UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR – PPGGBM

PERFIL PROTEÔMICO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA COM SUTIL DIFERENÇA DA QUALIDADE FISIOLÓGICA.

FELLIPE RAMOS SAMPAIO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2021

FELLIPE RAMOS SAMPAIO

PERFIL PROTEÔMICO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA COM SUTIL DIFERENÇA DA QUALIDADE FISIOLÓGICA.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética molecular e de Micro-organismos

Orientador: Prof. Rafael Marani Barbosa

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2021

FELLIPE RAMOS SAMPAIO

PERFIL PROTEÔMICO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA COM SUTIL DIFERENÇA DA QUALIDADE FISIOLÓGICA.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 29 de março de 2021.

Prof. Dr. Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar
(UESC)

Prof. Dr. Juliano Oliveira Santana
(UESC)

Prof. Drª. Thâmara Moura Lima
(UESC)

Prof. Dr. Rafael Marani Barbosa
(UESC - Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) por toda a estrutura e suporte físico dada a minha jornada como discente e pesquisador da graduação ao mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGGBM) da UESC, pela oportunidade. Assim como, todo o corpo docente e os funcionários que tornam possível a existência deste programa.

Aos amigos e colegas do grupo da proteômica e do grupo de sementes, por todas as trocas de conhecimento.

Ao professor Dr. Rafael Marani Barbosa pela orientação, confiança, suporte, oportunidades e companheirismo durante jornada de formação acadêmica.

Ao professor Dr. Carlos Priminho Pirovane, assim como a Drª Irma Yuliana Mora Ocampo pelos ensinamentos sobre proteômica, oportunidade, disponibilidade e provocações positivas fundamentais para execução da pesquisa.

Aos meus pais Janira e Sinval, também a Sara minha companheira, por todo apoio, suporte, incentivo e amor que me foi dado, desta forma contribuiram de forma direta e indireta para realização deste trabalho.

RESUMO

SAMPAIO, Fellipe R, M. S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março, 2021. **PERFIL PROTEÔMICO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA COM SUTIL DIFERENÇA DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DOS LOTES.** Orientador: Rafael Marani Barbosa. Co-orientador: Carlos Priminho Pirovani.

Uma das culturas agrícolas mais importante é da soja (*Glycine max* L.). Sua propagação é feita por sementes, em que são priorizados a utilização de lotes de sementes com melhor qualidade fisiológica. Sementes podem apresentar uma sutil diferença da qualidade fisiológica em que não é perceptível por teste padrão de germinação, porém é identificado por alguns testes de vigor. Esta sutil diferença pode ser explicada por eventos moleculáres e por sua vez, expressão e/ou acúmulo de diferentes proteínas nos tecidos das sementes. A proteômica pode entrar como uma potencial ferramenta para captar e explicar a diferença da qualidade fisiológica de lotes comerciais de sementes de soja. Por meio de abordagem proteômica, trabalhos evidenciaram mudanças no perfil proteômico de sementes de soja envelhecidas artificialmente, em que proteínas do metabolismo primário, como processo de metabolismo de carboidrados, dobramento de proteínas, metabolismo da glicose e atividade antioxidantes tiveram redução do acúmulo. Porém, estes trabalhos só observaram as sementes do ponto de vista da deterioração, não analisaram sob a perspectiva da qualidade fisiológica, além de não está esclarecida como esta variação ocorre durante as fases da germinação. Assim, ampliando chances de mais descobertas sobre os fenômenos de germinação, deterioração e vigor de sementes. O objetivo da pesquisa, é caracterizar o perfil proteômico da germinação de lotes de sementes de soja com sutil diferença de qualidade fisiológica. Para isso, análises fisiológicas e moleculares foram realizadas com cinco lotes comerciais de sementes de soja caracterizados fisiológicamente através de testes de germinação e vigor: Primeira contagem, índice de velocidade de germinação, massa seca e fresca total, , comprimento de raiz e de plântula, emergência de plântula, índice de velocidade de emergência e envelhecimento acelerado. Em dois dos cinco lotes, foi feito o teste de tetrazólio e caracterização da germinação através da curva de embebição. Para análise do perfil proteômico, foi utilizada parte das sementes (eixo embrionário junto a parte da região vascular dos cotilédones), amostras complexas de proteínas foram extraídas por método TCA/ACETONA, foi feito SDS-PAGE. Para obtenção do perfil proteômico, foi através de proteômica *shotgun,* as amostras complexas de proteínas foram analisadas com cromatrografo liquido (agilent UHPC-1290 infinity II) acoplado a espectrômetro de massa (Agilent 6545 LC/Q-TOF), As análises de bioinformática e estatística foram realizadas pelos softwares MassHunter, Agilent Mass Profiler Professional 15.1 (MPP) e pantherGO. Os spectros de massas foram validados com o banco de dados do SwissProt *Glycine max*. As análises de caracterização fisiológica dos cinco lotes de sementes através dos testes de germinação e vigor, identificaram sutis diferenças da qualidade fisiológica do lote B (maior qualidade), sobre o E (menor qualidade), pois, o teste de germinação não evidenciou diferenças estatística, porém

as variáveis de massa fresca total e envelhecimento acelerado, evidenciaram uma diferença no vigor entre estes lotes. O teste de tetrazólio confirmou esta diferença dos lotes B e E. Para a construção do perfil proteômico da germinação, foram identificados pontos dentro de cada fase da germinação, fase I (0,5h), fase II (20h) e fase III (51h). Extrações de proteínas dos tratamentos foram confirmada por quantificação com 2-D Quant Kit e SDS-PAGE. Foram identificadas na fase I da germinação 1936 e 1922 proteínas para o lote B e E respectivamente, destas 75 foram diferenciamente acumuladas. Na fase II da germinação foram 1963 lote B versus 1540 lote E, dessas 74 foram diferencialmente acumuládas. Já na fase III, foram identificadas 1714 para lote B e 1832 para lote E, em que 126 proteínas foram diferencialmente acumuládas. Análises de componentes principais evidenciou diferença dos lotes B e E em cada fase da germinação. A medida que avança a fase da germinação, a componente principal (CP1) aumenta o poder de explicação, na fase I a CP1 explicou 50,45% da variância, na fase II 68,24% e na fase III 71,68 da variância dos dados. Foi identificado por meio de ferramenta gene ontology que processos celulares e metabólicos, proteínas de atividade catalíticas e enzima de interconversão de metabólito em estrutura anatômica intracelular estão relacionados a variação da qualidade de sementes de soja. Alcool e aldeido desidrogenases tem um papel importante no início da germinação e pode indicar sutis diferenças de vigor, proteína de dessecação de sementes PM22, pode indicar sutil atraso da germinação durante a fase II e maior acúmulo de proteínas relacionadas a tradução e atividade glicolítica, podem indicar menor qualidade em comparação de lotes de sementes de soja.

Palavras chave: *Glycine max L.,* Vigor, Proteinas, Espectrometria de massas, Shotgun

ABSTRACT

SAMPAIO, Fellipe R, M. S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março, 2021. **PROTEOMIC PROFILE OF GERMINATION OF SOYBEAN SEEDS WITH SUBTLE DIFFERENCE OF PHYSIOLOGICAL QUALITY OF THE LOTS.** Orientador: Rafael Marani Barbosa. Co-orientador: Carlos Priminho Pirovani.

One of the most important agricultural crops is soybeans (Glycine max L.). Its propagation is made by seeds, in which the use of seed lots with better physiological quality is prioritized. Seeds may show a subtle difference in physiological quality that is not noticeable by standard germination test but is identified by some vigor tests. This subtle difference can be explained by molecular events and, in turn, expression and / or accumulation of different proteins in the tissues of the seeds. Proteomics can enter as a potential tool to capture and explain the difference in the physiological quality of commercial soybean seed lots. Using a proteomic approach, studies showed changes in the proteomic profile of artificially aged soybean seeds, in which primary metabolism proteins, such as carbohydrate metabolism process, protein folding, glucose metabolism and antioxidant activity had reduced accumulation. However, these studies only observed the seeds from the point of view of deterioration, did not analyze from the perspective of physiological quality, and it is not clear how this variation occurs during the stages of germination. Thus, increasing the chances of more discoveries about the phenomena of germination, deterioration and vigor of seeds. The objective of the research is to characterize the proteomic profile of the germination of soybean seed lots with subtle difference in physiological quality. For this, physiological and molecular analyzes were carried out with five commercial soybean seed lots physiologically characterized through germination and vigor tests: First count, germination speed index, total dry and fresh mass, root and seedling length, seedling emergence, emergence speed index and accelerated aging. In two of the five lots, the tetrazolium test and germination characterization through the imbibition curve were performed. For analysis of the proteomic profile, part of the seeds (embryonic axis next to part of the vascular region of the cotyledons) was used, complex samples of proteins were extracted by TCA / ACETONE method, SDS-PAGE was performed. To obtain the proteomic profile, it was through shotgun proteomics, the complex protein samples were analyzed with a liquid chromatograph (agilent UHPC-1290 infinity II) coupled to a mass spectrometer (Agilent 6545 LC/Q-TOF). statistics were performed by the MassHunter and Agilent Mass Profiler Professional 15.1 (MPP) and pantherGO software. The mass spectra were validated with the SwissProt Glycine max database. The analyzes of physiological characterization of the five seed lots through germination and vigor tests, identified subtle differences in the physiological quality of lot B (higher quality), over E (lower quality), because the germination test did not show statistical differences , however, the variables of total fresh mass and accelerated aging, showed a difference in vigor between these lots. The tetrazolium test confirmed this difference between lots B and E. For the construction of the germination proteomic profile, points were identified within each germination phase, phase I (0.5h), phase II (20h) and phase

III (51h). Protein extractions from the treatments were confirmed by quantification with 2-D Quant Kit and SDS-PAGE. In phase I germination 1936 and 1922 proteins were identified for batch B and E respectively, of which 75 were differentially accumulated. In germination phase II, there were 1963 lot B versus 1540 lot E, of these 74 were differentially accumulated. In phase III, 1714 were identified for lot B and 1832 for lot E, in which 126 proteins were differentially accumulated. Principal component analysis showed a difference of lots B and E in each germination phase. As the germination phase progresses, the main component (CP1) increases the explanatory power, in phase I to CP1 explained 50.45% of the variance, in phase II 68.24% and in phase III 71.68 of the variance of the data. It was identified by means of a gene ontology tool that cellular and metabolic processes, catalytic activity proteins and metabolite interconversion enzyme in an intracellular anatomical structure are related to the variation in the quality of soybean seeds. Alcohol and aldehyde dehydrogenases play an important role in early germination and may indicate subtle differences in vigor, seed desiccation protein PM22, may indicate subtle delay in germination during phase II and greater accumulation of proteins related to translation and glycolytic activity, may indicate lower quality compared to soybean seed lots.

Keywords: Glycine max L., Vigor, Proteins, Mass spectrometry, Shotgun.

ÌNDICE

AGRADECIMENTOS ii
RESUMO ii
ABSTRACT iv
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Fenômeno da germinação de sementes 3
2.2 Fenômeno da deterioração de sementes 8
2.3 Fenômeno do vigor de sementes 10
2.4 Qualidade fisiológica de lotes de sementes 12
2.5 Abordagem Proteômica para anális de sementes 14
3 MATERIAL E MÉTODOS 16
3.1 Caracterização fisiológica de lotes de semente de soja 16
3.1.1 Testes de germinação e vigor 16
3.1.2 Caracterização da curva de embebição durante a germinação 18
3.2 Proteômica em sementes de soja 19
3.2.1 Obtenção dos tratamentos 19
3.2.2 Desinfestação superficial das sementes e excisão do eixo embrionário com parte da região vascular. 19
3.2.3 Extração de proteinas 20
3.2.4 Quantificação de proteínas e SDS-PAGE 21
3.2.5 Espectrometria de massa livre de gel 21
3.3 Análises Estatistica 22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 24
4.1 Caracterização fisiológica, identifica uma sutil variação da qualidade fisiológica de lotes de sementes de soja. 24
4.2 Caracterização da curva de embebição durante a germinação de sementes de soja 29
4.3 Análises proteômicas da germinação e vigor de sementes de soja. 31
4.3.1 SDS-PAGE extrato total de proteínas 31
4.3.2 Quantificação de proteínas 32
4.3.3 Análise de componentes principais. 33
4.3.4 Expressão diferencial de proteínas em lotes de sementes de soja com sutil diferença da qualidade em diferentes fases da germinação 35
4.3.5 Processo biológico, função molecular, localização e classe das proteínas relacionadas a germinação e vigor de sementes. 37
5 CONCLUSÃO 46

6 REFERÊNCIAS.....47
ANEXOS 57

1 INTRODUÇÃO

O grão de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das commodities agrícolas mais importantes do mundo. Os grãos de soja são uma rica fonte de proteínas, óleos, antocianinas e isoflavonas é utilizada como matéria prima para diversos produtos alimentício, farmacológico e cosméticos (KIM et al. 2012). Em ambiente de constantes mudanças no mundo, há a necessidade de sempre haver pesquisas para a garantia de produção e assim manter a segurança alimentar das futuras gerações. A produção mundial de soja em 2020, segunda a USDA, foi de aproximadamente 337 milhões de toneladas em 122,6 milhões de hectares. Brasil é o maior produtor, projetando uma marca de 135 milhões de toneladas em 38,5 milhões de hectares para safra 2020/21 (CONAB, 2021). Os EUA foi ultrapassado, tornando-se o segundo maior produtor, desde a safra de 19/20, com uma produção aproximada de 97 milhões de toneladas em 30,3 milhões de hectares segundo a USDA.Sobre a produção regional de soja no Brasil. A região Norte-Nordeste do Brasil, o plantio atingiu 5.817,8 mil hectares, 6,4% de incremento em relação à área plantada na safra passada, nesta região é esperada uma produção de 19.799,1 mil toneladas, representando incremento de 5,8% em relação ao exercício anterior. Na Bahia, as lavouras de soja se expandiram sobre áreas novas e sobre áreas anteriormente cultivadas com algodão, no extremo-oeste, está sendo estimado o cultivo de 1.701 mil hectares, superando a safra passada em 4,9%. (CONAB, 2021).

Um fator importante para os crescentes aumentos de produtividade é a utilização de sementes de soja com elevada qualidade, esta caracteristica já é exigida pelos produtores. A qualidade fisiológica é um importante e desejado atributo sobre lotes comerciais de sementes de soja. Pois, esta característica se relaciona com a obtenção de *stand* adequado de plântulas, homogeneidade e produtividade da cultura (MARCOS-FILHO, 2005; OLIVEIRA et al., 2021). A utilização de semente de soja de alta qualidade é um fator importante que pode favorecer o êxito da cultura (FRANÇA-

NETO et al., 2010). A capacidade de germinação, o vigor e a longevidade são os parâmetros utilizados na caracterização e avaliação da qualidade fisiológica das sementes (MARCOS-FILHO, 2015). Ou seja, a qualidade fisiológica reúne informações sobre a germinação (viabilidade) e o vigor de sementes. Sendo assim, sua avaliação segura permite identificar lotes de sementes que possuem maior probabilidade de apresentar o desempenho desejado durante o armazenamento e em campo.

Diferentes lotes com a mesma taxa de germinação, obtida por testes em laboratório, podem apresentar variação no desempenho ao campo, ou no armazenamento (CAVERZAN et al., 2018). Isto ocorre devido a uma sutil variação no nível de deterioração das sementes nestes lotes, por sua vez no vigor dos lotes, estas variações só serão perceptível através de testes de vigor mais sensíveis e/ou técnicas moleculares. Avaliações amplas e profundas em sementes envelhecidas artificialmente de soja, relataram mudanças no perfil de proteínas, que quando anotadas funcionalmente foram principalmente relacionadas ao metabolismo primário e de resposta a estímulos. Proteínas relacionadas à atividade com nutrientes de reservas teve aumento do acúmulo, enquanto que proteínas envolvidas no metabolismo primário, como processo de metabolismo de carboidrados, dobramento de proteínas, processo de metabolismo da glicose, atividade de oxi-redução (detoxicação de ROS) tiveram redução do acúmulo (MIN et al., 2016, 2017). Estes trabalhos só observaram as sementes do ponto de vista da deterioração e não analisaram sob a perspectiva da qualidade fisiológica das sementes, pois não realizaram testes de vigor. Além disso, ainda não está esclarecida como esta variação se dá ao longo da germinação.

Portanto, ainda não há trabalhos que elucidam a nível molecular as sutis diferenças da qualidade fisiológica em lotes de sementes de soja e a estratégia de avaliar o perfil proteômico durante a germinação, amplia as chances de encontrar biomarcadores do vigor de sementes. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi de caracterizar o proteoma de sementes de soja durante a germinação, Identificar proteínas que influênciam sutilmente no vigor de lotes de sementes de soja, identificar padrões de expressão de proteínas em lotes de sementes de soja com sutil variação da qualidade fisiológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fenômeno da germinação de sementes

O fenômeno de germinação de sementes (figura 1), no geral, pode ser descrito por meio do padrão trifásico de embebição (BEWLEY; BLACK 1978). Inicialmente ocorre rápida absorção de água pela semente seca (Fase I) até que todas as matrizes e conteúdos celulares estejam totalmente hidratados, nesta fase ocorre rápida captação de água, na qual ocorrem reparação dos danos ao DNA (MACOVEI et al., 2011; DANDOY et al., 1987) e retomada das vias glicolíticas e oxidativas da pentose fosfato (HOWELL et al., 2006). Seguido por um período limitado de absorção de água (Fase II), que permanece inalterado em sementes que não completam a germinação, como em sementes inativas ou mortas, esta fase II é uma fase de platô na qual ocorre a síntese de mitocôndrias (HOWELL et al., 2006) e a tradução do mRNA de armazenamento (DINKOVA, 2011). O aumento na absorção de água associado à Fase III é inicialmente, e brevemente, relacionado à conclusão da germinação (strictu senso), embora isto seja proporcionalmente uma quantidade baixa. O ligeiro aumento no teor de água é seguido por uma absorção muito maior à medida que as células da radícula em crescimento e, subsequentemente, o resto da plântula, aumentam devido a divisões mitóticas e expansão celular (BEWLEY 1997), (NONOGAKI et al. 2007, 2010).

No início, antes mesmo da germinação, o conteúdo celular de uma semente seca é estabelecido durante o seu desenvolvimento na planta mãe, o que permite a retomada dos eventos metabólicos rapidamente após a reintrodução na água, independentemente de a semente estar inativa. Quanto tempo esses são utilizados durante a germinação é objeto de debate. Mas parece que, tudo o que é necessário para a retomada da síntese de proteínas está presente nas sementes secas, enquanto

há uma substituição gradual, aumentada pela síntese de novos RNAs, à medida que a germinação prossegue (RAJJOU, 2012).

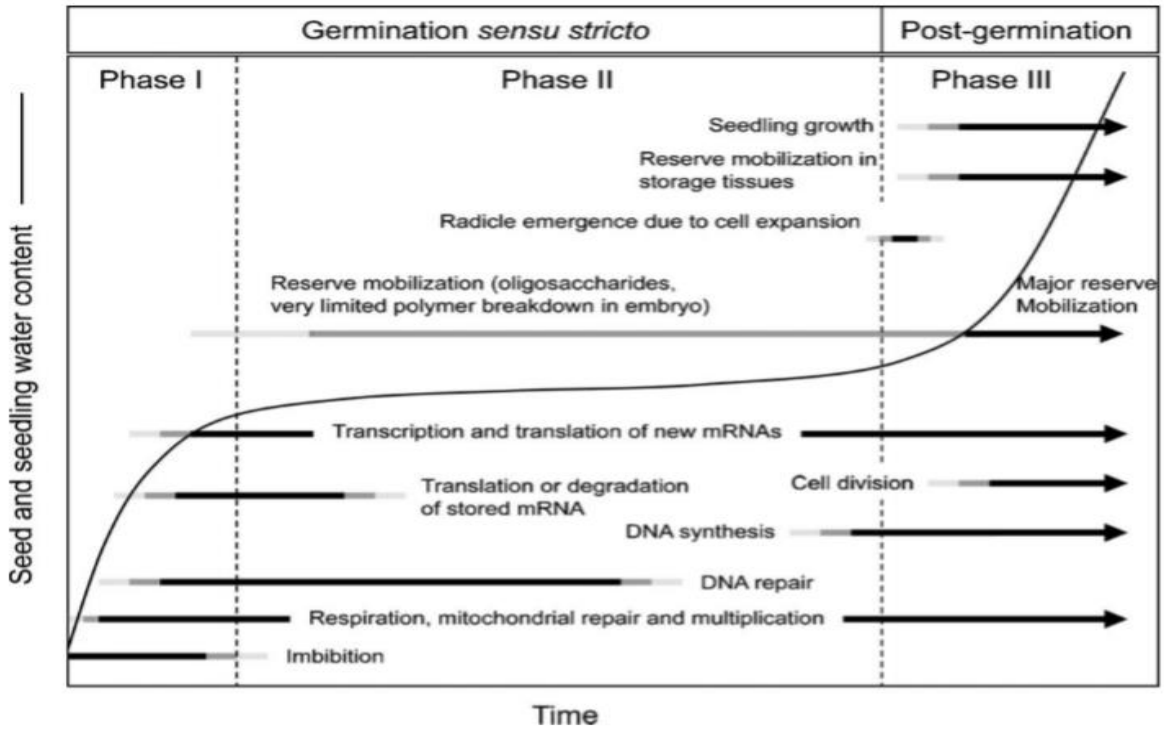


Figura 1: Evolução temporal dos eventos físicos e metabólicos que ocorrem durante a germinação (Fases I e II) e crescimento inicial de plântulas (Fase III). O tempo necessário para a ocorrência desses eventos varia entre as espécies e é influenciado pelas condições de germinação. A curva mostra um curso de tempo estilizado de captação de água.(NONOGAKI, 2010), Modificado de (NONOGAKI et al., 2007; BEWLEY 1997).

A secagem e a reidratação de uma semente a partir do estado seco impõem estresses consideráveis aos componentes celulares; após a embebição, há vazamento de solutos indicativos de dano temporário à membrana. Organelas como as mitocôndrias, vitais para respiração eficiente e metabolismo energético, são danificadas e reduzidas em número; seu reparo e substituição devem ocorrer durante a germinação. Mesmo o DNA não escapa à severidade da secagem e reidratação sem alguns danos, e o reparo é uma prioridade precoce. Assim, prevê-se que, após a embebição, a síntese de enzimas e compostos para limitar e reparar o dano celular seja predominante. (NONOGAKI, 2010).

Enquanto a captação de água por uma semente é rápida, a retomada do metabolismo em estado estacionário é mais gradual. Um evento inicial durante a fase I de embebição é a retomada do metabolismo energético. As sementes secas maduras contêm mitocôndrias com membranas internas pouco diferenciadas e com enzimas funcionais necessárias para a respiração, como as do ciclo de Krebs e oxidases terminais, estão presentes, o que provavelmente fornece ATP suficiente da fosforilação oxidativa por várias horas após o início da embebição (HOURMANT; PRADET, 1981). Essas enzimas podem ser protegidas nas sementes secas por proteínas abundantes em embriogênese tardia (LEA) específicas da mitocôndria (GRELET et al., 2005; TOLLETER et al.,2007). As reações de oxidação mitocondrial aumentam após a conclusão da embebição, durante a Fase II, à medida que as mitocôndrias sofrem reparo e replicação. Existem dois padrões distintos de desenvolvimento mitocondrial. Nas sementes armazenadoras de amido, como ervilha, feijão mungo e feijão caupi, há reparo e reativação de mitocôndrias preexistentes; no entanto, a biogênese de novas mitocôndrias é típica de sementes armazenadoras de óleo, como amendoim, mamona e abóbora (MOROHASHI; BEWLEY, 1980; MOROHASHI et al., 1981; MOROHASHI, 1986).

Duas outras vias respiratórias, a glicólise e a via da pentose fosfato (PPP), também são ativas em sementes embebidas. Muitas sementes experimentam condições anaeróbicas temporárias durante ou após a embebição, levando à produção de etanol (KENNEDY et al., 1992). A via glicolítica predomina quando a produção de ATP mitocondrial é restringida pela baixa disponibilidade de oxigênio, geralmente devido à permeabilidade limitada das estruturas ao redor do embrião. Por outro lado, quando as mitocôndrias se tornam ativas, a PPP predomina (ROBERTS; 1964a, 1964b). Compostos contendo nitrogênio, como nitrato e nitrito, liberam sementes da dormência (HENDRICKS; TAYLORSON, 1974; COHN et al., 1983, HILHORST; KARSSEN, 1989), agindo hipoteticamente como receptores de elétrons, afetando a taxa de transporte de elétrons ou causando a oxidação do NADPH, permitindo assim um maior fluxo de carbono através da PPP (ROBERTS, 1964b, ROBERTS; LORD, 1979). O nucleotídeo de pirimidina oxidada NADP é uma coenzima da glicose-6-fosfato desidrogenase, que é um elo fundamental entre a via da glicólise e a PPP. A eficácia do nitrato na promoção da germinação é exercida por sua redução a nitrito, hidroxilamina ou óxido nítrico (NO) (HENDRICKS; TAYLORSON, 1974). O

NO é reconhecido como um componente importante da transdução de sinal e pode acelerar o fluxo metabólico através da PPP, aumentando indiretamente a oxidação do NADPH (BETHKE et al., 2007a), embora possa estimular a germinação por outras vias, como as envolvidas no metabolismo hormonal, por exemplo. O NO promove a biossíntese de giberelina (GA) em Arabidopsis (BETHKE et al., 2007b). O nitrato (daí o NO) poderia agir desativando o ácido abscísico (ABA)(MATAKIADIS et al., 2009).

Embora proteínas e membranas estejam protegidas na maturidade de sementes secas, ainda ocorrem danos durante a maturação, secagem, armazenagem e embebição. As estruturas de membrana celular que são mantidas em uma fase de gel durante a secagem da maturação sofrem uma transição para uma fase cristalina líquida quando reidratadas (CROWE et al., 1989). Algumas membranas são danificadas durante essa transição de fase, o que resulta no vazamento de solutos das células (COPELAND; MCDONALD, 2012).

Sementes embebidas geram espécies reativas de oxigênio (ERO) durante a captação de água (WOJTYLA, 2006). Durante a germinação de sementes oleaginosas, há uma geração considerável de espécies reativas de oxigênio (ROS) por oxidação de ácidos graxos. A síntese de enzimas envolvidas na mitigação do estresse oxidativo foi demonstrada com proteômica na germinação de sementes de Arabidopsis (GALLAND et al., 2014). Um papel positivo da ERO na liberação da dormência de sementes foi proposto (ORACZ et al., 2007a; ORACZ et al., 2009; SCHOPFER, 2001). No entanto, em sementes não dormentes, os radicais livres podem ser prejudiciais às proteínas e outros componentes celulares. As sementes de ervilha seca contêm superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, desidroascorbato redutase e glutationa redutase, que estão envolvidas na eliminação de radicais livres gerados durante a embebição (WOJTYLA, 2006), assim como, em sementes de *Butia capitata* após a embebição, as atividades da superóxido dismutase e da glutationa redutase aumentam, seguida pela catalase, diminuindo assim o estresse oxidativo (BICALHO et al., 2019). Estas enzimas fazem parte de um complexo antioxidante nas sementes e podem contribuir para o reparo e/ou proteção de proteínas e outros compostos poliméricos durante a embebição.

Mesmo que as fases da germinação não definem temporariamente os eventos metabólicos que ocorrem dentro das sementes em germinação, pois estes são

confluentes (figura 1), na literatura é descrito os principais eventos dentro dessas fases servindo como referência para estudos pontuais dentro do fenômeno de germinação. Em estudos para se entender a mobilização de reservas durante a germinação foi comparado o perfil proteômico de sementes de soja com arroz durante a germinação, foram identificadas 215 proteínas metabólicas nas sementes de soja em germinação, destas foram detectadas 59 proteínas metabólicas lipídicas e a maioria das enzimas eram lipoxigenases (HAN et al., 2013). Desta forma, proteínas e óleos são as duas principais reservas em sementes de soja,em que, lipídios podem ser mobilizados pela via dependente de lipoxigenases durante a germinação das sementes de soja. Além dessas, 36 proteínas antioxidantes sendo as três mais abundantes a glutationa S-transferase (GST), tioredoxina e a peroxirredoxina foram as três proteínas mais abundantes, todos eles podem reduzir o dissulfeto das proteínas alvo e manter essas proteínas em seu status funcional (BUCHANAN, 2005; MEYER, 2009). Isso indica que há uma preferência em proteger as proteínas funcionais do ataque de Espécies Reativas de Oxigênio durante a germinação das sementes.

Então, para uma excelente germinação é imprecidível a presença de proteínas que participam da regulação do ácido abscisico e giberilinas, além das participantes das vias glicolítica para obtenção de energia, de enzimas que participam da mobilização de reservas, assim como, enzimas anti-oxidantes e de reparo, além de outros proteínas com diferentes funções. Sendo assim, a eficiência e quantidades destas proteínas podem estar relacionadas ao vigor das sementes, que por sua vez será capaz de germinar superando as barreiras impostas até um certo nível de deterioração das sementes.

2.2 Fenômeno da deterioração de sementes

Os fenômenos de germinação, deterioração e vigor são intrinsecamentes interligados (figura 2), a queda do vigor precede a queda da taxa de germinação de lotes de sementes a medida que o nível de deterioração nas sementes é elevado (MARCOS-FILHO, 2015).

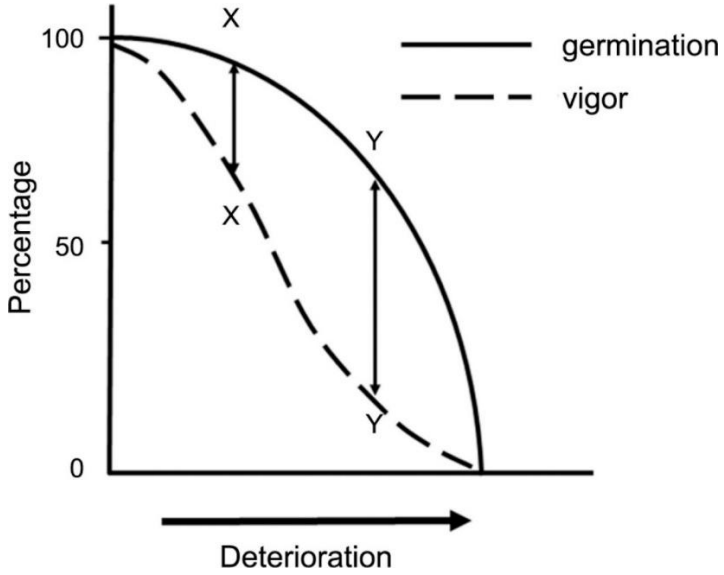


Figura 2 Relações entre a germinação e o vigor das sementes em associação com o progresso da deterioração d. Os pontos X e Y nas curvas de germinação e vigor correspondem a diferentes lotes de sementes e ilustram a diferença crescente entre a germinabilidade e o vigor à medida que a deterioração progride. (Adaptado de DELOUCHE; CALDWELL, 1960). Um lote de sementes de alta qualidade (X) que está menos deteriorado mostrará uma diferença relativamente pequena nos resultados dos testes de germinação e vigor. No entanto, um lote de sementes (Y) de qualidade fisiológica inferior com maior nível de deterioração terá maior germinação realizada em condições ideais, mas com vigor extremamente baixo.(MARCOS-FILHO, 2015).

O processo de envelhecimento (deterioração) da semente pode ser descrito como irreversível, cumulativo e inexorável. Esse processo pode resultar em atraso na emergência das plântulas e diminuição da resistência ao estresse ambiental no processo de germinação e durante o crescimento inicial das plântulas (MCDONALD, 1999).

Inicialmente foi descrito que os primeiros sinais da deterioração se davam na desorganização da membrana plasmática das células através da peroxidação lipídica devido a lipoxigenases (DELOUCHE; BASKIN, 1973) e devido ao acumulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) (MORSCHER et al., 2015; SANO et al., 2016). Porém com o advento das técnicas de biologia molecular, está se evidenciando que a peroxidação lipídica não é o início da deterioração, mas o resultado da depressão da atividade antioxidante (EBONE et al., 2019). Portanto, as EROS, ainda são a principal causa da deterioração das sementes (ZHANG et al., 2021).

No estágio inicial de embebição, as sementes podem fazer certos reparos, o que está relacionado ao atraso da germinação em sementes relativamente velhas (EBONE et al., 2019 ; XU et al., 2020). No entanto, à medida que a semente envelhece, danos graves excedem sua capacidade de se auto-reparar e as sementes acabam por perder sua viabilidade (BEWLEY et al., 2013).

O envelhecimento da semente não é igual para todos os tipos de sementes; até no mesmo lote de sementes, diferentes indivíduos apresentarão diversos níveis de deterioração. Considerando o mesmo ambiente de armazenamento, diferentes espécies apresentam variação na manutenção da sua viabilidade (germinação) (NAGEL; BÖRNER, 2010). Essas diferenças entre as espécies foram equiparadas a vários parâmetros bioquímicos, como os níveis de tocoferóis, lipocalinas e polifenóis antioxidantes, que estão positivamente correlacionados com os comportamentos de armazenamento de sementes (SANO et al., 2016).

A maturidade da semente no momento da colheita afeta a viabilidade da semente (RAO et al., 2017). Sementes maduras toleram o armazenamento muito melhor do que sementes imaturas no mesmo lote de sementes (COPELAND; MCDONALD, 2012). No entanto, atrasar a colheita também pode induzir ao processo de envelhecimento em condições de campo, especialmente na presença de um alto teor de umidade das sementes, o que diminui a viabilidade de armazenamento posterior (BEWLEY et al., 2013). O momento mais adequado para o armazenamento é após as sementes atingirem a maturidade fisiológica ou atingirem seu peso seco máximo. Além disso, vários estresses durante o desenvolvimento da semente, como deficiências minerais, infecção fúngica do campo, lesões mecânicas causadas por insetos e pássaros, água e temperaturas extremas (MCDONALD; NELSON, 1986 ;

RAO et al., 2017), e a colheita, bem como o manuseio pós-colheita das sementes, como o processamento por máquina, também podem reduzir a viabilidade das sementes (RAO et al., 2017).

Em geral, a viabilidade de sementes ortodoxas armazenadas pode ser prolongada usando armazenamento seco e frio, enquanto sementes tendem a se deteriorar mais rapidamente com altas temperaturas e umidade relativa (ELLIS; HONG, 2006 ; HARTMANN-FILHO et al., 2016). Duas abordagens gerais têm sido usadas para estudar o envelhecimento da semente. Na primeira, as sementes são armazenadas por vários anos em condições naturais. No entanto, como isso requer muito tempo para revelar mudanças nas sementes, as condições de envelhecimento artificial também podem ser usadas, como vários dias de armazenamento em alta temperatura e alta umidade relativa (POURNIK et al., 2019). Esse tratamento também é conhecido como 'envelhecimento acelerado' ou 'tratamento de deterioração controlada', no qual pode simular os eventos bioquímicos e moleculares que ocorrem durante o envelhecimento natural das sementes (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008). Consequentemente, este tratamento tem sido amplamente utilizado por empresas de sementes para testar o vigor de uma variedade de cultivares de sementes (AOSA, 1983; POURNIK et al., 2019). A nível fisiológico é perceptível que existe uma relação inversas entre a deterioração e o vigor de sementes. Logo é razoável inferir que exista mecânismos moleculares padrão que relacionem ambos os fenômenos.

2.3 Fenômeno do vigor de sementes

O vigor das sementes depende essencialmente da capacidade de resistir aos efeitos deletérios do envelhecimento (deterioração) (VENTURA et al., 2012). Portanto, o vigor e a deterioração são fenômenos relacionados.

Os primeiros conceitos de vigor foram estabelecidos na década de 50, como expressão do conjunto de atributos da semente que permitem a obtenção de um estande de plantas em condições desfavoráveis de campo (AOSA, 1983). Esse conceito de vigor foi refinado por décadas de pesquisas, adquirindo outras conotações, como render um estande de planta adequado sob uma ampla gama de

condições ambientais, e outros indicadores de qualidade também foram adicionados, como a emergência rápida e uniforme de plantas (MARCOS-FILHO, 2015). Portanto, o vigor pode ser medido pela alta taxa de germinação de sementes, uniformidade e crescimento das mudas sob condições adversas (ZHANG et al., 2015). Além disso, a vida útil das sementes é um componente importante do vigor das sementes, que depende do potencial de conservação fisiológica e do material genético das sementes e das condições encontradas durante o armazenamento (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008; WALTERS et al., 2010).

Como o alto vigor é um pré-requisito para um estabelecimento de povoamento eficiente e alto rendimento da colheita, ele tem importantes consequências econômicas e ecológicas. A capacidade das sementes de persistir nos solos também influencia a dinâmica populacional dos ecossistemas, e a duração que as sementes permanecem viáveis em um banco de genes determina o custo de sua conservação, bem como a capacidade dos curadores em manter a identidade genética da amostra (BLACK et al., 2006).

Plantas originadas de sementes de alto vigor apresentaram maior eficiência na fixação de nitrogênio. Além disso, baixos níveis de vigor resultaram em maior variabilidade de rendimento entre as plantas. No entanto, plantas cultivadas a partir de sementes de alto vigor exibiram maior rendimento devido a maior densidade populacional (SCHUCH et al., 2009; SCHEEREN et al., 2010; CAVERZAN, et al., 2018).

Além das técnicas de evelhecimento acelerado e deterioração controlada, O vigor da semente também pode ser afetado e estudado pela técnica de priming, uma técnica de embebição de curta duração seguida de ressecagem antes da fase III da germinação, que melhora a germinação e a taxa de emergência e diminui a sensibilidade da semente a fatores externos (HEYDECKER et al., 1973; MCDONALD, 2000).

A nível molecular o vigor das sementes está bem relacionado com proteínas que possuem capacidade de reparo e moleculas anti-oxidantes. Sementes de alta qualidade possuem mecanismos de reparo eficazes para neutralizar a deterioração (VENTURA et al., 2012).

Contudo, O vigor e a longevidade das sementes ainda não foram intensivamente direcionados em programas de melhoramento, mas com a identificação de genes e biomoléculas relevantes, há perspectivas de melhorar essas características através do melhoramento molecular. Além das proteínas antioxidantes já discutidas, outras proteínas tem sido direcionada a atenção para o melhoramento do vigor de sementes. Por exemplo, a proteína l-isoaspartil metiltransferase (PIMT) que desempenha um papel importante no reparo de proteínas danificadas nas sementes catalisando a conversão de resíduos anormais de l-isoaspartil em sua forma normal de l-aspartil (DINKINS et al., 2008; OGE et al., 2008). Um alto nível de atividade PIMT também foi observado em sementes em germinação de Nelumbo nucifera que exibem uma longevidade de semente notavelmente de longo prazo (quase 1300 anos) (SHEN-MILLER, 2002). Além dessa, um fator de transcrição específico da semente que regula a expressão da proteína de choque térmico (HSFA9) também demonstrou estar envolvido na longevidade da semente; no entanto, ainda não está claro se as proteínas de choque térmico expressas são ativas durante o armazenamento e evitam danos ou se são ativas mais tarde durante a embebição e podem reduzir os efeitos do envelhecimento (BEWLEY et al., 2013).

Relatar sobre as cysteine proteases e phytocystatins no processo de vigor/maturação da semente.

2.4 Qualidade fisiológica de lotes de sementes

Um lote de qualidade apresentam atributos genéticos, físicos, sanitários e fisiológicos. Todos os atributos são importantes para produção de lotes de sementes de qualidade, porém uns tem um maior impacto inicial maior do que outros. O atributo de qualidade genético diz respeito a ausência de mistura varietal e de outra especies, o físico a ausência de material inerte junto a massa de sementes do lote, sanitário a ausência de pragas e doenças e por fim o atributo fisiológico que diz respeito a alta germinação e vigor dos lotes. (MARCOS-FILHO, 2015).

Para cultura da soja, a semente de qualidade é um insumo indispensável, sendo que a qualidade ou potencial fisiológico de sementes se relaciona diretamente com a obtenção de stand adequado de plântulas, homogeneidade e produtividade da cultura (MARCOS-FILHO, 2005). O ponto máximo de qualidade fisiológica é

alcançado pelas sementes quando as mesmas adquirem maturidade fisiológica na planta mãe (MARCOS-FILHO, 2015), porém depois disto, ao longo do processamento até o plântio das sementes há ocorrencia da deterioração e redução do vigor, portanto qualidade. A utilização de semente de soja de alta qualidade é um fator importante que pode favorecer o êxito da cultura (FRANÇA-NETO et al., 2010). A capacidade de germinação, o vigor e a longevidade são os parâmetros utilizados na caracterização e avaliação da qualidade fisiológica das sementes (MARCOS-FILHO, 2015). Ou seja, A qualidade fisiológica reúne informações sobre a germinação (viabilidade) e o vigor de sementes. Sendo assim, Sua avaliação segura permite identificar lotes de sementes que possuem maior probabilidade de apresentar o desempenho desejado durante o armazenamento e em campo.

Na definição strictu senso, a germinação de sementes é um complexo fenômeno que se inicia com a embebição de água por sementes madura e resulta na protrusão da raiz primária (NONOGAKI et. al., 2010). Do ponto de vista tecnológico (agronômico), a semente é considerada germinada quando após embebição dá origem a uma plântula normal, ou seja, que apresente todas as suas estruturas essenciais. Este segundo ponto de vista fica ainda mais claro quando se trata de uma população ou lotes de sementes, por exemplo, quando determinados lotes de características semelhantes (mesmo genótipo) são comparados e apresentam mesma taxa de germinação, porém quando observado o desenvolvimento das plântulas é nítido uma diferença. Isso implica que há diferenças no estado de qualidade e/ou deterioração das sementes que podem não ser detectadas na germinação strictu senso ou até mesmo no teste de germinação. Essa diferença é remetida ao vigor de sementes que é um fenômeno de grande importância no entendimento da qualidade das sementes, principalmente nas espécies cultivadas (MARCOS-FILHO, 2015).

Na avaliação da qualidade ou potencial fisiológico, a germinação é uma característica que superestima o desempenho das sementes, pois é obtida em condições ideais de temperatura, umidade, e disponibilidade hídrica para a espécie, sendo necessário analisar outras variáveis para complementar as informações obtidas junto ao teste de germinação, como os testes de vigor (MARCOS-FILHO, 2015). Que por sua vez são mais sensíveis. A maioria dos testes de vigor são realizados após a embebição e, consequentemente, ativação dos mecanismos de germinação pelas sementes, que resulta na obtenção de variáveis que se relacionam à longevidade e/ou

capacidade de formação de plântula sob ampla variação de condições ambientais. Podem, a exemplo ser utilizados os teste de emergência em substrato ou em campo, avaliação da velocidade de germinação e desenvolvimento de plântulas (MAGUIRE, 1962; NAKAGAWA, 1999), teste de envelhecimento acelerado (MARCOS-FILHO, 1999), teste de Tetrazólio (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2018). Assim como condutividade elétrica (MARCOS-FILHO; VIEIRA, 2009), teste de emissão de etanol (SIQUEIRA, 2018) e avaliação do perfil de isoenzimas (VIEIRA et al., 2013).

2.5 Abordagem Proteômica para anális de sementes

A análise do proteoma é uma ferramenta importante que pode ser usada para comparar misturas complexas de proteínas e obter uma grande quantidade de informações sobre as proteínas individuais envolvidas na resposta biológica e / ou processo específico (RAJJOU et al., 2008b; GALLARDO et al., 2001; JOB et al., 2005; RAJJOU et al., 2006; MIERNYK; HAJDUCH, 2011; WANG et al., 2015). Além disso, a proteômica oferece uma oportunidade para examinar as mudanças simultâneas e para classificar os padrões temporais do acúmulo de proteínas que ocorrem em processos de desenvolvimento de sementes (HUANG et al., 2012; WANG et al., 2012) assim como na mobilização de reservas durante a germinação em sementes de soja (HAN et al., 2013).

Análises proteômicas recentes investigaram o efeito do envelhecimento acelerado em sementes de Brassica napus (YIN et al. 2015). Este estudo identificou 54 proteínas que foram associadas principalmente ao metabolismo das sementes, destino das proteínas, resposta ao estresse e desenvolvimento das sementes. Além disso, eles mostraram que o conteúdo de ácido abscísico (ABA) aumentou em sementes tratadas com envelhecimento acelerado em comparação com sementes controle. Esses resultados indicaram que o tratamento acelerado do envelhecimento afeta não apenas a fisiologia básica das sementes, mas também o vigor das sementes (YIN et al. 2015). Algumas análises proteômicas da mudança do vigor da semente foram relatadas (Catusse et al., 2011, XIN et al., 2011), como para o efeito da deterioração em sementes de soja (MIN et al., 2016, 2017). Sementes que apresentam variação no nível de vigor, apresentaram variação do perfil proteômico

em diversos estudos. Embora esses relatórios tenham fornecido uma grande quantidade de informações sobre o vigor das sementes, os principais eventos (proteínas) associados à mudança do vigor das sementes ainda são pouco compreendidos.

Estudos de proteômica mostram que, quando um aumento na abundância de uma determinada proteína se correlaciona com, por exemplo, um aumento no vigor ou alguma outra característica benéfica, é uma indicação de que o processo no qual a proteína está envolvido é importante para esse processo; e vice-versa para proteínas diminuindo em abundância. Embora esse não seja o caso, os estudos proteômicos identificaram muitas proteínas que são potencialmente importantes para o desenvolvimento, vigor e/ou germinação da semente ou para características mais específicas da semente, como resistência a patógenos fúngicos. Proteínas que foram identificadas como particularmente importantes para pelo menos dois desses processos de sementes estão envolvidas na desintoxicação de ROS, o citoesqueleto, glicólise, biossíntese de proteínas, modificações pós-tradução, metabolismo de metionina e proteínas abundantes em embriogênese tardia (LEA). Este tipo de dados não pode ser obtido por transcriptômica, pois geralmente há uma correlação fraca entre as quantidades de mRNA e as quantidades de proteínas (WANG et al., 2015).

O destaque de proteínas potencialmente importantes pela proteômica fornece aos pesquisadores e melhoristas de plantas pontos de partida para estudos adicionais, onde o próximo passo será frequentemente olhar para a expressão e regulação do gene que codifica a proteína de interesse em sua planta favorita. O objetivo final é incorporar genes que codificam proteínas particularmente promissoras nos programas de melhoramento. Além de identificar proteínas marcadoras de maior ou menor qualidade fisiológica de sementes, que no futuro poderá contribuir para o desenvolvimento de testes que avaliam o vigor de sementes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual de Santa Cruz-BA nos laboratórios de fitotecnia e no laboratório de Proteômica do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG). As amostras dos lotes comerciais de sementes de soja (safra 2019/20) estavam armazenados em geladeira. cinco amostras de lotes de sementes de soja foram selecionadas por estarem viáveis. Destes cinco lotes, três eram da variedade M8808 (lotes B; D e E) e dois da M8374 (lotes G e H).

Devido a baixa umidade (~ 3%) das amostras de sementes armazenadas, antes dos testes as sementes foram pré-condicionadas por 16 horas sob uma tela de alumínio dentro de caixas de plástico (11,0×11,0×3,5cm) com água (BRASIL, 2016).

Após a caracterização fisiológica apenas dois lotes (B e E) foram selecionados para o teste de tetrazólio, para a caracterização da curva de embebição e para as análises proteômicas (figura 3).

3.1 Caracterização fisiológica de lotes de semente de soja

3.1.1 Testes de germinação e vigor

Os cinco lotes foram caracterizados fisiologicamente através de testes de germinação e vigor:

Teor de água (TA): Método da estufa, duas repetições de 25 sementes em estufa a 105 ± 3 °C, durante 24 horas, sendo os resultados expressos em porcentagem (base úmida), e realizados antes e após o envelhecimento acelerado (BRASIL, 2009).

Teste de Germinação (GE), Primeira Contagem (PC) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG): em papel para germinação de sementes, previamente umedecido com água destilada à razão de 2,5 vezes o seu peso seco, foram distribuidas 50 sementes em 4 repetições sobre duas folhas de papel, sendo mais uma folha colocada sobre as sementes e enrolando-se todo o conjunto. Os rolos foram mantidos em câmara para germinação de sementes temperatura de 30 °C constante. As contagens de germinação de plântulas normais foram realizadas no 5° e 8° dias após a semeadura e os resultados foram expressos em porcentagem (BRASIL, 2009). Concomitantemente, a Primeira Contagem foi determinada pela porcentagem de plântulas normais germinadas no quinto dia após a instalação do teste de germinação (NAKAGAWA, 1999; BRASIL, 2009). utilizou-se os valores da germinação de plântulas normais na primeira e segunda contagem para calcular o índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962).

Biomassa: massa fresca total e massa seca total- avaliou-se a massa fresca das plântulas obtidas na primeira contagem de germinação, sendo pesadas 10 plântulas por repetição. Em seguida, as plântulas foram colocadas para secar em estufa de circulação de ar forçada a 70 °C, até obter peso constante da massa seca. Resultados expressos em miligramas (mg).

Biometria de plântulas: Comprimento de raiz e plântula - quatro amostras de 20 sementes de cada lote foram distribuídas em rolos de papel-toalha umedecidos com água destilada na proporção de 2,5 por 1 (mL de água destilada por massa do papel seco em gramas) e mantidos em um germinador a 25 °C, por cinco dias (NAKAGAWA, 1999). Sobre o papel-toalha umedecido foi traçada uma linha no terço superior, na direção longitudinal, onde as sementes foram colocadas direcionando-se a micrópila para baixo. O comprimento de raiz primária e das plântulas consideradas normais (Brasil, 2009) foi determinado ao final do quinto dia, com o auxílio de paquímetro, obtendo resultados em centímetro por plântula (cm / pl).

Teste de emergência em substrato (EP) e Índice de Velocidade de emergência (IVE): Em copos plásticos contendo subtrato comercial foram semeadas 50 sementes (cinco por copo) em quatro repetições por lote, foram contabilizadas plântulas que tiveram os cotilédones abertos, o tempo da contagem foram aos cinco,

sete, nove e onze dias após semeadura, sendo expresso em porcentagem. O IVE foi calculado com os valores das três contagens (MAGUIRE, 1962).

Teste de envelhecimento acelerado (EA): foram utilizadas 250 sementes para cada lote, distribuídas em caixas de plástico (11,0×11,0×3,5cm), possuindo em seu interior telas de alumínio acoplada, sobre a qual as sementes foram colocadas em camada única. Em cada caixa, foram adicionados 40 mL de água destilada, as quais foram mantidas em estufa, à temperatura de 41 °C por 48 horas (MARCOS-FILHO, 1999). Após o período de envelhecimento, as sementes foram submetidas ao teste de germinação e (BRASIL, 2009) e as leituras realizadas no quinto dia após instalação do teste. Além disso, foi feito o teor de água após o envelhecimento.

Teste de tetrazólio: Foram utilizado 4 repetições de 50 sementes para os lotes B e E, as sementes foram pré-condicionadas por 16 horas sob uma tela de alumínio dentro de caixas de plástico (11,0×11,0×3,5cm) com água, depois condicionada em papel tipo germitest em BOD à 25 °C durante 16 horas, após condicionamento, para coloração, as sementes foram embebidas na solução de 0,075% de tetrazólio em copinhos de plástico, à 40 °C em câmara BOD por três horas, após isto as sementes foram lavadas e feito a interpretação. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes com alto vigor e procetagem sementes viáveis segundo classificação (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2018).

3.1.2 Caracterização da curva de embebição durante a germinação

Foram utilizadas 100 sementes para cada Lote (B e E) com 4 repetições de 25 sementes. Foi determinado o TA inicial para cada lote e para cada repetição foi obtido o peso inicial. A sementes foram colocadas para embeber em rolos de papel do tipo germitest, foram utilizadas três folhas. O papel foi umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o seu peso seco. Os rolos com as sementes foram colocados na temperatura de 25 °C, em BOD. Durante quatro dias foram feitas sucessivas pesagens, para estas avaliações as sementes foram retiradas do papel, corridas sob papel toalha para retirada do excesso de umidade superficial e pesadas em balança digital obtendo-se o peso final. Quando necessário, a cada pesagem, o papel foi reumedecido. Com os valores do teor de água inicial, peso inicial e peso final é

possível calcular-se o teor de água final de cada repetição. Dessa forma, constuiu-se um gráfico com a curva de embebição dos lotes B e E, sendo eixo x representado pelo tempo em horas e o eixo y o teor de água em procentagem. A cada pesagem era também monitorado se houve protusão da raiz primária (germinação strictu-senso) nas sementes, aos 6 dias após embebição foi classificada as plântulas normais e anormais.

3.2 Proteômica em sementes de soja

3.2.1 Obtenção dos tratamentos

Nesta etapa foram utilizadas amostras do lote B e E, concomitantemente com a caracterização da curva de embebição foram retiradas amostras de seis sementes de cada repetição (totalizando um pool de 24 sementes).que comporam os tratamentos utilizado posteriormente para a analise proteômica.

Para isso, 4 repetições de 25 sementes foram preparadas da mesma forma que a caracterização da curva de embebição. A primeira amostragem retirado antes das sementes serem impostas a embebição, formando os tratamentos BI e EI. A segunda amostragem retirado aproximadamente 20 h após inicio da embebição, tratamentos BII e EII. A terceira amostragem composta apenas de sementes apresentando protusão da raiz primária (germinação strictu-senso) coletadas às 51 h após embebição, formaram os tratamentos BIII e EIII. Os numeros romanos I, II e III na nomeclatura dos tratamentos refere-se respectivamente as fases um, dois e três da germinação. E as letra B e E, respectivamente aos Lotes B (maior qualidade) e E (menor qualidade).

3.2.2 Desinfestação superficial das sementes e excisão do eixo embrionário com parte da região vascular.

Logo após a obtenção de cada tratamento (BI, EI, BII, EII, BIII e EIII) foi feito a desinfestação superficial das sementes submergindo em NaOCl 1,05% por 5 minutos, depois em álcool 70% por 10 segundos e depois 3 lavagens em água (destilada e autoclavada) por 5 minutos (HENNINGER, 2015). Após a desinfestação, com auxilio de bisturi foi feito a excisão do eixo embionário com parte da região vascular com um

corte diagonal feito na parte superior das sementes seguradas com pinças, o tegumento foi removido e os cortes foram imediata imersos em nitrogênio líquido para criogenização e macerados com nitrogênio liquido e Polyvinylpolypirrolidone (PVPP). Por fim as amostras foram colocados em microtubos de 2 mL e acondicionados em ultrafreezer -80 °C, até o uso.

3.2.3 Extração de proteinas

Em triplicata técnica foi feito pelo protocolo de Pirovani et al. (2008) com pequenas modificações. FASE TCA/ACETONA: 0,1 g do pó fino das amostras foram transferidas para ependorfs de 2ml devidamente identificados. O tecido foi ressuspendido em 1,5 mL de Acetona gelada (100% + 0,07% de β-mercaptoetanol) e misturado num vortex por 30 seg. Depois foi centrifugado à 14.000 rpm, por 10 min a 4 °C, repetiu-se a lavagem mais uma vez. Centrifugou-se, o líquido sobrenadante foi descartado e deixou o pellet secar por 20 min em temperatura ambiente. O pellet foi lavado lavado (4 vezes) com 1,5 mL de Ácido Tricloroacético (TCA) 10% em acetona (+ 0,07% de β-mercaptoetanol), foi misturado em vortex, após cada lavagem será centrifugado e descartado o líquido sobrenadante. O pellet foi lavado 2 vezes em TCA 10% em água (+ 0,07% de β- mercaptoetanol), mistura-se em vortex, na primara lavagem as amostras foram uma vez ultrasonicadas na configuração: 5 on / 10 off; por 1 min com amplitude de 70%. Após a primeira lavagem as amostras foram centrifugadas e descartado sobrenadante, Na segunda lavagem soltou-se o pellet e deixou precipitar por 1h e 30 minutos à -20 °C. Após isto, centrifuga-se, descarta sobrenadante e deixa secar a temperatura ambiente (Após este passo é possível guardar o pellet em -80 °C para dar continuiadade no outro dia).

FASE FENOL/SDS DENSO o pellet foi ressuspendido em 0,8 mL de Fenol (tamponado com TRIS pH 8,0) e 0,8 mL de tampão SDS (Dodecilsulfato de sódio) denso. Misturou-se num vortex por 2 min. Separou-se as fases por centrifugação à 14.000 rpm, por 10 min à 4 °C. Recuperou-se 0,3 mL da fase superior para novos microtubos devidamente identificados e adicionou-se 1,5 mL de Acetato de Amônio 0,1 M em metanol gelado, misturou-se por inversões e estocou-se no – 20 °C, por pelo menos 16 horas (overnight). Após isso, recuperou-se as proteínas por centrifugação (10.000 rpm, por 5 min à 4 °C). Lavou-se o pellet 2 vezes com 1 ml de Metanol gelado contendo Acetato de Amônio 1,0 M. onde a cada lavada tomou-se o cuidado de soltar

bem o pellet (fragmentando-o) e diluí-lo para que a solução alcance o interior do pellet. Por fim, deixou-se secar o pellet à temperatura ambiente até que toda a acetona evaporasse, então, adicionou-se 0,5 mL de Ureia 8M e fez a diluição completa do pellet. Então as amostras foram estocadas no – 20 °C até o uso.

3.2.4 Quantificação de proteínas e SDS-PAGE

Para quantificação, utilizou-se o protocolo padrão do produto comercial 2-D Quant Kit, manufaturado pela GE Healthcare Life Sciences (Reino Unido). Para averiguação da qualidade das amostras complexas, após a quantificação procedeu-se diluições necessárias para cada amostra/tratamento para aplicar num mini-gel resultando em SDS-PAGE que foi scaneado.

3.2.5 Espectrometria de massa livre de gel

O equipamento UHPL- 1290-infinity II e 6545 LC/Q-TOF da Agilent (UHPLC-QTOF-MS/MS), foi utilizado para analisar as amostras complexas de proteínas em solução, ou seja protômica shotgun, sem a nescessidade de utilização de corrida e spotagem em gel 2D. Se trata de um equipamento contendo uma Cromatografia Líquida de ultra eficiência (UHPL- 1290-infinity II) acoplada a um espectrômetro de massas (6545 LC/Q-TOF), que apresenta alta resolução.

As amostras foram digeridas em solução com tripsina seguindo protocolo padrão do Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO) (ANEXO A).

O pacote de software de aquisição e análises de dados utilizados foi o o Agilent Mass Hunter. A identificação das proteínas foi realizado com o Spectrum Mill para MassHunter Workstation. Para identificação dos espectros de massa, foi utilizado o banco de dados *Glycine max* do SwissProt. A autovalidação dos espectros foi com taxa de descobertas falsas menor que 1,2% (FDR < 1,2%).

Para análsies de dados estatísticos e plotagem dos gráficos, foi utilizando o software Mass Profiler Professional (MPP), este sistema faz parte do pacote Mass Hunter, é uma plataforma quimiométrica para explorar o alto conteúdo de informações dos dados MS e pode ser usado em qualquer análise diferencial baseada em MS para determinar as relações entre dois ou mais grupos de amostra e variáveis.

3.3 Análises Estatistica

Os testes para caracterização fisiológica foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições para cada lote. Com auxílio do software R, para comparação de cinco lotes foi realizado analise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey (α=0,05), antes as variáveis foram testadas quanto a normalidade (Shapiro-wilk) e homocedasticidade (Barttlet) atendendo aos pré-requisitos da ANOVA. Quando, para a comparação entre dois lotes, foi usado o test t (α=0,05).

Etatísticas para análise Proteômica, com o auxílio do software Mass Profiler Professional (MPP), foram feitas, análises de componentes principais (PCA), volcano plots para avaliar a regulação da expressão das proteínas, comparando dois lotes em cada fase da germinação com linhas de cortes para abundância (*p-value < 0,05*) e *fold-change a 1,5*, para identificar o nível de expressão (≥ 1,5 vezes) na abundância de proteínas. Os termos de Gene Ontology foram feitos com auxílio da ferramenta PANTHER (MI et al., 2019).

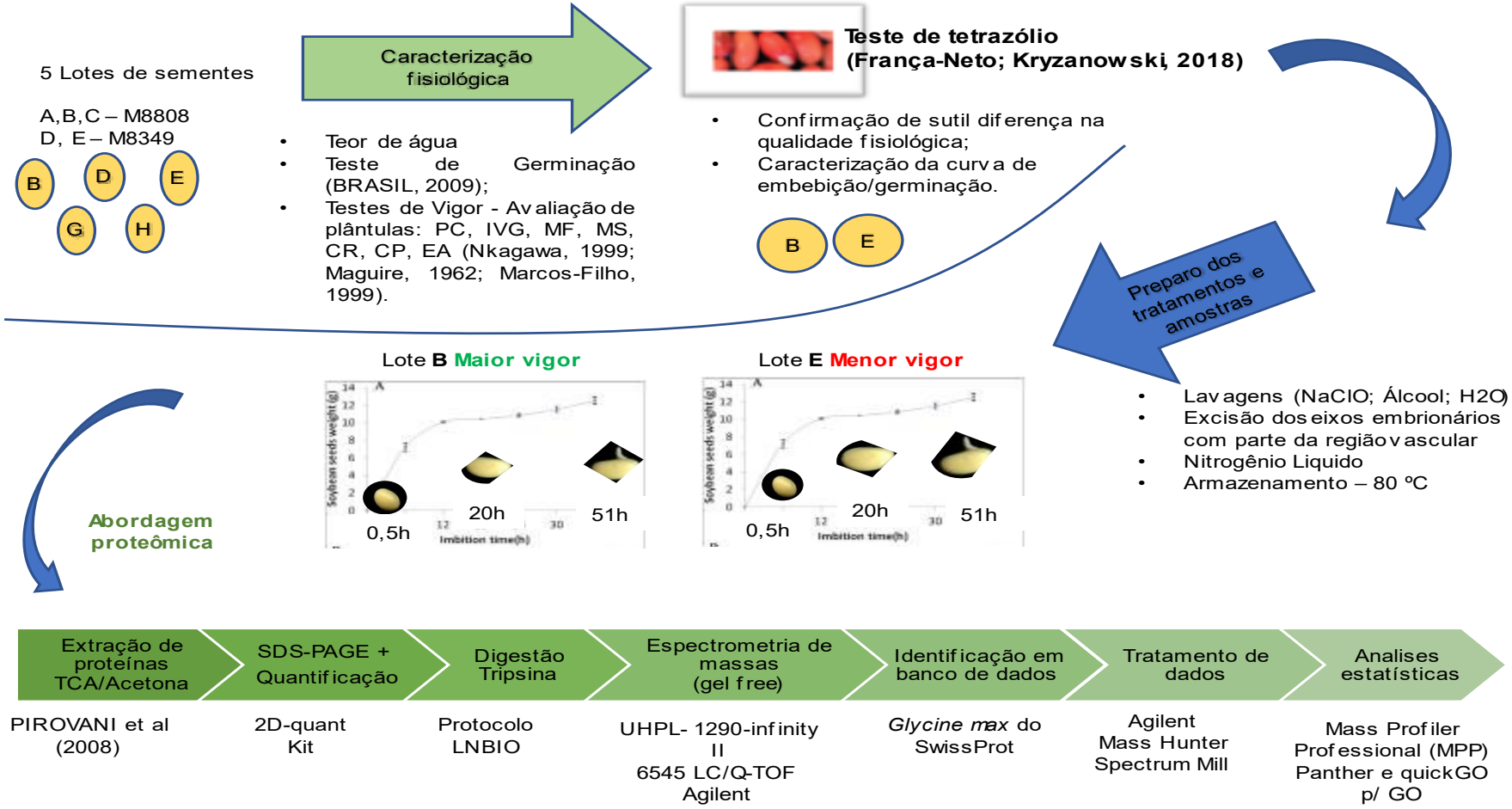


Figura 3. Diagrama esquemático do experimento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização fisiológica, identifica uma sutil variação da qualidade fisiológica de lotes de sementes de soja.

A caracterização fisiologica (germinação e vigor) de cinco lotes foram conduzidas com o intuido de selecionar dois lotes com sutis diferenças perceptíveis por alguns testes de vigor, para depois avaliação do perfil proteômico destes lotes. O vigor da semente não é uma propriedade mensurável única, mas um conceito que descreve várias características (ISTA, 1993).

Vale ressaltar que as amostras dos lotes armazenados estavam em geladeira e com teor de água (TA) de apróximadamente 3%, dessa forma, prevenindo à rapida deterioração dos tecidos. Porém, para evitar dano por embebição e eventuais erros nas avaliações da qualidade fisiológica dos lotes, antes da condução dos teste, adotou-se um procedimento de pré-condicionamento o que elevou o teor de água TA até o apresentado (Tabela 1). Os danos por sensibilidade à embebição rápida que podem ocorrer no teste de germinação em plântulas de soja, conforme descritos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), podem também ocorrer durante o preparo das sementes para o teste de tetrazólio. Normalmente esses danos ocorrem quando o grau de umidade das sementes está abaixo de 12% (FRANÇA-NETO et al., 1998a; TOLEDO et al., 2010). Desta forma, após o pré-condicionamento das amostras o TA ficou em volta de 12% e não apresentou grande variação entre lotes, menos que um ponto percentual entre os extremos, o que dá confiabilidade aos teste para comparação dos lotes entre si.

Os testes de germinação, primeira contagem e Índice de velocidade de germinação (tabela 1), apresentaram estatisticamente a mesma estratificação dos lotes, em que somente o lote G foi considerado de menor qualidade fisiológica segundo essas variáveis (GE = 76%; PC = 64% e IVG = 11,2). A PC e o IVG mesmo sendo testes de vigor são variáveis derivadas da germinação e este teste superestima a qualidade fisiológica de um lote de sementes (MARCOS-FILHO, 2015), dessa forma apresentaram baixa sensibilidade, pois só teve o poder de estratificar os lotes em 2 grupos.

A massa fresca total (MFT) estratificou os lotes em 3 grupos, o lote H (MFT =

22,5 g) apresentou maior acúmulo de massa e o pior foi o lote E (MFT = 15,4 g), os lotes B, D e G, não apresentaram diferenças estatística entre si (tabela 1). Para a variável de massa seca total, o lote H também apresentou o maior desempenho, o lote E apresentou numericamente o menor acúmulo (MST = 2,41g), porém telo teste de Tukey (α=0,05) ainda não diferiu dos lotes da mesma cultivar (B e D). Sementes vigorosas proporcionam maior transferência de massa de seus tecidos de reserva (cotilédone) para o eixo embrionário, na fase de germinação, originando plântulas com maior peso, em função do maior acúmulo de matéria. Para algumas espécies existe relação entre vigor e tamanho da semente, devido à quantidade de reserva energética armazenada na mesma (NAKAGAWA, 1999).

Tabela 1 - Caracterização fisiológica de lotes de sementes de soja cultivar M8808 (B, D e E) e M8349 (G e H). Teor de água (TA), Germinação (GE), Primeira Contagem (PC), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Massa Fresca Total (MFT), Massa Seca Total (MST), Comprimento de Raiz (CR), Comprimento de Plântula (CP).

Lote	TA	GE	PC	IVG	MFT	MST	CR	CP
	---------- % ----------			-	----- g -----		--- mm.pl^{-1} ---	
B	12.1	88 a*	87.5 a	14.3 a	17.6 b	2.51 bc	119.7 a	198.3 a
D	11.9	89 a	86 a	14.2 a	17.3 b	2.46 bc	118.05 a	207.4 a
E	11.8	87 a	83.5 a	13.8 a	15.4 c	2.41 c	104.65 a	181.4 a
G	11.5	76 b	64 b	11.2 b	17.2 b	2.56 b	83.40 a	170.4 a
H	11.5	94 a	92.5 a	15.1 a	22.5 a	3.51 a	120.7 a	212.55 a
CV (%)	-	5.58	7.86	6.89	4.09	2.33	16,71	10,61

Fonte: Dados da pesquisa
Nota: * Médias seguidas das mesmas letras, nas linhas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O teste de comprimento de plântulas estima o vigor de um lote de sementes, pois sementes mais vigorosas originam plântulas com maiores taxas de crescimento e com maior fornecimento de reservas dos tecidos de armazenamento (BAYS, et al., 2007). Os testes de comprimento de raiz e de plântula não apresentou diferenças estatisticas entre os lotes. Os valores de CR ficaram na faixa de 83,4 mm à 118,05 mm e o CP de 170,4 mm à 212 mm (Tabela 1). Estes são testes que avaliam o desempenho de plântulas normais e não conseguiu diferir estatisticamente os lotes de sementes entre si. Os teste de CR teve uma confiabilidade média, visto o

coeficiente de variação (GOMES, 1990).

O teste de emergência de plântula (EP) em substrato e seu derivado indice de velocidade de emergência (IVE) (Tabela 2), classificou o lote G como o de pior qualidade, EP = 79,5%, corroborândo com as outras variáveis. Este lote G, não poderia ser comercializado como sementes, devido a seus valores de teste de germinação, assim como EP ficarem inferior a 80% (ABRASEM, 2013). Pelo IVE o lote D ainda ficou superior ao lote E, porém igual ao lote B e H. O IVE avalia a velocidade de emergência de plântulas em condições de campo, ou seja, não controladas, pois quanto mais rápida a emergência das plântulas, maior o vigor dessas sementes, sendo que as observações são realizadas diariamente, até a estabilização da emergência dessas plântulas (OLIVEIRA et al., 2009).

Tabela 2 - Caracterização fisiológica de lotes de sementes de soja cultivar M8808 (B, D e E) e M8349 (G e H). Emergência de Plântulas (EP), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Teor de Água após Envelhecimento Acelerado (TAEA), Envelhecimento Acelerado (EA).

Lote	**EP**	**IVE**	**TAEA**	**EA**
	%	-	---------- % ----------	
B	97 a	23.8 ab	21.7	63 a
D	95 a	24.4 a	20.7	39 b
E	91 a	22.4 b	20.9	41 b
G	79 b	18.5 c	20.6	9 c
H	91 a	23.9 ab	24.1	57 a
CV (%)	3.5	3.9	-	11.8

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: * Médias seguidas das mesmas letras, nas linhas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O teste de evelhecimento acelerado (EA) (Tabela 2) estratificou os lotes em três níveis de vigor, dentre os lotes da cultivar M8808, o lote B apresentou uma germinação, após 48h de envelhecimento, EA = 63%, superior estatisticamento frente aos 39,5% e 41,5% dos lotes D e E, respectivamente. Evidenciando uma maior capacidade de resistir a deterioração, ou seja, apresenta maior vigor. O teste de envelhecimento acelerado é um teste que imprime alta temperatura e úmidade, dessa forma acelerando a deterioração das sementes, no intuito de simular um longo período de amazenamento (POURNIK et al., 2019). Além disso, pode simular os eventos bioquímicos e moleculares que ocorrem durante o envelhecimento natural das

sementes (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008). Este tratamento tem sido amplamente utilizado por empresas de sementes para testar o vigor de cultivares de sementes (AOSA, 1983; POURNIK et al., 2019). Para a cultivar M8374 seguiu o mesmo padrão de redução da germinação após o EA, o lote H sendo sempre superior ao G, apresentaram germinação após envelhecimento de EA = 57% e 9%, respectivamente. Pôde-se notar a severidade da redução de germinação no lote G após o envelhecimento, o que corrobora com outros testes de vigor e também com o teste germinação. No lote H, é observado a sinergia da rápida deterioração em lotes de baixa de baixa taxa de germinação inicial. quando o os efeitos da deterioração intensificam a deterioração já presente (MARCOS-FILHO, 2015).

Neste ponto, já é possível inferir que o lote B apresenta sutilmente maior qualidade fisiológica que o lote E, pois mesmo apresentando a mesma GE, as variáveis de MFT e principalmente o EA evidenciou esta diferença de vigor.

O teste de tetrazólio confirmou diferença entre os lotes B e E (figura 4). Foi possível inferir diferença significativa (teste t $p < 0,01$) entre os lotes B e E, para vigor, viabilidade e dano por úmidade. Os danos mecânicos e por percevejos não ouve diferença significativa, sendo assim, os principais danos ocorridos para a redução da qualidade dos lotes é evidenciado devido a deterioração por úmidade, pela classificação do teste de tetrazólio (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2018). Seguindo a classficação do teste, 74% das sementes do lote B verso 58,5% do lote E apresentaram vigor entre um e três. A viabilidade foi de 90% para o lote B contra 82,5% para o lote E. Em relação a danos por umidade, sementes do lote B apresentaram 8,75 pontos percentuais a menos que o lote E. Para sementes de soja, o teste de tetrazólio é o mais recomendado, porque dá informações além da viabilidade, sobre o vigor e os possíveis danos acometidos no lote de sementes, com alta confiabilidade. Por isso, o teste de tetrazólio é utilizado em larga escala para o controle interno da produção de sementes de soja (FRANÇA-NETO; KRZYZANOWSKI, 2018).

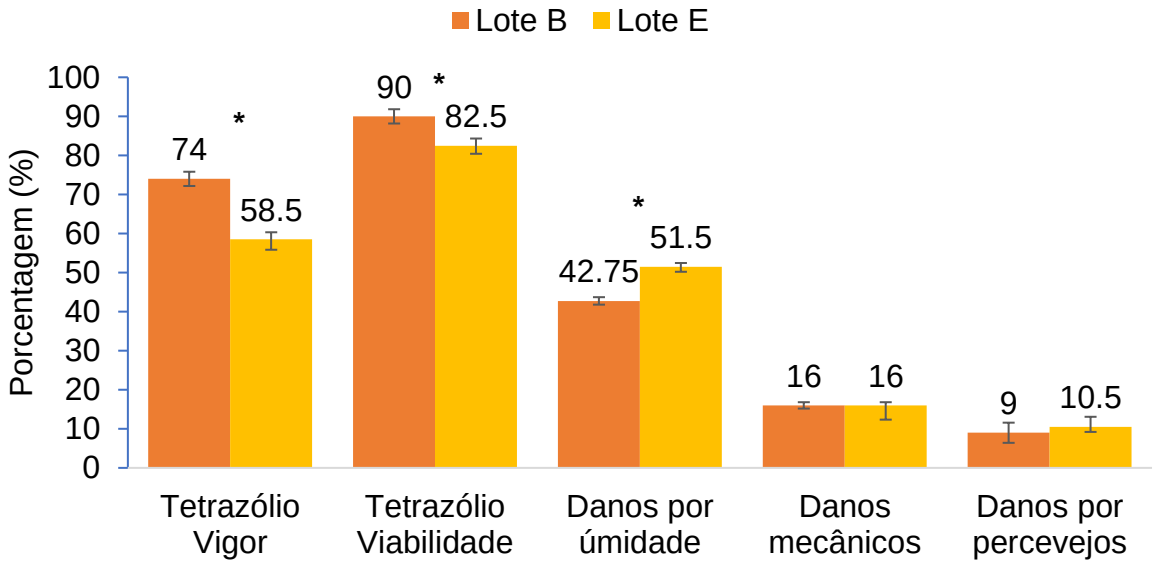


Figura 4 - Teste de tetrazólio em lotes de sementes de soja, cultivar M8808, quantificando a viabilidade, vigor e danos por umidade, mecânico e percevejo nas sementes. (*) Teste t ($p < 0,01$).

4.2 Caracterização da curva de embebição durante a germinação de sementes de soja

A curva de embebição (Figura 5) das sementes de soja apresentaram padrão trifásico, como descrito na literatura (NONOGAKI et al., 2010; HAN et al., 2013). os 2 lotes apresentaram o mesmo padrão. a partir de apróximadamente 50% do teor de água, sementes dentro das amostras começaram a apresentar protusão radicular (germinação strictu-senso).

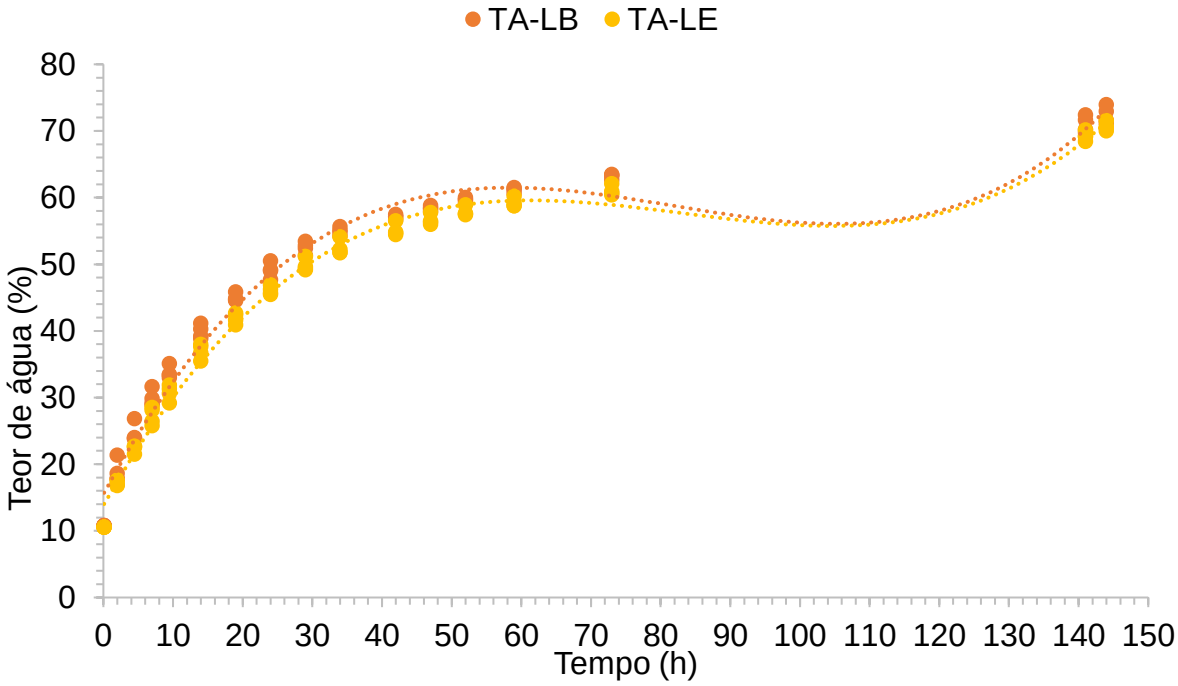


Figura 5 – Curva de embebição de dois lotes de sementes, cultivar M8808.

Com o acompanhamento da curva de embebição, os ponto para amostagem e extração do tecido da semente foram definidos. A fase I foi retirada aos 30 minutos após inicio da embebição, com teor de água menor que 20%; a fase II, 20 horas após embebição com teor de água na faixa de 40-45%; e a fase III,51 horas após embebição, com teor de água acima de 55%, em que as sementes amostradas já apresentaram protusão de raiz primária. Vale ressaltar que após 36 h de embebição, os lotes ultrapassaram em média os 10% de sementes com protusão de raiz primária. O processo de respiração é ativado durante a embebição das sementes, somente a partir das mesmas atingirem 25% de água (VERTUCCI; LEOPOLD, 1987).

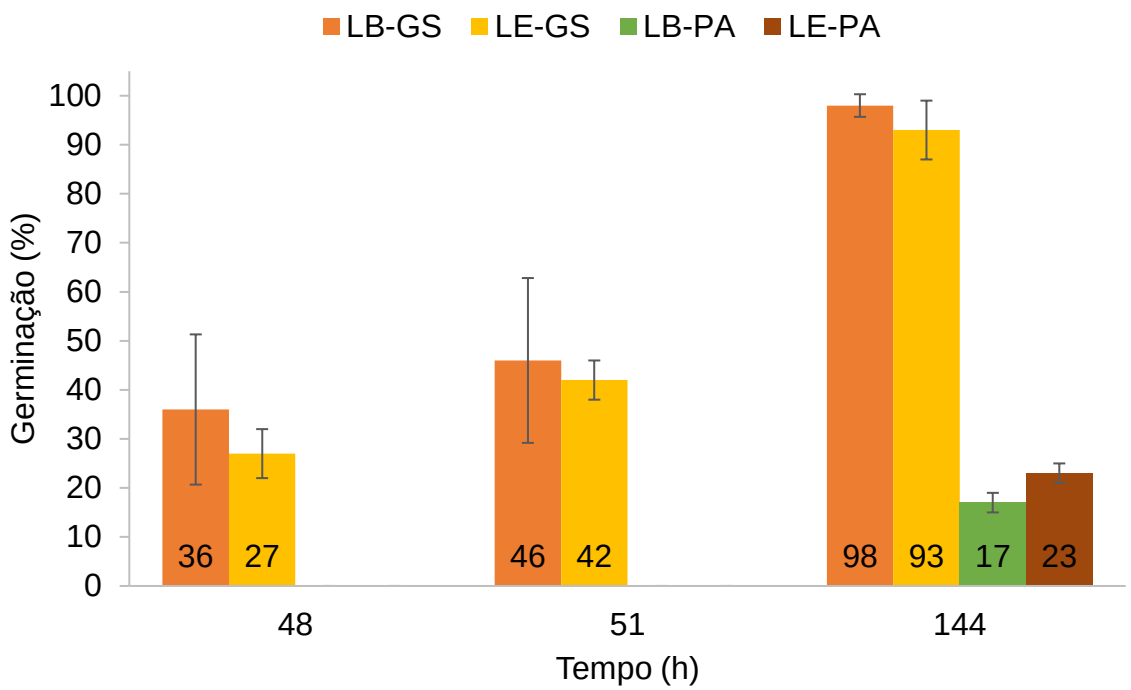


Figura 6 – Porcentagem de germinação strictu-senso (GS), a 48, 51 e 144 horas e porcentagem de plântulas anormais (PA), ao sexto dia de embebição, em dois lotes de sementes de soja, cultivar M8808

No decorrer do monitoramento da curva de embebição, também foi contabilizada a germinação dos lotes (figura 6). A nível de germinação strictu senso, não foi observado diferença estatistica entre os lotes B e E. Porém quando contabilizado as plântulas anormais ao final de 6 dias em embebição, o lote E (menor qualidade), apresentou 23% de plântulas anormais, enquanto o B apresentou 17%, diferiram estatisticamente pelo teste t (p = 0.05). Nas plântulas, os sintomas de danos por úmidade são detectados pela presença de anormalidades de plântulas (TOLEDO et al., 2010).

4.3 Análises proteômicas da germinação e vigor de sementes de soja.

4.3.1 SDS-PAGE extrato total de proteínas

A corrida em gel 1D das amostras, servem como um check-point para saber da qualidade da extração das proteínas, pois as amostras complexas de proteínas foram obtidas, visto as multiplas bandas separadas por peso molecular presente no gel (Figura 7). O marcador utilizado é de 14kDa à 97kDa, foi obtido diversas bandas de proteínas dentro desta faixa. Foi possível observar difenrença na intensidade em algumas poucas bandas comparando entre os lotes e o tempo. As proteínas majoritárias da soja são β-conglicinina e glicinina, respectivamente, globulinas 7 e 11S. A β-conglicinina é constituída de subunidades α, α' e β, com pesos moleculares de 84, 72 e 51 kDa, respectivamente, e a glicinina tem subunidades ácidas (36-40 kDa) e básicas (18-20 kDa). Devido a diferenças na composição e estrutura, as globulinas 7 e 11S exibem diferenças nas características nutricionais e funcionais (LIU, 1997; RIBLETT et al., 2001). Em Eletroforese dos quatro ingredientes alimentares derivados de soja foi constatada a presença das proteínas majoritárias β-conglicinina e glicinina, além de bandas com peso molecular próximo aos 30 kDa nas fibras dos cotilédones, sendo provavelmente glicoproteínas de parede celular, ricas em hidroxiprolina (SEIBEL; BELÉIA, 2008). As bandas com maiores intensidades são de peso molecular próximas aos destas proteínas descritas na literatura, mesmo havendo retirada de grande parte dos cotilédones, conglicininas, glicinicas e suas subunidades foram bastante presentes nas amostras. A medida que a germinação passa há uma redução da intensidade das bandas, pois há o desenvolvimento do eixo embrionário e desta forma uma proporção menor dos cotiledones na região vascular foi capturada.

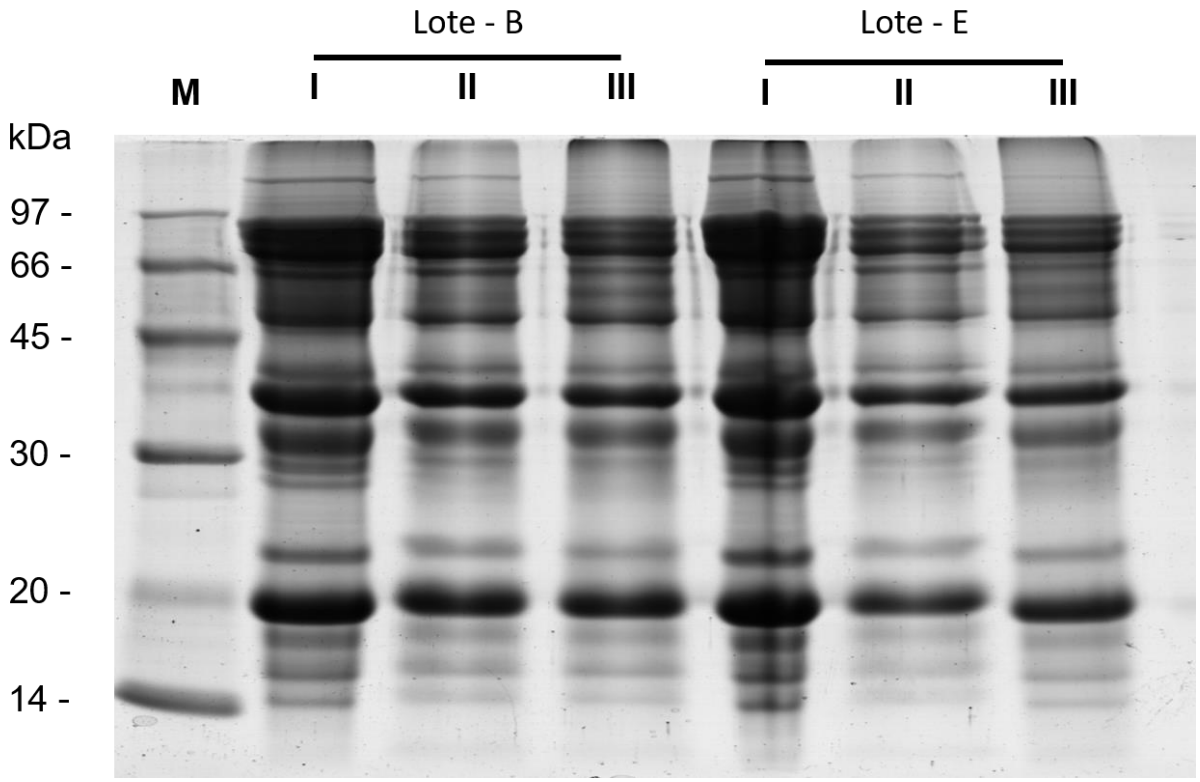


Figura 7 – Perfil proteico, SDS-PAGE, de proteínas totais de dois lotes de sementes de soja, cultivar M8808, durante a germinação, 0,5h em embebição (fase I), 20h em embebição (fase II) e 51h em embebição

4.3.2 Quantificação de proteínas

A quantidade total de proteínas identificadas para o Lote B, foi de 1936; 1653 e 1714 nas fases I, II e III da germinação respectivamente. Para o lote E, foi de 1922 na fase I, 1540 na fase II e 1832 na fase III da germinação. Destas, uma média de 43% das proteínas indentificadas ainda não foram caracterizadas no banco de dados SwissProt *glycine max.* Diante dos dados obtidos, quase metade das proteínas que possivelmente tenham uma fina contribuição para qualidade fisiológica de sementes carecem de estudos. Em trabalho semelhante com soja, juntando sementes que sofreram tratamento de deterioração controlada por 3 e 7 dias além do controle foram identificadas um total de 1626 proteínas (MIN et al., 2017).

4.3.3 Análise de componentes principais.

Para analisar a interdependência dos perfis de proteínas, foi feita em cada fase da germinação análises de componentes principais para os lotes B (maior qualidade) e o E (menor qualidade) (figura 8). A variação do conjunto de dados evidenciou a diferença entre os lotes B e E em todos as fases da germinação.

Os Biplots mostraram, que na fase I da germinação o componente principal 1 (CP1), explicou 50,45% e o CP2 apenas 14,96% da variância dos dados. Na fase 2, CP1 e CP2 explicaram 68,64% e 10,20% da variância das amostras respectivamente. E por último, na fase 3 o CP1 e CP2 explicaram 71,68% e 8,38% da variância das amostras respectivamente. O CP1 contém informação que separa o conjunto de amostras dos dois lotes, mostrando diferenças significativa entre os lotes. Em estudos sobre proteômica de soja, sobre o efeito da deterioração controlada durante 3 e 7 dias nas sementes, em análise de PCA, encontraram diferenças significativas para o conjunto de dados do controle, 3 e 7 dias de deterioração, além de obter a CP1 explicando 70% da variância dos dados de proteômica (MIN et al, 2017).

À medida que se avança as fases da germinação, a CP1 ganha maior poder de explicação da variância dos dados, isto, permite inferir que as mudanças do proteôma entre os lotes são mais perceptíveis à medida que se avança na germinação, o que é evidenciado na diferença do desenvolvimento de plântulas dos lotes com sutil variação da qualidade fisiológica.

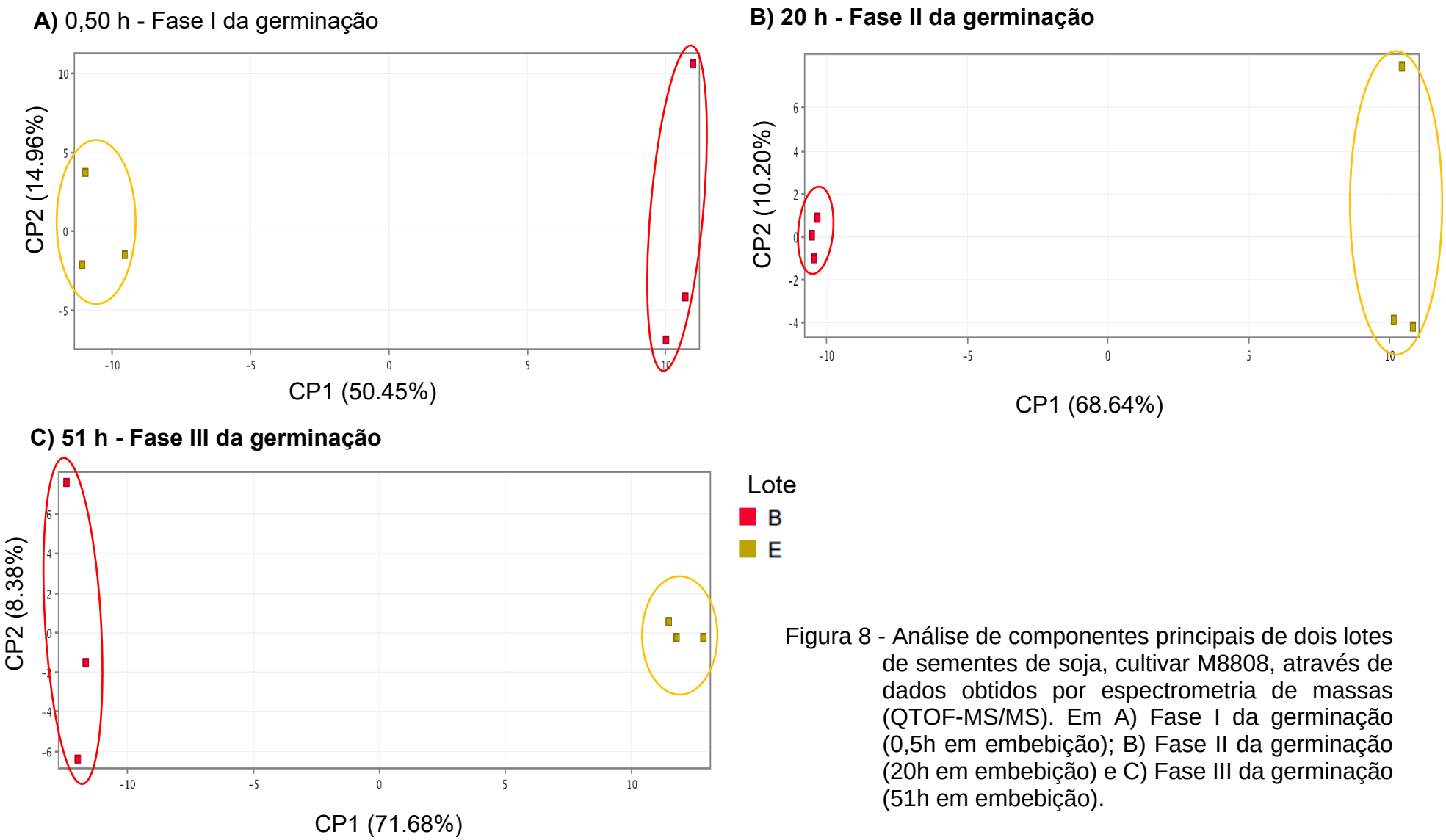


Figura 8 - Análise de componentes principais de dois lotes de sementes de soja, cultivar M8808, através de dados obtidos por espectrometria de massas (QTOF-MS/MS). Em A) Fase I da germinação (0,5h em embebição); B) Fase II da germinação (20h em embebição) e C) Fase III da germinação (51h em embebição).

4.3.4 Expressão diferencial de proteínas em lotes de sementes de soja com sutil diferença da qualidade em diferentes fases da germinação

Para analisar a expressão diferencial das proteínas, foram feitos Vulcano-Plots (figura 9) através do pacote de software MPP. Foi comparado o lote E em relação ao B, em cada fase da germinação: I (0,5h); II (20h) e III (51h). Foi considerado fold change de 1,5 para significância da diferença do acúmulo das proteínas e *p-value* > 0,05 para significância da abundância. As proteínas diferencialmente acumuladas em cada fase da germinação se encontram em listas no ANEXO B.

Na fase I da germinação foi observada 75 proteínas diferencialmente acumuladas, sendo 34 proteínas exclusivas no lote B, 38 exclusivas no lote E e três proteínas down-regulada do lote E em relação ao lote B, ou seja, maior acúmulo no lote B (figura 9a). Na fase II da germinação, foram identificadas 74 proteínas diferencialmente acumuladas, dessas, 32 proteínas são exclusivas no lote B, 31 proteínas exclusivas no lote E e 11 proteínas não exclusivas, em que, 10 proteínas são up-reguladas e uma proteína down-regulada no lote E em relação ao B (figura 9b).

Já na fase III da germinação, foi o momento em que se encontrou maior diferença no acúmulo de proteínas. Ocasionando uma mudança no padrão que vinha acontecendo nas primeiras fases (I e II). Porque, ocorreu uma quantidade expressivamente maior de proteínas diferencialmente acumuladas entre os lotes, principalmente mais acumuladas no lote E (figura 9 c). Nesta fase, foram encontradas 126 proteínas diferencialmente acumuladas, em que 33 proteínas são exclusivas do lote B, 52 proteínas exclusivas do lote E, 41 proteínas não exclusivas, em que, 40 proteínas são up-reguladas e apenas uma é down-regulada no lote E em relação a B.

Uma explicação para o número elevado de proteínas consideradas exclusivas pelo espectrômetro é a presença de proteínas “redundantes” ou variantes destas proteínas, podem ser isoformas, modificações pós-traducionais ou homólogas.

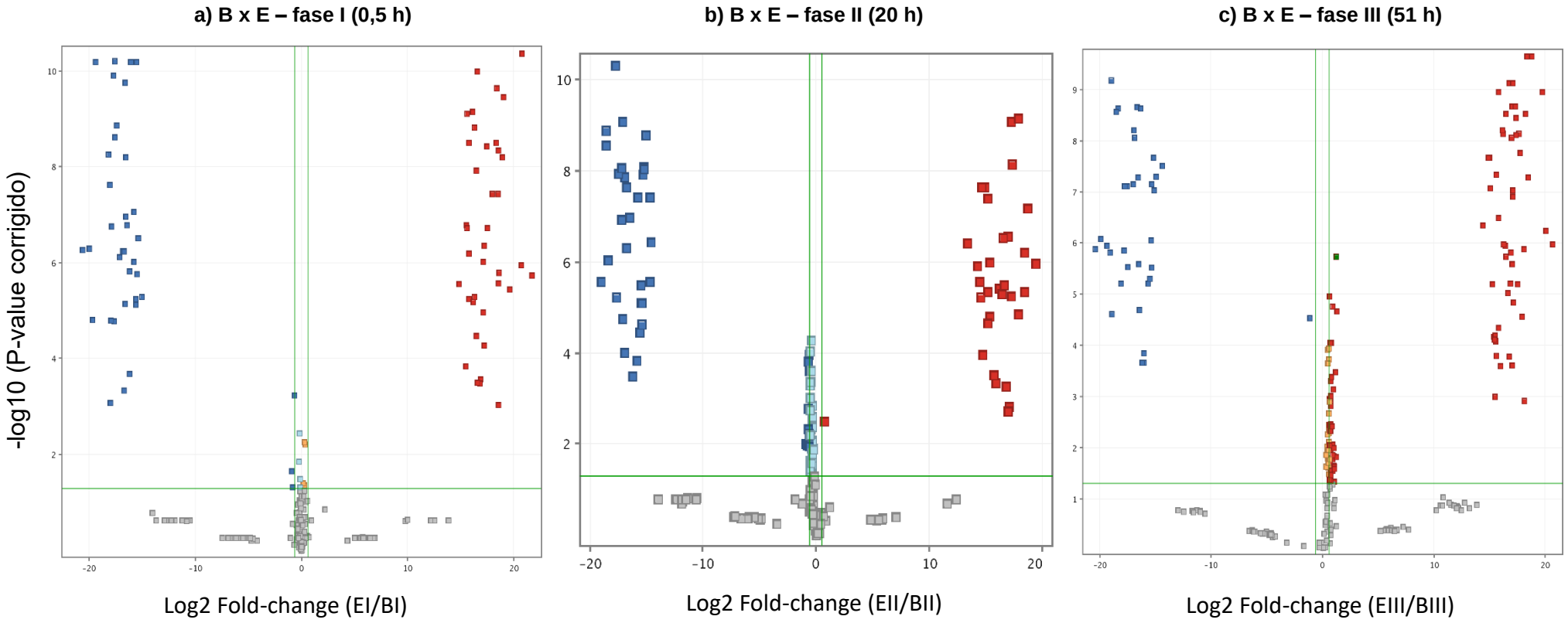


Figura 9 - Expressão de proteínas em sementes de soja, cultivar M8808, comparação entre dois lotes na fase I (0,5 h), fase II (20h) e fase III (51 h) da germinação. O Lote E é comparado com lote B (controle). Pontos acima da linha horizontal apresenta abundância significativa (*t-test, p<0,05).* Proteínas que tiveram regulação negativa e positiva é representado por pontos azuis e vermelhos, respectivamente (*fold-change = 1.5*).

O resultado do vulcano plot (figura 9), mostra que lotes de menor qualidade, na fase três possuem maior acúmulo de diferentes proteínas em comparação a lotes com sutil superioridade da qualidade fisiológica. No geral, em estudos de proteômica com sementes de soja, o efeito da deterioração por envelhecimento acelerado e/ou deterioração controlada, mostram regulações negativas das proteínas à medida que avança a deterioração (MIN et al., 2016, 2017). O que corrobora com o encontrado nas proteínas não exclusivas nas fases I e II. Porém quando se trata de uma plântula com recém emissão de raiz, este padrão se inverte. Uma explicação para isto, é que plântulas provindas de sementes com menor vigor, necessita de um maior aparato de proteínas para forçar o crescimento e desenvolvimento dos seus tecidos, assim como promover reparos e desintoxicações para um estabelecimento de uma plântula inteira ou normal. Porém, se faz necessário utilizar a ferramenta de ontologia genética destas proteínas, para identificar quais processos biológico e funções moleculares afetam sutilmente a qualidade fisiológica de lotes de sementes.

4.3.5 Processo biológico, função molecular, localização e classe das proteínas relacionadas a germinação e vigor de sementes.

Para descobrir os grupos funcionais associados às proteínas identificadas, foi realizada uma análise de termos “Gene Ontology” que categorizou o processo biológico, a função molecular, componente celular e classe das proteínas com sutil diferença na qualidade fisiológica, ou seja, envolvidas no vigor e germinação de sementes.

Listas das proteínas diferencialmente expressas entre os lotes B e E, em cada fase da germinação, foi analisada com auxílio da ferramenta Panther Classification System (MI et al.,2019). Foi retornado os termos de GO, referente a estas proteínas, foram sumarisados em porcentagem de vezes que as proteínas estão relacionado aos termos. (Tabela 3).

Tabela 3 – Ontologia genética provinda do acúmulo diferencial de proteinas em lotes com sutil variação da qualidade fisiológica durante as fases (I, II e III) da germinação. Os termos explorados são relacionados a: Processos Biológicos; Função Molecular, Componente Celular e Classe de Proteínas.

Processos Biológicos			
	BI x EI	BII x EII	BII x EIII
Resposta a estímulos (GO:0050896)	9.10%	13.20%	9.80%
Sinalização (GO:0023052)	2.30%	3.80%	0%
Processo celular (GO:0009987)	38.60%	32.10%	38.40%
Processo metabólico (GO:0008152)	36.40%	24.40%	30.40%
Regulação biológica (GO:0065007)	6.80%	9.40%	8.90%
Localização (GO:0051179)	6.80%	9.40%	5.40%
Processo reprodutivo (GO:0009987)	0%	1.90%	1.80%
Reprodução (GO:0000003)	0%	1.90%	1.80%
Processo de organismo multicelular (GO:0032501)	0%	1.90%	1.80%
Processo de desenvolvimento (GO:0032502)	0%	0%	1.80%
Total de hits de Processos Biológicos	44	53	112
Função Molecular			
Atividade reguladora da tradução (GO:0045182)	6.10%	0%	6.00%
Proteína de ligação (GO:0005488)	27.30%	40%	38.80%
atividade de molécula estrutural (GO:0005198)	12.10%	12%	10.40%
regulador de função molecular (GO:0098772)	3.00%	4%	1.50%
Atividade catalítica (GO:0003824)	48.50%	40%	43.30%
Atividade de transporte (GO:0005215)	3.00%	4%	0%
Total de hits Função Molecular	33	25	67
Componente Celular			
Entidade anatômica celular (GO:0110165)	42.50%	47.10%	44.60%
Complexo contendo proteína (GO:0032991)	17.50%	17.60%	13.30%
Estrutura anatômica intracelular (GO:0005622)	40.00%	35.30%	42.10%
Total de hits Componente Celular	40	34	83
Classe de proteínas			
Proteína do metabolismo do ácido nucleico (PC00171)	2.50%	6.30%	6.90%
Transportadora (PC00227)	2.50%	0.00%	1.40%
Regulador de transcrição específico (PC00264)	5.00%	0.00%	1.40%
Proteínas de tradução (PC00263)	25.00%	12.50%	20.80%
Proteína scaffold / adaptadora (PC00226)	5.00%	6.30%	4.20%
modulador de atividade de ligação de proteína (PC00095)	7.50%	9.40%	6.90%
enzima de interconversão de metabólito (PC00262)	40.00%	18.80%	34.70%
enzima modificadora de proteína (PC00260)	12.50%	25.00%	12.50%
receptor de sinal transmembrana (PC00197)	0.00%	3.10%	1.40%
Proteína de defesa/imunidade (PC00090)	0.00%	3.10%	1.40%
cromatina / ligação à cromatina ou proteína reguladora (PC00077)	0.00%	15.50%	2.80%
chaperona (PC00072)	0.00%	0.00%	5.60%
Total de hits classe de proteínas	40	32	72

Para os processos biológicos, foi identificados com maior relevância em todas as fases da germinação os genes relacionados ao processo celular e processo metabólico, porém, durante a fase 2 da germinação, houve redução a porcentagem de hits para estes termos, pois aumentou o número de proteínas que estão relacionadas ao preparo fisiológico das sementes para expandir as células do eixo embrionário e fazer a protusão radicular. Portanto, aumento em respostas a estimulos, sinalização, regulação e reprodução. Na fase III da germinação, não foi encontrado proteínas diferencialmente acumuladas relacionadas a sinalização, porém foi encontrado relacionado ao processo de desenvolvimento.

Para as funções moleculares, na fase I o termo que apresenta mais hits das proteínas diferencialmente acumuladas, ou seja mais representação, é a atividade enzimática (48,5%), diversas enzimas são relatas de grande importância para qualidade de sementes, estão muito relacionadas com atividade de degradação de lipídios, por exemplo, lipoxigenases, que tem papel importante na quebra de reservas lipídicas, além de enzimas antioxidantes (DHAR, APx1, MDAR e SOD), com papel fundamental na eliminação de espécies reativas de oxigênio (BAXTER et al., 2014) principalmente na fase inicial da germinação (KONG, et al., 2015). Ainda em funções moleculares, proteínas com atividade de ligação foram bastante associadas a mudanças sutis da qualidade das sementes, foram 27,3%, 40% e 38,8%, nas fases I, II e III da germinação respectivamente, esse mesmo termo de proteínas de ligação foi relatado com 20% dos genes na categoria de função molecular em sementes moduladas pela deterioração controlada (Min et al., 2017). Proteínas relacionadas a atividade reguladora da tradução tem 6.10% dos genes relacionados na fase I da germinação, porém na fase II as proteínas relacionadas a regulação não apresentaram diferença significativa de expressão, na fase III este termo volta a ter influência da qualidade dos lotes de sementes.

Para os Termos relacionados a componente celular, foi encontrado, na fase I, 42,5% dos genes relacionados a entidades atômicas celular; 40% a estutura anatômica intracelular e 17,5% relacionado a complexo contendo proteínas. Durante as outras fases da germinação, não ocorre mudança significativa das proporções dos termos. Estruturas anatômicas intracelular é um componente de uma célula contido dentro (mas não incluindo) a membrana plasmática. Nos eucariotos, inclui o núcleo e o citoplasma, ocorrem em transportes de peroxissômico, transporte intracelular de

auxina, transporte intracelular de lipídios, transporte transmembrana de proteína intracelular etc. Ou seja, a eficência do mecanismo deste transpotes nestes locais, pode estar relacionado a sutil variação da qualidade de sementes de soja.

Para os termos classificação de proteínas, as mais importantes, são relacionadas a proteínas de tradução (25% na fase I, 12,5% na fase II e 20,8% na fase III). Proteínas como fatores de tradução já foi mostrado importantes para germinação de sementes (NONOGAKI, 2010). Enzimas de interconvenção de metabólitos (fase I 40%; fase II 25% e fase III 12,5%), apresenta elevada relação com o vigor e germinação de sementes, são enzima que age para converter uma pequena molécula em outra. Esta classe inclui todas as enzimas, exceto aquelas que atuam no DNA, RNA ou uma proteína, nesta classe se enquadra as, hydrolases, isomerases, ligases, lyase, oxiredutases e transferases que desempenha importante papel na manutenção do vigor de sementes.

Os termos de ontologia apresentados, mostram um apanhado dos principais eventos biológicos e moleculares que estão relacionado até com uma sutil diferença na qualidade de sementes de soja. Estes termos relaciona os genes e seus produtos de interesse para o estudo do vigor e germinação das sementes.

4.3.6 Uma fina regulação de proteina influencia sutil diferença na qualidade fisiológica de sementes de soja.

É razoável pensar que proteínas finamente reguladas tenham um papel importante na variação sutil da qualidade fisiológica. Sendo assim, estas proteínas identificadas na análise de volcano plot foram tabeladas, comparadas e analisadas quanto aos processos biológicos e função molecular.

Na fase I da germinação foram encontradas três proteínas com maior acúmulo no lote B em relação ao E (tabela 4). Duas proteínas retornaram do UNIPROT como proteinas não caracterizadas, a A0A0R0JL19, através de BLAST, foi encontrada alta identidade com Alcool Desidrogenases e a proteina A0A0R0I4F6 tem alta indentidade com redutase de aldeído dependente de NADPH 1 de soja selvagem. A proteína A0A0R0GLJ3 foi identificada como proteína contendo o domínio ADH_zinc_N. Feito BLAST das proteinas para a A0A0R0JL19 foi identificado alta identidade com Alcool Desidrogenases, assim como a A0A0R0GLJ3 que foi identificada como uma proteína

contendo o domínio ADH_zinc_N. Estas proteínas tem relação com oxirredutases, portanto, tem papel importante no início da germinação, pois estão relacionadas a obtenção inicial de energia por vias anaeróbicas (TADIGE et al., 1999) e também a desintoxicação por sequestar aldeídos durante processo catabólico das reações (STROMMER, 2011), A desintoxicação de aldeídos também é um processo necessário para a aquisição do vigor das sementes, pois foi sugerido que a ADH, catalisa a oxidação irreversível de uma ampla gama de alcool e aldeídos reativos em seus correspondentes ácidos carboxílicos, desempenha um papel fundamental na desintoxicação dos aldeídos gerados pelo estresse ambiental (PEROZICH et al., 1999). Outros trabalhos evidenciaram que envelhecimento de sementes diminui o nível de acúmulo de ADH, em sementes de milho (XIN et al., 2011) e em sementes de soja (MIN et al., 2016). Sendo assim, os resultados encontrados corrobora com a literatura e permite inferir que esta proteína influência em uma sutil variação qualidade fisiológica de sementes de soja.

. Tabela 4 – Proteínas finamente reguladas entre dois lotes de sementes de soja, na fase I da germinação (0,5h de embebição).

Proteínas mais abundantes no Lote B				
Protein ID	Gene	Protein Name	Função Molecular	Processo Biológico
A0A0R0JL19	GLYMA_06G122600	Uncharacterized protein	Atividade do álcool desidrogenase, dependente de zinco	Processo catabólico de formaldeído
A0A0R0I4F6	GLYMA_10G155300	Uncharacterized protein	atividade oxidorredutase	Não anotado
A0A0R0GLJ3	GLYMA_14G121200	Proteína contendo domínio ADH_zinc_N	Não anotado	

Na fase II da germinação, foram encontradas 11 proteínas com fina regulação, 10 proteínas ficou up-reguladas do lote B em relação ao E e apenas uma apresentou maior acúmulo no lote E em relação ao B (tabela 5). Através de BLAST, três de quatro proteínas que inicialmente estavam como não caracterizadas (I1KYW3, A0A0R0I4F6 e C6SW56), foi identificada, já para proteína A0A0R0I621 não se teve sucesso.

Tabela 5 – Proteínas finamente reguladas entre dois lotes de sementes de soja, na fase II da germinação (20h de embebição).

Acess No.	Glyma Locus	Nome Proteína	Função Molecular	Processo Biológico
Maior acúmulo no lote B				
A0A0R0H2H7	GLYMA_12G071600	Cupin type-1 proteína contendo domínio	Não anotado	
P04347	GLYMA_13G123500	Glicinina G5	Atividade do reservatório de nutrientes	Não anotado
C6SWA6	GLYMA_15G040400	Histona H2A	Ligação de DNA	Silenciamento de cromatina
A0A0R0GW87	GLYMA_13G132100	Histona H2B		Montagem de nucleossomo
I1JI49	100817995	TPT proteína contendo domínio	atividade transporte de membrana	transporte transmembrana
A0A0R0I621	GLYMA_09G092600	Proteína não caracterizada	Não anotado	
I1KYW3	GLYMA_08G341000	Uncharacterized protein (Inibidor de tripsina do tipo Kunitz KTI1)	Atividade do inibidor de endopeptidase	Regulação negativa da atividade da endopeptidase
A0A0R0I4F6	GLYMA_10G155300	Uncharacterized protein (Aldeído redutase 1 dependente de NADPH)	Atividade oxidorredutase	Não anotado
C6SW56	GLYMA_10G291500	Uncharacterized protein (Proteína ribossomal L35 60S)	Ligação de mRNA	Tradução
I1MBR7	GLYMA_14G210700	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	UTP: atividade glicose-1-fosfato uridililtransferase	Metabolismo de carboidratos
Maior acúmulo no Lote E				
Q9XER5	GLYMA_16G031300	Proteína de maturação de semente PM22 (LEA)	Não anotado	Resposta à dessecação

A única proteína finamente up-regulada para o lote E de menor qualidade foi a Q9XER5, é uma Proteína de maturação de semente PM22, da família das Proteínas de embriogênese tardia (LEA). Estas proteínas são bem caracterizadas como moléculas protetoras contra estresse de dessecação. Acredita-se que elas atuem substituindo água, sequestrando íons, removendo ROS e/ou estabilizando proteínas e a estrutura da membrana (CUMING, 1999; TUNNACLIFFE; WISE, 2007; BATTAGLIA et al., 2008). As proteínas LEA são comumente encontradas em análises proteômicas de tolerância à dessecação. Sendo assim, geralmente proteínas LEA's estão relacionadas a maior vigor quando se trata de sementes dessecadas, porém, no caso deste estudo as sementes se encontram na fase II da

germinação (20 horas de embebição). O que corrobora em um estudo com sementes de ervilha alterações do proteoma durante a germinação tem abundância de SBP65 (pertencente ao grupo 3 das proteínas LEA) que diminui continuamente após 18 h de germinação, coincidindo com a perda de tolerância à dessecação (WANG et al., 2012b). Em sementes de milho tolerantes a dessecação, uma proteína LEA, EMB564, também diminuiu durante a germinação (HUANG et al., 2012). Dessa forma, por se tratar de uma LEA, o acúmulo da PM22 tende a decrescer durante a germinação, o que leva a evidenciar que ocorre atraso dos processos germinativos do lote E de menor qualidade em relação ao lote B de maior qualidade. Dessa forma, proteínas em geral LEA e no caso específico, a proteína PM22 com 20h de embebição ou meio da fase II de germinação pode indicar diferença sutil da qualidade fisiológica de lotes de sementes de soja.

Ainda na fase II da germinação, foi encontrado a proteína Glicinina G5, que teve maior acúmulo no lote B em relação ao lote E. A glicinina é a principal proteína de armazenamento de sementes de soja e tem atividade de reservatório de nutrientes. Em Estudo sobre o efeito do tratamento de deterioração controlada em sementes de soja foi encontrada 1626 proteínas totais, foi utilizada metodologia de extração de proteínas com precipitação com sulfato de protoamina para depleção de proteínas de alta abundância (glicininas e conglicininas) assim obtendo melhor resolução das proteínas na fração solúvel, ainda assim, encontraram 17 proteínas de armazenamento de sementes incluindo diferentes isoformas de β-conglicinina e glicinina (glicinina A5A4B3 e G1) e proteínas da família cupin, neste trabalho foi observado que o efeito de deterioração controlada aceleraram a degradação destas proteínas (MIN et al., 2017). Portanto, corrobora com o maior acúmulo de glicinina G5 nas sementes de maior qualidade fisiológica, pois é possível que tenha ocorrido degradação mais rápida desta proteína nas sementes do lote E de menor qualidade fisiológica, visto que este lote sofreu mais dano por umidade inferido através do teste de tetrazólio.

Como já discutido, proteínas relacionadas a atividade de oxirredução estão relacionadas a sementes de maior qualidade, assim ocorre em sementes de soja ainda na fase II da germinação. Além disso, o mesmo ocorre com processo de tradução, em que, é evidenciado maior acúmulo da C6SW56 uma proteína ribossomal L35 60S no lote B, podendo influenciar em maior tradução de proteínas para melhor desenvolvimento da germinação. O mesmo racional é evidenciado por maiores acúmulos de proteínas Histonas (H2A e H2B), estas proteínas são necessárias de forma que as descompactações e compactações do DNA sejam equilibradas para ideal transcrição de novos mRNAs de forma que não torne o DNA exposto a danos (LAYAT et al., 2021). Por isso, no lote B, estas proteínas podem estar relacionadas a

uma sutil melhoria do vigor em sementes de soja.

A I1MBR7 (UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase) é uma enzima que participa da síntese de UDP-glicose, a partir de glicose-1-fosfato e UTP, é essencial para a síntese de sacarose e polissacarídeos (MENG et al., 2009). O efeito de deterioração controlada provoca regulação negativa sobe esta proteína em sementes de soja (MIN et al., 2017), para o lote de maior qualidade há maior acúmulo.

A protuzao radicular da início a fase III da germinação, após isto vem as sussecivas divisões e especializações celulares para formar os tecidos e orgrãos da plântula. Nesta fase III as 51h em embebição, as sementes já apresentavam plena protuzão radicular para os dois lotes e curiosamente quando comparado os lotes com sutil diferença da qualidade fisiológica, foi observado maior acúmulo de uma maior gama de proteínas no lote E (menor qualidade) em relação ao lote B de (maior qualidade) (ANEXO C).

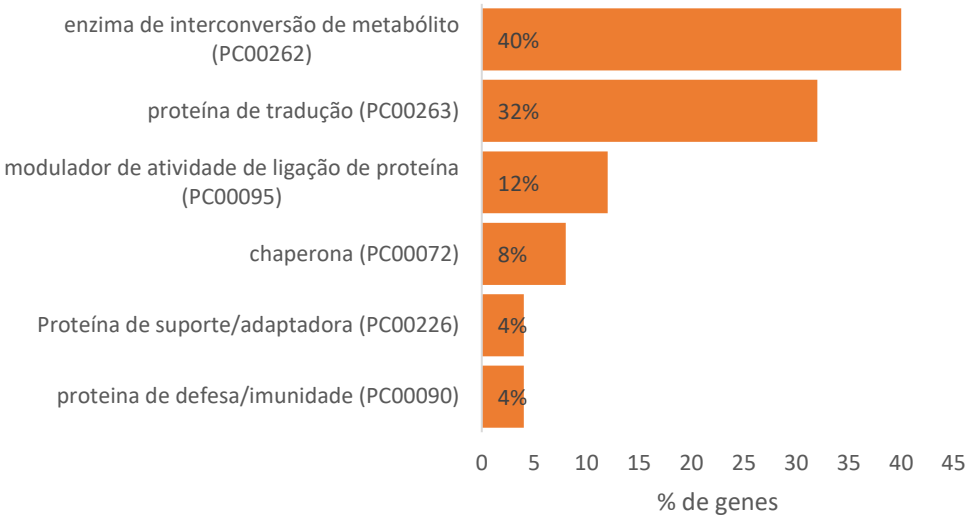
Foi observada 41 proteínas finamente reguladas, no qual, apenas uma teve maior acúmulo no lote B, que foi a K7KPA2 (Proteína contendo domínio RRM), esta proteínas está envolvida com splicing de RNA mensageiro via spliceossomo, tendo função molecular de ligação a RNA. Isto pode estar relacionado a preparações mais precoce do lote B para o desenvolvimento da plântula, dando início a especialização de células para formação dos novos tecidos que vão compor a plântula.

Já para as proteínas finamente up-reguladas do lote E em relação ao B, as 40 proteínas foram avaliadas com auxílio da ferramenta panther, para observar quais classes estão mais relacionados a estas proteínas (figura 10). A classe de proteína mais expressiva do lote E na fase III da germinação são as enzimas de interconvecsão de metabólitos, seguido de, proteínas de tradução.

Como relatado anteriormente, durante a fase III da germinação o lote E nescessita de mais proteínas e mais energia para conclusão da germinação. Foram identificadas duas Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase, que tem papel na via glicolítica e produção de energia, há também a maior abundância de alcool desidrogenase 1, importante para desintoxicação de alguns aldeídos e produção de energia. A porcentagem de plântulas anormais (figura 6) e danos por umidade (figura 5) no lote E é maior que no lote B, isto, dá indícios que há mais danos as mitocôndrias no lote E, isto ocasiona redução das taxas de respiração aeróbica e a aumentar as taxas de respiração

anaeróbicas, assim nescessitano de mais alcool desidrogenáses para conseguir energia. Juntamente com isto, as Proteínas ribossomais 40S, 60S e fatores de alongamento foram mais abundânte no lote E, isto ajuda a explicar a maior quantidade de proteínas neste tratamento,

Figura 10 – Porcentagem de um total de 36 protéinas finamente up-reguladas para o lote E (menor qualidade) em relação ao lote B (maior qualidade) relacionada a suas respectiva classe.



Além das proteinas relacionadas a tradução e obtenção de energia, algumas proteínas chaperonas e de suporte foram encontradas mais abundantes no lote E. Para corroborar com isto, foi encontrado ubiquitinina mais abundantes no Lote E, esta proteína marca outras proteínas defeituosas para que sejam destruidas. Isto mostra uma relação de maior ezimas relacionadas a tradução para renovação das proteínas defeituosas, além explica a presença de algumas proteínas companheiras que participam deste processo. Então, durante a fase III da germinação mecanismos e proteínas de tradução, via da glisólise, enzymas de kinase e de desintoxicação são marcadores de uma sutil piora da qualidade fisiológica de lotes de sementes de soja.

5 CONCLUSÃO

Análises do perfil proteômico são capazes de identificar sutil diferença da qualidade fisiológica de lotes comerciais de sementes de soja.

Lotes com menor qualidade apresentam uma gama maior de proteínas reguladas positivamentes na fase III da germinação.

O perfil proteômico de sementes de soja com sutil diferença da qualidade fisiológica é variavel durante as fases de germinação e diferenças entre estes lotes são perceptíveis nas diferentes fases da germinação.

Processos celulares e metabólicos, relacionados as proteínas de tradução, enzimas de interconversão de metabólito e enzimas modificadoras de proteínas são as classes de proteínas mais presentes na sutil diferença da qualidade de sementes.

Alcool desidrogenáse e aldeído desidrogenáse, são potênciais marcadores de vigor de sementes durante a primeira hora de embebição.

Proteínas LEA tolerante a dessecação, podem indicar atraso da germinação durante a fase II em lotes de menor qualidade fisiológica.

Lotes de qualidade sutilmente inferior, apresentam maior nescessidade de proteínas e energia durante a fase III da germinação.

6 REFERÊNCIAS

ABRASEM. Ministério da Agricultura, Pecuária e de Abastecimento. Instrução Normativa n. 45, de 17 de setembro de 2013. Padrões de identidade, qualidade, produção e comercialização de sementes de grandes culturas. Anexo XXIII. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br>>. Acesso em: 15 Fev 2021.

AOSA. ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS. **Seed vigour handbook. The handbook of seed testing.** East Lansing, p. 88, 1983.

BATTAGLIA, M.; OLVERA-CARRILLO, Y.; GARCIARRUBIO, A.; CAMPOS, F.; COVARRUBIAs A.A. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. **Plant Physiol.** v. 148, p. 6-24, 2008.

BAXTER, A., MITTLER, R., SUZUKI, N. ROS as key players in plant stress signalling, J. **Experimental Botany.** v. 65, p. 1229–1240, 2014.

BAYS, R.; BAUDET, L.; HENNING, A.; LUCCA FILHO, O. Recobrimento de sementes de soja com micronutrientes, fungicida e polímero. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 29, n. 2, p. 60-67, 2007.

BETHKE, P. C. et. al. The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. **Plant Physiology**, v. 143, p. 1173–1188, 2007b.

BETHKE, P. C.; LIBOUREL, I. G .L.; JONES, R. L. **Nitric oxide in seed dormancy and germination,** in: K.J. Bradford, H. Nonogaki (Eds.), Seed Development, Dormancy and Germination, Blackwell Publishing, Oxford, p. 153–175, 2007a.

BEWLEY, J. D. et. al. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy** (third ed.), Springer–Verlag, New York, 2013.

BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy, **Plant Cell,** v.9, p.1055–1066, 1997.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. (Eds.), **Seeds: Physiology of Development and Germination**, 2nd edition, Plenum Press, New York, p. 445, 1994.

BICALHO, E. M.; SANTOS, T. R.; GARCIA, S. D. Abscisic acid and the antioxidant system are involved in germination of Butia capitata seeds. **Acta Botanica Brasilica**, v. 33, p. 174–178, 2019.

BLACK, M.; BEWLEY J. D.; HALMER P. **The encyclopedia of seeds.** Science, technology and uses. Oxfordshire: CAB International. p. 137–143, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 395p.

BUCHANAN, B. B; BALMER, Y. Redox regulation: a broadening horizon. **Annual Review of Plant Biology,** v. 56, p.187–220, 2005.

CATUSSE, J. et. al. Proteomics reveals potential biomarkers of seed vigor in sugarbeet. **Proteomics** v. 11, p. 1569–1580, 2011.

CAVERZAN, A. et. al. How Does Seed Vigor Affect Soybean Yield Components?. **Agronomy Journal**, v. 110, p. 1318-1327. 2018.

COHN, M. A.; BUTERA, D. L.; HUGHES, J. A. Seed dormancy in red rice. III. Response to nitrite, nitrate, and ammonium ions. **Plant Physiology,** v. 73, p. 381–384, 1983.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. Brasília, DF, v. 8, safra 2020/21, n. 6, sexto levantamento, mar. 2021.

COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. F. **Principles of Seed Science and Technology** (fourth ed.), Springer Science & Business Media, New York, NY, 2012.

CROWE, J. H.; MCKERSIE B. D.; CROWE L. M. Effects of free fatty acids and transition temperature on the stability of dry liposomes. **Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 979 p. 7–10, 1989.

CUMING, A. C. **LEA proteins** P.R. SHEWRY, R. CASEY (Eds.), Seed Proteins, Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands p. 753-780, 1999.

DANDOY, E.; SCHYNS, R.; DELTOUR, R.; VERLY, W. G. Appearance and Repair of Apurinic Apyrimidinic Sites in DNA during Early Germination of Zea-Mays. **Mutation Research,** v. 181. p. 57–60, 1987.

DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 427-452, 1973.

DELOUCHE, J. C.; CALDWELL, W. P. **Seed vigor and vigor tests.** Procediments of Association of Official Seed Analysts v. 50 p. 124-129. 1960.

DINKINS, R. D. et. al. Changing transcriptional initiation sites and alternative 5′- and 3′-splice site selection of the first intron deploys Arabidopsis PROTEIN ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE2 variants to different subcellular compartments, **Plant Journal**, v. 55, p. 1–13, 2008.

DINKOVA, T. D. et. al. Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. **Seed Science Research,** v. 21, p. 85–93, 2011.

EBONE, L. A.; CAVERZAN, A.; CHAVARRIA G. Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 145, p. 34-42, 2019.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D; Temperature sensitivity of the low-moisture-content limit to negative seed longevity-moisture content relationships in hermetic storage **Annual Botanics**, v. 97, p. 785-791, 2006.

FRANÇA-NETO, J. B et al. **Tecnologia de Produção de Soja**. In: Informativo ABRATES, Londrina v. 20, n. 12, p. 26-35, 2010.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2018.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. **Suscetibilidade das principais cultivares de soja utilizadas no Brasil ao dano de embebição no teste de germinação,** Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1998a. 10p. (EMBRAPA-CNPSo. Comunicado Técnico, 60).

GALLAND, M. Dynamic Proteomics Emphasizes the Importance of Selective mRNA Translation and Protein Turnover during Arabidopsis Seed Germination. **Molecular Cellular Proteomics**, v. 13, p. 252–268, 2014.

GALLARDO K. et. al. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. **Plant Physiology**, v. 126, p. 835–848, 2001.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 12.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 467p.

GRELET, J. et. al. Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. **Plant Physiology,** v. 137, p. 157–167, 2005.

HAN C., YIN X., HE D., YANG P. Analysis of proteome profile in germinating soybean seed, and its comparison with rice showing the styles of reserves mobilization in different crops. **PLoS One** 8(2): e56947. Fevereiro 2013.

HARTMANN-FILHO, C. P. et. al. The effect of drying temperatures and storage of seeds on the growth of soybean seedlings. **Journal of Seed Science**, v. 38, p. 287-

295, 2016.

HENDRICKS, S. B.; TAYLORSON, R. B. Promotion of seed germination by nitrate, nitrite, hydroxylamine, and ammonium salts. **Plant Physiology**, v. 54, p. 304–309, 1974.

HENNING, A. A. **Guia Prático para identificação de Fungos mais frequentes em sementes de soja**. Brasília-DF, EMBRAPA, 2015; 33p.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. L Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**. v. 246, p. 42–44, 1973.

HILHORST, H. W. M.; KARSSEN, C. M. Nitrate reductase independent stimulation of seed germination in *Sisymbrium officinale* L.(hedge mustard) by light and nitrate. **Annual Botanitcs,** v. 63, p. 131–137, 1989.

HOURMANT, A., PRADET A., Oxidative phosphorylation in germinating lettuce seeds (Lactuca sativa) during the first hours of imbibition. **Plant Physiology**, v. 68, p. 631–635. 1981.

HOWELL, K. A.; MILLAR, A. H.; WHELAN, J. Ordered assembly of mitochondria during rice germination begins with pro-mitochondrial structures rich in components of the protein import apparatus. **Plant Molecular Biology**, v. 6, p. 201–223. 2006.

HUANG, H.; MØLLER, I. M.; SONG S. Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. **Journal of Proteomics**, v. 75 p. 1247–1262, 2012.

ISELY, D. **Vigor tests Procedments**. Associantion Official Seed Analyse. v. 47, p. 176-182, 1957.

ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. **Seed Science and Technology**, v. 21, supl., p. 1-288, 1993.

JOB C. et al. Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. **Plant Physiology,** v. 138, p. 790–802, 2005.

KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiol,** v.100, p.1–6, 1992

KIM, E. H., KIM, S. L., KIM, S. H., CHUNG, I. M. Comparison of isoflavones and anthocyanins in soybean [Glycine max (L.) Merrill] seeds of different planting dates. **Journal of agricultural and food chemistry,** v.6 0, p. 10196–10202, 2012.

KONG, L., HUO, H., MAO, P., Antioxidant response and related gene expression in

agedoat seed, **Front. Plant Science**. v.6, 2015.

LAYAT, E.; BOURCY, M.; COTTERELL, S.; ZDZIESZYŃSKA, J.; DESSET, S.; DUC, C.; TATOUT, C., BAILLY, C.; PROBST, A. V. The Histone Chaperone HIRA Is a Positive Regulator of Seed Germination. ***International Journal of Molecular Sciences***, v. 22, n. 8, p.4031, 2021.

LIU, K. **Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components.** In: LIU, K. Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization. New York: Chapman & Hall, cap. 2, p. 25-99. 1997

MACOVEI, A.; BALESTRAZZi, A.; CONFALONIERI, M.; FAE, M.; CARBONERA, D. New insights on the barrel medic MtOGG1 and MtFPG functions in relation to oxidative stress response in planta and during seed imbibition. **Plant Physiology Biochemistry,** v. 49, p. 1040–1050, 2011.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**, Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MARCOS-FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia agricola**, Piracicaba, v. 72, n. 4, p. 363-374, 2015.

MARCOS-FILHO, J. Teste de Vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**, Londrina: Abrates, 1999.

MARCOS-FILHO, J.; VIEIRA, R. D. Seed vigor tests: procedures conductivity tests. In: BAALBAKI, R. Z.; ELIAS, S. G.; MARCOS-FILHO, J.; MCDONALD, M. B. (Ed.). **Seed vigor tests handbook**, Ithaca: Association of Official Seed Analysts, 2009. p.186-209.

MATAKIADIS, T. et. al. The Arabidopsis abscisicacid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. **Plant Physiol**, v. 149, p. 949–960, 2009.

MCDONALD M. B., NELSON C. J. **Physiology of Seed Deterioration.** CSSA Species Publication No. 11 Crop Science Society of America, WI, USA, 1986.

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed**

Science Technology, v. 27, p. 177-237, 1999.

MCDONALD, M. B. Seed priming. In: Black M, Bewley JD, editors. **Seed technology and its biological basis**. Sheffield, UK: Sheffield Academy. p. 287–325, 2000.

MENG, M.; GEISLER, M.; JOHANSSON, H.; HARHOLT, J.; SCHELLER, H. V.; MELLEROWICZ, E.J; KLECZKOWSKI, L.A. UDP-glucose pyrophosphorylase is not rate limiting, but is essential in Arabidopsis. **Plant Cell Physiol.** v. 50, n. 5, p. 998-1011, 2009.

MEYER, Y.; BUCHANAN, B. B.; VIGNOLS, F.; REICHHELD, J. P. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. **Annual Review of Genetics,** v. 43, p. 335– 367, 2009.

MI, H.; MURUGANUJAN, A.; HUANG, X. et al. Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). **Nature Protocol** v.14, p.703–721, 2019.

MIERNYK, J.; HAJDUCH, M. Seed proteomics. **Journal of Proteomics**, v.74, p. 389–400, 2011.

MIN, C. W. et. al. In-depth proteomic analysis of Glycine max seeds during controlled deterioration treatment reveals a shift in seed metabolism, **Journal of Proteomics**. v.169, n. 3, p. 125-135, 2017.

MIN, C.W., KIM Y.J., GUPTA, R., KIM, S.W., HAN, W.Y., KO, J.M., KANG, H.W., YOON, W.B., CHOUNG, M.G., KIM, Y.C., KIM, S.T. High-throughput proteome analysis reveals changes of primary metabolism and energy production under artificial aging treatment in Glycine max seeds, **Applied Biolical Chemistry**, 59, p.841–853, 2016.

MOORE, R. P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. (Ed.). Seed Ecology. London: Butterworth, p. 347-366, 1973.

MOROHASHI, Y., Patterns of mitochondrial development in reserve tissues of germinated seeds: a survey. **Physiol. Plant,** v. 66, p. 653–658, 1986.

MOROHASHI, Y.; BEWLEY, J. D. Development of mitochondrial activities in pea cotyledons: influence of desiccation during and following germination of the axis. **Plant Physiology,** v. 66, p. 637–640, 1980.

MOROHASHI, Y.; BEWLEY, J. D.; YEUNG, E. C., Biogenesis of mitochondria in imbibed peanut cotyledons. II. Development of light and heavy mitochondria. **Plant Physiology**, v. 68, p. 318–323, 1981.

MORSCHER, F. et. al. Glutathione redox state, tocochromanols, fatty acids, antioxidant enzymes and protein carbonylation in sunflower seed embryos associated with after-ripening and ageing. **Annual Botanics**, v. 116 p. 669-678, 2015.

NAGEL, M.; BÖRNER A. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions **Seed Science Research**, v. 20, p. 1-12, 2010.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**, Londrina: Abrates, 1999. p. 2.1-2.24.

NONOGAKI, H., BASSEL, G. W., BEWLEY, J. D. Germination-still a mystery. **Plant Science**, v.179, n.6, p.574-581, 2010.

NONOGAKI, H., CHEN, F., BRADFORD, K. J., Mechanisms and genes involved in germination sensu stricto, in: K.J. Bradford, H. Nonogaki (Eds.), **Seed Development, Dormancy and Germination, Blackwell Publishing**, Oxford, p. 264–304. 2007

OGE, L. Et al. Protein repairl-isoaspartyl methyltransferase1 is involved in both seed longevity and germination vigor in Arabidopsis. **Plant Cell** v. 20, p. 3022–3037, 2008.

OLIVEIRA, A. C. S; MARTINS, G. N.; SILVA, R. F.; VIEIRA, H. D. Testes de vigor em sementes baseados no desempenho de plântulas. **Revista Científica Internacional.** v. 2, p. 1-21, n. 4, 2009.

OLIVEIRA K.R., SAMPAIO F.R., SIQUEIRA G.S., GALVÃO Í.M., BENNETT S.J., GRATÃO P.L., BARBOSA R.M. Physiological quality of soybean seeds grown under different low altitude field environments and storage time. **Plant Soil Environment.** v. 67, p. 92–98, 2021.

ORACZ, K. et. al. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation, **Plant Journal,** v. 50, p. 452–465, 2007.

ORACZ, K. et. al. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination, **Plant Physiol**, v. 150, p. 494–505, 2009.

PEROZICH, J.; NICHOLAS, H.; LINDAHL, J. R.; HEMPEL The big book of aldehyde dehydrogenase sequences. An overview of the extended Family Adv. **Exp. Med. Biol.,** v. 463, p. 1-7 (1999).

PETERS, J. (Ed.). Tetrazolium testing handbook. Ithaca: Association of Official Seed Analysts, (AOSA. Contribution to the Handbook on Seed Testing, 29), p. 88, 2007.

PIROVANI, C. P.; CARVALHO, H. A. S.; MACHADO, R. C. R. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by Moniliophthora perniciosa, the causal agent of the witches‘ broom disease. **Electrophoresis,** v. 29, p. 2391-2401, 2008.

POURNIK, S. et. al. True lipases beside phospholipases contribute to walnut kernel

viability loss during controlled deterioration and natural aging. Environmental and Experimental Botany., v. 164, p. 71-83, 2019.

RAJJOU L. et. al. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. **Plant Physiology**, v.141, p. 910–923, 2006.

RAJJOU, L. et. al. Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: A comparison between artificial and natural aging protocols. **Plant Physiology**, v. 148 p. 620–641, 2008b.

RAJJOU, L., DEBEAUJON, I. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Biologias Comptes rendus**, v. 331, p. 796–805. 2008a.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J., BALL, Y. J.; JOB, C.; JOB, D. Seed germination and vigor. **Annual Review of Plant Biology,** v. 63 p. 507-533, 2012.

RAO, N. K.; DULLOO, M. E.; ENGELS J.M. A review of factors that influence the production of quality seed for long-term conservation in genebanks. **Genetics Resourch Crop Evolution**, v.64, p. 1061-1074, 2017.

RIBLETT, A. L. et al. Characterization of β-conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, n. 10, p. 4983-4989, 2001.

ROBERTS, E. H. The distribution of oxidation–reduction enzymes and the effects of respiratory inhibitors and oxidising agents on dormancy in rice seed. **Plant Physiology**, v. 17 p. 14–29, 1964b.

ROBERTS, E.H. A survey of the effects of chemical treatments on dormancy in rice seed. **Plant Physiology**, v.17, p.30–43, 1964a.

ROBERTS, L. M.; LORD, J. M. Developmental changes in the activity of messenger RNA isolated fromgerminating castor bean endosperm. **Plant Physiology,** v. 64, p. 630–634, 1979.

SANO, N. et. al. Staying alive: molecular aspects of seed longevity. **Plant Cell Physiology,** v. 57 p. 660-674, 2016.

SCHEEREN, B. R. et. al. Physiological quality of soybean seeds and productivity. **Revista Brasileira de Sementes,** v. 32, p. 35–41. 2010.

SCHOPFER, P. Hydroxyl radical-induced cell-wall looseningin vitro andin vivo: implications for the control of elongation growth, **Plant Journal,** v. 28, p. 679–688, 2001.

SCHUCH, L. O. B.; KOLCHINSKI, E. M.; FINATTO, J. A. Seed physiological quality and individual plants performance in soybean. **Revista Brassileira de Sementes** v. 31, p. 144–149. 2009.

SEIBEL, N. F.; BELÉIA, A. D. P. Carboidratos das fibras de cotilédones e proteínas de produtos derivados de soja (Glycine max (L.) Merril). **Food Science and Technology**, v. 28, n. 3, 2008.

SHEN-MILLER J. Sacred lotus, the long-living fruits of China Antique. **Seed Science Resourch,** v. 12, p. 131, 2002.

SIQUEIRA, G. S. **RELAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES DE UM NOVO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DO VIGOR DE SEMENTES DE SOJA BASEADO NA EMISSÃO DE ETANOL**, 2018. 81f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2018.

STROMMER, J. The plant ADH gene family. **The Plant Journal,** v. 66, p. 128-142, 2011.

TADEGE, M.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C. Ethanolic fermentation: New functions for an old pathway. **Trends Plant Science,** v. 4, p. 320–325, 1999.

TOLEDO, M. Z.; CAVARIANI, C.; FRANÇA-NETO, J. B.; NAKAGAWA, J. Imbibition damage in soybean seeds affected by initial moisture content, cultivar and production location. **Seed Science and Technology**, v. 38, p. 399-408, 2010.

TOLEDO, M., Z.; CAVARIANI, C.; FRANÇA-NETO, J. B.; NAKAGAWA, J. Imbibition damage in soybean seeds affected by initial moisture content, cultivar and production location. **Seed Science and Technology**, v. 38, p. 399-408, 2010

TOLLETER, D. et. al. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. **Plant Cell,** v. 19, p. 1580–1589, 2007.

TUNNACLIFFE, A.; WISE M.J. The continuing conundrum of the LEA proteins. **Naturwissenschaften**, v.94, p. 791-812, 2007.

VENTURA, L. et. al. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. **Plant Physiology and Biochemistry.** v. 60, p. 196-206, 2012.

VERTUCCI, C. W.; LEOPOLD, C. Oxidative processes in soybean and pea seeds. **Plant Physiology**, v. 84, p. 1038-1043, 1987.

VIEIRA, B.G.T.L. et. al. Biochemical alterations in soybean seeds with harvesting time and storage temperature. **Journal of Food, Agriculture and Environment,** v.

11, p. 887-891, 2013b.

WALTERS, C.; BALLESTEROS, D.; VERTUCCI, V. A. Structural mechanics of seed deterioration: standing the test of time. **Plant Science,** v. 179, p. 565–573, 2010.

WANG W. Q. et. al. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant Physiology Biochemistry,** v. 86, p. 1–15, 2015.

WANG, L. et. al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed aging of soybean under high temperature and humidity stress. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2109–2127, 2012.

WANG, W. Q.; LIU, S. J.; SONG, S. Q. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, V. 86, P. 1-15, 2015.

WANG, W. Q.; MØLLER, I. M.; Song, S.Q. Proteomic analysis of embryonic axis of Pisum sativum seeds during germination and identification of proteins associated with loss of desiccation tolerance. **J. Proteomics**, v. 77, p. 68-86, 2012.

WOJTYLA, L. et.al. A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds, **Journal Plant Physiol,** v. 163, p. 1207–1220, 2006.

XIN, X. et. al. Proteome analysis of maize seeds: the effect of artificial ageing. **Plant Physiology,** v.143, n. 2, p. 126–138, 2011.

XU, L. et. al. Timing for antioxidant-priming against rice seed ageing: optimal only in non-resistant stage. **Science Reports**, v. 10, p. 1-13, 2020.

YIN, X., HE, D., GUPTA, R., YANG, P. Physiological and proteomic analyses on artificially aged Brassica napus seed. **Frontiers in Plant Science,** 6: 112, 2015.

ZHANG, H. et. al. Proteome Analysis of poplar seed vigor. **PLoS One**, v.10, 2015.

ZHANG, K. et. al. Deterioration of orthodox seeds during ageing: Influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species. **Plant Physiology and Biochemistry**, V. 158. p.475-485, 2021.

ANEXOS

ANEXO A **– Protocolo de digestão de proteinas em solução do LNBIO (**http://lnbio.cnpem.br/wp-content/uploads/2012/11/protocolo_digestao_solucao.pdf**)**

Protocolo de digestão em solução: Laboratório de Espectrometria de Massas LNBio

(Nature Protocols, vol.3/no10/1630-1638; 2008, modificado)

Esse protocolo pode ser utilizado para análises que serão realizadas em ESI Q-Tof e LTQ Orbitrap Velos para misturas complexas.

Obs.: Utilizar até 100 µg de proteína em um volume máximo de 200 µl.

Reagentes (todos devem ser preparados no dia do uso)

1. Ureia 8M: massa molar 60.06g/mol; 480,48mg em 1 ml de água purificada.
2. Bicarbonato de amônio 100 mM: 100 mM de bicarbonato de amônio em água purificada (massa molar 79,06 g/mol; 158 mg em 20 mL de água purificada).
3. Bicarbonato de amônio 50 mM: 50 mM de bicarbonato de amônio em água purificada (massa molar 79,06 g/mol; 79 mg em 20 mL de água purificada).
4. Ditiotreitol (DTT) 0.5M: 0.5M de DTT em bicarbonato de amônio 50 mM (massa molar 154.25g/mol; 77,12mg em 1mL de bicarbonato de amônio 50 mM).
5. Cloreto de cálcio (CaCl2) 0.1M: 0,0110g em 1ml de água purificada (massa molar: 110.99g/mol).
6. Iodoacetamida (IAA) 0.5M: 0.5M de IAA em bicarbonato de amônio 50 mM (massa molar 184.96g/mol; 92,5 mg em 1ml de bicarbonato de amônio 50 mM).
7. Solução de Tripsina: 20 ng/µL (Sequence grade Modified Tripsin V5111-Promega): solubilizar em bicarbonato de amônio 50mM, aliquotar e armazenar a -20°C.

Procedimento

Dia 1

1. Adicionar ureia 8M (1:1) na solução.
2. Redução: adicionar solução de DTT 5 mM final. Incubar durante 25 minutos a 56ºC.

3. Alquilação: adicionar solução de IAA 14 mM final. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente protegido da luz.

4. Quench da IAA livre: adicionar solução de DTT 5 mM final. Incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente protegido da luz.

5. Diluir a amostra 1:5 em 50mM de bicarbonato de amônio para reduzir a concentração da ureia para 1.6M.

6. Adicionar solução de CaCl2 1mM final.

7. Preparo da tripsina: 20 µg de tripsina em 1000 µL de bicarbonato de amônio 50 mM gelado. Concentração final da tripsina 20ng/µL.

8. Adicionar solução de tripsina (sugestão usar na proporção de 1:50 de enzima:substrato). Incubar durante 16 h a 37°C.

Dia 2

1. Parar a reação da enzima adicionando TFA (ácido trifluoacético) na concentração final de 0.4%. Verificar se o pH está abaixo de 2.0; caso não esteja adicionar mais TFA 0.4%. Para as amostras que não forem passar por dessalinização parar a reação com ácido fórmico 0.4% final.

2. Centrifugar a 2500g por 10 minutos em temperatura ambiente. Descartar o pellet.

3. Liofilizar as amostras que não tenham sal; do contrário proceder com o desalting dos peptídeos usando colunas de dessalinização como SepPack (Waters, C18) ou OASIS (Waters, HLB).

4. Armazenar a amostra a -20°C até a realização da análise.

ANEXO B – Proteinas diferencialmente acumuladas com pvalue corrigido maior que 0,05 e fold-change maior ou igual a 1,5. Nas fases I, II e III da germinação.

Fase I da germinação

ID Proteina	[BI]	[EI]	Nome da Proteina
I1JZA1	0	21.6561	PH domain-containing protein
K7KJD1	0	20.737349	C2 NT-type domain-containing protein
A0A0R0KJ08	0	20.698778	Uncharacterized protein
P11828	0	19.5711	Glycinin G3
I1KZT0	0	18.977566	ANK_REP_REGION domain-containing protein
I1LCI2	0	18.858208	AP2/ERF domain-containing protein
P25273	0	18.578394	Kunitz-type trypsin inhibitor KTI2
I1LGL0	0	18.54792	Uncharacterized protein
A0A0R0JBV9	0	18.527948	Uncharacterized protein
I1KS01	0	18.51111	Lipoxygenase
P01071	0	18.50409	Trypsin inhibitor B
A0A0R0ILM7	0	18.343744	Protein kinase domain-containing protein
A0A0R0G554	0	18.323904	Lipoxygenase
A0A0R0JTV5	0	17.93569	Elongation factor 1-alpha
I1KSX5	0	17.499216	Uncharacterized protein
A0A0R0EEX1	0	17.411364	TENA_THI-4 domain-containing protein
A0A0R4J2Q7	0	17.201132	Ribosomal_L16 domain-containing protein
I1KH77	0	17.178385	Midasin
I1LTT3	0	17.098488	Uncharacterized protein
A0A0R0HWC8	0	17.080652	Ribosomal protein L19
A0A0R0G348	0	16.8747	ATP-dependent DNA helicase
I1LJ14	0	16.813618	Uncharacterized protein
A0A0R0EC54	0	16.54114	Uncharacterized protein
I1KA18	0	16.54088	Acetyl-CoA carboxylase
I1JWK3	0	16.467474	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase
K7N1E9	0	16.446798	ABC transporter domain-containing protein
I1LKS7	0	16.271763	Poly [ADP-ribose] polymerase
A0A0R0HLR7	0	16.266157	NB-ARC domain-containing protein (Fragment)
A0A0R0HRS8	0	16.128447	ATP-dependent DNA helicase (Fragment)
A0A0R0EZH9	0	16.080189	Mitogen-activated protein kinase
C6SVF6	0	15.762088	Glutaredoxin domain-containing protein
K7LT57	0	15.736758	PfkB domain-containing protein
I1JTB4	0	15.732086	Uncharacterized protein
A0A0R0GRY6	0	15.582959	14_3_3 domain-containing protein
A0A0R0KE22	0	15.580714	RECA_2 domain-containing protein
A0A0R0FYJ2	0	15.529938	Protein kinase domain-containing protein
I1KUQ6	0	15.46888	Lipoxygenase

K7KFA4	0	14.805263	Uncharacterized protein
A0A0R0GLJ3	17.652174	16.985863	ADH_zinc_N domain-containing protein
A0A0R0JL19	18.719925	17.885923	Uncharacterized protein
A0A0R0I4F6	17.98148	17.02394	Uncharacterized protein
Q01417	15.043193	0	18 kDa seed maturation protein
A0A0R0GI82	15.396324	0	Uncharacterized protein
I1JSW4	15.490653	0	O-fucosyltransferase family protein
C6SW56	15.54665	0	Uncharacterized protein
I1NCT4	15.6151	0	Uncharacterized protein
I1MUP9	15.636231	0	Uncharacterized protein
A0A0R0JEI9	15.773506	0	14_3_3 domain-containing protein
A0A0R0LJU1	15.812421	0	Uncharacterized protein
A0A0R0JTY5	16.086525	0	Ubiquinol oxidase
I1LY64	16.18754	0	Uncharacterized protein
Q9SWB4	16.190474	0	Protein ADP-ribosyltransferase PARP3
C6SXM8	16.413406	0	Ribosomal protein L19
I1NAM6	16.53581	0	BZIP domain-containing protein
I1LXY1	16.5819	0	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase
C6T048	16.588385	0	Uncharacterized protein
A0A368UHG1	16.613195	0	Uncharacterized protein
K7M733	16.721125	0	Uncharacterized protein
A0A0R0JPR9	16.740593	0	Uncharacterized protein
I1MLL7	16.833994	0	Uncharacterized protein
K7M324	17.12853	0	Uncharacterized protein
A0A0R0GZG6	17.43933	0	Uncharacterized protein
A0A0R0GFJ1	17.624008	0	Ribosomal_L16 domain-containing protein
I1KY24	17.62546	0	NAD(P)-bd_dom domain-containing protein
B3TDK9	17.68026	0	Lipoxygenase
K7K7B4	17.740236	0	Uncharacterized protein
I1K564	17.883621	0	Amidase domain-containing protein
I1KTX8	17.953245	0	Phosphoglycerate kinase
K7KUE0	18.003653	0	C2 NT-type domain-containing protein
K7KCN4	18.093836	0	PMD domain-containing protein
A0A0R0FM97	18.167562	0	Elongation factor 1-alpha
C6SWX1	19.392172	0	40S ribosomal protein S25
A0A0R0EH75	19.716259	0	Uncharacterized protein
I1L1D4	19.969194	0	Rab-GAP TBC domain-containing protein
K7M1I5	20.607838	0	VARLMGL domain-containing protein

Fase II da germinação

Protein	[BII]	[EII]	Protein Name
A0A0R0EF61	0	19.441162	Protein kinase domain-containing protein
K7KUE0	0	18.727867	C2 NT-type domain-containing protein

A0A0R0IZF7	0	18.450056	CCHC-type domain-containing protein
I1L1D4	0	18.398552	Rab-GAP TBC domain-containing protein
K7M6Y6	0	17.879911	Prolamin_like domain-containing protein
I1JMA5	0	17.84413	Lipoxygenase
K7N116	0	17.337797	DPPIV_N domain-containing protein
P25273	0	17.237188	Kunitz-type trypsin inhibitor KTI2
I1L877	0	17.211885	Uncharacterized protein
I1MNY0	0	17.056383	Protein kinase domain-containing protein
A0A0R0HJJ7	0	16.952635	Serine/threonine-protein kinase TOR
Q39871	0	16.9478	Late embryongenesis abundant protein
A0A0R0H731	0	16.750807	Uncharacterized protein
A0A0R0K016	0	16.585894	Lipoxygenase domain-containing protein
A0A0R0FLV7	0	16.521975	DUF659 domain-containing protein
A0A0R0J304	0	16.45568	Uncharacterized protein
K7K4G2	0	16.165976	Cupin type-1 domain-containing protein
I1JWK3	0	15.878179	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase
A0A0R0G348	0	15.747142	ATP-dependent DNA helicase
C6T0L2	0	15.352154	Protein SLE3
A0A0R0IBE8	0	15.315323	ATP-dependent DNA helicase
A0A0R0H1N2	0	15.178971	Uncharacterized protein
A0A0R0H9A9	0	15.167065	Non-specific serine/threonine protein kinase
K7M4Y8	0	15.143285	Uncharacterized protein
I1JXA0	0	14.885184	Uncharacterized protein
I1NCX2	0	14.741853	Uncharacterized protein
A0A0R0FJH4	0	14.663032	Uncharacterized protein
Q01417	0	14.54686	18 kDa seed maturation protein
K7KKB6	0	14.464757	Uncharacterized protein
C3VHQ8	0	14.295283	Oleosin
I1KRZ4	0	13.402205	Uncharacterized protein
Q9XER5	15.688583	16.381598	Seed maturation protein PM22
I1JI49	15.198806	14.607971	TPT domain-containing protein
C6SW56	15.266038	14.649882	Uncharacterized protein
I1KYW3	16.960169	16.316671	Uncharacterized protein
A0A0R0GW87	16.992462	16.326292	Histone H2B
I1MBR7	15.479821	14.812421	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
C6SWA6	16.23865	15.546426	Histone H2A
A0A0R0I621	18.653915	17.941757	Uncharacterized protein
A0A0R0H2H7	16.438812	15.688706	Cupin type-1 domain-containing protein
A0A0R0I4F6	16.877823	16.092506	Uncharacterized protein
P04347	18.031944	17.087303	Glycinin G5
K7KTR9	14.592599	0	Oleosin

A0A0R0GRY6	14.695366	0	14_3_3 domain-containing protein
I1JE09	14.738342	0	Uncharacterized protein
C6F117	15.044419	0	Putative ribosomal protein S15
C6T4R9	15.246409	0	Ubiquitin
A0A0R0F6C6	15.259125	0	CASP-like protein
I1JPP3	15.310466	0	Uncharacterized protein
I1JSE5	15.408839	0	Uncharacterized protein
A0A0R0GLU9	15.426623	0	Helitron_like_N domain-containing protein
I1N9V7	15.426623	0	Uncharacterized protein
A0A0R0ER15	15.51321	0	DNA mismatch repair protein
A0A0R0F403	15.520549	0	Uncharacterized protein
A0A0R0K6T3	15.621646	0	Uncharacterized protein
I1JLC8	15.819382	0	Protein SLE2
I1LU88	15.911984	0	SET domain-containing protein
A0A0R0L851	16.226162	0	ATP-dependent DNA helicase
A0A0R0IJL1	16.4999	0	ANK_REP_REGION domain-containing protein
A0A0R0EDA6	16.815348	0	SANT domain-containing protein
A0A0R0JU59	16.820112	0	DUF659 domain-containing protein
K7LH85	17.000952	0	Omp85 domain-containing protein
A0A0R0KV40	17.017843	0	Lipoxygenase
I1JEG8	17.132196	0	Protein kinase domain-containing protein
I1LHP6	17.191397	0	Cupin type-1 domain-containing protein
I1KY24	17.219599	0	NAD(P)-bd_dom domain-containing protein
A0A0R0KJS8	17.228994	0	Endo/exonuclease/phosphatase domain-containing protein
A0A0R0JKI7	17.52841	0	Uncharacterized protein
A0A0R0F849	17.74106	0	Bromo domain-containing protein
A0A0R0LMI1	17.804976	0	Uncharacterized protein
A0A0R0HJG5	18.415941	0	AAI domain-containing protein
P11828	18.619728	0	Glycinin G3
A0A0R0HEN5	18.630499	0	ATP-dependent DNA helicase
I1N370	19.016254	0	Non-specific serine/threonine protein kinase

Fase III da germinação

Protein	[BIII]	[EIII]	Protein Name
A0A0R0H030	0	20.6392	Uncharacterized protein
A0A0R0K7S3	0	20.0641	Protein arginine N-methyltransferase 2
A0A0R0IGV2	0	19.7173	(1->3)-beta-glucan endohydrolase
A0A0R0IT08	0	18.7530	Uncharacterized protein
K7LGX4	0	18.4245	AAA domain-containing protein

K7MGQ8	0	18.3211	DUF4378 domain-containing protein
Q04672	0	18.2262	Sucrose-binding protein
A0A0R0JBV9	0	18.0891	Uncharacterized protein
I1JY29	0	18.0352	Uncharacterized protein
Q9XE60	0	17.9026	Ribonucleotide reductase small subunit
I1KS01	0	17.7051	Lipoxygenase
A0A0R0G554	0	17.6024	Lipoxygenase
K7KDB3	0	17.4947	BTB_2 domain-containing protein
A0A0R0FM97	0	17.3562	Elongation factor 1-alpha
K7LJS6	0	17.3509	SWIM-type domain-containing protein
I1JV38	0	17.2653	Glucose-6-phosphate isomerase
C6SZZ2	0	17.1113	Histone H2A
A0A0R0JTV5	0	17.0836	Elongation factor 1-alpha
K7MPD3	0	17.0831	Uncharacterized protein
K7K4G2	0	17.0372	Cupin type-1 domain-containing protein
I1KUQ6	0	17.0347	Lipoxygenase
D6C4Z9	0	17.0197	HSP90-1
A0A0R0I854	0	17.0095	Tripeptidyl-peptidase II
A0A0R0JGZ7	0	16.9689	Uncharacterized protein
I1JGR5	0	16.9062	Uncharacterized protein
K7K7B7	0	16.8480	Uncharacterized protein
A0A0R0KPJ4	0	16.7572	Uncharacterized protein
I1NH02	0	16.7272	Glyco_hydro_18 domain-containing protein
I1KST1	0	16.6052	Protein kinase domain-containing protein
K7M324	0	16.4727	Uncharacterized protein
A0A0R0HHB6	0	16.4318	Uncharacterized protein
K7KBR1	0	16.4011	Histidine kinase
I1J8A7	0	16.2241	Uncharacterized protein
A0A0R4J5Z8	0	16.1826	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase
I1JWK3	0	16.1425	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase
K7LVC6	0	15.9736	Helitron_like_N domain-containing protein
I1JDH6	0	15.8151	S5 DRBM domain-containing protein
A0A0R0K6T3	0	15.8111	Uncharacterized protein
A0A0R0F5C8	0	15.7749	Uncharacterized protein
A0A0R0GJF4	0	15.5757	Uncharacterized protein
C6TNT2	0	15.5749	EF1Bgamma class glutathione S-transferase
K7KP61	0	15.5159	Uncharacterized protein
A0A0R0L3E1	0	15.5086	Uncharacterized protein
A0A368UIA3	0	15.4598	Protein kinase domain-containing protein
A0A0R0FG78	0	15.4559	Uncharacterized protein
K7L411	0	15.4029	Uncharacterized protein
K7K5R7	0	15.3797	CRM domain-containing protein

I1NAM6	0	15.2723	BZIP domain-containing protein
I1K0M8	0	15.0297	AAI domain-containing protein
K7KTR9	0	14.9466	Oleosin
I1K5M5	0	14.8554	AP-3 complex subunit delta
A0A0R0GFY6	0	14.3762	Uncharacterized protein
A0A0R0GRY6	14.7199	15.9983	14_3_3 domain-containing protein
P19594	16.5260	17.7586	2S albumin
A0A0R0FSI6	14.7713	15.9983	Thioredoxin domain-containing protein
C6T049	14.9624	16.1246	WBb98N11.9 protein
Q9XET1	16.4853	17.5218	Seed maturation protein PM31
A0A0R0HCK0	15.1527	16.1792	Uncharacterized protein
P24095	16.8876	17.9070	Seed linoleate 9S-lipoxygenase
C6T0B5	17.3375	18.3191	Uncharacterized protein
I1KC70	15.8418	16.8172	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
A0A0R0IAF2	16.6021	17.5706	Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin
C6T9Z5	16.1187	17.0507	Formate dehydrogenase, mitochondrial
I1N747	15.5816	16.4743	Oleosin
C6SWX1	17.9634	18.8427	40S ribosomal protein S25
I1KU21	15.1342	16.0084	Tr-type G domain-containing protein
C6TN36	15.3890	16.2594	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
P01070	18.2572	19.1239	Trypsin inhibitor A
I1LFR0	16.1703	16.9698	LEA_2 domain-containing protein
A0A0R0H2H7	15.7579	16.5396	Cupin type-1 domain-containing protein
A0A0R0FGC0	17.2472	18.0115	TENA_THI-4 domain-containing protein
I1JMQ0	16.4511	17.1743	Nucleoside diphosphate kinase
C6T4R9	15.4690	16.1857	Ubiquitin
C6SWG9	16.0439	16.7552	Uncharacterized protein
I1M596	16.4865	17.1947	Lipoxygenase
I1L860	17.4716	18.1770	Uncharacterized protein
A0A0R0HEL8	16.1854	16.8841	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
A0A0R4J4U4	16.9394	17.6370	Uncharacterized protein
I1KYW3	16.3523	17.0480	Uncharacterized protein
P29531	15.1662	15.8566	P24 oleosin isoform B
B3TDK6	17.0181	17.7075	Lipoxygenase
A0A0R0JI98	15.7766	16.4656	EF1_GNE domain-containing protein
I1K554	14.9613	15.6338	Knot1 domain-containing protein
P11827	18.1515	18.8208	Beta-conglycinin alpha' subunit
A0A0R0GSW1	17.6580	18.3158	Glycosyltransferase
I1KNS9	15.1605	15.8104	EF1Bgamma class glutathione S-transferase
A0A0R0KK84	18.3909	19.0223	Uncharacterized protein
A0A0R0FJR0	16.3763	16.9884	40S ribosomal protein SA

I1MBR7	15.1665	15.7693	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
I1KGP0	15.4243	16.0219	Uncharacterized protein
A0A0R0H296	15.3560	15.9484	Uncharacterized protein
A0A0R0GZ38	19.7288	20.3182	Uncharacterized protein
K7KPA2	18.4416	17.2769	RRM domain-containing protein
C3VHQ8	14.3958	0	Oleosin
A0A0R0E8L7	14.9643	0	Helitron_like_N domain-containing protein
K7LP60	15.1514	0	Uncharacterized protein
K7KSG5	15.2045	0	Uncharacterized protein
I1LK56	15.3423	0	Uncharacterized protein
Q71EW8	15.3734	0	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase
I1LBU9	15.3944	0	Uncharacterized protein
A0A368UK14	15.5304	0	Uncharacterized protein
I1LTT3	15.6732	0	Uncharacterized protein
A0A0R0GLU9	16.0647	0	Helitron_like_N domain-containing protein
A0A0R0H5X8	16.0788	0	ATP-dependent DNA helicase
K7KDZ7	16.2632	0	Uncharacterized protein
C6SWA6	16.3602	0	Histone H2A
A0A0R0FH00	16.4407	0	Uncharacterized protein
K7KWV7	16.4971	0	Uncharacterized protein
I1N5H9	16.5664	0	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase
I1LHP6	16.6613	0	Cupin type-1 domain-containing protein
A0A0R0ESZ8	16.9148	0	Elongation factor 1-alpha
K7KCN4	16.9562	0	PMD domain-containing protein
I1KUQ2	17.0311	0	Lipoxygenase
I1N0S5	17.4994	0	TOG domain-containing protein
P25273	17.5577	0	Kunitz-type trypsin inhibitor KTI2
I1NI08	17.7851	0	Uncharacterized protein
P01071	17.8464	0	Trypsin inhibitor B
I1JMA5	18.1300	0	Lipoxygenase
A0A0R0GBK3	18.3859	0	Uncharacterized protein
K7KGK0	18.5676	0	Plus3 domain-containing protein
K7KJD1	18.9236	0	C2 NT-type domain-containing protein
A0A0R0L8P5	18.9867	0	Proteasome subunit beta
I1JJL6	19.0775	0	HATPase_c domain-containing protein
A0A0R0HIH4	19.3757	0	RNA helicase
A0A0R0KCB5	19.9444	0	Uncharacterized protein
A0A0R0F5G2	20.4080	0	Protein-serine/threonine phosphatase

ANEXO C – Proteínas finamente reguladas na fase III da germinação de sementes de soja.

Proteínas mais abundante no lote B III				
Acess No.	Glyma Locus	Protein name	FM	PB
K7KPA2	GLYMA_05G098900	RRM domain-containing protein	Ligação de RNA	splicing de mRNA, via spliceossomo

Proteínas mais abundante no lote EIII				
Acess No.	Glyma Locus	Protein name	FM	PB
A0A0R0GRY6	GLYMA_14G176900	14_3_3 domain-containing protein	-	
P19594	N/A	2S albumin	Reservatório de nutriente	-
C6SWX1	100499810	40S ribosomal protein S25	Constituinte estrutural ribossomo	-
A0A0R0FJR0	100805318	40S ribosomal protein SA	Constituinte estrutural ribossomo	Tradução
P11827	CG-1	Beta-conglycinin alpha' subunit	Reservatório de nutriente	-
A0A0R0H2H7	GLYMA_12G071600	Cupin type-1 domain-containing protein	-	
A0A0R0JI98	GLYMA_06G170900	EF1_GNE domain-containing protein	Alongamento tradução	Tradução
I1KNS9	EF1Bgamma1	EF1Bgamma class glutathione S-transferase	Alongamento tradução	Tradução

C6T9Z5	100794313	Formate dehydrogenase, mitochondrial	Atividade Catalítica	processo catabólico formato
A0A0R0IAF2	GLYMA_09G192800	Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin	Atividade Catalítica	resposta celular ao estresse oxidativo
I1KC70	GLYMA_06G172700	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Atividade Catalítica	processo glicolítico
C6TN36	100782924	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		
A0A0R0GSW1	GLYMA_13G061600	Glycosyltransferase	Atividade Catalítica	processo glicolítico
I1K554	100306228	Knot1 domain-containing protein	não anotado	Respota de defesa
I1LFR0	GLYMA_11G003000	LEA_2 domain-containing protein	-	
B3TDK6	Lx3	Lipoxygenase	oxirredutase	Oxidação lipídica
I1M596	547774	Lipoxygenase		
I1JMQ0	GLYMA_03G109500	Nucleoside diphosphate kinase	nucleoside diphosphate kinase activity	fosforilação de difosfato de nucleosídeo
I1N747	GLYMA_19G063400	Oleosin	-	armazenamento de lipídio
P29531	N/A	P24 oleosin isoform B		
A0A0R0HEL8	GLYMA_11G098700	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	atividade de peptidil-prolil cis-trans isomerase	isomerização de proteína peptidil-prolil
P24095	LOX1.4	Seed linoleate 9S-lipoxygenase	oxirredutase	lipid oxidation

Q9XET1	PM31	Seed maturation protein PM31	auto-associação de proteínas	dobramento de proteína
A0A0R0FGC0	547557	TENA_THI-4 domain-containing protein	atividade de tiaminase	processo biossintético de difosfato de tiamina
A0A0R0FSI6	GLYMA_17G254200	Thioredoxin domain-containing protein	-	
I1KU21	100804251	Tr-type G domain-containing protein	atividade do fator de alongamento da tradução	tradução
P01070	KTI3	Trypsin inhibitor A	atividade inibidora da endopeptidase do tipo serina	-
C6T4R9	100527579	Ubiquitin	marcação de proteina	ubiquitinação de proteínas
A0A0R0GZ38	100811636	Uncharacterized protein (proteína ribossomal)	constituinte estrutural do ribossomo	Tradução
A0A0R0KK84	547901	Uncharacterized protein (proteina de armazenamento de sementes)	Atividade de reserva de nutriente	-
I1L860	GLYMA_10G028300	Uncharacterized protein	-	
C6T0B5	100306653	Uncharacterized protein	ligação GTP	-
A0A0R4J4U4	GLYMA_13G035200	Uncharacterized protein (Álcool desidrogenase 1)	atividade da álcool desidrogenase, dependente de zinco	processo catabólico de formaldeído

I1KYW3	100798239	Uncharacterized protein (Kunitz-type trypsin inhibitor KTI1)	atividade do inibidor de endopeptidase	regulação negativa da atividade da endopeptidase
C6SWG9	100499784	Uncharacterized protein (60S s)	constituinte ribossomo	Tradução
I1KGP0	GLYMA_07G020000	Uncharacterized protein (proteina ribossomal)	Ligação ao RNA	maturação de LSU-rRNA a partir do transcrito de rRNA tricistrônico (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)
A0A0R0H296	GLYMA_12G072300	Uncharacterized protein (proteina ribossomal)	constituinte estrutural do ribossomo	Tradução
A0A0R0HCK0	GLYMA_11G052400	Uncharacterized protein	ligação GTP	transporte de proteína intracelular
I1MBR7	100790112	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Atividade Catalítica	glicogênese
C6T049	WBb98N11.9	WBb98N11.9 protein	ligação de esterol	transporte de esterol