GLY e a CYS em todos os períodos. Neste caso, a CYS presente na GLUT é o aminoácido responsável pelo balanço de enxofre entre os órgãos. O transporte de GLUT pelo floema foi baseado nos dados obtidos dos exudados de floema (Tabela 6) e no trabalho de Garsed & Read (1977a) e Garsed & Read (1977b), que evidenciou a presença de GLUT e CYS livre sendo transportada no floema. Na

simulação foi permitido o transporte de CYS, GLUT e SO₄, porém, o modelo optou em utilizar somente a GLUT para transporte no floema para o eixo.

O GABA representou outra forma para transporte de nitrogênio e carbono para o eixo. Na simulação GABA transportado é fonte de nitrogênio (GLT) e de carbono (SUC) para o eixo. Quantidades significativas de GABA foram encontradas nos exudados de floema (Tabela 6), servindo como base para a inclusão nas reações de transporte no floema. O método de coleta do exudado de floema foi feito com a utilização de EDTA. Beuve et al. (2004) reportaram a presença de GABA em exudados de floema utilizando o método de EDTA. Por outro lado, (Gaupels et al. 2008; Dinant et al.) discutem que o tratamento com EDTA frequentemente resulta em composições antifactuais do exudado de floema, possivelmente pelo envelhecimento e alagamento dos tecidos analisados durante o método.

8. CONCLUSÃO

Apesar da complexidade encontrada no metabolismo vegetal, a modelagem por ABF foi aplicada com sucesso e pôde oferecer informações úteis sobre o metabolismo ao longo da germinação crescimento inicial. Algumas informações como o padrão de utilização do amido e dos AST obtidos pela modelagem metabólica por AFB foram corroborados em trabalhos encontrados na literatura (Kuo et al. 1988; Hsu et al. 1973). Em geral o padrão de utilização das reservas também foram corroboradas por dados encontrados por outros autores. Por outro lado os dados obtidos pela modelagem metabólica diferiram na maioria dos dados obtidos de perfil metabólico que auxilia no teste de confiabilidade da aplicação da modelagem. Dessa forma, ajustes serão necessários para que o modelo seja mais acurado e se equipare aos resultados obtidos experimentalmente.

Para que os resultados de modelagem metabólica se aproximem mais dos resultados experimentais encontrados, serão necessárias algumas informações e correções a serem feitas no modelo. Entre elas estão uma avaliação real da composição de aminoácidos de proteínas de reservas, a determinação de um fator de conversão nitrogênio-proteína específico para eixos de soja, a revisão e a adição de informações na matriz estequiométrica das reações do modelo para a degradação de aminoácidos, a composição real de açúcares encontrados na parede celular, a permissão de outros compostos a serem transportados via floema, entre outras informações que auxiliem no ajuste.

Apesar de serem necessários alguns ajustes, o modelo já é capaz de fornecer informações interessantes que podem guiar estudos futuros em metabolismo de plantas em determinados estados fisiológicos e lançar luz em questões que ainda não estão totalmente esclarecidas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, C., Broman, T. & Rinne, R., 1981. Starch Metabolism in Developing and Germinating Soya Bean Seeds is Independent of β -Amylase Activity. *Ann. Bot.*, 48(4), pp.433–440.
- Adams, C., Rinne, R. & Fjerstad, M., 1980. Starch Deposition and Carbohydrase Activities in Developing and Germinating Soya Bean Seeds. *Ann. Bot.*, 45(5), pp.577–582.
- Aguiar, I.B., Pinã-Rodrigues, F.C.M. & Figliolia, M.B., 1993. *Sementes Florestais Tropicais*. I. B. Aguiar, F. C. M. Pinã-Rodrigues, & M. B. Figliolia, eds., Brasília: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes - ABRANTES.
- Albrecht, L., 2009. *Biorregulador do desempenho agrônômico, econômico e na qualidade de semente de soja*. Universidade Estadual de Maringá.
- Allen, D.K., Libourel, I.G.L. & Shachar-Hill, Y., 2009. Metabolic flux analysis in plants: coping with complexity. *Plant, cell & environment*, 32(9), pp.1241–57.
- Allen, D.K., Ohlrogge, J.B. & Shachar-Hill, Y., 2009. The role of light in soybean seed filling metabolism. *Plant Journal*, 58(2), pp.220–234.
- Amaral, L. et al., 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea*, 34(4), pp.425–431.
- ap Rees, T., 1980. Assessment of the Contributions of Metabolic Pathways to Plant Respiration. In D. Davies, ed. *The Biochemistry of Plants*. Academic Press, pp. 1–29.
- ap Rees, T., 1987. Compartmentation of plant metabolism. In D. Davies, ed. *The Biochemistry of Plants*. New York: Academic Press, pp. 87–115.
- Araújo, W.L. et al., 2010. Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. *The Plant cell*, 22(5), pp.1549–63.
- Araújo, W.L. et al., 2011. Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in plant science*, 16(9), pp.489–98.
- Bailly, C. et al., 2001. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of experimental botany*, 52(357), pp.701–8.
- Baker, A. et al., 2006. Chewing the fat: β -oxidation in signalling and development. *Trends in Plant Science*, 11(3), pp.124–132.
- Baleroni, C.R.S. et al., 2000. Lipid Accumulation during Canola Seed Germination in Response to Cinnamic Acid Derivatives. *Biologia Plantarum*, 43(2), pp.313–316.

- Bentsink, L., 2000. Genetic Analysis of Seed-Soluble Oligosaccharides in Relation to Seed Storability of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124(4), pp.1595–1604.
- Beuve, N. et al., 2004. Putative role of gamma -aminobutyric acid (GABA) as a long-distance signal in up-regulation of nitrate uptake in Brassica napus L. *Plant, Cell and Environment*, 27(8), pp.1035–1046.
- Bewley, J. & Black, M., 1994. *Seeds: Physiology of Delevopment and Germination 2°* ed. J. Bewley, ed., New York: Plenum Press.
- Black, M. et al., 1996. Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 47(2), pp.161–169.
- Black, R., 2000. Complexo soja: fundamentos, situação atual e prespectiva. In G. Câmara, ed. *Soja: tecnologia de produção II*. Piracicaba: ESALQ, pp. 1–20.
- Borchert, S. et al., 1993. Studies of the Enzymic Capacities and Transport Properties of Pea Root Plastids. *Plant physiology*, 101(1), pp.303–312.
- Borodina, I. & Nielsen, J., 2005. From genomes to in silico cells via metabolic networks. *Current opinion in biotechnology*, 16(3), pp.350–5.
- Boyle, N.R. & Morgan, J.A., 2009. Flux balance analysis of primary metabolism in Chlamydomonas reinhardtii. *BMC systems biology*, 3, p.4.
- Brown, C.S. & Huber, S.C., 1987. Photosynthesis, reserve mobilization and enzymes of sucrose metabolism in soybean (Glycine max) cotyledons. *Physiologia Plantarum*, 70(3), pp.537–543.
- Brown, C.S. & Huber, S.C., 1988. Reserve mobilization and starch formation in soybean (Glycine max) cotyledons in relation to seedling growth. *Physiologia Plantarum*, 72(3), pp.518–524.
- Buckeridge, M.S., Aida, M.P., et al., 2004. Acúmulo de Reservas. In A. G. Ferreira & F. Borghetti, eds. *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, p. 323.
- Buckeridge, M.S. et al., 2000. Cell wall storage polysaccharides in seeds. Structure, metabolism, function and ecological aspects. In *Seed physiology papers presented at the VII Brazilian Plant Physiology Congress, Brasília, July 1999*. Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, pp. 137–162.
- Buckeridge, M.S., Santos, H.P., et al., 2004. Mobilização de Reservas. In A. Ferreira & F. Borghetti, eds. *Germinação do básico ao aplicado2*. Porto Alegre: Artmed, p. 323.
- Buckeridge, M.S. & Dietrich, S.M.C., 1996. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of Sesbania marginata Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Plant Science*, 117(1-2), pp.33–43.

- Buckeridge, M.S., Panegassi, V. & Dietrich, S.M.C., 1995. Storage carbohydrate mobilisation in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) following germination. *Revista Brasileira de Botânica*, 18(2), pp.171–175.
- Buitink, J., Hemminga, M.A. & Hoekstra, F.A., 2000. Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. *Plant physiology*, 122(4), pp.1217–24.
- Canvin, D.T. & Beevers, H., 1961. Sucrose synthesis from acetate in the germinating castor bean: kinetics and pathway. *The Journal of biological chemistry*, 236(4), pp.988–995.
- Cardoso, V.J., 2004. Germinação. In G. Kerbauy, ed. *Fisiologia Vegetal*. São paulo: Guanabara Koogan, p. 452.
- Carlson, J.B., 1973. Morphology. In B. Caldwell, ed. *Soybeans: improvement, production and uses*. Madison: The American Society of Agronomy, Inc., p. 681.
- Castro, R.D., Bradford, K.J. & Hilhorst, H.W., 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In A. G. Ferreira & F. Borghetti, eds. *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, p. 323.
- Cheung, C.Y.M. et al., 2013. A method for accounting for maintenance costs in flux balance analysis improves the prediction of plant cell metabolic phenotypes under stress conditions. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 75(6), pp.1050–61.
- Cogne, G. et al., 2011 A model-based method for investigating bioenergetic processes in autotrophically growing eukaryotic microalgae: application to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology progress*, 27(3), pp.631–40.
- Conab, 2013. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos - Safra 2013/14 - Terceiro Levantamento. , 1(3), p.77.
- Conab, 2008. Estudos de prospecção para a safra 2008/2009.
- Cosgrove, D., 1986. Biophysical Control of Plant Cell Growth. *Ann rev Plant Physiol*, 37, pp.377–405.
- Crowe, J.H. et al., 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *The Biochemical journal*, 242(1), pp.1–10.
- Dal’Molin, C.G.D.O. et al., 2010. C4GEM, a genome-scale metabolic model to study C4 plant metabolism. *Plant physiology*, 154(75), pp.1871–1885.
- Dien, S.J.V. & Lidstrom, M.E., 2002. Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1, with application to reconstruction of C(3) and C(4) metabolism. *Biotechnology and bioengineering*, 78(3), pp.296–312.

- Dieuaide-Noubhani, M. & Alonso, A.P., 2014. Application of metabolic flux analysis to plants: methods and protocols. In M. Dieuaide-Noubhani & A. P. Alonso, eds. *Plant Metabolic Flux Analysis*. London: Humana Press, p. 365.
- Dinant, S. et al., Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *Comptes rendus biologiques*, 333(6-7), pp.504–15.
- Dixon, R. & Sumner, L., 2003. Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology*, 131(3), pp.878–885.
- Duke, S.H. et al., 1978. Low Temperature Effects on Soybean (*Glycine max* [L.] Merr. cv. Wells) Free Amino Acid Pools during Germination. *PLANT PHYSIOLOGY*, 62(4), pp.642–647.
- East, J.W., Nakayama, T.O.M. & Parkman, S., 1972. Changes in Stachyose, Raffinose, Sucrose, and Monosaccharides During Germination of Soybean1. *Crop Science*, 12(1), p.7.
- Eastmond, P.J. et al., 2000. Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), pp.5669–5674.
- Eastmond, P.J. & Graham, I.A., 2001. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends in plant science*, 6(2), pp.72–8.
- Edwards, J.S. & Palsson, B.O., 2000. The Escherichia coli MG1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), pp.5528–5533.
- Egli, D.B. & TeKrony, D.M., 1997. Species differences in seed water status during seed maturation and germination. *Seed Science Research*, 7(01), pp.3–12.
- Embrapa, 2004. *Tecnologias na produção de Soja: Paraná - 2005*, Londrina: Embrapa Soja.
- Engqvist, M. et al., 2009. Two D-2-hydroxy-acid dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* with catalytic capacities to participate in the last reactions of the methylglyoxal and beta-oxidation pathways. *The Journal of biological chemistry*, 284(37), pp.25026–37.
- Entwistle, G. & Rees, T.A., 1988. Enzymic capacities of amyloplasts from wheat (*Triticum aestivum*) endosperm. *The Biochemical journal*, 255(2), pp.391–6.
- Falk, K. et al., 1998. Metabolic bypass of the tricarboxylic acid cycle during lipid mobilization in germinating oilseeds. Regulation Of nad⁺-dependent isocitrate dehydrogenase versus fumarase. *Plant physiology*, 117(2), pp.473–81.
- Fatland, B.L., Nikolau, B.J. & Wurtele, E.S., 2005. Reverse genetic characterization of cytosolic acetyl-CoA generation by ATP-citrate lyase in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 17(1), pp.182–203.

- Fehr, W.R., Thorne, J.C. & Hammond, E.G., 1971. Relationship of Fatty Acid Formation and Chlorophyll Content in Soybean Seed1. *Crop Science*, 11(2), p.211.
- Ferreira, A. & Borghetti, F., 2004. *Germinação: do básico ao aplicado* A. Ferreira & F. Borghetti, eds., Porto Alegre: Artmed.
- Filho, A. de C. & Amabile, R.F., 1996. Biologia da Soja. In Á. A. Morais & A. L. da Silva, eds. *Soja: suas aplicações*. São Paulo, Brasil: MDSI Editora Médica e Científica Ltda., p. 259.
- Footitt, S. et al., 2002. Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis homologue of human ALDP. *EMBO Journal*, 21(12), pp.2912–2922.
- Förster, J. et al., 2003. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome research*, 13(2), pp.244–53.
- Garsed, S.G. & Read, D.J., 1977a. Sulphur Dioxide Metabolism in Soy-Bean, *Glycine max* var. Biloxi. I. The Effects of Light and Dark on the Uptake and Translocation of $^{35}\text{SO}_2$. *New Phytologist*, 78(1), pp.111–119.
- Garsed, S.G. & Read, D.J., 1977b. Sulphur Dioxide Metabolism in Soy-Bean, *Glycine max* var. Biloxi. II. Biochemical Distribution of $^{35}\text{SO}_2$ Products. *New Phytologist*, 79(3), pp.583–592.
- Gaupels, F., Knauer, T. & van Bel, A.J.E., 2008. A combinatory approach for analysis of protein sets in barley sieve-tube samples using EDTA-facilitated exudation and aphid stylectomy. *Journal of plant physiology*, 165(1), pp.95–103.
- Gitzelmann, R. & Auricchio, S., 1965. The handling of soya alpha-galactosides by a normal and a galactosemic child. *Pediatrics*, 36(2), pp.231–235.
- Grafahrend-Belau, E. et al., 2014. Flux balance analysis as an alternative method to estimate fluxes without labeling. In M. Dieuaide-Noubhani & A. P. Alonso, eds. *Plant Metabolic Flux Analysis*. London: Humana Press, p. 365.
- Grafahrend-Belau, E. et al., 2009. Flux balance analysis of barley seeds: a computational approach to study systemic properties of central metabolism. *Plant physiology*, 149(1), pp.585–98.
- Grafahrend-Belau, E. et al., 2013. Multiscale metabolic modeling: dynamic flux balance analysis on a whole-plant scale. *Plant physiology*, 163(2), pp.637–47.
- Graham, I. a, 2008. Seed storage oil mobilization. *Annual review of plant biology*, 59, pp.115–142.
- Grant, D. & Shoemaker, R., 2006. SoyBase and the soybean breeder's toolbox. *USDA-ARS, Wachington, DC*.
- Greenfield, H. & Southgate, D., 2003. *Food composition data: Production, Management and use* Second Edi. B. Nurlingame & U. Charrondiere, eds., Rome: FAO.

- Gurusinghe, S. & Bradford, K.J., 2001. Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. *Seed Science Research*, 11(02), pp.121–134.
- Hadley, H. & Hymowitz, T., 1973. Speciation and Cytogenetics. In B. Caldwell, ed. *Soybeans: improvement, production and uses I*. Madison: American Society of Agronomy, pp. 97–116.
- Halmer, P., 1985. The mobilization of storage carbohydrates in germinated seeds. *Physiologie végétale*, 23, pp.107–125.
- Harwood, J.L., 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1301(1-2), pp.7–56.
- Housley, T.L., Peterson, D.M. & Schrader, L.E., 1977. Long Distance Translocation of Sucrose, Serine, Leucine, Lysine, and Carbon Dioxide Assimilates: II. Oats. *Plant physiology*, 59(2), pp.221–224.
- Hsu, S.H., Hadley, H.H. & Hymowitz, T., 1973. Changes in Carbohydrate Contents of Germinating Soybean Seeds I. *Crop Science*, 13(4), p.407.
- Hymowitz, T., 1970. On the domestication of the soybean. *Economic Botany*, 23, pp.408–421.
- Jackson, S.A. et al., 2006. Toward a Reference Sequence of the Soybean Genome : A Multiagency Effort. *Crop Science Society of America*, 46(1), pp.55–61.
- Jankowski, M.D. et al., 2008. Group contribution method for thermodynamic analysis of complex metabolic networks. *Biophysical journal*, 95(3), pp.1487–99.
- Joshi, A.C. et al., 1973. Distribution of fatty acids during germination of soybean seeds. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 50(8), pp.282–283.
- Kitajima, K., 1996. Ecophysiology of tropical tree seedlings. In S. Mukley, R. Chazdon, & A. Smith, eds. *Tropical forest plant ecophysiology*. New York: Chapman & Hall, pp. 559–596.
- Kjeldahl, J., 1883. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen. *Journal of Analytical Chemistry*, pp.366–382.
- Kleessen, S. et al., 2012. Model-based confirmation of alternative substrates of mitochondrial electron transport chain. *The Journal of biological chemistry*, 287(14), pp.11122–31.
- Knoop, H. et al., 2010. The metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803: systemic properties of autotrophic growth. *Plant physiology*, 154(1), pp.410–22.
- Koizumi, M. & Kano, H., 2014. Water entry in dry soybeans at imbibition observed by dedicated micro-magnetic resonance imaging. *American Journal of Biology and Life Sciences*, 2(1), pp.6–11.

- Komor, E. et al., 1996. Phloem loading--not metaphysical, only complex: towards a unified model of phloem loading. *Journal of experimental botany*, 47 Spec No(August), pp.1155–1164.
- Koster, K.L., 1991. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant physiology*, 96(1), pp.302–4.
- Kruger, N. & Ratcliffe, G., 2008. Metabolic organization in plants: a challenge for the metabolic engineer. In H. Bohnert, H. Nguyen, & N. Lewis, eds. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology, Volume 1: Bioengineering and Molecular Biology of Plant Pathways*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, pp. 1–27.
- Kuo, T.M., Doehlert, D.C. & Crawford, C.G., 1990. Sugar metabolism in germinating soybean seeds: evidence for the sorbitol pathway in soybean axes. *Plant physiology*, 93(4), pp.1514–20.
- Kuo, T.M., VanMiddlesworth, J.F. & Wolf, W.J., 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(1), pp.32–36.
- Labouriau, L., 1983. *A germinação das sementes*, Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos.
- Lalonde, S. et al., 2003. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell and Environment*, 26(1), pp.37–56.
- Lalonde, S., Wipf, D. & Frommer, W.B., 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual review of plant biology*, 55, pp.341–72.
- Laurens, L.M.L. et al., 2012. Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(1), pp.167–78.
- Levan, N.A., Goggi, A.S. & Mullen, R. 2008. Improving the reproducibility of soybean standard germination test. *Crop Science*, 48, pp. 1933-40.
- Libourel, I.G.L. & Shachar-Hill, Y., 2008. Metabolic flux analysis in plants: from intelligent design to rational engineering. *Annual review of plant biology*, 59, pp.625–50.
- Linka, N. & Weber, A.P.M., 2010. Intracellular metabolite transporters in plants. *Molecular plant*, 3(1), pp.21–53.
- Lisec, J. et al., 2006. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1(1), pp.387–396.
- Madore, M.A., 2011. Biosynthesis and Degradation of Galactosyloligosaccharides. In B. O. F. et Al., ed. *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology I-III*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1661–1691.

- Marcos Filho, J., Godoy, O. & Câmara, G., 1982. Tecnologia da produção. In G. Câmara, ed. *Produção, pré-processamento e transformação agroindustrial1*. São paulo: Secretaria de Industria, Comércio, Ciência e Tecnologia, pp. 1–39.
- McCleary, B.V. & Matheson, N.K., 1974. α -d-Galactosidase activity and galactomannan and galactosylsucrose oligosaccharide depletion in germinating legume seeds. *Phytochemistry*, 13(9), pp.1747–1757.
- McDonald, M.B., Vertucci, C.W. & Roos, E.E., 1988. Soybean Seed Imbibition: Water Absorption by Seed Parts. *Crop Science*, 28(6), p.993.
- Melo, F.P. et al., 2004. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. In A. Ferreira & F. Borghetti, eds. *Germinação do básico ao aplicado2*. Porto Alegre: Artmed, p. 323.
- Meyer, C.J., Steudle, E. & Peterson, C. a., 2007. Patterns and kinetics of water uptake by soybean seeds. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), pp.717–732.
- Millhouse, J., Wiskich, J. & Beevers, H., 1983. Metabolite Oxidation and Transport in Mitochondria of Endosperm From Germinating Castor Bean. *Australian Journal of Plant Physiology*, 10(2), p.167.
- Montagud, A. et al., 2010. Reconstruction and analysis of genome-scale metabolic model of a photosynthetic bacterium. *BMC systems biology*, 4, p.156.
- Morais, Á.A. & Silva, A.L., 1996. Composição. In Á. A. Morais & A. L. Silva, eds. *Soja: suas aplicações*. Rio de Janeiro: MDSI Editora Médica e Científica Ltda., p. 259.
- Moreira, J. et al., 2010. Cultivar de soja BRS 313: Indicação de cultivo para o Oeste da Bahia. In *Resumos do XXXI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil*. pp. 301–302.
- Moreira, M., 1999. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. In *Anais Congresso Brasileiro de Soja*. Londrina: Embrapa - SPI, pp. 99–104.
- Morse, W.J., 1950. History of soybean production. In K. Markley, ed. *Soybeans and soybean products*. New York: Interscience Publishers Inc., pp. 3–59.
- Mostafa, M., Rahma, E. & Rady, A., 1987. Chemical and nutritional changes in soybean during germination. *Food Chemistry*, 23(4), pp.257–275.
- Muller, L., 1981. Taxionomia e morfologia. In S. Miyasaka & J. C. Medina, eds. *A soja no Brasil*. Campinas, SP: ITAL, p. 192.
- Nagata, T., 1959. Studies on the differentiation of soybeans in the world with special regard to that of Southeast Asia. *Proceedings of the Crop Science Society of Japan*, 28, pp.79–82.

- Nielsen, N., 1996. Soybean seed composition. In D. Verma & R. Shoemaker, eds. *Soybean: genetics, molecular biology and biotechnology*. Willingford, UK: CAB International, p. 270.
- Obendorf, R.L. et al., 2008. Imbibitional Chilling Sensitivity and Soluble Carbohydrate Composition of Low Raffinose, Low Stachyose Soybean Seed. *Crop Science*, 48(6), p.2396.
- Osborne, T.B., 1924. *The vegetable protein* 2nd ed., London: Longmans, Green and Co.
- Peterbauer, T. & Richter, A., 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research*, 11(03), pp.185–197.
- Piper, E.L. & Boote, K.I., 1999. Temperature and cultivar effects on soybean seed oil and protein concentrations. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(10), pp.1233–1241.
- Poolman, M.G. et al., 2009. A genome-scale metabolic model of Arabidopsis and some of its properties. *Plant physiology*, 151(3), pp.1570–81.
- Poolman, M.G., 2006. ScrumPy: metabolic modelling with Python. *Systems biology*, 153(5), pp.375–378.
- Praxedes, S.C. et al., 2006. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 56(3), pp.263–273.
- Radrich, K. et al., 2010. Integration of metabolic databases for the reconstruction of genome-scale metabolic networks. *BMC systems biology*, 4(1), p.114.
- Raymond, P. et al., 1992. Peroxisomal β -oxidation of fatty acids and citrate formation by a particulate fraction from early germinating sunflower seeds. *Plant physiology and biochemistry*, 30(2), pp.153–161.
- Reid, J.S., 1971. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosae). *Planta*, 100(2), pp.131–42.
- Rocha, R.S., 2009. Avaliação de variedades e linhagens de soja em condições de baixa latitude. , p.59.
- Rolletschek, H. et al., 2011. Combined noninvasive imaging and modeling approaches reveal metabolic compartmentation in the barley endosperm. *The Plant cell*, 23(8), pp.3041–54.
- Rotundo, J.L. & Westgate, M.E., 2009. Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. *Field Crops Research*, 110(2), pp.147–156.
- Saha, R., Suthers, P.F. & Maranas, C.D., 2011. *Zea mays* irs1563: A comprehensive genome-scale metabolic reconstruction of maize metabolism. *PLoS ONE*, 6(7).

- Salon, C., Raymond, P. & Pradet, A., 1988. Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *The Journal of biological chemistry*, 263(25), pp.12278–87.
- Sangronis, E. & Machado, C.J., 2007. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), pp.116–120.
- Santos, H. & Buckeridge, M.S., 2004. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Annals of botany*, 94(6), pp.819–30.
- Santos, O., 1988. *A cultura da soja: Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná*, Editora Globo.
- Schopfer, P., 2006. Biomechanics of plant growth. *American Journal of Botany*, 93(10), pp.1415–1425.
- Schwender, J., Shachar-Hill, Y. & Ohlrogge, J.B., 2006. Mitochondrial metabolism in developing embryos of *Brassica napus*. *The Journal of biological chemistry*, 281(45), pp.34040–7.
- Servaites, J.C., Schrader, L.E. & Jung, D.M., 1979. Energy-dependent Loading of Amino Acids and Sucrose into the Phloem of Soybean. *Plant physiology*, 64(4), pp.546–550.
- Silva, D.J. et al., 2003. Translocação e redistribuição de enxofre em plantas de milho e de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(6), pp.715–721.
- Sosulski, F.W. & Imafidon, G.I., 1990. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(6), pp.1351–1356.
- Spears, J.F., Tekrony, D.M. & Egli, D.B., 1997. Temperature during seed filling and soybean seed germination and vigour. *Seed science and technology*, 25(2), pp.233–244.
- Sriram, G., González-Rivera, O. & Shanks, J. V, 2006. Determination of biomass composition of *Catharanthus roseus* hairy roots for metabolic flux analysis. *Biotechnology progress*, 22(6), pp.1659–63.
- Stepansky, A. & Galili, G., 2003. Synthesis of the Arabidopsis bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase enzyme of lysine catabolism is concertedly regulated by metabolic and stress-associated signals. *Plant physiology*, 133(3), pp.1407–15.
- Sweetlove, L.J. & Ratcliffe, R.G., 2011. Flux-balance modeling of plant metabolism. *Frontiers in plant science*, 2(August), p.38.
- Tetyuk, O., Benning, U.F. & Hoffmann-Benning, S., 2013. Collection and analysis of Arabidopsis phloem exudates using the EDTA-facilitated Method. *Journal of visualized experiments*, (80), p.e51111.

- Thomas, J.M.G. et al., 2003. Elevated Temperature and Carbon Dioxide Effects on Soybean Seed Composition and Transcript Abundance. *Crop Science*, 43(4), p.1548.
- Thorne, J.H., 1982. Characterization of the Active Sucrose Transport System of Immature Soybean Embryos. *PLANT PHYSIOLOGY*, 70(4), pp.953–958.
- Tiné, M.A., 1997. *Mobilização de xiloglucano de reserva em sementes de Hymenaea courbaril (L.)*. UNICAMP.
- Toh, S. et al., 2008. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in Arabidopsis seeds. *Plant physiology*, 146(3), pp.1368–85.
- USDA, 2013. Economic Data on Food, Agriculture, and the Rural Economy.
- Villela, F.A., 1998. Water relations in seed biology. *Scientia Agricola*, 55(spe), pp.98–101.
- Weber, F., Moreira, J. & Pipolo, A., 2010. BRS 313 Tieta: Indicação de cultivo como ferramenta para manejo de mofo branco no oeste da Bahia. *Fundacaoba.Com.Br*, (Tabela 3), pp.2009–2011.
- Webster, B.D. & Leopold, A.C., 1977. The ultrastructure of dry and imbibed cotyledons of soybean. *American Journal of Botany (USA)*.
- Weise, A. et al., 2000. A New Subfamily of Sucrose Transporters, SUT4, with Low Affinity/High Capacity Localized in Eucleate Sieve Elements of Plants. *THE PLANT CELL ONLINE*, 12(8), pp.1345–1356.
- Williams, L., 1950. Structure and genetic characteristics of the soybean. In K. Markley, ed. *Soybeans and soybean products*. New York, USA: Interscience Publishers Inc., p. 540.
- Williams, T.C.R. et al., 2010. A genome-scale metabolic model accurately predicts fluxes in central carbon metabolism under stress conditions. *Plant physiology*, 154(1), pp.311–23.
- Yazdi-Samadi, B., Rinne, R.W. & Seif, R.D., 1977. Components of Developing Soybean Seeds: Oil, Protein, Sugars, Starch, Organic Acids, and Amino Acids¹. *Agronomy Journal*, 69(3), p.481.
- Ziegler, P., 1995. Carbohydrate degradation during germination. In J. Kigel & G. Galili, eds. *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, pp. 447–474.

ANEXO I – Tabela de Composição de Aminoácidos das Proteínas de Soja

TABELA 3. Composição em aminoácidos das proteínas das cultivares de soja estudadas e do padrão da FAO (1985).

Aminoácidos	FAO (g/100 g de proteína)			Cultivares (g/100 g de proteína)					
	2-5 anos	10-12 anos	Adulto	IAS-4	EMBRAPA-4	Davis	BR-16	Iguaçu	IAS-5
Essenciais									
Histidina	1,9	1,9	1,6	1,9	1,8	1,9	2,0	2,4	2,4
Isoleucina	2,8	2,8	1,3	4,1	3,5	3,8	3,7	4,1	4,0
Leucina	6,6	4,4	1,9	7,8	7,1	7,4	7,3	7,8	7,9
Lisina	5,8	4,4	1,6	6,4	5,6	5,8	6,0	6,8	6,9
Metionina	-	-	-	1,3	1,2	1,3	1,3	1,4	1,3
Cisteína	-	-	-	2,5	2,0	2,5	2,2	2,4	2,3
Sulfurados (Met + Cys)	2,5	2,2	1,7	3,8	3,2	3,8	3,5	3,8	3,6
Fenilalanina	-	-	-	6,2	6,1	6,2	6,0	6,5	6,7
Tirosina	-	-	-	3,2	3,0	3,3	3,1	3,4	3,5
Aromáticos (Phe + Tyr)	6,3	2,2	1,9	9,4	9,1	9,5	9,1	9,9	10,2
Treonina	3,4	2,8	0,9	3,9	3,5	3,9	3,8	4,0	4,1
Triptofano	1,1	0,9	0,5	1,7	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5
Valina	3,5	2,5	1,3	4,1	4,1	4,3	4,1	4,6	4,4
Total AAE ¹	33,9	24,1	12,7	43,1	39,5	41,9	41,1	44,9	45,0
Não essenciais									
Arginina	-	-	-	7,4	7,4	6,8	6,8	7,3	7,2
Alanina	-	-	-	4,3	3,8	4,0	3,9	4,2	4,4
Ácido aspártico	-	-	-	12,8	13,1	14,2	13,7	14,6	14,7
Ácido glutâmico	-	-	-	18,3	20,9	22,1	20,7	23,6	23,3
Glicina	-	-	-	3,7	3,6	3,6	3,4	3,8	3,9
Prolina	-	-	-	8,3	7,5	7,9	7,6	8,0	8,7
Serina	-	-	-	5,3	4,8	5,2	5,0	5,5	5,0

¹ Aminoácidos essenciais.

Tabela retirada de Vieira et. al (1999), utilizada para o cálculo das estequiometrias dos AAs na síntese e degradação das proteínas pelo modelo de balanço de fluxos. O cultivar selecionado foi EMBRAPA-4 por apresentar características semelhantes à variedade estudada.

Vieira, C.R., Cabral, L.C. & Paula, A.C.O. de, 1999. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 34(7), pp.1277–1283.

ANEXO II – Tabela de Composição de Açúcares de Parede Celular de Soja

Table 1. Yield and Composition of Soybean Meal and Fractions (Percent Weight)^a

fraction ^a	soybean hulls		dehulled SBM			
	WSh	WUh	SBM	WSc	WUc	WUS
yield (%)	16.7	83.3	100	56.0	44.0	13.9
crude protein	26.0	10.7	53.9	57.2	49.6	5.2
crude fat	0.3	0.4	0.7	0.4	1.0	1.5
ash	12.8	2.6	6.9	10.5	2.4	2.9
total monosaccharides	37.2	63.5	24.9	17.9	37.5	90.3
sugar composition						
rhamnose	2.8	3.3	2.6	2.2	5.5	3.6
fucose	0.2	0.5	1.3	0	2.1	2.1
arabinose	3.7	7.3	10.4	1.8	13.3	13.3
xylose	1.3	12.6	4.3	0	5.9	5.9
mannose	36.2	4.5	3.5	5.1	2.2	1.5
galactose	20.4	3.0	31.9	39.6	29.6	28.1
glucose	26.9	66.3	37.7	49.4	28.2	27.8
uronic acids	8.4	2.6	8.2	1.8	13.2	17.6

^a Sugar composition expressed as percent mole.

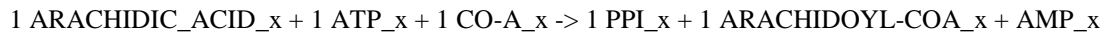
Tabela retirada de Ouhida et. al (2002), utilizada para o cálculo das estequiometrias dos açúcares na síntese e degradação de parede celular pelo modelo de balanço de fluxos. A coluna utilizada foi a WUc, que corresponde ao resíduo insolúvel remanescente após a extração dos compostos solúveis.

Ouhida, I., Pérez, J.F. & Gasa, J., 2002. Soybean (*Glycine max*) cell wall composition and availability to feed enzymes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7), pp.1933–8.

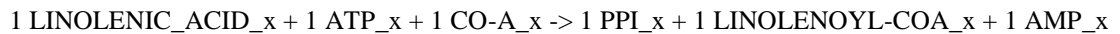
ANEXO III – Relação das Reações Modificadas e Adicionadas ao Modelo

Ativação de Ácidos Graxos:

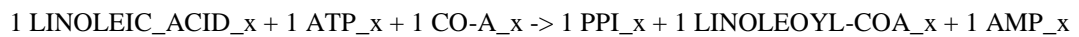
Arachidate_ACT_x:



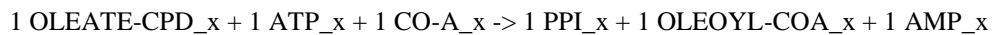
α -Linolenate_ACT_x:



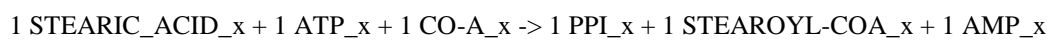
Linoleate_ACT_x:



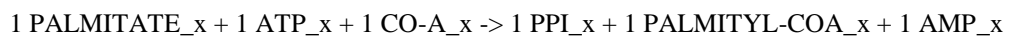
Oleate_ACT_x:



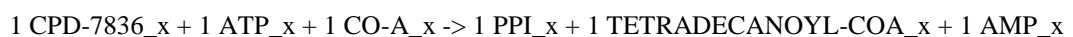
Stearate_ACT_x:



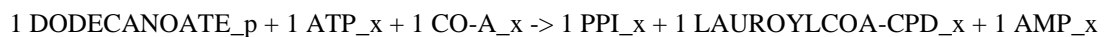
Palmitate_ACT_x:



Myristate_ACT_x:

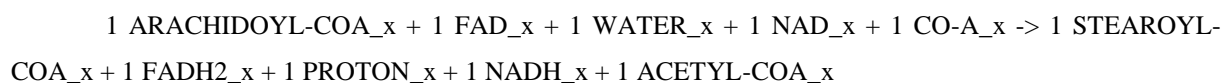


Dodecanoate_ACT_x:

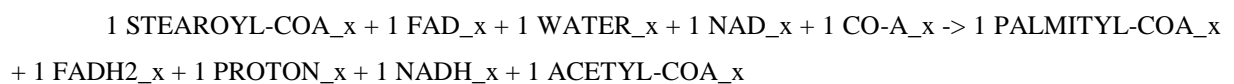


β -Oxidação dos Ácidos Graxos Saturados:

Arachidoyl-CoA_oxi_x:



Stearoyl-CoA_oxi_x:



Palmityl-CoA_oxi_x:

1 PALMITYL-COA_x + 1 FAD_x + 1 WATER_x + 1 NAD_x + 1 CO-A_x -> 1 TETRADECANOYL-COA_x + 1 FADH2_x + 1 PROTON_x + 1 NADH_x + 1 ACETYL-COA_x

Tetradecanoyl-CoA_oxi_x:

1 TETRADECANOYL-COA_x + 6 FAD_x + 6 WATER_x + 6 NAD_x + 6 CO-A_x -> 6 FADH2_x + 6 PROTON_x + 6 NADH_x + 7 ACETYL-COA_x

Lauroyl-CoA_oxi_x:

1 LAUROYLCOA-CPD_x + 5 FAD_x + 5 WATER_x + 5 NAD_x + 5 CO-A_x -> 5 FADH2_x + 5 PROTON_x + 5 NADH_x + 6 ACETYL-COA_x

B-Oxidação de Graxos Insaturados:

Linolenoyl-CoA_oxi_x:

1 LINOLENOYL-COA_x + 3 NADPH_x + 8 WATER_x + 8 NAD_x + 8 CO-A_x -> 3 NADP_x + 8 PROTON_x + 8 NADH_x + 9 ACETYL-COA_x

Linoleoyl-CoA_oxi_x:

1 LINOLEOYL-COA_x + 2 NADPH_x + 8 WATER_x + 8 NAD_x + 8 CO-A_x -> 2 NADP_x + 8 PROTON_x + 8 NADH_x + 9 ACETYL-COA_x

Oleoyl-CoA_oxi_x:

1 OLEOYL-COA_x + 1 NADPH_x + 8 WATER_x + 8 NAD_x + 8 CO-A_x -> 1 NADP_x + 8 PROTON_x + 8 NADH_x + 9 ACETYL-COA_x

Biossíntese de Ácidos Graxos:

Stearate_ACT_c:

1 STEARIC_ACID_c + 1 ATP_c + 1 CO-A_c -> 1 PPI_c + 1 STEAROYL-COA_c + 1 AMP_c

ACETYL-COA-CARBOXYLTRANSFER-RXN_c:

1 HCO3_c + 1 ATP_c + 1 ACETYL-COA_c -> 1 PROTON_c + 1 Pi_c + 1 ADP_c + 1 MALONYL-COA_c

3KETOACYLCOA-synthase_c:

1 STEAROYL-COA_c + 1 MALONYL-COA_c -> 1 3KETOSTEAROYL-COA_c + 1 CARBON-DIOXIDE_c + 1 CO-A_c

3KETOACYLCOA-reductase_c:

1 3KETOSTEAROYL-COA_c + 1 PROTON_c + 1 NADPH_c -> 1 R-3-hydroxystearoyl-COA_c + 1 NADP_c

3-hydroxyacyl-CoA-dehydratase_c:

1 R-3-hydroxystearoyl-COA_c -> 1 WATER_c + 1 Trans-2-dehydrostearoyl-COA_c

Trans-2-enoyl-CoA-reductase_c:

1 Trans-2-dehydrostearoyl-COA_c + 1 PROTON_c + NADPH_c -> 1 ARACHIDOYL-COA_c + 1 NADP_c

Arachidoyl-COA-HYDROLASE-RXN_c:

1 ARACHIDOYL-COA_c + 1 WATER_c -> 1 ARACHIDIC_ACID_c + 1 CO-A_c

Linoleoyl-ACP-desaturase_p:

1 Oleoyl-ACPs_p + 2 Reduced-ferredoxins_p + 1 OXYGEN-MOLECULE_p -> 2 WATER_p + 1 Linoleoyl-ACPs_p + 2 Oxidized-ferredoxins_p

Linoleoyl-ACP-hydrolase_p:

1 Linoleoyl-ACPs_p + 1 WATER_p -> 1 ACP_p + 1 LINOLEIC_ACID_p

α-Linolenoyl-ACP-desaturase_p:

1 Linoleoyl-ACPs_p + 2 Reduced-ferredoxins_p + 1 OXYGEN-MOLECULE_p -> 2 WATER_p + 1 Linolenoyl-ACPs_p + 2 Oxidized-ferredoxins_p

α-Linolenoyl-ACP-hydrolase_p:

1 Linolenoyl-ACPs_p + 1 WATER_p -> 1 ACP_p + 1 LINOLENIC_ACID_p

Síntese e Degradação de Proteínas

PROTEIN-SYNTHASE_c:

0.000116 pHis + 0.000267 pIle + 0.000541 pLeu + 0.000383 pLys + 0.000080 pMet + 0.000165 pCys + 0.000369 pPhe + 0.000166 pTyr + 0.000294 pThr + 0.000078 pTrp + 0.000350 pVal + 0.000425 pArg + 0.000427 pAla + 0.000492 pAsp + 0.000496 pAsn + 0.000710 pGlu + 0.000715 pGln + 0.000480 pGly + 0.000651 pPro + 0.000457 pSer -> 1 PROTEIN_c

PROTEIN-HYDROLYSIS_c:

1 PROTEIN_c -> 0.000116 HIS_c + 0.000267 ILE_c + 0.000541 LEU_c + 0.000383 LYS_c + 0.000080 MET_c + 0.000165 CYS_c + 0.000369 PHE_c + 0.000166 TYR_c + 0.000294 THR_c + 0.000078 TRP_c + 0.000350 VAL_c + 0.000425 ARG_c + 0.000427 L-ALPHA-ALANINE_c + 0.000492 L-ASPARTATE_c + 0.000496 ASN_c + 0.000710 GLT_c + 0.000715 GLN_c + 0.000480 GLY_c + 0.000651 PRO_c + 0.000457 SER_c

Síntese e Degradação de Parede Celular

CELLWALL-SYNTHESIS_c:

0.055 UDP-L-RHAMNOSE_c + 0.021 GUANOSINE_DIPHOSPHATE_FUCOSE_c + 0.133 UDP-L-ARABINOSE_c + 0.059 UDP-D-XYLOSE_c + 0.022 GDP-MANNOSE_c + 0.292 UDP-GALACTOSE_c + 0.282 UDP-GLUCOSE_c + 0.132 UDP-D-GALACTURONATE_c -> 1 CELLWALL_c + 0.953 UDP_c + 0.043 GDP_c

CELLWALL-HYDROLYSIS_c:

1 CELLWALL_c -> 0.055 RHAMNOSE_c + 0.021 D-FUCOSE_c + 0.133 L-ARABINOSE_c + 0.059 XYLOSE_c + 0.022 MANNOSE_c + 0.292 GALACTOSE_c + 0.282 GLC_c + 0.132 CPD-12523_c

Reações de Transporte

Arachidate_biomass:

1 x_ARACHIDIC_ACID <> 1 ARACHIDIC_ACID_c

α-Linolenate_biomass:

1 x_LINOLENIC_ACID <> 1 LINOLENIC_ACID_c

Linoleate_biomass:

1 x_LINOLEIC_ACID <> 1 LINOLEIC_ACID_c

Oleate_biomass:

1 x_OLEIC_ACID <> 1 OLEATE-CPD_c

Stearate_biomass:

1 x_STEARIC_ACID <> 1 STEARIC_ACID_c

Palmitate_biomass:

1 x_PALMITATE <> 1 PALMITATE_c

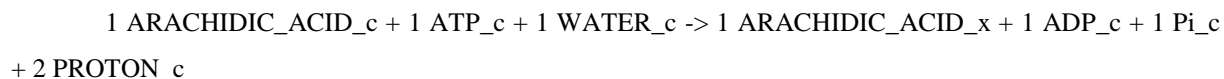
Myristate_biomass:



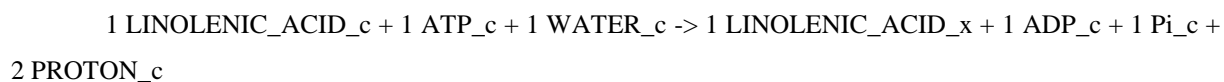
Dodecanoate_biomass:



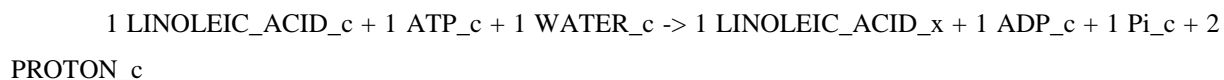
ARACHIDIC_ACID_cx:



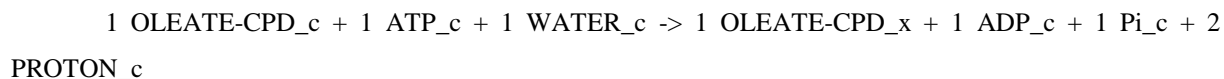
LINOLENIC_ACID_cx:



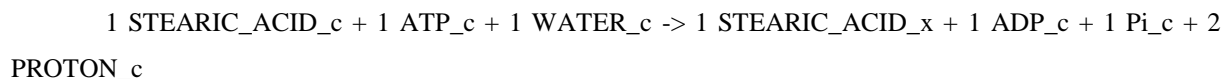
LINOLEIC_ACID_cx:



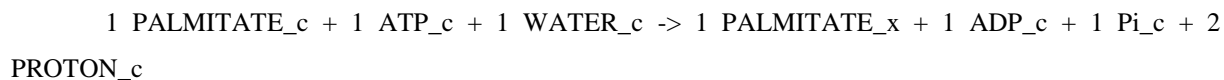
OLEATE_CPD_cx:



STEARIC_ACID_cx:



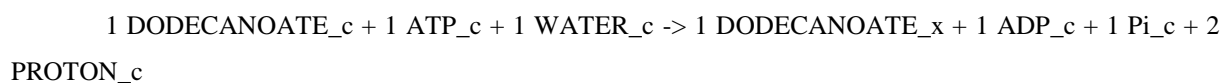
PALMITATE_cx:



CPD-7836_cx:



DODECANOATE_cx:



HYDROXYPHNYL-TRANS_pc:

1 P-HYDROXY-PHENYLPYRUVATE_p <> 1 P-HYDROXY-PHENYLPYRUVATE_c

2KETOBUTYRYL-TRANS_cm:

1 3-KETOBUTYRATE_c <> 1 3-KETOBUTYRATE_m

2OXOBUT-TRANS_pc:

1 2-OXOBUTANOATE_p <> 1 2-OXOBUTANOATE_c

2OXOBUT-TRANS_cm:

1 2-OXOBUTANOATE_c <> 1 2-OXOBUTANOATE_m

Protein_biomass:

1 x_PROTEIN <> 1 PROTEIN_c

Raffinose_biomass:

1 x_RAFFINOSE <> 1 CPD-1099_c

Stachyose_biomass:

1 x_STACHYOSE <> 1 CPD-170_c

Verbascose_biomass:

1 x_VERBASCOSSE <> 1 CPD-8065_c

Maltose_biomass:

1 x_MALTOSE <> 1 MALTOSE_c

RHAMNOSE_biomass:

1 x_RHAMNOSE <> 1 RHAMNOSE_c

FUCOSE_biomass:

1 x_FUCOSE <> 1 D-FUCOSE_c

Cellwall_biomass:

1 x_CELLWALL <> 1 CELLWALL_c

Galacturonate_biomass:

1 x_GALACTURONATE <> 1 CPD-12523_c

Dodecanoate_pc:



Stearate_pc:



Oleate_pc:



Linoleate_pc:



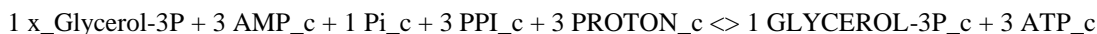
α -Linolenate_pc:



Myristate_pc:

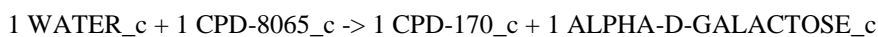


Glycerol-3P_biomass:

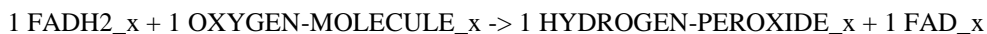


Outras Reações

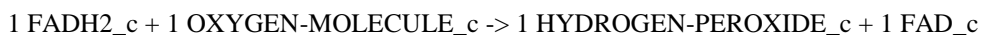
Verbascose-Degradation_c:



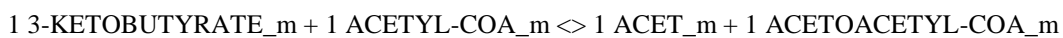
FAD_reg_x:



FAD_reg_c:



ACTCOA_m:



HYDROXYMETHYLGLUTARYL-COA-LYASE-RXN_m:



ACETYL-COA-ACETYLTRANSFER-RXN_m:

1 ACETOACETYL-COA_m + 1 CO-A_m <> 2 ACETYL-COA_m

2-MEBUCOA-ETF-RXN_m:

1 ETF-Oxidized_m + 1 2-METHYL-BUTYRYL-COA_m -> 1 ETF-Reduced_m + 1 CPD-1083_m

MEPROPCOA-ETF-RXN_m:

1 ISOBUTYRYL-COA_m + 1 ETF-Oxidized_m -> 1 METHACRYLYL-COA_m + 1 ETF-Reduced_m

PROLINE-DEHYDROGENASE_m:

1 ETF-Oxidized_m + 1 PRO_m -> 1 ETF-Reduced_m + 1 L-DELTA1-PYRROLINE_5-CARBOXYLATE_m + 1 PROTON_m

PROPIONYLCOA-CARBOXYLASE_m:

1 PROPIONYL-COA_m + 1 CARBON-DIOXIDE_m <> 1 D-METHYL-MALONYL-COA_m

METHYLMALONYLCOA-RACEMASE_m:

1 D-METHYL-MALONYL-COA_m <> 1 METHYL-MALONYL-COA_m

METHYLMALONYLCOA-MUTASE_m:

1 METHYL-MALONYL-COA_m <> 1 SUC-COA_m

RXN-15129_c:

1 CYS_c -> 1 PROTON_c + 1 2-AMINOACRYLATE_c + 1 HS_c

1.2.7.1-Pyruvic-ferredoxin-oxidoreductase_m:

1 2-OXOBUTANOATE_m + 1 CO-A_m + 2 NAD_m -> 1 PROPIONYL-COA_m + 1 CARBON-DIOXIDE_m + 2 NADH_m + 1 PROTON_m

Reações Modificadas

Glycerol_biomass:

1 x_Glycerol <> 1 GLYCEROL_c

pTYR_biomass:

1 pTYR + 1 TYR-tRNAs_c <> 1 Charged-TYR-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pGLU_biomass:

1 pGLU + 1 GLT-tRNAs_c <> 1 Charged-GLT-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pLYS_biomass:

1 pLYS + 1 LYS-tRNAs_c <> 1 Charged-LYS-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pVAL_biomass:

1 pVAL + 1 VAL-tRNAs_c <> 1 Charged-VAL-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pPHE_biomass:

1 pPHE + 1 PHE-tRNAs_c <> 1 Charged-PHE-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pGLN_biomass:

1 pGLN + 1 GLN-tRNAs_c <> 1 Charged-GLN-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pTHR_biomass:

1 pTHR + 1 THR-tRNAs_c <> 1 Charged-THR-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pMET_biomass:

1 pMET + 1 MET-tRNAs_c <> 1 Charged-MET-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pTRP_biomass:

1 pTRP + 1 TRP-tRNAs_c <> 1 Charged-TRP-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pSER_biomass:

1 pSER + 1 SER-tRNAs_c <> 1 Charged-SER-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pGLY_biomass:

1 pGLY + 1 GLY-tRNAs_c <> 1 Charged-GLY-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pHIS_biomass:

1 pHIS + 1 HIS-tRNAs_c <> 1 Charged-HIS-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pLEU_biomass:

1 pLEU + 1 LEU-tRNAs_c <> 1 Charged-LEU-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pCYS_biomass:

1 pCYS + 1 CYS-tRNAs_c <> 1 Charged-CYS-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pASP_biomass:

1 pASP + 1 ASP-tRNAs_c <> 1 Charged-ASP-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pILE_biomass:

1 pILE + 1 ILE-tRNAs_c <> 1 Charged-ILE-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pALA_biomass:

1 pALA + 1 ALA-tRNAs_c <> 1 Charged-ALA-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pASN_biomass:

1 pASN + 1 ASN-tRNAs_c <> 1 Charged-ASN-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pARG_biomass:

1 pARG + 1 ARG-tRNAs_c <> 1 Charged-ARG-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c

pPRO_biomass:

1 pPRO + 1 PRO-tRNAs_c \Leftrightarrow 1 Charged-PRO-tRNAs_c + 1 Protein-polymerisation-cost_c + 1 Protein-processing-cost_c + 1 Protein-tranlocation-cost_c