

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DURANTE A
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Cariniana legalis*

BIANCA MACHADO CAMPOS TRINDADE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2016

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DURANTE A
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Cariniana legalis*

BIANCA MACHADO CAMPOS TRINDADE

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.

Orientador: Prof. Vanildo Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2016

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DURANTE A
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Cariniana legalis*

BIANCA MACHADO CAMPOS TRINDADE

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Aprovada em 22 de Fevereiro de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof. Eldo Campos (D.Sc. Biociências e Biotecnologia)- UFRJ- Campus Macaé

Prof. Henrique Duarte Vieira (D.Sc. Produção Vegetal) - UENF

Prof^a. Claudete Santa-Catarina (D.Sc. Biotecnologia) – UENF
(co-orientadora)

Prof. Vanildo Silveira (D.Sc. Biotecnologia)-UENF
(Orientador)

DEDICATÓRIA

A Deus, meu grande ajudador e sustentador;

Ao meu esposo Roberto;

Meus pais Jakson e Joselita;

E meus irmãos Bárbara e Bruno;

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela formação.

À UENF e CAPES, pela concessão das bolsas de estudos.

Ao meu orientador Vanildo Silveira, pela orientação, ensinamentos, compromisso e paciência.

À minha co-orientadora Claudete Santa Catarina, pela colaboração e conselhos no decorrer deste trabalho.

Ao meu esposo Roberto, pelo amor, cuidado e espera durante os momentos de ausência e por todo apoio concedido para a realização desse sonho.

Aos meus pais, irmãos, sobrinhos, e demais familiares que mesmo de longe sempre estiveram torcendo pelas minhas conquistas.

À minha amiga Taiane pela amizade e companheirismo nesses onze anos de estudo.

À Ellen Moura e Ricardo Reis que não mediram esforços para colaborar na concretização desse trabalho, dando toda contribuição, suporte em todas as etapas e pela valiosíssima amizade e profissionalismo.

Aos demais amigos Lucas, Ângelo, Tatiana, Jackellinne, Victor, Kariane, Viviane, Ana Paula, pelos momentos de confraternização, ajuda e companheirismo.

Ao José Daniel, secretário do Programa, pela prestatividade e auxílio.

E a todos que, de alguma maneira, fizeram parte dessa conquista.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO.....	1
1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1.1 O Bioma Mata Atlântica	4
1.2 - A espécie <i>Cariniana legalis</i>	6
1.3 - Desenvolvimento e germinação de sementes.....	8
1.4 - Proteômica na germinação de sementes.....	15
1.5 - Eletroforese Bidimensional	19
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1 - Material Vegetal.....	23
2.2 - Curva de embebição.....	23
2.3 - Germinação de sementes.....	24
2.4 - Extração de proteínas.....	24
2.5 - Eletroforese Bidimensional (2-DE)	25
2.6 - Análise dos géis.....	26
2.7 - Digestão da tripsina	26
2.8 - Identificação de proteínas por espectrometria de massas.....	27
3 - RESULTADOS.....	28

3.1- Germinação de sementes	28
3.2- Análise proteômica durante a germinação das sementes de <i>Cariana legalis</i>	29
4 - DISCUSSÃO	41
4.1- Germinação de sementes	41
4.2- Análise proteômica durante a germinação.....	42
4.2.1- Proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos	42
4.2.2- Proteínas relacionadas a processos de oxidação-redução.....	44
4.2.3- Proteínas de reserva.....	45
4.2.4- Proteínas relacionadas com a biossíntese e dobramento de proteínas.....	46
4.2.5- Outras proteínas relacionadas com o metabolismo de proteínas	49
5 - CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

RESUMO

Trindade, Bianca Machado Campos; Ds.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro, 2016; ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Cariniana legalis*. Orientador: Vanildo Silveira, Coorientadora Claudete Santa-Catarina, Conselheiros Messias Gonzaga e Claudete Santa-Catarina.

A *Cariniana legalis*, conhecida popularmente como jequitibá-rosa, é uma espécie arbórea pertencente ao bioma Mata Atlântica de importância ecológica e econômica fornecendo madeira de boa qualidade e de grande valor econômico. Devido a intensas atividades exploratórias e a falta de reposição através de reflorestamentos, essa espécie tem sido cada vez mais reduzida em seu habitat ocupando a categoria vulnerável à extinção. Os estudos em sementes têm tentado compreender os mecanismos em torno da germinação e encontrar novos marcadores que possam ser utilizados em programas de melhoramento ou biotecnológicos que visem melhorar a produtividade das culturas, além de garantir a conservação da espécie. A germinação das sementes refere-se ao processo fisiológico a partir da absorção de água pela semente seca, terminando com a protrusão da raiz. Muitos processos bioquímicos complexos estão envolvidos na germinação e como eles são regulados de forma coordenada e sucessivamente é, em parte, desconhecida. A análise proteômica tem sido aplicada principalmente para analisar e compreender estes processos biológicos dinâmicos. O objetivo deste estudo foi realizar uma análise proteômica comparativa durante a

germinação de sementes de *C. legalis*. As sementes foram submetidas à germinação e amostras foram coletadas no dia zero (0) e após 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias de embebição. Para a análise proteômica foram considerados os dias 0, 4, 8, 12. Após a obtenção dos géis de eletroforese bidimensional (2-DE), os spots diferencialmente expressos, foram levados para identificação usando um espectrômetro de massas SYNAPT G2 HDMS-Si conectado a um UPLC nanoACQUITY. Dos 103 spots, 70 proteínas foram identificadas e classificadas em nove grupos funcionais. Dentre as mais representativas foram aquelas proteínas associadas com processo de biossíntese (15%), processo de biossíntese celular (14%), proteína de armazenamento (14%), o processo de oxidação-redução (12%), e processo metabólicos de carboidratos (11%). A maioria das proteínas identificadas teve níveis variáveis de expressão durante a germinação e estava relacionada com a atividade respiratória, participando na glicólise, ciclo de Krebs, a cadeia respiratória, a produção de ATP e síntese de proteínas, essenciais durante a germinação e continuidade do desenvolvimento da plântula. A proteína mais abundante foi a globulina proteína sendo a principal fonte de matéria e energia para a germinação.

Palavras-chave: Proteômica Comparativa, Germinação de Sementes, Eletroforese Bidimensional, *C. legalis*.

ABSTRACT

Trindade, Bianca Machado Campos; Ds.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro, 2016; ANALYSIS PROTEOMIC COMPARATIVE DURING GERMINATION SEEDS OF *Cariniana legalis*; Advisor: Vanildo Silveira, Co-supervisor Claudete Santa-Catarina, Counsellors Messias Gonzaga e Claudete Santa-Catarina.

The *Cariniana legalis* popularly known as jequitibá pink is an arboreal species belonging to the Atlantic Forest of ecological and economic importance of providing good quality wood and of great economic value. Due to intense exploratory activities and the lack of replacement by reforesting this species has been increasingly reduced its habitat occupying the vulnerable category to extinction. Studies in seeds have tried to understand the mechanisms around the germination and find new markers that can be used in breeding programs and biotechnology to improve crop productivity as well as ensure the conservation of the species. Germination refers to the physiological process from the water absorption by the dry seed, ending with the radicle protrusion. Many complex biochemical processes are involved in germination and how they are regulated in a coordinated manner and in turn is in part unknown. The proteomic analysis has been applied mainly to analyze and understand these dynamic biological processes. The aim of this study was to conduct a comparative proteomic analysis during germination of *C. legalis* seeds. The seeds were submitted to germination

and samples were collected on day zero (0) and after 2, 4, 6, 8, 10 and 12 days of soaking. For the proteomic analysis were considered the days 0, 4, 8, 12. After obtaining the two-dimensional electrophoresis gels (2-DE), the differentially expressed spots were taken for identification using a mass spectrometer SYNAPT G2 HDMS-Si connected to one UPLC nanoACQUITY. Of the 103 spots, 70 proteins were identified and classified into nine functional groups. Among the most representative of those proteins associated with biosynthesis process (15%), cellular biosynthetic process (14%), the storage protein (14%), the process of oxidation-reduction (12%), and metabolism of carbohydrates procedure (11%). Most of the identified proteins had expression levels variables during germination and were related to respiratory activity by participating in glycolysis, Krebs cycle, respiratory chain, ATP production and protein synthesis, essences during germination and continued development seedling. The most abundant was the protein globulin protein as the main source of matter and energy for germination.

Keywords: Comparative Proteomics, germination of seeds, Electrophoresis Two-dimensional, *C. legalis*.

INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica possui altos índices de biodiversidade tanto de fauna como de flora. Este bioma presta inúmeros serviços ambientais, tais como: proteção de mananciais hídricos, contenção de encostas, regulação do clima, dentre outras funções MMA (2015). Contudo, em decorrência de um processo de colonização e ocupação de terra neste ambiente, no presente momento, este bioma se encontra reduzido e fragmentado, sendo que das 472 espécies da flora brasileira que constam na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção, 276 espécies, ou seja, mais de 50% pertencem a Mata Atlântica (MMA, 2015).

Dentre as espécies presentes no bioma Mata Atlântica a *C. legalis* (Martius) Kuntze, endêmica deste ambiente está na categoria vulnerável à extinção. Essa espécie arbórea é conhecida popularmente como jequitibá-vermelho, pertencente à família Lecythidaceae, composta de 17 gêneros e 300 espécies (Matta e Scudeller, 2012).

Além da sua importância ecológica a *C. legalis* é fornecedor de madeira de boa qualidade e grande valor econômico, utilizada principalmente na construção civil e também fornece celulose de boa qualidade, podendo ser aplicada na indústria de papel (Carvalho, 2003).

Entretanto, devido a intensas atividades exploratórias e a falta de reposição através de reflorestamentos, essa espécie tem sido cada vez mais reduzida em seu habitat (IUCN, 2015). Além disso, embora as sementes de *C. legalis* não apresentem dificuldade de germinação, as mesmas perdem a viabilidade à

medida que se prolonga o armazenamento, o que tem limitado o uso dessa espécie em programas de reflorestamento, principalmente com relação à obtenção de mudas (Rêgo, 2002).

Um dos fatores limitante para o uso de espécies nativas para fins de recomposição florestal ou de exploração comercial é o pouco conhecimento de suas características ecológicas (Oliveira et al., 2015). Assim, o estudo da germinação torna-se importante para melhor compreensão da espécie, visando sua inserção em programas silviculturais, bem como aos voltados para a conservação.

Os estudos em sementes têm contribuído para a compreensão dos mecanismos em torno da germinação e encontrar novos marcadores que possam ser utilizados em programas de melhoramento ou biotecnológicos que visem melhorar a produtividade das culturas.

Além disso, abordagens “ômicas” estão sendo utilizadas para caracterizar o vigor das sementes, longevidade, a germinação, tolerâncias a estresse ambiental, uniformidade, velocidade de germinação e o estabelecimento de plântulas (Rajjou et al., 2004). Muitos estudos têm sido realizados sobre a germinação das sementes, principalmente por meio fisiológico, análise transcriptoma e análise proteômica (Yang et al., 2007; Sreenivasulu et al., 2008; Yan et al., 2014; He et al., 2015). A proteômica, especificamente, tem sido aplicada nos diversos estudos em plantas, visando o conhecimento de vias, processos que estão associados com a ontogênese dos diferentes órgãos, tecidos e células durante o desenvolvimento da planta (Takac et al., 2011).

As proteínas são os produtos moleculares dos genes e têm papel central em muitos processos biológicos, são expressas em função de diferentes condições celulares e do meio ambiente, se mostrando dinâmico no organismo sendo a expressão funcional do genoma (Motoyama e Yates III, 2008).

Além disso, a expressão proteica reflete o funcionamento dos genes por analisar o produto final do genoma (Pandey e Mann, 2000), sendo uma ferramenta poderosa também no melhoramento genético, por fornecer informação a nível molecular da variabilidade genética que é efetivamente expressa no genoma (Pennington e Dunn, 2001).

No que se refere à germinação de sementes, estudos proteômicos têm abordado os eventos fisiológicos durante a germinação de sementes (Weitbrecht et al.,

2011), desenvolvimento de sementes (Balbuena et al., 2011), compreensão dos reguladores que estão envolvidos na indução e liberação de dormência em sementes (Graeber et al., 2012), desvendar características específicas de processos complexos como a germinação (He et al., 2015; Wang et al., 2015); detectar marcadores de proteínas que podem ser utilizados para caracterizar o vigor das sementes (Gallardo et al., 2002; Zhang et al., 2015) e resposta aos fatores ambientais da germinação de sementes (Tan et al., 2013).

Além do mais, a proteômica tem sido aplicada em estudos da germinação de semente com foco na identificação total de proteínas, com intuito de gerar mapas de referência ou identificar proteínas específicas em diferentes estágios de desenvolvimento (Miernyk et al., 2011; Cunsolo et al., 2012; Deng et al., 2013).

A maioria dos estudos proteômicos em germinação de sementes é desenvolvida com espécies cultivadas e/ou de espécies modelos (He e Yang, 2013; Nguyen et al., 2015) evidenciando uma carência de informações para sementes de espécies arbóreas nativas, em especial aquelas vulneráveis à extinção, como é o caso da espécie *C. legalis*.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi estudar a proteômica comparativa durante o processo germinativo de sementes de *C. legalis*.

1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O Bioma Mata Atlântica

Na época do descobrimento, a Mata Atlântica abrangia uma área equivalente a 1.300.000 Km², estendendo-se ao longo da Costa Atlântica, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, abrangendo 17 estados do território brasileiro. Contudo, a cobertura original deste bioma foi reduzida a 22% baseados, principalmente, em remanescentes de vegetação nativa em diferentes estágios de regeneração. Apenas 7% desses remanescentes estão conservados em fragmentos acima de 100 hectares (Figura 1) (Atlântica, 2015).

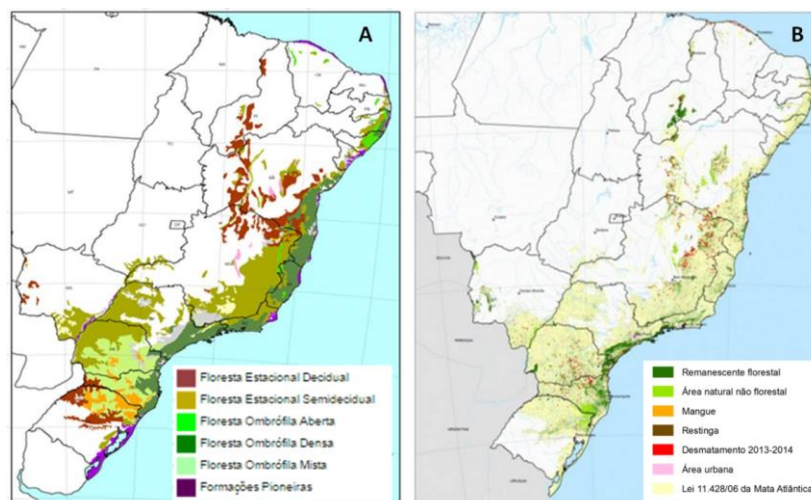


Figura 1: Mapas do domínio da Mata Atlântica mostrando a cobertura florestal original (A) e a cobertura do remanescente florestal entre os anos de 2013-2014 (B). Fonte: Atlântica (2015).

Entretanto, mesmo estando reduzido e fragmentado, esse bioma apresenta cerca de 20.000 espécies vegetais, sendo que destas 35% existem no Brasil, incluindo diversas espécies endêmicas e ameaçadas de extinção (MMA, 2015).

Apesar de sua enorme riqueza e importância biológica, as florestas tropicais foram drasticamente reduzidas por meio de processos como desmatamento, queimadas, corte seletivo de madeira e caça (Pinto et al., 2007). A perda destes ambientes é ocasionada principalmente pelo aumento da população humana, o que leva a um processo de industrialização, devido à necessidade de atender a população com bens manufaturados, acarretando uma grande demanda de recursos naturais (Laurance e Bierregaard, 1997).

A perda de habitat é a principal causa da diminuição da biodiversidade e esses pequenos fragmentos podem ser o único lugar propício para determinadas espécies (MMA, 2015). Além do mais, os remanescentes da Mata Atlântica são importantes por promover a proteção de nascentes e fontes, regulação do clima, manutenção da temperatura do solo e outros serviços (Atlântica, 2015).

A floresta e outras formas de vegetação nativa permitem a regulação do regime hídrico permanente na alimentação do lençol freático, por isso, se faz necessário recuperar áreas da Mata Atlântica para garantir a preservação dos recursos hídricos, além da paisagem, estabilidade geológica, biodiversidade, e o fluxo gênico da fauna e flora (MMA, 2015).

Devido à elevada diversidade e o histórico de devastação, a Mata Atlântica está incluída entre os 34 principais “hotspot” mundiais, ou seja, centro de alta biodiversidade, em que a extensão original foi bastante reduzida, colocando em risco a sobrevivência de incontáveis espécies de animais e plantas (IUCN, 2015), sendo, portanto, um ecossistema prioritário para conservação. Também, em função da importância deste bioma, o mesmo foi declarado como uma Reserva de Biosfera pela UNESCO (Oliveira-Filho e Fontes, 2000).

No Rio de Janeiro, a Mata Atlântica cobria 100% de toda área do estado e era composta de ecossistemas associados como matas de altitude, restingas e mangues (Rambaldi et al., 2003). Entretanto, perdeu parte de sua cobertura florestal original, restando apenas menos de 20% (Atlântica, 2015). Dessa maneira, muitos programas de reflorestamentos com espécies nativas são aplicados para a recuperação ou restauração da Mata Atlântica, utilizando diferentes metodologias como condução da regeneração natural de espécies

nativas ou com plantios de espécies nativas através de mudas ou sementes, tendo como prioridade para a recuperação destas áreas degradadas, o uso de espécies vulneráveis à extinção (Chazdon et al., 2007).

Sendo assim, a necessidade de sementes viáveis para atender os programas de conservação e produção florestal tem elevado o número de pesquisas, envolvendo a fisiologia e os processos bioquímicos quanto ao armazenamento e germinação de diversas sementes (De La Fuente et al., 2011; He e Yang, 2013; Zhang et al., 2014; Aragão et al., 2015).

1.2 - A espécie *Cariniana legalis*

Dentre as inúmeras espécies endêmicas da Mata Atlântica e aquelas vulneráveis à extinção se tem a *C. legalis* (Martius) Kuntze. Essa espécie conhecida popularmente como jequitibá-vermelho é uma espécie arbórea pertencente à família Lecythidaceae, composta de 17 gêneros e 300 espécies, as quais possuem distribuição Pantropical, cuja distribuição cobre as regiões de todos os continentes (Matta e Scudeller, 2012). Destas, 300 espécies, 11 são endêmicas da Mata Atlântica (Smith et al., 2012).

No Brasil a *C. legalis* possui distribuição geográfica restrita ao litoral da região Nordeste e Sudeste do Brasil (Figura 2) (Carvalho, 2003).

A árvore é semicaducifólia e possui tronco retilíneo, com fuste de até 50 m de altura e diâmetro à altura do peito de até 1 m, e copa em forma de guarda-chuva (Reitz, 1981).

As plantas da *C. legalis* são monoicas e se reproduzem em torno dos 20 anos de idade (Sebbenn et al., 2000). O florescimento no Estado do Rio de Janeiro se dá nos meses de abril a maio, frutificando de julho a setembro (Carvalho, 2003).

O fruto é um pixídio capsular alongado e lenhoso, com dimensões de aproximadamente 7,0 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. O fruto também possui uma abertura superior circular, o que confere uma deiscência transversal separando uma tampa apical (opérculo) do restante do fruto (ânfora), com dispersão anemocórica (Gonçalves e Lorenzi, 2011). Cada fruto é composto de 10 a 15 sementes aladas de até 3,0 cm de comprimento, com núcleo seminal basal (Carvalho, 2003)



Figura 2: Mapa da distribuição de *C. legalis* no Brasil. Os pontos verdes indicam os locais de ocorrência natural desta espécie. Fonte: Carvalho (2003).

Embora as sementes tenham sido classificadas como recalcitrantes por Rêgo (2002), sua viabilidade mantém-se por até 12 meses em câmara seca ou fria, porém perdem a viabilidade à medida que se prolonga o armazenamento (Carvalho, 2003). Recentemente, esta espécie foi classificada como de comportamento ortodoxo de acordo com a qualidade fisiológica durante o armazenamento (Abreu, 2009).

A madeira de *C. legalis* é classificada como madeira de lei, moderadamente pesada, possuindo superfície lisa e usada em carpintaria, compensados, laminados, celulose e papel (Rêgo, 2002), além de ser indicada em reflorestamentos para recuperação ambiental (Carvalho, 2003).

Devido à sua importância econômica para a produção de madeira, esta espécie foi intensamente explorada, encontrando-se, atualmente poucas plantas remanescentes nos seus locais de ocorrência, sendo classificada como vulnerável pela IUCN (IUCN, 2015). Indicando que as espécies sofreram redução de 30% de

indivíduos adultos nos últimos dez anos ou que esta redução está projetada para os próximos dez anos, com probabilidade de redução de pelo menos 10% dos indivíduos adultos neste período (IUCN, 2015), enfrentando um risco alto de extinção em médio prazo, devido à exploração desordenada e sem plantio de reposição (Carvalho, 2003).

Da casca se extrai substâncias tanantes tais como o tanino, que tem função desinfetante e resina que pode ser usado na medicina popular, contra afecções da boca, inflamação da garganta, amigdalites e faringites (Carvalho, 2003). Suas flores apresentam potencial apícola e suas sementes, além de serem usadas na dieta de animais, também são úteis para o uso em plantios mistos (Carvalho, 2003).

As sementes de *C. legalis* não apresentam dificuldades para a germinação e não são afetadas, dentro da faixa adequada, por fatores como temperatura, luz e umidade (Kageyama e Viana, 1989). A germinação das sementes é epígea e abundante nas primeiras semanas da colheita. Entretanto, as sementes perdem a viabilidade à medida que se prolonga o armazenamento, dificultando a utilização dessa espécie em programas de melhoramento genético e de reflorestamentos (Rêgo, 2002).

Apesar de o Brasil possuir grande diversidade de espécies florestais, com grande valor econômico, muitas delas são exploradas sem que haja informações quanto às fases de seu ciclo biológico, sistema de propagação e reprodução de mudas. Neste contexto, na tentativa de compreender os mecanismos dessas espécies, torna-se imprescindível à aquisição de conhecimento sobre morfologia, da germinação, bem como o manejo e a devida reprodução, reposição e regeneração natural das espécies ameaçadas de extinção (Carvalho, 2003).

1.3 - Desenvolvimento e germinação de sementes

A formação e a germinação da semente são as etapas cruciais no desenvolvimento vegetal, sendo resultado de um complexo controle espacial e temporal do metabolismo, onde muitos hormônios atuam na regulação da expressão de múltiplos genes (Sheoran et al., 2005).

A formação completa do ciclo reprodutivo da semente começa com o desenvolvimento das flores e polinização e o desenvolvimento do embrião, a

partir do zigoto que é formado pela fusão de um ovo e uma célula espermática, e o tegumento da semente é desenvolvido a partir de integumentos do óvulo (Miernyk et al., 2011). O tecido para armazenamento dos nutrientes pode ser o(s) cotilédono(s), ou endosperma. Este último é derivado da dupla fertilização, é triploide e rico em óleo e/ou proteínas e/ou amido (Linkies et al., 2010).

A semente compreende três partes básicas: o embrião; um tecido de armazenamento de nutrientes para ser usado previamente pelo embrião até alcançar a autotrofia, e o tegumento, para proteção da semente (Haughn e Chaudhury, 2005). Após sua maturação, com a formação de um embrião funcional, a semente é dispersa da planta, e o desenvolvimento deste embrião permite o estabelecimento de uma plântula, permitindo a sobrevivência e garantindo o início de uma nova geração (Koornneef et al., 2002).

Muitas sementes concluem seu desenvolvimento com uma etapa conhecida como dessecação, característico de sementes ortodoxas que, quando dispersas pela planta-mãe, apresentam baixos conteúdos de água, em torno de 5 a 10% de seu peso fresco (Castro et al., 2004). Segundo Oliver et al. (2001), a tolerância à dessecação em plantas é um fenômeno comum nas estruturas reprodutivas, tais como, pólen, esporos e sementes e pode ser definida como a capacidade de recuperar quase toda água protoplasmática perdida (80-90%). Essa tolerância está sob a dependência de muitos genes cuja expressão é controlada pelo fitohormônio ácido abscísico (ABA) (Hirayama e Shinozaki, 2007).

De acordo com (Kermode (1997)), a desidratação é um evento pré-programado garantindo às sementes resistir a ambientes desfavoráveis e, quando não dormentes, poderem restabelecer a atividade metabólica e crescer em condições adequadas para a germinação (Han et al., 1999). A reduzida atividade garante a preservação da viabilidade das células embrionárias no estado seco, podendo se estender por séculos, mantendo assim o potencial de germinação (Donohue et al., 2010).

Ao contrário, em sementes recalcitrantes, geralmente não se verifica uma etapa de dessecação ao final do desenvolvimento e da dispersão das sementes, pois tais sementes apresentam-se metabolicamente ativas quando dispersas (Castro et al., 2004), com variações entre espécies quanto ao tipo e intensidade do metabolismo, estado de desenvolvimento, e concentração de água ao se dispersar (Berjak e Pammenter, 1994).

Em sementes recalcitrantes o conteúdo de água pode ser mantido relativamente alto, em torno de 60 a 70% de seu peso fresco (Castro et al., 2004) e dessa forma, o desenvolvimento das sementes progride, culminando na germinação, conseqüentemente, com a emissão da radícula, sem a necessidade de suprimento exógeno de água, ou, quando presente a fase de embebição, se mostra de forma tênue em comparação com as sementes ortodoxas (Berjak e Pammenter, 1994). Assim sendo, sementes recalcitrantes não passam pela fase de secagem e quiescência metabólica (Catusse et al., 2008b).

Devido a este padrão de metabolismo germinativo, as sementes recalcitrantes são caracterizadas por apresentarem baixa viabilidade e propensão às injúrias por resfriamento (Castro et al., 2004). De acordo com Barbedo e Filho (1998), as diferenças no comportamento existente entre as sementes ortodoxas e recalcitrantes são resultantes de processos de seleção natural, em concordância com as condições ambientais em que a espécie se desenvolveu. A germinação pode ser dividida em três fases: a) embebição, b) reativação da atividade metabólica e c) início do crescimento da plântula (Nonogaki et al., 2010) (Fig 3).

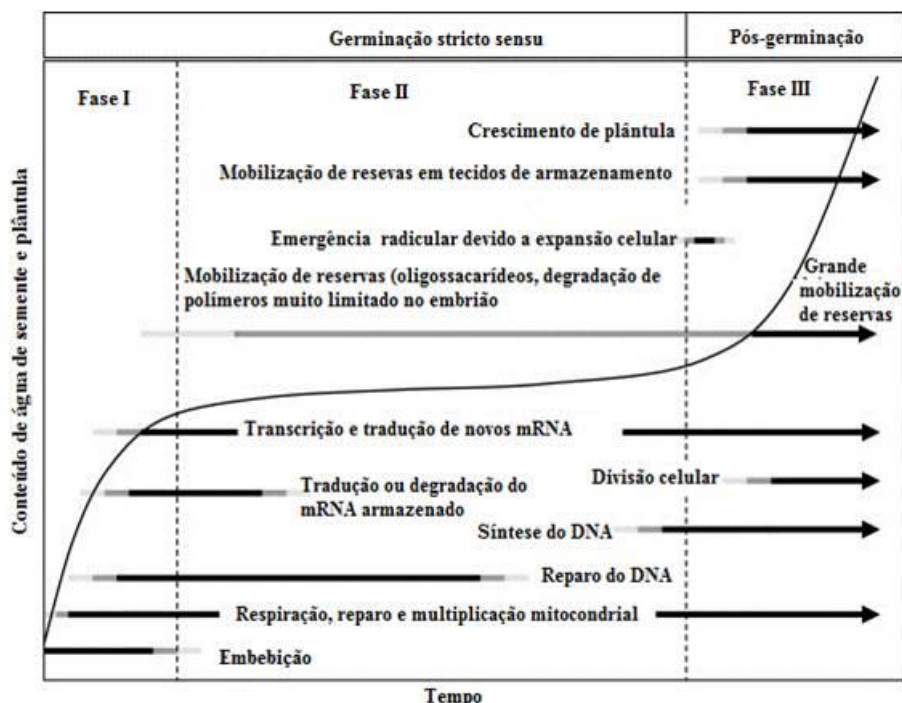


Figura 3: Curva trifásica dos eventos físicos que ocorrem durante a germinação (Fase I e II) e crescimento inicial da plântula (Fase III). Adaptado de Nonogaki et al. (2010).

Durante o processo germinativo ocorrem vários eventos, tais como: ativação da respiração (Bewley, 1997), reparo de macromoléculas (Osborne, 1983) mobilização de reservas (Gallardo et al., 2002) e reiniciação do ciclo celular (Vázquez-Ramos e de La Paz Sánchez, 2003).

Em sementes secas o potencial de água é muito baixo o que provoca influxo rápido da água e durante a embebição a semente aumenta de tamanho rapidamente, ocorrendo mudanças no tamanho e se dá em vários pontos de entrada, tais como a micrópila, hilo ou superfície (Preston et al., 2009).

Entretanto, todas as células dos tecidos embrionários e dos demais tecidos apresentam potencial hídrico, que pode ser específico a cada tecido (Castro et al., 2004) e o progresso da embebição vai variar entre sementes e os diferentes tecidos (Wojtyla et al., 2006).

A água apresenta inúmeras funções, contribuindo para o amolecimento do tegumento, intensificação da velocidade respiratória, favorecer as trocas gasosas, induzir a síntese e atividade de enzimas e hormônios e contribuir para a regularidade da degradação, translocação e assimilação das reservas e crescimento subsequente (Castro et al., 2004).

De acordo com Bewley et al. (2013), a embebição de água nas sementes se dá através de um padrão trifásico. A fase inicial de absorção de água, ou fase I, é uma fase rápida que dependerá do gradiente de potencial hídrico entre a semente e o seu ambiente (Figura 3).

O influxo de água para dentro das células de sementes secas durante a fase I resulta em perturbações temporárias estruturais, em particular as membranas, que conduzem a uma fuga rápida e imediata de solutos de baixo peso molecular e metabólitos na solução circundante de embebição (Bewley, 1997). Nessa primeira fase também acontece reparo DNA mitocondrial. As atividades respiratórias também podem ser detectadas poucos minutos após o início da embebição (Bewley et al., 2013).

Dentro de um curto espaço de tempo de reidratação, as membranas voltam a sua configuração mais estável, em que o tempo de vazamento de solutos é reduzido. Este é o sintoma de transição dos componentes de fosfolípidios de membrana a partir da fase de gel obtida durante a maturação para o estado normal líquido cristalino hidratado (Crowe et al., 1992).

Além do mais, a proteção da integridade celular na reidratação é protegida pela produção de substâncias protetoras como proteínas do tipo deidrininas (Han et al., 1999), bem como por oligossacarídeos (Obendorf, 1997).

As vias glicolíticas e a oxidativa pentose-fosfato recomeçam também durante a fase I e as enzimas do ciclo de Krebs se tornam ativas (Botha et al., 1992). Além do mais, em sementes secas há a presença de mitocôndrias, que embora pouco diferenciados em função da secagem na maturação, contêm enzimas suficientes que sustentam o ciclo de Krebs e a produção de ATP (adenosina trifosfato) durante a sequência de embebição (Bewley et al., 2013).

O processo é basicamente físico, onde o conteúdo de água da semente alcança um nível, mantido constante ou aumentando lentamente por um período conhecido como fase de preparação e ativação do metabolismo, ou apenas fase II. Durante a fase II, são ativados os processos metabólicos requeridos para o crescimento do embrião e a conclusão do processo germinativo (Castro et al., 2004).

Todos os componentes necessários para a retomada da síntese de proteínas estão presentes nas células das sementes secas e durante a reidratação os ribossomos realizam a síntese de proteínas utilizando RNAm armazenados em sementes secas (Bewley et al., 2013). De acordo com Bewley e Marcus (1990), a maioria dos RNAm presentes em sementes codificam proteínas úteis para o funcionamento normal do metabolismo celular.

A fase II é uma etapa fundamental no desenvolvimento de uma nova planta, em que pode ocorrer tanto à emergência da radícula e o estabelecimento da plântula, ou a semente pode se manter em um estado dormente, caso não encontre condições ambientais adequadas de germinar (Catusse et al., 2008a). Na fase II ocorre síntese de mitocôndrias, bem como a tradução de mRNA armazenado (Howell et al., 2006). É também considerada uma fase de metabolismo ativo, durante a qual as reservas de mobilização são iniciadas (Dinkova et al., 2011).

A síntese de DNA ocorre nas células da radícula logo após o início da embebição. A princípio, essa síntese aconteceria para reparar danos celulares que ocorrem durante a dessecação e reidratação nas sementes. Outro período de síntese de DNA ocorre após a protrusão radicular associado com a divisão celular (de Castro et al., 1995).

A fase III da embebição é marcada por um aumento no conteúdo de água na semente, devido à associação com o início do crescimento do embrião (divisão celular e consequente alongamento embrionário e protrusão da radícula) e, posteriormente, conclusão da germinação e é nessa fase de pós-germinação que a radícula começa a crescer (Bewley, 1997). Entretanto, a absorção de água continua durante o crescimento de plântulas. É uma fase em que a mobilização de reservas se torna importante para o estabelecimento de plântulas até que ela se torne fotossinteticamente ativa (Bewley, 1997).

As reservas das sementes contidas nos órgãos de armazenamento são de alto peso molecular que, posteriormente, são convertidos a metabólitos de baixo peso molecular para serem transportados facilmente para regiões de crescimento. Os órgãos que armazenam as reservas nas sementes podem conter dois ou mais tipos de reservas, podendo ser carboidratos, óleo ou proteínas, que são hidrolisados e usados posteriormente pelo embrião (Bewley et al., 2013). No que diz respeito às reservas das sementes formadas por proteínas, elas podem ser classificadas em albumina solúveis em água; globulinas solúveis em soluções salinas e insolúveis em água; glutelinas solúveis em ácido diluído ou em soluções alcalinas e a prolaminas solúveis em alcoóis. As proteínas de reserva são utilizadas como fonte de nitrogênio no desenvolvimento e germinação do embrião (Shewry et al., 1995).

Outro processo importante durante a germinação de sementes é a respiração, que é a oxidação de compostos de carbono resultando em CO_2 e H_2O , através de uma série de reações, utilizando o oxigênio como aceptor final de elétrons para produção de energia de compostos secundários (Bewley et al., 2013). A energia produzida pela respiração é liberada e conservada na forma de ATP, que posteriormente será usado na manutenção e desenvolvimento da plântula (Bewley et al., 2013). Outros substratos podem ser utilizados durante a respiração, tais como o amido, sacarose, frutose, glicose, lipídios, ácidos orgânicos, proteínas (Marengo e Lopes, 2009).

Durante a absorção de água pela semente há uma intensificação das atividades respiratórias e também de outras atividades metabólicas, que possibilitam o fornecimento de energia e nutrientes para a retomada do crescimento embrionário (Bewley, 1997).

Além disso, para que haja eficiência na produção de ATP é importante que a atividade e integridade das mitocôndrias dos embriões sejam mantidas a partir do início da embebição, havendo dessa maneira aumento do consumo de oxigênio, bem como, maior liberação de CO₂ (Bewley et al., 2013).

Importantes moléculas para o processo respiratório como DNA, RNA, proteínas, lipídios, carotenóides, fitormônios, são formadas através de esqueletos carbonados resultantes da respiração celular (Marenco e Lopes, 2009).

A síntese dessas moléculas importantes para o crescimento é possível através das substâncias de alto poder redutor, tais como o NADH, FADH₂ e a de elevado conteúdo energético como o ATP (Marenco e Lopes, 2009). Ou seja, nem todo carbono contido no substrato respiratório é liberado em forma de CO₂ e nem todos os elétrons se combinam com O₂ para produzir H₂O (Marenco e Lopes, 2009).

Todos os componentes úteis para a atividade metabólica durante a germinação estão presentes em formas potencialmente ativas em sementes secas, incluindo mRNAs, proteínas ribossômicas e fatores de iniciação ao alongamento e nas sementes secas contêm mRNAs armazenados durante a maturação, que garantem a sobrevivência à dessecação (Rajjou et al., 2004).

Mais de 10000 diferentes mRNAs armazenados foram identificados nas análises de transcriptoma de *Arabidopsis* (Okamoto et al., 2010). A maioria dos mRNAs armazenados são transcritos que codificam proteínas do grupo LEA ("late embryogenesis abundant"). As proteínas LEA permitem a manutenção da estabilidade, capacidade de reparo do DNA e de reposição de água necessária para a manutenção da estrutura das membranas (Goyal et al., 2005).

O metabolismo é ativado durante as fases I e II, através da absorção de água, por meio de enzimas que foram armazenadas na semente durante a sua maturação (Weitbrecht et al., 2011).

Em uma abordagem proteômica em *Arabidopsis* verificou-se que grandes números de enzimas envolvidas nas principais vias metabólicas encontravam-se nas sementes secas e permaneceram estáveis ou mais acumulados durante a germinação (Fu et al., 2005), incluindo enzimas de vias de produção de energia, tais como as envolvidas na glicólise (6- fosfofrutiquinase (PFK), fosfoglicerato quinase (PGK)), e no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (malato desidrogenase) (Weitbrecht et al., 2011).

Além do mais, as sementes secas contêm pouca quantidade de ATP, necessitando da hidratação para que um aumento rápido na produção aconteça em associação com a troca de gás (Benamar et al., 2008). A hidratação também favorece o reparo das mitocôndrias pré-existentes de forma a contribuir para a produção de ATP (Benamar et al., 2008).

Nas sementes, as proteínas armazenadas, além de serem fontes de aminoácidos, também contribuem para a produção de energia em forma de ATP (Angelovici et al., 2011).

A utilização das fases de embebição é importante para mostrar como acontecem os eventos durante a germinação de sementes, no entanto, em algumas espécies esse padrão não é bem definido (Nonogaki et al., 2010). Estes eventos também não definem temporalmente os eventos metabólicos que ocorrem no interior da semente (Nonogaki et al., 2010). Entretanto, com a aplicação do estudo da proteômica é possível averiguar quais mudanças ocorreram em nível de proteínas durante a germinação das sementes e assim inferir o que de fato está ocorrendo em cada fase durante a embebição da semente.

1.4 - Proteômica na germinação de sementes

O proteoma representa o conjunto completo de proteínas que estão presentes num organismo, órgão específico, tecido, célula ou mesmo os compartimentos subcelulares refletindo o estado atual de funcionamento de um sistema em condições específicas e a expressão funcional do genoma (Jorrín et al., 2007).

As plantas, de maneira geral, possuem mais genes que o genoma humano, e por isso, se tornam organismos mais complexos para estudo (Neilson et al., 2010). Além disso, o número de genes não pode ser facilmente correlacionado com o número de proteínas funcionais, uma vez que um organismo possui várias regulações do gene, tais como, a transcrição, *splicing*, tradução e pós-tradução na maturação da proteína (Vadivel e Kumaran, 2015). E vários fatores físicos como o tipo de tecido, estágio de desenvolvimento, estímulos ambientais também afetam a expressão gênica em plantas (Rampitsch e Srinivasan, 2006).

Além do mais, devido ao número de níveis de ploidia em algumas plantas e a presença de várias isoformas da proteína, estudar o proteoma de plantas pode-se tornar complexo (Vadivel e Kumaran, 2015). Entretanto, mesmo diante da complexidade que é estudar a dinâmica das proteínas, a análise proteômica é importante por correlacionar melhor com o fenótipo biológico (Zubarev, 2013).

A utilização da proteômica tem sido útil para documentar a distribuição geral das proteínas de um tecido, célula, identificar e caracterizar as proteínas de interesse e elucidar suas funções e associações (Ciero e Bellato, 2002)

O estudo de proteômica em plantas tem tido várias abordagens, podendo ser descritivo, comparativo, subcelular, PTMs, interatômicas, proteômicas, e a proteômica translacional que visa o aumento da produção agrícola e de alimentos, fibras e abastecimento de combustíveis favorecendo a sustentabilidade ambiental, crescimento econômico e o bem-estar humano (Jorrín-Novo et al., 2015).

A proteômica comparativa é a estratégia que permite a elaboração de perfis proteicos, estudo da expressão proteica ao longo de diferentes estádios de desenvolvimento, garantindo a identificação de proteínas estágio-específico, cuja expressão possa ser usada como marcadores do desenvolvimento (Dias et al., 2010). Ela permite a comparação quantitativa de várias proteínas através da análise de um conjunto de géis em vários experimentos, por meio de algoritmos de computador para a detecção dos spots, bem como a quantificação. O primeiro passo da análise é verificar os géis 2-DE e capturá-los como imagens digitais, importá-los para o software e analisar o gel para detecção dos spots, local e quantificação do spot (Hurkman e Tanaka, 2007) (Figura 4).

Além disso, as imagens devem ser inspecionadas e editadas manualmente quando necessárias para verificar a detecção local de correspondência dos spots e a uniforme em todos os géis e assim garantir a normalização dos volumes dos spots e a quantificação precisa dos dados, proporcionando a extração do conjunto de dados que, juntamente com a identificação das proteínas, fornecerão informações dos processos bioquímicos associados com proteomas específicos (Hurkman e Tanaka, 2007).

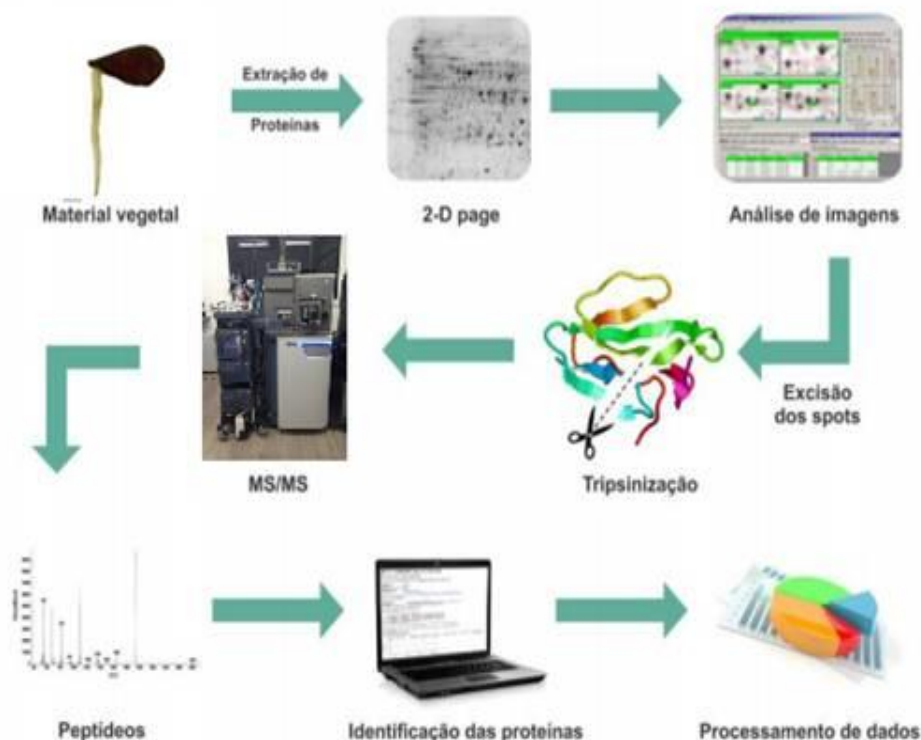


Figura 4. Etapas da análise proteômica em plantas, utilizando a plataforma 2-DE.

As metodologias mais aplicadas para o estudo do proteoma tem sido a eletroforese bidimensional (2-DE) combinada com a espectrometria de massas, e a análise em shotgun que é uma tecnologia de identificação proteica multidimensional que possibilita identificação de um número maior de proteínas, com plataformas automatizadas e de alto rendimento. Em contrapartida, é mais aplicada em espécies que possuem genoma sequenciado (Champagne e Boutry, 2013). Essa técnica consiste na digestão de proteínas de amostras complexas que são separadas em cromatografia líquida (UPLC) de ultra-alta pressão acoplada a um espectrômetro de massas (Motoyama e Yates III, 2008).

A estratégia MS/MS possibilita a identificação mais precisa porque permite a determinação da sequência de aminoácidos (Chen e Harmon, 2006). Além do mais, os espectros obtidos permitem a identificação de proteínas por similaridade de sequências entre espécies próximas, tornando importante principalmente quando a espécie estudada possui pouca informação em bancos de dados (Chen e Harmon, 2006).

Uma série de trabalhos tem utilizado a técnica de fracionamento proteico, a eletroforese bidimensional 2-DE, juntamente com a espectrometria de massas

MS/MS para fragmentação de peptídeos e posterior identificação das proteínas através de bancos de dados específicos, tais como os de (Correia et al., 2012; de Carvalho Silva et al., 2014; Vale et al., 2014; Varhaníková et al., 2014; Nguyen et al., 2015).

Ghosh e Pal (2012) analisaram os cotilédones de sementes germinadas de *Vigna radiata* e através da análise comparativa obtiveram 102 spots diferencialmente expressos, e 74 proteínas identificadas. As proteínas identificadas estiveram associadas ao estresse na adaptação da tensão durante a germinação.

Rana e Sreenivasulu (2013) averiguaram alterações proteicas durante a germinação de sementes de *Aconitum heterophyllum*. Verificaram 40 proteínas diferencialmente expressas envolvidas no metabolismo, regulação de DNA, tolerância ao stress. De acordo com os autores, estas alterações proteicas são responsáveis por alterações fisiológicas, físicas e contribuem para um aumento na porcentagem de germinação.

Comparando-se sementes germinadas e as não germinadas (dormentes) em *Podophyllum hexandrum* Royle (Dogra et al., 2013) obtiveram 113 proteínas diferencialmente expressas, dentre as quais, 59 estiveram relacionadas ao metabolismo, 17 com a sinalização de ABA/GA e 15 ao estresse. O estudo revelou que a protrusão radicular ocorre devido ao aumento no acúmulo de hidrolases na parede celular, tais como a beta-1,3- glucanase enfraquecendo o endosperma.

He e Yang (2013), para a proteômica da germinação de arroz, verificaram que o maior grupo de proteínas identificadas estava envolvido nas vias metabólicas de carboidratos, incluindo a glicólise, ciclo do TCA, fermentação, gluconeogênese, ciclo do glioxilato e via das pentoses fosfato. Das proteínas encontradas, 22 catalisavam os passos da glicólise, sendo a maioria delas up-regulada no início da embebição.

Poucos estudos com respeito a sementes de espécies lenhosas estão disponíveis na literatura. Pawlowski (2009), por exemplo, mostrou que o mecanismo de quebra da dormência de sementes envolve diversos processos, tais como, proteínas do metabolismo energético, de proteassoma, transcrição, síntese de proteínas, de transdução de sinal e do metabolismo de metionina.

Zhang et al. (2014), por exemplo, analisaram a germinação de sementes de *Magnolia sieboldii*, e encontraram 59 proteínas diferencialmente expressas. As proteínas identificadas formaram oito grupos de acordo com suas respectivas funções. A maior percentagem foi atribuída a proteínas de armazenamento (31%), seguido do metabolismo (18%), estresse/defesa (18%).

A proteômica também tem sido aplicada na investigação de proteínas relacionadas à germinação em resposta a fatores ambientais (Tan et al., 2013) ao vigor de sementes (Zhang et al., 2015); no desenvolvimento da semente, tolerância à dessecação (Wang et al., 2015); longevidade de sementes (Nguyen et al., 2015), dentre outras finalidades.

A abordagem proteômica tem sido aplicada com sucesso para averiguar mudanças qualitativas e quantitativas nos padrões de expressão de proteínas durante o crescimento e desenvolvimento, bem como para análise de resposta a vários estímulos bióticos e abióticos. Além destas finalidades, a análise proteômica permite expandir as informações biológicas, entender melhor os aspectos relacionados à germinação de semente. Embora inúmeros avanços tenham ocorridos nos estudos de proteômica durante a germinação de sementes de várias espécies, não existem relatos de investigação a respeito de alterações proteicas na germinação de sementes em *C. legalis*, sendo esse, portanto, um trabalho pioneiro para a espécie em questão.

1.5 - Eletroforese Bidimensional

As proteínas desempenham papel importante nos processos celulares, atuando como componentes estruturais, catalisadores de reações bioquímicas, tais como metabolismo, sinalização e regulação (Feng et al., 2009). Além disso, as modificações das proteínas por serem dinâmicas, e suas propriedades físicas e químicas variáveis torna o estudo da análise do proteoma ainda mais desafiador (Feng et al., 2009).

A eletroforese bidimensional é um processo dividido em dois passos, a primeira dimensão ou a focalização isoeletrica em que as proteínas são separadas de acordo com os seus pIs (IEF) (usando tiras de gel de gradientes com pH imobilizado) e a segunda dimensão a separação das proteínas em função

da sua massa molecular em dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A abundância de proteínas analisadas utilizando 2-DE pode ser estimada através da intensidade de coloração no gel (Rabilloud e Lelong, 2011).

Entretanto, antes que a primeira dimensão seja executada é necessário um bom preparo da amostra, com a extração de proteínas e a solubilização, que são passos fundamentais para o sucesso e progresso das demais etapas (Balbuena et al., 2011).

O preparo ideal de uma amostra consiste em solubilizar todas as proteínas, eliminar todos os compostos que possam interferir na primeira separação (Rabilloud e Lelong, 2011) e o método de preparação da amostra vai depender do objetivo da separação (Rabilloud e Lelong, 2011).

Os componentes que podem interferir na eletroforese bidimensional são os compostos fenólicos, carboidratos que podem entupir os poros do gel, terpenoides, pigmentos, lipídios que podem causar estrias e afetar negativamente a reprodutibilidade dos géis de 2-DE (Carpentier et al., 2005).

Quando não se tem um protocolo estabelecido para o preparo da amostra é necessário que se faça testes de diferentes métodos de extração a fim de isolar e fracionar as proteínas de maneira que se solubilizem quantidades elevadas de proteínas a fim de se obter géis 2-DE consistentes e reprodutíveis (Wang et al., 2008).

Para extração das proteínas é necessário à utilização de produtos químicos sem carga (neutros), e para isso se utiliza da combinação de agentes caotrópicos, tais como a ureia e a tioureia que são excelentes agentes desnaturantes e de solubilização (Rabilloud e Lelong, 2011). Por sua vez, a adição de detergentes eletricamente neutros (zwitteriônico) é utilizada para dissolver lipídios e garantir as condições adequadas para IEF, além de solubilizar e minimizar a agregação das proteínas (Rabilloud e Lelong, 2011).

O fenol e o TCA-acetona também são metodologias comumente usadas na extração de proteínas vegetais, mas o método de TCA-acetona inclui uma baixa solubilidade contribuindo para uma baixa resolução de proteínas, sendo mais eficaz para os tecidos mais novos (Santoni et al., 1997).

O fenol é mais indicado para plantas lenhosas e outros tecidos vegetais por separar a proteína e as substâncias interferentes no interior do tecido (Carpentier et al., 2005). A extração com fenol, seguido da precipitação em solução de

acetato de amônio/metanol, tem aumentado o número de spots, a resolução dos géis e considerado mais apropriado para tecidos recalcitrantes (Carpentier et al., 2005).

Embora, ambos os métodos concentrem a amostra e simultaneamente, removam componentes interferentes antes da 2-DE, os protocolos baseados em fenol possibilitam maiores rendimentos de proteínas e resolução dos géis, se comparados com o uso do TCA/acetona (Wu et al., 2014).

Em contra partida, a utilização de solução ureia e tiourea tem se mostrado capaz de aumentar a solubilização de proteínas conjugadas a açúcares e proteínas hidrofóbicas (Carpentier et al., 2005). Sendo amplamente utilizada na extração de proteínas principalmente em tecidos vegetais (Rabilloud e Lelong, 2011). Em trabalhos realizados por Balbuena et al. (2011), essa metodologia resultou na detecção de maior número de spots e maior reprodutibilidade.

Outras abordagens mais modernas estão sendo aplicadas para o estudo da proteômica, tais como *gel-free* (isento de gel), também designada de *shotgun* em que o complexo de frações peptídicas gerados após a digestão proteolítica, pode ser resolvido utilizando diferentes estratégias de fracionamento, oferecendo análise de alto rendimento do proteoma (Abdallah et al., 2012).

Embora esta nova abordagem tenha sido desenvolvida com o intuito de substituir a 2-DE, ambas as plataformas têm a capacidade de resolver diferentes características, e a escolha, muitas vezes, é determinada pela questão biológica e objetivo abordado (Abdallah et al., 2012).

Por não existir um único método que forneça informações qualitativas e quantitativas de todos os componentes de uma mistura complexa proteica, sugere-se que ambas as abordagens tanto a 2-DE e *shotgun* se complementem a fim de uma análise global mais enriquecida, fornecendo uma melhor compreensão das questões biológicas (Abdallah et al., 2012), embora não possa detectar todas as proteínas ao mesmo tempo ou mesmo a maioria das proteínas em um único experimento (Feng et al., 2009).

Todavia, a técnica de eletroforese bidimensional ainda permanece amplamente utilizada. Por exemplo, em um levantamento entre os anos de 2008 a 2013, verificaram a existência de 1037 artigos publicados no *Journal of Proteomics*, destes, 73 artigos eram referentes à análise proteômica de diversas

espécies de plantas (Wu et al., 2014). Dos 73 artigos, 70 foram baseados em 2-DE e apenas 3 usaram o método de gel free (Wu et al., 2014).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material Vegetal

Sementes de *C. legalis* foram obtidas do viveiro Caiçara em Brejo Alegre, São Paulo (21°9'58" S e 50°10'55" W), em novembro de 2013. As sementes foram armazenadas na geladeira a 8°C por um período de três dias antes do início do experimento.

2.2 - Curva de embebição

Para a curva de embebição, utilizaram-se cinco repetições de 10 sementes em cada, que foram recolhidas de dois em dois dias. As sementes foram colocadas em copos de 200 mL de polietileno contendo vermiculita e substrato vegetal (Basaplant®, São Paulo, Brasil, pH 5,8 ± 0,5) na proporção 2:1 e foram mantidos em estufa, com 30% de sombreamento. A irrigação foi realizada duas vezes por dia (de manhã e à tarde). Para a estimativa de matéria fresca (MF), as sementes foram pesadas a cada dois dias até o 12º dia de embebição. Depois disso, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel e armazenadas na

câmara de circulação de ar forçado a 70°C durante um período de 24h para completar a desidratação e para a obtenção de matéria seca (MS) e dos valores de conteúdo de água (CA).

2.3 - Germinação de sementes

As sementes de *C. legalis* foram submetidas a um teste de germinação, a fim de estabelecer os dias de coleta durante a germinação. Durante este período, as sementes foram observadas diariamente (Figura 5A). Para os testes de germinação, as sementes foram colocadas em copos de 200 mL de polietileno contendo vermiculita e substrato vegetal (2:1) e foram mantidos em estufa, com 30% de sombreamento. A irrigação foi realizada duas vezes por dia (manhã e noite). As amostras foram coletadas em (dia 0 - sementes maduras) e após 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias.

2.4 - Extração de proteínas

As sementes foram enxaguadas em água Milli-Q e os tegumentos removidos. O experimento foi realizado utilizando-se três repetições biológicas para cada dia avaliado. Para cada amostra biológica obtida foi utilizado 100 mg de MF, que foi macerado em nitrogênio líquido. Para a análise proteômica foram considerados os dias 0, 4, 8 e 10 dias de embebição da semente.

Para a extração de proteínas, a metodologia utilizada foi a descrita por Balbuena et al. (2011). O material pulverizado foi ressuspensão em tampão de extração contendo 7M de ureia, 2M de tiourea, 1% de ditioneína (DTT) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) 2% de Triton-X100 (todos da GE Healthcare, Freiburg, Alemanha) 1 mM de fluoreto fenilmetanossulfonil (PMSF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), e 5 µM de pepstatina (Sigma-Aldrich). As amostras foram agitadas durante 5 min à temperatura ambiente e centrifugada durante 20 min a 16.000 g, a 4°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e quantificados utilizando 2D Quant Kit (GE Healthcare).

2.5 - Eletroforese Bidimensional (2-DE)

Para a eletroforese bidimensional, 700 µg de proteínas de cada triplicata foram precipitados overnight em cinco volumes de acetato de amônio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), 0,1 M com metanol (Merck, Darmstadt, Germany) a -20°C. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g e os *pellets* obtidos foram lavados duas vezes com acetato de amônio e uma vez com acetona gelada (Merck) e 20 mM DTT (Bio-Rad).

As amostras dos pellets foram diluídas em 350 µL com um tampão de reidratação constituído de 7M ureia, 2M tioureia, 2% de CHAPS (GE Healthcare), 0,5% de tampão IPG (pH 3-10) (GE Healthcare), 1% de DTT e 0,002% de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich). As amostras foram inseridas em strips de IPG de 18 cm, pH 3-10 (GE Healthcare). A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada em aparelho Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) à temperatura de 20°C. A IEF consistiu de uma etapa de reidratação de 12h seguida de mais cinco etapas: (1) 500V por 1h; (2) 1.000V por 45min; (3) 8.000V por 1h45min; (4) 8.000V por 2h30min e; (5) 1.000V por 6h.

Após a IEF, as amostras foram reduzidas por 15 minutos em uma solução de equilíbrio (1,5M Tris-HCl (GE Healthcare), a pH 8,8, composta de 6M ureia, 30% de glicerol (Sigma-Aldrich), 2% dodecil sulfato de sódio (Sigma-Aldrich), 125 mM de DTT e 1% azul de bromofenol (Sigma-Aldrich), sendo as amostras posteriormente alquiladas em solução de equilíbrio contendo 125 mM de iodoacetamida (GE Healthcare).

A segunda dimensão foi obtida por meio de desnaturação em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). A separação foi efetuada em corrente constante de 25mA por gel em um sistema vertical Protean II Xi system (BioRad, Richmond, USA). Após obtenção da segunda dimensão, os géis foram fixados por uma hora em solução contendo 40% de etanol e 10% de ácido acético. Em seguida, os géis passaram por uma etapa de lavagem e coloração com corante Coomassie (0,1% de Coomassie brilhante blue G250, 1,2% de ácido ortofosfórico (85%) e 10% de sulfato de amônio) de acordo com o descrito por Neuhoff et al. (1985).

2.6 - Análise dos géis

Os géis bidimensionais (2-DE) foram digitalizados com auxílio do aparelho Image Scanner III (GE Healthcare) e analisados no programa de imagens Master Platinum 7.0 (GE Healthcare), o que possibilitou a detecção, quantificação relativa e comparação dos spots obtidos entre os diferentes géis analisados. A calibração do scanner foi realizada conforme instruções do fabricante.

A autenticidade e o contorno de cada spot foram automaticamente determinados e validados por inspeção visual e edição, quando necessário. Foram utilizadas três corridas em gel para cada amostra, representando três repetições biológicas para avaliação do número de spots detectados e da resolução dos géis obtidos. O alinhamento entre os géis de cada repetição foi realizado automaticamente utilizando três spots de referência, seguindo-se uma inspeção manual e correção de imagens quando necessário. A abundância relativa de cada spot foi determinada por meio da divisão dos valores do volume de cada spot pela soma dos valores do volume total dos spots, de forma a obter o volume relativo individual de cada spot (% vol). Os spots que mostraram reprodutibilidade foram considerados para identificação de proteínas. Diferenças na expressão de proteínas foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $P \leq 0,05$ e para spots que mostraram mudança no nível de expressão por pelo menos duas vezes nos períodos de tempo avaliados.

2.7 - Digestão da tripsina

Spots que apresentavam alterações em sua expressão por mais de duas vezes foram excisados e descoloridos de acordo com o protocolo preconizado por Vale et al. (2014). Em seguida, estes spots foram secados em vácuo a 30°C em aparelho CentriVap (Labcomo, Kansas, MO, USA). Os spots foram diferidos por adição de 15 μ L de solução de tripsina (33 ng/ μ L; V5111, Promega, Madison, WI, USA) preparados em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 60 min em gelo.

Posteriormente, os spots foram incubados em Thermomixer® (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 58°C por 30 min. Logo após, foram adicionados às

amostras 1 μL de ácido trifluoracético 5% (TFA, Sigma-Aldrich), 30 μL de ácido fórmico 5% (Sigma-Aldrich), e 50% (v/v) de acetonitrila (Sigma-Aldrich), seguido de um vortéx de 20s, ultrassonificação de 10 min, e outro vortéx de 20s. Este procedimento foi repetido por duas vezes. As amostras foram concentradas até 10 μL em CentriVap® (Labconco, Kansas, MO, USA) por 5 min, dessalinizadas em ZipTip C18 (Millipore, Billerico, MA, USA) e transferidas para “Vials” (Waters).

2.8 - Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Para análise por espectrometria de massas, utilizou-se um aparelho nanoAcquity UPLC conectado a um espectrômetro de massas modelo Synapt G2-Si HDMS (Waters, Manchester, UK). Para análises ESI-LC-MS/MS utilizou-se um BEH 130 C18 1,7 μm (100 μm \times 100 mm) a uma taxa de fluxo de 500 nL/min. Para eluição dos peptídeos, um gradiente binário foi usado, em que a fase A consistia em água (Tedia, Fairfield, Ohio, USA) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich) e a fase B consistia de acetonitrila (Sigma-Aldrich) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich). O gradiente iniciou-se em 7-40% B em 0-33.21 min; 40-85% B em 33.21-37.21 min; 85-85% B em 37.21-41.21 min; 85-7% B em 41.21-43.21. As análises foram realizadas em positivo e em modo de resolução, em modo independente de aquisição de dados (DIA).

A transferência de energia de colisão subiu de 20 V para 35 V, no modo de alta energia; com um pico de tensão capilar de 30 V e 2800 V, respectivamente, e temperatura de fonte de 60°C. As taxas de varredura para aquisição dos espectros foram ajustadas para 0,5. O [Glu1]-fibrinopeptídeo B humano (Sigma-Aldrich) a 100 fmol/ μL foi usado como um calibrador externo. O processamento dos espectros e a busca em banco de dados foram efetuadas pelo ProteinLynx Global Service v.3.02 (PLGS, Waters), com os seguintes parâmetros: Mínimo de fragmentos de íons por peptídeo: 2, Mínimo de fragmentos de íons por proteína: 5 e Mínimo de peptídeos por proteínas: 1, Clivagens perdidas: 1, Modificação fixa Carbamidometil C e Modificação variável modificação M. Foram utilizados os bancos de dados de proteínas da Asterids (289,542 sequências), Eudicotyledons (1.333,548 sequências), e Viridiplantae (3.301,171 sequências). A classificação funcional foi realizada utilizando o programa Blast2Go v.3.0 (Conesa et al., 2005) e UniProtKB (<http://uniprot.org>).

3 - RESULTADOS

3.1- Germinação de sementes

A germinação das sementes de *C. legalis* iniciou-se no 8º dia após embebição (Figura 5A). Durante a germinação, observou um padrão trifásico de absorção de água (Figura 1B). A primeira fase, também conhecida como fase inicial de absorção de água, se caracterizou por uma rápida absorção de água até o fim do 2º dia (Figura 5B). A fase II caracterizou-se por uma redução na taxa de embebição de água, iniciando-se no 2º dia até o 8º, quando se deu início a emissão de raízes (Figura 5B). Este evento marca o início da fase III, caracterizado pelo aumento contínuo de absorção de água e pelo crescimento do embrião até o 12º dia (Figura 5B).

A MS se manteve constante durante todo o período de embebição (Figura 5B), enquanto a MF demonstrou um pequeno aumento na fase I, se mantendo inalterada na fase II, e apresentou um novo acréscimo durante o a fase III (Figura 5B). O conteúdo de água aumentou durante os primeiros dias de embebição, mantendo-s constante durante a fase II e apresentando um aumento significativo a partir do 8º dia (Figura 5B).

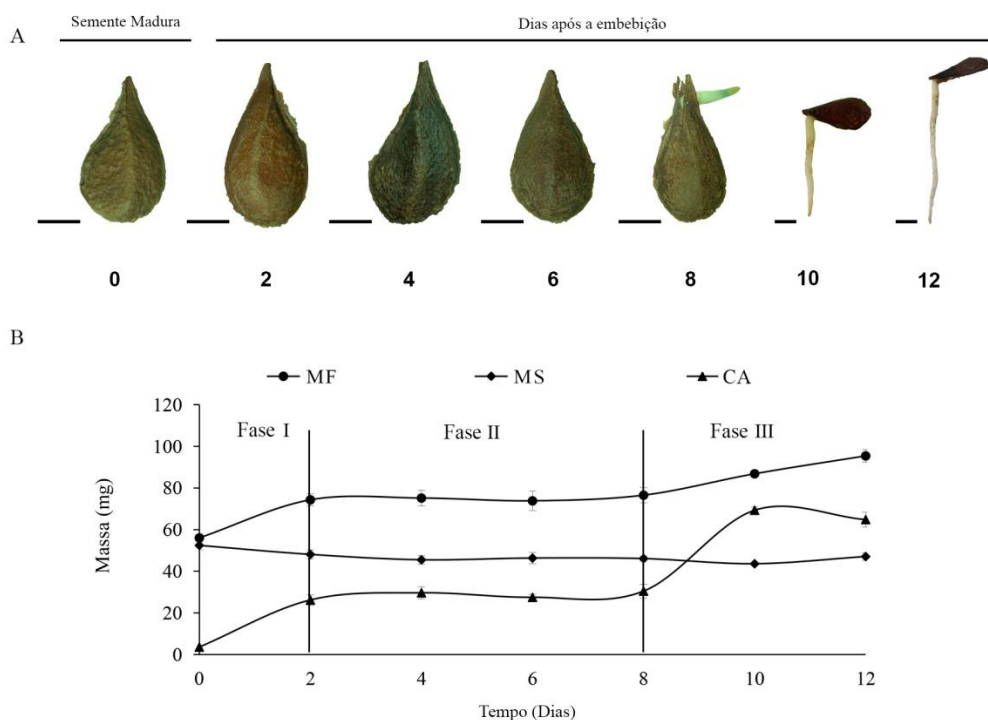


Figura 5. Características das sementes durante a germinação. A) Mudanças morfológicas para os sete estágios de germinação (0 semente quiescente, 2, 4, 6, 8, 10, 12 dias de embebição) B) Curva de embebição nas três fases de absorção de água. MF (matéria fresca), MS (matéria seca) e CA (conteúdo de água).

3.2- Análise proteômica durante a germinação das sementes de *Cariana legalis*

O mapa 2-DE da análise comparativa revelou um total de 103 spots com expressão diferenciada entre os tempos 0, 4, 8 e 12 dias de embebição (Figura 6), sendo 70 desses spots identificados com sucesso via análise MS/MS (Tabela 1).

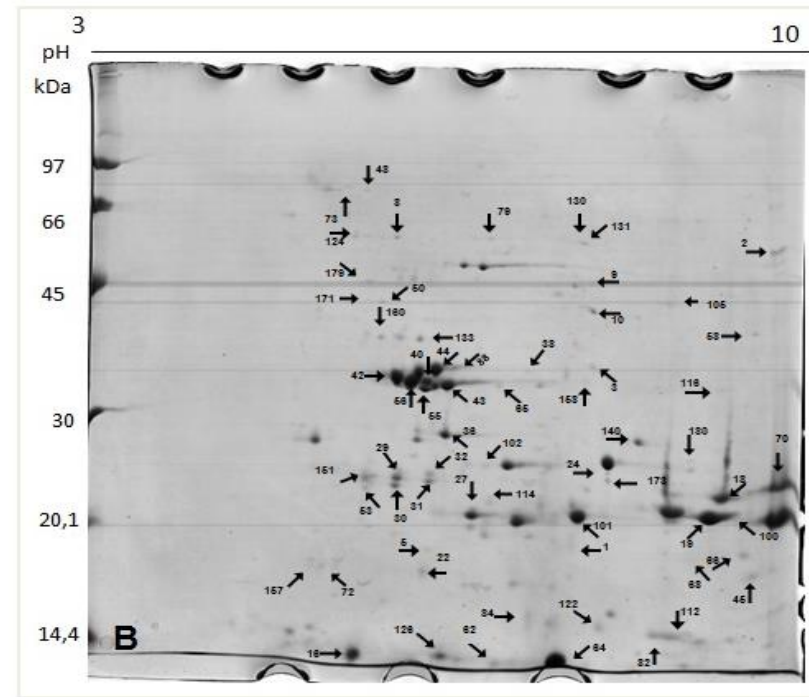
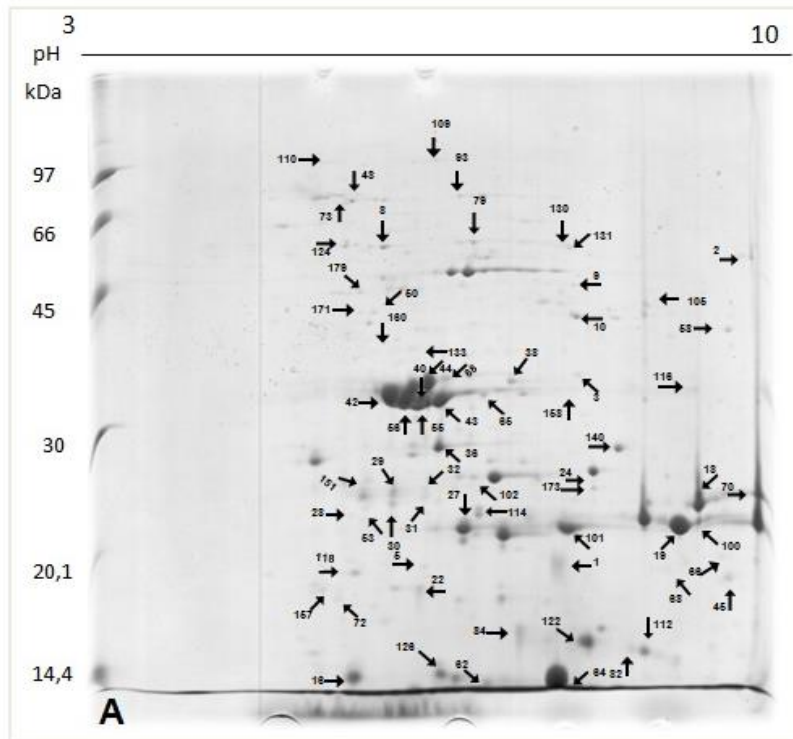


Figura 6. Mapa de referência da germinação de sementes de *C. legalis* por gel de eletroforese bidimensional (2-DE). Em sementes quiescentes (A), e após 4 (B), 8 (C), e 12 (D) dias de embebição. A protrusão da raiz ocorreu aos 8 dias de embebição.

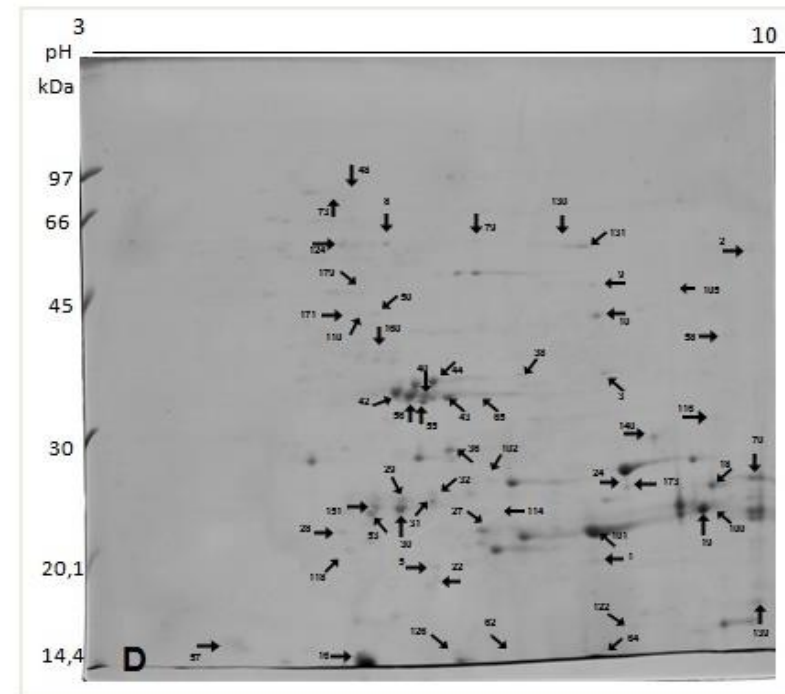
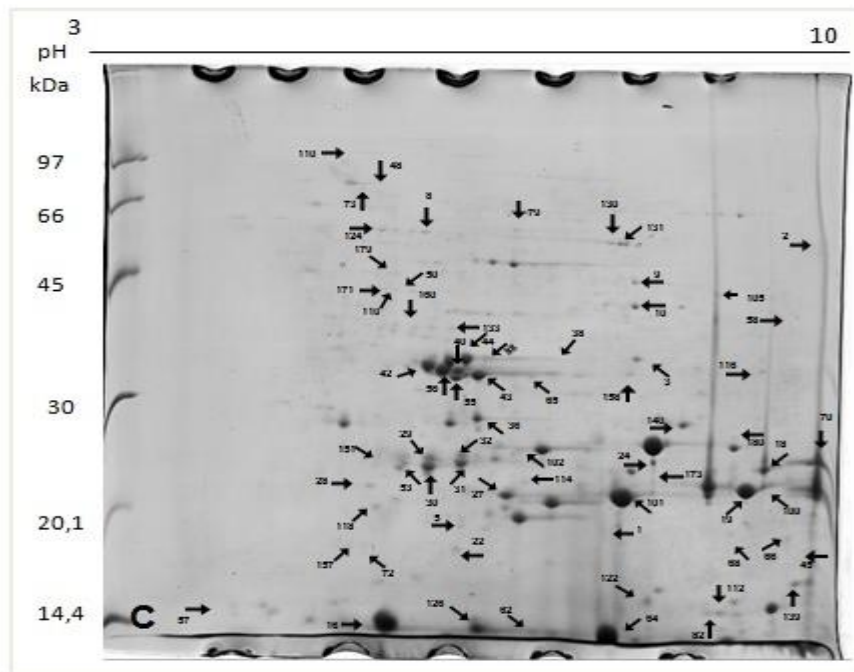


Figura 6. Mapa de referência da germinação de sementes de *C. legalis* por gel de eletroforese bidimensional (2-DE). Em sementes quiescentes (A), e após 4 (B), 8 (C), e 12 (D) dias de embebição. A protrusão da raiz ocorreu aos 8 dias de embebição.

Tabela 1. Proteínas expressas diferencialmente identificadas por espectrometria de massas em sementes de *C. legalis*.

Spot ^a	Número de acesso ^b	Nome da proteína e espécie	Function ^c	Cobertura (%) ^d	Número de Pept ^e	Score ^f	Teórico/Exp ^g MW	Teórico/Exp. ^h pI	Abundância Dias de Germinação ⁱ
00	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	15,3	30/22	2007	52263/20908	6,1/7,73	
18	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	7,1	30/05	403,1	52263/24942	6,1/9,53	
19	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	11,2	30/47	1079,2	52263/22789	6,1/9,3	
29	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	14,4	30/11	713,7	52263/28192	6,1/6,05	
30	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	14	30/10	269,6	52263/24576	6,1/6,02	
31	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	5,6	30/03	55	52263/24799	6,1/6,31	
32	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	6	30/04	264,8	52263/25313	6,1/6,30	
40	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	12,7	30/05	303,6	52263/33394	6,1/6,23	
42	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	11,6	30/11	449	52263/34294	6,1/5,95	

Tabela 1 (Cont.)

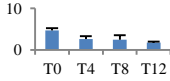
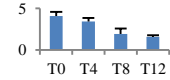
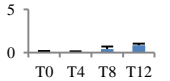
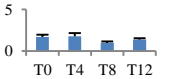
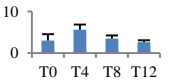
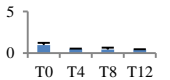
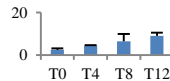

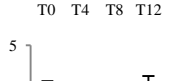
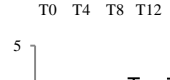
Spot ^a	Número de acesso ^b	Nome da proteína e espécie	Function ^c	Cobertura (%) ^d	Número de Pept ^e	Score ^f	Teórico/Exp ^g MW	Teórico/Exp. ^h pI	Abundância Dias de Germinação ⁱ
43	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	23,4	30/28	2993,1	52263/33311	6,1/6,50	
44	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	14,6	9/2	221	52263/34956	6,1/6,35	
53	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	8,2	30/14	229,3	52263/24216	6,1/5,77	
55	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	26,7	30/30	5292,2	52263/32276	6,1/6,23	
56	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	17,2	30/14	5173,3	52263/32735	6,1/6,08	
100	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	8,6	6/12	609	52263/22939	6,1/9,5	
01	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	23	64/18	1748,9	52263/22035	6,1/7,95	
151	Q84ND2	11 S Globulin (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	9,5	6/13	1200,3	52263/25923	6,1/5,81	
45	U5FE66	Legumin family protein (<i>Populus trichocarpa</i>)	Storage protein	2,4	42/1	1390,5	55935/17755	6,2/9,62	
39	U5FE66	Legumin family protein (<i>Populus trichocarpa</i>)	Storage protein	2,4	32/2	1703,4	55935/20517	6,2/6,32	

Tabela 1 (Cont.)

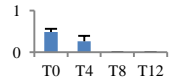
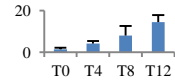
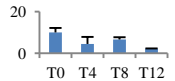
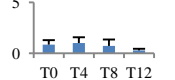
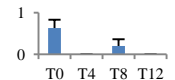
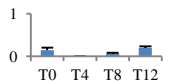
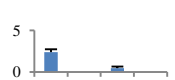
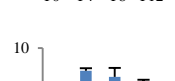
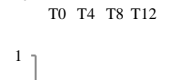
Spot ^a	Número de acesso ^b	Nome da proteína e espécie	Function ^c	Cobertura (%) ^d	Número de Pept ^e	Score ^f	Teórico/Exp ^g MW	Teórico/Exp. ^h pI	Abundância Dias de Germinação ⁱ
84	2SS1	2S sulfur-rich seed storage (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	21,9	30/10	587,8	16898/16228	5,9/7,44	
16	B6EU54	2 Albumina (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	5,5	12/06	163,2	16743/14205	6,3/5,75	
64	B6EU54	2 Albumina (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	5,5	14/9	352,7	16743/13948	6,3/7,7	
122	B6EU54	2 Albumina (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Storage protein	10,3	12/13	320,1	16743/15630	6,38,29	
2	Q3LUM6	Elongation factor 1-alpha (<i>Daucus carota</i>)	Biosynthetic process/ Cellular biosynthetic process	11,6	42/18	3179,5	49270/54178	9,5/9,95	
109	A0A059BNB6	Elongation factor 2 (<i>Eucalyptus grandis</i>)	Anatomical structure development/ Biosynthetic process/ Cellular biosynthetic process	12,2	10/8	233,2	93924/107103	5,8/ 6,51	
57	S8D236	GTP-binding protein chloroplastic short (<i>Genlisea aurea</i>)	Seed development/Seed germination/Anatomical structure development	2,6	14/4	642,2	63481/12983	4,9/4,10	
70	A0A022Q305	GTP-binding protein chloroplastic short (<i>Erythranthe guttata</i>)	Seed development/Seed germination/Anatomical structure development	1,8	49/3	399,3	49324/26766	5,9/9,83	
72	S8D236	GTP-binding protein chloroplastic short (<i>Genlisea aurea</i>)	Seed development/Seed germination/Anatomical structure development	2,8	43/5	435,5	63481/19075	4,9/5,53	

Tabela 1 (Cont.)

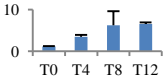
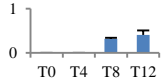
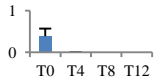
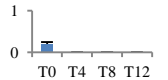
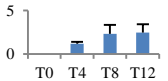
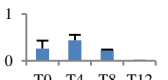
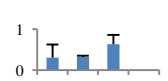
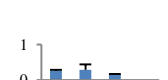
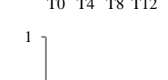
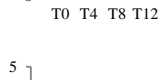
Spot ^a	Número de acesso ^b	Nome da proteína e espécie	Function ^c	Cobertura (%) ^d	Número de Pept ^e	Score ^f	Teórico/Exp ^g MW	Teórico/Exp. ^h pI	Abundância Dias de Germinação ⁱ
24	A0A022Q305	GTP-binding protein chloroplastic short (<i>Erythranthe guttata</i>)	Seed development/Seed germination/Anatomical structure development	1,8	32/3	457,7	49324/26417	5,9/8,32	
118	S8D236	GTP-binding protein chloroplastic short (<i>Genlisea áurea</i>)	Seed development/Seed germination/Anatomical structure development	2,8	2/3	450,8	63481/19870	4,9/5,42	
82	M1BAZ1	Hydroxyisobutyryl-hidrolase-like protein (<i>Solanum tuberosum</i>)	Biosynthetic process/Oxidation-reduction process	5,8	30/2	91,9	38898/15313	5,5/8,78	
93	M1BAZ1	Hydroxyisobutyryl-hidrolase-like protein (<i>Solanum tuberosum</i>)	Biosynthetic process/Oxidation-reduction process	5,8	16/2	126,4	38898/73038	5,5/6,76	
126	M1BAZ1	Hydroxyisobutyryl-hidrolase-like protein (<i>Solanum tuberosum</i>)	Biosynthetic process/Oxidation-reduction process	5,8	42/3	165,7	38898/13779	5,5/6,30	
58	A0A023M644	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (<i>Comastoma pendunculatum</i>)	Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process/ Oxidation-reduction process/ Cellular biosynthetic process	18,9	13/1	955,8	22575/22575	5,2/5,2	
62	B6GUQ5	Ribulose-1,5- bisphosphate-carboxylase (Fragment) (<i>Acranthera</i> sp.)	Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process/ Oxidation-reduction process/ Cellular biosynthetic process	21,2	12/2	1882,9	51601/51601	5,9/5,9	
65	A0A023M644	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (<i>Comastoma pedunculatum</i>)	Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process/ Oxidation-reduction process/ Cellular biosynthetic process	18,9	13/01	663,1	22575/33228	5,2/7,02	
79	C6ZQ11	Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxigenase large subnit (<i>Barringtonia asiática</i>)	Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process/ Oxidation-reduction process/ Cellular biosynthetic process	19,3	30/9	3573,4	51721/51721	7,4/7,4	
112	B9T055	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain (<i>Ricinus communis</i>)	Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process/ Oxidation-reduction process/ Cellular biosynthetic process	10	17/2	181,4	20302/15157	8,9/8,9	

Tabela 1 (Cont.)

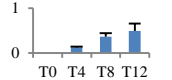
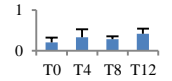
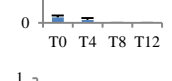
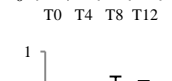
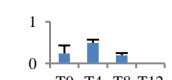
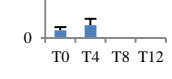
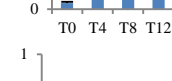
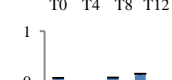


Spot ^a	Número de acesso ^b	Nome da proteína e espécie	Function ^c	Cobertura (%) ^d	Número de Pept ^e	Score ^f	Teórico/Exp ^g MW	Teórico/Exp. ^h pI	Abundância Dias de Germinação ⁱ
131	C3S8M6	Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>Codonopsis lanceolata</i>)	Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process/ Oxidation-reduction process/ Cellular biosynthetic process	31,7	21/4	21143,8	50816/50816	6,3/6,3	
5	D2T0E3	Cytosolic class I small heat shock protein type 1 (<i>Rhododendron mariesii</i>)	Protein folding	34	13/11	847,6	16263/20517	5,2/6,32	
73	V5K655	Heat shock protein 70 (<i>Capsicum annuum</i>)	Protein folding	12,1	8/8	8421,1	71496/78496	5/5,38	
10	D0VFU1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>Panax ginseng</i>)	Carbohydrate metabolic process/ Oxidation-reduction process	49,8	20/32	59255,5	23276/41481	5,6/8,09	
140	D0VFU1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>Panax ginseng</i>)	Carbohydrate metabolic process/ Oxidation-reduction process	12	30/2	104,5	23276/29127	5,6/8,47	
66	A0A072V5F9	Polygalacturonase inhibitor protein (<i>Medicago truncatula</i>)	Biological regulation	4,9	32/2	1578,4	24215/19425	8,5/9,75	
173	A0A022Q2J0	Polygalacturonase (<i>Erythranthe guttata</i>)	Biological regulation	5,2	21/2	77	43321/23920	8,9/8,31	
3	P52406	Endochitinase 4 (<i>Solanum tuberosum</i>)	Cell wall organization or biogenesis/ Carbohydrate metabolic process	4,6	18/02	1087,6	32296/35072	8,1/8,1	
158	Q5W116	Putative endochitinase B (fragment) (<i>Nicotiana glauca</i>)	Carbohydrate metabolic process/ Cell wall organization or biogenesis	19	18/4	1190,8	15495/32277	8,4/7,91	
171	A0A022R0N2	Phosphoglycerate kinase (<i>Erythranthe guttata</i>)	Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process	19,6	27/14	3647,9	45766/43133	5,7/5,72	

Tabela 1 (Cont.)

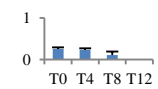
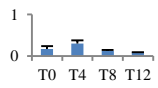
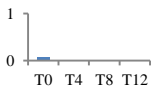
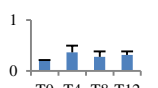
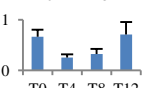
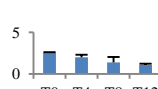

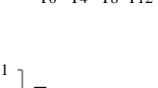
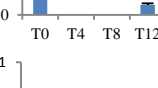
Spot ^a	Número de acesso ^b	Nome da proteína e espécie	Function ^c	Cobertura (%) ^d	Número de Pept ^e	Score ^f	Teórico/Exp ^g MW	Teórico/Exp. ^h pI	Abundância Dias de Germinação ⁱ
50	A0A022R0N2	Phosphoglycerate kinase (<i>Erythranthe guttata</i>)	Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process	17,2	33/11	6088,9	45766/45766	5,7/5,7	
179	Q42961	Phosphoglycerate kinase chloroplastic (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process	20,2	49/6	824,4	50145/45891	8,7/5,71	
110	A0A061GYB4	ATPase, AAA-type, CDC48 protein (<i>Theobroma cacao</i>)	Biological regulation/ Anatomical structure development/ Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process/ Anatomical structure morphogenesis/ Cellular biosynthetic process	14,4	21/12	729,7	89452/110036	4,9/5,41	
124	S8C857	ATP synthase subunit beta (<i>Genlisea aurea</i>)	Biosynthetic process/ Cellular biosynthetic process	24,5	6/12	3134,3	57022/57762	6,2/5,58	
8	P26300	Enolase (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process/ Cellular biosynthetic process	22,5	35/15	16801,5	47768/47768	5,6/5,6	
27	F2VYC9	Beta-hydroxyacyl-ACP (<i>Helianthus annuus</i>)	Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process/ Cellular biosynthetic process	18,9	16/03	682,2	25096/22492	8,9/6,76	
36	A0A078FB80	Glutathione S-transferase (<i>Brassica napus</i>)	Biological regulation/ Anatomical structure development/ Biosynthetic process/ Oxidation-reduction process/ Cellular biosynthetic process	5,1	15/01	826	26675/28209	5,1/6,47	
38	Q9FZ42	Glucose and ribitol dehydrogenase homolog 1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Oxidation-reduction process	20,5	24/16	7979,5	31367/34322	6,1/7,34	
48	M1D2V1	tRNA pseudouridine synthase (<i>Solanum tuberosu</i>)	Cellular biosynthetic process/ Biological regulation/ Cell wall organization or biogenesis/ Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process	17	18/02	115,7	26454/76921	7,2/5,67	

Tabela 1 (Cont.)

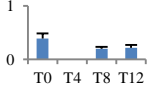
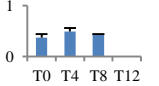
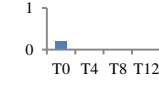
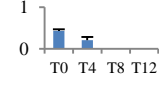
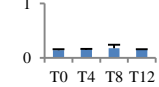
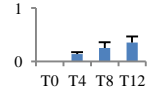
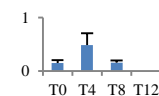
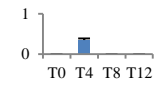
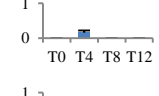
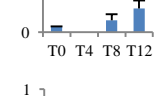
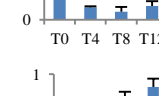
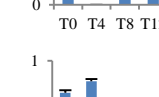
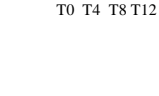
Spot ^a	Número de acesso ^b	Nome da proteína e espécie	Function ^c	Cobertura (%) ^d	Número de Pept ^e	Score ^f	Teórico/ Exp. ^g MW	Teórico/ Exp. ^h pI	Abundância Dias de Germinação ⁱ
68	B1PDK0	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (<i>Capsicum annuum</i>)	Protein folding	27,9	8/8	3570,4	18114/20133	8,5/9,20	
102	Q6DV41	Superoxide dismutase (<i>Camellia sinensis</i>)	Aerobic respiration/ Seed development/Seed germination/ Anatomical structure development/ Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process/ Reactive oxygen species metabolic process/ Oxidation-reduction process	16,5	69/4	15975,6	18114/20133	8,5/9,20	
105	A8Y7H5	Aspartate aminotransaminase (<i>Sideroxylon persimile</i>)	Root morphogenesis/root hair cell differentiation, development, elongation/ Anatomical structure development/ Biosynthetic process	32,5	21/12	3700,1	8468/44259	9,2/8,90	
114	A0A059PRI4	MYB related transcription factor (<i>Salvia miltiorrhiza</i>)	Cellular biosynthetic process/ Biological regulation/ Cell wall organization or biogenesis/ Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process	4,8	49/1	455,7	19526/23472	9,2/6,95	
116	A0A077D0A9	Voltage -dependent anion channel (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Biological regulation/ Biosynthetic process/ Oxidation-reduction process/ Cellular biosynthetic process/ Aerobic respiration/ Seed development/Seed germination	9,8	12/11	1304,6	29483/34095	6,7/9,5	
130	A0A061FL99	Catalase (<i>Theobroma cacao</i>)	Reactive oxygen species metabolic process/ Oxidation-reduction process	11,2	24/4	808,3	56906/50594	7,0/7,81	

Tabela 1 (Cont.)

Spot ^a	Número de acesso ^b	Nome da proteína e espécie	Function ^c	Cobertura (%) ^d	Número de Pept ^e	Score ^f	Teórico/Exp ^g MW	Teórico/Exp. ^h pI	Abundância Dias de Germinação ⁱ
133	I1U4K8	Malate dehydrogenase (<i>Rhododendrom micranthum</i>)	Oxidation-reduction process/ Aerobic respiration/ Biosynthetic process/ Carbohydrate metabolic process	19	2/18	7719	35582/37950	6,4/6,33	
160	B9RET4	Cysteine synthase (<i>Ricinus communis</i>)	Cysteine biosynthetic process from serine	7,7	12/2	560	34321/37569	5,3/5,78	
180	D7UQM2	Flavanone-3-beta- hydroxylase (<i>Lactuca sativa</i>)	Biosynthetic process/ Oxidation-reduction process	19,6	11/2	117,1	18985/26456	5,7/9,17	
9	A5BXL8	Thiolase (<i>Vitis vinifera</i>)	Biological regulation/ Biosynthetic process/ Oxidation-reduction process/ Cellular biosynthetic process	8,7	31/2	141,9	48588/46132	7/8,11	
22	A0A022Q0D3	Kaurene synthase-like 1(<i>Erythranthe guttata</i>)	Biosynthetic process/ Cellular biosynthetic process	0,9	70/2	66,2	89889/19140	5,4/6,28	
28	A0A022S0T2	Protein translocase (<i>Erythranthe guttata</i>)	Response to stress, response to carbohydrate, protein transport	7	13/5	2011,2	17928/23959	6,2/5,65	
88	A0A022RUY1	Peroxidase 24 short (<i>Erythranthe guttata</i>)	Root morphogenesis/root hair cell diferentiation, development, elongation/ Biological regulation/ Cell wall organization or biogenesis/ Anatomical structure development/ Biosynthetic process	6,6	30/1	141,4	21383/34885	8,7/6,55	

^a Número de spot correspondente ao número indicado na Figura 6.

^b Número de acesso do ProteinLynx Global Service usando o banco de dados de proteínas Asterídeas, Eudicotiledônea e Vitidiplantae

^c Classificação funcional das proteínas usando Blast2go (www.blast2go.com).

^d Predição da porcentagem de sequência de proteína coberta pelo ProteinLynx Global Service.

^e Número de sequências de peptídeos únicos identificados pelo ProteinLynx Global Service.

^f Score a partir ProteinLynx Global Service.

^g Massa relativa de proteína teórica e experimental por Image Master and ProteinLynx Global Service.

^h Ponto isoelétrico (pI) teórico e experimental por Image Master and ProteinLynx Global Service.

Dessas proteínas identificadas, 32 foram comuns aos 4 dias de avaliação. Adicionalmente, 5 proteínas foram observadas somente no dia 0 e 2 proteínas foram observadas unicamente no 4º dia de embebição. Representação gráfica do percentual médio de volume (%vol) de cada spot consta-se na Tabela 1.

A classe mais representativa de proteínas estava ligada a processos biosintéticos (15%), seguidos por processos de biossíntese celular (14%), proteínas de reserva (14%), processos de oxidação-redução (12%), desenvolvimento de estruturas anatômicas (7%), regulação biológica (5%), além de outras funções (17%) e de proteínas não classificadas (5%) (Figura 7).

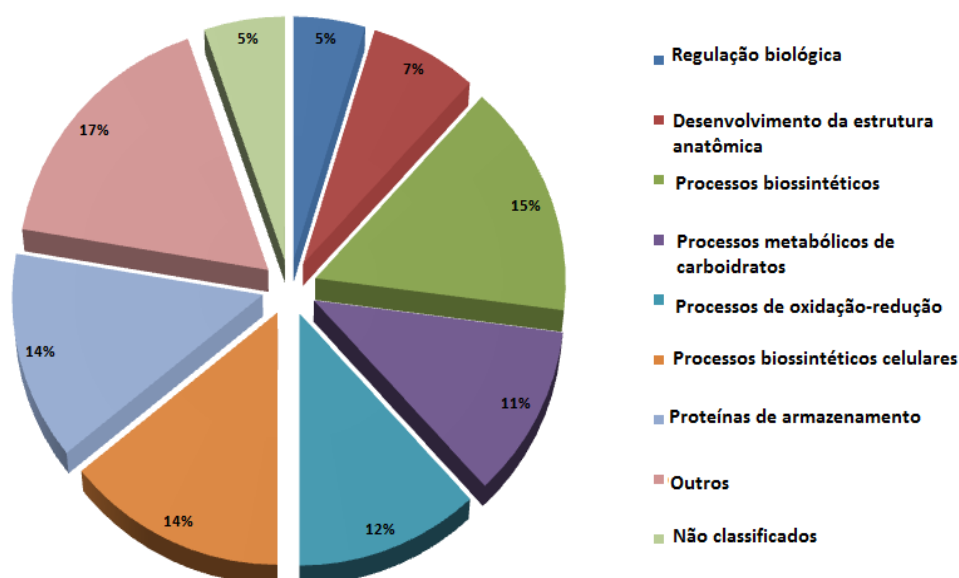


Figura 7. Classificação funcional das proteínas identificadas em sementes de *C. legalis* durante a germinação.

A análise proteômica da germinação de *C. legalis* foi realizada aos 0, 4, 8 e 12 dias de embebição das sementes, e os resultados são discutidos com base na classificação funcional das proteínas diferencialmente expressas.

4 - DISCUSSÃO

4.1- Germinação de sementes

A absorção de água é a primeira e principal etapa da germinação em sementes. As sementes de *C. legalis* demonstraram um modelo de embebição trifásico durante o processo de germinação (Figura 5B), conforme estabelecido por (Bewley, 1997) e observado em outras espécies florestais, como em *Cedrela fissilis* (Aragão et al., 2015).

A reativação do metabolismo, conhecido como fase I da germinação, é uma fase rápida que depende do gradiente de potencial de água entre as sementes e o ambiente. O processo é basicamente físico, em que o conteúdo de água nas sementes alcança certo nível. Esta fase também é caracterizada por uma rápida elevação no processo respiratório, proporcional ao aumento da hidratação dos tecidos da semente (Castro et al., 2004).

Na etapa seguinte, ocorre uma redução nas taxas de embebição de água e uma estabilização na atividade respiratória, caracterizando assim a fase II. Neste estágio, os processos metabólicos essenciais para o crescimento do embrião são intensificados e a germinação é completada com a emissão da radícula, o que inicia a fase III (Castro et al., 2004). Neste estágio, a absorção de água tende a ser maior, ocorrendo um segundo aumento na atividade respiratória. Este processo está associado com uma maior disponibilidade de oxigênio no ambiente

devido à ruptura do tegumento ocasionada pela emergência da radícula e o crescimento da plântula (Bewley, 1997).

O estudo da curva de embebição de sementes é necessário porque permite conhecer a permeabilidade do tegumento, possibilitando a aplicação de tratamento de pré-hidratação, visando favorecer a germinação (Castro et al., 2004).

Entretanto, a duração de cada fase da germinação depende da característica de cada espécie, das características intrínsecas da semente, como a quantidade de compostos hidratados e a permeabilidade da água e/ou do oxigênio no tegumento (Bewley, 1997).

Este padrão trifásico ocorre somente em sementes com condições adequadas para germinação. Assim, as sementes de *C. legalis* mostram-se aptas para experimentos de germinação, apresentando boa absorção de água e dispensando tratamentos pré-germinação, o que contribui para que haja o mínimo de interferência nas sementes utilizadas para estudos de proteômica.

4.2- Análise proteômica durante a germinação

As proteínas são moléculas importantes na germinação de sementes, uma vez que elas tomam parte de uma série de processos, tais como reações de catabolismo envolvendo a degradação de substâncias de reserva para geração de energia, e reações anabólicas, tais como a produção de novas organelas e células para o crescimento do embrião.

Neste estudo, utilizou-se a abordagem proteômica para ampliar a compreensão sobre a germinação de *C. legalis*, uma espécie nativa da Mata Atlântica sob ameaça de extinção.

Foram realizados estudos de proteômica comparativa durante a germinação de *C. legalis*, e estes resultados foram discutidos com base na classificação funcional das proteínas diferencialmente expressas (Figura 7, Tabela 1).

4.2.1- Proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos

O metabolismo dos carboidratos tem profundos efeitos sobre o desenvolvimento, porque, além de funcionar como fonte de energia, pode atuar

como marcador no controle de diferentes aspectos do desenvolvimento vegetal (Eveland e Jackson, 2012). Vinte proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos foram identificadas neste trabalho, entre elas diversas proteínas importantes na produção de energia durante a germinação, incluindo a ATP sintase (spot 124), GAPDH (spot 114), enolase (spot 8), e a fosfoglicerato quinase (179), presentes em todo o processo de germinação.

A proteína gliceraldeído 3-fosfato deidrogenase (GAPDH), uma enzima chave na glicólise cataliza a primeira etapa na via de conversão do D-gliceraldeído 3-fosfato (G3P) em 3-fosfo-D-glicerol fosfato, foi detectada em dois spots (10 e 140) e teve sua maior abundância 12 dias após embebição. A enolase (spot 8), proteína chave para o metabolismo dos carboidratos também esteve presente ao longo da germinação de *C. legalis*. Estes resultados demonstram a alta demanda de energia requerida para germinação de *C. legalis*.

O ATP está relacionado à produção de energia na via glicolítica, fornecendo fosfato para o processo de degradação da glicose, em seguida, se convertendo em ADP (Banks et al., 1979). A síntese de moléculas de ATP é mediada pela ação da enzima ATP sintase (spot 124) e pode ser sintetizada durante as fases iniciais da embebição, sendo também um produto de vias de fermentação (Raymond et al., 1985). A ATP sintase (spot 124) (Tabela 1) esteve presente no início da germinação (dia 0), corroborando Bewley (1997), que afirma que as enzimas necessárias para a retomada das atividades metabólicas estão presentes em sementes secas.

Em sementes secas, as atividades mitocondriais são baixas, e uma das primeiras mudanças que ocorre nos primeiros estágios da germinação é a retomada da atividade respiratória (Yang et al., 2007). O canal de ânion dependente de voltagem (VDAC) (spot 116), também conhecido como porinas, é o maior canal na membrana externa das mitocôndrias, tendo importância no funcionamento desta organela (Shoshan-Barmatz et al., 2006). A porina regula o transporte de metabólitos entre a mitocôndria e o citoplasma e é a proteína mais abundante na membrana externa das mitocôndrias Desagher e Martinou (2000). VDAC esteve presente durante toda a germinação, mas foi mais abundante durante a segunda fase da embebição, fase esta caracterizada de acordo Bewley et al. (2013) em que se verifica grande atividade respiratória e, conseqüentemente, maior atividade mitocondrial.

Outras proteínas, tais como, o aspartato aminotransferase (spot 105), uma importante enzima envolvida no metabolismo do carbono e de nitrogênio (Tabela 1), esteve presente no dia 0.

O aspartato aminotransferase catalisa a síntese de aspartato e do ácido aspártico, participando da síntese de vários aminoácidos. A síntese de aminoácidos é de suma importância para garantir a tradução de proteínas que são essenciais para o desenvolvimento organizacional da germinação de sementes (Dong et al., 2015).

A família das ATPase podem atuar como bomba de prótons, o principal responsável pela redução do pH interno nas células, alterando o potencial de membrana utilizado como fonte de energia na hidrólise de proteínas armazenadas nos tecidos celular de sementes (Maeshima et al., 1994). Esta proteína (spot 110) esteve presente somente no início da germinação (dia 0), demonstrando que a expressão destes genes também é importante em sementes secas de *C. legalis*. Em sementes de tomate, o aumento da expressão de genes que codificam as ATPases em resposta ao tratamento com ácido giberélico (GA) promoveu acidificação da parede celular, facilitando o alongamento das células e uma maior extensão radicular (Obroucheva, 2013).

4.2.2- Proteínas relacionadas a processos de oxidação-redução

Uma importante modificação durante a germinação se refere à modulação do estado de oxidação das proteínas após a embebição das sementes (Alkhalfioui et al., 2007). No início da germinação, o conteúdo de oxigênio é limitado, sendo a energia suprida pela respiração anaeróbica, uma vez que a eficiência do ciclo dos ácidos tricarbóxicos não é altamente eficiente nos estágios iniciais. Entretanto, a atividade respiratória aumenta com o consumo de oxigênio e a liberação de dióxido de carbono é acelerada durante a embebição (Botha et al., 1992).

Para prevenção de danos causados pelo estresse oxidativo aos componentes celulares, as células lançam mão de uma série de mecanismos de desintoxicação por meio da ação de enzimas protetoras como a catalase, peroxidase e superóxido dismutase (Kibinza et al., 2011). Por exemplo, a catalase (spot 130) catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e O_2 , protegendo as células contra efeitos tóxicos deste radical (Willekens et

al., 1995). A catalase esteve presente durante a embebição e foi altamente expressa durante a germinação (Tabela 1). Esta proteína ocorre durante a embebição de sementes, em que há um incremento na atividade mitocondrial, respiração e produção de energia (ATP), favorecendo a germinação (Hite et al., 1999; Demirkaya et al., 2010). A presença da catalase é também um dos fatores que determina a qualidade de sementes, servindo como parâmetro para avaliação de seu potencial germinativo (Prodanović et al., 2007).

A flavanona-3-beta- hidroxilase (spot 180) é utilizada para a produção de flavonoides e antocianinas (Pelletier e Shirley, 1996). Flavonoides são metabólitos secundários que estão presentes em altos níveis nas sementes de muitas espécies vegetais (Shirley, 1998). Durante a germinação, ocorre o aumento da atividade antioxidante, em que os flavonoides protegem o embrião contra danos oxidativos. Além disso, flavonoides atuam impedindo a ação de radicais livres, tais como espécies reativas de oxigênio (ROS) (Bais et al., 2006). Os flavonoides também podem proteger as sementes contra deterioração, prolongando seu período de armazenamento (Bailly, 2004).

A presença da flavanona-3-beta-hidroxilase após o 4º dia de embebição indica uma resposta ao estresse causado por um processo intenso de embebição. A presença de flavonoides foi observada durante a embebição de sementes (Yang, 2001; De Tullio e Arrigoni, 2003), levantando também a hipótese de que esta proteína pode atuar como proteção contra o estresse oxidativo durante a embebição (Aalen, 1999).

Peroxidases (spot 88) são proteínas importantes na desintoxicação celular, foram observadas antes da embebição (dia 0) e no 4º dia, onde teve maior abundância. Para Jeng e Sung (1994), as peroxidases presentes em sementes secas permitem a redução de danos causados pela peroxidação após embebição das sementes.

4.2.3- Proteínas de reserva

Muitas proteínas desempenham papel na reserva nutritiva para a germinação, a mobilização dessas proteínas nas sementes se dá através de enzimas proteinases que geram aminoácidos e são utilizados para a biossíntese de novas proteínas para a própria semente ou da futura planta. Muitas enzimas

requeridas para a mobilização de reservas são sintetizadas *de novo*, constituindo-se em alguns dos produtos iniciais da síntese de proteínas (Bewley, 1997).

As proteínas de reserva têm sido amplamente estudadas em diversas espécies vegetais (He et al., 2011; Dogra et al., 2013; Guo et al., 2013; Maldonado-Cervantes et al., 2014; Silva, 2014).

As principais proteínas de reserva em plantas magnoliopsidas são as globulinas (leguminas e vicilinas) (Sheoran et al., 2005). Das 23 proteínas de reserva identificadas neste trabalho, 17 foram do tipo 11S globulinas (spots 1, 18, 19, 29, 30, 31, 32, 40, 42, 43, 44, 53, 55, 56, 100, 101, 151) (Tabela 1), as quais foram expressas em todos os períodos da germinação, com variações apenas em seus níveis de expressão. Também foram identificadas proteínas albuminas 2S (spots 16, 64 e 122) (Tabela 1), e proteínas da família das leguminas (spots 139, 45 e 84) (Tabela 1).

As globulinas foram as proteínas mais abundantes nas sementes de *C. legalis*. As 11S globulinas contêm diversas ligações de cadeia dissulfeto inter e intra que são muito flexíveis, adotando diferentes conformações estruturais (Adachi et al., 2003). Esta capacidade de regular ligações sulfidríla-dissulfeto em 11S globulina poderia ser uma estratégia das sementes para controlar o sistemas de oxi-redução que altera a estrutura e atividade de proteínas e controlam vários processos, tais como a ativação de proteases, transcrição, divisão celular, eliminação de radicais e desintoxicação (Shahmoradi et al., 2013).

Durante a germinação, estas proteínas são degradadas e utilizadas para o desenvolvimento da plântula como fonte de nitrogênio ou de esqueletos de carbono (Huang et al., 2012).

4.2.4- Proteínas relacionadas com a biossíntese e dobramento de proteínas

A síntese de proteínas é iniciada utilizando mRNA preexistente acumulado durante o desenvolvimento e maturação da semente. Mais tarde, a síntese depende de novos mRNA sintetizados novamente durante a embebição (síntese de novo) (Bewley et al., 2013). Novos RNAs são transcritos durante o processo de germinação, a maioria destes, codifica para proteínas essenciais para dar suporte ao metabolismo celular normal (Bewley, 1990).

Dentre as proteínas ativas desta fase, o fator de transcrição MYB (spot 114) (Tabela 1) regula a expressão de genes importantes. Eles são compostos de, pelo menos, quatro domínios discretos, domínio de ligação ao DNA, sinal de localização nuclear, domínio de ativação de transcrição, e o local de oligomerização, que funcionam em conjunto para regular muitos processos fisiológicos e bioquímicos através da modulação da taxa de iniciação da transcrição de genes alvo (Du et al., 2009).

O fator de transcrição MYB (spot 114), esteve presente no dia 0, com maior nível de abundância, e também no 4º dia após a embebição das sementes. Isto porque a semente seca é composta de mRNA pré-existente e no início da embebição dará suporte ao metabolismo normal da semente pela síntese de proteínas (Bewley et al., 2013)

Em cevada, a expressão da proteína MYB foi induzida por ácido giberélico (GA), ativando a expressão de α -amilase, responsável pela degradação e mobilização de amido para o crescimento embrionário, favorecendo o enfraquecimento dos tecidos e protrusão da raiz (Gubler et al., 1999). No arroz expressão MYB também é requerida para expressão da α -amilase em aleurona, ambas são reguladas por sinal GA (Gubler et al., 1999).

A proteína sintase pseudouridina tRNA (spot 48), também identificada neste trabalho, é responsável por catalisar uma uridina pseudouridina específica para isomerização em uma variedade de RNA (Foster et al., 2000). A modificação de RNA é um processo pós-transcricional pelo qual certos nucleotídeos são modificados após sua incorporação inicial em uma cadeia de RNA, muitos resíduos de pseudouridina são altamente conservadas e fazem parte da funcionalidade do RNA (Pan et al., 2003).

As proteínas sintase pseudouridina tRNA podem atuar como chaperonas de RNA ou auxiliar no dobramento ou montagem correta (Hoang e Ferré-D'Amaré, 2001). A sintase pseudouridina tRNA (spot 48) (Tabela 1) apresentou maior nível de expressão no dia 0, demonstrando elevado nível em semente quiescente para a produção correta de proteínas de *C. legalis*.

A síntese de proteínas acontece no sentido amino-carboxila mediante a adição de aminoácidos na ponta da cadeia polipeptídica em crescimento através da ligação peptídica, que atua como um conector para diferentes aminoácidos

durante a síntese de polipeptídios e existem duas formas estéreas distintas a *cis* e *trans* (Mainali et al., 2014).

Durante esse processo, as moléculas especializadas chamadas chaperonas ajudam a dobrar a proteína na sua estrutura tridimensional correta (Lee e Tsai, 2005). E juntamente com as chaperonas a atividade das PPlases (Peptidil-prolil *cis-trans* isomerase) (spot 68) auxiliam também no dobramento de proteínas recém-sintetizadas por isomerização de ligação peptidil prolil, considerado como o passo limitante da velocidade no dobramento de proteínas (Brandts et al., 1975).

Além disso, a atividade das PPlases garantem o resgate das proteínas desnaturadas durante as condições de estresse (Mainali et al., 2014) e ajudam a controlar o ciclo celular (Ciero e Bellato, 2002). Estas proteínas foram detectadas nas sementes quiescentes E APÓS 8 E 12 dias de embebição.

As proteínas de choque térmico estão envolvidas numa variedade de processos celulares, incluindo o dobramento de proteínas, no transporte de proteínas, a modulação das atividades proteicas, na regulação e degradação de proteína e prevenção da agregação irreversível de proteínas (Su e Li, 2008).

Estas proteínas podem agir durante os primeiros dias de reidratação nas sementes (Huang et al., 2012), estarem associadas com o desenvolvimento de sementes (Wang et al., 2015), na translocação de proteínas, associadas à síntese e mobilização de reservas (Forward et al., 2002), defesa celular (Carpentier et al., 2005), além de estarem envolvidas em estresse abiótico (Balbuena et al., 2011).

Duas proteínas de choque térmico foram identificadas durante a germinação de sementes de *C. legalis*, o spot 73 e o spot 5 (Tabela 1), o spot 5, foi expresso durante todos os períodos de análise e o spot 73 no dia 0 e no 4º dia de embebição.

A proteína de choque térmico também foi identificada no desenvolvimento de sementes de *Pinus massoniana* Zhen (Bar-Nun e Glickman, 2012) e *Araucaria angustifolia* (Balbuena et al., 2011). Em *A. thaliana* Su e Li (2008) demonstraram que a proteína de choque térmico Hsp 70, encontrada no estroma do cloroplasto foi requerida para a diferenciação e germinação de sementes. Sung et al. (2001) verificaram a presença de proteínas citosólicas VrHsc70 no eixo embrionário, demonstrando a necessidade de Hsc70s para a rápida divisão celular e expansão radicular.

4.2.5- Outras proteínas relacionadas com o metabolismo de proteínas

Durante o processo de germinação, identificou-se a proteína Poligalacturonase spot (173) (Tabela 1), essa proteína está envolvida em reações metabólicas de síntese e degradação de moléculas, mobilizando polissacarídeos e componentes de parede celular usados na geração de energia e produção de matéria-prima para germinação (Buckeridge e de Souza, 2014). A poligalacturonase é uma hidrolase importante para a degradação de compostos da parede celular, atuando durante a germinação, suavizando o tegumento para protrusão da radícula (Kanai et al., 2010).

O spot da poligalacturonase identificado neste estudo (173) (Tabela 1) esteve presente na semente quiescente (0) e no 4º dia de embebição com maior nível de abundância.

5 - CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que foi possível detectar diferenças no padrão de expressão de proteínas identificadas durante a germinação de sementes *C. legalis*.

A germinação promoveu a expressão de muitas proteínas relacionadas com o metabolismo do carbono, presentes ao longo de germinação, agindo como fonte de energia para todo o processo e também podendo funcionar como marcadores no desenvolvimento da futura plântula.

Foi observado um grupo de proteínas envolvidas na prevenção do estresse oxidativo causado pela embebição, entre as proteínas estiveram a catalase, peroxidase, superóxido dismutase e flavanona-3-beta-hidroxilase, indicando haver mecanismo de desintoxicação nos componentes celulares por meio de enzimas de proteção, capaz de assegurar a sobrevivência das células e continuidade do processo de germinação, que poderia explicar a diversidade destas proteínas no presente estudo.

Além disso, a atividades das proteínas na síntese de proteínas estavam presentes tanto na manutenção de sementes (sementes secas), como durante as fases iniciais de embebição, garantindo a síntese proteica para completa germinação de sementes.

Dos 103 spots detectados, 70 proteínas foram identificadas e classificadas em nove grupos quanto à funcionalidade.

A proteína de reserva mais abundante neste estudo foi a globulina com 17 proteínas identificadas, apresentando diferentes níveis de expressão em todos os tempos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aalen, R. (1999) Peroxiredoxin antioxidants in seed physiology. *Seed Science Research* 9(04):285-295.
- Abdallah, C., Dumas-Gaudot, E., Renaut, J. , Sergeant, K. (2012) Gel-Based and Gel-Free Quantitative Proteomics Approaches at a Glance. *International Journal of Plant Genomics* 2012:17.
- Abreu, D.C.A.d. (2009) *Bases fisiológicas para a conservação a longo prazo de sementes Cariniana legalis (Mart.) O. Kuntze.* Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias 80p.
- Adachi, M., Kanamori, J., Masuda, T., Yagasaki, K., Kitamura, K., Mikami, B. , Utsumi, S. (2003) Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(12):7395-7400.
- Alkhalifioui, F., Renard, M., Vensel, W.H., Wong, J., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Buchanan, B.B. , Montrichard, F. (2007) Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiology* 144(3):1559-1579.

- Angelovici, R., Fait, A., Fernie, A.R. , Galili, G. (2011) A seed high-lysine trait is negatively associated with the TCA cycle and slows down *Arabidopsis* seed germination. *New Phytologist* 189(1):148-159.
- Aragão, V.P.M., Navarro, B.V., Passamani, L.Z., Macedo, A.F., Floh, E.I.S., Silveira, V. , Santa-Catarina, C. (2015) Free amino acids, polyamines, soluble sugars and proteins during seed germination and early seedling growth of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), an endangered hardwood species from the Atlantic Forest in Brazil. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 27(2):157-169.
- Atlântica, F.S.M. (2015) SOS Mata Atlântica. 2015. Disponível em: < <https://www.sosma.org.br/quem-somos/publicacoes/> >. Acesso em: April 2015.
- Bailly, C. (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14(02):93-107.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. , Vivanco, J.M. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57:233-266.
- Balbuena, T.S., Dias, L.L.C., Martins, M.L.B., Chiquieri, T.B., Santa-Catarina, C., Floh, E.I.S. , Silveira, V. (2011) Challenges in proteome analyses of tropical plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 23:91-104.
- Banks, R., Blake, C., Evans, P., Haser, R., Rice, D., Hardy, G., Merrett, M. , Phillips, A. (1979) Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme. *Nature* 279:773-777.
- Bar-Nun, S. , Glickman, M.H. (2012) Proteasomal AAA-ATPases: structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823(1):67-82.

- Barbedo, C.J. , Filho, J.M. (1998) Tolerância à dessecação em sementes. *Acta bot. bras.* 12(2):145-164.
- Benamar, A., Rolletschek, H., Borisjuk, L., Avelange-Macherel, M.-H., Curien, G., Mostefai, H.A., Andriantsitohaina, R. , Macherel, D. (2008) Nitrite–nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1777(10):1268-1275.
- Berjak, P. , Pammenter, N. (1994) Recalcitrance is not an all-or-nothing situation. *Seed Science Research* 4(02):263-264.
- Bewley, J.D. (1997) Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 7(9):1055-1066.
- Bewley, J.D., Bradford, J.K., Hilhorst, W.M.H. , Nonogaki, H. (2013) *Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3 ed., New York, 381p.
- Bewley, J.D. , Marcus, A. (1990) Gene expression in seed development and germination. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 38:165-193.
- Botha, F.C., Potgieter, G.P. , Botha, A.M. (1992) Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regulation* 11(3):211-224.
- Brandts, J.F., Halvorson, H.R. , Brennan, M. (1975) Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* 14(22):4953-4963.
- Buckeridge, M.S. , de Souza, A.P. (2014) Breaking the “Glycomic Code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. *BioEnergy Research* 7(4):1065-1073.

- Carpentier, S.C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R. , Panis, B. (2005) Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* 5(10):2497-2507.
- Carvalho, P.E.R. (2003) *Espécies arbóreas brasileiras*. Colombo: vol 1, 1039p.
- Castro, R., Bradford, K. , Hilhorst, H. (2004) Embebição e reativação do metabolismo. *In*: Ferreira, A. , Borghetti, F. (eds) Germinação: do básico ao aplicado. Artmed ed., Porto Alegre: Artmed, vol 1, p. 149-162.
- Catusse, J., Job, C. , Job, D. (2008a) Transcriptome-and proteome-wide analyses of seed germination. *Comptes Rendus Biologies* 331(10):815-822.
- Catusse, J., Strub, J.M., Job, C., Van, D.A. , Job, D. (2008b) Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression. *Proc Natl Acad Sci* 105
- Champagne, A. , Boutry, M. (2013) Proteomics of nonmodel plant species. *Proteomics* 13(3-4):663-673.
- Chazdon, R.L., Letcher, S.G., Van Breugel, M., Martínez-Ramos, M., Bongers, F. , Finegan, B. (2007) Rates of change in tree communities of secondary Neotropical forests following major disturbances. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362(1478):273-289.
- Chen, S. , Harmon, A.C. (2006) Advances in plant proteomics. *Proteomics* 6(20):5504-5516.
- Ciero, L. , Bellato, C. (2002) Avanços Recentes em Técnicas de Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massa. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 29:158-164.

- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21(18):3674-3676.
- Correia, S., Vinhas, R., Manadas, B., Lourenço, A.S., Veríssimo, P., Canhoto, J.M. (2012) Comparative Proteomic Analysis of Auxin-Induced Embryogenic and Nonembryogenic Tissues of the Solanaceous Tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). *Journal of proteome research* 11(3):1666-1675.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. (1992) Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54(1):579-599.
- Cunsolo, V., Muccilli, V., Saletti, R., Foti, S. (2012) Mass spectrometry in the proteome analysis of mature cereal kernels. *Mass spectrometry reviews* 31(4):448-465.
- de Carvalho Silva, R., Carmo, L.S.T., Luis, Z.G., Silva, L.P., Scherwinski-Pereira, J.E., Mehta, A. (2014) Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Proteomics* 104:112-127.
- de Castro, R.D., Zheng, X., Bergervoet, J.H., De Vos, C.R., Bino, R.J. (1995) [beta]-Tubulin Accumulation and DNA Replication in Imbibing Tomato Seeds. *Plant Physiology* 109(2):499-504.
- De La Fuente, M., Borrajo, A., Bermúdez, J., Lores, M., Alonso, J., López, M., Santalla, M., De Ron, A., Zapata, C., Alvarez, G. (2011) 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Journal of Proteomics* 74(2):262-267.
- De Tullio, M.C., Arrigoni, O. (2003) The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Science Research* 13(04):249-260.

- Demirkaya, M., Dietz, K.J. , Sivritepe, H.O. (2010) Changes in antioxidant enzymes during ageing of onion seeds. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 38(1):49-52.
- Deng, Z.Y., Gong, C.Y. , Wang, T. (2013) Use of proteomics to understand seed development in rice. *Proteomics* 13(12-13):1784-1800.
- Desagher, S. , Martinou, J.-C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 10(9):369-377.
- Dias, L.L.C., Balbuena, T.S., Silveira, V., Santa-Catarina, C., Shevchenko, A. , Floh, E.I.S. (2010) Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: a recalcitrant seed species. *Braz J Plant Physiol* 22
- Dinkova, T.D., Márquez-Velázquez, N.A., Aguilar, R., Lázaro-Mixteco, P.E. , Sánchez de Jiménez, E. (2011) Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF (iso) 4E is required for maize seed germination. *Seed Science Research* 21(02):85-93.
- Dogra, V., Ahuja, P.S. , Sreenivasulu, Y. (2013) Change in protein content during seed germination of a high altitude plant *Podophyllum hexandrum* Royle. *Journal of Proteomics* 78:26-38.
- Dong, K., Zhen, S., Cheng, Z., Cao, H., Ge, P. , Yan, Y. (2015) Proteomic analysis reveals key proteins and phosphoproteins upon seed germination of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in plant science* 6:1-17.
- Donohue, K., Rubio de Casas, R., Burghardt, L., Kovach, K. , Willis, C.G. (2010) Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41:293-319.

- Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X.-F., Yang, W.-J., Wu, Y.-M., Huang, Y.-B. , Tang, Y.-X. (2009) Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry* 74(1):1-11.
- Eveland, A.L. , Jackson, D.P. (2012) Sugars, signalling, and plant development. *Journal of Experimental Botany* 63(9):3367-3377.
- Feng, B., Li, L., Zhou, X., Stanley, B. , Ma, H. (2009) Analysis of the Arabidopsis floral proteome: detection of over 2 000 proteins and evidence for posttranslational modifications. *Journal of integrative plant biology* 51(2):207-223.
- Forward, B.S., Osusky, M. , Misra, S. (2002) The Douglas-fir BiP promoter is functional in *Arabidopsis* and responds to wounding. *Planta* 215(4):569-576.
- Foster, P.G., Huang, L., Santi, D.V. , Stroud, R.M. (2000) The structural basis for tRNA recognition and pseudouridine formation by pseudouridine synthase I. *Nature Structural & Molecular Biology* 7(1):23-27.
- Fu, Y., Gu, Y., Zheng, Z., Wasteneys, G. , Yang, Z. (2005) Arabidopsis interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell* 120(5):687-700.
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P.C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J. , Job, D. (2002) Importance of methionine biosynthesis for *Arabidopsis* seed germination and seedling growth. *Physiologia Plantarum* 116
- Ghosh, S. , Pal, A. (2012) Identification of differential proteins of mungbean cotyledons during seed germination: a proteomic approach. *Acta Physiologiae Plantarum* 34(6):2379-2391.
- Gonçalves, E.G. , Lorenzi, H.J. (2011) *Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares*. 2 ed., São Paulo, 544p.

- Goyal, K., Walton, Laura J. , Tunnacliffe, A. (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* 388(1):151-157.
- Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., LEUBNER-METZGER, G. , Soppe, W.J. (2012) Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, Cell & Environment* 35(10):1769-1786.
- Gubler, F., Raventos, D., Keys, M., Watts, R., Mundy, J. , Jacobsen, J.V. (1999) Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *The Plant Journal* 17(1):1-9.
- Guo, X., Fang, X., Sun, Y., Shen, L., Wang, Z. , Chen, L. (2013) Lithium storage in carbon-coated SnO₂ by conversion reaction. *Journal of Power Sources* 226:75-81.
- Han, F., Ullrich, S.E., Clancy, J.A. , Romagosa, I. (1999) Inheritance and fine mapping of a major barley seed dormancy QTL. *Plant Science* 143(1):113-118.
- Haughn, G. , Chaudhury, A. (2005) Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 10(10):472-477.
- He, D., Han, C., Yao, J., Shen, S. , Yang, P. (2011) Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. *Proteomics* 11(13):2693-2713.
- He, D. , Yang, P. (2013) Proteomics of rice seed germination. *Frontiers in plant science* 4
- He, M., Zhu, C., Dong, K., Zhang, T., Cheng, Z., Li, J. , Yan, Y. (2015) Comparative proteome analysis of embryo and endosperm reveals central differential expression proteins involved in wheat seed germination. *BMC Plant Biology* 15(1):1-17.

- Hirayama, T. , Shinozaki, K. (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in Plant Science* 12(8):343-351.
- Hite, D.R., Auh, C. , Scandalios, J.G. (1999) Catalase activity and hydrogen peroxide levels are inversely correlated in maize scutella during seed germination. *Redox report* 4(1-2):29-34.
- Hoang, C. , Ferré-D'Amaré, A.R. (2001) Cocystal structure of a tRNA Ψ 55 pseudouridine synthase: nucleotide flipping by an RNA-modifying enzyme. *Cell* 107(7):929-939.
- Howell, K., Millar, A.H. , Whelan, J. (2006) Ordered Assembly of Mitochondria During Rice Germination Begins with Promitochondrial Structures Rich in Components of the Protein Import Apparatus. *Plant Molecular Biology* 60(2):201-223.
- Huang, H., Møller, I.M. , Song, S.-Q. (2012) Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. *Journal of Proteomics* 75(4):1247-1262.
- Hurkman, W.J. , Tanaka, C.K. (2007) Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analysis. *Journal of Chromatography* 849(1):344-350.
- IUCN (2015) International Union for Conservation of Nature. The IUCN Red List of Threatened species. 2015. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org> >. Acesso em: 25 April.
- Jeng, T. , Sung, J. (1994) Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. *Seed Science and Technology* 22(3):531-539.
- Jorrín-Novo, J.V., Pascual, J., Sánchez-Lucas, R., Romero-Rodríguez, M.C., Rodríguez-Ortega, M.J., Lenz, C. , Valledor, L. (2015) Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and

- 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. *Proteomics* 15(5-6):1089-1112.
- Jorrín, J.V., Maldonado, A.M. , Castillejo, M.A. (2007) Plant proteome analysis: a 2006 update. *Proteomics* 7(16):2947-2962.
- Kageyama, P. , Viana, V. (1989) Tecnologia de sementes e grupos ecológicos de espécies arbóreas tropicais. *Simpósio Brasileiro sobre Tecnologia de Sementes Florestais* 2:197-215.
- Kanai, M., Nishimura, M. , Hayashi, M. (2010) A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of ABI5. *The Plant Journal* 62(6):936-947.
- Kermode, A.R. (1997) Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. *Seed Science Research* 7(02):75-95.
- Kibinza, S., Bazin, J., Bailly, C., Farrant, J.M., Corbineau, F. , El-Maarouf-Bouteau, H. (2011) Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Science* 181(3):309-315.
- Koornneef, M., Bentsink, L. , Hilhorst, H. (2002) Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* 5(1):33-36.
- Laurance, W.F. , Bierregaard, R.O. (1997) *Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities*. Chicago: University of Chicago Press vol 2, 632p.
- Lee, S. , Tsai, F. (2005) Molecular chaperones in protein quality control. *J. Biochem Mol Biol* 38(3):259-265.
- Linkies, A., Graeber, K., Knight, C. , Leubner-Metzger, G. (2010) The evolution of seeds. *New Phytologist* 186(4):817-831.

- Maeshima, M., Hara-Nishimura, I., Takeuchi, Y. , Nishimura, M. (1994) Accumulation of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and H⁺-ATPase during reformation of the central vacuole in germinating pumpkin seeds. *Plant Physiology* 106(1):61-69.
- Mainali, H.R., Chapman, P. , Dhaubhadel, S. (2014) Genome-wide analysis of Cyclophilin gene family in soybean (*Glycine max*). *Plant Biology* 14(282):1-11.
- Maldonado-Cervantes, E., Huerta-Ocampo, J.A., Montero-Morán, G.M., Barrera-Pacheco, A., Espitia-Rangel, E. , de la Rosa, A.P.B. (2014) Characterization of *Amaranthus cruentus* L. seed proteins by 2-DE and LC/MS–MS: Identification and cloning of a novel late embryogenesis-abundant protein. *Journal of Cereal Science* 60(1):172-178.
- Marenco, R.A. , Lopes, N.F. (2009) *Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral*. 3 ed Editora UFV, 486p.
- Matta, L.B.V. , Scudeller, V.V. (2012) Lecythidaceae Poit. in the Tupé Sustainable Development Reserve, Manaus, Brazil. *Brazilian Journal of Botany* 35:195-217.
- Miernyk, J.A., Preťová, A., Olmedilla, A., Klubicová, K., Obert, B. , Hajduch, M. (2011) Using proteomics to study sexual reproduction in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction* 24(1):9-22.
- MMA (2015) Ministério do Meio Ambiente. 2015. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica> >. Acesso em: 25 April.
- Motoyama, A. , Yates III, J.R. (2008) Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. *Analytical Chemistry* 80(19):7187-7193.

- Neilson, K.A., Gammulla, C.G., Mirzaei, M., Imin, N. , Haynes, P.A. (2010) Proteomic analysis of temperature stress in plants. *Proteomics* 10(4):828-845.
- Neuhoff, V., Stamm, R. , Eibl, H. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis* 6(9):427-448.
- Nguyen, T.-P., Cueff, G., Hegedus, D.D., Rajjou, L. , Bentsink, L. (2015) A role for seed storage proteins in Arabidopsis seed longevity. *Journal of Experimental Botany*: 348.
- Nonogaki, H., Bassel, G.W. , Bewley, J.D. (2010) Germination—still a mystery. *Plant Science* 179(6):574-581.
- Obendorf, R.L. (1997) Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7(02):63-74.
- Obroucheva, N.V. (2013) Aquaporins in seeds. *Seed Science Research* 23(04):213-216.
- Okamoto, M., Tatematsu, K., Matsui, A., Morosawa, T., Ishida, J., Tanaka, M., Endo, T.A., Mochizuki, Y., Toyoda, T. , Kamiya, Y. (2010) Genome-wide analysis of endogenous abscisic acid-mediated transcription in dry and imbibed seeds of Arabidopsis using tiling arrays. *The Plant Journal* 62(1):39-51.
- Oliveira-Filho, A.T. , Fontes, M.A.L. (2000) Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. *Biotropica* 32(4b):793-810.
- Oliveira, A.K.M., Carvalho, J.M.B., Souza, J.S. , Souza, S.A. (2015) Germinação de sementes de *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 17:642-648.

- Oliver, A.E., Leprince, O., Wolkers, W.F., Hinch, D.K., Heyer, A.G. , Crowe, J.H. (2001) Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying. *Cryobiology* 43(2):151-167.
- Osborne, D.J. (1983) Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Canadian Journal of Botany* 61(12):3568-3577.
- Pan, H., Agarwalla, S., Moustakas, D.T., Finer-Moore, J. , Stroud, R.M. (2003) Structure of tRNA pseudouridine synthase TruB and its RNA complex: RNA recognition through a combination of rigid docking and induced fit. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(22):12648-12653.
- Pandey, A. , Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405(6788):837-846.
- Pawlowski, T.A. (2009) Proteome analysis of Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds dormancy breaking and germination: influence of abscisic and gibberellic acids. *BMC Plant Biology* 9
- Pelletier, M.K. , Shirley, B.W. (1996) Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings (Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase). *Plant Physiology* 111(1):339-345.
- Pennington, S.R. , Dunn, M.J. (2001) *Proteomics: from protein sequence to function*. Canada: Garland Science vol 1, 313p.
- Pinto, S.I.d.C., Martins, S.V., Silva, A.G.d., Barros, N.F.d., Dias, H.C.T. , Scoss, L.M. (2007) Estrutura do componente arbustivo-arbóreo de dois estádios sucessionais de floresta estacional semidecidual na Reserva Florestal Mata do Paraíso. *Revista Árvore* 31(5):823-833.
- Preston, J., Tatematsu, K., Kanno, Y., Hobo, T., Kimura, M., Jikumaru, Y., Yano, R., Kamiya, Y. , Nambara, E. (2009) Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds:

- a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant and Cell Physiology* 50(10):1786-1800.
- Prodanović, O., Prodanović, R., Bogdanović, J., Mitrović, A., Milosavić, N. , Radotić, K. (2007) Antioxidative enzymes during germination of two lines of serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně]. *Archives of Biological sciences* 59(3):209-216.
- Rabilloud, T. , Lelong, C. (2011) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal of Proteomics* 74(10):1829-1841.
- Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C. , Job, D. (2004) The effect of α -amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology* 134(4):1598-1613.
- Rambaldi, D.M., Magnanini, A., Lardosa, E., Figueiredo, P. , Oliveira, R.F.d. (2003) *A Reserva da Biosfera da Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro*. 2 ed., Rio de Janeiro: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 61p.
- Rampitsch, C. , Srinivasan, M. (2006) The application of proteomics to plant biology: a review. *Botany* 84(6):883-892.
- Rana, B. , Sreenivasulu, Y. (2013) Protein changes during ethanol induced seed germination in *Aconitum heterophyllum*. *Plant Science* 198:27-38.
- Raymond, P., Al-Ani, A. , Pradet, A. (1985) ATP production by respiration and fermentation, and energy charge during aerobiosis and anaerobiosis in twelve fatty and starchy germinating seeds. *Plant Physiology* 79(3):879-884.
- Rêgo, G.M. (2002) Ecofisiologia do jequitibá-rosa e do jacarandá-da-bahia: morfogênese, germinação e crescimento inicial. *Scientia Agraria* 3(1):125-125.

- Reitz, R. (1981) *Flora ilustrada catarinense—Lecitidáceas*. Santa Catarina, 32p.
- Santoni, V., Delarue, M., Caboche, M. , Bellini, C. (1997) A comparison of two-dimensional electrophoresis data with phenotypical traits in *Arabidopsis* leads to the identification of a mutant (*cri1*) that accumulates cytokinins. *Planta* 202(1):62-69.
- Sebbenn, A.M., Kageyama, P.Y., Siqueira, A. , Zanatto, A.C.S. (2000) Sistema de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. *Scientia forestalis*(58):25-40.
- Shahmoradi, Z., Tamaskani, F., Sadeghipour, H.R. , Abdolzadeh, A. (2013) Redox changes accompanying storage protein mobilization in moist chilled and warm incubated walnut kernels prior to germination. *Journal of Plant Physiology* 170(1):6-17.
- Sheoran, I.S., Olson, D.J., Ross, A.R. , Sawhney, V.K. (2005) Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. *Proteomics* 5(14):3752-3764.
- Shewry, P.R., Napier, J.A. , Tatham, A.S. (1995) Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell* 7(7):945.
- Shirley, B.W. (1998) Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Science Research* 8(04):415-422.
- Shoshan-Barmatz, V., Israelson, A., Brdiczka, D.a. , Sheu, S. (2006) The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Current Pharmaceutical Design* 12(18):2249-2270.
- Silva, P.d.A. (2014) Estudo da qualidade fisiológica, bioquímica e ultra-estrutural durante o desenvolvimento e a secagem de sementes de soja.

- Smith, N., Mori, S. , Prance, G. (2012) Lecythidaceae in In Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em:<>. Acesso em 3
- Sreenivasulu, N., Usadel, B., Winter, A., Radchuk, V., Scholz, U., Stein, N., Weschke, W., Strickert, M., Close, T.J. , Stitt, M. (2008) Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiology* 146(4):1738-1758.
- Su, P.-H. , Li, H.-m. (2008) Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiology* 146(3):1231-1241.
- Sung, D.Y., Kaplan, F. , Guy, C.L. (2001) Plant Hsp70 molecular chaperones: protein structure, gene family, expression and function. *Physiologia Plantarum* 113(4):443-451.
- Takac, T., Pechan, T. , Samaj, J. (2011) Differential proteomics of plant development. *J Proteomics* 74
- Tan, L., Chen, S., Wang, T. , Dai, S. (2013) Proteomic insights into seed germination in response to environmental factors. *Proteomics* 13(12-13):1850-1870.
- Vadivel, A. , Kumaran, A. (2015) GEL BASED PROTEOMICS IN PLANTS: TIME TO MOVE ON FROM THE TRADITION. *Frontiers in plant science* 6:1-4.
- Vale, E.d.M., Heringer, A.S., Barroso, T., Ferreira, A.T.d.S., da Costa, M.N., Perales, J.E.A., Santa-Catarina, C. , Silveira, V. (2014) Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. *Proteome Science* 12(1):1-17.

- Varhaníková, M., Uvackova, L., Skultety, L., Pretova, A., Obert, B. , Hajduch, M. (2014) Comparative quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli in maize suggests the role of oxylipins in plant totipotency. *Journal of Proteomics* 104:57-65.
- Vázquez-Ramos, J.M. , de La Paz Sánchez, M. (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research* 13(02):113-130.
- Wang, W.-Q., Liu, S.-J., Song, S.-Q. , Møller, I.M. (2015) Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiology and Biochemistry* 86:1-15.
- Wang, W., Tai, F. , Chen, S. (2008) Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Journal of separation science* 31(11):2032-2039.
- Weitbrecht, K., Müller, K. , Leubner-Metzger, G. (2011) First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*
- Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M. , Van Camp, W. (1995) Catalases in plants. *Molecular Breeding* 1(3):207-228.
- Wojtyła, Ł., Garnczarska, M., Zalewski, T., Bednarski, W., Ratajczak, L. , Jurga, S. (2006) A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. *Journal of Plant Physiology* 163(12):1207-1220.
- Wu, X., Gong, F. , Wang, W. (2014) Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis. *Proteomics* 14(6):645-658.
- Yan, D., Duermeyer, L., Leoveanu, C. , Nambara, E. (2014) The Functions of the Endosperm During Seed Germination. *Plant and Cell Physiology* 55(9):1521-1533.

- Yang, P., Li, X., Wang, X., Chen, H., Chen, F. , Shen, S. (2007) Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. *Proteomics* 7(18):3358-3368.
- Yang, T.B., B. Ooraikul, F (2001) Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 52(4):319-330.
- Zhang, P., Liu, D., Shen, H., Li, Y. , Nie, Y. (2015) Proteome Analysis of Dormancy-Released Seeds of *Fraxinus mandshurica* Rupr. in Response to Re-Dehydration under Different Conditions. *International Journal of Molecular Sciences* 16(3):4713-4730.
- Zhang, X.-l., Liu, G.-l., Li, T.-l., Qi, M.-f., Mei, M. , Lu, X.-j. (2014) Differential proteome analysis of mature and germinated seeds of *Magnolia sieboldii* K. Koch. *Trees* 28(3):859-870.
- Zubarev, R.A. (2013) The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics. *Proteomics* 13(5):723-726.