

AÇÃO DO *MYO*-INOSITOL E D-PINITOL NA PROMOÇÃO DA  
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE  
SOJA

**LÍLIA MARQUES GRAVINA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO - 2015

AÇÃO DO *MYO*-INOSITOL E D-PINITOL NA PROMOÇÃO DA  
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE  
SOJA

**LÍLIA MARQUES GRAVINA**

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, com ênfase em Biologia Celular.”

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Antônia Elenir Amâncio Oliveira

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos do Centro de Biociências e Biotecnologia (LQFPP/CBB)-UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO - 2015

AÇÃO DO *MYO*-INOSITOL E D-PINITOL NA PROMOÇÃO DA  
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE  
SOJA

**LÍLIA MARQUES GRAVINA**

“Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências – CBB, da  
Universidade Estadual do Norte Fluminense  
Darcy Ribeiro, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Biociências e  
Biotecnologia, com ênfase em Biologia Celular.”

Aprovada em 31 de março de 2015.

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>.Dr.<sup>a</sup> Luciana Belarmino da Silva- IFF/Campos dos Goytacazes

---

Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>Virginia Silva Carvalho - LFIT/CCTA/UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Claudete Santa-Catarina - LBCT/CBB/UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Antônia Elenir Amâncio de Oliveira - LQFPP/CBB/ UENF  
(Orientadora)

*Ao meu esposo Geraldo Gravina, pelo incentivo, companheirismo, apoio e amor incondicional ao longo dessa trajetória. Obrigada por ser meu “porto seguro” nos momentos em que mais precisei;*

*Aos meus amados filhos Roberta, Gerlene e Gabriel, pela felicidade de tê-los sempre ao meu lado;*

*Ao meu querido e tão amado neto Miguel Marques de Amaral Arruda que encheu de alegria a minha vida me presenteando com a dádiva de ser avó;*

*Aos meus queridos irmãos Cristiane e Wanderson, que tanto amo;*

*Aos meus pais Eurípedes e Eni, que me concederam o direito à vida, pelo cuidado, grande incentivo e amor;*

*À minha cunhada Elisa pelo apoio e incentivo.*

*Dedico*

## *APRENDI E DECIDI*

*E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer,  
decidi triunfar...*

*Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.  
Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar  
uma solução.*

*Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um  
oásis.*

*Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.*

*Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.  
Naquele dia descobri que meu único rival não era mais que minhas  
próprias limitações e que enfrentá-las era a única e melhor forma de  
as superar.*

*Naquele dia, descobri que eu não era o melhor e que talvez eu nunca  
tivesse sido.*

*Deixei de me importar com quem ganha ou perde.*

*Agora me importa simplesmente saber melhor o que fazer.  
Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir.  
Aprendi que o melhor triunfo é poder chamar alguém de "amigo".*

*Descobri que o amor é mais que um simples estado de  
enamoremamento, "o amor é uma filosofia de vida".*

*Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos  
passados e passei a ser uma tênue luz no presente.*

*Aprendi que de nada serve ser luz se não iluminar o caminho dos  
demais.*

*Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...*

*Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornarem-se  
realidade.*

*E desde aquele dia já não durmo para descansar... simplesmente  
durmo para sonhar.*

*Walt Disney*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu Deus-Pai, pela dádiva da vida, pela serenidade e forças necessárias para a realização desse sonho;*

*À professora Elenir pela presteza em me receber como sua orientanda. Obrigada pela confiança e carinho. Obrigada também pelo zelo com a minha vida, não só no aspecto profissional, mas pessoal também! Obrigada pelo exemplo de competência e profissionalismo e, acima de tudo, exemplo de ser humano! Muito obrigada mesmo por se dispor a compartilhar parte dos seus conhecimentos!*

*À UENF pela oportunidade e pelo ensino de boa qualidade;*

*À CAPES pelo apoio financeiro;*

*À EMBRAPA soja representada pela pessoa do pesquisador Dr. Odílton Lemos de Mello Filho, por ceder gentilmente as sementes de soja, cultivar BRS 284, utilizadas neste trabalho;*

*Às professoras Luciana Belarmindo da Silva, Virginia Silva Carvalho e Claudete Santa-Catarina por aceitarem gentilmente compor minha banca examinadora;*

*À professora Olga Lima Tavares Machado pela presteza e auxílio na realização deste trabalho, bem como a gentileza em aceitar ser a revisora;*

*A todos os amigos da sala 224, com os quais pude compartilhar momentos de seriedade no trabalho, mas também de descontração nas horas vagas: Arianne, Leonardo, Eduardo, Janaina e Kayan. Obrigada por tudo!*

*Em especial aos amigos da sala 227: Dayanni (Day), Lucilene, Gustavo e Nathália pelas conversas sempre produtivas e amizade;*

*Em especial agradeço aos amigos que conquistei Dayanni Padua, Larissa e Carlos Eduardo por compartilharem comigo momentos de apertos quanto aos prazos, mas também momentos de alegria;*

*À amiga Paulinha pela ajuda tão necessária para a conclusão deste sonho e muito obrigada pelas doces palavras de conforto;*

*Ao técnico do laboratório Cristóvão por me ajudar sempre que precisei;*

*Aos meus pais Eurípedes Marques e Eni Moura Marques por torcerem pela minha vitória. E me fazerem entender que as conquistas vêm após as lutas. Amo vocês!!!!*

*Aos meus amados filhos Roberta Ísis Marques, Gerlene Gravina e Gabriel Gravina por compartilharem comigo a alegria dessa conquista; Agradeço a Deus pelo presente de ser mãe de vocês;*

*Aos meus irmãos Cristiane Marques e Wanderson Marques pelo apoio e carinho.*

*Agradeço também a Paulo Rossi pelas contribuições nas traduções de artigos científicos.*

*Ao meu amado marido Geraldo Gravina pelo apoio, amor e tranquilidade necessários para a realização deste trabalho! Obrigada por fazer parte desse sonho!*

*Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica e ajudaram na realização desse trabalho!!!!!!*



## SUMÁRIO

	PÁG.
ÍNDICE	
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Glycine max</i> .....	1
1.2 Germinação de sementes e desenvolvimento pós-germinativo.....	2
1.2.1 Mobilização de reservas durante a germinação e desenvolvimento pós-germinativo.....	5
1.2.2 Controle hormonal da germinação.....	7
1.3 Açúcares e seus derivados como moléculas sinalizadoras.....	9
1.3.1 MYO-INOSITOL E D-PINITOL.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. A soja ( <i>Glycine max</i> ).....	15
3.2. Experimentos de germinação.....	15
3.3. Curva de embebição de água.....	16
3.4. Dosagem das proteínas solúveis em tampão salino.....	16
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	17
3.6. Atividade enzimática em gel de gelatina (zimografia).....	18
3.7. Determinação da atividade das proteinases cisteínicas do tipo papaína.....	18
3.8. Quantificação dos triacilglicerois.....	19
3.9. Determinação da atividade da $\alpha$ -amilase.....	20
3.10. Quantificação dos açúcares redutores.....	21
3.11. Determinação dos aminoácidos livres.....	22

3.12. Delineamento experimental.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Efeitos do tratamento com o <i>Myo</i> -inositol sobre o crescimento dos eixos hipocótilo-radículas de <i>G. max</i> .....	25
4.2. Efeitos do tratamento com D-pinitol e <i>Myo</i> -inositol sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de <i>G. max</i> .....	27
4.3. Dosagem de proteínas em cotilédones e eixos hipocótilo-radículas tratados com D-pinitol.....	31
4.4. Dosagem de proteínas em cotilédones e eixos hipocótilo-radículas tratados com <i>Myo</i> -inositol.....	31
4.5. Perfil proteico em SDS-PAGE (12%) de cotilédones e eixos hipocótilo-radículas tratados com D-pinitol e <i>Myo</i> -inositol.....	34
4.6. Visualização da atividade em gel de gelatina (zimografia) de proteinases de eixos hipocótilo-radículas e cotilédones de <i>G. max</i> tratados com D-pinitol e <i>Myo</i> -inositol.....	36
4.7. Atividade da proteinase (pH ácido) em cotilédones e eixos hipocótilo-radículas de <i>G. max</i> tratados com <i>Myo</i> -inositol e D-pinitol.....	39
4.8. Quantificação dos triacilglicerois em cotilédones de <i>G. max</i> tratados com D-pinitol.....	42
4.9. Determinação da atividade da $\alpha$ -amilase em cotilédones e eixos hipocótilo-radículas de <i>G. max</i> tratados com <i>Myo</i> -inositol e D-pinitol.....	43
4.10. Quantificação dos açúcares redutores em cotilédones e eixos hipocótilo-radículas de <i>G. max</i> tratados com <i>Myo</i> -inositol e D-pinitol.....	46
4.11. Detecção dos aminoácidos livres.....	49
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Principais eventos bioquímicos durante a embebição de água nas fases de germinação e desenvolvimento pós-germinativo.....	4
FIGURA 2: Esquema mostrando a interação entre a síntese de GAs, a ativação de enzimas, a mobilização de reservas em um grão de cevada e as diferentes funções nos vários tecidos durante a germinação.....	9
FIGURA 3: Via proposta para a síntese de ciclitois, galactosídeos ciclitois e família dos oligossacarídeos da série rafinose.....	11
FIGURA 4: Resumo da via de síntese do D-pinitol e <i>Myo</i> -inositol.....	14
FIGURA 5: (A) Partes constituintes de uma semente de soja germinada em 96 horas. (B) Eixos hipocótilo-radículas de sementes de <i>G. max</i> , germinadas em concentrações de 0,022 a 1,440µg/mL de <i>myo</i> -inositol e controle (água destilada) no tempo de 96 horas.....	26
FIGURA 6 - Número de sementes de soja, cultivar BRS 284, germinadas em condições controle e sob os tratamentos com D-pinitol (A) ou <i>myo</i> -inositol (B) expressos em porcentagem e (C) Massa fresca e seca (g) nos tempos de até 96 horas.....	28
FIGURA 7- Comprimento dos eixos hipocótilo-radículas de plântulas de <i>G. max</i> , cultivar BRS 284, tratadas com D-pinitol (A) ou com <i>Myo</i> -inositol (B).....	29
FIGURA 8- Comprimento do eixo hipocótilo-radícula de plântulas de <i>G. max</i> , variedade BRS 284, tratadas com <i>Myo</i> -inositol ou com D-pinitol (comparação entre os tratamentos).....	30
FIGURA 9- Concentração de proteínas em cotilédones (A) e em eixos	

hipocótilo-radículas (B) de plântulas de <i>G. max</i> , variedade BRS 284, tratados com D-pinitol.....	32
FIGURA 10-. Concentração de proteínas em cotilédones (A) e em eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de <i>G. max</i> , variedade BRS 284, tratados com <i>Myo</i> -inositol.....	33
FIGURA 11- Perfil proteico em SDS-PAGE (12%) de cotilédones controle (C) e tratados (T) com D-pinitol embebidos nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas (A) e 60, 72, 84 e 96 horas (B).....	35
FIGURA 12- Perfil proteico em SDS-PAGE (12%) de eixos hipocótilo-radículas de <i>G. max</i> , controle (C) e tratados (T) com D-pinitol embebidos nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas (A) e 60, 72, 84 e 96 horas (B).....	35
FIGURA 13- Perfil proteico em SDS-PAGE (12%) de eixos hipocótilo-radículas de <i>G. max</i> , controle (C) e tratados (T) com <i>Myo</i> -inositol embebidos nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas (A) e 60, 72, 84 e 96 horas (B).....	35
FIGURA 14- Atividade proteinásica em gel de poliacrilamida 12% contendo 1% de gelatina de amostras de eixos hipocótilo-radículas de <i>G. max</i> de 12 a 96 horas de embebição em água (controle-C) ou D-pinitol (Tratado-T). A: eixos hipocótilo-radículas embebidos de 12 a 48 horas. B: eixos hipocótilo-radículas embebidos de 60 a 96 horas.....	37
FIGURA 15- Atividade proteinásica em gel de poliacrilamida 12% contendo 1% de gelatina de amostras de cotilédones de <i>G. max</i> nos controles (C) e tratados (T) com D-pinitol nos tempos de 24, 36, 48, 84 (A) e 96 horas (B) e tratados com <i>Myo</i> -inositol nos tempos de 12, 36, 48 e 84 horas (B).....	38
FIGURA 16- Concentração da proteinase em cotilédones (A) e em eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de <i>G. max</i> , cultivar BRS 284, tratados	

com <i>Myo</i> -inositol durante a embebição por até 96 horas.....	40
FIGURA 17- Concentração da proteinase em cotilédones (A) e eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de <i>G. max</i> , cultivar BRS 284, tratados com D-pinitol durante a embebição por até 96 horas.....	41
FIGURA 18- Concentração dos triacilglicerois em cotilédones de plântulas de <i>G. max</i> , cultivar BRS 284, tratados com D-pinitol durante a embebição por até 96 horas.....	42
FIGURA 19- Concentração da $\alpha$ -amilase nos cotilédones (A) e eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de <i>G. max</i> , cultivar BRS 284, controles ou tratadas com <i>Myo</i> -inositol durante a embebição por até 96 horas.....	44
FIGURA 20- Concentração da $\alpha$ -amilase nos cotilédones (A) e eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de <i>G. max</i> , cultivar BRS 284, controles ou tratadas com D-pinitol durante a embebição por até 96 horas.....	45
FIGURA 21- Concentração de açúcares redutores em cotilédones (A) e em eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de <i>G. max</i> , cultivar BRS 284, tratados com <i>Myo</i> -inositol durante a embebição por até 96 horas.....	47
FIGURA 22- Concentração de açúcares redutores em cotilédones (A) e em eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de <i>G. max</i> , cultivar BRS 284, tratados com D-pinitol durante a embebição por até 96 horas.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição química da fase móvel usada para eluição dos aminoácidos.....	23
Tabela 2- Comprimento médio dos eixos embrionários de <i>Glycine max.</i> em função das concentrações de <i>Myo</i> -inositol.....	25
Tabela 3- Valores médios de aminoácidos (pMol) detectados nas amostras de cotilédones controles e tratadas com <i>Myo</i> -inositol nos tempos de 60 e 96 horas de embebição.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

<b>ABS</b>	Absorbância
<b>APS</b>	Persulfato de amônia
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNS</b>	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>HCl</b>	Ácido clorídico
<b>LEAs</b>	<i>Late-Embryogenesis Abundant</i>
<b>MI</b>	<i>Myo</i> -inositol
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>pMol</b>	Picomol
<b>q.s.p.</b>	Quantidade suficiente para
<b>SDS</b>	Sódio dodecil sulfato
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TEMED</b>	N',N',N',N'- tetrametiletilenodiamino
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>Tween 20%</b>	Polioxietileno (20) sorbitano monolaurato
<b>V</b>	Voltagem
<b>µg/P</b>	Micrograma/proteína

## RESUMO

*Myo*-inositol e D-Pinitol são compostos naturais de plantas encontrados em diversos tecidos vegetais. Estudos sobre germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas mostraram que D-pinitol estimulou o desenvolvimento pós-germinativo das radículas e epicótilo de *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do tratamento com *Myo*-inositol e D-pinitol exógeno durante a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de soja (*Glycine max*). As sementes foram germinadas em soluções de *Myo*-inositol e D-Pinitol (0,36 µg/mL) ou água (controle). A germinação foi conduzida em placas de Petri, dentro de estufas com ambiente controlado. As plantas foram cultivadas em intervalos de 12 até 96 horas e os tecidos foram separados em cotilédones e eixos para serem utilizados nos experimentos. Os tecidos foram submetidos a dosagens de proteínas totais, aminoácidos livres, atividade de proteínases cisteínicas,  $\alpha$ -amilases e dosagem de triacilgliceróis. Neste trabalho foi demonstrado que D-pinitol e *myo*-inositol estimularam o crescimento do eixo hipocótilo-radícula de plântulas de *G. max*. Os níveis de proteínas totais e as atividades de proteínases cisteínicas de cotilédones e eixos embrionários variaram durante a germinação e no desenvolvimento das plântulas. No entanto, essas variações não foram observadas no perfil visualizado por SDS-PAGE. A quantificação de aminoácidos livres nas amostras de cotilédones, onde foram observadas reduções de proteínas totais, mostraram um aumento no conteúdo de glutamina livre. As concentrações de carboidratos também foram influenciadas pelos tratamentos, diminuindo em cotilédones tratados com *myo*-inositol. Nos eixos embrionários o nível de carboidratos aumentou em 24 e 36 h e diminuiu em 72 h. No tratamento com D-pinitol variações nos níveis desses açúcares também foram observadas, com aumentos e reduções ao longo do tempo e em função do tratamento. Variações também foram observadas na atividade de amilases, principalmente um aumento em eixos tratados com D-pinitol. Os triacilgliceróis diminuíram em cotilédones tratados com D-pinitol em 12 horas e aumentaram nos intervalos de 24, 60, 72, 84 e 96 horas.

Palavras-chave: *Glycine max*; Germinação de sementes; Promotores de crescimento vegetal.



## ABSTRACT

*Myo*-inositol and D-Pinitol are natural compounds found in diverse plant tissues. Seed germination and seedling development studies showed that D-pinitol stimulated the post-germination development of radicles and epicotyls of *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* seedlings. The objective of this work was to investigate the effects of the exogenous application of *myo*-inositol and D-pinitol on soybean (*Glycine max*) seed germination and seedling development. Seeds were germinated in the presence of *myo*-inositol, D-pinitol solutions (0.36 µg/mL) or water (control experiments). The germination was developed in Petri dishes, under controlled environment cabinet. In intervals of 12 hours, up to 96 hours, the seed tissues were separated and cotyledons and embryonic axes were used in the experiments. These tissues were submitted to dosages of total proteins, free amino acids, cysteine proteinase and  $\alpha$ - amylase activities, triglycerides. In this work, we show that D-pinitol and *myo*-inositol stimulated the growth of hypocotyl-radicle axes of *G. max* seedlings. These levels were influenced by the treatments in some intervals of time tested, however similar variation was not observed in the visualization of proteins and enzyme activity profiles by SDS-PAGE. In respect to the free amino acid quantification in cotyledon samples, where total proteins was seen to be reduced, an increase in the level of free glutamine was observed. The carbohydrate levels were also influenced by the treatments, decreasing in cotyledons treated with *myo*-inositol. In axes, the levels increased at 24 and 36 h and decreased at 72 h. Under D-pinitol treatment, variations in sugar levels were also observed, with increases and decreases over the time and treatment. Variations were also observed in amylase activities, mainly an increase in axes treated with D-pinitol. The triglycerides decreased in cotyledons treated with D-pinitol at 12 h and increased at 24, 60, 72, 84 e 96 h.

Key-words: *Glycine max*; Seeds germination; Plant growth promoters.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1- *Glycine max*

A soja pertence à classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae (Papilionoideae), gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* e a forma cultivada é a *Glycine max* (L.) Merrill. O gênero *Glycine* se subdivide em dois subgêneros: Soja e *Glycine*. O primeiro é constituído por duas espécies (*Glycine soja* e *Glycine max*) e o segundo por 15 espécies perenes e selvagens (Hancock, 2004; Sediyaama, 2009).

Há um consenso de que a soja tenha se originado na costa leste da Ásia, principalmente na China, 4000 anos atrás. Entretanto, seu cultivo nos dias atuais é resultante de cruzamentos naturais entre espécies de soja selvagens as quais, dentro de um processo evolutivo, foram domesticadas e melhoradas pelos cientistas chineses. A China deteve a produção de soja exclusivamente até meados de 1894 sendo apenas introduzida na Europa no final do século XV por curiosidade, nos jardins botânicos da Inglaterra, França e Alemanha (Hancock, 2004; Paiva *et al.*, 2006; EMBRAPA, 2013).

Santos (1988) relata que a soja foi introduzida no Brasil em 1882, pelo professor Gustavo Dutra, da Escola de Agronomia da Bahia, que se empenhou nas primeiras pesquisas da cultura no país. Porém, somente a partir de 1914 a soja passou a ser cultivada comercialmente, no município de Santa Rosa, RS. O cultivo da soja somente adquiriu expressiva importância econômica a partir dos anos 40 (Paiva *et al.*, 2006). A espécie *Glycine max* é exótica no Brasil e de grande interesse socioeconômico, pois tem como principais características possuir elevados teores médios de proteína (40%) e óleo (20%), alta produtividade de grãos e também pela capacidade de adaptação a diferentes ambientes (Paiva *et al.*, 2006). Considerando que a soja é uma das principais fabáceas cultivadas no mundo, devido a sua expressiva importância agro econômica, o Brasil ao longo dos últimos anos, vem se destacando com a segunda posição no ranking de produtores mundiais de soja ficando atrás dos Estados Unidos (USDA, 2013).

Dados sobre o levantamento da safra brasileira de grãos 2013/2014, divulgado em fevereiro pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015), revelaram que mais uma vez a soja obteve um recorde de produção com 86,12 milhões de toneladas em 30,17 milhões de hectares de área cultivada em todo o Brasil. Como uma cultura em franca expansão, a soja já possui em média suas características bioquímicas bem conhecidas como, 20% de óleo, 38% de proteína e 34% de carboidratos (Sedyama *et al.*, 2005 e EMBRAPA, 2013). Contudo, o aumento dessa produtividade está amplamente associado aos avanços tecnológicos, moleculares e bioquímicos, bem como o uso destas novas tecnologias no seu manejo agrícola e os ganhos com o melhoramento genético desta espécie oleaginosa.

## 1.2- Germinação de sementes e desenvolvimento pós-germinativo

A germinação da semente é, de modo simplificado, a saída do repouso metabólico, quando o embrião retoma seu crescimento culminando na emergência da radícula através do tegumento (Nonogaki *et al.*, 2010).

Em geral, para que ocorra a germinação de uma semente até o estabelecimento de uma nova plântula, três condições ambientais básicas são indispensáveis: presença de água, disponibilidade de oxigênio e temperatura (Castro *et al.*, 2004; Sert *et al.*, 2009).

O processo geral da germinação já é bem descrito e envolve uma série de atividades metabólicas que se iniciam a partir da embebição da semente. Todos os constituintes que a semente quiescente necessita para a retomada primária das atividades metabólicas já estão presentes na mesma (Bewley, 1997). O processo de embebição então reidrata todas essas células e constituintes já existentes, disparando a retomada da atividade metabólica, além de ativar o maquinário para formação das novas células, enzimas e demais componentes que serão posteriormente necessários para o desenvolvimento pós-germinativo (Bewley, 1997).

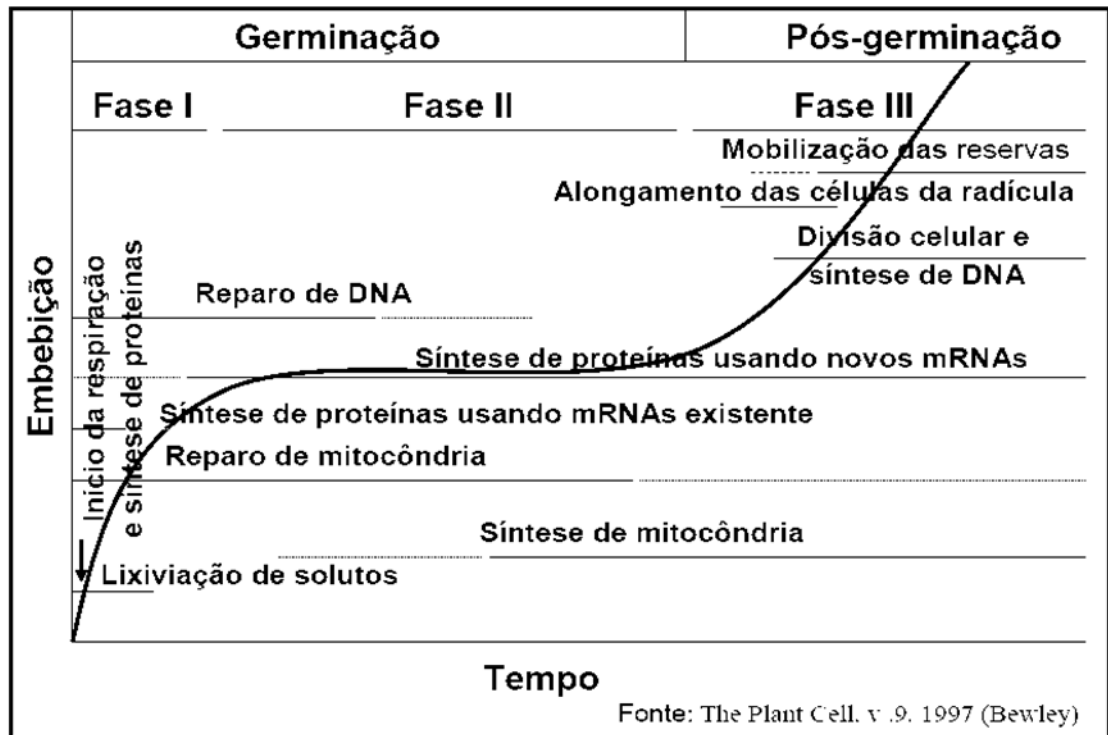
A absorção de água pela semente durante a germinação e o desenvolvimento pós-germinativo, de uma maneira geral, apresenta um caráter trifásico (Figura 1). A fase I é caracterizada por uma rápida tomada de água e, nessa fase, são

descritos processos como a liberação de solutos, inclusive inibidores de germinação, ativação de enzimas existentes e síntese de proteínas usando mRNAs pré-existentes (Bewley, 1997). As sementes quiescentes possuem mitocôndrias pobremente diferenciadas, que sofreram danos durante a dessecação, sendo assim no início da tomada de água há o reparo dessas mitocôndrias pré-existentes, além do início da síntese de novas mitocôndrias (Ehrenshaft e Brambi, 1990; Attucci *et al.*, 1991; Grelet *et al.*, 2005). Tolleter *et al.* (2007) demonstraram que organelas e enzimas, como as do ciclo de Krebs por exemplo, são protegidas da dessecação durante a maturação das sementes pelas proteínas LEAs (*Late Embryogenesis Abundant*). Já foi descrito que proteínas LEA exercem função de proteção em sementes de cevada (*Hordeum vulgare*), cenoura (*Dacus carota*), algodão (*Gossypium hirsutum*), milho (*Zea mays*), ervilha (*Pisum sativum*), nabo (*Brassica napus L.*), arroz (*Oryza sativa L.*), girassol (*Helianthus annuus*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e trigo (*Triticum spp.*) (Dure *et al.*, 1989; Skriver e Mundy 1990; Lane, 1991). Trabalhando com sementes de soja (*Glycine max*) Blackman *et al.* (1991) demonstraram que as proteínas LEAs se acumulam no tecido embrionário e são capazes de proteger as células durante o processo de dessecação, assim como alguns carboidratos (rafinose, trealose, sacarose e outros oligossacarídeos) encontrados em sementes.

Na fase II a redução na absorção de água caracteriza uma fase estável com síntese *de novo* de enzimas, translocação e assimilação das reservas de carboidratos, de síntese de novos mRNAs e síntese de proteínas a partir de novos mRNAs. Para a maioria das sementes de leguminosas, a germinação se completa ao final da fase II. A fase III compreende o desenvolvimento pós-germinativo e é caracterizada pelo aumento na absorção de água associada a uma intensa síntese de novos tecidos e células, culminando com o crescimento do eixo hipocótilo-radícula (Holdsworth *et al.*, 2008). Nessa fase há uma intensa atividade metabólica com alta produção de macromoléculas (polissacarídeos e proteínas). A mobilização de reservas é intensa nessa fase. As sementes ditas dormentes, conhecidas por não completarem a germinação, não conseguem ultrapassar a fase II (Kigel e Galili, 1995; Bewley, 1997).

Considera-se que a germinação está completa quando ocorre a emergência da radícula através do tegumento. Alguns eventos clássicos como o ápice da

mobilização de reservas proteicas estão associados com o desenvolvimento pós-germinativo e crescimento da plântula (Bewley, 1997; Vidal e Vidal, 2000).



**FIGURA 1:** Principais eventos bioquímicos durante a embebição de água nas fases de germinação e desenvolvimento pós-germinativo (Adaptado de Bewley, 1997).

### 1.2.1-Mobilização de reservas durante a germinação e desenvolvimento pós-germinativo

As reservas depositadas nas sementes durante a maturação desempenham importante papel no processo de germinação e estabelecimento da plântula, pois a nova planta dependerá destas reservas para se estabelecer. Segundo Buckeridge *et al.*, (2004) as principais substâncias de reserva em sementes são polissacarídeos, lipídeos e proteínas. Porém, a quantidade e a proporção dessas reservas podem variar entre gêneros ou espécies de mesmo gênero, de acordo com suas estratégias de dispersão e estabelecimento (Bewley e Black, 1994).

O amido é o polissacarídeo predominante nas sementes de plantas superiores e é considerado uma importante reserva, principalmente para as necessidades energéticas iniciais. As reservas de amido nas sementes podem variar de acordo com a espécie. Em sementes de *Araucaria angustifolia* a reserva de amido pode chegar a 60% do peso da semente (Cardemil e Reiner, 1982).

Várias enzimas estão envolvidas na degradação dos estoques de amido:  $\alpha$ -amilases,  $\beta$ -amilases e amido fosforilase (Bewley e Black, 1994; Zeeman *et al.*, 2010), porém a  $\alpha$ -amilase é a principal enzima envolvida na degradação do amido quebrando as ligações do tipo  $\alpha$ 1-4 (Kumari *et al.*, 2010). Corte *et al.*, (2006) trabalhando com sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth observaram que os grãos de amido foram as primeiras reservas a serem consumidas no processo germinativo.

Muitas sementes armazenam proteínas como suas principais reservas. Os aminoácidos oriundos da degradação destas proteínas possuem dois destinos durante a germinação e desenvolvimento pós-germinativo: alguns serão utilizados na biossíntese de novas proteínas, essenciais para o metabolismo ou degradação e outros serão redirecionados para as vias produtoras de energia como o Ciclo de Krebs (Bewley e Black, 1994; Tegeder, 2012).

A mobilização de proteínas armazenadas é observada em sementes de plantas. Porém, a mobilização de proteínas em cotilédones de leguminosas e no endosperma de cereais, é um evento predominante após a emergência da

radícula, sendo então um processo efetivamente pós-germinativo (Bewley e Black, 1994; Müntz, 1996; *apud* Müntz *et al.*, 2001).

As proteínas de sementes são classificadas de acordo com suas solubilidades como: albuminas que são solúveis em água e tampões neutros; globulinas solúveis em soluções salinas; glutelinas solúveis em soluções básicas ou ácidas e as prolaminas que são solúveis em soluções alcoólicas (Shewry, 1995). As principais proteínas de reserva das sementes são predominantemente pertencentes às classes das globulinas nas leguminosas, e das prolaminas nos cereais (Carasco *et al.*, 1978). As sementes quiescentes já possuem enzimas proteolíticas ativas ou que serão ativadas com o início da embebição (Müntz *et al.*, 2001).

As endopeptidases, conhecidas como proteinases, segundo a classificação de Storey e Wagner (1986) são subdivididas em quatro grupos a seguir:

- Proteinases serínicas (EC 3.4.21): são enzimas que possuem um resíduo do aminoácido serina em seu sítio ativo, de maneira geral possuem um pH ótimo em torno de 8,0 e 9,0 e a sua atividade pode ser inibida por aprotinina, inibidor de tripsina de soja e fenilmetilsulfonilfluorido.

- Proteinases cisteínicas (EC 3.4.22): são as enzimas que possuem um resíduo de cisteína no seu sítio catalítico, apresentam um pH ótimo em torno de 5,0 ou 6,0 e sua atividade pode ser inibida por E-64, cistatina, leupeptina entre outros.

- Proteinases aspárticas (EC 3.4.23): são as enzimas que dependem de um resíduo de asparagina para a sua atividade catalítica, mostrando um pH ótimo entre 3,0 e 4,0 e são inibidas por pepstatina.

- Metaloproteases (EC 3.4.24): são enzimas que necessitam de um íon metálico para o funcionamento adequado do seu mecanismo catalítico, possuem pH ótimo entre 8,0 e 9,0 e a inibição da sua atividade pode ser feita por EDTA e 1,10-fenantrolina.

As proteinases cisteínicas são consideradas as principais proteinases que atuam na mobilização das reservas de proteínas do tipo globulinas. Essas enzimas foram observadas em sementes de *Vicia sativa* L., juntamente com a detecção de seu mRNAs, ao longo de todo o período germinativo (Schlereth *et al.*, 2000; 2001). Proteinases cisteínicas também foram detectadas durante o

desenvolvimento de sementes de *Vigna unguiculata* nos trabalhos de Fernandes (1990) e Nong *et al.* (1995) detectaram em sementes de *Glycine max*.

Estudos comprovam que, durante a germinação de sementes de cevada, as proteinases cisteínicas do tipo papaína foram ativadas pela presença de giberelinas (Rogers *et al.*, 1985; Koehler e Ho, 1990). O que também foi observado em sementes de arroz (Watanabe *et al.*, 1991) e milho (De Barros e Larkins, 1990; Domoto *et al.*, 1995). Uma vez que essa indução é necessária para a degradação de proteínas de reserva liberando aminoácidos que atuarão na síntese proteica *de novo* na germinação. Entretanto, as plantas também podem acumular inibidores de proteinases cisteínicas em sementes maduras de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (Fernandes *et al.*, 1991) e em arroz (Abe *et al.*, 1987) podendo inibir sua síntese.

Os lipídios também são fontes importantes de energia para a germinação e o desenvolvimento pós-germinativo para algumas sementes. Essas reservas predominam na forma de triacilgliceróis e estão armazenados nos corpos lipídicos. Os triacilgliceróis acumulados são hidrolisados pela ação das lipases, liberando ácidos graxos, que são oxidados liberando energia para o estabelecimento da nova planta (Vallilo *et al.*, 2007).

Em trabalhos realizados com sementes de *Apuleia leiocarpa*, foi observado que as reservas de lipídios foram mobilizadas durante a germinação (Pontes *et al.*, 2002). Suda e Giorgini (2000) também observaram a mobilização dos lipídios no endosperma de sementes de *Euphorbia heterophylla*. Silva *et al.*, (1998) analisando a composição de ácidos graxos em sementes de *Dalbergia miscolobium*, observaram uma diferença na composição das gorduras armazenadas em diferentes tecidos da semente, nas quais foram detectadas altas concentrações de ácidos graxos nos eixos hipocótilo-radículas e que estavam ausentes nos cotilédones.

### 1.2.2-Controle hormonal da germinação

Durante a germinação os hormônios atuam na sinalização da comunicação do eixo hipocótilo-radícula e os tecidos de reserva modulando suas interações metabólicas. Os principais hormônios que controlam a germinação são: ácido



abscísico (ABA) - inibidor da germinação e giberelinas (Ácido Giberélico – GA<sub>3</sub>) - promotor da germinação (Taiz e Zeiger, 2013).

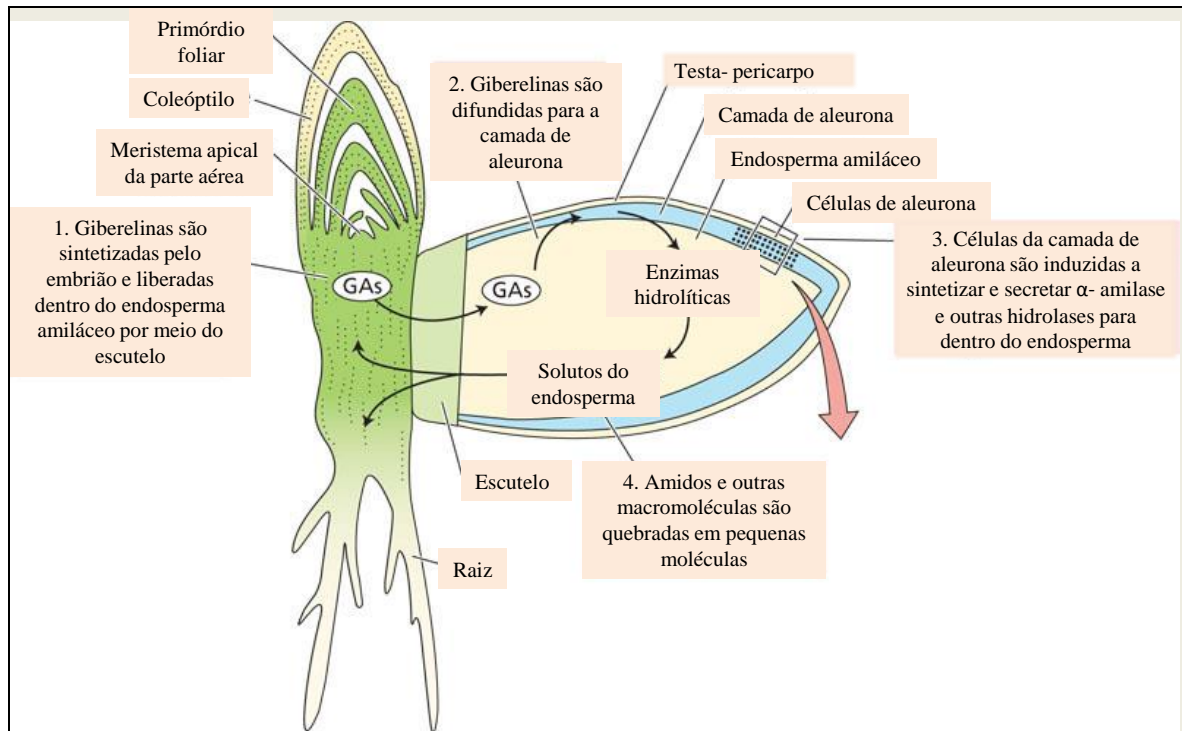
O ácido abscísico (ABA) é um fitohormônio reconhecidamente atuante na maturação de sementes. Sua síntese ocorre em amiloplastos ou cloroplastos (Nambara *et al.*, 2010). O ABA também pode agir na inibição da germinação ou atuando na promoção do acúmulo de reservas e na tolerância à dessecação. Durante a maturação de sementes o ABA está presente em altas concentrações para evitar a germinação precoce e seus níveis vão diminuindo até atingirem valores mínimos durante a germinação (Nambara *et al.*, 2010).

As GAs são fitohormônios conhecidos por participarem ativamente nas vias de sinalização, funcionando como regulador de crescimento durante a germinação e desenvolvimento pós-germinativo. São pertencentes à família dos diterpenos tetracíclicos formados por quatro unidades de isoprenos. A síntese das GAs ocorre em três compartimentos específicos: plastídeo; retículo endoplasmático e citossol (formação das GAs ativas (GA<sub>4</sub> e GA<sub>1</sub>) (Taiz e Zeiger, 2013).

Segundo Bewley e Black (1994), o ácido giberélico, conhecido como GA<sub>3</sub>, atua na expressão gênica, ativação e síntese de várias enzimas promovendo a germinação, aumentando a porcentagem e a velocidade de germinação. O GA<sub>3</sub> pode agir diretamente no crescimento celular; na extensibilidade da parede celular; na permeabilidade da membrana celular; na atividade enzimática; na variação do potencial osmótico e na mobilização de açúcar (Guardia e Benlloch, 1980).

As GAs ativam a síntese de hidrolases, como a  $\alpha$ -amilase, diminuindo a resistência mecânica favorecendo o crescimento da radícula (Lovegrove e Hooley, 2000; Kaneko *et al.*, 2002). Essa ativação ocorre na camada de aleurona estimulando a mobilização de reservas de amido durante a germinação de sementes (Taiz e Zeiger, 2013) (Figura 2). Sua ação como ativador de expressão da  $\alpha$ -amilase em células da camada de aleurona em sementes de *Hordeum vulgare* foi elucidada na década de 90 (Gubler *et al.*, 1995; Gubler *et al.*, 1999; Cercós *et al.*, 1999). Shen *et al.* (2003) demonstraram que o tratamento com GA<sub>3</sub> em folhas de arroz promoveu uma rápida alongação nos entre nós.

Castro (1981) relatou que o tratamento com GA<sub>3</sub> (100 mg L<sup>-1</sup>), proporcionou aumento na massa de matéria seca total e de folhas em plantas de soja.



**FIGURA 2:** Esquema mostrando a interação entre a síntese de GAs, a ativação de enzimas, a mobilização de reservas de um grão de cevada e as diferentes funções nos vários tecidos durante a germinação. (Adaptado: Taiz e Zeiger, 2013).

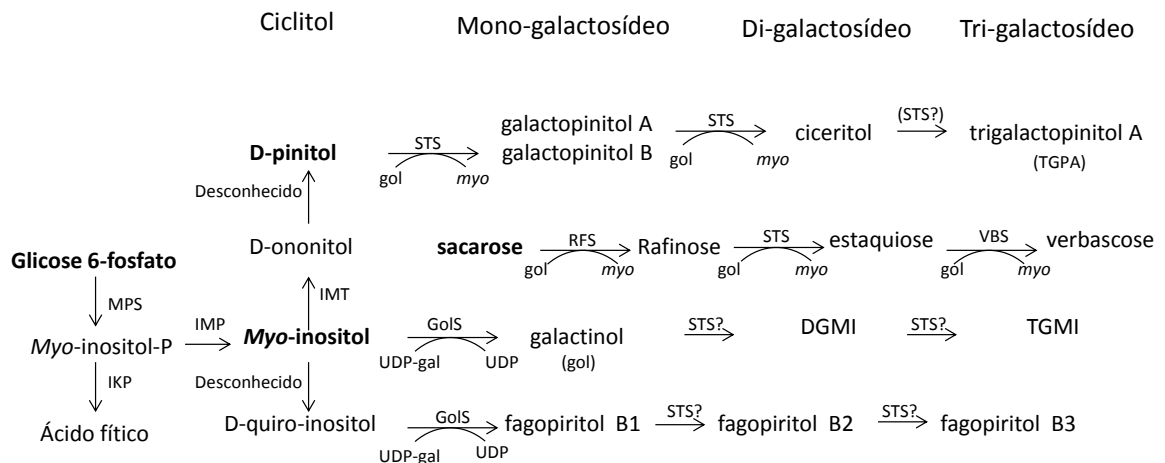
### 1.3-AÇÚCARES E SEUS DERIVADOS COMO MOLÉCULAS SINALIZADORAS

Tem sido demonstrado que as plantas também utilizam açúcares, principalmente mono e dissacarídeos ou seus derivados como sinalizadores para a ativação e coordenação do metabolismo entre tecidos, principalmente entre tecido fonte e os tecidos dreno (Rolland e Sheen, 2005). Os açúcares solúveis como sacarose, glicose e frutose já foram descritos atuando como sinalizadores capazes de modular a expressão de diferentes genes (Koch, 1996; Rolland *et al.*, 2002). Coue'e *et al.* (2006) destacaram não só a funcionalidade desses açúcares na manutenção das funções celulares vegetais, mas também seu envolvimento em sinais metabólicos como resposta a hormônios específicos nas vias de transdução de sinais.

Estudos têm mostrado que há uma interligação entre as vias de síntese e interconversão de açúcares e acredita-se que muito dessas vias sejam utilizadas para a interconversão de moléculas necessárias a sinalização e ativação de

processos metabólicos. A figura 3 mostra as interconversões envolvendo a família dos oligossacarídeos da série rafinose (RFOs), como a rafinose, estaquiose e verbascose, muitos dos quais são sintetizados a partir da sacarose e as adições subsequentes de galactoses formando derivados (Figura 3). Alguns desses açúcares são mostrados como ativadores do promotor da  $\alpha$ -amilase (Lu *et al.*, 1998). A deficiência de açúcares e outros nutrientes, como nitrogênio e fosfato podem conduzir a uma série de mecanismos de regulação de outras hidrolases, transportadores e fatores de transcrição, ativando a síntese da  $\alpha$ -amilase e outras enzimas hidrolíticas no escutelo e na camada de aleurona (Hong *et al.*, 2012)

Estudos anteriores mostram que a sacarose e a rafinose desempenham um importante papel durante a germinação de grãos de cevada (*Hordeum vulgare*), diminuindo seus níveis durante os primeiros estágios da germinação, porém a sacarose passa a aumentar no processo pós-germinativo (MacLeod, 1957; Palmer, 1969). Alguns trabalhos (Bernal-Lugo e Leopold, 1992; Karner *et al.*, 2004) tem demonstrado que além da função de armazenamento, a sacarose também está relacionada à a sinalização em processos de direcionamento do fluxo de nutrientes, em processos de proteção e integridade das membranas de plantas, principalmente quando submetidas a condições adversas, como déficit hídrico. O aumento da sacarose como efeito protetor durante a dessecação da semente está relacionado com o metabolismo da rafinose. Sreenivasulu *et al.* (2008) constataram que a trealose ajuda a estabilizar as proteínas que são ativadas durante a germinação precoce.



**FIGURA 3:** Via proposta para a síntese de ciclitois, galactosídeos ciclitois e família dos oligossacarídeos da série rafinose. Os parênteses indicam que as enzimas que catalisam tais reações ainda não foram elucidadas. MIPS: *Myo*- inositol-fosfato sintase (EC 5.5.1.4); *Myo*: *Myo*-inositol; IKP: *Myo*-inositol-fosfatase quinase; IMP: *Myo*-inositol-fosfato monofosfatase (EC 3.1.3.25); IMT: *Myo*-inositol 4-metiltransferase; STS: estaquiiose sintase (EC 2.4.1.67); RFS: rafinose sintase (EC 2.4.1.82); GOL-S: galactinol sintase (EC 2.4.1.123); UDP-GAL: uridina difosfato galactosídeo; TGMI: trigalactosil *Myo*-inositol; DGMI: digalactosil *Myo*-inositol; GOL-galactinol: TGPA: trigalactosil pinitol A; UDP: uridina difosfato; VBS: verbascose sintase (Adaptado de Obendorf *et al.*, 2009).

### 1.3.1-MYO-INOSITOL E D-PINITOL

O *Myo*-inositol (MI) é o ciclitol mais abundantemente encontrado nos vegetais. São compostos sintetizados a partir da glicose 6-fosfato (Figura 4) agindo como precursor da maioria dos outros inositois, incluindo o chiro-inositol, ononitol e o D-pinitol (Obendorf *et al.*, 2009). MI tem sido descrito como um segundo mensageiro em rotas de sinalização como transdução e regulação de sinal hormonal, regulação da síntese de ATP (adenosina trifosfato), transporte e estocagem de alguns hormônios (auxina); participa da biossíntese da parede celular e tráfego de vesículas (Saiard *et al.*, 2004).

Loewus e Murthy (2000) mostraram a ação do MI como fator de crescimento para certos micro-organismos, bem como sua exigência para o desenvolvimento de alguns mutantes de levedura, fato esse que tem motivado o interesse dos

pesquisadores para a descoberta de novas funções e características bioquímicas e biológicas desses compostos.

Loewus e Loewus (1983) também sugerem o papel dos MI no crescimento e desenvolvimento de plantas. Os MIs estão associados à estrutura e função de moléculas atuando diretamente como precursor para compostos em plantas, na reserva de fosfato, na transdução de sinal, na proteção de estresse, homeostase hormonais e biossíntese da parede celular (Morré *et al.*, 1990; Loewus e Murthy, 2000).

Em plantas de *Arabidopsis* e *G. max* mutantes expressando variações mutantes da enzima *Myo*-inositol fosfato sintase foram observadas alterações no processo da embriogênese, como defeitos no desenvolvimento do endosperma e na deposição de reservas, demonstrando que essas moléculas participam de maneira efetiva nesses processos bioquímicos (Abid *et al.*, 2009). Chun *et al.* (2003) demonstraram que os MIs participam ainda, no remodelamento da cromatina, reparo e recombinação de DNA, expressão de genes e exportação de mRNA.

O D-Pinitol (1D-30-metil-chiro-inositol) é outro importante ciclitol encontrado nas plantas. D-pinitol é um dos principais carboidratos solúveis encontrados em plantas de soja (Kuo *et al.*, 1988; Guo e Oosterhuis, 1993; 1997). Este ciclitol é formado a partir da metilação do *Myo*-inositol e tem sido detectado em vários tecidos de vegetais, como folhas, caules, raízes e sementes (Kuo *et al.*, 1997). Foi também detectado nos brotos florais e folhas de jojoba (Dittrich e Korak, 1984; Nelson e Bartels, (1992). Alguns trabalhos têm relacionado este ciclitol com a resposta das plantas a estresses ambientais como alta salinidade, baixa temperatura, concentração de sódio (Bialeski, 1994; Murakeözy *et al.*, 2002) e estresse hídrico (McManus *et al.*, 2000). Guo e Oosterhuis (1997) demonstraram que plantas de *G. max* submetidas ao déficit hídrico aumentaram significativamente os conteúdos de pinitol em suas folhas.

Yamada *et al.* (1995) mostraram relação entre as concentrações de D-pinitol com a capacidade da espécie *Mesembryanthemum crystallinum*, conhecida como planta do gelo, se desenvolver sob condições adversas (seca, salinidade do solo e baixas temperaturas). O aumento da expressão de genes envolvidos na síntese de pinitol também tem sido observado em plantas submetidas a condições adversas (Vernon e Bohnert, 1992).

Bieleski (1994b) relatou que plantas provenientes de ambientes com alta salinidade acumulam altos níveis de D-pinitol em suas folhas. Kuo *et al.* (1997) observaram que o conteúdo de D-pinitol varia enormemente nos diferentes tecidos durante o desenvolvimento de sementes de *G. max*.

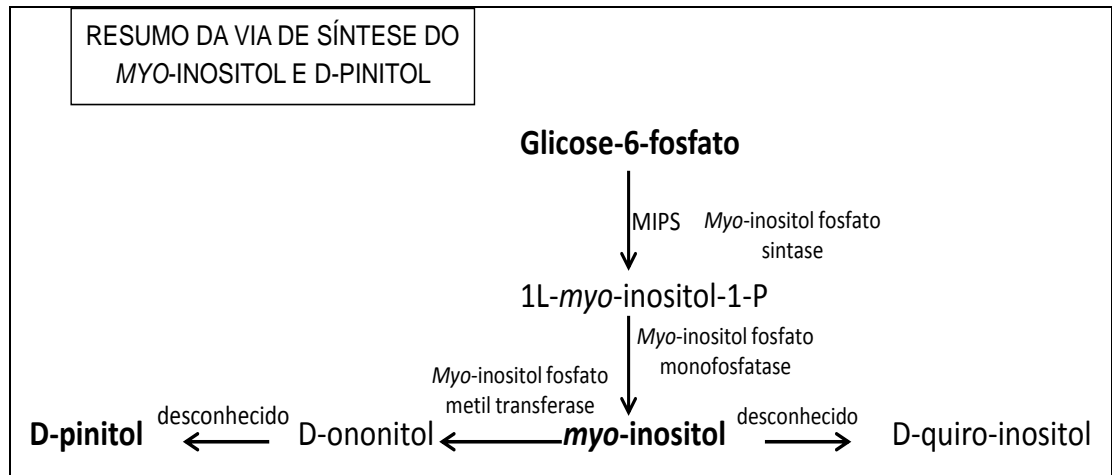
A presença dos *Myo*-inositois e do D-pinitol em diferentes partes do vegetal tem sido associada a funções tais como: transporte e armazenamento de açúcares, regulação osmótica, resposta a condições de alta salinidade e déficit hídrico (Loescher, 1987; Bieleski *et al.*, 1997). Entretanto, o D-pinitol se destaca como sendo o principal carboidrato associado ao mecanismo de resposta em plantas (Bieleski, 1994a). Murakeozy *et al.* (2002) identificaram a presença expressiva do D-pinitol nos carboidratos totais de folhas e raízes de *Limonium gmelini*. Em alguns casos, D-pinitol e MI podem se acumular em tecidos vegetais em concentrações superiores as de glicose, frutose e sacarose (Chiera *et al.*, 2006). Estudos mostraram que folhas de *G. max* contém quantidades relativamente altas de ciclitois como o D-pinitol, *Myo*-inositol, D-chiro-inositol e D-ononitol, além de sacarose, maltose, frutose e glicose (Streeter *et al.*, 2001; Kosina *et al.*, 2009).

D-pinitol também tem sido relacionado com a promoção de crescimento para alguns vegetais. Oliveira *et al.* (2004) trabalhando com sementes de *Canavalia ensiformis* germinada na presença de D-pinitol, mostraram que esse composto promoveu a germinação e desenvolvimento pós-germinativo, aumentando consideravelmente o tamanho e a massa do eixo hipocótilo-radícula e dos epicótilos das plântulas. Resultados similares também foram observados nos estudos de Silva (2006) em sementes de *Phaseolus vulgaris* e Ribeiro (2011), onde em sementes de *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris* germinadas na presença de D-pinitol tiveram o tamanho de seus eixos hipocótilos-radícula e epicótilos aumentados. Entretanto, aumentos na atividade e expressão do gene da  $\alpha$ -amilase também foram observados por Ribeiro (2011).

Ribeiro *et al.* (2011) observaram a presença de *Myo*-inositol durante a germinação e desenvolvimento pós-germinativo de *V. unguiculata* e *P. vulgaris*, enquanto D-pinitol foi detectado apenas em cotilédones de sementes quiescentes.

Embora existam evidências claras sobre os efeitos positivos de D-pinitol sobre a promoção do crescimento do eixo hipocótilo-radícula durante a germinação, os mecanismos de ação que explicam esses efeitos ainda não estão elucidados. Os

resultados positivos do tratamento sobre a ativação da amilase, mostrados anteriormente apontam para um possível mecanismo de ação sobre o aumento da mobilização de reservas.



**FIGURA 4:** Resumo da via de síntese do D-pinitol e *Myo*-inositol (Adaptado de Obendorf *et al.*, 2009).

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- Objetivo geral

➤ Investigar os efeitos do *Myo*-inositol e do D-pinitol na germinação e desenvolvimento pós-germinativo de sementes de soja *G. max* (BRS 284).

### 2.2- Objetivos específicos

➤ Avaliar os efeitos dos tratamentos com *Myo*-inositol e D-pinitol na taxa germinativa e no tamanho do eixo hipocótilo-radícula das sementes de soja.

➤ Quantificar as reservas energéticas de triacilglicerois, proteínas e carboidratos em cotilédones e eixos hipocótilo-radículas submetidos aos tratamentos.

➤ Avaliar a atividade de enzimas chaves na mobilização das reservas energéticas como proteases e amilases.

## 3- MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1- Sementes de soja (*G. max*)

As sementes de soja BRS 284 utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela Embrapa/Soja de Londrina-PR. Essa cultivar se apresenta bem adaptada nos Estados do PR, SP, SC, MS, MG e GO e com melhor desempenho em áreas com altitude de até 700 metros.

Possui como característica ser precoce, de crescimento indeterminado, ou seja, não possui vagens na gema terminal. Seus teores proteicos estão em torno de 38,7% e de óleo 20,4% (EMBRAPA SOJA, 2013).

A cultivar BRS 284 possui excelente potencial produtivo mesmo em áreas de ocorrência do nematoide de galha *Meloidogyne javanica*, uma das principais pragas da cultura da soja (Gomes, 1976).

### 3.2- Experimentos de germinação

Os experimentos foram realizados em triplicata, usando 20 sementes por placa utilizando água destilada (controle), solução de D-pinitol numa concentração de 0,36 µg/mL, (concentração previamente definida como efetiva no desenvolvimento dos eixos hipocótilo-radículas de *Gycine max*, (Ribeiro, 2011).



As sementes foram desinfestadas por uma rápida lavagem com uma solução de álcool etílico 70%, em seguida foram colocadas para germinar em placas de Petri (14 cm de diâmetro) contendo algodão estéril (1,6 g/placa) e umedecido com 30 mL de água destilada estéril (controle) ou 30 mL de solução de D-pinitol. As placas foram mantidas numa estufa incubadora (fotoperíodo 12h luz/12h escuro) a 28°C, umidade relativa ambiente de 60% e observadas em intervalos de 12h por até 96 horas.

Um segundo experimento de germinação foi conduzido para determinar a concentração efetiva ideal de *Myo*-inositol seguindo os mesmos procedimentos de repetições, montagem das placas e desinfestação anteriormente citadas. Para isso foram utilizadas cinco concentrações diferentes: 0,002; 0,09; 0,36; 0,72 e 1,44 µg/mL. Os procedimentos seguintes da germinação foram executados como descrito acima. A cada intervalo de 12 horas, todas as sementes foram separadas em suas partes constituintes como: tegumento, cotilédones e eixo hipocótilo-radícula (ao fim da germinação). Para as dosagens específicas propostas para este trabalho foram utilizados os cotilédones e eixo hipocótilo-radícula, os quais foram medidos, congelados em nitrogênio líquido, macerados, liofilizados e mantidos sob refrigeração a -20 °C.

### 3.3- Curva de embebição de água

Para determinação da curva de embebição foram utilizadas 20 sementes em cada placa de Petri, as quais continham algodão embebidos em 30 mL de água destilada (controle) ou nas soluções de *myo*-inositol ou D-pinitol (0,36 µg/mL). A cada intervalo de 12 horas, 10 sementes foram retiradas da placa e pesadas para a obtenção da matéria fresca (MF) até um total de 96 horas de embebição. Após esse período, as sementes foram liofilizadas por um período de 4 dias e pesadas novamente para obtenção da massa da matéria seca (MS) correspondente a cada período de embebição.

### 3.4- Dosagens das proteínas solúveis em Tampão Salino

As proteínas totais solúveis em tampão salino dos eixos hipocótilo-radículas e cotilédones foram extraídas utilizando 1 mg do pó/1 mL de tampão de fosfato de

sódio 100 mM, cloreto de sódio 500 mM, pH 7,6 (Tampão PBS). As amostras foram submetidas à agitação sob refrigeração por 1 hora a 4°C e posteriormente centrifugadas (3000 x g a 4°C) por 5 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado para o ensaio.

A dosagem de proteínas utilizando o método do ácido bicinonínico (BCA) foi realizada segundo a metodologia de Smith (1985), utilizando-se 20 µL das amostras extraídas e acrescentadas de 200 µL do reagente BCA na proporção de 1:50. Em seguida as amostras foram incubadas em banho-maria por 30 minutos. Após esse período um volume de 220 µL foi transferido para placa de cultura de células e as absorbâncias lidas a 540 nm em um espectrofotômetro. O branco da amostra conteve 20 µL do tampão PBS com 200 µL do reagente BCA. Para determinar a concentração de proteínas nas amostras foi utilizada uma curva padrão de ovoalbumina.

### 3.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a visualização do perfil proteico, as amostras foram submetidas ao processo de eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), na presença de SDS segundo a metodologia descrita por Laemmli, (1970) e quantificadas por densitometria.

O gel principal (gel de separação) foi montado em placas de vidro de 10 X 13,5 cm, misturando-se: 3,3 mL de água destilada; 4,0 mL de uma solução de acrilamida mix 30 %; 2,5 mL de tampão Tris 1,5 M pH 8,8; 0,1 mL de SDS 10 %; 0,1 mL de persulfato de amônia (APS) 10 % e 0,004 mL de TEMED.

O gel de empacotamento foi preparado misturando-se: 2,7 mL de água destilada; 0,67 mL de uma solução de acrilamida mix a 30 %; 0,5 mL de tampão Tris 1,0 M pH 6,8; 0,04 mL de SDS 10 % ; 0,04 mL de persulfato de amônio 10 % (APS) e 0,004 mL de TEMED. O tampão de corrida para eletroforese foi o Tris-glicina contendo SDS 1% em pH 8,8 e água (q.s.p. 1000 mL). A eletroforese processou-se por aproximadamente 3 horas com uma voltagem de 50 V e após passar pelo empacotamento foi colocada uma voltagem de 100 V até o final do processo.

Para o preparo das amostras foram pesados 1 mg de pó dos cotilédones e eixos hipocótilo-radículas tratados com *Myo*-inositol e D-pinitol e em seguida

dissolvidos em tampão de amostra (1 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 3,8 mL de água destilada; 0,8 mL de glicerol; 1,6 mL de SDS 10 % e 0,4 mL de Azul de bromofenol 1 %). As amostras foram deixadas agitando na geladeira por 15 minutos, centrifugadas e por fim foram aplicados 20  $\mu$ L dessa mistura em cada poço do gel. O gel foi corado com uma solução de Azul de Coomassie R 0,1%, 40% de metanol e 10% de ácido acético). O gel foi descorado por uma solução de 35 % de metanol e 10 % ácido acético). O marcador de peso molecular cromóforo utilizado foi: Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker (12 000 – 225 000 kDa) RPN800E GE Healthcare (Figuras 12, 13 e 16 A e B).

### 3.6- Atividade enzimática em gel de gelatina (Zimografia)

Para a detecção da atividade em gel de proteinases cisteínicas, foi preparado um gel contendo gelatina 1% em gel de poliacrilamida 12%, tendo por base a metodologia descrita primeiramente por Heussen e Doudle (1980). O marcador de massa molecular utilizado foi o PageRuler™ Prestained Protein Ladder, com kDa de 10 a 180 (Fig. 17 A e B). Através desta técnica foram analisadas as atividades proteinásicas de amostras dos eixos hipocótilo-radículas em diferentes tempos (12 a 96 horas) de embebição.

A eletroforese foi processada como descrito na seção 3.4 e após o gel foi lavado com Triton X-100 2,5% por 4 vezes, durante 30 minutos cada e incubado por 14 horas em um banho-maria a 37°C em tampão citrato-fosfato pH 5,6. Posteriormente, o gel foi corado por uma solução contendo Azul de Coomassie R 0,1% em uma solução de metanol 40%, ácido acético 10% e água (q.s.p. 400 mL) e descorado com uma solução de metanol 35%, ácido acético 10% e água (q.s.p. 500 mL).

### 3.7- Determinação da atividade das proteinases cisteínicas do tipo papaína

As atividades *in vitro* das proteinases cisteínicas foram realizadas conforme descrito por Michaud *et al.* (1994), com modificações por Oliveira (2007) e utilizando a azocazeína como substrato. As amostras foram submetidas à extração de proteínas na proporção de 15 mg de pó de cotilédones e eixo

hipocótilo-radículas diluídos em 150  $\mu\text{L}$  de tampão citrato-fosfato (citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio monobásico 100 mM, Triton X-100 0,1%, DTT 1,5 mM, pH 5,6). A extração ocorreu durante 2 horas, sob agitação a 4°C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado no experimento. Para obtenção da curva, a papaína foi diluída na proporção de 1 mg/2 mL de tampão citrato-fosfato obtendo-se uma solução com uma concentração final de papaína de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Azocaseína 1% foi preparada em 10 mL de tampão citrato-fosfato.

O ensaio foi preparado com quantidades crescentes (1; 2; 4; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20 e 22  $\mu\text{L}$ ) da solução estoque (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) da papaína, 80  $\mu\text{L}$  da solução de azocaseína 1% e tampão citrato-fosfato para completar um volume final de 120  $\mu\text{L}$ . A seguir foram levadas para incubação de 1 hora em banho-maria a 37 °C. Logo após esse período a reação foi parada com 300  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 10% e levadas para centrifugação por 5 minutos a 10000 x g a 26 °C. Foram transferidos 350  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para novos eppendorfs, onde foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 M. A leitura foi feita em comprimento de onda de 440 nm.

As atividades proteínásicas das amostras utilizando o substrato azocaseína em pH 5,6 é indicado para proteinases cisteínicas semelhantes à papaína. A reação foi realizada incubando-se 80  $\mu\text{L}$  da solução azocaseína 1% com 30  $\mu\text{L}$  das amostras com 10  $\mu\text{L}$  de tampão citrato-fosfato. Após a incubação a 37 °C em banho-maria por 1 hora, a reação foi parada pela adição de 300  $\mu\text{L}$  de TCA 10%. Em seguida, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 10000 x g. Foram retirados 350  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, adicionados 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 M. As amostras foram submetidas à leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 440 nm.

### 3.8- Quantificação dos triacilgliceróis

As dosagens dos triacilgliceróis foram realizadas utilizando o kit TRIGLICÉRIDES 120 da empresa DOLES. O sistema para dosagem enzimática compõem-se de uma mistura de enzimas/ATP liofilizadas (lipase, glicerolquinase, glicerolfosfato, oxidase, peroxidase/0,024 mmol de ATP) e 0,018 mmol de 4-

Aminoantipirina. Um tampão e uma solução de glicerol. As absorbâncias das amostras foram lidas por espectrofotometria em comprimento de onda de 510 nm.

A quantificação de triacilglicerois foi realizada em cotilédones tratados e não tratados com D-pinitol. 1 mg de pó de cotilédones foram diluídos em 1 mL de tampão (preparado do Kit), agitados por 1 hora em temperatura ambiente e centrifugados e por fim utilizou-se 25  $\mu$ L do sobrenadante. Para a curva foram tabulados treze pontos contendo: 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5  $\mu$ L de glicerol, adicionados a 1 mL de tampão do kit. Os pontos da curva de glicerol foram levados para incubação por 10 min a 37 °C. O experimento foi feito em triplicata.

### 3.9- Determinação da atividade da $\alpha$ -amilase

A determinação da atividade enzimática das  $\alpha$ -amilases foi feita através da dosagem de açúcares redutores, baseada na metodologia descrita por Miller (1959), com modificações.

Para a realização do ensaio foi preparado o reagente ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) da seguinte forma: Na solução 1- em 30 mL de H<sub>2</sub>O destilada foram adicionados 4,5 % de hidróxido de sódio (NaOH). Na solução 2- 1% de ácido 3,5 dinitrossalicílico e 25,5% de tartarato duplo de sódio e potássio foram dissolvidos em 88 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Na solução 3- uma solução composta de 1 g de fenol cristalino dissolvido em 2,2 mL de uma solução de NaOH 10 % e o volume final foi levado a 10 mL com água destilada. O reagente DNS é composto da soma das três soluções preparadas.

Para a realização do ensaio, em triplicata, 1 mg do pó de cotilédones e eixos hipocótilo-radículas tratados ou não com *Myo*-inositol e D-pinitol foram diluídos em 400  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,8. As amostras foram agitadas durante 30 minutos a 4 °C, centrifugadas a 3000 g por 5 minutos a 4 °C. Aos sobrenadantes (25  $\mu$ L) foram adicionados 6  $\mu$ L de uma solução de amido 1 % e 19  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada. Foram feitos três brancos: o branco do reagente DNS (50  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio); o branco da solução de amido 1 % (25  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio, 25  $\mu$ L da solução de amido 1 %) e os brancos das amostras (25  $\mu$ L de cada amostra, 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada). Todas as amostras foram incubadas a 37 °C em banho-maria por 45 minutos. Após o resfriamento

foram, então, adicionados 100 mL do reagente DNS e em seguida foram fervidas durante 5 minutos e ao fim desse processo foram adicionadas 100  $\mu$ L de água destilada. Um volume de 250  $\mu$ L de cada amostra foi transferido para uma placa de cultura de células com 96 poços para leitura em um leitor de microplacas, sob um comprimento de onda de 540 nm.

Para quantificarmos a atividade da  $\alpha$ -amilase nas amostras, foi preparada uma curva padrão utilizando maltose como açúcar redutor. Para isso, foi preparada uma solução de maltose 1 % e quantidades crescentes desta solução (1,25; 2,50; 3,75; 5,0; 6,25; 7,5; 8,75; 10,0; 11,25; 12,5; 13,75; 15,0; 16,25; 17,5; 18,75; 20,0; 21,25; 22,05; 23,75; e 25,0  $\mu$ L) foram colocadas em tubos eppendorfs, aos quais foi adicionada água destilada para completar um volume final de 50  $\mu$ L. Em cada tubo, foram adicionados 100  $\mu$ L de reagente de DNS e, posteriormente, as soluções foram fervidas a 100 °C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L de água destilada e 250  $\mu$ L de cada solução foram transferidos para uma placa de cultura de células, para que as absorvâncias pudessem ser lidas num leitor de microplacas a 540 nm.

### 3.10- Quantificação dos açúcares redutores

A quantificação de açúcares redutores foi feita seguindo a metodologia descrita por Miller (1959), com modificações.

As amostras de cotilédones e eixos hipocótilo-radículas foram dissolvidas nas seguintes proporções: 1 mg em 400  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,8. Em seguida foram submetidas à agitação a 4 °C por 30 minutos, centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos a 4 °C para retirada do sobrenadante e transferidos para novos tubos. O ensaio enzimático foi realizado em triplicata. Foram utilizadas 50  $\mu$ L das amostras onde adicionou-se 100  $\mu$ L de DNS e em seguida foram levadas à fervura a 100 °C por 5 minutos. Ao final foram acrescentados 100  $\mu$ L de água destilada e lidas a 540 nm no espectrofotômetro. A curva de maltose utilizada nesse ensaio foi a mesma descrita no item anterior para o ensaio da  $\alpha$ -amilase.

### 3.11- Determinação dos aminoácidos livres

Para determinação dos aminoácidos livres foram escolhidas as amostras dos cotilédones tratados com *Myo*-inositol nos tempos de 60 e 96 horas e seus respectivos controles. Uma quantidade de 1 mg do pó de cotilédones foi ressuspenso em 1mL de HCl 0,02 M. A solução obtida foi agitada, filtrada e transferida para novos tubos. Em seguida procedeu-se a diluição, onde retirou-se 10 µL da solução contendo a amostra e acrescentou-se 190 µL de HCl 0,02 M. Foram aplicadas 20 µL dessa solução diluída na coluna de troca iônica.

Para a análise dos aminoácidos livres foi empregada a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) num cromatógrafo Shimadzu modelo LC- 10AD, equipado com coluna de troca catiônica Amino-Na e detector de fluorescência seguindo o manual de instruções do equipamento (Shimadzu Corporation, 1993). O fluxo de eluição foi de 0,5 mL/min. Para eluição foi empregado um gradiente crescente de pH, constituído por tampão citrato de sódio, Kit Shimadzu, tipo NA, formado pelas soluções tamponadas comerciais AA-MA, AA-MB e AA-MC, cuja composição química é descrita na tabela 1.

Os aminoácidos foram detectados por fluorescência de excitação/emissão de 350 nm e 450nm, respectivamente, utilizando derivatização pós-coluna empregando uma solução 0,08% de ortoftaldialdeído (OPA) em tampão Carbonato de sódio. A coluna foi padronizada com uma mistura de aminoácidos para hidrólise de proteínas (Sigma A9781) constituída de ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Gln), treonina (Thr), prolina (Pro), glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), lisina (Lys), arginina (Arg), serina (Ser), isoleucina (Ile). Foram aplicados 500 pmoles (picomoles) de cada aminoácido. Uma padronização adicional foi feita utilizando o aminoácido glutamina, ausente na mistura anterior.

Tabela 1- Composição química da fase móvel usada para eluição dos aminoácidos			
	Solução AA-MA	Solução AA-MB	Solução AA-MC
Normalidade	0,20	0,60	0,20
pH	3,20	10,00	(Não ajustar o pH)
Citrato de sódio.2H <sub>2</sub> O (g)	58,80	58,80	-
Hidróxido de sódio (g)	-	-	4,00
Ácido Bórico (g)	-	12,40	-
Etanol (mL)	210,00	-	-
Ácido perclórico (60%) (mL)	50,00	-	-
NaOH 4N (mL)	-	30,00	-
Volume Final (L)	3,00	1,00	0,50

### 3.12- Delineamento experimental

Um experimento preliminar foi instalado no delineamento inteiramente casualizado utilizando cinco concentrações de *myo*-inositol (0,022; 0,090; 0,360; 0,720; 1,440  $\mu\text{g/mL}$ ), um controle (H<sub>2</sub>O destilada), oito tempos de avaliação (12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas) e com duas repetições, com a finalidade de obter a melhor concentração na promoção do crescimento do eixo hipocótilo-radícula para ser utilizado posteriormente nos experimentos principais. A unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri contendo 20 sementes de *G. max*, cultivar BRS 284.

Dois experimentos principais foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 8). O primeiro experimento foi constituído de dois tratamentos (controle e D-pinitol) e 08 tempos de avaliação (de 12 em 12 horas) totalizando 96 horas. O segundo experimento foi constituído pelo *myo*-inositol e o tratamento controle (somente com água destilada) e os mesmos tempos de avaliação utilizados no primeiro experimento. Cada unidade experimental foi composta por uma placa de Petri contendo 20 sementes de soja,



cultivar BRS 284, sendo utilizadas três repetições por tratamento. Foram necessárias 1920 sementes  $[(2 \times 8) \times 2 \times 3 \times 20 = 1920]$ . As variáveis avaliadas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) após verificadas as preposições do teste F, principalmente a normalidade dos erros e a homogeneidade das variâncias dos tratamentos. Atendidos os pré-requisitos, foram realizadas as ANOVAS e seus desdobramentos necessários. Os tratamentos foram comparados pelo teste da diferença mínima significativa (d.m.s.), ou seja, utilizando o teste estatístico “t” de Student protegido pela análise de variância. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do aplicativo computacional GENES (Cruz, 2013).

#### 4- RESULTADOS

##### 4.1- Efeitos do tratamento com o *Myo*-inositol sobre o crescimento dos eixos hipocótilo-radículas de *G. max*

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostraram que o tratamento com *Myo*-inositol na concentração de 0,36  $\mu\text{g/mL}$  apresentou um efeito positivo sobre o crescimento dos eixos hipocótilo-radículas de plântulas de *G. max* (Figura 5 B). O aumento observado foi de aproximadamente de 30%. A partir desse resultado esta foi definida como a concentração efetiva e utilizada nos demais experimentos.

Tabela 2- Comprimento médio dos eixos hipocótilo-radículas de soja *G. max* embebidos em concentrações crescentes de *Myo*-inositol por 96 horas. \*Comparações pelo teste da diferença mínima significativa (DMS) à 5% de probabilidade.

Concentração	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Comprimento (cm)	Comparação (DMS)
0	0,000	3,2185	C
1	0,022	3,7961	AB
2	0,090	3,5023	BC
3	0,360	4,1600	A
4	0,720	2,7460	D
5	1,440	3,0898	CD

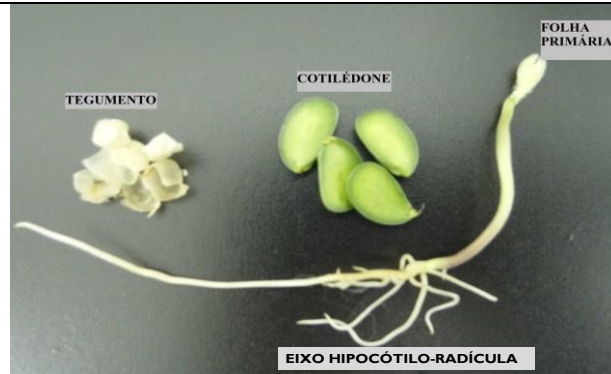


Figura 5 A: Partes constituintes de uma semente de soja germinada em 96 horas.

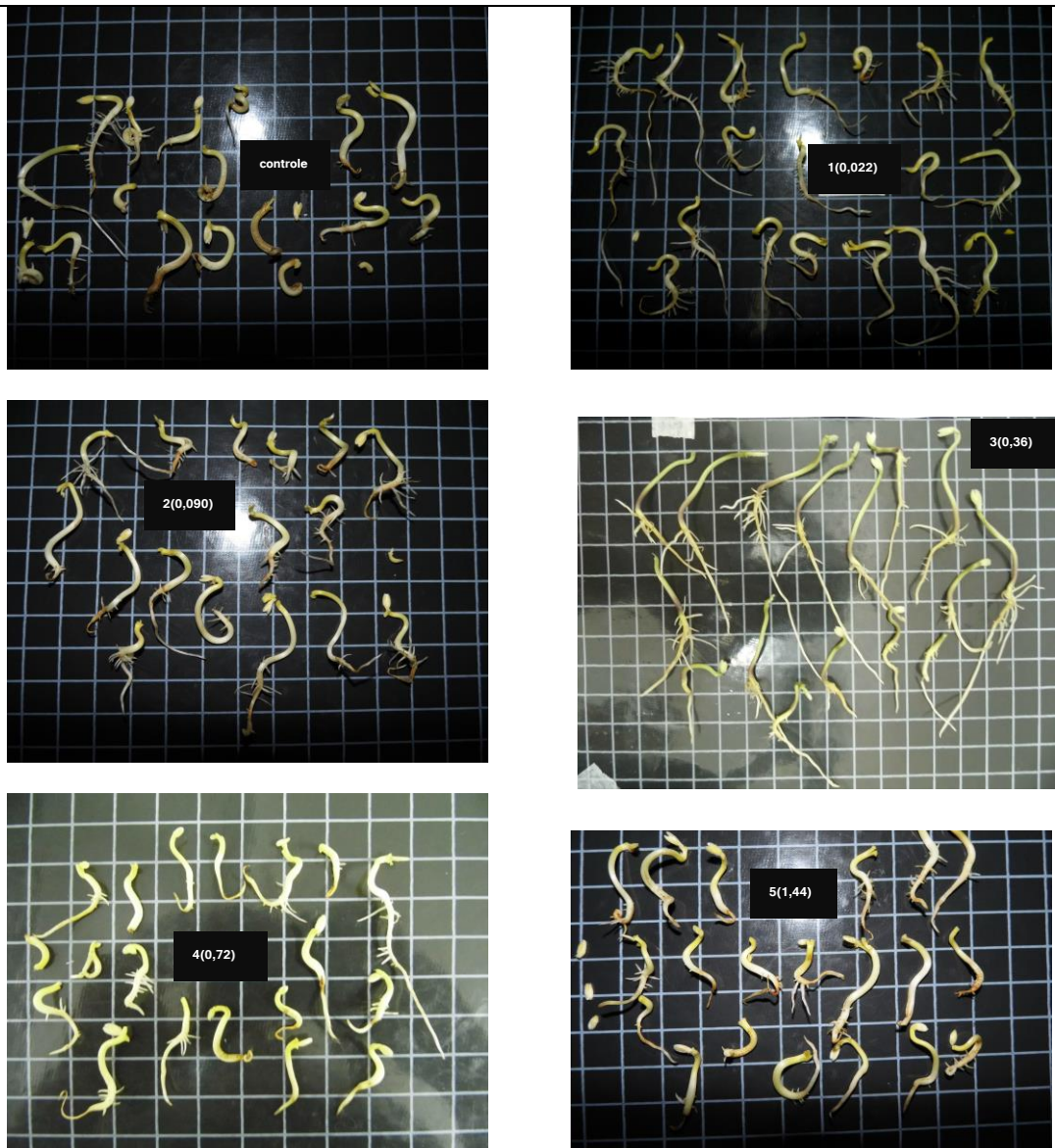


Figura 5 B: Eixos hipocótilo-radículas de sementes de *G. max* germinadas em concentrações de 0,022 a 1,44 $\mu$ g/mL de *myo*-inositol e controle (água destilada) no tempo de 96 horas. Folha quadriculada equivale à medida de 1cm.

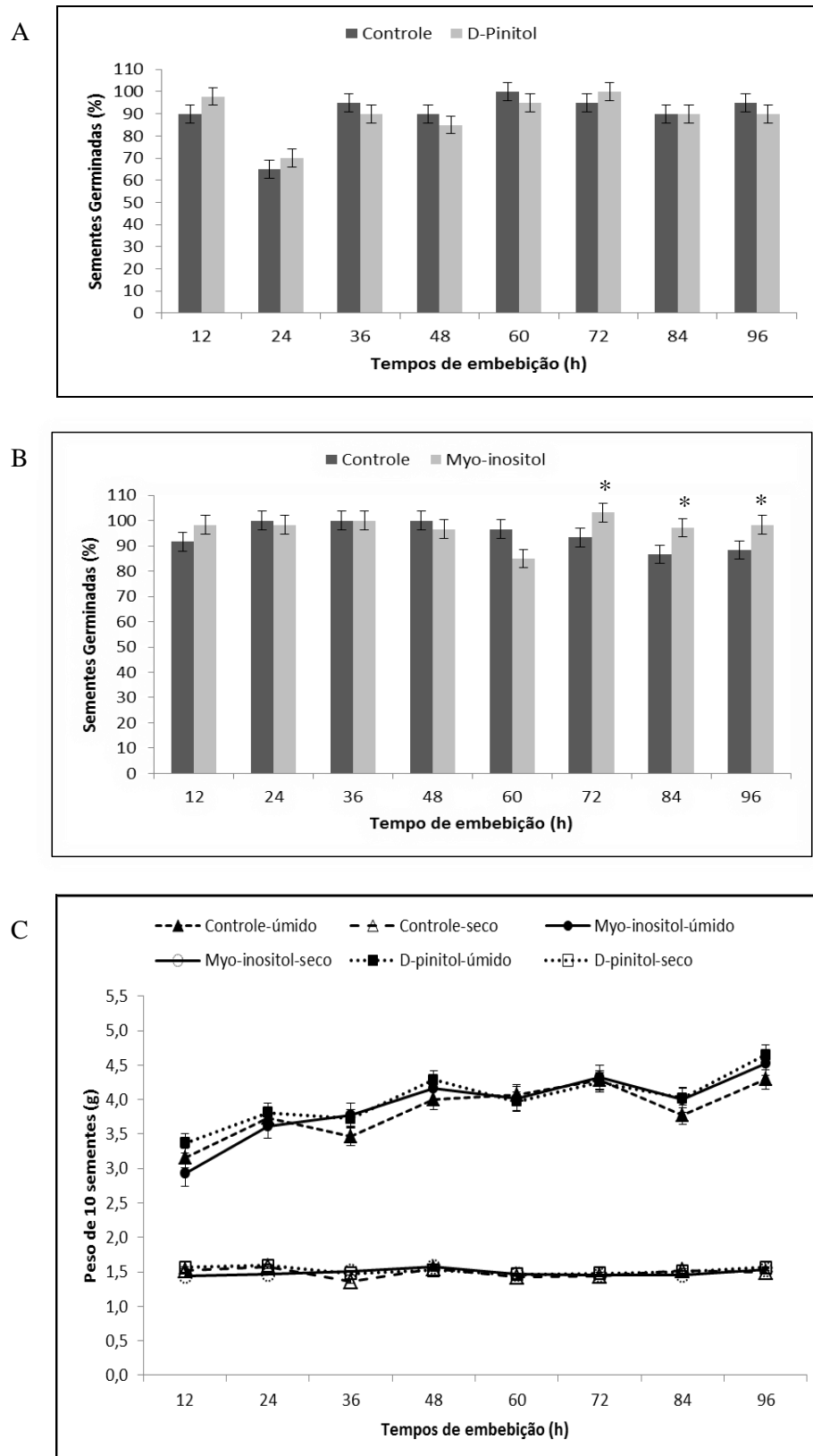
#### 4.2-Efeitos do tratamento com D-pinitol e *Myo*-inositol sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de *G. max*

O número de sementes germinadas não foi alterado comparando-se o tratamento com D-pinitol e o controle (Figura 6 A) em nenhum dos oito tempos de embebição. Diferentemente, o *Myo*-inositol promoveu pequenos aumentos significativos nas taxas germinativas das sementes de soja, a partir de 72 horas de embebição. Estas diferenças em relação ao tratamento controle ocorreram nos tempos de 72, 84 e 96 horas (Figura 6 B). Com relação à massa fresca e massa seca das sementes também não foram observadas alterações significativas entre os tratamentos (Figura 6C).

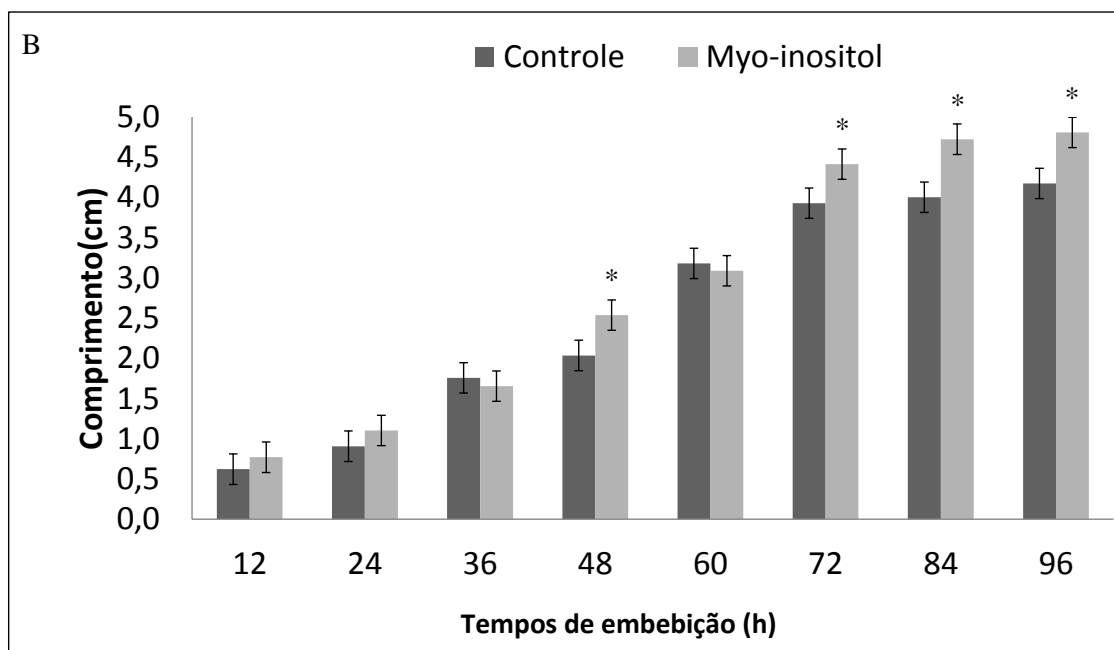
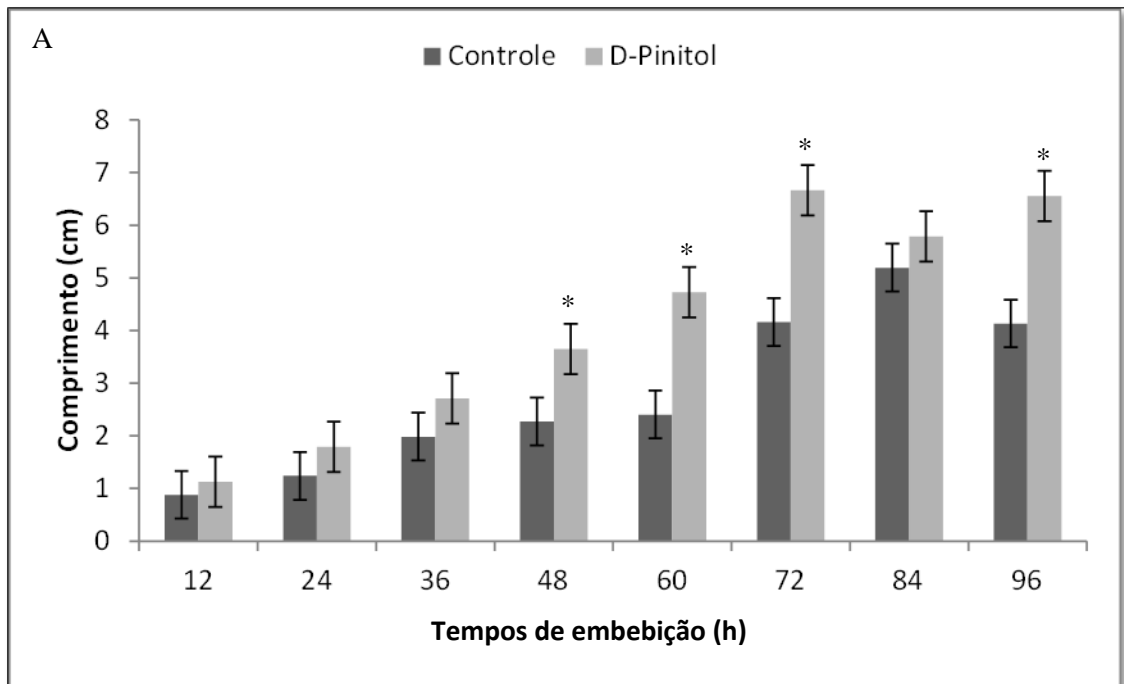
Com relação ao comprimento do eixo hipocótilo-radícula das plântulas de *G. max*, os tratamentos com D-pinitol e *Myo*-inositol promoveram aumentos no crescimento. O D-pinitol foi superior ao controle, pois promoveu o crescimento dos eixos hipocótilo-radículas das plântulas de *G. max* a partir do tempo de 48 horas, com exceção no tempo de 84 horas que não foi significativo (Figura 7 A).

Já o *Myo*-inositol proporcionou aumento no tamanho do eixo hipocótilo-radícula a partir do tempo de 48 horas de embebição, diferindo do controle nos tempos de 48, 72, 84 e 96 horas, com exceção no tempo de 60 horas (Figura 7 B).

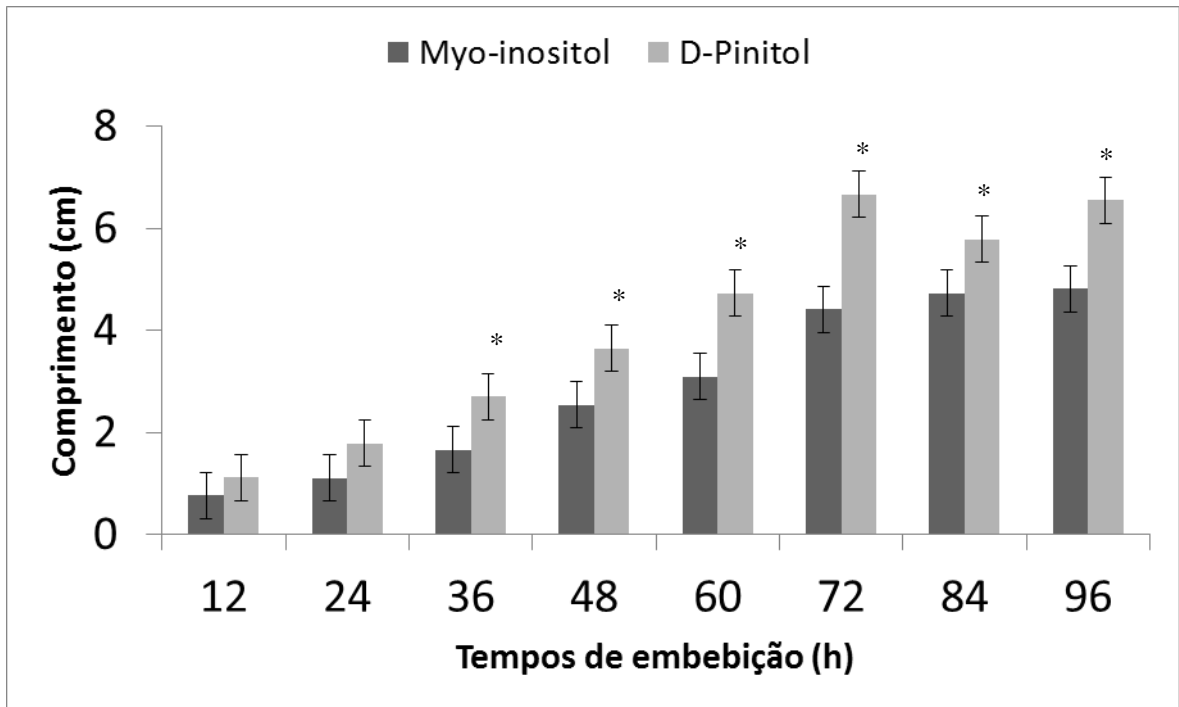
Porém, quando comparado os dois tratamentos pode-se observar que o D-pinitol foi o composto que promoveu aumentos mais expressivos que o *Myo*-inositol nos tempos a partir de 36 horas (Figura 8).



**FIGURA 6** – Número de sementes de *G. max*, cultivar BRS 284, germinadas em condições controle e sob os tratamentos com D-pinitol (A) ou *Myo*-inositol (B) expressos em porcentagem e (C) Massa fresca e seca (g) nos tempos de até 96 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados representam as médias das repetições.\* Estatisticamente significativo pelo teste do DMS ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 7-** Comprimento dos eixos hipocótilo-radículas de plântulas de *G. max*, cultivar BRS 284, tratadas com D-pinitol (A) ou com *Myo*-inositol (B). Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados representam as médias das repetições.\* Estatisticamente significativo pelo teste do DMS ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 8-** Comprimento dos eixos hipocótilo-radículas de plântulas de *G. max*, cultivar BRS 284, tratadas com *Myo*-inositol ou com D-pinitol (comparação entre os tratamentos). Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados representam as médias das repetições. \* Estatisticamente significativo pelo teste do DMS ( $P < 0,05$ ).

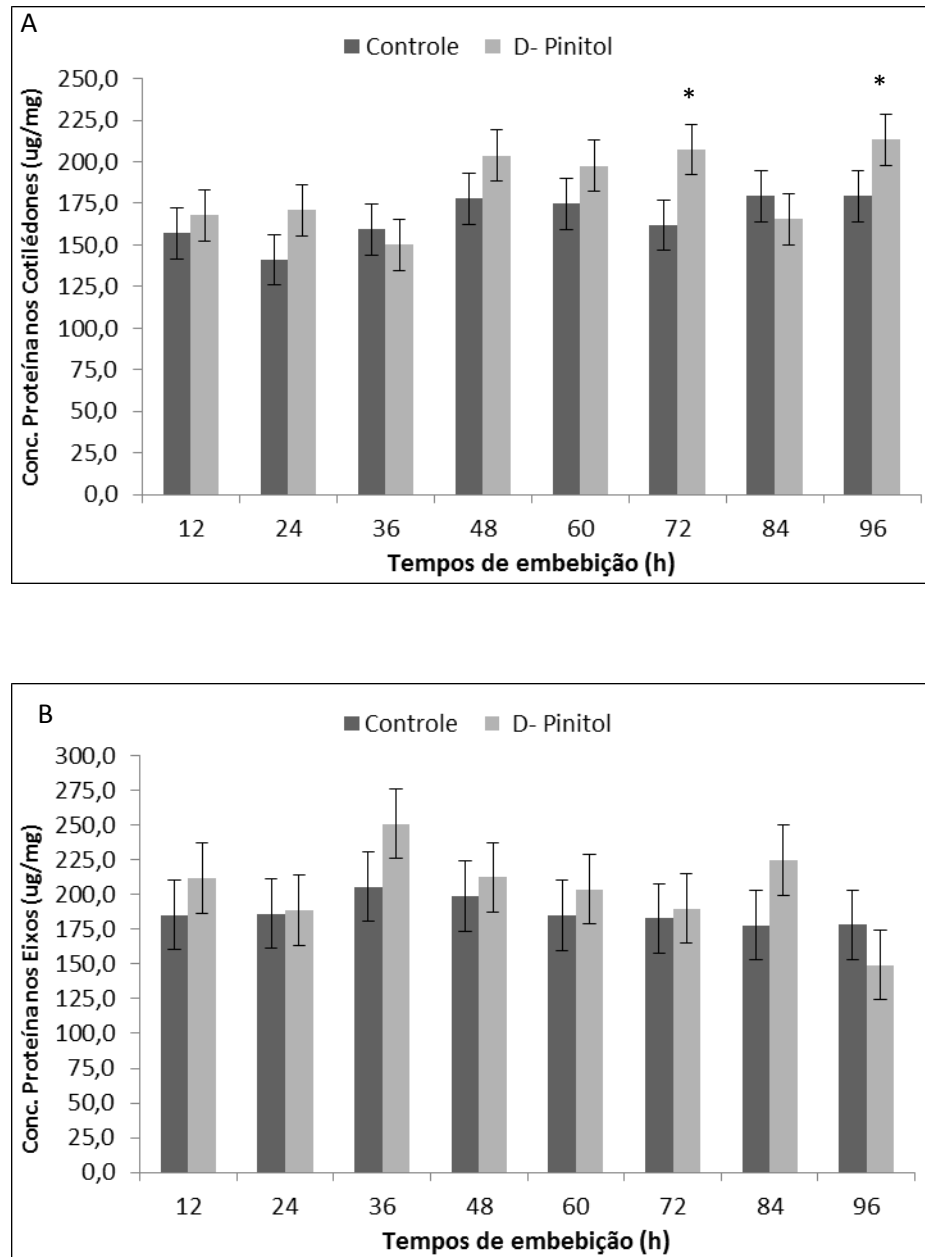
#### 4.3- Dosagem de proteínas em cotilédones e eixos hipocótilo-radículas tratados com D-pinitol

O tratamento D-pinitol promoveu aumentos significativos na concentração de proteínas nos cotilédones nos tempos de 72 e de 96 horas de embebição (figura 9 A). Entretanto, nos eixos hipocótilo-radículas não houve diferença significativa entre os tratamentos com D-pinitol e água (figura 9 B).

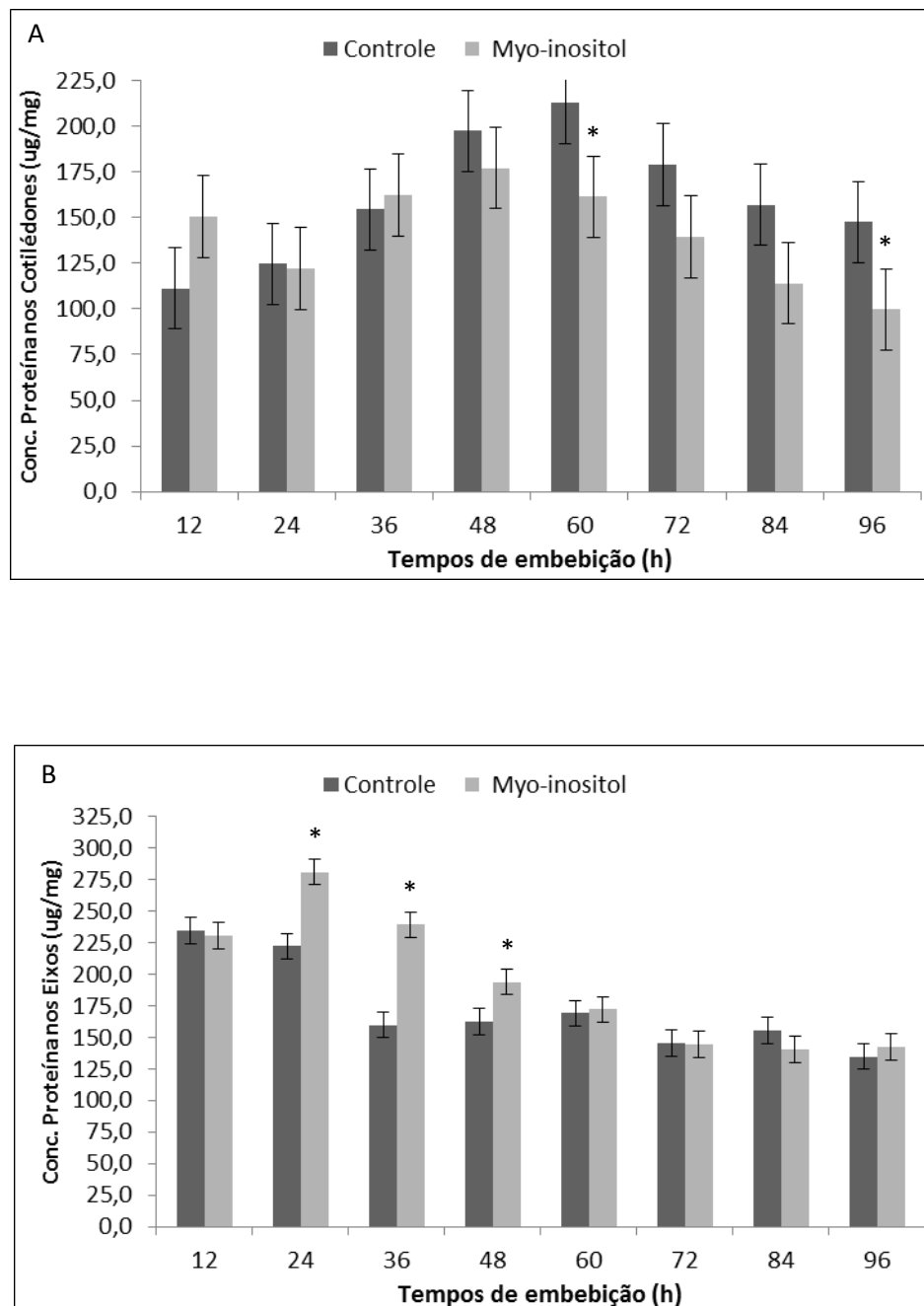
#### 4.4- Dosagem de proteínas em cotilédones e eixos hipocótilo-radículas tratados com *Myo*-inositol

As sementes de *G. max* tratadas com o *Myo*-inositol apresentaram reduções significativas na concentração de proteínas de seus cotilédones nos tempos de 60 e de 96 horas de embebição (Figura 10 A). Ao avaliar a concentração de proteína nos eixos hipocótilo-radículas, pode-se observar efeito contrário, pois a concentração de proteínas no tecido tratado com *Myo*-inositol foi superior ao controle nos tempos de embebição de 24, 36 e 48 horas (Figura 10 B).





**FIGURA 9-** Concentração de proteínas em cotilédones (A) e em eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de *G. max*, cultivar BRS 284, tratados com D-pinitol. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados representam as médias das repetições. \* Estatisticamente significativo pelo teste do DMS ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 10-** Concentração de proteínas em cotilédones (A) e em eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de *G. max*, cultivar BRS 284, tratados com *Myo*-inositol. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados representam as médias das repetições. \* Estatisticamente significativo pelo teste do DMS ( $P < 0,05$ ).

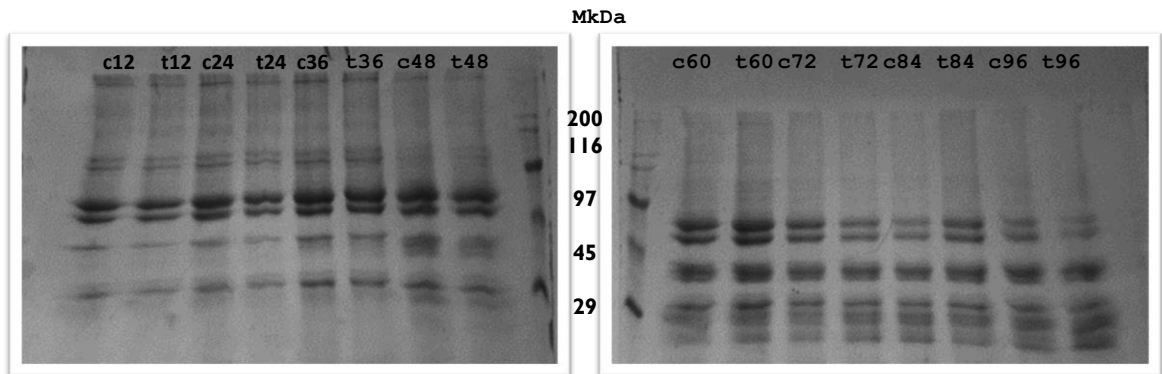
#### 4.5- Perfil proteico em SDS-PAGE (12%) de cotilédones e eixos hipocótilo-radículas tratados com D-pinitol e *Myo*-inositol

O perfil proteico revelado por SDS-PAGE de cotilédones tratados com D-pinitol não mostrou nenhuma alteração visível em bandas proteicas entre as massas moleculares de 200 a 14 kDa, faixa de bandas bem resolvidas em SDS-PAGE 12%. Independente dos tratamentos, foi observado o desaparecimento de bandas entre 200 e 97 kDa ao longo dos tempos de embebição e um enriquecimento de bandas com massa abaixo de 45 kDa (Figuras 11 A e B). Os resultados para os tratamentos com *Myo*-inositol foram similares, não sendo observadas alterações entre os tratamentos (dados não mostrados).

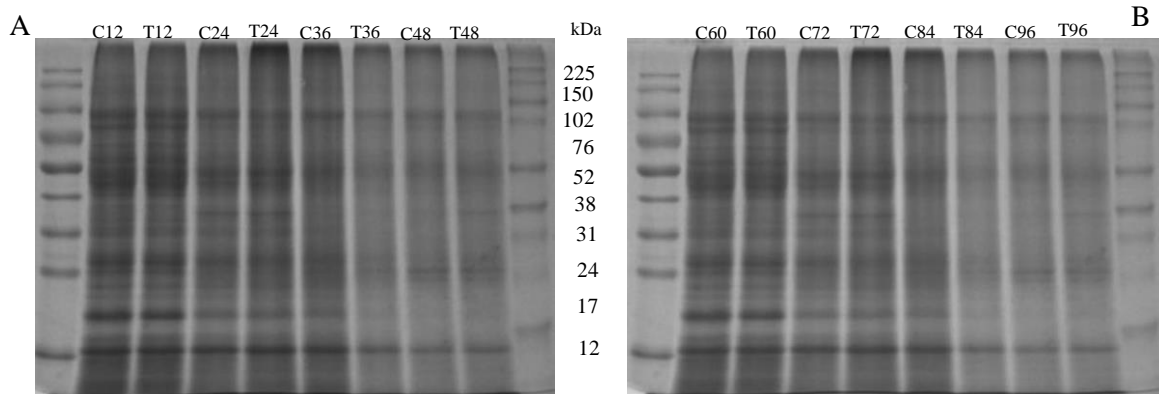
O perfil de proteínas dos eixos hipocótilo-radículas tratados ou não com D-pinitol e *Myo*-inositol também foi visualizado e assim como nos cotilédones, não foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos e os controles durante o tempo de embebição de 96 horas comparado com o D-pinitol (Figura 12 A e B) e com o *Myo*-inositol (Figura 13 A e B).

A

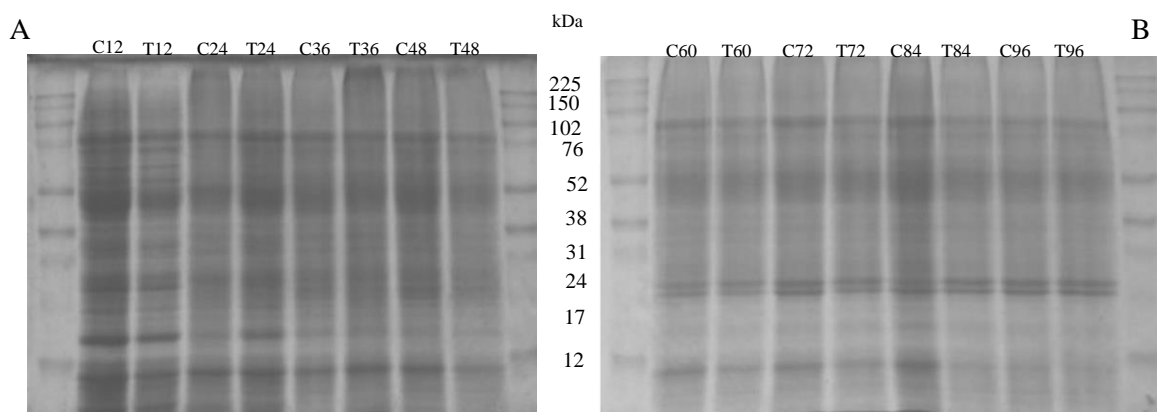
B



**FIGURA 11-** Perfil proteico em SDS-PAGE (12%) de cotilédones controle (c) e tratados (t) com D-pinitol embebidos nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas (A) e 60, 72, 84 e 96 horas (B). kDa: marcadores de massas moleculares.



**FIGURA 12-** Perfil proteico em SDS-PAGE (12%) de eixos hipocótilo-radículas de *G. max* controle (c) e tratados (t) com D-pinitol embebidos nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas (A) e 60, 72, 84 e 96 horas (B). kDa: marcadores de massas moleculares.



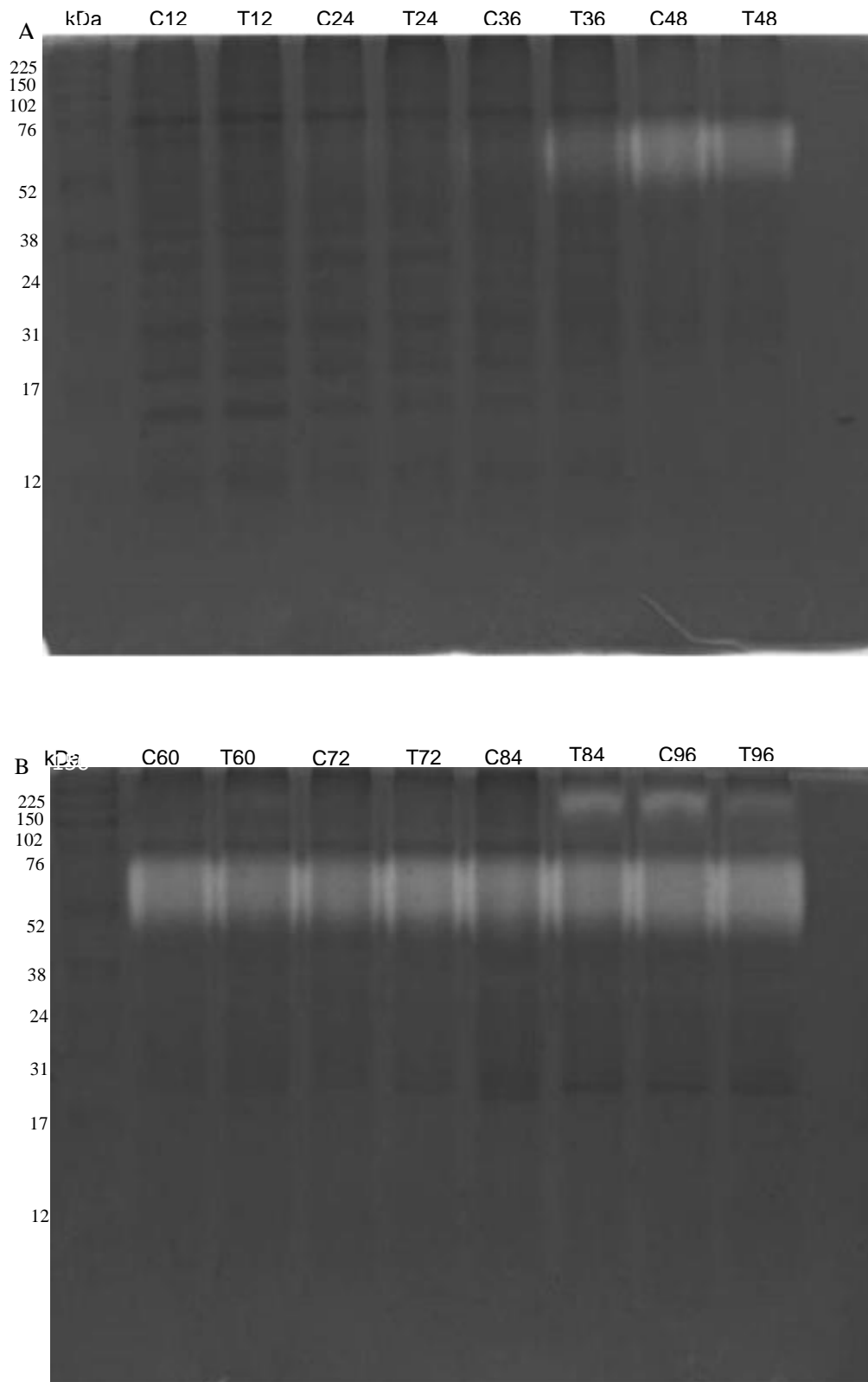
**FIGURA 13-** Perfil proteico em SDS-PAGE (12%) de eixos hipocótilo-radículas de *G. max* controle (c) e tratados (t) com *Myo*-inositol embebidos nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas (A) e 60, 72, 84 e 96 horas (B). kDa: marcadores de massas moleculares.

#### 4.6- Visualização da atividade em gel de gelatina (Zimografia) de proteinases de eixos hipocótilo-radículas e cotilédones de *G. max* tratados com D-pinitol e *Myo*-inositol

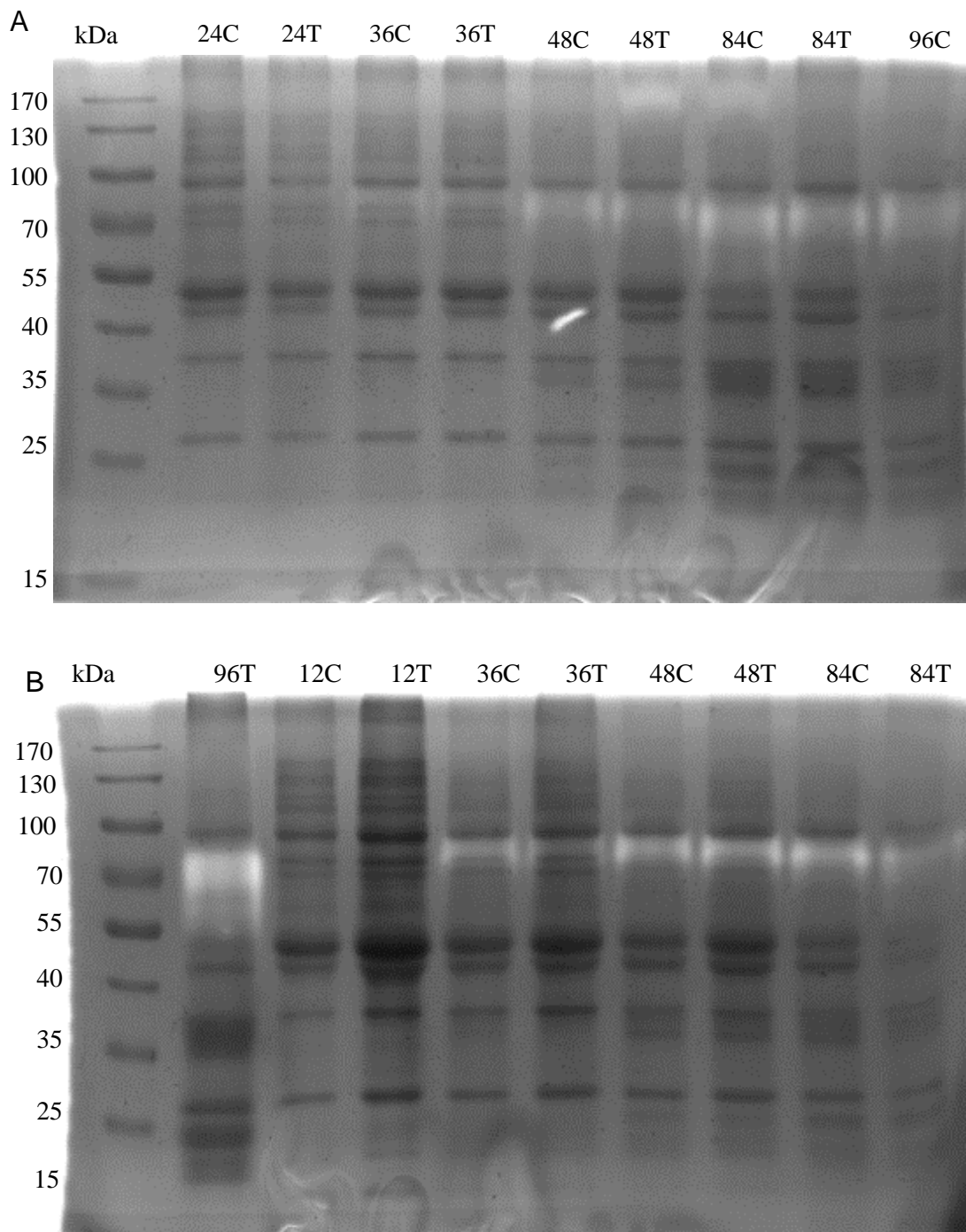
Na figura (14 A e B) tem-se a visualização da atividade gelatinolítica de proteinases nos eixos hipocótilo-radículas nos tempos de 12 a 96 horas (tratados ou não com D-pinitol). Assim, pode-se observar bandas de atividade entre 76 e 52 kDa a partir de 36 horas na presença do D-pinitol e a partir do tempo de 48 horas em ambas as amostras (tratada e controle). As marcações de atividades foram aparentemente similares em todos os demais tempos de embebição.

O perfil de atividade para eixos hipocótilo-radículas tratados com *Myo*-inositol também foram similares entre os controles e tratamentos em todos os tempos analisados (Dados não mostrados).

Para a análise do perfil de atividade gelatinolítica de proteinases de cotilédones tratados ou não com D-pinitol e *Myo*-inositol foram utilizadas apenas as amostras que haviam mostrado diferenças estatisticamente significantes. Para as amostras tratadas com D-pinitol foram usados os tempos de 24, 36, 48, 84 e 96 horas e para as amostras tratadas com *Myo*-inositol os tempos de 12, 36, 48 e 84 horas (Figura 15 A e B). Os resultados mostraram atividade nas amostras a partir de 48 horas para os tratamentos com D-pinitol e a partir de 36 horas nas amostras tratadas com *Myo*-inositol. Embora essas atividades sejam relativamente bem definidas, com faixa de massa molecular abaixo de 100 e 70 kDa, nenhuma variação significativa pode ser evidenciada, com exceção de um aumento aparente na marcação da atividade de cotilédones tratados com D-pinitol em 96 horas (Figura 15 B).



**FIGURA 14-** Atividade proteinásica em gel de poliacrilamida 12% contendo 1% de gelatina de amostras de eixos hipocótilo-radículas de *G. max* de 12 a 96 horas de embebição em água (controle-C) ou D-pinitol (Tratado-T). A: eixos hipocótilo-radículas embebidos de 12 a 48 horas. B: eixos hipocótilo-radículas embebidos de 60 a 96 horas. kDa- Marcador de peso molecular.



**FIGURA 15:** Atividade proteinásica em gel de poliacrilamida 12% contendo 1% de gelatina de amostras de cotilédones de *G. max* nos controles (C) e tratados (T) com D-pinitol nos tempos de 24, 36, 48, 84 (A) e 96 horas (B) e tratados com *Myo*-inositol nos tempos de 12, 36, 48 e 84 horas (B). kDa- Marcador de peso molecular.

#### 4.7- Atividade da proteinase (pH ácido) em cotilédones e eixos hipocótilo-radículas de *G. max* tratados com *Myo*-inositol e D-pinitol

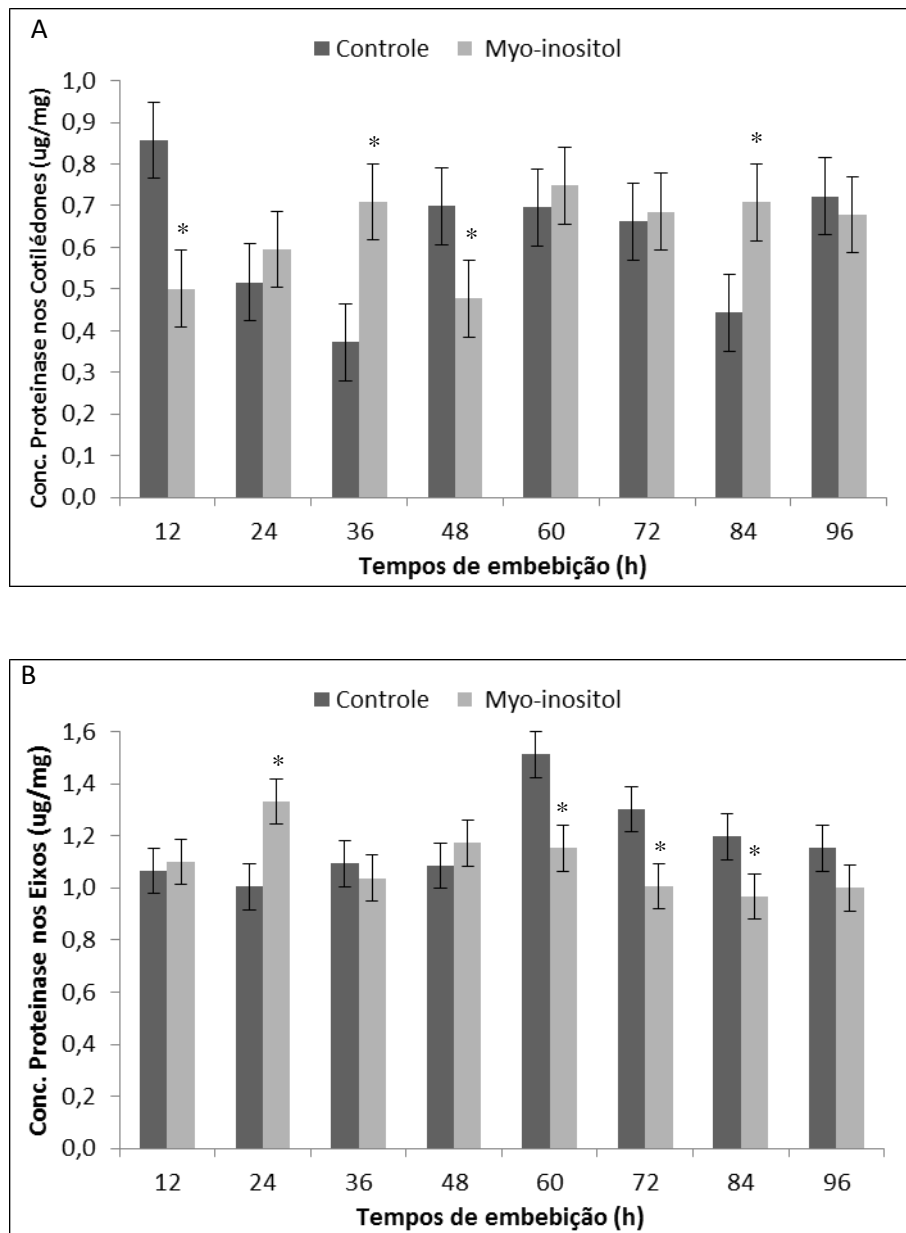
A figura 16 A mostra que a concentração, estimada pela atividade, de proteinases nos cotilédones de plântulas de *G. max*, cultivar BRS 284, não seguiu um padrão. Pode-se observar a variabilidade entre os tempos e as repetições, o que resultou valores entre 0,35 e 0,85 $\mu$ g/mg. As concentrações em cotilédones tratados com *myo*-inositol superaram às do controle nos tempos de 36 e 84 horas de embebição e foram inferiores ao controle nos tempos de 12 e 48 horas. Nos demais tempos não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Quanto ao efeito do *myo*-inositol sobre a concentração de proteinases nos eixos hipocótilo-radículas é possível observar a superioridade do tratamento somente no tempo de 24 horas de embebição, enquanto que nos tempos de 60, 72 e 84 horas os tratamentos foram inferiores aos do controle (Figura 16 B).

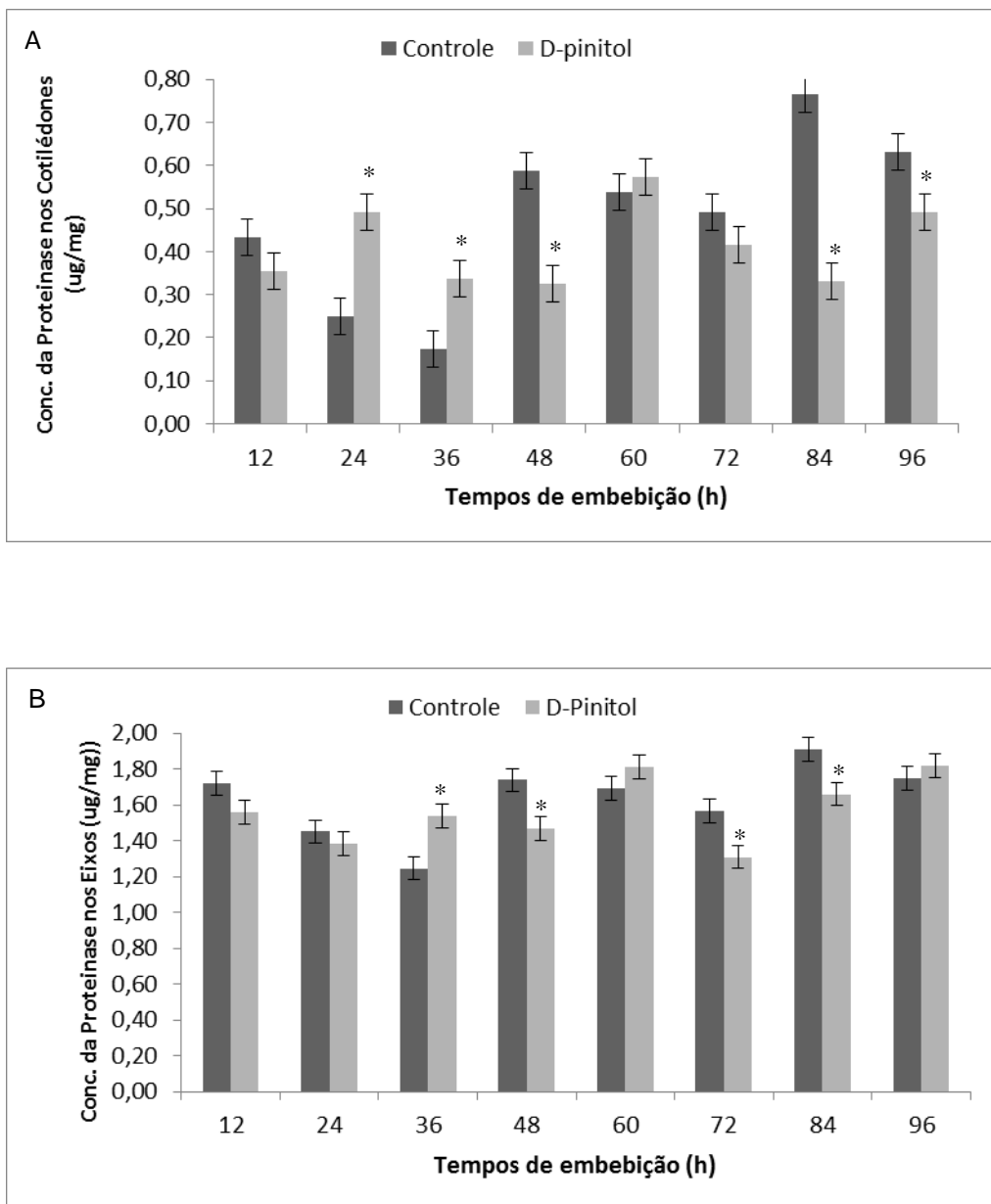
Na figura 17 A verifica-se o efeito do tratamento com D-pinitol sobre a atividade das proteinases em pH ácido, observa-se que as atividades foram diminuídas nos cotilédones tratados nos tempos de embebição de 48, 84 e 96 horas, enquanto que a atividade das proteases foi superior ao controle somente nos tempos de embebição de 24 e de 36 horas, não havendo diferença significativa nos tempos de 12, 60 e 72 horas.

Pela análise da figura 17 B, observa-se que as atividades de proteinases foram inferiores ao controle nos tempos de embebição de 48, 72 e 84 horas. Enquanto que o tratamento com D-pinitol aumentou a atividade das proteinases dos eixos hipocótilo-radículas somente em 36 horas.





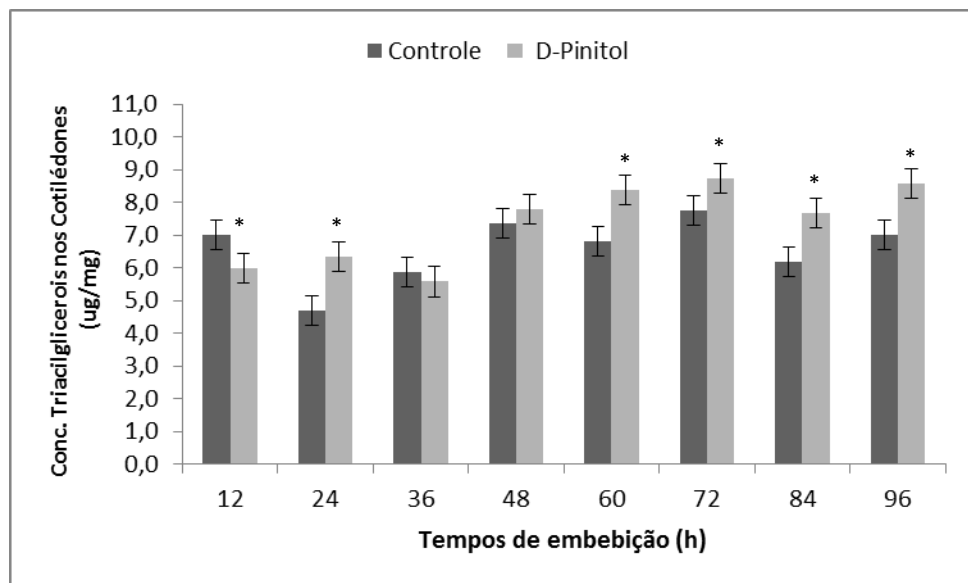
**FIGURA 16-** Concentração da proteinase em cotilédones (A) e em eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de *G. max*, cultivar BRS-284, tratados com *Myo*-inositol durante a embebição por até 96 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados representam as médias das repetições. \* Estatisticamente significativo pelo teste do DMS ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 17-** Concentração da proteinase em cotilédones (A) e eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de *G. max*, cultivar BRS 284, tratados com D-pinitol durante a embebição por até 96 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados representam as médias das repetições. \* Estatisticamente significativo pelo teste do DMS ( $P < 0,05$ ).

#### 4.8- Quantificação dos triacilglicerois em cotilédones de *G. max* tratados com D-pinitol

Na figura 18, observa-se o efeito significativo do tratamento com D-pinitol no aumento da concentração de triacilglicerois em cotilédones de plântulas de *G. max*. As sementes que obtiveram maiores concentrações se encontraram nos tempos 24, 60, 72, 84 e 96 horas de embebição, enquanto o controle superou o tratado somente no tempo de 12 horas. Devido à dificuldade de obtenção dos kits de dosagens de triacilglicerois não foi possível a detecção desses lipídios nas demais amostras.

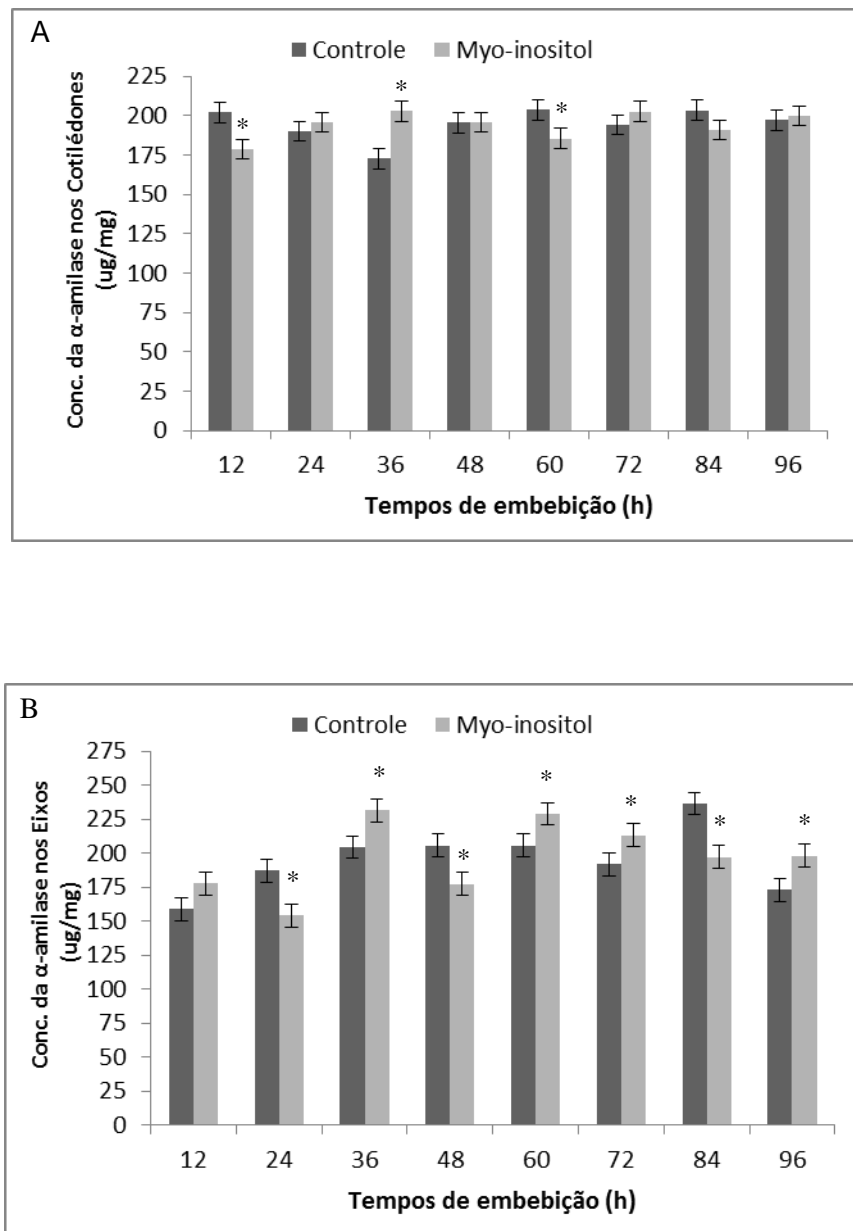


**FIGURA 18-** Concentração dos triacilglicerois em cotilédones de plântulas de *G. max*, cultivar BRS 284, tratados com D-pinitol durante a embebição por até 96 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados representam as médias das repetições.\*Estatisticamente significativo pelo teste do DMS ( $P < 0,05$ ).

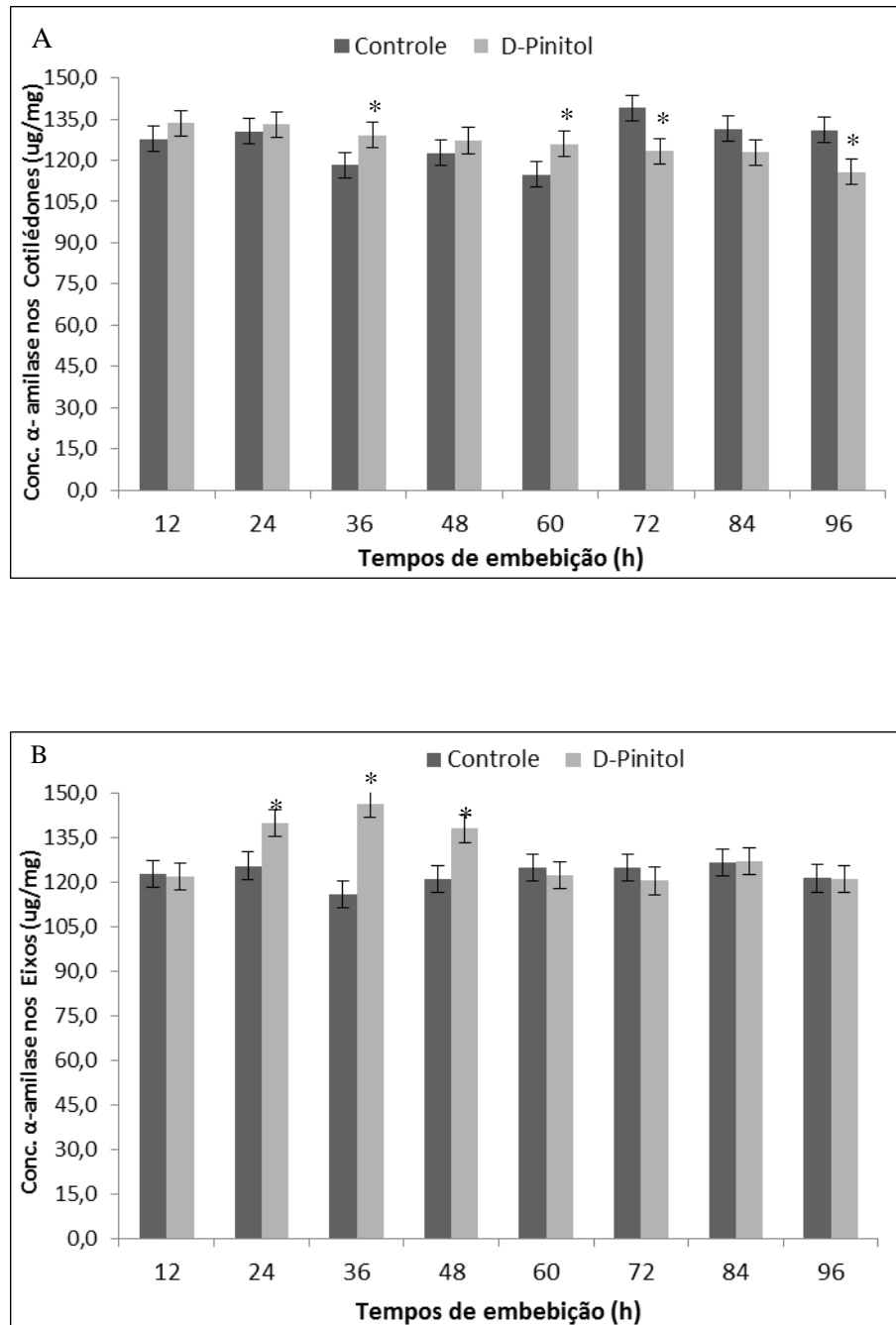
#### 4.9- Determinação da atividade da $\alpha$ -amilase em cotilédones e eixos hipocótilo-radículas de *G. max* tratados com *Myo*-inositol e D-pinitol

A atividade da  $\alpha$ -amilase nos cotilédones de plântulas de *G. max*, cultivar BRS 284, em função dos tratamentos variou bastante, tendo aumentado em alguns tempos e diminuindo em outros (Figuras 19 e 20). Para o tratamento com *Myo*-inositol foram observados diminuição da atividade dos cotilédones com o tratamento nos tempos 12 e 60 horas, enquanto somente em 36 horas houve aumento na atividade (Figura 19 A). Nos eixos hipocótilo-radículas observa-se diminuição nos tempos 24, 48 e 84 horas e aumento nos tempos 36, 60, 72 e 96 horas (Figura 19 B).

Com relação ao tratamento com D-pinitol, foram observados diminuição da atividade dos cotilédones com o tratamento nos tempos 72 e 96 horas, e aumento nos tempos 36 e 60 horas (Figura 20 A). Os efeitos mais pronunciados foram vistos nos eixos hipocótilo-radículas tratados, onde aumentos na atividade foram observados nos tempos 24, 36 e 48 horas (Figura 20 B).



**FIGURA 19-** Concentração da  $\alpha$ -amilase nos cotilédones (A) e eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de *G. max*, cultivar BRS 284, controles ou tratadas com *Myo*-inositol durante a embebição por até 96 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados representam as médias das repetições. \* Estatisticamente significativo pelo teste do DMS ( $P < 0,05$ ).

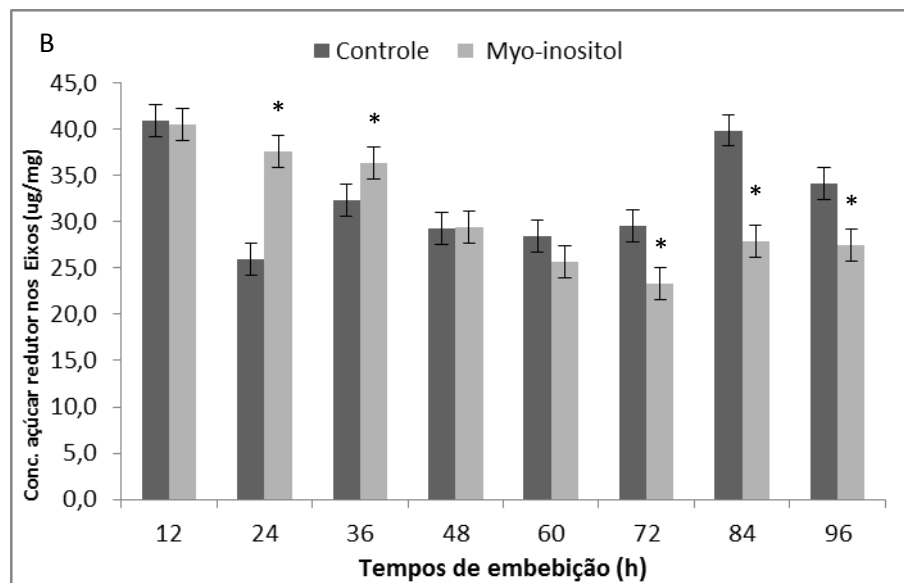
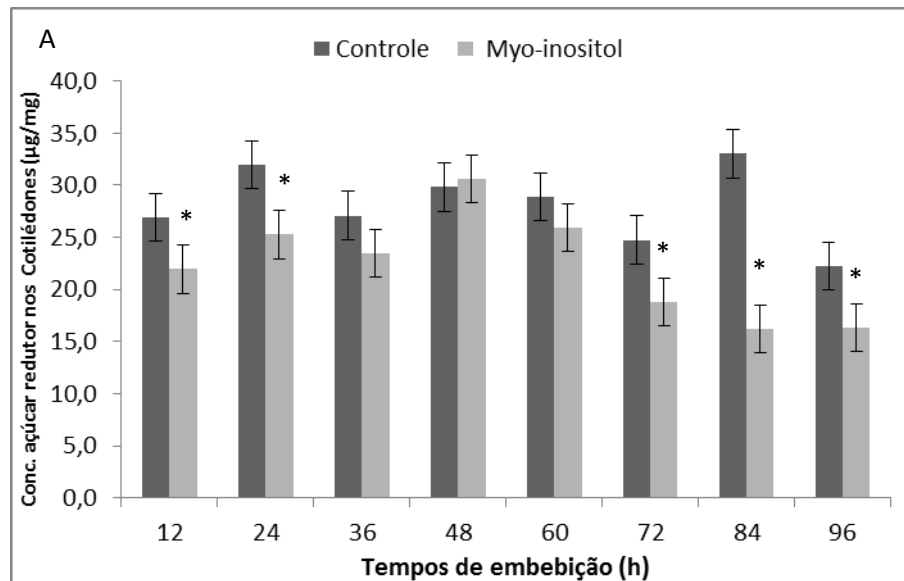


**FIGURA 20-** Concentração da  $\alpha$ -amilase nos cotilédones (A) e eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de *G. max*, cultivar BRS 284, controles ou tratadas com D-pinitol durante a embebição por até 96 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados representam as médias das repetições. \* Estatisticamente significativo pelo teste do DMS ( $P < 0,05$ ).

#### 4.10- Quantificação dos açúcares redutores em cotilédones e eixos hipocótilo-radículas de *G. max* tratados com *Myo*-inositol e D-pinitol

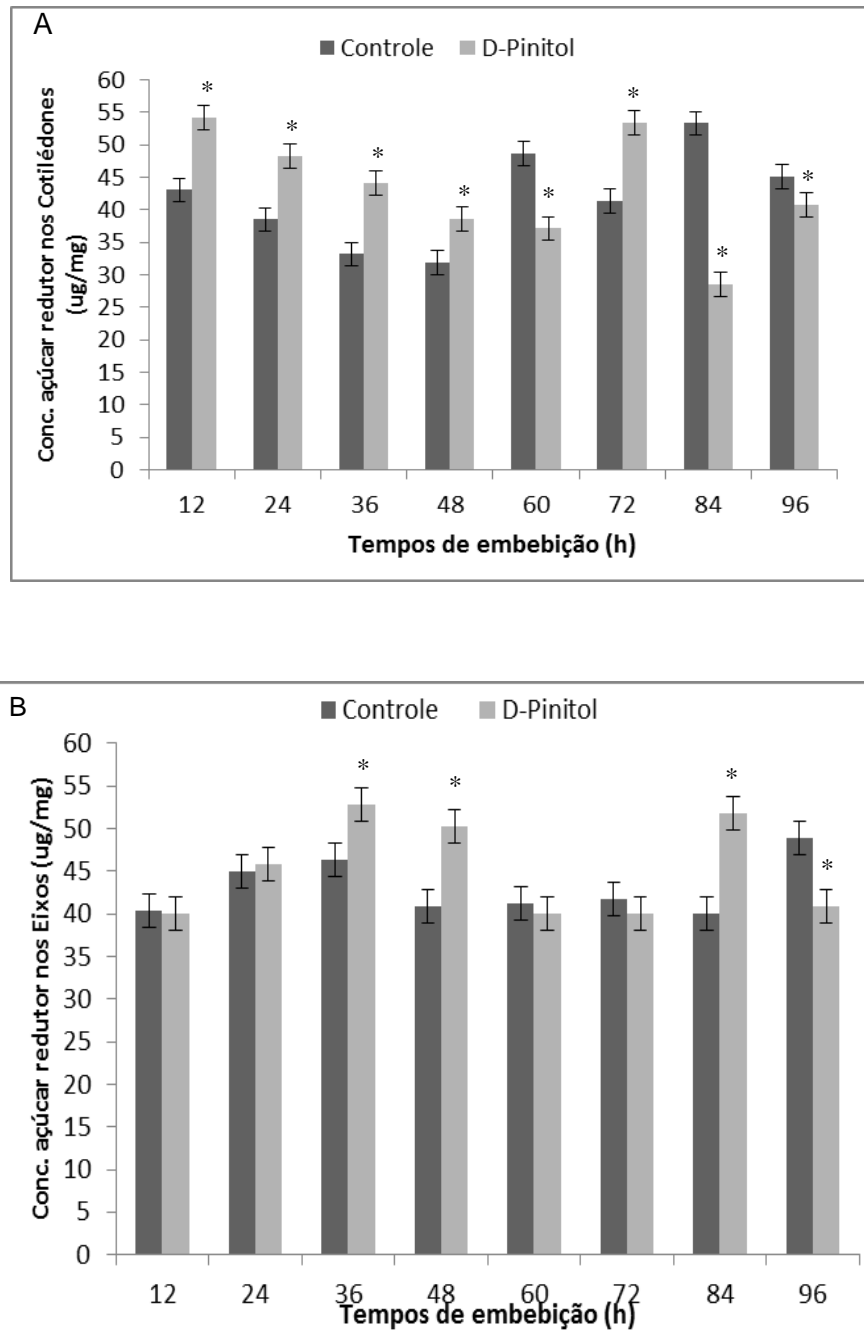
A concentração de açúcares redutores variou bastante entre os tempos de embebição assim como entre as repetições. O tratamento com *Myo*-inositol promoveu redução nas concentrações em cotilédones de *G. max* com 12, 24, 72, 84 e 96 horas de embebição quando comparado com o controle (Figura 21 A). Nos demais tempos não houve diferença significativa comparando com o controle. Quando analisadas as concentrações desses carboidratos nos eixos embrionários também foram observados valores bastante variáveis, sendo maiores nos tecidos tratados nos tempos 24 e 36 horas e diminuindo com o tratamento a partir de 72 horas (Figura 21 B).

Os dados observados para os tratamentos com D-pinitol no que diz respeito a concentração de açúcares redutores mostram valores maiores nos tecidos tratados nos tempos de 12, 24, 36, 48, e 72 horas de embebição, sendo inferior ao controle nos tempos de 60, 84 e 96 horas (Figura 22 A). Já no eixo hipocótilo-radícula o D-Pinitol promoveu maiores concentrações de açúcares redutores nos tempos de 36, 48 e 84 horas de embebição, sendo o teor inferior ao controle somente no tempo de 96 horas (Figura 22 B).



**FIGURA 21-** Concentração de açúcares redutores em cotilédones (A) e em eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de *G. max*, cultivar BRS 284, tratados com *Myo*-inositol durante a embebição por até 96 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados representam as médias das repetições. \* Estatisticamente significativo pelo teste do DMS ( $P < 0,05$ ).





**FIGURA 22-** Concentração de açúcares redutores em cotilédones (A) e em eixos hipocótilo-radículas (B) de plântulas de *G. max*, cultivar BRS 284, tratados com D-pinitol durante a embebição por até 96 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados representam as médias das repetições. \* Estatisticamente significativo pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

#### 4.11- Detecção dos aminoácidos livres

Para as análises de aminoácidos livres foram escolhidas as amostras de cotilédones controle e tratadas com *Myo*-inositol nos tempos 60 e 96 h. Essas amostras foram escolhidas por apresentarem reduções significativas nas concentrações de proteínas totais solúveis nos cotilédones de *G. max* submetidos ao tratamento (Figura 10 A).

Os resultados mostraram que dos 20 aminoácidos proteicos, apenas 7 foram detectados nas amostras, a grande maioria em poucas quantidades, sendo a glutamina o aminoácido que se encontrou em maior concentração. Os aminoácidos detectados foram aspartato (Asp), glutamina (Gln), valina (Val), fenilalanina (Phe), arginina (Arg), alanina (Ala) e glicina (Gly). Ao se analisar as quantidades desses aminoácidos com relação aos resultados obtidos pode-se evidenciar que a maioria aumentou com o tratamento, sendo que a glutamina foi o resultado mais conclusivo. Esses aminoácidos, além de terem sido detectados em baixas concentrações, aumentaram com o tratamento com *Myo*-inositol em ambos os tempos. Para os demais aminoácidos foram observados aumentos na concentração de Val, Phe e Arg com 60 horas de tratamento, enquanto Ala e Gly foram detectados apenas nos tecidos tratados com *Myo*-inositol. No tempo de 96 horas de tratamento, além da glutamina, foram observados aumento nas quantidades dos aminoácidos Asp, Val e Ala, enquanto que a Gly foi detectada apenas nos tecidos tratados. Embora esses aminoácidos tenham aparentemente aumentado de concentração com o tratamento, suas detecções em baixas concentrações, com exceção da glutamina, dificulta a conclusões dos resultados (Tabela 3).

Tabela 3- Valores médios de aminoácidos (pMol) detectados nas amostras de cotilédones controles e tratados com *Myo*-inositol nos tempos de 60 e 96 horas de embebição. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados apresentados são as médias das repetições.

Aminoácidos	Tempo de germinação			
	60 horas		96 horas	
	Controle	<i>Myo</i> -inositol	Controle	<i>Myo</i> -inositol
Asp	5,7	5,3	1,2	5,6
Gln	214,0	373,3	223,7	335,0
Val	11,5	34,4	16,5	50,0
Phe	9,4	21,7	5,5	7,3
Arg	1,1	6,6	2,0	3,9
Ala	-	8,8	0,6	6,2
Gly	-	14,1	-	0,5

## DISCUSSÃO

A qualidade da semente é considerada um ponto indispensável para a garantia de uma produtividade agrícola satisfatória, visto que influencia diretamente o vigor germinativo da mesma. Além dessa qualidade outros fatores que influenciam essa produtividade são a homogeneidade e a uniformidade no processo germinativo e pós-germinativo. Devido à importância da germinação no estabelecimento da nova planta, estudos que visem à promoção e a homogeneidade da germinação de cultivares de interesse agrônomico têm sido realizados ao longo dos anos. Dentro deste contexto a descoberta de compostos químicos naturais capazes de estimular a germinação e o desenvolvimento pós-germinativo tem recebido atenção especial.

Alguns açúcares e seus derivados tem sido relacionados com funções de sinalização no crescimento vegetal. Ciclitois derivados da glicose como *Myo*-inositol e D-pinitol tem sido relatados como promotores de crescimento, inclusive em vegetais (Oliveira *et al.*, 2004, Chiera *et al.*, 2007; Mitsuhashi *et al.*, 2008; Obendorf *et al.*, 2009, Ribeiro, 2011). MI e seus derivados participam de processos de transdução e regulação de sinais hormonais, regulação da síntese de ATP, transporte e estocagem de alguns hormônios, como auxina; participação da biossíntese da parede celular e tráfego de vesículas (Saiard *et al.*, 2004).

Atividades do D-pinitol já foram descritas em processos como a germinação e o desenvolvimento pós-germinativo, onde foi mostrado os efeitos deste na promoção do crescimento do eixo hipocótilo-radícula de *C. ensiformis*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris* (Oliveira *et al.*, 2004; Silva 2006; Ribeiro 2011; Ribeiro *et al.*, 2015-em preparação). Assim, o presente trabalho investigou os efeitos do *Myo*-inositol e do D-pinitol na germinação e desenvolvimento pós-germinativo de sementes de *G. max*, bem como avaliou os efeitos dos tratamentos sobre as reservas energéticas de cotilédones e eixos hipocótilo-radículas durante a embebição.

Sementes de soja da cultivar BRS 284 foram inicialmente germinadas em soluções de *Myo*-inositol em concentrações variadas de 0,022 até 1,44 µg/mL para investigar se alguma dessas concentrações promovia um maior crescimento do eixo hipocótilo-radícula. Os resultados mostraram então que a concentração

de 0,36  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi a que mais estimulou o crescimento, alcançando percentuais de quase 30% de aumento em 96 horas de tratamento. Essa concentração foi similar a previamente determinada como efetiva para o D-pinitol (Oliveira *et al.*, 2004). Sendo assim ambas as moléculas D-pinitol e *Myo*-inositol foram usadas nos experimentos de germinação em concentração de 0,36  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O primeiro parâmetro avaliado foi o número de sementes germinadas nos tratamentos ao longo do tempo. Os resultados mostraram que o tratamento com D-pinitol não influenciou na taxa germinativa, enquanto o tratamento com o *Myo*-inositol aumentou o número de sementes germinadas nos tempos 72, 84 e 96 horas. Esses resultados com D-pinitol são opostos aos observados para sementes de *Canavalia ensiformis*, que tiveram um aumento no número de sementes germinadas quando tratadas com D-pinitol 0,36  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Oliveira *et al.*, 2004). Entretanto, os resultados estão de acordo com o observado por Ribeiro (2011) para sementes de *P. vulgaris* e *V. unguiculata* onde o tratamento também não alterou o número de sementes germinadas.

Quando analisado o crescimento do eixo hipocótilo-radícula foi observado aumento em ambos os tratamentos, principalmente para D-pinitol que proporcionou aumentos dos eixos nos tempos 48, 60, 72 e 96 horas. Esses aumentos alcançaram percentuais de 60% nos tempos 72 e 96 horas. Esses dados estão de acordo com o previamente observado com o tratamento com D-pinitol para sementes de *C. ensiformis*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata* (Oliveira *et al.*, 2004; Silva 2006; Ribeiro 2011) onde esse composto promoveu o crescimento do eixo hipocótilo-radícula dessas espécies.

Uma hipótese para explicar esse aumento no crescimento seria uma possível influência em processos bioquímicos predominantes durante a germinação e desenvolvimento pós-germinativos. O aumento da disponibilização de energia seria um desses processos. Esta energia é providenciada pela mobilização de polissacarídeos, proteínas de reservas e ácidos graxos (Bewley e Black, 1994; Bewley, 1997). Desta forma foram investigadas as concentrações e padrões proteicos, atividade de proteinases cisteínicas, quantidades de carboidratos e lipídios em tecidos submetidos ou não aos tratamentos.

Assim, foram investigados possíveis alterações nesses constituintes. Inicialmente avaliou-se a quantidade de proteínas totais solúveis em cotilédones e eixos durante os tempos de embebição em ambos os tratamentos.

Os resultados mostraram poucas variações na quantidade de proteínas nos cotilédones e eixos tratados com D-pinitol, sendo aumentadas pelo tratamento com D-pinitol em alguns tempos, principalmente nos cotilédones em 72 horas e nos eixos em 36 horas. Com relação ao tratamento com *Myo*-inositol observamos uma diminuição na quantidade de proteínas nos cotilédones principalmente em 60 e 96 horas enquanto nos eixos as proteínas aumentaram com o tratamento principalmente nos tempos de 24, 36 e 48 horas. Entretanto quando avaliamos o perfil proteico por SDS-PAGE nenhuma alteração marcante foi observada no perfil de proteínas visualizadas na faixa de massa molecular entre 200 e 14 kDa.

Proteínas são consideradas uma das principais reservas para os processos de germinação e desenvolvimento pós-germinativo em sementes de leguminosas. Estima-se que em sementes maduras as proteínas de reserva podem representar cerca de 20 a 30% das proteínas totais em leguminosas (Bewley e Black, 1994). As vicilinas são globulinas 7S e representam as principais proteínas de reserva de leguminosas, elas são depositadas durante o processo de maturação e preenchimento de grãos para serem mobilizadas durante o desenvolvimento pós-germinativo das plântulas (Shewry e Lucas, 1997). Durante a germinação, acredita-se que ocorra primeiro a mobilização de proteínas de reserva do eixo hipocótilo-radícula, como descrito por Müntz *et al.* (2001). Embora tenham sido observadas mudanças pontuais em alguns tempos de tratamentos, os resultados não apontam claramente para mudanças que justifiquem o maior crescimento dos eixos tratados com os compostos.

O papel das proteinases cisteínicas já é bastante descrito com relação à mobilização de reservas nos processos germinativos e pós-germinativos de sementes de leguminosas (Yamauchi *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1993). Schlereth *et al.* (2000) confirmaram que o início da mobilização de proteínas do tipo globulina, em cotilédones e eixos, durante a germinação de sementes de *Vicia sativa* é ativado pela ação das proteinases do tipo cisteínicas. Sendo assim, foi investigada a atividade proteolítica em pH ácido que é o pH ótimo de atividade desse tipo de enzimas. Atividade proteolítica em pH ácido foi observada em todos os tecidos, tratados ou controle em todos os tempos de embebição. Para ambos

os tratamentos observou-se aumentos e reduções de atividade ao longo dos tratamentos. Essas atividades também foram visualizadas por zimografia usando SDS-PAGE contendo gelatina e embora as atividades tenham sido visualizadas os resultados não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

Foram escolhidos alguns tempos e tecidos específicos para investigação mais detalhada sobre a aparente diminuição da concentração total de proteínas. As amostras escolhidas foram de cotilédones tratados com *Myo*-inositol nos tempos de 60 e 96 horas e em seguida submetidas à análise de aminoácidos livres. O objetivo foi verificar o destino dos aminoácidos possivelmente liberados dessas proteínas. Os resultados mostraram a presença de 7 aminoácidos dos 20 possíveis, sendo que muitos destes foram detectados em concentrações muito pequenas, algumas consideradas apenas traços. A exceção foi a Gln que foi detectada em alta concentração. Os aminoácidos detectados foram Asp, Gln, Val, Phe, Arg, Ala e Gly. Com relação aos tratamentos, o dado mais importante foi o aumento da glutamina com o tratamento com *Myo*-inositol em ambos os tempos. Para os demais aminoácidos embora tenha sido observado aumentos para quase todos, os baixos níveis detectados dificultam qualquer tipo de conclusão para estes dados.

Os aminoácidos são moléculas de baixo peso molecular que podem ser requeridas para o desenvolvimento do vegetal em várias situações. O principal uso de aminoácidos nos estágios de germinação e desenvolvimento pós-germinativos estão associados à construção de novas proteínas como enzimas ou proteínas para as novas células; ou oxidação para a liberação de esqueletos carbônicos que alimentarão vias produtoras de energia como o Ciclo de Krebs. Esses aminoácidos podem ainda servir como fonte de nitrogênio orgânico para a síntese de vários compostos, como nucleotídeos, clorofila hormônios e metabólitos secundários (Tegeder, 2012; Taiz e Zeiger, 2013).

As proteínas de reserva são as principais fornecedoras de aminoácidos durante a germinação e desenvolvimento pós-germinativo. Os aminoácidos resultantes ou são oxidados para a liberação de intermediários diretos ou indiretos do Ciclo de Krebs onde serão usados para gerar energia ou serão translocados para os pontos de crescimento sendo utilizados diretamente na formação de novas proteínas (Popinigis, 1985). É sabido que o eixo hipocótilo-radícula da semente possui reservas, inclusive proteínas, que suprirão as atividades

metabólicas nas primeiras horas de germinação, sendo que a partir de um determinado tempo de germinação também irão depender das reservas dos cotilédones, inclusive dos aminoácidos liberados. (Popinigis, 1985). Sendo assim, há ocasiões em que as plantas necessitam transportar os aminoácidos de um órgão/tecido para outro, como por exemplo, de cotilédones de sementes em germinação para as partes aéreas em expansão e ponta da raiz (Popinigis, 1985).

Algumas transformações metabólicas são necessárias para o transporte de aminoácidos para outros tecidos ou mesmo para o seu catabolismo no local de liberação. Dos 20 aminoácidos proteicos, em plantas apenas o glutamato pode ser diretamente oxidado. Isto é feito pela ação da glutamato desidrogenase (GDH) sendo a qual cataliza a transaminação de aminoácidos que são transformados em glutamato. Os produtos formados pela reação da GDH são amônia e 2-oxoglutarato, sendo esse último usado preferencialmente pelas plantas nas reações de transaminação. A amônia liberada nesse processo é reassimilada em reação catalisada pela glutamina sintetase (GS) formando glutamina que posteriormente será usada para a síntese de asparagina. Lehmann e Ratajczak (2008) revelam que a asparagina é universalmente usada pelas plantas superiores como um componente de armazenamento de N e de transporte para outros tecidos. O N-amida da asparagina é derivado diretamente do grupo amida da glutamina em reação catalisada pela enzima asparagina sintetase (AS). Assim, o alto conteúdo de glutamina encontrado nos cotilédones pode indicar uma alta atividade no metabolismo de aminoácidos. Nessas circunstâncias um alto teor de glutamato formado é oxidado na mitocôndria liberando amônia, que retorna para o citoplasma, via um receptor de glutamato (GR) que atua como um canal de  $\text{NH}_4^+$  (Lehmann e Ratajczak 2008). Essa amônia é então usada para a síntese de glutamina pela ação da glutamina sintetase (GS). Quando necessário a glutamina então reage com aspartato originando asparagina que será translocada para os tecidos que necessitarem.

Outra reserva significativa nas sementes de leguminosas é constituída por carboidratos que podem compreender entre 24% até 68% da massa da semente (Hoover e Sosulski 1991). Para muitas sementes a energia inicial necessária para os primeiros eventos da germinação são fornecidas pela quebra do amido estocado (Van der Maarel *et al.*, 2002), desta forma a degradação do amido é vital para o sucesso da germinação. Em sementes de sorgo (*Sorghum spp.*) os



conteúdos de amido durante a germinação foram reduzidos cerca de 70 % para concentrações inferiores a 35% (Elmaki *et al.*, 1999) mostrando uma acentuada mobilização desse carboidrato nas primeiras horas de embebição. A degradação de amido é uma via modulada por fatores metabólicos e hormonais, sendo o hormônio giberelina (GA) considerado o responsável pela indução da síntese *de novo* das enzimas responsáveis por esse processo, principalmente  $\alpha$ -amilase (Perata *et al.*, 1997). A quebra do amido envolve um grupo de enzimas como as  $\alpha$ -amilases,  $\beta$ -amilases, enzima desramificadora do amido e  $\alpha$ -glucosidases (Dunn, 1974). Ambas,  $\alpha$ -glucosidase e  $\alpha$ -amilase, são capazes de quebrar grânulos de amido, sendo a  $\alpha$ -amilase considerada a principal enzima a desempenhar essa função durante a germinação (Perata *et al.*, 1997; Saman *et al.*, 2008).

Avaliações quanto aos teores de açúcares redutores e atividade de amilases foram avaliadas nas amostras de cotilédones e eixos submetidas aos tratamentos. Os resultados obtidos mostraram que a concentração de açúcares redutores variou bastante entre os tempos, dificultando enormemente a interpretação dos resultados e a conclusão dos dados. O tratamento com *Myo*-inositol promoveu redução nos açúcares dos cotilédones na maioria dos tempos estudados, principalmente em 84 horas. Nos eixos também observaram-se muitas variações, sendo maiores nos tecidos tratados nos tempos 24 e 36 h e menores a partir de 72 horas. Para o tratamento com D-pinitol os teores foram maiores nos cotilédones tratados nos tempos de 12, 24, 36, 48, e 72 horas e inferior ao controle nos tempos de 60 e 84 horas. Já nos eixos o D-Pinitol promoveu maiores teores de açúcares em 36, 48 e 84 horas, sendo inferior ao controle somente em 84 horas.

A atividade da  $\alpha$ -amilase também variou bastante em função dos tempos e dos tratamentos. Em cotilédones tratados com *Myo*-inositol houve diminuição da atividade em 12 e 60 horas e aumento em 36 horas. Nos eixos hipocótilo-radículas a diminuição ocorreu nos tempos 24, 48 e 84 horas e aumento nos tempos 36, 60, 72 e 96 horas. Com relação ao D-pinitol, o principal resultado foi o aumento da atividade em eixos de 36 horas. Os efeitos positivos dos tratamentos de D-pinitol sobre a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase estão de acordo com os observados por Ribeiro (2011) que mostrou que esse tratamento aumentou a

atividade e a expressão do gene para essa enzima em cotilédones de *P. vulgaris* e *V. unguiculata*.

Os efeitos significativos dos tratamentos sobre as concentrações de triglicerídeos foram avaliadas apenas em cotilédones tratados com D-pinitol, onde foram verificados aumentos nos tempos 24, 60, 72, 84 e 96 horas e diminuição apenas em 12 horas. Devido à dificuldade de obtenção dos kits de dosagens de triacilglicerois não foi possível a detecção desses lipídios nas demais amostras.

Embora algumas diferenças pontuais nas quantidades de proteínas totais, de carboidratos, em atividades proteolíticas, na atividade de  $\alpha$ -amilases e triacilglicerois tenham sido visualizadas nos tecidos germinados na presença de *Myo*-inositol e D-pinitol, a grande variação entre nos tecidos entre os tratamentos e os diferentes tempos estudados dificultam a inferência de alguma conclusão sobre possíveis efeitos positivos ou negativos do tratamento sobre a síntese e/ou sobre a mobilização desses compostos. A análise do conjunto permite concluir que há realmente um efeito positivo dos tratamentos sobre o crescimento do eixo hipocótilo-radícula e que esses tratamentos causam direta ou indiretamente perturbações pontuais na composição dos tecidos. Entretanto, é provável que a promoção do crescimento desencadeada pelos tratamentos não esteja relacionada com a aceleração da mobilização de reservas proteicas ou glicídicas e nem com a ativação de enzimas que degradam essas reservas.

## CONCLUSÕES

- Apenas o tratamento com *Myo*-inositol promoveu aumentos significativos no número de sementes germinadas, a partir de 72 horas de embebição.
- O crescimento do eixo hipocótilo-radícula foi estimulado por ambos os tratamentos, principalmente pelo D-pinitol que proporcionou aumentos de até 60%.
- A detecção de aminoácidos livres nas amostras tratadas com o *Myo*-inositol mostrou um marcante aumento na quantidade de glutamina.
- Algumas diferenças pontuais nas quantidades de proteínas totais, de carboidratos, em atividades proteolíticas, na atividade de  $\alpha$ -amilases e triacilglicerois foram visualizadas nos tecidos germinados na presença dos tratamentos.
- A alta variação das concentrações nos diferentes tecidos, durante os tempos e entre os tratamentos não possibilitou conclusões definitivas sobre os efeitos de cada tratamento sobre o metabolismo desses compostos.
- A análise dos dados mostrou que embora o efeito positivo dos tratamentos sobre o crescimento do eixo hipocótilo-radícula seja claro, essa promoção do crescimento não está relacionada com o aumento da mobilização de reservas proteicas ou glicídicas desses tecidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K., EMORI, Y., KONDO, H., SUSUKI, K. and ARAI, S. (1987). Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (*Oryzacystatin*). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. *The Journal Biological Chemistry*, 262: 16793 – 16797.
- ABID, G.; SILUE, S.; MUHOVSKI, Y.; JACQUEMIN JEAN-MARIE; TOUSSAINT, A. and BAUDOIN, JEAN-PIERRE. (2009). Role of *Myo*-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development. *GENE*. 439: 1–10.
- ATTUCCI, S.; CARDE, J. P.; RAYMOND, P.; SAINT GÉS, V.; SPITERI, A. and PRADET, A. (1991). Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. *Plant Physiology*, 95: 390-398.
- BERNAL-LUGO, I. and LEOPOLD, A. C. (1992). Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiology*, 98:1207–1210.
- BEWLEY, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055-1066.
- BEWLEY, J. D. and BLACK, M. (1994). In: *Seeds - Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, NY, Second Edition, 35-42, 147-153.
- BIELESKI, R. L. (1994). D-pinitol is a major carbohydrate in leaves of some coastal plants indigenous to New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 32: 73-78.
- BIELESKI, R. L. (1994a). It ain't necessarily so: sugars, stress and shibboleths. *New Zealand Bioscience*, 3: 3-6.
- BIELESKI, R. L. (1994b). D-pinitol is a major carbohydrate in leaves of some coastal plants indigenous to New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 32: 73-78.
- BIELESKI, R. L.; CLARK, C. J. and KLAGES, K. U. (1997). Identification of *Myo*-inositol as major carbohydrate in kiwifruit, *Actinidia deliciosa*. *Phytochemistry*, 46: 51-55.
- BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. (1991). Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiology*, 96: 868-874.

- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; ALDAR, M. P. M. (2004). Mobilização de reservas. In: Ferreira AG, Borghetti F, eds. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 163-185.
- CARASCO, J. F.; CROY, R.; DERBYSHIRE, E. and BOULTER, D. (1978). The Isolation and characterization of the major polypeptides of the seed globulin of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and their sequential synthesis in developing seeds. *Journal of Experimental Botany*, 29: 309–323.
- CARDEMIL, L. and REINERO, A. (1982). Changes in *Auracaria araucana* seed reserves during germination and early seedling growth. *Canadian Journal of Botany*, 60: 1629–1638.
- CASTRO, P. R. C. (1981). Análise de crescimento e produção da soja (*Glycine max* cv.Davis) sob efeito de fitorreguladores. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 33: 1346 - 9.
- CASTRO, R. D. de; BRADFORD, K. J. and HILHORST, H. W. M. (2004). Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação: do Básico ao Aplicado. *Artmed*, Porto Alegre.
- CERCÓS, M.; GÓMEZ-CADENAS, A. and HO, T. H. D. (1999). Hormonal regulation of a cysteine protease gene, EPB-1, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the coordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid. *Plant Journal*, 19: 107-118.
- CHIERA J. M.; BOUCHARD R. A.; DORSEY S. L.; PARK E. H.; BUENROSTRO-NAVA M. T.; LING P. P. and FINER J. J. (2007) Isolation of two highly active soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) promoters and their characterization using a new automated image collection and analysis system. *Plant Cell Reports*, 26: 1501-1509.
- CHIERA, J. M.; STREETER, J. G. and FINER, J. J. (2006). Ononitol and pinitol production in transgenic soybean containing the inositol methy transferase gene from *Mesembryanthemum crystallium*. *Plant Science*, 171: 647-654.
- CHUN, J. A.; JIN, U. H.; LEE, J. W.; YI, Y. B.; HYUNG, N. I.; KANG, M. H.; PYEE, J. H.; SUH, M. C.; KANG, C. W.; SEO, H. Y.; LEE, S. W. e CHUNG, C. H. (2003). Isolation and characterization of a *Myo*-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination. *Planta*, 216: 874-80.

- CONAB. A soja em números (Safrá 2013/2014), In: EMBRAPA SOJA: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. (2015). Disponível em: <  
[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_01\\_09\\_09\\_00\\_21\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2015.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_09_09_00_21_boletim_graos_janeiro_2015.pdf). Acesso em: 10 fev. 2015.
- CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A.; LEITE, I. T. A.; VENTRELLA, M. C. and MATHIAS, A. A. (2006). Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Árvore*, 30 (6): 941-949.
- COUE'E, I.; SULMON, C.; GOUESBET, G. and AMRANI, A.E. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57: 449-459.
- CRUZ, C. D. (2013). GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*, 35 (3): 271-276.
- DE BARROS, E. G. and LARKINS, B. A. (1990). Purification and characterization of zein degrading proteases from endosperm of germinating maize seeds. *Plant Physiology*, 94:297-303.
- DITTRICH, P. and KORAK, A. (1984). Novel synthesis of D-pinitol in *Simmondsia chinensis*. *Phytochemistry*, 23: 65-66.
- DOMOTO, C., WATANABE, H., ABE, M., ABE, K. and ARAI, S. (1995). Isolation and characterization of two distinct cDNA clones encoding corn seed cysteine proteinases. *BBA- Gene Structure and Expression*, 1263 (3) 241-244.
- DUNN, G. (1974). A model for starch breakdown in higher plants. *Phytochemistry*, 13: 1341-1346.
- DURE, L. H.; CROUCH, M.; HARADA, J.; MUNDY, H. J.; QUATRANO, R.; THOMAS, T. and SUNG, Z. R. (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 12: 475-486.
- EHRENSHAFT, M. and BRAMBI, R. (1990). Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiology*, 93: 295-304.
- ELMAKI, H.B., BABIKER, E.E. and EL TINAY, A.H.E. (1999). Changes in chemical composition, grain malting, starch and tannin contents and protein

- digestibility during germination of sorghum cultivars. *Food Chemistry*, 64: 331-336.
- EMBRAPA SOJA. (2013): EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em: <  
[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=294andcod\\_pai=17](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294andcod_pai=17)>.  
 Acesso em: 10 set. 2013.
- FERNANDES, K. V. S. (1990). Proteinases cisteínicas e inibidores de papaína durante o desenvolvimento de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Cv Pitiúba. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Ceará para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, 1990.
- FERNANDES, K. V. S.; CAMPOS, F. A. P.; VAL, R. R. and XAVIER FILHO, J. (1991). The expression of papain inhibitors during development of cowpea seeds. *Plant Science* (Limerick), 74: 179-184.
- GOMES, P. (1976). A soja. São Paulo: *Ed. Nobel*, 1976. 152p.
- GRELET, J.; BENAMAR, A.; TEYSSIER, E.; AVELANGE-MACHEREL, M-H.; GRUNWALD, D. and MACHEREL, D. (2005). Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiology*, 137:157–167.
- GUARDIA, M. and BENLLOCH, M. (1980). Effects of potassium and gibberellic acid on stem growth of whole sunflower plants. *Physiologia Plantarum*, 49: 443-448.
- GUBLER, F.; KALLA, R.; ROBERTS, J. K. and JACOBSEN, J. V. (1995). Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: Evidence for *Myb* transactivation of a high-pI  $\alpha$ -amylase gene promoter. *Plant Cell*, 7: 1879–1891.
- GUBLER, F.; RAVENTOS, D.; KEYS, M.; WATTS, R.; MUNDY, J. and JACOBSEN, J. V. (1999). Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *Plant Journal*, 17: 1–9.
- GUO, C. and OOSTERHUIS, D. M. (1993). Pinitol: a major transport carbohydrate in soybean plants? In: Proceedings 20<sup>th</sup> Annual Meeting of *Plant Growth Regulator Society of America*, 23-29.
- GUO, C. and OOSTERHUIS, D. M. (1997). Effect of water-deficit stress and genotypes on pinitol occurrence in soybean plants. *Environmental and Experimental Botany*, 37: 147-152.

- HANCOCK, J. F. (2004). *Plant Evolution and the Origin of Crop Species*. Second Edition. Cambridge: *CABI Publishing*, 307p.
- HEUSSEN, C. and DOWDLE, E. B. (1980). Electrophoretic analysis of proteases in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl-sulfate and copolymerized substrate. *South African Journal of Science*, 76: 184-184.
- HOLDSWORTH, M. J.; FINCH-SAVAGE, W. E.; GRAPPIN, P. and JOB, D. (2008). Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. *Trends in Plant Science*, 13: 7-13.
- HONG, Y. F.; HO, T-HD.; WU, C. F.; HO, S. L.; YEH, R. H.; LU, C. A.; CHEN, P. W.; YU, L. C.; CHAO, A. and YU, S. M. (2012). Convergent starvation signals and hormone crosstalk in regulating nutrient mobilization upon germination in cereals. *The Plant Cell*, 24: 2857–2873.
- HOOVER, R. and SOSULSKI, F.W. (1991). Composition, structure, functionality, and chemical modification of legume starches: a review. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 69(1): 79-92.
- KANEKO, M.; ITOH, H.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ASHIKARI, M. and MATSUOKA, M. (2002). The alpha-amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. *Plant Physiology*, 128 (4): 1264–1270.
- KARNER, U.; PETERBAUER, T.; RABOY, V.; JONES, D. A.; HEDLEY, C. L. and RICHTER, A. (2004). Myo-inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. *Journal of Experimental Botany*, 55:1981–1987.
- KIGEL, J. and GALILI, G. (1995). *Seed development and germination*. 2.ed. New York: *Plenun Press*.
- KOCH, K.E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 509–540.
- KOEHLER, S.M. and HO, T.H.D. (1990). A major giberellic acid-induced barley aleurone cysteine proteinase which digests hordein – purification and characterization. *Plant Physiology*, 94, 251-258.
- KOSINA, S. M.; CASTILLO, A.; SCHNEBLY, S. R. and OBENDORF, R. L. (2009). Soybean seed coat cup unloading on plants with low-raffinose, low-stachyose seeds. *Seed Science Research*, 19: 145-53.



- KUMARI, A.; SINGH, V. K.; FITTER, J.; POLEN, T. and KAYASTHA, A. M. (2010).  $\alpha$ -amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds - Purification, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. *Phytochemistry*, 71: 1657–1666.
- KUO, T. M.; VAN MIDDLESWORTH, F. K. and WOLF, W. J. (1988). Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 36: 32-36.
- KUO, T.M.; LOWELL, C.A. and NELSEN, T.C. (1997). Occurrence of Pinitol in developing soybean seed tissues. *Phytochemistry*, 45: 29-35.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LANE, B. G. (1991). Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB)*, 5: 2893-2901.
- LEHMANN, T and RATAJCZAK, L. (2008). The pivotal role of glutamate dehydrogenase (GDH) in the mobilization of N and C from storage material to asparagine in germinating seeds of yellow lupine. *Journal of Plant Physiology*, 165:149-158.
- LOESCHER, W. H. (1987). Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiology Plantarum*, 70: 53-557.
- LOEWUS, F. A. and LOEWUS, M. W. (1983). Myo-inositol: Its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 34: 137-161.
- LOEWUS, F. A. and MURTHY, P. P. N. (2000). Myo-inositol metabolism in plants. *Plant Science*, 150: 1-19.
- LOVEGROVE, A. and HOOLEY, R. (2000). Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends in Plant Science*, 5: 102–110.
- LU, C. A.; LIM, E. K. and YU, S. M. (1998). Sugar response sequence in the promoter of a rice alpha-amylase gene serves as a transcriptional enhancer. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 10120–10131
- MACLEOD, A. M. (1957). Raffinose metabolism in germinating barley. *New Phytologist*, 56: 210–220.

- McMANUS, M. T.; BIELESKI, R. L.; CARADUS, J. R. and BARKER, D. J. (2000). Pinitol accumulation in mature leaves of white clover in response to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 43 (1): 11-18.
- MICHAUD, D.; NGUVEN-QUOC, B.; BERNIER-VADNAIS, N.; FAYNE, L. and YELLE, S. (1994). Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 90: 497-503.
- MILLER, G. L.; BLUM R.; GLENNOM, W. E. and BURTON, A. L. (1959). Measurement of methods for assay of xylanase activity. *Analytical Biochemistry*, 2: 127-132.
- MITSUHASHI, N.; KONDO, M.; NAKAUNE, S.; OHNISHI, M.; HAYASHI, M.; HARA-NISHIMURA, I.; RICHARDSON, A.; FUKAKI, H.; NISHIMURA, M. and MIMURA, T. (2008). Localization of *Myo*-inositol-1-phosphate synthase to the endosperm in developing seeds of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 59: 3069–3076.
- MORRÉ, D. J.; BOSS, W. F. and LOEWUS, F. A. (Eds.) (1990). *Inositol Metabolism in Plants*, Wiley-Liss, 393p. New York. In: Loewus, F.A.; Murthy, P.P.N. (2000). *Myo*-inositol metabolism in plants. *Plant Science*, 150: 1-19.
- MÜNTZ, K. (1996). Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *Journal of Experimental Botany*, 47 (298): 605-622.
- MÜNTZ, K., BELOZERSKY, M. A., DUNAEVSKY, Y. E., SCHLERETH, A., TIEDEMANN, J. (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1741–1752.
- MURAKEÖZY, E. O.; SMIRMOFF, N.; NAGY, Z. and TUBA, Z. (2002). Seasonal accumulation pattern of Pinitol and other carbohydrates in *Limonium gmelini* subsp. *Hungarica*. *Journal of Plant Physiology*, 159: 485-490.
- NAMBARA, E.; OKAMOTO, M.; TATEMATSU, K.; YANO, R.; SEO, M. and KAMIYA, Y. (2010). Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research*, 20: 55–67.
- NELSON, J. M. and BARTELS, P. G. (1992). Soluble sugar content of water-stressed and non-water-stressed jojoba blades and buds in the winter. *AAIC Annual Meeting*, St. Louis, MO, 4–6.

- NONG, V. H.; BECKER, C. and MÜNTZ, K. (1995). cDNA cloning for a putative cysteine proteinase from developing seeds of soybean. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1261: 435-438.
- NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W. and BEWLEY, J. D. (2010). Germination – still a mystery. *Plant Science*, 179: 574–581.
- OBENDORF, R. L.; ZIMMERMAN, A. D.; ZHANGA, Q.; CASTILLO, A.; KOSINA, S. M.; BRYANT, E. G.; SENSENIG, E. M.; WU, J. and SCHNEBLY, S. R. (2009). Accumulation of Soluble Carbohydrates during Seed Development and Maturation of Low-Raffinose, Low-Stachyose Soybean. *Crop Science Society of America*, 49 (1): 329-341.
- OLIVEIRA, A. E. A.; RIBEIRO, E. S.; Da CUNHA, M.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S. and XAVIER-FILHO, J. (2004). Insulin accelerates *Canavalia ensiformis* seeds germination and development. *Plant Growth Regulation*, 43: 57-62.
- OLIVEIRA, L. O. (2007). Atividades de proteinases cisteínicas e de seus inibidores do tipo cistatinas durante a germinação de sementes de feijão-decorda (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Monografia - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.
- PAIVA, B. M. de; ALVES, R. M.; HELENO, N. M. (2006). Aspectos socioeconômicos da soja. Informe Agropecuário, Belo Horizonte - MG, 27 (230): 7-14, jan.\fev.
- PALMER, G. H. (1969). Sucrose and raffinose utilization during the early stages of barley germination. *Journal of the Institute of Brewing*, 75: 505–508.
- PERATA, P.; GUGLIELMINETTI, L. and ALPI, A., (1997). Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. *Annals of Botany*, 79: 49-56.
- PONTES, A. C.; BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G. and SOARES, C. P. B. (2002). Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (garapa) durante a embebição. *Revista Árvore*, Viçosa, 26 (5): 593-601.
- POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. (1985). 2. ed. Brasília: AGIPLAN. 289 p.
- RIBEIRO, E. S. (2011). Investigação das ações de D-Pinitol como modulador da germinação e desenvolvimento pós-germinativo de plântulas. Tese de

- Doutorado apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.
- RIBEIRO, E. S.; CENTENO, D. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO R. C., FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. AND OLIVEIRA A. E. A. (2011). Free Cyclitol, Soluble Carbohydrate and Protein Contents in *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* Bean Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 4273-4278.
- ROGERS, J. C., DEAN, D. and HECK, G. R. (1985). Aleurain: a barley thiol protease closely related to mammalian cathepsin H. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 8: 6512- 6516.
- ROLLAND, F. AND SHEEN, J. (2005). Sugar sensing and signalling networks in plants. *Biochemical Society Transactions*, 33: 269-271.
- ROLLAND, F.; WINDERICKX, J. and THEVELEIN, J. M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2:183–201.
- SAIARD, A.; BHANDARI, R.; RESNICK, A. C.; SNOWMAN, A. M. and SNYDER, S. H. (2004). Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science*, 306(5704): 2101-2105.
- SAMAN, P.; VÁZQUEZ, J.A. and PANDIELLA, S.S. (2008). Controlled germination to enhance the functional properties of rice. *Process Biochemistry*, 43: 1377-1382.
- SANTOS, O. S. (1988). A cultura da soja -1 Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Editora Globo, 299p.
- SCHLERETH, A.; BECKER, C.; HORSTMANN, C.; TIEDEMANN, J. and MÜNTZ, K. (2000). Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 51: 1423-1433.
- SCHLERETH, A.; STANDHARDT, D.; MOCK, H.P. and MÜNTZ, K. (2001). Stored cysteine proteinases start globulin breakdown in protein bodies of embryonic axes and cotyledons of germinating vetch (*Vicia sativa* L.) seeds. *Planta*, 212: 718-727.
- SEDIYAMA, T. (Org.). (2009). Tecnologias de produção e usos da soja. Londrina, Paraná: Mecenias, 314 p.

- SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R.C. and REIS, M.S.(2005). Melhoramento da Soja. In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, 553-604.
- SERT, M. A.; BONATO, C. M. e SOUZA, L. A. DE. (2009). Germinação da semente. In: SOUZA, L. A. DE (Org.). Sementes e Plântulas. Germinação, estrutura e adaptação. Ponta Grossa: Todapalavra.
- SHEN, S.; SHARMA, A. and KOMATSU, S. (2003). Characterization of proteins responsive to gibberellin in the leaf-sheath of rice (*Oryza sativa* L.) seedling using proteome analysis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(2): 129-136.
- SHEWRY, P. R. (1995). Plant storage proteins. *Biological Reviews*, Cambridge, *Great Britain*, 70: 375-426.
- SHEWRY, P. R. and LUCAS, J. A. (1997). Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. *Advances in Botanical Research*, 26: 136-170.
- SHIMADZU CORPORATION. (1993). Shimadzu High-Performance Liquid Chromatograph LC-10A/C-R7A Amino Acid Analysis System Instruction Manual. Kyoto, Japan.
- SILVA, L. B. (2006). Estudo dos Efeitos de Insulina sobre Processos Fisiológicos de Planta. Tese de doutorado apresentada no curso de Biociências e Biotecnologia/CBB/UENF. Ano de obtenção: 2006.
- SILVA, T. R. G.; CORTELAZZO, L. A. and DIETRICH, S. M. C. (1998). Variations in storage compounds during germination and early plantlet growth of *Dalbergia miscolobium*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 10 (2): 119-124.
- SKRIVER, K. and MUNDY, J. (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*, 2: 503-512.
- SREENIVASULU, N.; USADEL,B.; WINTER, A.; RADCHUK, V.; SCHOLZ, U.; STEIN, N.; WESCHKE, W.; STRICKERT, M.; CLOSE T. J.; STITT, M.; GRANER, A. and WOBUS, U. (2008). Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiology*, 146: 1738–1758.
- STOREY, R. D. and WAGNER, F. W. (1986). Plant proteases: A need for uniformity. *Phytochemistry*, 25 (12): 2701-2709.

- STREETER, J. G.; LOHNES, D. G. and FIORITTO, R. J. (2001). Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. *Plant Cell and Environment*, 24: 429-38.
- SUDA, C. N. K. and GIORGINI, J. F. (2000). Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Lavras, 12 (3): 226-245.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2013). *Fisiologia Vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 954p .
- TANAKA, T., MINAMIKAWA, T., YAMAUCHI, D. and OGUSHI, Y. (1993). Expression of an endopeptidase (Ep-C1) in *phaseolus-vulgaris* plants. *Plant Physiology*, 101, 421-427.
- TEGEDER, M. (2012). Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Current Opinion in Plant Biology*, 15: 1-7.
- TOLLETER, D.; JAQUINOD, M.; MANGAVEL, C.; PASSIRANI, C.; SAULNIER, P.; MANON, S.; TEYSSIER, E.; PAYET, N.; AVELANGE-MACHEREL, M. H. and MACHEREL, D. (2007). Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell*, 19: 1580-1589.
- USDA- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (2013) Production, Supply and Distribution Online. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: nov. de 2013.
- VALLILO, M.I.; CARUSO, M.F.S.; TAKEMOTO, E. and PIMENTEL, Sabria-Aued. (2007). Caracterização química e físico-química do óleo das sementes de *Platymiscium floribundum* Vog. (sacambu), colhidas na fase de desenvolvimento e na época de maturação fisiológica. *Revista do Instituto Florestal*, São Paulo, 19 (2): 73-80.
- VAN DER MAAREL, J.E.C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, C.M.J.; LEEMHUIS, H. and DIJKHUIZEN, L. (2002). Properties and applications of starch converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94: 137-155.

- VERNON, D.M. and BOHNERT, H.J. (1992). A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *The EMBO Journal*, 11: 2077–2085.
- VIDAL, W.N. and VIDAL, M.R.R. (2000). In.: Botânica- Organografia, Editora UFV. 4<sup>a</sup> ed.
- WATANABE, H.; ABE, K.; EMORI, Y. and HOSOYAMA, H. (1991). Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains). *Journal of Biological*, 266: 16897- 16902.
- YAMADA, S.; KATSUHARA, M.; KELLY, W.B.; MICHALOWSKI, C.B. and BOHNERT, H.J. (1995). A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell*, 7: 1129-1142.
- YAMAUCHI, D.; TAKEUCHI, H. and MINAMIKAWA, T. (1994). Structure and expression of  $\alpha$  - amylase gene from *Vigna mungo*. *Plant and Cell Physiology*, 35: 705–711.
- ZEEMAN, S. C.; KOSSMANN, J. and SMITH, A. M. (2010). Starch: Its metabolism, evolution and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 209–234.