



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

**Influência da luz na mobilização de reservas durante o crescimento inicial
da soja (*Glycine max* (L.) Merr)**

Aluna: Karen Fernanda Oliveira e Silva

Orientador: Dr. Thomas Christopher Rhys Williams

Brasília, DF
Outubro/2018

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

KAREN FERNANDA OLIVEIRA E SILVA

INFLUÊNCIA DA LUZ NA MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE O
CRESCIMENTO INICIAL DA SOJA (*Glycine max* (L.) Merr)

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: Dr. Thomas Christopher Rhys Williams

Brasília, DF
Outubro/2018

AGRADECIMENTOS

Inicio agradecendo à Deus pelo dom da vida e por ser minha força em todos os momentos. Ao meu amado pai, Francisco, por acreditar em mim, por toda educação e por nunca me deixar desistir. À Fátima, minha Rainha, mamãe! Meu maior agradecimento. Por me dar todo o suporte, por acordar de madrugada para me ajudar nas coletas, por secar minhas lágrimas quando preciso, por sorrir e gargalhar comigo e por sempre me fazer acreditar em mim mesma. À minha querida irmã Gabriella, por ser a pessoa que mais me apoiou para entrar no mestrado e aposta todas as suas fichas em mim, me fazendo acreditar que eu sou capaz. Ao meu irmão Eduardo pelas maravilhosas conversas que fazem a vida mais leve. Aos meus amados cunhados, Érica e Rogério, por toda ajuda, força e carinho nessa caminhada. Aos meus sobrinhos, Victor Hugo e Theo, que me fazem esquecer todas as preocupações com apenas um sorriso.

Com toda minha gratidão, agradeço imensamente ao meu estimado orientador, Thomas Williams. Que aceitou me orientar durante esses anos de mestrado, que tanto me ensinou e com toda paciência nos transmite o conhecimento para encarar o desafio de tentar entender mais a fisiologia e a bioquímica vegetal. Obrigada por toda correção e conselhos no texto da dissertação, por sempre estar disposto a tirar dúvidas, pela disponibilidade em sempre ir ao laboratório nos ensinar e nos fazer melhores pesquisadores. Sem dúvida não teríamos orientação melhor, sei que falo por mim e meus colegas de laboratório, pois todos nós somos imensamente gratos por tê-lo como orientador. Foi incontestavelmente uma honra poder ser orientanda durante esse tempo!

Ao meu amor, Jorge. Por ser paciente e me acalmar nos meus momentos de desespero, por me apoiar e se orgulhar tanto de mim. Pelas longas conversas, gargalhadas e por dividir comigo momentos tão únicos e incríveis. Aos meus melhores amigos, Johny, Gabriel e Brian, por serem um porto seguro e sempre me encherem de alegria. Sou grata pela compreensão e apoio em todos os momentos. À minha melhor amiga, Katy, por sempre segurar minha mão e dizer “Vai dar certo, vamos conseguir”. Por ser meu ombro amigo quando eu preciso desabafar e por sempre me encorajar nos novos desafios.

Aos colegas e amigos que eu tive a enorme felicidade de conhecer através do mestrado, em especial: Carol, Rennan, Laísa e Lucas, dividir os dias no laboratório, os cafés na copa ou até mesmo as conversas nos corredores do departamento de Botânica me fizeram mais feliz e me deram forças nos dias difíceis. Aos amigos do laboratório de Bioquímica Vegetal, principalmente: Janderson, Guilherme, Isadora e Dagon, agradeço pelo

companheirismo e amizade ao longo desses anos. Ao Thiago Moreira por me ajudar em diversos protocolos, principalmente no HPLC. Sua ajuda foi fundamental! Ao Bruno Val, um agradecimento especial, por me ajudar nos experimentos. À Estela, que com toda sua doçura e paciência me ensinou e me ajudou com o protocolo de Aminoácidos Totais. À Patrícia, pela ajuda nas análises de Carbono e Nitrogênio.

Aos doutores: Marcelo Claro, Christina Vinson, Cristiane Ferreira, Sérgio Figueiredo e Marcelo Lattarulo, agradeço pelas dicas, correções no texto, sugestões e conselhos. Ao Eduardo Barbosa pela ajuda e correções na estatística. À Capes pela concessão da bolsa de estudos. À FAP-DF pelo financiamento da pesquisa. À Shancap Sementes, por gentilmente nos cederem as sementes de soja utilizadas no experimento. Ao Nuno do Laboratório de Química de Proteínas da UnB, pela ajuda na hidrólise das proteínas.

O mestrado foi sem dúvidas um dos maiores desafios que eu enfrentei até agora, e seria impossível ter conseguido sozinha. A todos os que acreditam em mim e me apoiam, meu muitíssimo obrigada! Aos que me encorajam a seguir no doutorado, espero tê-los juntos em mais um desafio. Agradeço a Deus por ter colocado pessoas tão extraordinárias em meu caminho. Gratidão!

“Mestre não é quem ensina, mas quem de repente aprende”

João Guimarães Rosa

Influência da luz na mobilização de reservas durante o crescimento inicial da soja

(Glycine max (L.) Merr)

RESUMO

O sucesso dos processos iniciais do desenvolvimento vegetal é influenciado por fatores ambientais e pelas reservas que garantem a manutenção da plântula. As principais reservas encontradas nas sementes são carboidratos, proteínas e lipídeos, que serão mobilizadas durante o desenvolvimento inicial até a plântula se tornar fotoautotrófica. A luz pode agir tanto como sinal na fotomorfogênese, assim como influencia também como fonte de energia para a fotossíntese na plântula. O objetivo desse estudo foi investigar como diferentes tratamentos de luminosidade influenciam na mobilização de reservas proteicas e no metabolismo de aminoácidos durante o crescimento inicial de soja. Sabendo da importância da soja no cenário econômico, assim como por ser uma espécie interessante para compreender processos iniciais por apresentar cotilédones com grandes reservas proteicas, torna-se relevante avaliar como as reservas das sementes são utilizadas para fornecer energia e precursores para biossíntese durante esse período inicial. As sementes de soja foram germinadas em sala de crescimento sob luminosidade de $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante sete dias, após esse período, as plântulas foram submetidas a três tratamentos: Luz Normal, Luz Baixa e Escuro, onde permaneceram por três dias. Foram realizadas análises bioquímicas, incluindo quantificação de aminoácidos livres totais por ninidrina, quantificação de carbono e nitrogênio total, e quantificação de aminoácidos por CLAE. As proporções de aminoácidos foram menores no tratamento de Luz Normal, enquanto as plântulas no Escuro apresentaram maiores quantidades de aminoácidos livres, sugerindo haver início da proteólise relacionada a falta de carbono quando as plântulas estão submetidas ao escuro. Ao observar a proporção de Nitrogênio Total nas plântulas foi possível perceber que os valores para quase todos os órgãos foram gradativamente aumentando do tratamento Luz para Luz Baixa e Escuro. Os resultados sugerem que durante os momentos de pouca luminosidade possa estar havendo uma maior degradação de proteínas e aumento da concentração de aminoácidos e o seu direcionamento para prover energia para os órgãos em crescimento.

Palavras-chave: fotomorfogênese, escotomorfogênese, aminoácido.

Influence of light on the mobilization of reserves during initial soybean growth (*Glycine max* (L.) Merr)

ABSTRACT

The success of the initial processes of plant development is influenced by environmental factors and by the reserves that the maintenance of the seedling. The main reserves found in the seeds are carbohydrates, proteins and lipids, which will be mobilized during the initial development until the moment when the seedlings become photoautotrophic. Light can act both as a signal in photomorphogenesis, as it also influences as a source of energy for photosynthesis in the seedling. The objective of this study was to investigate how different treatments of luminosity influence the mobilization of protein reserves and amino acid metabolism during initial soybean growth. Knowing the importance of soybean in the economic scenario, as well as the fact of it being an interesting species to understand initial processes, since it presents cotyledons with large protein reserves, it is relevant to evaluate how the seed reserves are used to provide energy and precursors for biosynthesis during this initial period. The soybean seeds were germinated under a $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of luminosity for seven days, after which the seedlings were submitted to three treatments: Normal Light, Low Light and Dark, where they remained for three days. Biochemical analyzes were performed, including quantification of total free amino acids by ninhydrin, quantification of carbon and total nitrogen, and quantification of amino acids by HPLC. The amino acid ratios were lower in the Normal Light treatment, while the seedlings in the Dark presented higher amounts of free amino acids, suggesting that the onset of proteolysis is related to the lack of carbon from when the seedlings were submitted to dark. Observing the proportion of Total Nitrogen in the seedlings, it was possible to perceive that the values for almost all organs were gradually increasing from the treatment Light to Low Light and Dark. The results suggest that during low light moments there may be an increasing protein degradation and an increasing amino acid concentration and its targeting to provide energy to growing organs.

Key words: photomorphogenesis, skotomorphogenesis, amino acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento Experimental dos tratamentos.....	27
Figura 2 - Estágio de desenvolvimento das plântulas ao se iniciar as coletas do experimento. Cotilédones abertos e primeiro par de folhas em expansão.....	28
Figura 3 - Horários das coletas das plântulas de soja em cada um dos tratamentos	29
Figura 4 – Partes da plântula de soja coletadas no experimento	30
Figura 5 - Diferenças morfológicas observadas nas plântulas de soja nos diferentes tratamentos do experimento	34
Figura 6 - Efeitos dos tratamentos de luminosidade sobre a massa fresca nos diferentes órgãos da plântula de soja coletadas em diferentes horas do dia	35
Figura 7 - Efeitos dos tratamentos de luminosidade sobre a massa seca nos diferentes órgãos da plântula de soja coletadas em diferentes horas do dia	36
Figura 8 - Efeitos dos tratamentos de luminosidade sobre Carbono Total nos diferentes órgãos da plântula de soja coletadas em diferentes horas do dia	38
Figura 9 - Efeitos dos tratamentos de luminosidade sobre Nitrogênio Total nos diferentes órgãos da plântula de soja coletadas em diferentes horas do dia	39
Figura 10 - Efeitos dos tratamentos de luminosidade sobre o total de nitrogênio nos diferentes órgãos da plântula de soja coletadas em diferentes horas do dia.....	40
Figura 11 - Efeitos dos tratamentos de luminosidade sobre Aminoácidos Totais Livres nos diferentes órgãos da plântula de soja coletadas em diferentes horas do dia.....	41
Figura 12 – Porcentagem de aminoácidos analisados por CLAE	44-48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos dos principais tipos de reservas encontrados em diferentes cultivares.....	17
Tabela 2 - Gradiente do método cromatográfico utilizado nas análises de CLAE.....	33
Tabela 3 - Porcentagem de massa seca nos diferentes tratamentos e órgãos da plântula de soja.....	37
Tabela 4 - Anexo 1 - Porcentagem de massa seca dos aminoácidos detectados por CLAE nos diferentes tratamentos e órgãos da plântula de soja.....	70

LISTA DE ABREVIACOES

AA – Aminoácidos
ABA – cido abscísico
ALA – Alanina
ANOVA – Análise de variância
ARG – Arginina
ASN – Asparagina
ASP – cido aspártico
ASPG – Asparaginase
AST – Aares solúveis totais
ATL – Aminoácidos totais livres
BCAAs – Aminoácidos de cadeia ramificada
CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência
ETF – Flavoprotena de transporte de elétrons
GA – cido giberélico
GLN – Glutamina
GLU – cido glutâmico
GLY – Glicina
HIS – Histidina
ILE – Isoleucina
LYS – Lisina
MF- Massa fresca
MS – Massa seca
N – Nitrogênio
PHE – Fenilalanina
PRPC – Polissacarídeo de reserva de parede celular
SER – Serina
TCA – Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TYR – Tirosina
VAL – Valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Germinação e Crescimento Inicial.....	15
2.2. Reservas e sua Mobilização.....	16
2.3. Influência da Luz na Germinação e no Crescimento inicial.....	18
2.4. Soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merr).....	21
3. JUSTIFICATIVA	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo Geral	24
4.2. Objetivos Específicos	24
5. HIPÓTESES	25
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
6.1. Material Vegetal.....	26
6.2. Crescimento Vegetal e Tratamentos.....	26
6.3. Coleta e Armazenamento do Material Vegetal.....	27
6.4. Análises Bioquímicas.....	31
6.4.1. Extração de Aminoácidos Livres.....	31
6.4.2. Quantificação de Aminoácidos por Ninidrina.....	31
6.4.3. Quantificação de Carbono e Nitrogênio Total.....	31
6.4.4. Quantificação de Aminoácidos por CLAE.....	32
6.5. Análises Estatísticas.....	33
7. RESULTADOS	34
7.1. Desenvolvimento de plântula.....	34
7.2. Biomassa.....	35
7.3. Carbono e Nitrogênio Total	38
7.4. Aminoácidos Totais Livres.....	41
7.5. Aminoácidos por CLAE	43
8. DISCUSSÃO	49
8.1. Crescimento da plântula e absorção de água	49
8.2. Distribuição de Carbono e Nitrogênio	51
8.3. Aminoácidos	53
8.3.1 Aminoácidos Totais	53

8.3.2	Aminoácidos por CLAE	55
9	CONCLUSÃO	61
10	PLANO DE PUBLICAÇÃO	62
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
12	ANEXO	70

1. INTRODUÇÃO

A germinação e o desenvolvimento das plântulas são processos importantes no ciclo de vida vegetal. O sucesso do crescimento inicial é influenciado por fatores ambientais e pelas reservas que garantem a manutenção da plântula, sendo essa fase heterotrófica crítica para o desenvolvimento e um momento em que há uma maior vulnerabilidade aos estresses do ambiente (Castro et al., 2004). Ao longo do desenvolvimento da plântula há formação do sistema radicular e a capacidade de se manter realizando fotossíntese (Melo et al., 2004; Castro et al., 2004). Durante o período inicial e crescimento, as estruturas da semente e do embrião proporcionam a nutrição necessária para o crescimento das plântulas (Kolchinski et al., 2006). As principais reservas encontradas nas sementes são carboidratos, proteínas e lipídeos, que serão mobilizadas durante o desenvolvimento inicial até a plântula se tornar autotrófica (Buckeridge et al., 2004, Henning et al., 2010).

Diversos fatores afetam a germinação e crescimento inicial, dentre eles a temperatura, luz, hormônios e disponibilidade de água (Borghetti, 2004; Han et al, 2013; Bewley & Black, 1994). A luz está entre os principais fatores que influenciam o desenvolvimento vegetal (Chory et al., 1996). Tanto a quantidade como a qualidade de luz que chega para as plantas pode influenciar no seu desenvolvimento (Melo et al, 2004). A presença de luz resulta na fotomorfogênese onde haverá uma condução da morfologia da plântula a realizar fotossíntese, enquanto o desenvolvimento no escuro resulta na escotomorfogênese, induzindo a planta a estiolar, tentando alcançar condições para se manter de forma autotrófica (Arnim & Deng, 1996). Plântulas em ambientes sombreados também podem apresentar características que demonstrem uma menor taxa fotossintética e conseqüentemente menor desenvolvimento (Su et al., 2014). A luz além de agir como sinal durante o desenvolvimento vegetal, é a fonte de energia para a fotossíntese na plântula (Brown & Hurber, 1987). A capacidade de realizar fotossíntese pode afetar tanto na proteólise de proteínas presentes nas plantas, assim como na mobilização de reservas (Brouquisse et al., 1998).

A soja (*Glycine Max* (L.) Merr) é uma leguminosa que teve origem no Oriente, e as suas sementes possuem grandes quantidade de proteínas, minerais e vitaminas, tendo grande importância para a alimentação humana na produção de farelos e óleos, assim como para alimentação animal. Pode também ser utilizada na produção de combustível, como o biodiesel (Hymowitz, 1970; Yin et al., 2014). As sementes de soja ao germinar apresentam cotilédones que em presença de luz se tornam verdes e, além de serem utilizados como fonte de nitrogênio e carbono através da degradação de reservas previamente estocadas, possuem também capacidade

fotossintética (Marek, 1992). Dentre as reservas presentes nas suas sementes, grande parte da sua composição compreende de proteínas (Agrawal et al, 2008). Durante a germinação e crescimento inicial as proteínas de reserva são degradadas e fornecem aminoácidos para a manutenção e crescimento da plântula (Qi et al., 1992). Essa composição química coloca a soja como uma importante espécie leguminosa para ser utilizada como modelos de estudos durante a germinação e crescimento inicial.

Sabendo da relevância da soja como importante fonte de alimento, além das características que a tornam interessante para estudos durante a germinação e desenvolvimento inicial, busca-se compreender como diferentes níveis de luminosidade podem afetar a degradação de proteínas dos cotilédones da soja e qual o direcionamento dos aminoácidos liberados para a biossíntese ou para catabolismo durante esses processos. Podendo dessa forma fornecer auxílio ao conhecimento sobre o desenvolvimento inicial e contribuir tanto em estudos que envolvam o metabolismo de plântulas, assim como em âmbitos agrônômicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Germinação e Crescimento Inicial

O desenvolvimento inicial é um momento crucial na história de vida das plantas, pois representa a fase de maior vulnerabilidade no desenvolvimento vegetal em que as culturas estão se estabelecendo, possibilitando o surgimento de novos indivíduos e a perpetuação das espécies (Bewley & Black, 1994). O processo de germinação se inicia com a absorção de água pela semente (Castro et al., 2004) e finaliza com a alongação da radícula, e geralmente pode ser dividido em três fases com base no processo de absorção de água, sendo a fase I uma fase de rápida absorção de água, na fase II ocorre a ativação do metabolismo e a fase III é um estágio em que a radícula começa a crescer. Logo, quando há o surgimento da radícula ou aumento em sua massa fresca, considera-se completa a germinação (Labouriau, 1983; Bewley & Black, 1994).

Uma vez concluído o processo de germinação, haverá o desenvolvimento de plântulas, que será amplamente determinado pela resposta ao ambiente e pelas reservas que irão sustentá-las nesse estágio inicial, antes de se tornarem fotoautotróficas (Kolchinski et al., 2006). Das diversas definições de ‘plântula’ encontradas na literatura, a que tem maior relevância para a mobilização de reservas e irá ser utilizada ao longo do trabalho será: “Uma plântula é um indivíduo vegetal desenvolvido a partir de uma semente, um indivíduo será plântula enquanto depender da reserva de sua semente e enquanto uma porção significativa da sua biomassa for oriunda das reservas da sua semente” (Melo et al., 2004). O crescimento inicial pós-germinativo pode ocorrer em duas maneiras, epígea, onde há um crescimento do hipocótilo que leva os cotilédones a ficarem acima do solo, e o tipo hipógea onde os cotilédones permanecem no solo e há uma alongação do epicótilo que leva as folhas para fora do solo (Bewley & Black, 1994).

Diversos fatores externos e internos influenciam o processo fisiológico do crescimento inicial, tais como luz, fitormônios, temperatura, disponibilidade de água e o vigor das sementes. Os sinais de luz são percebidos principalmente por fotorreceptores, tais como fitocromos, criptocromos e fototropinas, que regulam o crescimento e o desenvolvimento da planta e são responsáveis pelas respostas morfogênicas induzidas pela luz, que se dá através do comprimento de onda do espectro em que a planta está exposta (Casal et al., 1998; Arnim & Deng, 1996; Casal & Yanovsky, 2005). Fitormônios como ácido abscísico (ABA) e ácido

giberélico (GA) podem desempenhar papéis regulatórios durante a germinação e a mobilização de reservas. O ABA ajuda a manter a dormência da semente e inibe a degradação de reservas, enquanto o GA a promove (Pawlowski, 2007). A faixa de temperatura ótima para germinação e crescimento varia para cada espécie, sendo que a temperatura ótima pode garantir o sucesso no desenvolvimento inicial e temperaturas acima ou abaixo podem acarretar a diminuição ou perda total da germinação e emergência das plântulas. Geralmente a faixa de 20-30 °C mostra-se adequada para o desenvolvimento de muitas espécies tropicais e subtropicais (Aguiar et al., 1993). O efeito do vigor da semente também pode influenciar no seu sucesso germinativo e desenvolvimento inicial, sementes que possuem maior vigor apresentam maior velocidade em processos metabólicos proporcionando emissão mais rápida da raiz, maior taxa de crescimento e maior comprimento das plântulas (Vanzolini & Carvalho, 2002).

2.2 Reservas e a sua Mobilização

As sementes contêm reservas que têm como função permitir a manutenção e crescimento do embrião (Buckeridge et al., 2004; Agrawal et al., 2008). Esses componentes de reserva são sintetizados durante a fase de desenvolvimento da semente, denominado maturação. As principais reservas encontradas nas sementes das plantas são carboidratos, lipídeos e proteínas, e são utilizadas como fontes de Carbono, Nitrogênio e Enxofre para formação de componentes estruturais e geração de energia (Ziegler, 1995; Henning et al., 2010).

Os teores de composição das reservas nas sementes podem variar entre as espécies (tabela 1) (Magalhães et al., 2010; Corte et al., 2006). Por exemplo, o Arroz, possui cerca de 85% de amido do total de massa seca, enquanto muitas sementes oleaginosas contêm 50 a 70% em óleo, assim como a semente de Canola (*Brassica napus*) que contêm cerca de 40% de óleo (Ruuska et al., 2002). Já culturas leguminosas, tais como a Soja (*Glycine max*), podem apresentar 40% do seu peso seco como proteína (Agrawal et al., 2008).

Tabela 1. Exemplos dos principais tipos de reservas encontrados em diferentes cultivares.

Cultivar	Família	Principal tipo de reserva
Arroz	Poaceae	Amido
Sorgo	Poaceae	Amido
Milho	Poaceae	Amido
Cevada	Poaceae	Amido
Aveia	Poaceae	Amido
Trigo	Poaceae	Amido
Feijão	Fabaceae	Amido
Soja	Fabaceae	Proteína
Ervilha	Fabaceae	Proteína
Amendoim	Fabaceae	Lipídeo
Canola	Brassicaceae	Lipídeo
Girassol	Asteraceae	Lipídeo
Gergelim	Pedaliaceae	PRPC
Café	Rubiaceae	PRPC

*PRPC: Polissacarídeos de reserva de parede celular.

A mobilização das reservas é um dos eventos mais importantes na germinação e crescimento inicial de plântulas, pois fornece recursos e energia para os processos biossintéticos e manutenção celular, e será crucial para a eficiência da germinação e o estabelecimento das plântulas (Han et al., 2013). A germinação e a pós-germinação das sementes é caracterizada pela mobilização das reservas dos tecidos de armazenamento e a transferência dos produtos solubilizados para o eixo do embrião em crescimento (Beever, 1968). Diferentes reservas são mobilizadas através de diferentes vias metabólicas durante a germinação e o crescimento inicial. A mesma reserva pode ser também sujeita a diferentes vias de degradação em cada espécie e a mobilização das reservas não progride na mesma taxa em todas as regiões do cotilédone da semente (Han et al., 2013).

Um importante evento metabólico na germinação e crescimento inicial é a hidrólise de proteínas de reserva da semente (Qi et al., 1992). As proteínas de reserva são acumuladas em vacúolos de armazenamento, onde se dobram de forma compacta e apresentam regiões vulneráveis a proteólise. Algumas das famílias de proteínas de armazenamento possuem características estruturais principais em comum, como o grupo das Globulinas 11S e 7S, no qual apresentam unidades monoméricas que são dobrados e compactados de forma estruturalmente equivalente e montados, respectivamente, com hexâmeros e trímeros. As

Albuminas 2S apresentam um arranjo de quatro a cinco alfa-hélices em uma hélice direita. E ainda um outro grupo de proteínas de reserva conhecidas como Prolaminas apresentam a dobragem em moléculas compactas em forma de haste, no qual os resíduos formam rotações β -reservas organizadas numa estrutura em espiral (Tan-Wilson & Wilson, 2012).

He et al. (2007) observaram em seus estudos a proteólise controlada das extensões N-terminal das proteínas de armazenamento 7S β -conglucininas em um período inicial no crescimento das plântulas durante os primeiros dias de desenvolvimento, constatando que além de serem utilizados para a síntese de proteínas no crescimento, os aminoácidos podem ser convertidos em intermediários do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) para proporcionar energia ou suporte na mobilização de reservas por lipólise, β -oxidação e ciclo de glioxilato, processos que também são observados durante o crescimento inicial das plântulas.

2.3 Influência da Luz na Germinação e Crescimento Inicial

Fatores físicos e biológicos podem influenciar no desenvolvimento de plântulas, entre eles a disponibilidade de luz, temperatura, ataque de patógenos, estresse hídrico etc., e entender a maneira como as espécies respondem a esses fatores auxilia na compreensão de como as plântulas vão interagir com o ambiente (Melo et al., 2004). Dos vários fatores ambientais que podem afetar o desenvolvimento vegetal, a luz está entre os principais, e desempenha papel importante na detecção sazonal, como um possível sinal para alterar padrões de desenvolvimento (Chory et al., 1996), na quebra da dormência das sementes (Neto et al., 2003; Abreu & Garcia, 2005; Chunchui et al., 2014), na fotossíntese (Harris et al., 1986), assim como também pode intervir na proteólise de componentes presentes nas plantas (Sudia & Green, 1967).

A luz, como sinal, tem vários efeitos sobre o desenvolvimento vegetal que é grandemente ilustrado pelo desenvolvimento de plântulas. A fotomorfogênese, que é o desenvolvimento induzido pela presença de luz, conduz a uma morfologia da plântula que é otimizada para realizar fotossíntese, assim como a direção da luz incidente direciona parte aérea e raízes a responderem fototropicamente. A cinética dos efeitos mediados pela luz permite respostas como a redução do alongamento do hipocótilo e indução da expansão celular nos cotilédones e folhas. Os padrões de desenvolvimento das plântulas sob luz são distintos daqueles no escuro, com relação a expressão gênica, diferenciação celular e morfologia do órgão. Sendo a intensidade da luz e o comprimento de onda fatores importantes na determinação da

velocidade de crescimento celular, da acumulação de pigmentos e da diferenciação dos plastídios (Arnim & Deng, 1996). O uso de *Arabidopsis thaliana* como organismo vegetal modelo levou a maior compreensão do controle da luz no desenvolvimento das plântulas, mostrando que sob condições de luz, a plântula emerge da semente, constituindo um hipocótilo, cotilédones e uma raiz principal. Após um aumento de volume, o hipocótilo começa a se endireitar e os cotilédones se abrem e expandem-se por divisão e expansão celular, acompanhados pelo acúmulo de clorofila, se tornando verdes. Isso é atribuído pelas respostas moleculares do fitocromo, que constitui uma das importantes áreas de investigação no campo da fotomorfogênese. O fitocromo é um pigmento proteico considerado fundamental na recepção do sinal luminoso, e faz parte de uma família pequena de fotorreceptores, cujas proteínas são codificadas por genes diferentes (Casal et al, 1998; Casal & Sánchez, 1998; Grande & Takaki, 2006). Entre suas várias formas, existem duas principais que se pode encontrar o fitocromo, a forma inativa (Fv) que absorve luz vermelha em um pico máximo de 660 nm e se converte para a forma ativa (Fve), que tem absorção máxima de 730 nm. A forma Fve absorve luz vermelho-extremo e se transforma novamente na forma inativa. A passagem de Fv para Fve, e vice-versa, acontece rapidamente em tratamento luminoso. Essa reação também pode acontecer no escuro, porém em processo mais devagar (Casal & Sánchez, 1998; Zaidan & Barbedo, 2004). Esses pigmentos traduzem sinais luminosos em sinais bioquímicos e subsequentemente através de mudanças moleculares e fisiológicas modulam o crescimento e o desenvolvimento das plântulas (Arnim & Deng, 1996; Casal et al, 1998).

Os processos de desenvolvimento são regulados tanto pela qualidade da luz (por exemplo, comprimento de onda) e quantidade (fluência), como pelo fotoperíodo, representado pela duração do período de luz no controle das respostas sazonais, no qual por meio dos fotorreceptores a planta coordena aspectos do seu desenvolvimento (Yanovsky, 2001). Os ritmos circadianos são o subconjunto de ritmos biológicos e definem um tempo para completar um ciclo. Nas plantas, os ritmos circadianos controlam eventos fisiológicos e bioquímicos, sendo a luz um fator importante para diversos processos, como a abertura estomática, expressão gênica e mobilização de reservas em plântulas (Brown & Huber, 1987; Casal & Yanovsky, 2005; Dodd et al, 2005; McClung, 2006). Sendo assim, eventos biológicos controlados pela luz, tais como ciclos dia-noite, são sincronizados pelo relógio biológico.

A luz é a fonte de energia utilizada para assimilação fotossintética de CO₂ e fonte de energia direta ou indireta para outros processos. As plantas armazenam metabólitos durante o dia, e durante a noite elas são dependentes desse armazenamento para o seu metabolismo. O

amido é exemplo de um metabólito essencial para o crescimento, sendo possível observar que distúrbios na sua utilização afetam o metabolismo e crescimento da planta. O uso prematuro do amido pode levar a uma falta de carbono durante a noite, afetando sua mobilização, e a redução da utilização de carbono que poderia ser investida em crescimento de folha e raízes (Stitt & Zeeman, 2012).

O desenvolvimento no escuro, conhecido como escotomorfogênese, causa o efeito de estiolação, onde maximiza a alongação celular com pouco desenvolvimento de folhas, a medida que a plântula tenta alcançar condições de luz suficientes para o crescimento fotoautotrófico (Arnim & Deng, 1996; Josse & Halliday, 2008). Plantas em ambientes sombreados também podem apresentar estiolamento que é representado por internó mais alongado, diminuição da área foliar e folhas de cor verde-clara (Melo et al., 2004).

A luz pode afetar tanto no desenvolvimento e diferenciação de plântulas, ou seja, fotomorfogênese, como pode-se ter o efeito da luz também como fonte de energia, no caso da fotossíntese. Há estudos quem mostram o efeito causado pela luz durante ciclos de luz e escuro na proteólise dos componentes de reservas de plantas que estão em privação de carbono. Onde submeteram plantas jovens de milho a ciclos de luz, escuro e escuro prolongado para avaliar a ocorrência dos efeitos da limitação de açúcar em diferentes partes da planta. Observando que não houve proteólise significativa induzida durante os ciclos normais de luz e escuro, no entanto as alterações no metabolismo e crescimento foram percebidas logo após o início do período de escuro e provavelmente uma proteólise relacionada a privação de carbono apareça durante os períodos de escuro prolongado (Brouquisse et al., 1998).

Tanto a quantidade como a qualidade da luz que chega para as plantas pode ser alterada antes de atingi-las, dependendo de onde estão localizadas, pois os comprimentos de onda, principalmente na região do vermelho e do azul do espectro, podem ser absorvidos, por exemplo, por folhas mais altas e conseqüentemente a luz que chega até o solo estará mais filtrada e apresentará menor irradiância e mudanças nos comprimentos de onda (Melo et al., 2004). O sombreamento é um fator que também pode afetar no desenvolvimento inicial das espécies, Su et al., (2014) avaliaram o efeito do sombreamento causado por um sistema de consórcio entre culturas, que significa maximizar o espaço intercalando o cultivo de duas ou mais espécies. Intercalando a colheita de milho com a de soja, observando que as plantas de milho causavam sombreamento nas plantas de soja e isso era um fator limitante para o crescimento da soja se comparado com espécies em monocultura. Os resultados mostraram que as plântulas de soja sob efeito do sombreamento apresentaram taxas relativamente mais

baixas de fotossíntese líquida, transpiração e condutância estomática devido a baixa luminosidade disponível.

Sendo assim, sabendo que durante o período de crescimento inicial, a plântula é nutricionalmente dependente dos produtos de reserva presente nos cotilédones, e sabendo que a luz pode afetar esses processos, torna-se relevante avaliar como a degradação e mobilização de reservas é influenciada pela luz e qual a contribuição disso para o metabolismo das plântulas.

2.4 Soja (*Glycine Max* (L.) Merr)

A soja (*Glycine max* (L.) Merr) é uma espécie leguminosa oriunda da China (Hymowitz, 1970). Atualmente o cultivo dessa espécie está concentrado principalmente nos Estados Unidos, Brasil e Argentina, que respondem por cerca de 70% a 80% da produção mundial (Masuda & Goldsmith, 2009; FAO 2013). Indonésia, Japão e Coreia também são produtores de soja (Yin et al., 2014).

O Brasil é um dos grandes produtores mundiais dessa espécie, ocupando uma área de 33,89 milhões de hectares na safra de 2016/2017, o que totalizou uma produção de 113,92 milhões de toneladas (Artuzo et al., 2018). A soja foi introduzida no Brasil em 1882, no entanto nos anos 1960-1970 a sua produção se intensificou (Black, 2000). De acordo com a Embrapa (2014) a produção da soja está entre as atividades econômicas que apresentaram crescimentos mais expressivos nas últimas décadas. As sementes possuem grandes quantidades de proteínas, minerais e vitaminas (Yin et al., 2014), e junto com outras espécies, ela faz parte das plantas importantes para a alimentação humana, na produção de farelos e óleos, assim como na alimentação animal (Hymowitz, 1970).

A temperatura é importante para estabelecer o sucesso do processo de desenvolvimento desta espécie. Para as sementes de soja a temperatura em que melhor se desenvolvem é entre 20°C a 30°C, e o seu crescimento é pequeno ou inexistente em temperaturas menores que 10°C, sendo que acima de 40°C também apresenta efeitos adversos. A disponibilidade de água no desenvolvimento da soja também é importante, especialmente em dois períodos, na germinação-emergência, e na floração-enchimento dos grãos. Para garantir uma boa germinação, a semente de soja precisa absorver pelo menos 50% do seu peso em água (Tyagi & Tripathi, 1983).

As sementes de soja possuem cotilédones que emergem e se tornam verdes durante a sua germinação e crescimento inicial. Os cotilédones desenvolvem características semelhantes a folhas, incluindo a capacidade fotossintética e funcionam tanto como órgãos fotossintéticos como na mobilização de reservas (Marek, 1992). Ainda que a contribuição fotossintética dos cotilédones não seja muito grande, é possível observar ser suficiente para compensar perdas por respiração, antes da expansão das folhas primárias (Harris et al., 1986). Thomas & Costa (1993) observaram que o efeito da remoção dos cotilédones para a plântula resulta na diminuição da quantidade de tecidos fotossintetizantes e de reserva, sendo assim é observado que há uma grande importância de ao menos um dos cotilédones permanecer por cerca de dez dias para garantir alto rendimento da plântula.

É de grande importância a composição química das reservas de soja para compreender o seu processo de germinação e crescimento inicial, tendo em consideração a quantidade elevada (aproximadamente 40%) de proteínas totais encontrada nessa espécie (Agrawal et al., 2008), a soja é colocada como uma espécie leguminosa modelo. Existem duas principais proteínas de reserva em sementes de soja, glicinina e β -conglucina, que juntas compõem cerca de 70% das reservas de proteína da semente e ambos os tipos estão presentes nos vacúolos de armazenamento de proteínas (Diaz, 1993; Qi et al., 1992; Kim et al., 2011).

A proteína 11S, conhecida como glicinina é constituída de seis subunidades não idênticas, cada subunidade consiste de um componente polipeptídico ácido ligado a um componente básico por uma única ligação dissulfeto (Nielsen, 1985). A β -conglucina, identificada como 7S, é uma glicoproteína composta por três subunidades (α , α' e β) associadas não covalentemente (Thanh & Shibasaki, 1978). As cadeias ácidas de glicinina e as subunidades α' e α de β -conglucina são mobilizadas primeiro no crescimento de plântulas. As extensões N-terminal das subunidades α' e α da β -conglucina são ricas em Ácido Glutâmico (Glu), Glutamina (Gln), Ácido Aspártico (Asp) e Asparagina (Asn). Nos cotilédones das plântulas, a proteólise das proteínas de armazenamento é iniciada por enzimas proteolíticas. A protease C1, uma serina protease que funciona em um pH ácido, é a responsável pela degradação inicial das subunidades proteicas (Qi et al., 1992). A degradação das reservas proteicas de β -conglucina em sementes de soja durante a germinação e o crescimento inicial começa com a proteólise das subunidades α' e α por essa enzima proteolítica (Tan-Wilson et al., 1996). Essa protease foi localizada nos vacúolos de armazenamento de proteínas de células do parênquima nos cotilédones por microscopia imunoeletrônica (Tan-Wilson et al., 1996; He et al., 2007). De acordo com Diaz et al., (1993), a mobilização de proteínas de reserva em soja ocorre primeiramente em células adjacentes aos feixes vasculares e na epiderme.

3 JUSTIFICATIVA

Os processos de germinação e crescimento inicial de plântulas são considerados momentos críticos no desenvolvimento e um período de alta sensibilidade das espécies. Levando em consideração a importância da soja no cenário econômico, assim como por ser uma espécie interessante para compreender processos iniciais por apresentar cotilédones fotossintéticos com grandes reservas proteicas, torna-se relevante avaliar como as reservas das sementes são utilizadas para fornecer energia e precursores para biossíntese durante esse período inicial. Sabendo que condições ambientais, como a luz, podem influenciar a germinação e crescimento das plântulas torna-se necessário estudos que mostrem como os diferentes níveis de luminosidade podem afetar a degradação das proteínas dos cotilédones e o que acontece com os aminoácidos resultantes dessa degradação e qual a contribuição disso para o metabolismo da plântula. Sendo assim, esse estudo visa fornecer subsídios para ampliar a gama de conhecimento em âmbitos agrônômicos e elucidar de forma mais ampla o metabolismo dos processos iniciais de desenvolvimento da soja, podendo também contribuir em estudos ecofisiológicos e biotecnológicos, por meio da aplicação na melhoria da qualidade da espécie, assim como na compreensão de aspectos fisiológicos e bioquímicos dos processos de mobilização das reservas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar como diferentes condições luminosas influenciam na mobilização de reservas proteicas e no metabolismo de aminoácidos durante o crescimento inicial de soja (*Glycine max*).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar como a luz influencia na mobilização de reservas, analisando o estímulo da luz em relação à quebra de proteínas e investimento de aminoácidos em crescimento;
- Analisar quais aminoácidos são liberados durante a proteólise nos tratamentos de luminosidade;
- Avaliar se as plântulas apresentam maior direcionamento de aminoácidos em condições de escuro e baixa luminosidade.

5 HIPÓTESES

- Na presença de luz as reservas proteicas estocadas nos cotilédones são utilizadas exclusivamente para a produção de biomassa nova, não sendo ativado o catabolismo de aminoácidos;
- Em condições de escuro e baixa luminosidade, os aminoácidos de cadeia ramificada são catabolizados e utilizados como fonte de Carbono e Nitrogênio;
- No escuro a taxa de degradação de proteínas é acelerada para fornecer energia a partir do catabolismo de aminoácidos.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Material Vegetal

As sementes de soja utilizadas neste estudo são da variedade BR/MG46 [Conquista]. Das quais foram cedidas para o estudo pela Empresa Schancap Sementes. As sementes foram armazenadas em frascos vedados e mantidos em câmara fria (Temperatura ± 4 °C) até o início dos experimentos.

6.2. Crescimento Vegetal e Tratamentos

As sementes passaram por três lavagens em água destilada e foram dispostas em potes de plástico de 500 mL, o fundo do pote foi coberto por algodão hidrófilo umedecido com 25 mL de água destilada e recoberto com papel filtro. As sementes foram dispostas no papel filtro/algodão e recobertas com 200 g de areia. A areia foi previamente lavada e esterilizada em estufa a 120°C.

Os potes contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento a 24°C e luminosidade de $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ utilizando lâmpadas de LED. Todas as sementes germinaram sob a mesma condição de luz e temperatura, durante sete dias. Após esse período, as plântulas foram submetidas aos tratamentos. Os potes foram dispostos em três tratamentos, sendo estes: Luz Normal, Luz Baixa e Escuro. Para o tratamento em Luz Normal, as plântulas permaneceram em luminosidade de $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12h. Para o tratamento em Luz Baixa as plântulas tiveram a luminosidade reduzida para $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ utilizando-se telas de sombrite preto 50%, e fotoperíodo de 12h. Para o tratamento no Escuro as plântulas foram mantidas em caixas fechadas com ausência de luz. As plântulas permaneceram três dias nos tratamentos antes de iniciar a coleta do material.

Foram utilizados 12 potes para cada tratamento, sendo três tempos de coleta com quatro potes em cada coleta. Em cada pote foi distribuído dez sementes, num total de 360 sementes (Figura 1).

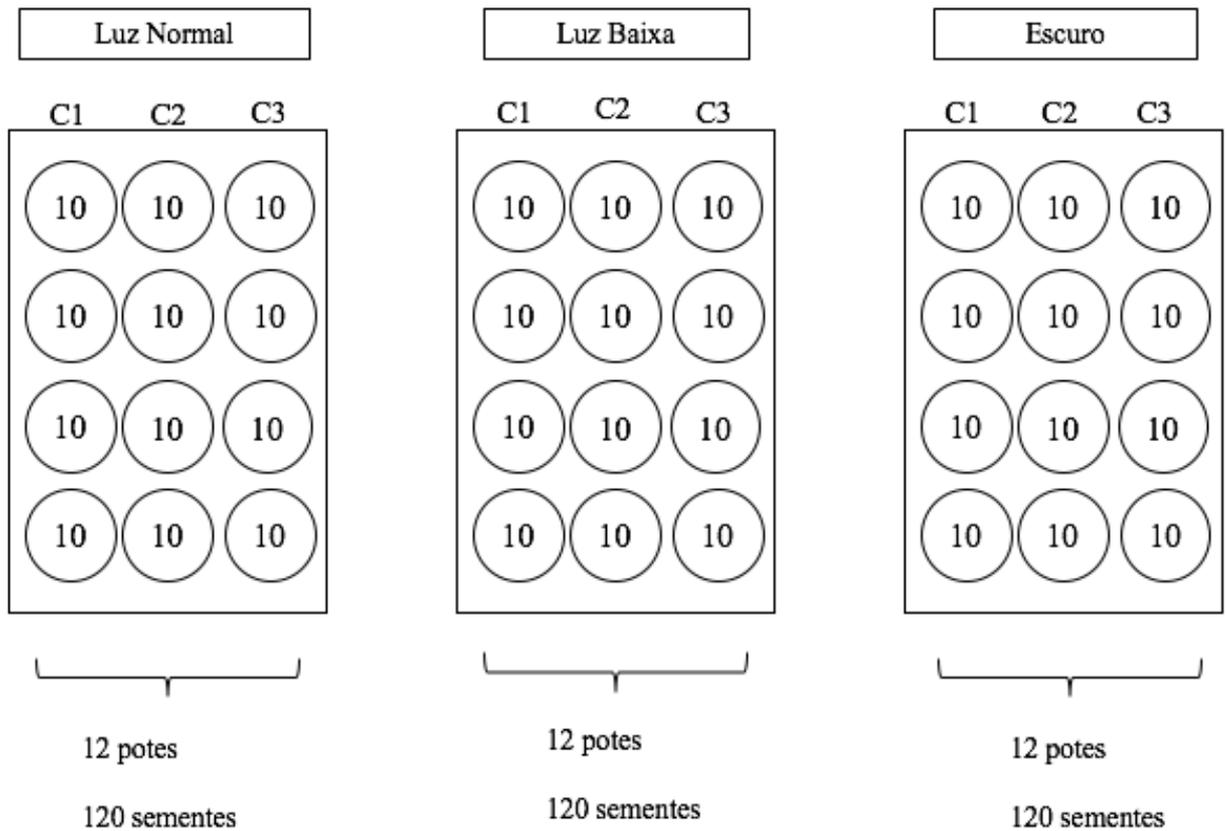


Figura 1. Delineamento Experimental dos tratamentos. Os círculos representam os potes e os número nos círculos representam a quantidade de sementes de soja em cada pote. C1: Coleta 1, C2: Coleta 2, C3: Coleta 3.

6.3. Coleta e Armazenamento do Material Vegetal

Após os três dias em que as plântulas permaneceram submetidas aos tratamentos, foram realizadas três coletas aleatorizadas. As coletas se iniciaram no estágio de desenvolvimento VC e V1, momento em que as plântulas estavam com os cotilédones abertos e o primeiro par de folhas em expansão (Figura 2).



Figura 2. Estágio de desenvolvimento das plântulas de soja ao se iniciar as coletas do experimento com os cotilédones abertos e primeiro par de folhas em expansão.

A primeira coleta foi realizada logo antes do início do dia às 6h00. A segunda coleta foi feita 12 horas após a primeira coleta, no final do dia às 18h00. E a terceira coleta foi realizada após mais 12 horas de escuro, no início do outro dia às 6h00 (Figura 3).

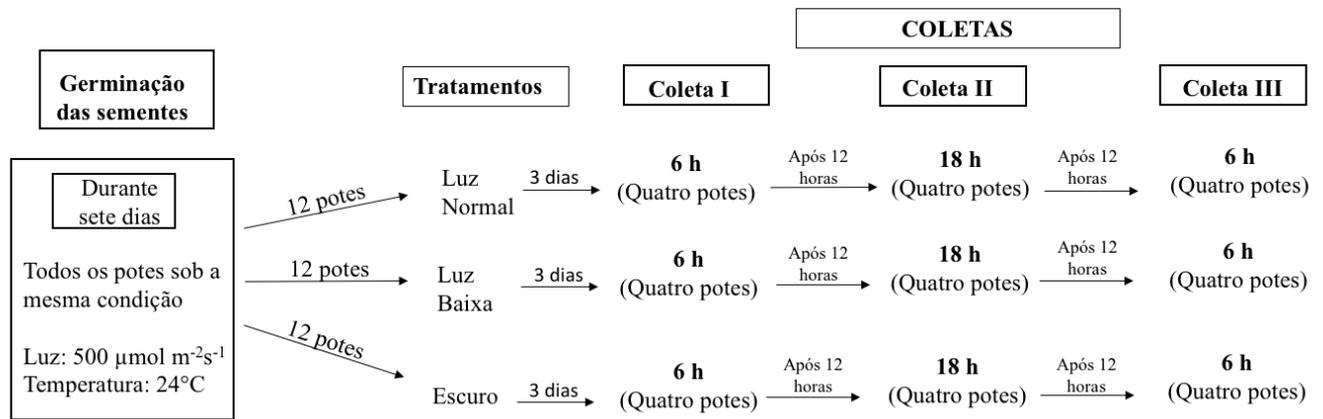


Figura 3. Horários das coletas das plântulas de soja em cada um dos tratamentos.

Foram coletados os cotilédones, epicótilos, folhas, hipocótilos e raízes das plântulas germinadas em cada um dos tratamentos (Figura 4), e pesado em seguida para obtenção da sua massa fresca. Logo após, foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até a liofilização do material vegetal. Após 48h de liofilização, o material foi novamente pesado para obtenção da sua massa seca e então foi macerado e armazenado em tubos plásticos tipo *eppendorfs*® de 2 mL a -20°C .

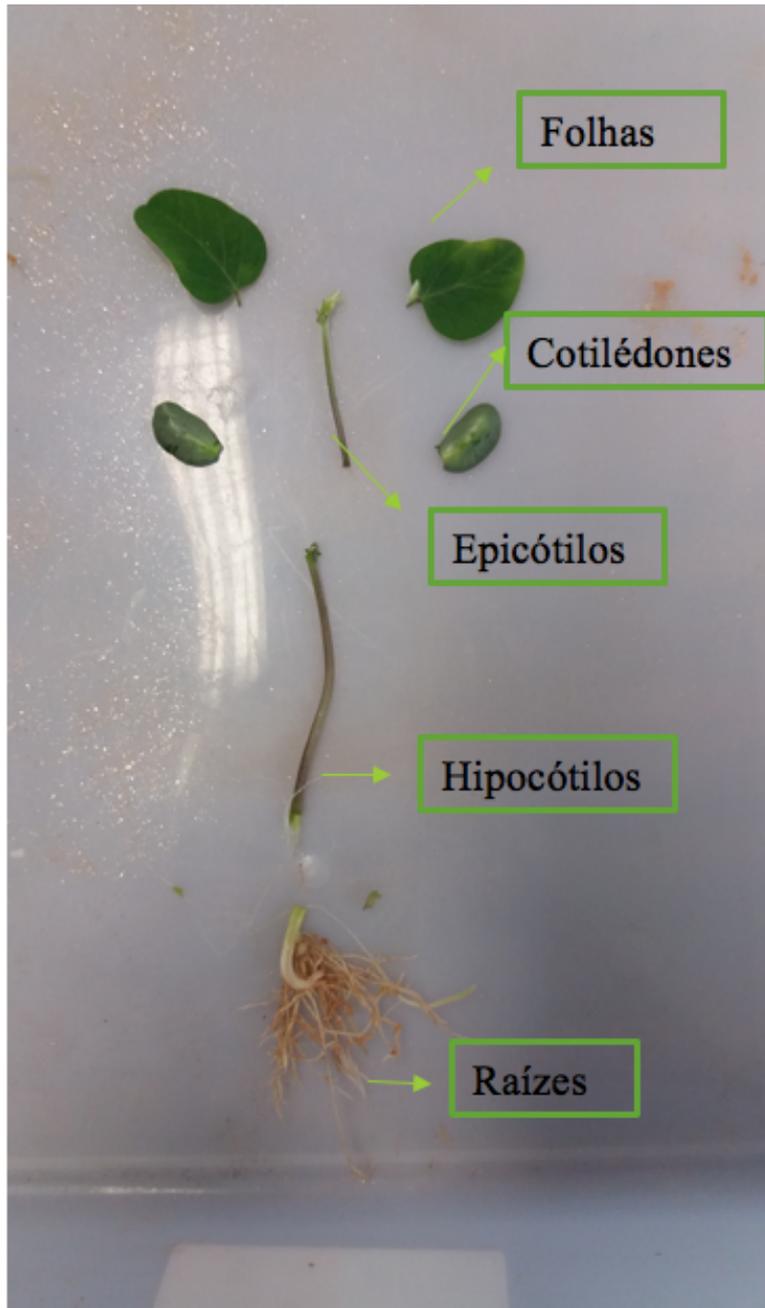


Figura 4. Partes da plântula de soja coletadas no experimento.

6.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

6.4.1. Extração de Aminoácidos Livres

A extração foi realizada a partir de 10 mg de cada amostra, que foram transferidas para um microtubo de 2 mL com 500 μ L de etanol 80% (v/v) e colocadas em banho-maria a 80°C/20 min. Em seguida, os microtubos foram submetidos à centrifugação a 10.000g/10 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro microtubo e, o material insolúvel, submetido a mais três ciclos de extração: ressuspenso, homogeneizado em vórtex e colocado a 80°C/20 min no banho-maria. Após cada ciclo, foi submetido a centrifugação a 10.000g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados no mesmo *pool* e, o material insolúvel, foi seco em *speed vac* por 5 minutos a 40°C. Ambos foram armazenados a -20°C até o momento das análises (Praxedes et al., 2006).

6.4.2. Quantificação de Aminoácidos por Ninidrina

Foi adicionado 50 μ L do extrato etanólico em poços de uma microplaca acrescidos de 50 μ L de tampão citrato (pH 5.2) com 0.2% de ácido ascórbico e 100 μ L de solução de ninidrina 1% (p/v) preparado em etanol 70% (v/v). A microplaca contendo a reação foi aquecida a 80°C/30 min, resfriada à temperatura ambiente por 5 min e, em seguida, lida a absorvância em espectrofotômetro a 570 nm. Foi assumida que a intensidade da cor púrpura obtida ao final do procedimento é proporcional à concentração de aminoácidos presente na amostra. Para essa análise foi construída uma curva de calibração com uma solução de Leucina (SIGMA[®]) – padrão de absorvância (Moore & Stein, 1954) nas concentrações de 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 e 1.0 mmol, acrescido de um ponto branco – nulo em concentração (Yemm & Cocking, 1955).

6.4.3. Quantificação de Nitrogênio e Carbono Total

A quantificação de nitrogênio e carbono total foi feita através do processo de combustão da biomassa em analisador de carbono, nitrogênio e enxofre (CN-628S, Leco, St. Joseph - Mi, EUA). Foram utilizados 100 mg de biomassa seca para cotilédones e raízes e 20 mg para epicótilos, folhas e hipocótilo. As amostras foram previamente secas em estufa a 60 °C por pelo menos 12h. Após a secagem, foram pesadas e vedadas para a retirada de ar.

A combustão foi feita em excesso de oxigênio ($H_2O < 3$ ppm, $CnHm < 5$ ppm) a 950 °C. O gás hélio (He) ($H_2O < 3$ ppm, $O_2 < 2$ ppm) foi utilizado como gás cromatográfico carreador a pressão de 669 mm.Hg. A curva padrão foi realizada utilizando padrões certificados previamente secos em estufa a 80 °C por duas horas.

6.4.4. Quantificação de Aminoácidos por CLAE

Aminoácidos solúveis foram extraídos utilizando etanol aquecido conforme descrito no tópico 6.4.1. Os aminoácidos foram quantificados utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de troca iônica Dionex ICS3000 equipado com uma coluna analítica AminoPac PA10 de diâmetro interno de 4,6mm, comprimento de 250mm e um detector eletroquímico. Foi utilizado 500 μ L do extrato etanólico para secagem em *speed vac*. Logo após foram solubilizadas em 500 μ L de ácido clorídrico (0,1M). As amostras foram diluídas 45x utilizando ácido clorídrico (HCl) à 0,1M. As amostras foram injetadas num loop de 10 μ L. Os aminoácidos foram eluídos da coluna utilizando um gradiente de hidróxido de sódio e acetato de sódio (Dionex Corporation, 2004) e quantificados utilizando curvas padrão. Teve-se como fase móvel a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 200 mM preparada com água ultrapura. O acetato de sódio foi preparado à 1M, a corrida foi realizada à 27 °C com o tempo de corrida de 75 minutos. A separação cromatográfica utilizou como fases móveis as misturas A: hidróxido de sódio, B: acetato de sódio, C: água. Usando os parâmetros de gradiente da corrida: 84% de A e 16% de B (Tabela 2). Para registrar os dados obtidos pelos detectores na cromatografia foi utilizado o computador integrado ao sistema de detecção. O *software* utilizado foi o *Chromleon Chromatography Data System*. O integrador do software fornece o tempo de retenção de cada pico, a área de cada um e a área total de todos eles (Skoog et al., 2002). A identificação dos componentes da amostra foi realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos com padrões eluídos nas mesmas condições da amostra, e, os componentes sendo identificados pelos seus tempos de retenção. Os padrões foram obtidos comercialmente e foram analisados em diferentes concentrações, formando assim uma curva de calibração, no qual corresponde à um gráfico da concentração do componente pela área do pico obtido. Através desta análise foram quantificados os componentes da amostra através das áreas dos picos (Skoog et al., 2002). A identificação dos picos correspondentes aos diferentes aminoácidos individualmente foi feita por meio de padrões de Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano, Valina, Arginina, Histidina, Alanina, Asparagina, Aspartato, Cisteína, Glutamato, Glutamina, Glicina, Prolina, Serina e Tirosina

solubilizados em ácido clorídrico 0,1M, nas seguintes concentrações: 80, 40, 20, 10, 5 e 2.5 μ M.

Tabela 2. Gradiente do método cromatográfico utilizado nas análises de CLAE.

Tempo de Retenção [Min]	Fluxo [mL/min]	%B	%C
2,000	0,250	16,0	0,0
12,100	0,250	32,0	0,0
16,000	0,250	32,0	0,0
24,000	0,250	24,0	40,0
40,000	0,250	24,0	40,0
40,100	0,250	80,0	0,0
42,100	0,250	80,0	0,0
42,200	0,250	16,0	0,0
65,000	0,250	16,0	0,0

6.5. Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados observando a quantidade total de aminoácidos nos cotilédones em relação aos outros tecidos da plântula por meio das análises de biomassa e a composição de proteínas. Dados de quantificação de aminoácidos, carbono e nitrogênio foram expressados como porcentagem de massa seca. Comparações entre os tratamentos ou tempos foram feitas utilizando ANOVA seguido por teste de Tukey, utilizando o *software* R (Landeiro et al, 2010). Foi adotado o nível de probabilidade de 0,05.

7 RESULTADOS

7.1 DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS

Foi possível observar diferenças morfológicas entre plântulas dos diferentes tratamentos. As plântulas submetidas ao tratamento Escuro demonstraram estiolamento, com hipocótilos alongados, folhas com pouca coloração verde e pouca abertura dos cotilédones. As plântulas no tratamento Luz Baixa também apresentaram sinais de estiolamento, como aumento do comprimento do hipocótilo. Em contrapartida, as plântulas submetidas ao tratamento de Luz Normal apresentaram folhas maiores e coloração verde escura (Figura 5).

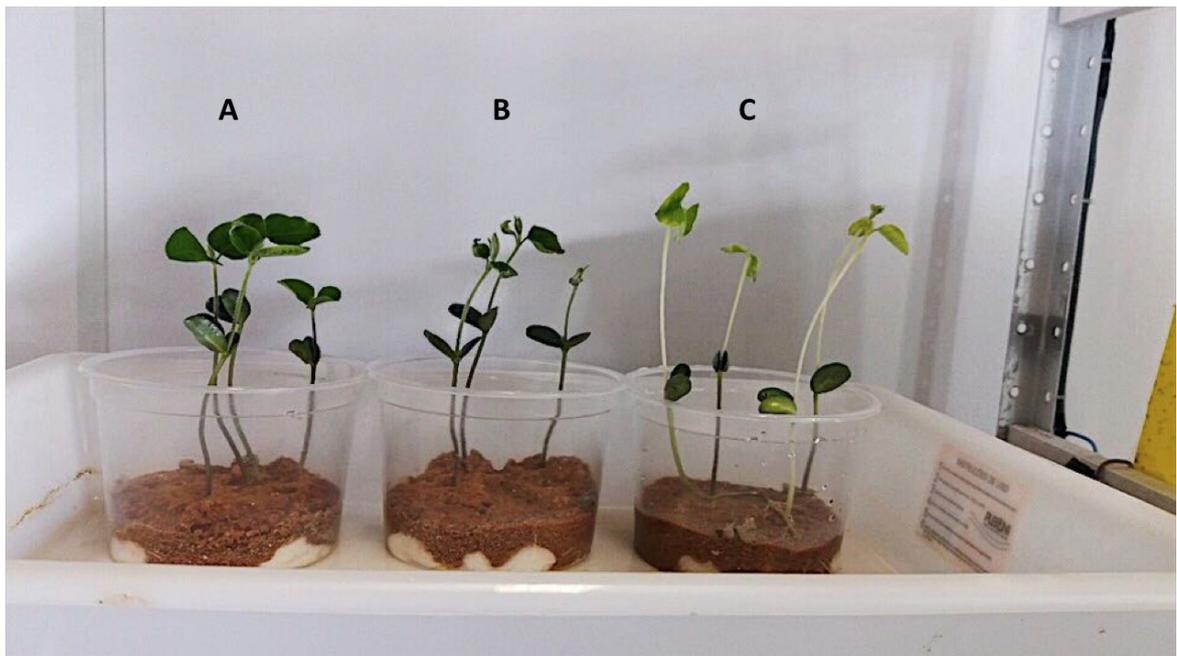


Figura 5: Diferenças morfológicas observadas nas plântulas de soja nos diferentes tratamentos do experimento. A: Luz Normal, B: Luz Baixa, C: Escuro.

7.2 BIOMASSA

Os pares de cotilédones apresentaram valores médios de massa fresca de até 0,650g (Figura 6), e valores pouco acima de 0,100g de massa seca (Figura 7), não tendo mudanças significativas na massa seca entre as diferentes coletas. O epicótilo mostrou uma diferença significativa para massa fresca entre os tratamentos na terceira coleta, mostrando haver diferença entre Luz e Escuro, com valores mais altos no Escuro (Figura 6). Os valores de massa seca foram mais baixos, pesando até 0,012g com diferenças entre os tratamentos na coleta 2 e 3, com valores um pouco mais altos no tratamento Escuro principalmente na coleta 3. O epicótilo apresentou diferenças entre as coletas para massa seca no tratamento de Escuro, mostrando um aumento na terceira coleta (Figura 7).

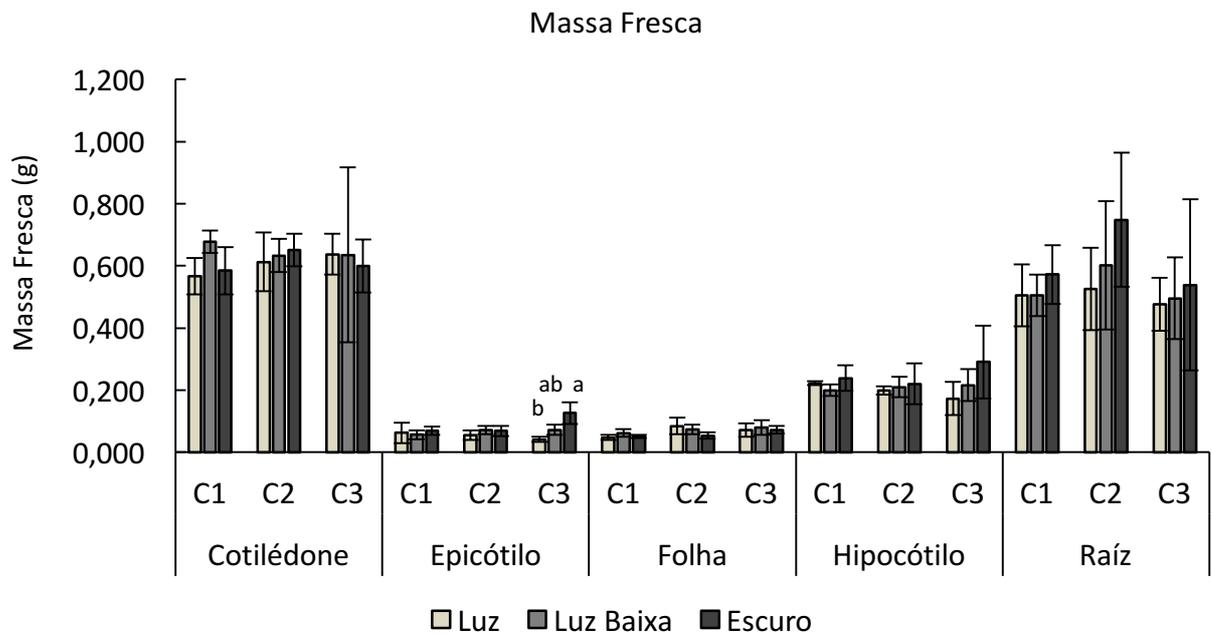


Figura 6. Efeitos dos tratamentos de luminosidade sobre a massa fresca nos diferentes órgãos da plântula de soja coletadas em diferentes horas do dia. C1: Coleta 1 (6h); C2: Coleta 2 (18h); C3: Coleta 3 (6h). As análises foram realizadas utilizando ANOVA seguida por teste Tukey *a posteriori*. As letras representam as diferenças estatísticas entre os tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de probabilidade adotado de 0,05. Valores em média e desvio padrão.

As folhas apresentaram valores de massa fresca semelhantes entre as três coletas e os três tratamentos, no entanto mostrou uma diferença significativa na massa seca na segunda e terceira coleta do experimento, com valores mais altos no tratamento de Luz e mais baixos no Escuro. Apresentando também diferença significativa entre as coletas, para o tratamento de Luz Normal, com valores aumentando na segunda coleta (Figura 7). O hipocótilo não

apresentou mudanças significativas entre os tratamentos e coletas nas análises de massa fresca e seca. As raízes também não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e coletas para massa fresca e massa seca.

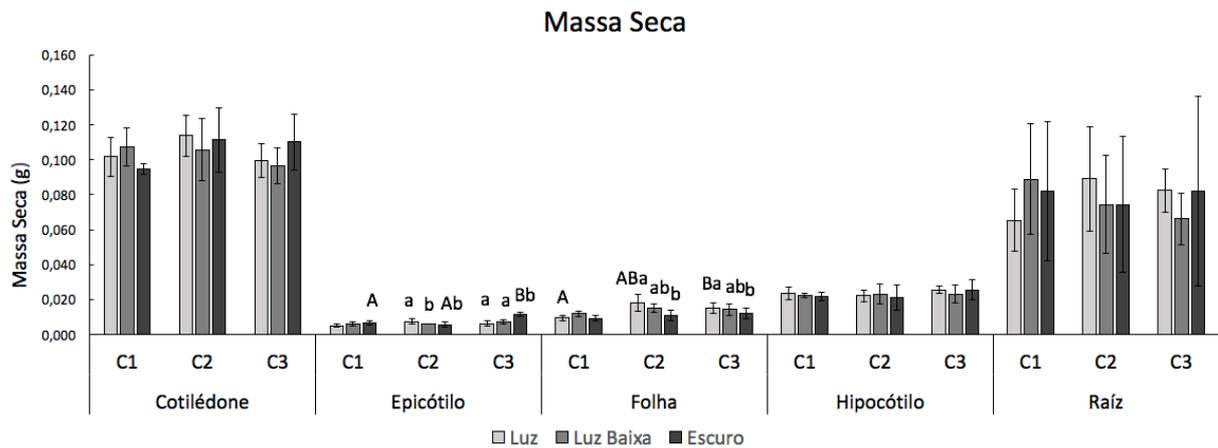


Figura 7. Efeitos dos tratamentos de luminosidade sobre a massa seca nos diferentes órgãos da plântula de soja coletadas em diferentes horas do dia. C1: Coleta 1 (6h); C2: Coleta 2 (18h); C3: Coleta 3 (6h). As análises foram realizadas utilizando ANOVA seguida por teste Tukey *a posteriori*. As letras representam as diferenças estatísticas entre os tratamentos e coletas. Letras maiúsculas representam diferenças entre as coletas e minúsculas representam diferenças entre os tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de probabilidade adotado de 0,05. Valores em média e desvio padrão.

Utilizando os dados de massa fresca e seca foi possível calcular a porcentagem de massa seca nos órgãos. Os cotilédones apresentaram valores em torno de 18% de massa seca nas duas primeiras coletas do experimento. No tratamento de Luz Baixa os valores ficaram entre 16%, não tendo variação entre as coletas. No Escuro foi possível observar um discreto aumento da porcentagem de massa seca na terceira coleta do experimento (19%). Pôde ser observado uma diferença significativa na porcentagem de massa seca de Epicótilo e Folha, mostrando que há diferença entre os tratamentos de Luz e Escuro (Tabela 2), assim como uma diferença significativa para Hipocótilo, entre os tratamentos de Luz e Escuro.

As porcentagens de massa seca em geral foram maiores nos tratamentos de Luz diminuindo significativamente no Escuro nos epicótilos, folhas e hipocótilos. Os valores mais altos foram observados para Folhas na plântula que permaneceu na Luz (20%) e os valores mais baixos observados por Epicótilo e Hipocótilo durante o tratamento de Escuro prolongado.

As proporções de massa seca se mantiveram entre as coletas, não apresentando mudança significativa estatisticamente entre os diferentes tempos, apenas nos órgãos entre os Tratamentos.

Tabela 3. Porcentagem de massa seca nos diferentes tratamentos e órgãos da plântula de soja. Valores em média e desvio padrão.

Tratamento	Coleta	Órgão				
		Cotilédone	Epicótilo	Folha	Hipocótilo	Raiz
Luz	1 (6h)	18,0±1,5	10,4±4,5	20,1±1,4	10,7±1,4	13,1±3,2
Luz Baixa	1 (6h)	15,9±1,4	10,8±1,1	19,2±1,5	11,2±0,7	17,6±5,0
Escuro	1 (6h)	16,4±4,5	9,5±0,9	18,3±1,2	9,2±1,3	14,5±6,6
Luz	2 (18h)	18,7±1,3	13,8±1,5	22,3±1,6	11,3±1,5	17,1±3,9
Luz Baixa	2 (18h)	16,9±3,9	8,8±1,5	20,5±2,4	10,9±1,3	12,5±3,2
Escuro	2 (18h)	17,4±4,3	8,5±0,7	20,2±3,0	9,5±1,0	11,0±3,0
Luz	3 (6h)	15,6±0,8	15,1±2,3 a	21,9±2,7 a	16,1±5,6 a	17,6±3,4
Luz Baixa	3 (6h)	15,2±1,3	10,2±0,9 b	18,4±1,8 ab	10,8±0,6 b	13,7±2,3
Escuro	3 (6h)	19,0±5,7	6,1±3,4 b	16,4±1,5 b	9,2±1,5 b	17,9±2,1

* As letras representam as diferenças estatísticas entre os tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de probabilidade adotado de 0,05.

7.3 CARBONO E NITROGÊNIO TOTAL

Os cotilédones apresentaram uma diferença significativa de carbono total entre Luz e os demais tratamentos na primeira coleta (Figura 9). Os cotilédones apresentaram os valores mais altos de carbono total quando comparados aos demais tecidos. Epicótilos apresentaram valores levemente maiores para carbono total no tratamento Luz Baixa, porém não sendo significativo dentre os demais tratamentos (Figura 9).

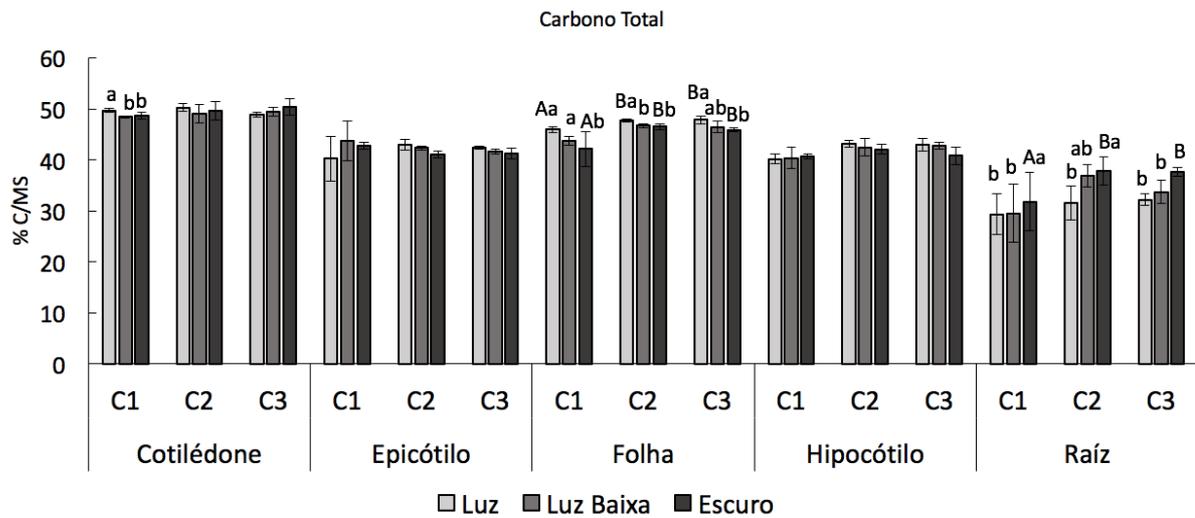


Figura 9. Efeitos dos tratamentos de luminosidade sobre Carbono Total nos diferentes órgãos da plântula de soja coletadas em diferentes horas do dia. C1: Coleta 1 (6h); C2: Coleta 2 (18h); C3: Coleta 3 (6h). As análises foram realizadas utilizando ANOVA seguida por teste Tukey *a posteriori*. As letras representam as diferenças estatísticas entre os tratamentos e coletas. Letras maiúsculas representam diferenças entre as coletas e minúsculas representam diferenças entre os tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de probabilidade adotado de 0,05. Valores em média e desvio padrão.

As folhas apresentaram diferenças estatísticas significativas para carbono total entre os tratamentos e entre as coletas realizadas (Figura 9). Na segunda coleta mostrando haver diferença entre Luz e os demais tratamentos e na terceira coleta mostrando haver diferença entre Luz e Escuro, sendo os valores mais baixos no tratamento Escuro. A diferença entre as coletas foi no tratamento de Luz Normal. O hipocótilo apresentou valores pouco acima de 43% de carbono total, não apresentando diferenças bruscas entre os tratamentos. Já as raízes apresentaram diferença entre os tratamentos, sendo que na coleta dois houve diferença estatística entre os tratamentos Luz e Escuro, com valores mais altos no Escuro, e a coleta três mostrou diferenças entre Escuro e os demais tratamentos, apresentando também maiores valores durante o tratamento Escuro. As raízes também apresentaram diferenças estatísticas

entre as coletas, no tratamento Escuro, com valores maiores na segunda e terceira coleta (Figura 9).

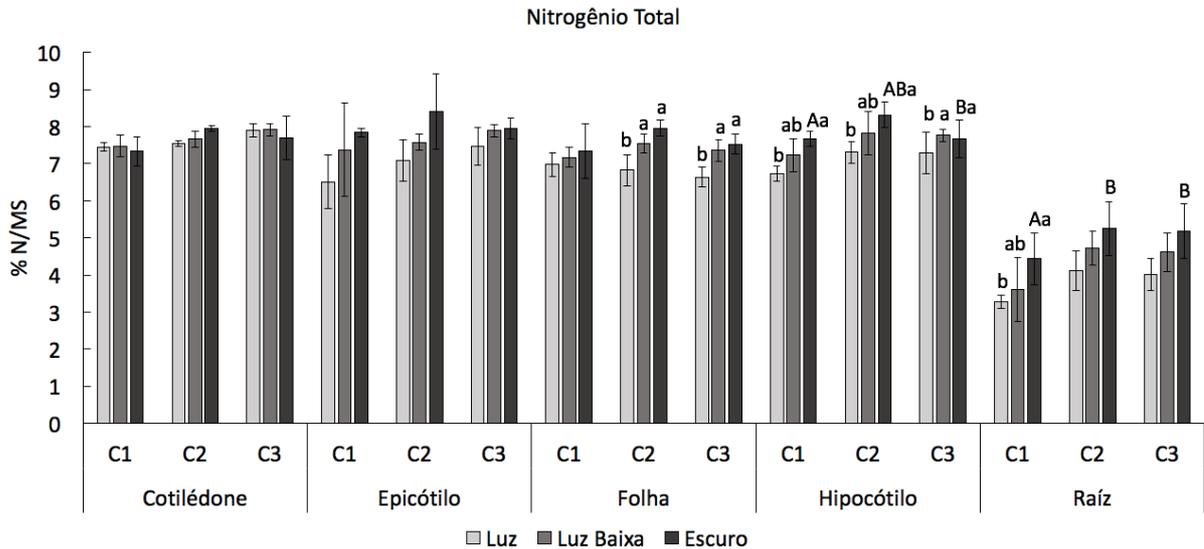


Figura 9. Efeitos dos tratamentos de luminosidade sobre Nitrogênio Total nos diferentes órgãos da plântula de soja coletadas em diferentes horas do dia. C1: Coleta 1 (6h); C2: Coleta 2 (18h); C3: Coleta 3 (6h). As análises foram realizadas utilizando ANOVA seguida por teste Tukey *a posteriori*. As letras representam as diferenças estatísticas entre os tratamentos e coletas. Letras maiúsculas representam diferenças entre as coletas e minúsculas representam diferenças entre os tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de probabilidade adotado de 0,05. Valores em média e desvio padrão.

Para Nitrogênio Total os cotilédones e epicótilos apresentaram valores em torno de 7%, não variando entre os tratamentos e entre as coletas. As folhas apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos nas coletas dois e três, sendo que Luz teve valores mais baixos em porcentagem de nitrogênio total, Luz Baixa teve valores um pouco acima e Escuro valores mais altos. Hipocótilo teve diferenças entre os tratamentos e coletas, apresentando também valores mais baixos em Luz, seguidos de um leve aumento em Luz Baixa e valores um pouco maiores no Escuro. E diferença nas coletas no tratamento de Escuro. As raízes apresentaram diferenças significativas entre as coletas e entre os tratamentos na coleta um. As diferenças entre as coletas foram observadas no tratamento de Escuro, com valores um pouco maiores na segunda e terceira coleta.

Por meio da porcentagem de nitrogênio, foi calculado o total de nitrogênio em cada órgão da plântula. Foi observado diferença significativa no epicótilo na coleta 2, mostrando

haver maior teor de Nitrogênio Total no tratamento de Luz Normal. O mesmo padrão foi observado para as folhas na coleta 1 e para o hipocótilo na coleta 3 (Figura 11).

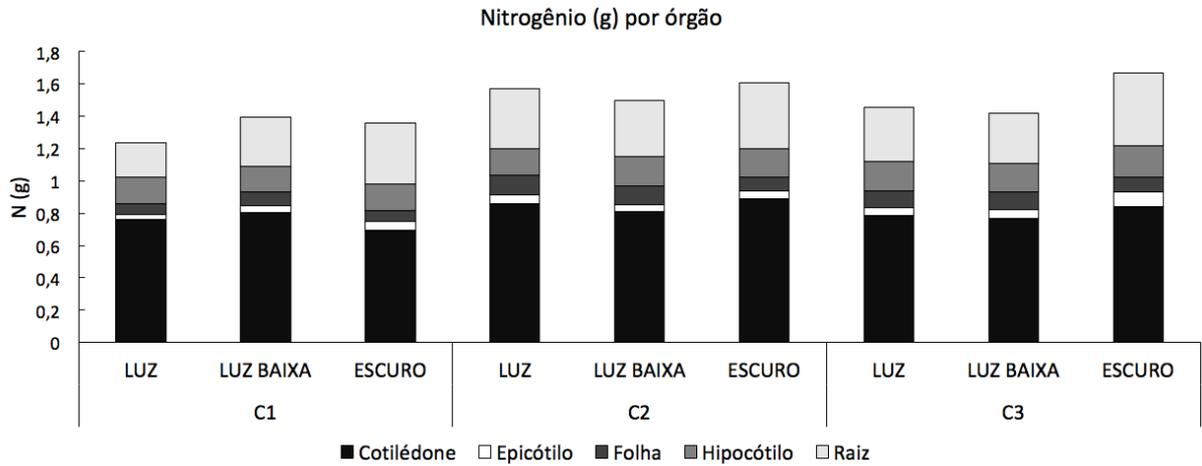


Figura 10. Efeitos dos tratamentos de luminosidade sobre o total de nitrogênio nos diferentes órgãos da plântula de soja coletadas em diferentes horas do dia. C1: Coleta 1 (6h); C2: Coleta 2 (18h); C3: Coleta 3 (6h).

7.4 AMINOÁCIDOS TOTAIS LIVRES

No epicótilo, o nível durante o Escuro foi consideravelmente maior em comparação com os outros órgãos da planta, sendo esses valores significativos no último dia de coleta do experimento. Além disso, houve uma diferença significativa entre os Tratamentos de Luz e Escuro nas três coletas e entre as coletas. A diferença entre as coletas pode ser observada no tratamento de Escuro, com valores maiores de aminoácidos livres na terceira coleta (Figura 6). As folhas apresentaram valores pouco acima de 3% de massa seca no Tratamento de Luz, tendo o conteúdo de aminoácidos diminuído na segunda coleta do experimento nos tratamentos de Luz e Luz Baixa. Assim como em epicótilo, as folhas também apresentaram diferenças entre os Tratamentos de Luz e Escuro durante a segunda coleta, tendo valores mais altos no Tratamento de Escuro.

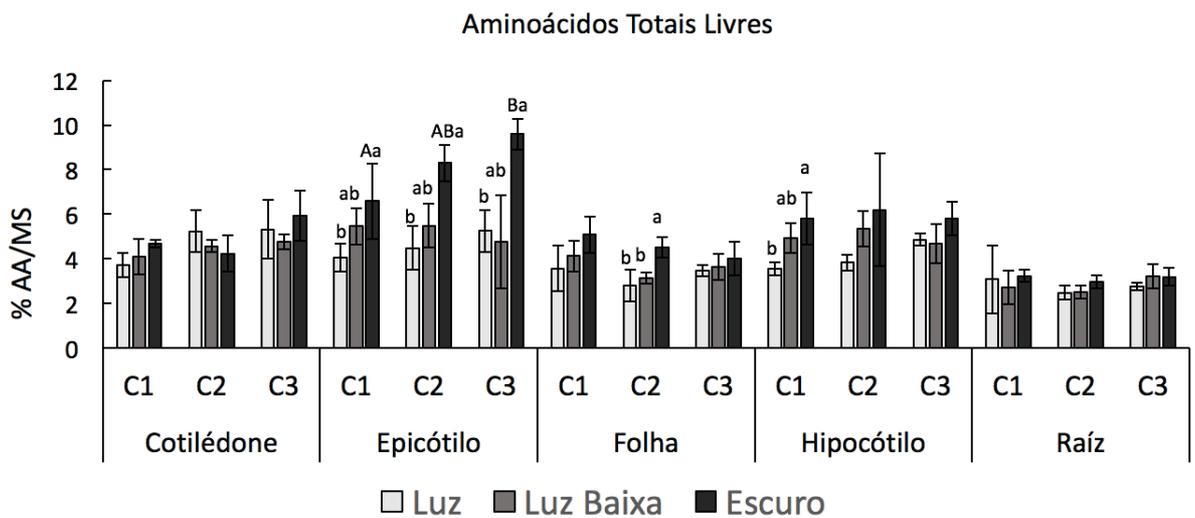


Figura 11. Efeitos dos tratamentos de luminosidade sobre Aminoácidos Totais nos diferentes órgãos da plântula de soja coletadas em diferentes horas do dia. C1: Coleta 1 (6h); C2: Coleta 2 (18h); C3: Coleta 3 (6h). As análises foram realizadas utilizando ANOVA seguida por teste Tukey *a posteriori*. As letras representam as diferenças estatísticas entre os tratamentos e coletas. Letras maiúsculas representam diferenças entre as coletas e minúsculas representam diferenças entre os tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de probabilidade adotado de 0,05. Valores em média e desvio padrão.

O hipocótilo teve valores mais baixos no Tratamento Luz na primeira coleta, mostrando novamente haver diferença entre Luz com o Escuro (Figura 8). As raízes

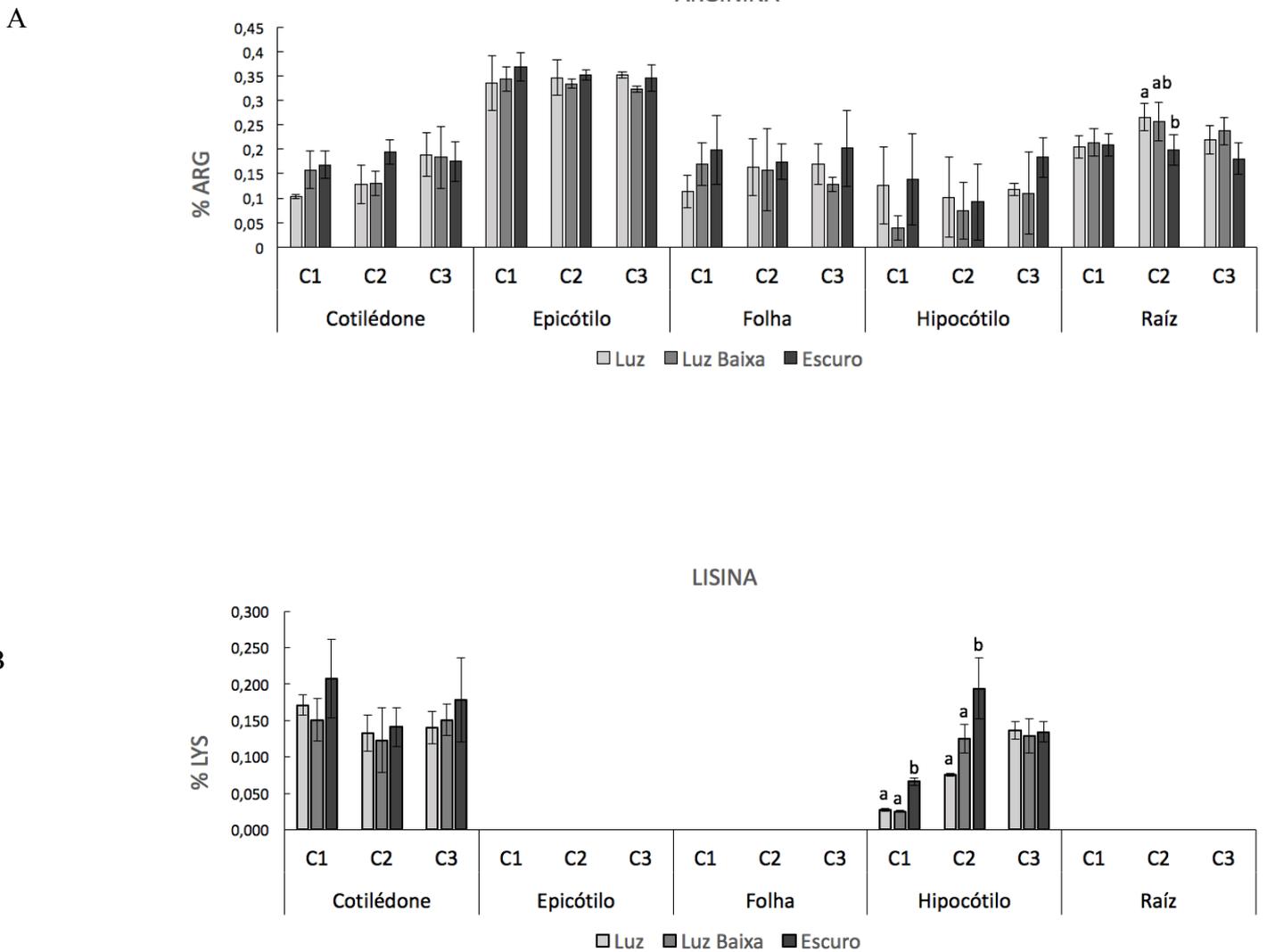
apresentaram os menores valores dentre os demais órgãos da plântula, entre 3% de aminoácidos nos três tratamentos e nas três coletas, não apresentando diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ou coletas.

7.5 AMINOÁCIDOS POR CLAE

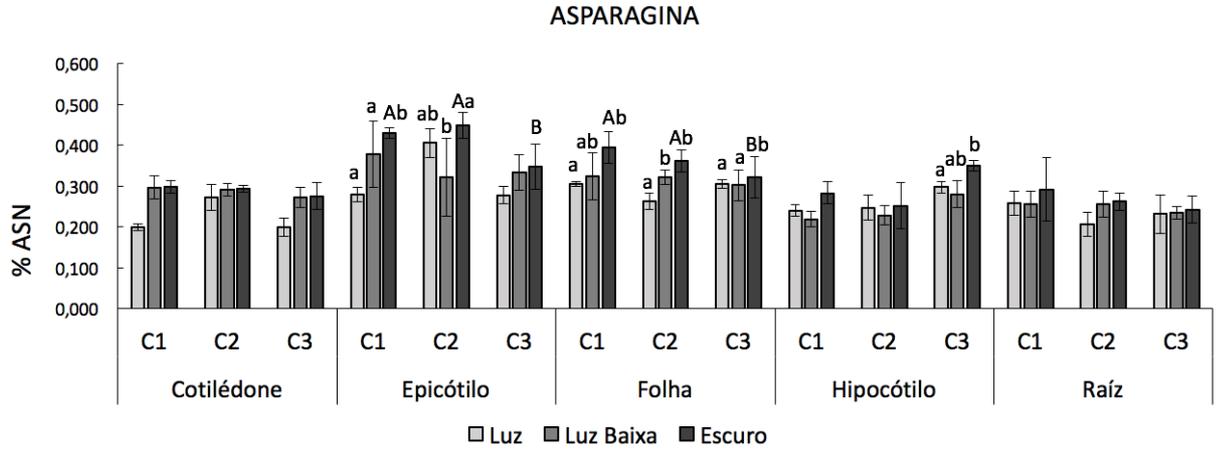
Pelas análises de CLAE foi possível detectar 14 aminoácidos nos diferentes órgãos de soja observados no experimento, sendo eles: Arginina (ARG), Lisina (LYS), Asparagina (ASN), Serina (SER), Histidina (HIS), Fenilalanina (PHE), Ácido aspártico (ASP), Ácido glutâmico (GLU), Glutamina (GLN), Isoleucina (ILE), Valina (VAL), Alanina (ALA), Glicina (GLY) e Tirosina (TYR). No entanto, alguns aminoácidos não foram detectados em todos os órgãos da plântula, tais como lisina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina, isoleucina, valina, alanina, glicina e tirosina (Anexo 1).

Dos 14 aminoácidos detectados pela cromatografia, 11 tiveram alguma diferença estatística significativa em algum dos órgãos e tratamentos realizadas no experimento. Arginina mostrou diferença significativa para raiz na coleta 2, com valores mais baixos durante o tratamento no Escuro (Anexo 1; Figura 12-A). Lisina apresentou alteração em hipocótilo na coleta 1 e coleta 2, mostrando valores mais altos do aminoácido durante o Escuro (Anexo 1; Figura 12-B). Asparagina demonstrou em geral os maiores valores de porcentagem em comparação aos demais aminoácidos, com mudanças significativas em epicótilos nas três coletas e entre as coletas no tratamento Escuro, nas folhas nas três coletas e entre as coletas também no Escuro, e em hipocótilo entre os tratamentos na coleta 3, exibindo maiores valores durante o Escuro em comparação a Luz Normal e Luz Baixa (Anexo 1; Figura 12-C). Serina apresentou alterações em epicótilos nos tratamentos nas três coletas e entre as coletas no tratamento Escuro, exibindo valores mais baixos no tratamento Luz Normal e aumentando de Luz Baixa para Escuro, da mesma maneira em hipocótilos na coleta 2 (Anexo 1; Figura 12-D). Histidina exibiu mudanças significativas em epicótilo nos tratamentos nas três coletas e entre as coletas no tratamento Escuro, entre os tratamentos na raiz na coleta 1 e hipocótilo na coleta 2 os valores no Escuro foram significativamente maiores (Anexo 1; Figura 12-E). Fenilalanina apresentou diferenças em epicótilo entre as coletas no tratamento Escuro e entre os tratamentos nas três coletas, com valores sempre maiores durante o Escuro, assim como em folhas na coleta 1 e hipocótilos na coleta 2 (Anexo 1; Figura 12-F). Ácido glutâmico apresentou mudanças em epicótilos nos tratamentos nas três coletas e entre as coletas no tratamento Escuro, com valores significativamente menores no tratamento de Luz baixa em comparação a Luz Normal e Escuro (Anexo 1; Figura 12-A). Isoleucina demonstrou diferenças em epicótilos na coleta 1, exibindo valores maiores do aminoácido durante o tratamento Escuro (Anexo 1; Figura 12-G). Em Valina foi possível observar mudanças significativas em epicótilos nos tratamentos na coleta 2 e 3 e entre as

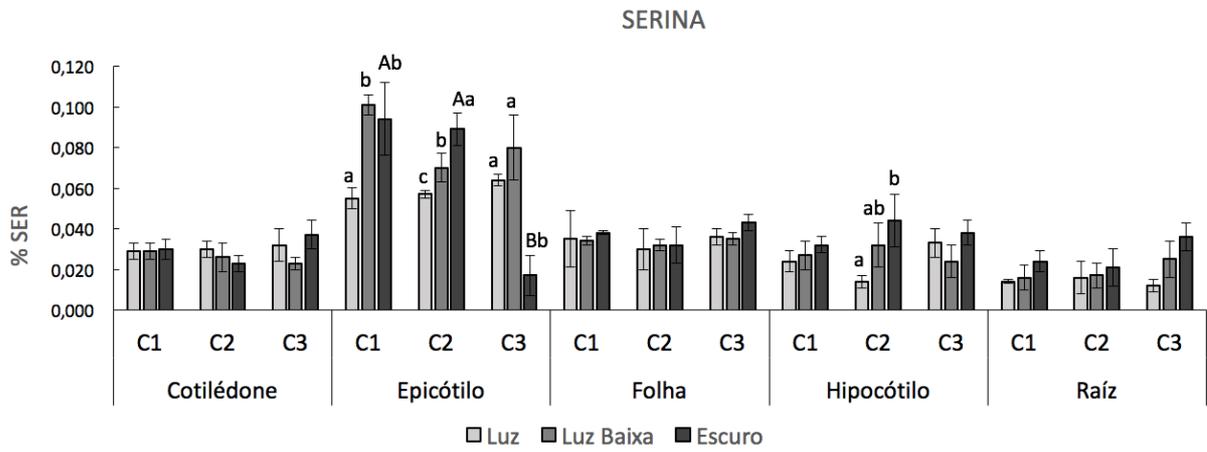
coletas no tratamento Escuro, e entre os tratamentos em hipocótilos nas coletas 1 e 2, com valores sempre menores em Luz Normal e maiores em Luz Baixa e Escuro (Anexo 1; Figura 12-I). Para Alanina as alterações significativas foram nas raízes nas coletas 1 e 2, exibindo os maiores valores durante o tratamento de Luz Normal (Anexo 1; Figura 12-J). Em Glicina houve diferenças nos cotilédones da coleta 2 e 3, hipocótilo na coleta 1 e raízes na coleta 3, demonstrando sempre valores bem maiores no tratamento de Luz Normal (Anexo 1; Figura 12-K).



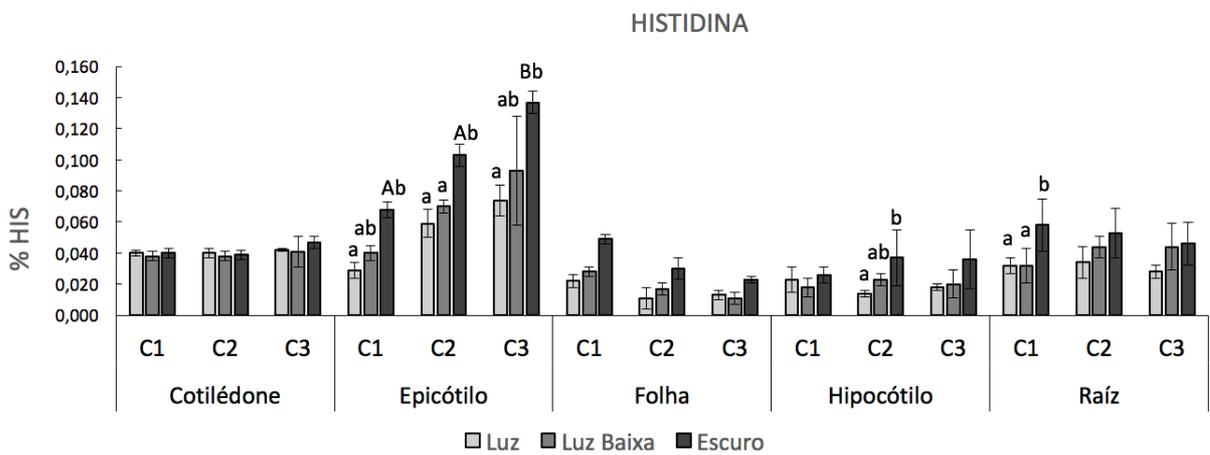
C



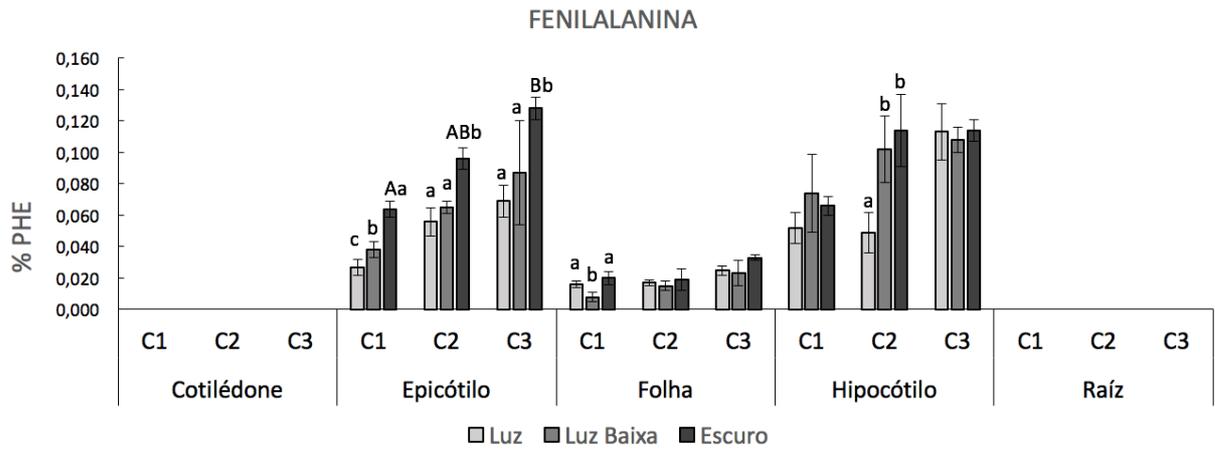
D



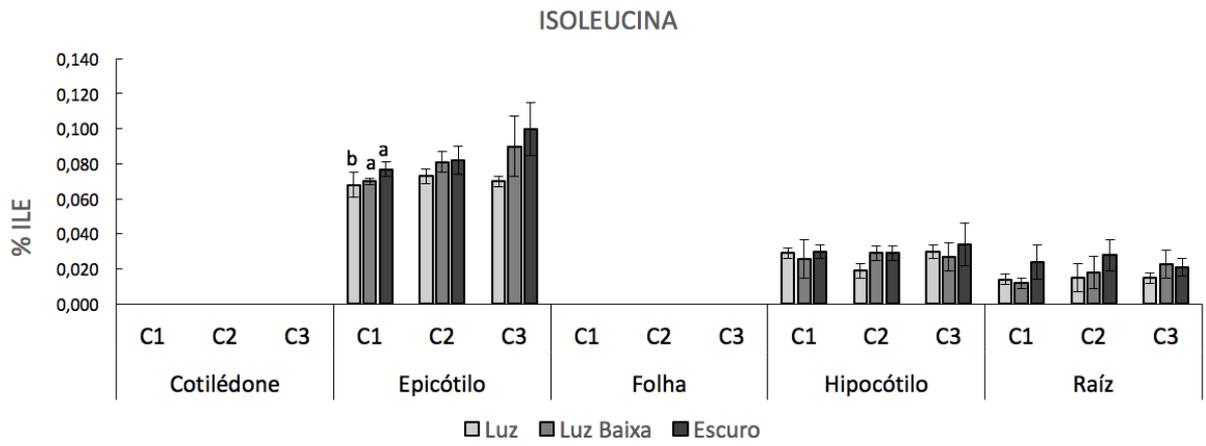
E



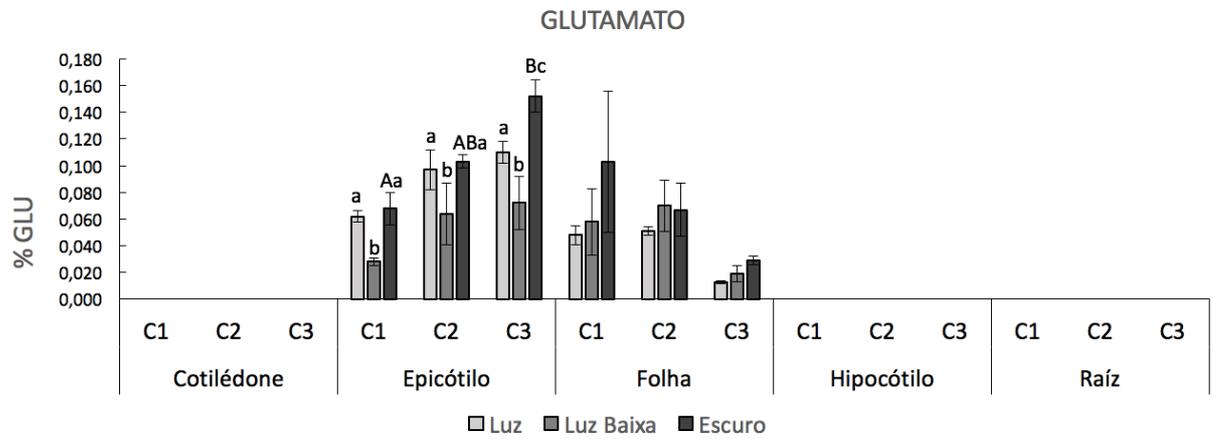
F



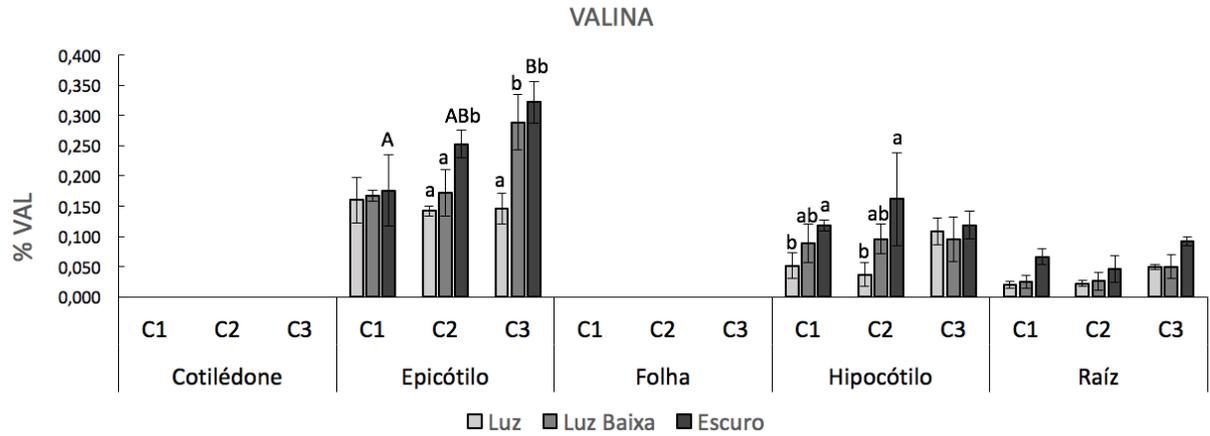
G



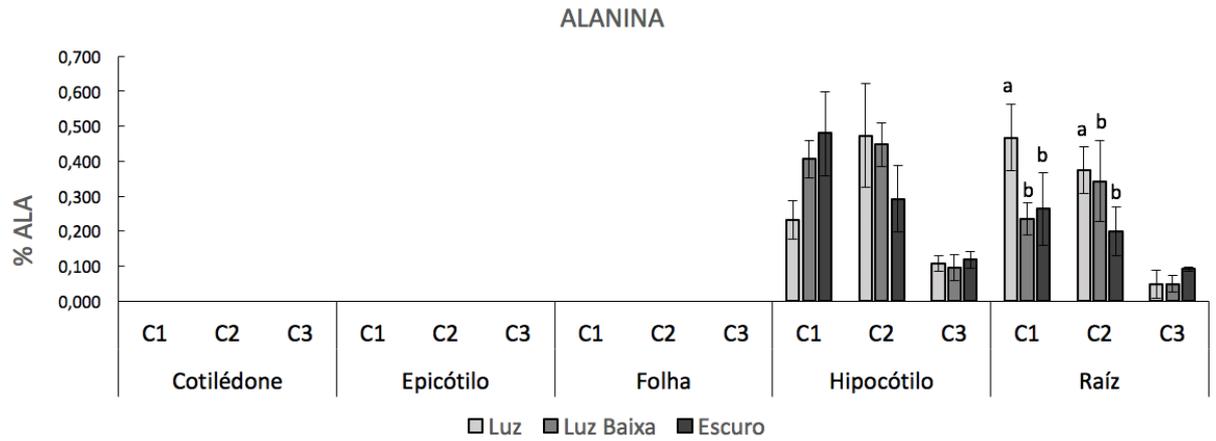
H



I



J



K

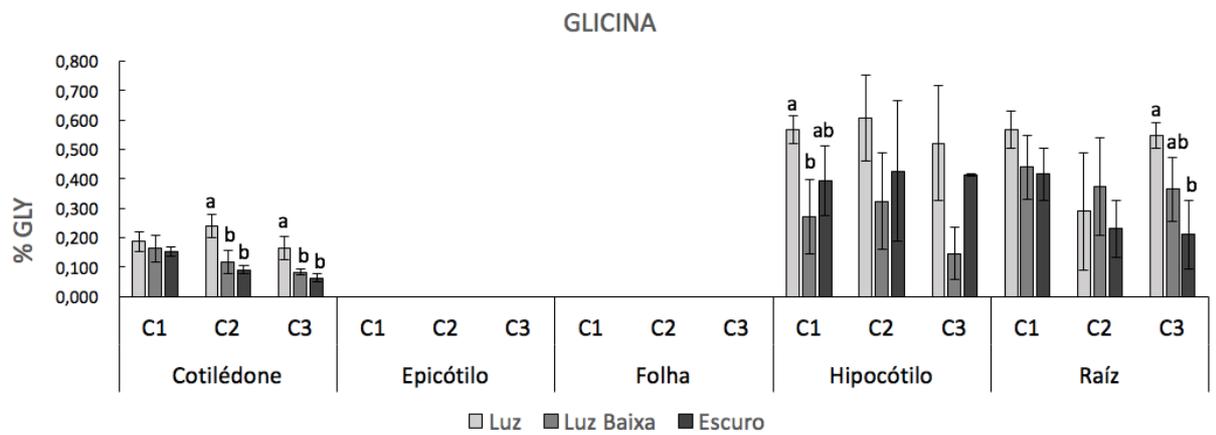


Figura 12. Porcentagem de massa seca dos aminoácidos detectados por CLAE nos diferentes tratamentos e órgãos da plântula de soja. A: Arginina; B: Lisina; C: Asparagina; D: Serina; E: Histidina, F: Fenilalanina; G:

Isoleucina, H: Glutamato, I: Valina, J: Alanina; K: Glicina. As letras representam as diferenças estatísticas entre os tratamentos e coletas. Letras maiúsculas representam diferenças entre as coletas e minúsculas representam diferenças entre os tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de probabilidade adotado de 0,05. Valores em média e desvio padrão. C1: Coleta 1 (6h), C2: Coleta 2 (18h), C3: Coleta 3 (6h).

8 DISCUSSÃO

8.1 DESENVOLVIMENTO DA PLÂNTULA

As folhas apresentaram diferenças significativas nos valores de massa seca, mostrando valores mais altos sob o tratamento com luminosidade de $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 7). A fixação do carbono e a expansão da folha ocorrem a taxas mais elevadas durante o dia e em ambientes com luz (Pal et al., 2013; Sulpice et al., 2014). Em um estudo anterior plântulas de soja também tiveram ganho em massa seca quando cultivadas na luz, e os cotilédones por realizarem fotossíntese elevaram as taxas de formação de sacarose (da mobilização de reservas e/ou fotossíntese) para exportação para os tecidos que crescem rapidamente na plântula (Brown & Huber, 1987).

A menor quantidade de massa seca nas folhas crescidas no escuro está relacionada com a mobilização das reservas e investimento para energia e crescimento da plântula. Uma plântula que se desenvolve em um ambiente escuro deve superar o desafio de crescer tentando encontrar luz. Para isso a planta se desenvolve por meio do crescimento heterotrófico utilizando as reservas depositadas nos cotilédones (Seluziaki et al., 2017). O balanço energético é fundamental para o crescimento das plântulas no escuro, uma vez que são ainda mais dependentes das suas reservas para gerar energia. Por exemplo, em plantas de *Arabidopsis* a principal fonte de energia para o crescimento estiolado provém de ácidos graxos armazenados no embrião e no endosperma, o que é importante pois pelo catabolismo desses ácidos graxos são produzidos açúcares pelo ciclo de glioxilato e gliconeogênese (Eastmond et al., 2000; Penfield et al., 2004; Rylott et al., 2003).

Sabe-se que a luz promove a fotomorfogênese, caracterizando a desaceleração do alongamento do epicótilo e hipocótilo, expansão dos cotilédones, aumento da síntese de antocianinas e amadurecimento de cloroplastos, incluindo montagem da maquinaria fotossintética e elaboração de membranas internas (Arnim & Deng, 1996). Na ausência de luz ou luz limitada, a plântula passa a utilizar a escotomorfogênese ou crescimento estiolado (Arsovski et al., 2012; Seluziaki et al., 2017). No presente estudo estes padrões morfológicos foram observados no tratamento de Escuro, caracterizando plântulas com epicótilo alongado e folhas reduzidas, o que também está de acordo com os dados de massa fresca e massa seca. (Figura 6; Figura 7). Todavia, esse crescimento acelerado no epicótilo teve um maior predomínio de teor de água do que de massa seca, isso pode estar relacionado ao alongamento celular que ocorre a partir da absorção de água por uma diferença de pressão osmótica (Schopfer, 2006). Foi possível observar diferenças para a massa seca entre as coletas para

epicótilos no tratamento de Escuro, observando um aumento da massa seca entre os diferentes tempos de coleta, indicando que o epicótilo está crescendo mais rápido que os demais órgãos e há um aumento desse peso principalmente durante noite, entre a coleta dois e três do experimento. Como era esperado, a proporção de água superou a proporção de massa seca, fato relacionado ao crescimento da plântula e seu alongamento celular, que ocorre a partir da absorção de água e acúmulo de solutos na célula durante os períodos iniciais de desenvolvimento (Schopfer, 2006).

As plântulas no Tratamento Luz Baixa de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ apresentaram em geral valores mais baixos de biomassa quando comparados ao Tratamento de Luz Normal (Tabela 2), com epicótilos levemente estiolados e folhas de tamanhos reduzidos (Figura 5), semelhante ao que foi encontrado por Liu et al, 2017, onde as plântulas de soja que foram submetidas a luminosidade reduzida pelo efeito do sombreamento tiveram redução na biomassa. Demonstrando assim que a baixa luminosidade leva a um declínio no rendimento e consequentemente valores mais baixos de biomassa e indicando que a plântula possa estar também usando as reservas como fonte de energia para o seu crescimento e desenvolvimento inicial (Liu et al., 2017).

8.2 DISTRIBUIÇÃO DE CARBONO E NITROGÊNIO

Os diferentes órgãos que foram analisados da plântula, com exceção das raízes, apresentaram em geral maiores valores de Carbono Total durante o tratamento de Luz 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, valores um pouco mais reduzidos nas plântulas do tratamento Luz Baixa 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, seguidas por valores menores das plântulas no Escuro (Figura 9). Nas folhas foi possível observar diferenças entre as coletas, mostrando que durante o tratamento de Luz Normal a taxa de Carbono aumentou entre as coletas, apresentando valores maiores na última coleta do experimento. Em outros estudos com plantas submetidas ao escuro prolongado foi possível observar que as concentrações de açúcar e amido diminuíram ao longo do tempo em todos os órgãos da planta (Slot & Kitajima, 2015; Avin-Wittenberg et al., 2015).

Sabe-se que muitas plantas armazenam parte dos fotoassimilados como amido durante o dia e os remobilizam para sustentar o metabolismo e o crescimento à noite. Sendo assim, as alterações que ocorrem no fotoperíodo e relógio biológico (tais como dias curtos/longos, escuro prolongado, etc.) podem alterar a regulação da degradação do amido e resultar em um menor desenvolvimento da planta (Stitt & Zeeman, 2012). A luz é a única fonte de energia para a assimilação fotossintética de CO_2 , dessa forma, foi possível notar que apesar da limitação de luminosidade nas plântulas do tratamento Luz Baixa, a proporção de carbono total não foi tão discrepante em relação as plantas na Luz Normal. As folhas apresentaram diferenças estatísticas significativas para carbono total entre os tratamentos, indicando que durante o Escuro o carbono foi reduzido. Isso pode estar ligado ao fato das plântulas estarem utilizando mais as reservas por estarem com falta de carbono, assim como observado por Fernandez et al., (2017) após a diminuição da intensidade da luz, a taxa de acumulação de amido declina em proporção ao declínio da fotossíntese.

Ao observar a proporção de Nitrogênio Total nas plântulas é possível perceber que, assim como em Aminoácidos Totais, os valores para quase todos os órgãos foram gradativamente aumentando do tratamento Luz para Luz Baixa e Escuro durante as três coletas do experimento (Figura 10). Isso pode estar indicando que durante os momentos de pouca luminosidade pode estar havendo uma maior degradação de proteínas e aumento da concentração de aminoácidos livres e o seu direcionamento para prover energia para os órgãos em crescimento. No entanto para cotilédones e raízes que não apresentaram diferenças no aumento de aminoácidos livres, outro tipo de reserva pode estar sendo degradado, tal como amido, açúcares e lipídeos. Além disso houve também uma diminuição de massa seca nos tratamentos de Luz Baixa e Escuro, sendo que em plantas de *Arabidopsis* foi observado que

baixos níveis de nitrogênio resultam em uma redução significativa do tamanho dos cotilédones e plântulas, peso fresco, clorofila e antocianinas (Martin et al., 2002).

8.3 AMINOÁCIDOS

8.3.1 AMINOACIDOS TOTAIS

As proporções de aminoácidos totais variaram em geral de forma oposta aos valores de massa seca, ou seja, o tratamento de Luz proporcionou valores mais altos em massa seca e menores proporções de aminoácidos totais, em contrapartida as plântulas no Escuro apresentaram maiores quantidades de aminoácidos (Figura 8). Sendo assim, indica-se que haja menor atividade proteolítica significativa nos diferentes tecidos da plântula durante o tratamento de Luz, ou seja, nos ciclos normais de luz/escuro. No entanto, observa-se mudanças no metabolismo dos aminoácidos sob tratamento em baixa luminosidade e principalmente, indica-se haver início da proteólise relacionada a falta de carbono quando as plântulas estão submetidas ao escuro. De forma semelhante foi encontrado alterações na quantidade de proteínas em plantas de milho sob condições de fotoperíodo normal e escuro prolongado, observando-se uma diminuição de proteínas após 48h de escuro (Brouquisse, 1998), mostrando que a degradação de proteína está ligada a um aumento nas atividades proteolíticas e à liberação de nitrogênio protéico na forma de aminoácidos, particularmente Asparagina (Asn), e NH_4^+ , no qual pode ser observado nas análises de aminoácidos (Hust & Sudia, 1973).

Provenientes da degradação de proteínas, os aminoácidos podem ser utilizados como fonte de energia para o metabolismo da plântula. Em situações de baixa de carbono, como nas plântulas submetidas a pouca luminosidade ou ao escuro, as plântulas podem utilizar substratos alternativos para o seu desenvolvimento e crescimento, tais como os esqueletos de carbono provenientes do catabolismo de aminoácidos (Araújo et al, 2012).

O epicótilo foi o tecido que apresentou maior proporção de aminoácidos totais, principalmente no tratamento de Escuro, sendo que esses valores aumentaram gradativamente entre as três coletas do experimento, alcançando maiores valores na última coleta (Figura 8). Evidenciado por Araújo et al., (2012), durante o período de senescência, componentes celulares como proteínas e lipídios são degradados e mobilizados para uso em outras partes das plantas. Sendo assim, quando o nível de proteínas cai durante a senescência há uma liberação de nitrogênio e demais metabólitos que serão transportados via floema para outros tecidos que estão crescendo, como epicótilos (Araújo et al., 2012; Brouquisse, 1998; Muntz et al., 2001).

As plântulas tiveram proporções mais baixas de aminoácidos livres no tratamento Luz, em contrapartida valores mais altos em massa seca (Figura 7; Figura 8). As plântulas sob essa

condição tinham além das reservas proteicas estocadas nos cotilédones, a produção de fotoassimilados resultantes da fotossíntese realizada pelas folhas e pelos cotilédones que sob presença de luz tornam-se também fotossintetizantes (Harris et al., 1986).

8.3.2 AMINOÁCIDOS POR CLAE

Dos 11 aminoácidos que apresentaram diferenças estatísticas significativas nos órgãos e tratamentos observados, Lisina, Asparagina, Serina, Histidina, Fenilalanina, Ácido glutâmico, Isoleucina e Valina exibiram maiores valores durante os tratamentos de Luz Baixa e Escuro (Tabela 3). Apenas os aminoácidos Arginina, Alanina e Glicina demonstraram maiores valores em Luz Normal para os órgãos e tratamentos que tiveram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 3). Sabe-se que os aminoácidos possuem várias funções importantes nas plantas, além do seu papel como constituinte proteico, também são peças fundamentais em diversos processos fisiológicos tais como crescimento e desenvolvimento da planta, controle intracelular do pH, geração de energia e sinalização a estresses. Além disso, muitos aminoácidos representam precursores para a biossíntese de outros compostos nitrogenados tais como nucleotídeos, fitormônios ou metabólitos secundários (Hildebrandt et al., 2015).

Compreender o metabolismo vegetal é um desafio, frente a complexidade em entender as vias, o transporte de elétrons mitocondriais e outros processos ativos na planta. A compreensão da regulação das respostas das vias clássicas e alternativas da respiração sob desenvolvimento de plantas e deficiência de recursos tem sido alvo de diversos estudos. O catabolismo dos aminoácidos pode contribuir para entender o estado de energia das células vegetais em condições fisiológicas em que as plantas podem estar sob estresse, como por exemplo na “fome de carbono”, condição que indica falta de carbono para a planta se desenvolver e realizar processos necessários para sua sobrevivência. Isto pode estar acontecendo nas plântulas de soja submetidas a condições de baixa ou ausência total de luminosidade, uma vez que os resultados mostram um maior nível desses metabólitos durante essas condições, sugerindo um direcionamento para catabolismo desses aminoácidos para prover energia aos órgãos em crescimento. Durante a privação de carbono as proteínas são degradadas e os seus aminoácidos catabolizados podem contribuir para a produção de energia necessária para os órgãos na plântula (folhas ou raízes sob estresse, por exemplo) (Hildebrandt et al., 2015). Os resultados avaliados pela cromatografia (Tabela 3) são semelhantes aos encontrados pela análise de Aminoácidos Totais por Ninidrina (Figura 8), onde observa-se um acúmulo de aminoácidos nos tratamentos de Luz Baixa e Escuro. Isso corrobora com uma de nossas hipóteses, de que em condições de baixa luminosidade pode estar sendo aumentada a degradação de proteínas e havendo um maior direcionamento dos aminoácidos para geração de energia.

Durante certas condições, como a falta de carbono, é observado que os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs - *branchedchain amino acids*) estão envolvidos na resposta ao estresse. Joshi et al., (2010) consideram que o acúmulo de aminoácidos livres em resposta ao estresse abiótico desempenha um papel de tolerância, e nessas condições de falta de luminosidade há um acúmulo de BCAAs. Outros estudos mostram que em plantas de *Arabidopsis* os produtos de degradação de aminoácidos de cadeia ramificada e aminoácidos aromáticos fornecem elétrons diretamente a cadeia de transporte de elétrons através do complexo da flavoproteína de transferência de elétrons (ETF) ou indiretamente pelos produtos catabólicos que alimentam o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (Araújo et al., 2010; Araújo et al., 2012). No presente estudo foi observado aumento significativo de aminoácidos de cadeia ramificada: Isoleucina e Valina, e do aminoácido aromático: Fenilalanina, em condições de baixa luminosidade e escuro (Tabela 3). Corroborando com outra de nossas hipóteses, de que os BCAAs e AAs aromáticos podem estar sendo usados para gerar energia. Outros estudos demonstram que sob condições de estresse abiótico há o acúmulo de BCAAs, e os aminoácidos resultantes da degradação de proteínas são doadores de elétrons diretos e indiretos para produzir ATP (Obata & Fernie, 2012), semelhante ao encontrado por Araújo et al., (2012).

O catabolismo de aminoácidos alimenta a via da ETF, catalisadas pela isovaleril-CoA desidrogenase e 2-D-hidroxioglutarato desidrogenase (Galili et al., 2016). Araújo et al., (2011) sugerem que a Lisina também pode ser degradada via 2-hidroxioglutarato. Sendo assim, a doação de elétrons para o sistema de transferência de elétrons ocorre via catabolismo de BCAAs e AAs aromáticos no caso da isovaleril-CoA desidrogenase e pelo catabolismo de AAs aromáticos e principalmente Lys no caso de 2-D-hidroxioglutarato desidrogenase. O fornecimento de elétrons para cadeia de transporte de elétrons mitocondrial pela degradação de BCAAs, AAs aromáticos e Lys, representa uma forte conexão entre o metabolismo de aminoácidos e o TCA (Galili et al., 2016).

A autofagia é um mecanismo catabólico para reciclagem de macromoléculas e proteínas e permite a manutenção de pools de aminoácidos e a remobilização de nutrientes. Barros et al., 2017 estudaram a importância metabólica da autofagia frente ao desenvolvimento vegetal em condição de escuro prolongado, mostrando que em plantas mutantes de *Arabidopsis* com disrupção de autofagia houve senescência precoce, incluindo diminuição do conteúdo de clorofila e eficiência fotoquímica. Além disso, o perfil metabólico de folhas sob condição de escuro mostrou uma extensa reprogramação metabólica na qual os aumentos nos níveis de aminoácidos foram observados. Sendo assim, durante a senescência

causada pela falta de luminosidade, a isovaleril-CoA desidrogenase e a D-2-hidroxioglutarato desidrogenase atuam como doadores de elétrons alternativos ao pool de ubiquinona. Essa reprogramação metabólica pode resultar no aumento dos intermediários do ciclo TCA e dos níveis de aminoácidos totais, assim como a diminuição de proteínas e amido (Pires et al., 2016).

Sabe-se que as plântulas de soja apresentam, além das folhas, os cotilédones com capacidade fotossintética. Antes do processo de senescência, cotilédones mobilizam para outras partes da planta os metabólitos necessários para o desenvolvimento do vegetal. Estes processos são conduzidos por regulação gênica ao longo do crescimento vegetal. As folhas passam por várias mudanças ao longo do seu crescimento, sendo que à medida que uma folha nova se expande e ganha competência fotossintética, ela passa a ser fonte para outras partes da planta, e depois passa pela senescência conforme os nutrientes são mobilizados e exportados antes da abscisão foliar. Foi possível observar que para Asparagina as folhas apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos nas três coletas realizadas, mostrando que durante o escuro o nível desse aminoácido foi maior. Isso pode ser observado também na análise de Ninidrina. Em contrapartida, as folhas apresentaram maiores valores de Massa Seca e Carbono Total quando estavam no tratamento com luminosidade normal. Demonstrando que durante o processo de senescência e escuro, as plântulas possuem mais aminoácidos livres que podem estar sendo utilizados para gerar energia, ou que a falta de energia pode está impedindo a utilização dos aminoácidos livres para a produção de novas proteínas, uma vez que os níveis de carbono e massa seca são reduzidos nessas condições (Brown & Hudson, 2015).

A Asparagina foi o aminoácido que apresentou maiores valores de porcentagem e mostrou diferenças significativas principalmente no Escuro em epicótilos, folhas e hipocótilos (Tabela 3). A Asparagina é uma importante forma de nitrogênio (N) armazenado ou transportado nas plantas (Kambhmoati et al., 2017). As principais rotas de catabolismo de Asn é a reação de desaminação e liberação de Asp e amônio, catalisada pela asparaginase (ASPG), passo necessário para transformar Asn da forma armazenada de N em outros AAs. Outra rota do catabolismo de Asn envolve a transaminação do grupo α -amino de Asn para um aceptor de 2-oxoácido, produzindo 2-oxossuccinato, seguido por sua hidrólise para formar oxaloacetato e amônia. O nitrogênio também pode ser removido dos aminoácidos por reações de desaminação produzindo 2-oxoácidos e amônio. Serina e treonina também podem ser diretamente desaminadas por desidratases (Kambhmoati et al., 2017).

Ainda nos tratamentos de pouca ou nenhuma luminosidade, Glutamato e Histidina também tiveram mudanças significativas, apresentando maiores níveis nesses tratamentos. O nitrogênio absorvido ou produzido é inicialmente assimilado em glutamina (Gln) e Glutamato (Glu) (Ohyama, 2017). A quebra do Glutamato pode ser conseguida por desaminação oxidativa a 2-oxoglutarato. A descarboxilação do glutamato pelas glutamato-decarboxilases produz o γ -aminobutírico (GABA). Estudos mostram uma associação do GABA com o metabolismo central sob privação de carbono, indicando que ele pode desempenhar um papel na coordenação do balanço de carbono-nitrogênio e até mesmo mediar uma resposta de “fome de carbono” (Hildebrandt et al., 2015). Foi observado que plantas com alterações nos níveis das enzimas do TCA mostraram apenas pequenas alterações em respiração nos tecidos fotossintetizantes. No entanto, a inibição de 2-oxoglutarato desidrogenase teve um impacto na respiração e no metabolismo de aminoácidos. Portanto, acredita-se que a manutenção de 2-oxoglutarato através das etapas iniciais do TCA esta envolvida na regulação da atividade do TCA e no metabolismo de aminoácidos (Dongen et al., 2010; Araújo et al., 2012). Enquanto o metabolismo de grande parte dos aminoácidos é amplamente discutido na literatura, o catabolismo de Histidina em plantas permanece ainda pouco investigado (Galili et al., 2016; Hildebrandt et al., 2015).

As diferenças vistas entre os tratamentos podem ser resultado de alterações do relógio circadiano, uma vez que o metabolismo vegetal é regulado por fatores ambientais, tais como a disponibilidade de luz e nutrientes. A regulação do relógio circadiano é proposta para elucidar a importância dos ritmos circadianos no desenvolvimento vegetal e seu crescimento. Análises de expressão gênica em diferentes espécies vegetais sugerem que o relógio circadiano regula a transcrição de várias enzimas envolvidas no metabolismo primário vegetal (Farré & Weise, 2012). Alterações na regulação do relógio circadiano pode ser observado por mutantes de *Arabidopsis* que exibem mudanças significativas nos níveis de metabólitos, onde há um aumento de intermediários do TCA, incluindo aminoácidos (Fukushima et al., 2009). As alterações no presente estudo foram vistas principalmente em relação às plântulas que permaneceram em condições de pouca ou nenhuma luminosidade. Acredita-se que o escuro é um importante sinal para as plantas e um momento em que se desenvolvem ativamente por meio da regulação gênica e de alterações bioquímicas. Ou seja, embora as plantas não possuam “receptores de escuro”, o fato dos fotorreceptores estarem inativos facilita a ativação e inibição dos processos que acontecem em condições de escuro, sendo assim, a própria escuridão pode ser considerada um sinal por desencadear uma série de respostas no metabolismo das plântulas sob tal condição (Gommers & Monte, 2018).

Alguns órgãos das plântulas de soja apresentaram maior massa fresca, massa seca ou % de massa seca no tratamento de Luz Normal (Tabela 2). Em contrapartida, grande parte dos dados de Aminoácidos por Ninidrina e Aminoácidos por CLAE indicam menores valores no tratamento de Luz Normal. Durante o crescimento vegetal, a biossíntese de aminoácidos das células fotossintéticas é regulada para fornecer substrato para a síntese proteica. Sendo assim, durante esse estágio a degradação de proteínas e catabolismo de aminoácidos são menos importantes e em ausência de estresse, proteínas e aminoácidos são proporcionados para utilização na biossíntese (Hildebrandt et al., 2015). No entanto, pelas análises de cromatografia, os aminoácidos: Arginina, Alanina e Glicina tiveram maiores porcentagens nos tratamentos de Luz Normal. A Arginina é muito utilizada no transporte e armazenamento de nitrogênio. Dessa maneira, a mobilização de nitrogênio requer a degradação da arginina e enzimas envolvidas podem ser induzidas durante a germinação. A Arginina é hidrolisada na mitocôndria pela Arginase e produz ureia e ornitina. Já a degradação da Glicina ao dióxido de carbono e amônio é catalisada por um sistema multienzimático glicina-descarboxilase. O sistema de clivagem da glicina em plantas C3 é para a fotorrespiração, uma vez que as enzimas envolvidas são fortemente induzidas pela luz e podem se tornar as proteínas mais abundantes da matriz mitocondrial durante o dia (Douce et al., 2001). Para outros aminoácidos as rotas catabólicas podem ser mais curtas. Como no caso da Alanina, que é diretamente convertida em piruvato pelas alanina-aminotransferase (Hildebrandt et al., 2015).

Alanina, Arginina e Glicina, os aminoácidos que apresentaram diferenças estatísticas durante o tratamento de Luz Normal, mostraram aumento principalmente nas raízes. Sabe-se que as folhas são os principais produtores de fotoassimilados por meio da fotossíntese e esses produtos podem ser transportados e armazenados temporariamente em órgãos de reserva ou drenos, tais como as raízes. Pela análise de Carbono Total também foi possível observar que as raízes apresentaram menores porcentagens de carbono nas coletas 2 e 3 no tratamento de Luz Normal (Figura 9), em contraponto, as folhas apresentaram maiores porcentagens de carbono durante os tratamentos de luz. Sendo assim, essas plântulas mostram que apesar da quantidade de carbono nas raízes ter sido menor durante o tratamento de Luz Normal, há um aumento desses aminoácidos (Ala, Gly e Arg) nessa condição. A energia disponível é chave para o metabolismo e influencia o crescimento e desenvolvimento das plantas. Dessa maneira, as plantas obtêm a energia através da captação de energia luminosa por meio da fotossíntese e pela oxidação de substratos orgânicos pela respiração mitocondrial, esse processo é dependente de carboidratos pelo ciclo TCA. Nas condições em que os carboidratos se tornam limitantes, tais como analisados por estresse de falta de luminosidade e senescência, as plantas

passam a usar substratos alternativos, como lipídeos e aminoácidos, mantendo assim o metabolismo mitocondrial ativo, por meio da geração de elétrons que podem ser transferidos para a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial pelo sistema ETF (Barros et al., 2017).

9 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível constatar que houveram diferenças entre os tratamentos utilizados no estudo e que as plântulas mostraram um maior acúmulo de aminoácidos nos tratamentos com pouca ou nenhuma luminosidade, tais como epicótilos e folhas que apresentaram aumentos significativos nos níveis de Aminoácidos Totais Livres que foram também refletidos nas análises de Nitrogênio Total.

Por meio das análises de CLAE foi possível observar os aminoácidos envolvidos durante a proteólise no escuro e em baixa luminosidade, corroborando com as hipóteses que nas condições de escuro e baixa luminosidade a taxa de degradação de proteínas é acelerada para fornecer energia e que os aminoácidos de cadeia ramificada podem estar sendo catabolizados e utilizados como fonte de Carbono e Nitrogênio em condições de “fome de carbono”. Esse método se mostrou adequado para atingir os objetivos propostos no estudo e corroborar com as hipóteses testadas.

O metabolismo vegetal apresenta grande complexidade e estudos que ajudem a compreender esse metabolismo ao longo da germinação e crescimento inicial tornam-se necessários e podem oferecer informações úteis para o conhecimento agrônomo da espécie, permitindo auxílios em estudos futuros e também aplicação na melhoria da qualidade da espécie. Além disso os resultados poderão ser utilizados para futura modelagem metabólica, permitindo analisar as vias metabólicas ao longo do crescimento inicial sob diferentes condições de luminosidade.

10 PLANO DE PUBLICAÇÃO

A partir dos resultados da pesquisa pretende-se submeter um artigo científico intitulado “A influência da luz na mobilização de reservas durante o crescimento inicial de soja (*Glycine max* (L.) Merr)” para a revista: Journal of Plant Physiology (B1).

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.E.P.; GARCIA, Q.S. **Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de *Xyris* L. (Xyridaceae) ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil.** Acta bot. Bras, 19(1): 149-154, 2005.

AGUIAR, I.B.; PINÃ-RODRIGUES, F.C.M. & FIGLIOLIA, M.B. **Sementes Florestais Tropicais.** AGUIAR I.B.; PINÃ-RODRIGUES, F.C.M., & FIGLIOLIA, M.B. eds., Brasília: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes – ABRANTES, 1993.

AGRAWAL, G.K.; HAJDUC, M.; GRAHAM, K.; THELEN, J.J. **In-Depth Investigation of the Soybean Seed-Filling Proteome and Comparison with a Parallel Study of Rapeseed.** Plant Physiology 148: 504–518, 2008.

ARAÚJO, W.L. et al., **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: 1549–1563. 2010.

ARAÚJO, W.L. et al., **Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants.** Trends in plant science, 16(9), pp.489–98, 2011.

ARAÚJO W.L. et al., **Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues.** Plant, cell & environment. 35:1-21, 2012.

ARNIM, A.V.; DENG, X.W. **Ligth control of seedling development.** Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 215–43, 1996.

ARSOVSKI, A.A.; GALSTYAN, A.; GUSEMAN, J.M.& NEMHAUSER, J.L. **Photomorphogenesis.** Arabidopsis Book 10e0147, 2012.

ARTUZO, F.D. et al. **Gestão de custos na produção de milho e soja.** Rev. Bras. Gest. Neg. São Paulo v.20 p.273-294. 2018

AVIN-WITTENBERG, T. et al. **Global Analysis of the Role of Autophagy in Cellular Metabolism and Energy Homeostasis in Arabidopsis Seedlings under Carbon Starvation.** The plant cell. 2015

BARROS, J.A.S. et al. **Autophagy deficiency compromises alternative pathways of respiration following energy deprivation in *Arabidopsis thaliana*.** Plant Physiology, pp.16.01576. 2017.

BEEVERS, L. **Protein Degradation and Proteolytic Activity the Cotyledons of Germinating Pea Seeds (*Pisum sativum*).** Phytochemistry, 7: 1837-1844, 1968.

BEWLEY, J.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination.** Plenum Press: New York. 2º ed. 445 p. 1994.

- BORGHETTI, F. **Dormência embrionária.** In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (eds.) *Germinação do básico ao aplicado.* Porto Alegre: Artmed. pp. 149-162, 2004.
- BLACK, R. **Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva.** In: CÂMARA, G. (ed) *Soja: Tecnologia de Produção II.* ESALQ. pp. 1–20, 2000.
- BROUQUISSE, R.; GAUDILLÉRE, J.P.; RAYMOND, P. **Induction of a Carbon-Starvation-Related Proteolysis in Whole Maize Plants Submitted to Light/Dark Cycles and to Extended Darkness.** *Plant Physiol.* 117: 1281–1291, 1998.
- BROWN, A.N.; HUDSON, K.A. **Developmental profiling of gene expression in soybean trifoliolate leaves and cotyledons.** *BMC Plant Biology* 15:169, 2015.
- BROWN, C.S.; HUBER, S.C. **Photosynthesis, Reserve Mobilization and enzymes of sucrose metabolism in soybean (*Glycine max*) cotyledons.** *Physiol. Plantarum*, 70: 537-543, 1987.
- BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A. **Acúmulo de Reservas.** In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (eds.) *Germinação do básico ao aplicado.* Porto Alegre: Artmed, pp. 31-50, 2004.
- CASAL, J.J.; SÁNCHEZ, R.A.; BOTTO, J.F. **Modes of action of phytochromes.** *Journal of Experimental Botany*, 49: 127–138, 1998.
- CASAL, J.J.; SÁNCHEZ, R.A. **Phytochromes and seed germination.** *Seed Science Research*, New Delhi, 8: 17- 329, 1998.
- CASAL, J.J.; YANOVSKY, M. **Regulation of Gene Expression by Light.** *Int. Dev. J. Biol.* 49: 501-511, 2005.
- CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W. **Embebição e reativação do metabolismo.** In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (eds.) *Germinação do básico ao aplicado.* Porto Alegre: Artmed. pp. 149-162, 2004.
- CHORY, J.; CHATTERJEE, M.; COKK, R.K.; ELICH, T.; FANKHAUSER, C.; LI, J.; NAHPAL, P.; NEEF, M.; PEEPER, A.; POOLE, D.; REED, J.; VITART, V. **From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12066-12071, 1996.
- CHUNCHUI, Z. **The community-level effect of light on germination timing in relation to seed mass: a source of regeneration niche differentiation.** *New phytologist*, 204: 496-506, 2014.
- CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; PONTES, C.A.; LEITE, I.T.A.; VENTRELLA, M.C.; MATHIAS, A.A. **Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimentos de plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth.** (Leguminosae-Caesalpinioideae). *R. Árvore* 30:941-949, 2006.
- DIAZ, P.; WILSON, K.A.; TAN-WILSON A.L. **Immunocytochemical Analysis of Proteolysis in Germinating Soybean.** *Phytochemistry*, 33: 961-968, 1993.

DODD, A.N. et al. **Plant Circadian Clocks Increase Photosynthesis, Growth, Survival and Competitive Advantage.** *Science*, 309: 630-633, 2005.

DONGEN, J.T.V. et al., **Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathways.** *Journal of Plant Physiology* 168: 434– 1443. 2011.

DOUCE, R.; BOURGUIGNON, J.; NEUBURGER, M.; and REBEILLE, F. **The glycine decarboxylase system: a fascinating complex.** *Trends in Plant Science* 6, 167-176, 2001.

Embrapa. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro.** Londrina: Embrapa Soja. 70p, 2014.

EASTMOND, P.J.; GERMAIN, V.; LANGE P.R.; BRYCE, J.H., SMITH, S.M. & GRAHAM I.A. **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, 5669–5674. 2000.

FARRÉ, E.M; WEISE, S. **The interactions between the circadian clock and primary metabolism.** *Current Opinion in Plant Biology*, 15:293–300. 2012.

FAO. **FAO Statistical Yearbook 2013: World food and agriculture.** Roma: FAO, p. 201-258. 2013.

FERNANDEZ, O.; ISHIARA, H.; GEORGE, G.M.; MENGIN, V.; FLIS, A.; SUMMER, D.; ARRIVAUULT, S.; FEIL, R.; LUNN, J.E.; ZEEMAN, S.C.; SMITH, A.M.; STITT, M. **Leaf Starch Turnover Occurs in Long Days and in Falling Light at the End of the Day.** *Plant Physiology*, 174: 2199–2212. 2017.

FUKUSHIMA, A. et al. **Impact of clock-associated Arabidopsis pseudo-response regulators in metabolic coordination.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:7251-7256. 2009.

GALILI, G., AMIR, R., FERNIE, R. **The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants.** *Annu. Rev. Plant Biol.* 67:8.1–8.26. 2016.

GOMMERS, C.M.M.; MONTE, E. **Seedling Establishment: A Dimmer Switch-Regulated Process between Dark and Light Signaling.** *Plant Physiology*, 176, pp. 1061–1074. 2018.

GRANDE, F.G.A.F.; TAKAKI, M. **Efeitos da luz, temperatura e estresse de água na germinação de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth (Caesalpinoideae).** *Bragantia*, Campinas, 65: 37-42. 2006.

HAN, C.; YIN, X.; HE, D.; YANG, P. **Analysis of Proteome Profile in Germinating Soybean Seed, and Its Comparison with Rice Showing the Styles of Reserves Mobilization in Different Crops.** *Plos One* 8: e56947. 2013.

HARRIS, M.; MACKENDER, R.O.; SMITH, D. **Photosynthesis of cotyledons of soybean seedlings.** *New Phytol.* 104, 319-329, 1986.

HE, F.; HUANG, F.; WILSON, K.A.; TAN-WILSON, A. **Protein storage vacuole acidification as a control of storage protein mobilization in soybeans.** *Journal of Experimental Botany*, 58 (5): 1059-1070. 2007.

- HENNIG, A.F.; MERTZ, L.M.; JUNIOR, E.A.J.; MACHADO, R.D.; FISS, G.; ZIMMER, P.D. **Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor.** *Bragantia* 69: 727-734. 2010
- HILDEBRANT, T.M., NESI, A.N., ARAÚJO, W.L., BRAUN, HARS-PETER. **Amino acid catabolism in plants.** *Mol. Plant.* 10.1016/j.molp.2015.09.005. 2015.
- HUST, C.J.; SUDIA, T.W. **The Effect of Light on the Use of the Nitrogen Reserves of Germinating Soybean Seeds.** *American Journal of Botany* 60: 1034-1040, 1973.
- HYMOWITZ, T. **On the domestication of the soybean.** *Econ Bot* 23: 408–421, 1970.
- JOSHI, V., JOUNG, J.G, FEI, Z.J., JANDER, G. **Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress.** *Amino Acids* 39, 933-947. 2010.
- JOSSE, E.M.; HALLIDAY, K. **Skotomorphogenesis: The Dark Side of Light Signalling.** *Current Biology* 18: 1144-1146, 2008.
- KAMBHAMPATI, S., AJEWOLE, E., MARSOLAIS, F. **Advances in asparagine metabolism.** *Progress in Botany*, 10.1007/124. 2017.
- KIM, H.T.; CHOI, U.K.; RYU, H.S.; LEE, S.J.; KWON, O.S. **Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1814: 1178–1187, 2011.
- KOLCHINSKI, E.M.; SCHUCH, L.O.B.; PESKE, S.T. **Crescimento Inicial da soja em função do vigor das sementes.** *R. Bras. Agrobiologia*, Pelotas, 12: 163-166, 2006.
- LABOURIAU, L. **A germinação das sementes,** Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983.
- LANDEIRO, V.L.; ZUCCO, C.A.; MENEZES, J.F.S. **Introdução ao uso do programa R. INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia,** 2010.
- LIU, X.; RAHMAN, T.; SONG, C.; SU, B.; YANG, F.; YONG, T; WU, Y.; ZHANG, C.; YANG, W. **Changes in light environment, morphology, growth and yield ofsoybean in maize-soybean intercropping systems.** *Field Crops research*, 200:38-46, 2017.
- MAGALHÃES, S.R.; BORGES, E.E.L.; BEGER, A.P.A. **Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake durante a germinação.** *Ciência Florestal*, 20: 589-595, 2010.
- MAREK, L.F.; STEWART, C.R. **Photosynthesis and Photorespiration in Presenescent, Senescent, and Rejuvenated Soybean Cotyledons.** *Plant Physiol* 98: 694-699, 1992.
- MARTON, T.; OSWALD, O.; GRAHAM, I.A. **Arabidopsis Seedling Growth, Storage Lipid Mobilization, and Photosynthetic Gene Expression Are Regulated by**

Carbon:Nitrogen Availability. *Plant Physiology*, 128:472, 2002.

MASUDA, T.; GOLDSMITH, P.D. **World Soybean Production: Area Harvested, Yield, and Long-Term Projections.** *International Food and Agribusiness Management Review*. v 12:4, 2009.

MELO, F.P.L.; NETO, A.V.A.; SIMABURKURO, E.A.; TABARELLI, M. **Recrutamento e estabelecimento de plântulas.** In: A.G. FERREIRA; F. BORGHETTI (eds.) *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed. pp. 149-162, 2004.

MCCLUNG, C.R. **Plant Circadian Rhythms.** *Plant Cell*, 18: 792-803, 2006.

MOORE, S.; STEIN, W.H. **A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds.** *The Journal of Biological Chemistry* 211: 907-913, 1954.

MUNTZ, K.; BELOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. **Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth.** *Jornal of experimental botany* 52: 1741-1752, 2001.

NETO, J.A.; AGUIAR, I.B.; FERREIRA, V.M. **Efeito da temperatura e da luz na germinação de sementes de *Acacia polyphylla* DC.** *Revista Brasil. Bot.*, 26: 249-256, 2003.

NIELSEN, N.C. **The structure and complexity of the IIS polypeptides in soybeans.** *J Am Oil Chem Soc* 62: 1680-1686, 1985.

OBATA, T., FERNIE, A.R. **The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses.** *Cell. Mol. Life Sci.* 69:3225–3243. 2012.

OHYAMA, T. Et al. **Amino Acid metabolism and transport in soybean plants.** *Intech*, 8: 171-196. 2017.

PAL, S.K.; LIPUT, M.; PIQUES, M.; ISHIHARA, H.; OBATA, T.; MATINS, M.C.; STITT, M. **Diurnal changes of polysome loading track sucrose content in the rosette of wild-type *arabidopsis* and the starchless *pgm* mutant.** *Plant Physiology* 162, 1246–126, 2013.

PIRES, M.V. et al. **The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched-chain amino acids following water shortage in *Arabidopsis*.** *Plant, Cell and Environment*, 39:1304-1319. 2016.

PONFIELD, S.; RYLLOT, E.L.; GILDAY, A.D.; GRAHAM, S.; LARSON, T.R. & GRAHAM, I.A. **Reserve mobilization in the *Arabidopsis* endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1.** *Plant Cell* 16, 2705–2718, 2004.

PAWLOWSKI, T.A. **Proteomics of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seed dormancy breaking: influence of abscisic and gibberellic acids.** *Proteomics* 7:2246–2257, 2007.

PRAXEDES, S.C. et al. **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, 2006.

QI, X.; WISLON, K.A.; TAN-WILSON, A.L. **Characterization of the Major Protease Involved in the Soybean, β -Conglycinin Storage Protein Mobilization.** Plant Physiol 99: 725-733, 1992.

RUUSKA, S.A.; GIRKE, T.; BENNING, C.; OHLROGGE, J.B. **Contrapuntal Networks of Gene Expression during Arabidopsis Seed Filling.** The Plant Cell 14: 1191–1206, 2002.

RYLOTT E, L.; GILDAY, A.D. & GRAHAM, I.A. **The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in Arabidopsis is essential for seedling establishment.** Plant Physiology 131, 1834–1842, 2003.

SANTOS, H.; BUCKERIDGE, M. **The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions.** Ann Bot 94: 819–830, 2004.

SELUZICKI, A.; BURKO, Y.; CHORY, J. **Dancing in the dark: darkness as a signal in plants.** Plant, Cell and Environment. doi: 10.1111, 2017.

SCHOPPER, P. **Biomechanics of plant growth.** American Journal of Botany. 93:1415, 2006.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J., NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental.** 5ed. Porto Alegre: Bookman (SBQ). p598-676. 2012

SLOT, M.; KITAJIMA, K. **Whole-plant respiration and its temperature sensitivity during progressive carbon starvation.** Functional Plant Biology, 42, 579–588, 2015.

STITT, M.; ZEEMAN, S.C. **Starch turnover: pathways, regulation and role in growth.** Plant Biology, 15: 282-292, 2012.

SULPICE, R.; FLIS A.; IVAKOV, A.A.; APELT, F.; KROHN, N.; ENCHKE, B.; STITT, M. **Arabidopsis coordinates the diurnal regulation of carbon allocation and growth across a wide range of photoperiods.** Molecular Plant 7, 137–155, 2014.

SU, B.Y.; SONG, Y.X.; SONG, C.; CUI, L.; YONG, T.W.; YANG, W.Y. **Growth and photosynthetic responses of soybean seedlings to maize shading in relay intercropping system in Southwest China.** PHOTOSYNTHETICA 52 (3): 332-340, 2014.

SUDIA, T.W.; GREEN, D.G. **The effect of the light on the redistribution of Sr90, C134 and Zn65 in the germinating seed of soybean (*Glycine max* (L) MERR.).** Plant and Soil XXVII, no. 1, 1967.

TAN-WILSON, A.L.; LIU, X.; CHEN, R.; QI, X.; WILSON, K.A. **An Acidic Amino Acid-Specific protease from germinating soybeans.** Phytochemistry 42 (2): 313-319, 1996.

TAN-WISLON, A.L.; WILSON, K.A. **Mobilization of seed protein reserves.** Physiologia Plantarum 145: 140-153, 2012.

- THANH, V.H.; SHIBASAKI, K. (1978). **Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of β -conglycinin.** J Agric Food Chem 26: 692-698 1978.
- THOMAS, A.L.; COSTA, J.A. **Crescimento de plântulas de soja afetado pelo sombreamento dos cotilédones e suas reservas.** Pesq. Agropec. bras., 28 (8): 925-929, 1993.
- TYAGI, S.K., TRIPATHI, R.P. **Effect of temperature on soybean germination.** Plant and soil. 74:273-280. 1983.
- VANZOLINI, S.; CARVALHO, N.M. **Efeito do vigor de sementes de soja sobre o seu desempenho em campo.** Revista Brasileira de Sementes, 24: 33-41, 2002.
- WILLIAMS, T.C.R.; MIGUEL, L.; MASAKAPALLI, S.K.; KRIGER, N.J.; SWEETLOVE, L.J.; RATCLIFFE, R.G. **Metabolic network fluxes in heterotrophic Arabidopsis cells: stability of the flux distribution under different oxygenation conditions.** Plant Physiol 148: 704–718, 2008.
- YANOVSKY, M.J. **Signaling Networks in the Plant Circadian System.** Plant Biology, 4: 429, 2001.
- YEMM, E.W.; COCKING, E.C. **The determination of amino acids with ninhydrin.** Analyst, v.80, p.209–213, 1955.
- YIN, Y.; YANG, R.; HAN, Y.; GU, Z. **Comparative proteomic and physiological analyses reveal the protective effect of exogenous calcium on the germinating soybean response to salt stress.** Journal of proteomics 113: 110 – 126, 2014.
- ZAIDAN, L.B.P.; BARBEDO, C.J. **Quebra de dormência em sementes.** In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (eds.) Germinação do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed. pp. 149-162, 2004.
- ZIEGLER, P. **Carbohydrate degradation during germination.** In: KIGEL, J. & GALILI, G.eds. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker, pp. 447–474, 1995.

12. ANEXO 1 - QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS POR CLAE

Porcentagem de massa seca dos aminoácidos detectados por CLAE nos diferentes tratamentos e órgãos da plântula de soja. A: Coleta 1 (6h), B: Coleta 2 (18h), C: Coleta 3 (6h). As letras representam as diferenças estatísticas entre os tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de probabilidade adotado de 0,05. Os traços representam a ausência de detecção do aminoácido na cromatografia. Valores em média e desvio padrão.

AA		COLETA 1 (6h)				
		Tratamento	Cotilédone	Epicótilo	Folha	Hipocótilo
ARG	Luz	0,104 ± 0,004	0,336 ± 0,056	0,114 ± 0,033	0,126 ± 0,126	0,204 ± 0,023
	Luz Baixa	0,158 ± 0,039	0,343 ± 0,025	0,169 ± 0,043	0,039 ± 0,025	0,214 ± 0,028
	Escuro	0,168 ± 0,028	0,368 ± 0,029	0,198 ± 0,070	0,139 ± 0,093	0,209 ± 0,022
LYS	Luz	0,171 ± 0,014	-	-	0,027 ± 0,002 a	-
	Luz Baixa	0,151 ± 0,029	-	-	0,025 ± 0,001 a	-
	Escuro	0,208 ± 0,054	-	-	0,066 ± 0,005 b	-
ASN	Luz	0,200 ± 0,008	0,279 ± 0,017 a	0,305 ± 0,005 a	0,240 ± 0,014	0,258 ± 0,029
	Luz Baixa	0,297 ± 0,029	0,379 ± 0,081 a	0,324 ± 0,058 ab	0,219 ± 0,019	0,256 ± 0,032
	Escuro	0,299 ± 0,015	0,430 ± 0,014 b	0,395 ± 0,039 b	0,283 ± 0,027	0,292 ± 0,078
SER	Luz	0,029 ± 0,004	0,055 ± 0,005 a	0,035 ± 0,014	0,024 ± 0,005	0,014 ± 0,001
	Luz Baixa	0,029 ± 0,004	0,101 ± 0,005 b	0,034 ± 0,002	0,027 ± 0,007	0,016 ± 0,006
	Escuro	0,030 ± 0,005	0,094 ± 0,018 b	0,038 ± 0,001	0,032 ± 0,004	0,024 ± 0,005
HIS	Luz	0,040 ± 0,002	0,029 ± 0,005 a	0,022 ± 0,004	0,023 ± 0,008	0,032 ± 0,005 a
	Luz Baixa	0,038 ± 0,003	0,040 ± 0,005 ab	0,028 ± 0,003	0,018 ± 0,006	0,032 ± 0,011 a
	Escuro	0,040 ± 0,003	0,068 ± 0,005 b	0,049 ± 0,003	0,026 ± 0,005	0,058 ± 0,017 b
PHE	Luz	-	0,027 ± 0,005 c	0,016 ± 0,002 a	0,052 ± 0,010	-
	Luz Baixa	-	0,038 ± 0,005 b	0,008 ± 0,004 b	0,074 ± 0,025	-
	Escuro	-	0,064 ± 0,005 a	0,020 ± 0,004 a	0,066 ± 0,006	-

Continuação

AA	Tratamento	Cotilédone	Epicótilo	Folha	Hipocótilo	Raiz
ASP	Luz	-	-	-	-	0,825 ± 0,040
	Luz Baixa	-	-	-	-	0,360 ± 0,198
	Escuro	-	-	-	-	1,089 ± 0,784
GLU	Luz	-	0,062 ± 0,004 a	0,048 ± 0,007	-	-
	Luz Baixa	-	0,028 ± 0,003 b	0,058 ± 0,025	-	-
	Escuro	-	0,068 ± 0,012 a	0,103 ± 0,053	-	-
GLN	Luz	-	-	-	-	0,016 ± 0,008
	Luz Baixa	-	-	-	-	0,038 ± 0,008
	Escuro	-	-	-	-	0,021 ± 0,016
ILE	Luz	-	0,060 ± 0,007 b	-	0,029 ± 0,003	0,014 ± 0,003
	Luz Baixa	-	0,070 ± 0,002 a	-	0,026 ± 0,011	0,012 ± 0,003
	Escuro	-	0,077 ± 0,004 a	-	0,030 ± 0,004	0,024 ± 0,010
VAL	Luz	-	0,160 ± 0,038	-	0,052 ± 0,021 b	0,020 ± 0,006
	Luz Baixa	-	0,167 ± 0,009	-	0,089 ± 0,032 ab	0,025 ± 0,011
	Escuro	-	0,176 ± 0,059	-	0,118 ± 0,009 a	0,066 ± 0,013
ALA	Luz	-	-	-	0,233 ± 0,054	0,468 ± 0,096 a
	Luz Baixa	-	-	-	0,407 ± 0,053	0,235 ± 0,045 b
	Escuro	-	-	-	0,480 ± 0,124	0,264 ± 0,104 b
GLY	Luz	0,187 ± 0,034	-	-	0,567 ± 0,046 a	0,568 ± 0,062
	Luz Baixa	0,164 ± 0,045	-	-	0,270 ± 0,126 b	0,440 ± 0,109
	Escuro	0,153 ± 0,017	-	-	0,394 ± 0,118 ab	0,416 ± 0,089
TYR	Luz	-	-	-	0,006 ± 0,001	-
	Luz Baixa	-	-	-	0,008 ± 0,002	-
	Escuro	-	-	-	0,007 ± 0,001	-

B

COLETA 2 (18h)						
AA	Tratamento	Cotilédone	Epicótilo	Folha	Hipocótilo	Raiz
ARG	Luz	0,128 ± 0,039	0,346 ± 0,036	0,163 ± 0,058	0,102 ± 0,082	0,265 ± 0,028 a
	Luz Baixa	0,130 ± 0,024	0,334 ± 0,010	0,158 ± 0,084	0,074 ± 0,058	0,256 ± 0,039 ab
	Escuro	0,195 ± 0,025	0,352 ± 0,029	0,174 ± 0,036	0,092 ± 0,078	0,198 ± 0,031 b
LYS	Luz	0,133 ± 0,025	-	-	0,075 ± 0,002 a	-
	Luz Baixa	0,123 ± 0,044	-	-	0,125 ± 0,020 a	-
	Escuro	0,141 ± 0,027	-	-	0,194 ± 0,042 b	-
ASN	Luz	0,272 ± 0,032	0,406 ± 0,035 ab	0,263 ± 0,020 a	0,247 ± 0,031	0,207 ± 0,030
	Luz Baixa	0,291 ± 0,015	0,322 ± 0,095 b	0,322 ± 0,018 b	0,229 ± 0,024	0,255 ± 0,032
	Escuro	0,294 ± 0,008	0,448 ± 0,032 a	0,361 ± 0,027 b	0,252 ± 0,056	0,262 ± 0,021
SER	Luz	0,030 ± 0,004	0,057 ± 0,002 c	0,030 ± 0,010	0,014 ± 0,003 a	0,016 ± 0,008
	Luz Baixa	0,026 ± 0,007	0,070 ± 0,007 b	0,032 ± 0,003	0,032 ± 0,011 ab	0,017 ± 0,006
	Escuro	0,023 ± 0,004	0,089 ± 0,008 a	0,032 ± 0,009	0,044 ± 0,013 b	0,021 ± 0,009
HIS	Luz	0,040 ± 0,003	0,059 ± 0,009 a	0,011 ± 0,007	0,014 ± 0,002 a	0,034 ± 0,010
	Luz Baixa	0,038 ± 0,003	0,070 ± 0,004 ab	0,017 ± 0,004	0,023 ± 0,004 ab	0,044 ± 0,007
	Escuro	0,039 ± 0,003	0,103 ± 0,007 b	0,030 ± 0,007	0,037 ± 0,018 b	0,053 ± 0,016
PHE	Luz	-	0,056 ± 0,009 a	0,016 ± 0,002	0,049 ± 0,013 a	-
	Luz Baixa	-	0,065 ± 0,004 a	0,015 ± 0,003	0,102 ± 0,021 b	-
	Escuro	-	0,096 ± 0,007 b	0,019 ± 0,007	0,114 ± 0,023 b	-
ASP	Luz	-	-	-	-	0,936 ± 0,619
	Luz Baixa	-	-	-	-	1,047 ± 0,778
	Escuro	-	-	-	-	0,743 ± 0,450
GLU	Luz	-	0,097 ± 0,015 a	0,051 ± 0,003	-	-
	Luz Baixa	-	0,064 ± 0,023 b	0,070 ± 0,019	-	-
	Escuro	-	0,103 ± 0,005 a	0,067 ± 0,020	-	-

Continuação

AA	Tratamento	Cotilédone	Epicótilo	Folha	Hipocótilo	Raiz
	Luz	-	-	-	-	0,024 ± 0,009
	Luz Baixa	-	-	-	-	0,013 ± 0,006
GLN	Escuro	-	-	-	-	0,035 ± 0,010
	Luz	-	0,073 ± 0,004	-	0,019 ± 0,004	0,015 ± 0,013
	Luz Baixa	-	0,081 ± 0,006	-	0,029 ± 0,004	0,018 ± 0,009
ILE	Escuro	-	0,082 ± 0,008	-	0,045 ± 0,023	0,028 ± 0,009
	Luz	-	0,142 ± 0,008 a	-	0,037 ± 0,020 b	0,022 ± 0,057
	Luz Baixa	-	0,172 ± 0,038 a	-	0,096 ± 0,024 ab	0,026 ± 0,015
VAL	Escuro	-	0,253 ± 0,023 b	-	0,162 ± 0,077 a	0,046 ± 0,022
	Luz	-	-	-	0,473 ± 0,148	0,376 ± 0,067 a
	Luz Baixa	-	-	-	0,448 ± 0,062	0,343 ± 0,115 b
ALA	Escuro	-	-	-	0,293 ± 0,096	0,200 ± 0,069 b
	Luz	0,241 ± 0,041 a	-	-	0,606 ± 0,146	0,289 ± 0,253
	Luz Baixa	0,117 ± 0,040 b	-	-	0,324 ± 0,164	0,374 ± 0,166
GLY	Escuro	0,091 ± 0,013 b	-	-	0,427 ± 0,240	0,230 ± 0,096
	Luz	-	-	-	0,008 ± 0,002	-
	Luz Baixa	-	-	-	0,009 ± 0,003	-
TYR	Escuro	-	-	-	0,012 ± 0,006	-

C

COLETA 3 (6h)						
AA	Tratamento	Cotilédone	Epicótilo	Folha	Hipocótilo	Raiz
ARG	Luz	0,189 ± 0,045	0,351 ± 0,006	0,169 ± 0,041	0,118 ± 0,013	0,219 ± 0,029
	Luz Baixa	0,183 ± 0,063	0,323 ± 0,006	0,128 ± 0,015	0,110 ± 0,084	0,237 ± 0,028
	Escuro	0,175 ± 0,041	0,345 ± 0,027	0,202 ± 0,078	0,183 ± 0,041	0,180 ± 0,032
LYS	Luz	0,140 ± 0,022	-	-	0,136 ± 0,012	-
	Luz Baixa	0,151 ± 0,022	-	-	0,129 ± 0,023	-
	Escuro	0,178 ± 0,058	-	-	0,134 ± 0,014	-
ASN	Luz	0,200 ± 0,022	0,278 ± 0,022	0,306 ± 0,011 a	0,298 ± 0,014 a	0,232 ± 0,047
	Luz Baixa	0,272 ± 0,024	0,334 ± 0,044	0,302 ± 0,038 a	0,280 ± 0,033 ab	0,234 ± 0,015
	Escuro	0,276 ± 0,033	0,348 ± 0,055	0,322 ± 0,050 b	0,350 ± 0,012 b	0,243 ± 0,032
SER	Luz	0,032 ± 0,008	0,064 ± 0,003 a	0,036 ± 0,004	0,033 ± 0,007	0,012 ± 0,003
	Luz Baixa	0,023 ± 0,003	0,080 ± 0,016 a	0,035 ± 0,003	0,024 ± 0,008	0,025 ± 0,009
	Escuro	0,037 ± 0,007	0,117 ± 0,010 b	0,043 ± 0,004	0,038 ± 0,006	0,036 ± 0,007
HIS	Luz	0,042 ± 0,001	0,074 ± 0,010 a	0,013 ± 0,003	0,018 ± 0,002	0,028 ± 0,004
	Luz Baixa	0,041 ± 0,010	0,093 ± 0,035 a	0,011 ± 0,004	0,020 ± 0,009	0,044 ± 0,015
	Escuro	0,047 ± 0,004	0,137 ± 0,007 b	0,023 ± 0,002	0,036 ± 0,019	0,046 ± 0,014
PHE	Luz	-	0,069 ± 0,010 a	0,025 ± 0,003	0,113 ± 0,018	-
	Luz Baixa	-	0,087 ± 0,033 a	0,023 ± 0,008	0,108 ± 0,008	-
	Escuro	-	0,128 ± 0,007 b	0,033 ± 0,002	0,114 ± 0,007	-
ASP	Luz	-	-	-	-	0,190 ± 0,113
	Luz Baixa	-	-	-	-	0,888 ± 0,952
	Escuro	-	-	-	-	0,900 ± 0,367
GLU	Luz	-	0,110 ± 0,008 a	0,013 ± 0,115	-	-
	Luz Baixa	-	0,072 ± 0,020 b	0,019 ± 0,006	-	-
	Escuro	-	0,152 ± 0,012 c	0,029 ± 0,003	-	-

Continuação

AA	Tratamento	Cotilédone	Epicótilo	Folha	Hipocótilo	Raiz
GLN	Luz	-	-	-	-	0,040 ± 0,020
	Luz Baixa	-	-	-	-	0,027 ± 0,012
	Escuro	-	-	-	-	0,050 ± 0,022
ILE	Luz	-	0,070 ± 0,003	-	0,030 ± 0,004	0,015 ± 0,003
	Luz Baixa	-	0,090 ± 0,017	-	0,027 ± 0,008	0,023 ± 0,008
	Escuro	-	0,100 ± 0,015	-	0,034 ± 0,012	0,021 ± 0,005
VAL	Luz	-	0,146 ± 0,025 a	-	0,109 ± 0,022	0,050 ± 0,043
	Luz Baixa	-	0,289 ± 0,045 b	-	0,095 ± 0,037	0,050 ± 0,024
	Escuro	-	0,322 ± 0,034 b	-	0,119 ± 0,023	0,092 ± 0,007
ALA	Luz	-	-	-	0,401 ± 0,120	0,431 ± 0,254
	Luz Baixa	-	-	-	0,369 ± 0,117	0,281 ± 0,036
	Escuro	-	-	-	0,402 ± 0,123	0,171 ± 0,055
GLY	Luz	0,165 ± 0,041 a	-	-	0,521 ± 0,195	0,549 ± 0,044 a
	Luz Baixa	0,082 ± 0,010 b	-	-	0,146 ± 0,089	0,364 ± 0,109 ab
	Escuro	0,065 ± 0,013 b	-	-	0,412 ± 0,004	0,211 ± 0,116 b
TYR	Luz	-	-	-	0,009 ± 0,002	-
	Luz Baixa	-	-	-	0,007 ± 0,002	-
	Escuro	-	-	-	0,010 ± 0,003	-