

**RODRIGO DE OLIVEIRA LARA**

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS, ANATÔMICAS E  
PROTEÔMICA DE SEMENTES FLORESTAIS SOB ESTRESSE TÉRMICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges

Coorientadores: Edvaldo Barros

Genaina Aparecida de Souza

Sebastião Tavares de Rezende

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2019**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L318a  
2019 Lara, Rodrigo de Oliveira, 1987-  
Alterações bioquímicas, fisiológicas, anatômicas e  
proteômica de sementes florestais sob estresse térmico / Rodrigo  
de Oliveira Lara. – Viçosa, MG, 2019.  
100 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Árvores - Efeito da temperatura. 2. *Cedrela fissilis*. 3.  
*Melanoxylon brauna*. 4. Proteínas. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Engenharia Florestal. Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Florestal. II. Título.

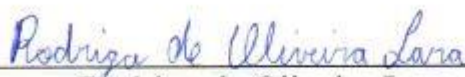
CDO adapt. CDD 634.918122|

**RODRIGO DE OLIVEIRA LARA**

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS, ANATÔMICAS E  
PROTEÔMICA DE SEMENTES FLORESTAIS SOB ESTRESSE TÉRMICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de agosto de 2019.



---

Rodrigo de Oliveira Lara  
Autor



---

Eduardo Euclides de Lima e Borges  
Orientador

**Dedico essa tese a minha  
família e amigos que me  
poiaram por toda essa  
trajetória.**

**“Mesmo as aranhas mais caprichosas podem deixar um fio frouxo”. (John Ronald Reuel Tolkien)**

## **BIOGRAFIA**

Rodrigo de Oliveira Lara, filho de Canuto de Oliveira Lara e Maria Aparecida Alves Lara, natural de Abaeté, Minas Gerais, nasceu em 15 de setembro de 1987.

Cursou ensino fundamental na Escola Estadual Frederico Zacarias e o nível médio na Escola Estadual Doutor Edgardo da Cunha Pereira, concluído em dezembro de 2005.

Em agosto de 2007, ingressou na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, graduando-se Engenheiro Florestal em janeiro de 2012.

Em fevereiro de 2012, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, concluindo os requisitos necessários para obter o título de Mestre em Ciências Florestais com ênfase em Silvicultura e Recuperação de Áreas Degradadas em fevereiro de 2014, com apresentação da dissertação.

Em junho de 2014, foi contratado pela Fortal Engenharia para trabalhar no projeto de inventário e recuperação da Reserva Biológica União e Reserva Biológica do Poço das Antas em Rios das Ostras, Rio de Janeiro. Também lecionou no curso técnico de Segurança do Trabalho ministrando a disciplina Prevenção de Incêndios durante mesmo período.

Em fevereiro de 2016, retomou os estudos no Programa de Pós-graduação em Gestão de Projetos (Lato Sensu), na Pontifícia Universidade Católica, Belo Horizonte. Concluiu os requisitos da especialização em julho de 2019.

Em março de 2016, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal, nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Doctor Scientiae* em agosto de 2019 com defesa de tese.

## RESUMO

LARA, Rodrigo de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2019. **Alterações bioquímicas, fisiológicas, anatômicas e proteômica de sementes florestais sob estresse térmico.** Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Coorientadores: Edvaldo Barros, Genaina Aparecida de Souza e Sebastião Tavares de Rezende.

Estudos anatômicos, fisiológicos e bioquímicos durante a germinação de sementes de *Cedrela fissilis* sob estresse térmico são fundamentais, tendo em vista a possibilidade do aumento da temperatura global, da importância econômica da espécie e do pouco conhecimento acerca do seu uso. Além disso, a escassez de informações com base em análise proteômica em espécies nativas brasileiras, estudos de espécies de interesse econômico e ambiental são necessários como a *Melanoxylon brauna*. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo: avaliar alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas durante a germinação de *Cedrela fissilis* em diferentes temperaturas e analisar qualitativamente o perfil de proteínas de sementes de *M. brauna* sob estresse térmico. Avaliou-se a germinação de cedro em 25, 30 e 35 °C, temperatura alternada de 35/25 °C, o índice de velocidade de germinação (IVG), condutividade elétrica, consumo de oxigênio, e monossacarídeos de açúcares solúveis. Também foi avaliado o teor de peróxido de hidrogênio durante a germinação, assim como a atividade enzimática da invertase, ascorbato peroxidase, protease, catalase, superóxido dismutase, peroxidase de fenóis em condições de diferentes temperaturas. Realizou-se cortes anatômicos da semente e histoquímica de proteínas. O perfil expresso de proteínas de *M. brauna* foi utilizado SDS PAGE com short run e a leitura feita por espectrometria de massas UPLC nanoAcquity MS. Os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente causalizado (DIC). A embebição das sementes de cedro em 35 °C com posterior transferência para 25 °C favoreceu a germinação. Na temperatura de 35 °C ocorreram maiores danos ao sistema de membranas, aumento no consumo de oxigênio, maior alteração de compostos de reserva tais como redução no teor de amido, teor de glicose total e monossacarídeos assim como, acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, maior atividade de invertase e proteases, comprometimento do sistema oxidante e posterior morte das sementes. Após 72 horas de embebição, foram observadas alterações anatômicas na região micropilar e no endosperma lateral assim como redução de proteínas. A análise proteômica da semente de *M. brauna* demonstrou que há diferença de abundância de proteínas

expressas quando as sementes são submetidas a 25 e 40 °C. Foram identificadas 69 proteínas em sementes de braúna. A presença de proteínas em T0 (sem embebição) estão relacionadas a proteção e processo germinativo inicial da semente. Sob 25°C as proteínas presentes pertencem a síntese de ATP, sistema antioxidante, proteção celular e síntese de novo. As proteínas detectadas à 40 °C integram vias ligadas ao estresse oxidativo, sistema antioxidante, manutenção celular.

Palavras-chave: Efeito da temperatura. *Cedrela fissilis*. *Melanoxylon brauna*. Proteína.



## ABSTRACT

LARA, Rodrigo de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2019. **Biochemical, physiological, anatomical and proteomic alterations of forest seeds under thermal stress.** Advisor: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Co-advisers: Edvaldo Barros, Genaina Aparecida de Souza and Sebastião Tavares de Rezende.

Anatomical, physiological and biochemical studies during the germination of *Cedrela fissilis* seeds under thermal stress are fundamental, considering the possibility of global temperature increase, the economic importance of the species and the little knowledge about its use. In addition, the scarcity of information based on proteomic analysis in native Brazilian species, studies of species of economic and environmental interest are necessary as *Melanoxylon brauna*. In this sense, the present work aims: to evaluate biochemical, physiological and anatomical changes during *Cedrela fissilis* germination at different temperatures and to qualitatively analyze the protein profile of *M. brauna* seeds under thermal stress. Cedar germination at 25, 30 and 35 ° C, alternating temperature of 35/25 ° C, germination speed index (IVG), electrical conductivity, oxygen uptake, and soluble sugar monosaccharides were evaluated. Hydrogen peroxide content during germination was also evaluated, as well as the enzymatic activity of invertase, ascorbate peroxidase, protease, catalase, superoxide dismutase, phenol peroxidase under different temperature conditions. Seed anatomical sections and protein histochemistry were performed. The expressed profile of *M. brauna* proteins was used with short run SDS PAGE and reading by UPLC nanoAcquity MS mass spectrometry. The experiments were conducted in a completely causal design (DIC). The soaking of cedar seeds at 35 ° C and later transfer to 25 ° C favored germination. At 35 ° C, there was greater damage to the membrane system, increased oxygen uptake, greater change in reserve compounds such as reduced starch content, total glucose and monosaccharides as well as increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation, invertase and proteases, oxidative system impairment and subsequent seed death. After 72 hours of soaking, anatomical changes were observed in the micropillary region and lateral endosperm as well as protein reduction. Proteomic analysis of *M. brauna* seed showed that there is a difference in abundance of proteins expressed when seeds are submitted to 25 and 40 ° C. We identified 69 proteins in brauna seeds. The presence of proteins in T0 (without imbibition) are related to seed protection and initial germination process. At 25 ° C the proteins present belong to ATP synthesis, antioxidant system, cellular protection and de

novo synthesis. Proteins detected at 40 ° C integrate pathways linked to oxidative stress, antioxidant system, cellular maintenance.

Keywords: Effects of temperature. *Cedrela fissilis*. *Melanoxylon brauna*. Protein.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Porcentagem de germinação (A) e índice de velocidade de germinação (B) de *Cedrela fissilis* em diferentes temperaturas alternadas (Temperaturas de 35 °C por 24, 48, 72 e 96 horas e retorno para temperatura 25 °C); curva de embebição (C); condutividade elétrica (D); teores de lipídios (E); quantificação de açúcares solúveis presentes em exsudatos durante a germinação (F). Média ± erro padrão, n= 5; letras diferentes indicam diferença estatística de acordo com o teste de Tukey (P<0,05).....15

**Figura 2:** Teores de amido (A); açúcares solúveis (B); proteína total (C); consumo de oxigênio (D); hipóteses de alterações e mobilização de compostos de reserva durante a germinação de *Cedrela fissilis* em diferentes temperaturas (E). As setas indicam alterações significativas em diferentes compostos em 72 h. n= 5,0 ± erro padrão.....17

**Figura 3:** Teores médios de arabinose (A), xilose (B), manose (C) e glicose (D) em sementes de *Cedrela fissilis* sob diferentes temperaturas e tempos.....19

**Figura 1:** (A) Porcentagem de germinação, (B) Atividades específicas de protease, (C) invertase e (D) Teor do peróxido de hidrogênio em sementes de *Cedrela fissilis*, durante o período de germinação em diferentes temperaturas. \* Indica diferença significativa pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ), n= 5, ± erro padrão.....34

**Figura 2:** Atividade específica de (A) ascorbato peroxidase (B) catalase, (C) peroxidase e (D) superóxido dismutase em sementes de *Cedrela fissilis* durante o período de germinação em diferentes temperaturas. \* Indica diferença estatística pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ), n= 5, ± erro padrão.....35

**Figura 3:** Cortes longitudinais de sementes de *Cedrela fissilis* durante a embebição coradas com azul de toluidina em A, C, D, E, G, I, J, K de 250 µm; região micropilar em B, F, H, L, N e R com barras de 500 µm. As setas indicam alongamento do embrião. Sendo: T1: 25 °C/24 h, T2: 25 °C/48h, T3: 25°C/72h, T4: 25 °C/96h, T5: 30 °C/24h, T6: 30 °C/48h, T7: 30 °C/72h, T8: 30 °C/96h, T9: 35 °C/24h, T10: 35°C/48 h, T11: 35 °C/72 h, T12: 35 °C/96h.....37

**Figura 4:** Cortes transversais de sementes coradas para proteína com Xiluidine Ponceo durante a embebição em de sementes de *Cedrela fissilis*. Barras= 250 µm. T1: 25 °C/24 h, T2: 25 °C/48h, T3: 25°C/72h, T4: 25 °C/96h, T5: 30 °C/24h, T6: 30 °C/48h, T7: 30 °C/72h, T8: 30 °C/96h, T9: 35 °C/24h, T10: 35°C/48 h, T11: 35 °C/72 h, T12: 35 °C/96h.....38

**Figura 1:** Proteínas homologas identificadas de acordo com as abordagens PEAKS e Mascot Scaffold em sementes de *Melanoxylon brauna* em diferentes

temperaturas.....	56
<b>Figura 2:</b> Proteínas homologas identificadas conforme cada tratamento térmico em sementes de <i>Melanoxylon brauna</i> .....	56
<b>Figura 3:</b> Classificações funcionais (%) das proteínas identificadas em sementes de <i>Melanoxylon brauna</i> pelo KOG.....	65
<b>Figura 4:</b> Classificação funcional das proteínas identificadas em sementes de <i>Melanoxylon brauna</i> pelo KOG – Funções versus número de proteínas.....	65
<b>Figura 5:</b> Análise de string de sementes de <i>Melanoxylon brauna</i> submetidas a diferentes temperaturas.....	66

## SUMÁRIO

<b>Introdução geral</b> .....	13
<b>Referências</b> .....	17
<b>Artigo 1</b> .....	21
Temperatura e atividade fisiológica em sementes de <i>Cedrela fissilis</i> .....	21
<b>1-Introdução</b> .....	21
<b>2-Material e Métodos</b> .....	23
<b>3-Resultados</b> .....	25
<b>4-Discussão</b> .....	31
<b>5-Conclusões</b> .....	35
<b>6-Referências bibliográficas</b> .....	35
<b>Artigo 2</b> .....	41
Alterações enzimáticas e anatômicas na germinação de <i>Cedrela fissilis</i> em diferentes temperaturas. ....	41
<b>1- Introdução</b> .....	41
<b>2- Material e métodos</b> .....	43
<b>3- Resultados</b> .....	46
<b>4- Discussão</b> .....	51
<b>5- Conclusões</b> .....	55
<b>6- Referências bibliográficas</b> .....	55
<b>Artigo 3</b> .....	61
Análise qualitativa de proteínas de <i>Melanoxylon brauna</i> por espectrometria de massas em diferentes temperaturas .....	61
<b>1-Introdução</b> .....	61
<b>2-Material e métodos</b> .....	64
<b>3-Resultados</b> .....	68
<b>4-Discussão</b> .....	79
<b>5-Conclusões</b> .....	86
<b>6-Referências bibliográficas</b> .....	87
<b>Conclusões Gerais</b> .....	99

## Introdução geral

Atualmente, tem-se discutido sobre a mudança no clima do planeta, principalmente relacionado com o excesso de emissão de CO<sub>2</sub> que pode impactar a vida humana na terra (MITCHARD et al., 2018). O Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), em seu quinto relatório, informou que o aumento de 1,5 °C já é uma realidade e que os impactos negativos sobre as atividades humanas são evidentes (IPCC, 2018). De acordo com este relatório, as mudanças na temperatura podem oscilar de 1°C a 5 °C até o final do século dependendo do aquecimento e da emissão de gases de efeito estufa.

Esse aumento acarretará vários impactos nos ecossistemas e no ciclo hidrológico, com alterações nos padrões de chuva e temperatura, além da intensificação de eventos climáticos extremos. Podendo causar impactos negativos em diversos segmentos socioeconômicos do Brasil, como a agricultura e pecuária (FERRERO et al., 2017), geração de energia (CERRI et al., 2018), abastecimento de água, ocorrência de desastres naturais (SALVIANO, et al., 2016), impactos significantes na fauna e flora (PBMC, 2013). As projeções de 2011 a 2040 demonstram que a temperatura média anual no estado de São Paulo aumentará 4°C, com tendência a elevação até 8°C no período de 2011-2100 (LYRA et al., 2018).

Nesse sentido, os biomas brasileiros apresentam alterações na estrutura vertical e horizontal dentro da floresta associado a efeitos climáticos (FONTANA et al., 2018). No nordeste do Brasil, a caatinga teve redução de 50% de pluviosidade média esperada de 2010 a 2016, com período de secas prolongadas e crescentes áreas de desertificação (MARENGO et al., 2018). A mata atlântica terá alta de 2 a 3 °C e baixa pluviométrica entre 20 a 25% até o final do século. Na área de cerrado a projeção é ainda mais grave visto que a temperatura terá elevação de 4 a 5 °C, podendo atingir até 8°C até o final do século. Associado a isso, a irregularidade dos padrões de pluviosidade em estados como Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e norte de São Paulo pode causar prejuízo a atividade humana e estabelecimento de espécies florestais nessas áreas (TAVARES et al., 2018). Assim, essas alterações indicam comprometimento da variabilidade genética e mudanças estruturais que compõem as espécies florestais.

A temperatura é um componente determinante da ocorrência de uma espécie em um bioma pela influência em sua germinação até o estabelecimento da plântula. A sensibilidade e vulnerabilidade de espécies às mudanças climáticas, sobretudo em

condições temperaturas elevadas, tem sido estudada por vários pesquisadores. As sementes de *Enterolobium contortisuliquum* apresentam 92% de germinação quando submetidas a temperaturas de 20 a 30 °C. Contudo, com redução quando submetidas além dessas temperaturas (RAMOS et al., 2018). O mesmo padrão ocorre com *Prosopis juliflora* (PEREIRA et al., 2018), *Schinus terebinthifolius* (VITÓRIA et al., 2018), *Parkia platycephala* (SILVA et al., 2017), *Gochnatia polymorpha* (MACHADO et al., 2016) e *Simira gardneriana* (OLIVEIRA et al., 2016) com redução acentuada na germinação quando submetidas a temperaturas acima de 30 °C.

Diante da perspectiva sobre a elevação da temperatura, levanta-se o questionamento como se dará a resposta adaptativa das espécies e como se pode interferir de modo a preservar e, conseqüentemente, evitar a extinção das espécies.

Dentre as espécies florestais nativas de importância ecológica e econômica tem-se a *Melanoxylon brauna*, popularmente conhecida como braúna, pertencente à família Fabaceae Caesalpinioidea. De ocorrência natural na floresta pluvial da encosta atlântica das regiões Nordeste e Sudeste, especialmente nos estados da Bahia, São Paulo e Minas Gerais (LORENZI et al., 2008). A espécie é conhecida pela qualidade e durabilidade de suas madeiras, apresentam característica acastanhada, quase negra nos espécimes mais velhos, sendo considerada uma madeira de lei de grande valor econômico (ATAÍDE et al., 2017). No entanto, devido a intensa exploração, a espécie se encontra atualmente na lista de espécies ameaçadas de extinção (BRASIL, 2014).

Outra espécie de relevância para uso é a *Cedrela fissilis*. Pertencente à família Meliaceae, a *Cedrela fissilis* é conhecida popularmente como cedro-cheiroso, cedro-fêmea, cedro-mogno e cedro-rosa. É uma espécie parcialmente ombrófila no estágio juvenil e heliófila no estágio adulto. Ocorre tanto na floresta primária, sobretudo nas bordas da mata ou clareiras, como na floresta secundária, porém nunca em formações puras (AMARAL et al. 2006). Comporta-se como secundária inicial ou secundária tardia (DURIGAN et al., 2002). É distribuída mais frequentemente na Mata Atlântica, contudo é encontrada também na floresta Amazônica. Segundo LORENZI (et al., 2002), é uma espécie decídua, heliófita ou escleriófita, com características de florestas semi decíduas, menos frequente em floresta densa. O amadurecimento dos frutos ocorre entre abril e novembro. A madeira serrada ou roliça pode ser usada para construção civil, naval e aeronáutica, movelaria, marcenaria, confecção de instrumentos musicais e esculturas, entre outros. Como lenha, a madeira de cedro é considerada de boa

qualidade. No mercado, a madeira de cedro é cotada ao valor de compra R\$ 180/m<sup>3</sup> e venda de R\$ 650/m<sup>3</sup>. (AUGUSTA et al., 2015).

Visando o uso em Programas de Recuperação de Áreas, a *C. fissilis* é também uma espécie importante para recuperação florestal de áreas degradadas e de matas ciliares, onde não ocorrem inundações (DURIGAN et al., 2002). Esta espécie também é promissora para a recuperação de solos contaminados por metais pesados (SIQUEIRA-SILVA et al., 2016).

Apesar do aumento considerável dos estudos com semente de espécies florestais nativas, ainda há carência de informações básicas sobre essa espécie de alto valor econômico, paisagístico e ecológico. Há poucas informações a respeito do comportamento fisiológico, bioquímico, anatômico e proteômico dessas espécies principalmente quando em condições adversas. Logo, estudos sobre essa condição podem ser esclarecedoras e, portanto, apresentar resultados essenciais para preservação e uso das espécies.

Os compostos de reserva das sementes podem variar entre espécie e dentro de uma mesma espécie (CORTE et al., 2006). São constituídos por carboidratos, amidos, proteínas e lipídios que são hidrolisados durante a germinação. Estes compõem a fonte energética necessária ao embrião de tal modo que desencadeiam processos metabólicos que fornecem energia para a retomada do crescimento do embrião. Dessa forma, os compostos são translocados do cotilédone para o eixo embrionário, agindo como fonte energética para a emissão da raiz primária.

Do mesmo modo, os compostos de reserva sofrem influência da temperatura durante o processo germinativo. Esse aumento da temperatura pode favorecer ou prejudicar a germinação até determinado ponto, auxiliando no processo de translocação para o eixo e ativando enzimas que são indispensáveis para quebra de compostos (ATAIDE et al., 2017).

Além disso, o estresse abiótico em sementes pode gerar as espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas são formadas, acumuladas e podem causar potencial dano oxidativo a diversas biomoléculas levando a célula a morte. Por outro lado, desempenham um papel crucial como sinalizadoras durante o processo germinativo. Logo, é necessário entender como cada espécie se comporta, mantendo níveis aceitáveis de EROS, sem causar danos irreparáveis.

De modo a evitar danos irreversíveis, enzimas do sistema antioxidante atuam quando os níveis de EROS ultrapassam o esperado. As enzimas peroxidase do ascorbato



(APX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidases (POX) têm importante papel na remoção do excesso de EROs nos diferentes compartimentos celulares. A temperatura é um dos fatores que determina capacidade de defesa quanto a remoção de tais substâncias, tendo em vista que essa determina a ativação e velocidade das enzimas (MATOS et al., 2014).

Diante o rol de enzimas que ocorrem durante o processo germinativo, algumas como proteases e invertases não estão associadas diretamente ao estresse oxidativo. No entanto estão associadas a hidrólise de compostos e conversão de açúcares redutores como sinalizadores celulares. A sinalização regula processos essenciais como balanço hormonal (Ácido abscísico e etileno) e dinâmica do açúcar nas plantas. Todavia, em sementes, a sinalização está ligada a formação do endosperma micropilar que cumpre o papel mediador no fornecimento de glicose e frutose pela Invertase e UDP glicose e frutose pela Frutose Sintase (SuSy) (SOUZA et al., 2017).

Existe consenso de que a análise de proteínas e suas respectivas enzimas retratam de modo mais próximo o comportamento fisiológico de um sistema biológico. Porém, a magnitude, em termos de efeito sobre o fenótipo, não pode ser totalmente predita pela atividade enzimática isolada, em função de eventos regulatórios que irão afetar o fluxo de metabólitos nas vias. Dessa forma, a caracterização proteômica, pode fornecer melhor compreensão dos mecanismos da resposta da germinação das sementes de *Melanoxylon brauna* sob estresse térmico.

A principal resposta biológica analisada através desse método está relacionada à redução da germinação sob condições de alta temperatura com a diminuição da abundância de proteínas envolvidas no metabolismo da metionina, biossíntese de aminoácidos, degradação de reserva (BEWLEY et al., 2013, LIU et al., 2014, MARTINS et al., 2017). De acordo com Li (2013), as proteínas identificadas em plantas de alfafa (*Medicago truncatula* cv.), quando submetidas ao estresse térmico foram distribuídas nas seguintes categorias funcionais: 1% estrutura celular, 1% síntese de proteínas, 2% transporte intracelular, 4% transportadores, 6% armazenamento de proteínas, 7% transdução de sinais, 7% metabolismo, 24% doenças/defesas (chaperonas e proteínas envolvidas na ligação dissulfeto) e 48% relacionadas a energia, evidenciando as diferentes respostas biológicas em condições de estresse.

Tendo como perspectiva as mudanças climáticas, o consequente aumento na temperatura que afetará as espécies, alteração na diversidade genética de espécies da Mata Atlântica, comprometimento da ocorrência de espécies nos biomas atuais, os

impactos negativos nas atividades antrópicas, tornam-se fundamentais estudos envolvendo os efeitos do estresse térmico na germinação de sementes de *C.fissilis* e análise proteômica das sementes de *M.brauna*.

Dessa forma, propõe-se neste trabalho analisar as alterações anatômicas, histoquímicas e bioquímicas que ocorrem durante a germinação de sementes de *C. fissilis* em diferentes temperaturas. E, através da análise proteômica, investigar o perfil proteico e comparar as mudanças de abundância de proteínas em sementes de *M. brauna* submetidas a temperaturas elevadas. Essas informações geradas, além de relevantes para a pesquisa básica, são essenciais para o melhor entendimento dos processos ecológicos, estabelecimento de plantas, sucessão ecológica, formando assim uma peça chave para conservação das espécies, seja com finalidade comercial e preservação das espécies.

### **Referências**

- AMARAL, V.F.M. **Multiplicação in vitro de *Cedrela odorata***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2006. 63f.
- ATAÍDE, M.; BORGES, E.E.L.; PICOLI, E.A.T.; FILHO, A.T.; FLORES, A.V. Alterações nas reservas de sementes de *Melanoxylon brauna* (Fabaceae Caesalpinoideae) durante a germinação em diferentes temperaturas. **Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.12, n.3, p.372–379, 2017.
- AUGUSTA, S.; CHAGAS, F.; LINS, F.S.; SILVA, V.S.; ABREU, F.; CRUZ, N.N.R. Espécies florestais comercializadas em serrarias do município de Rorainópolis. **Ambiente**, v.8, n.1, Edição especial, p.66- 72, 2015.
- BEWLEY, J.D.; BRADFORD, H.W.M.; NONOGAKI, H.N. **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy** (3rd edition). London, 2013. 393 p.
- BRASIL, MMA - Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº 6, de 23 de dezembro de 2008. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**. 2014.
- CERRI, E.P.; CERRI, C.C.; MAIA, S.M.F; CHERUBIN, M.R. Reducing Amazon Deforestation through agricultural intensification in the Cerrado for advancing food security and mitigating climate change. **Sustainability**. v.10, n.4, p.989-1007, 2018.

- CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A.; LEITE, I. T. A. Mobilização de reservas durante a germinação de sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides*. **Revista Árvore**, v.30, n.6, p.941-949, 2006.
- DURIGAN, G.; SANTOS, J. D.; GANDARA, F. B. Fitossociologia de dois fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual no Pontal do Paranapanema. **Revista do Instituto Florestal**, v. 14, n.1, p. 13-26, 2002.
- FERRERO, R.; LIMA, M.; GONZALEZ-ANDUJAR, J.L. Crop production structure and stability under climate change in South America. **Annals of Applied Biology**, v.172, n.1, p.65-73, 2017.
- FONTANA, C.; LIS, G.P.; NABAIS, C.; LOUSADA, J.L.P.C.; OLMEDO, G.M. Climatic signal on growth rings of *Copaifera lucens*: an endemic species of a Brazilian Atlantic Forest hotspot, southeastern Brazil. **Dendrochronologia**, v.50, n.1, p.23-32, 2018.
- IPCC, Intergovernmental Panel On Climate Change - **Global Warming**. 2018, 32.p
- LI, W.; WEI, Z.; QIAO, Z.; WU, Z.; CHENG, L.; Y, WANG. Proteomics analysis of alfalfa response to heat stress. **Plos one**, v.8 n.12, 2013.
- LIU, S. J., XU, H. H., WANG, W.-Q., LI, N., WANG, W. P., MØLLER, I.M., SONG, S. Q. A proteomic analysis of rice seed germination as affected by high temperature and ABA treatment. **Physiologia Plantarum**, v.154, n.1, p.141-161, 2014.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, 5th ed.; Instituto Platarum: Nova Odessa, Brasil, 2008; 368p.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil**. 2ª Ed. São Paulo: Nova Odessa. 2002.
- LYRA, A.; TAVARES, P.; CHOU, S.C.; SUEIRO, G.; DEREEZYNSKI, C. Climate change projections over three metropolitan regions in Southeast Brazil using the non-hydrostatic Eta regional climate model at 5-km resolution. **Theroyal Applied Climatology**, v.132, n.2, p.663-682, 2018.

- MACHADO, D.M.M.; BORTOLIN, G.S.; PARANHOS, J.T.; SILVA, A.C.F. Temperatura, luz e desinfecção na germinação das sementes de *Gochnatia polymorpha*. **Revista de Ciências Agrárias**, v.39, n.1, p.144-152, 2016.
- MARENGO, J.A.; ALVES, L.M.; ALVALA, R.C.S.; CUNHA, A.P. Climatic characteristics of the 2010-2016 drought in the semiarid Northeast Brazil region. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.90, n.2, p.1974-1985, 2018.
- MARTINS, R.S.; JOSE, A.C.; FARIA, J.M.R. Proteomic analysis of osmoprimed and heat-shock-treated *Eucalyptus urophylla* seeds. **Trees**, v.31, n1, p.311-324, 2017.
- MATOS, A.C.B.; BORGES, E.E.L.; SEKITA, M.C. Produção de espécies reativas de oxigênio em sementes de *Dalbergia nigra* sob estresse térmico. **Journal Seed Science**, v.36, n.3, p.282-289, 2014.
- MITCHARD, E.T.A. The tropical forest carbon cycle and climate change. **Nature**, v.559, n.26, p.527-534, 2018.
- OLIVEIRA, A.K.M.; SOUZA, J.S.; BRAGA, J.M.; SOUZA, S.A. Germinação de sementes e crescimento de *Ormosia arborea* em diferentes temperaturas e substratos. **Gaia Scientia**, v.10, n.4, p.262-271, 2016.
- PBMC - **Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas projeta clima mais quente para este século**, disponível em: <http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/noticia/2013-12-24/paine,-brasileiro-de-mudancas-climaticas-projeta-clima-mais-quente-para-este-seculo> acessado em 19 de maio de 2019.
- PEREIRA, M.D.; ROMERO, T.C.O.S.; FLORES, A.V.; SEVERIANO, R.L. Germinação e biometria de frutos e sementes de *Prosopis judiflora*. **Ciência Florestal**, v.28, n.3, p.1271-1281, 2018.
- RAMOS, M. G. C.; CRISOSTOMO, N.M.S.; SILVA, C.L.; BERTO, T.S.; COSTA, E.A. Efeito da luz e temperatura na germinação de sementes de *Enterolobium contortisiliquum*. **Ciência Agrícola**, v.16, n. suplementar, p.59-63, 2018.
- SALVIANO, M.F.; GROppo, J.D.; PELLEGRINO, G.Q. Análise de tendências em dados de precipitação e temperatura no Brasil. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v.31, n.1, p.64-73, 2016.

SILVA, R.B.; ATOS, V.P.; FARIAS, S.G.G.; SENA, L.H.M. Germinação e vigor de plântulas de *Parkia platycephala* em diferentes substratos e temperaturas. **Revista Ciência Agronômica**, v.48, n.1, p.142-150, 2017.

SIQUEIRA-SILVA, A.I.; PEREIRA, E.G.; MODOLO, L.V.; FILHO, J.P.L.; PAIVA, E.A.S. Impact of cement dust pollution on *Cedrela fissilis*: A potential bioindicator species. **Chemosphere**, v.158, n.1, p.56-65, 2016.

SOUZA, G.A.; DIAS, C.F.S.; PIMENTA, T.M.; ALMEIDA, A.L.; PICOLI, E.A.T. Sugar metabolism and developmental stages of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) seeds. **Physiologia Plantarum**, v.162, n.4, p.495-505, 2017.

TAVARES, P.S.; GIAROLLA, A.; SHOU, S.C.; SILVA, A.J.P. Climate change impact on the potential yield of *Arabica coffee* in southeast Brazil. **Regional Environmental Change**, v.18, n.3, p.873-883, 2018.

VITORIA, R.Z.; OLIVEIRA, F.T.G.; POSSE, S.C.P.; ARANTES, S.D. Qualidade fisiológica de sementes de aroeira em função da maturação dos frutos sob diferentes temperaturas de germinação. **Nucleus**, v.15, n.2, p.575-582, 2018.

## Artigo 1

Temperatura e atividade fisiológica em sementes de *Cedrela fissilis*.

**Resumo:** O cedro (*Cedrela fissilis* Vell. -Meliaceae) possui valor econômico pela sua utilização na medicina e pela qualidade da madeira. Sua propagação se faz principalmente pelas sementes, cuja germinação tem sido estudada amplamente em relação aos aspectos ambientais, mas percebe-se limitações de conhecimentos envolvendo a fisiologia e a necessidade de informações bioquímicas dos processos que ocorrem nessa fase. A temperatura influencia a absorção de água pela semente e as reações fisiológicas e bioquímicas que regulam todo o processo metabólico. Nesse sentido, os objetivos deste trabalho foram avaliar as temperaturas mínima, ótima e máxima, o vigor, as alterações nos compostos de reserva, o comportamento da membrana celular e o consumo de oxigênio nas temperaturas de 25, 30 e 35 °C por 24, 48, 72 e 96 horas. A maior porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) foram obtidos a 25 °C. As maiores taxas de consumo de oxigênio, a condutividade elétrica e as mudanças nos teores de carboidratos foram observadas na temperatura de 35 °C. Não ocorreram alterações significativas nos teores de lipídios nas diferentes temperaturas. A proteína apresentou variações distintas em seus conteúdos em cada temperatura a que foram submetidas.

**Palavras chave:** Cedro rosa, estresse térmico, mata atlântica, espécie nativa, respiração

### 1-Introdução

Espécie arbórea nativa da Mata Atlântica, a *C. fissilis* é conhecida popularmente como cedro rosa. A espécie tem grande importância no setor madeireiro e na recuperação de áreas degradadas (PEREIRA et al., 2016). Ocorre com baixa densidade de indivíduos, desde o sul do Brasil até a Costa Rica, (SANCHES et al., 2017). Devido à intensa exploração, a espécie foi incluída na lista vermelha de espécies ameaçadas, na categoria vulnerável, pela União Internacional da Conservação da Natureza desde 1998 (ARAGÃO et al., 2015).

As mudanças climáticas previstas para cenários futuros, com a temperatura podendo variar de 0,5 a 4 °C (SALVIANO et al., 2016), torna necessário entender os mecanismos fisiológico e bioquímico do processo germinativo das sementes de cedro, principal meio de reprodução. Informações a respeito da germinação dessa espécie

tornam-se mais prementes pela baixa densidade das árvores de cedro nos locais de ocorrência. Estudos referentes à temperatura e de suas consequências na germinação são fundamentais para o desenvolvimento de novas estratégias para conservação e propagação da espécie.

As espécies florestais apresentam comportamento variável em relação à temperatura de germinação, sendo o intervalo de 20 a 30 °C recomendado para a maioria das espécies subtropicais e tropicais (BRACALION et al., 2010). As temperaturas constantes de 20 e de 25 °C foram as que mais estimularam a germinação de sementes de *C. odorata* (PASSOS et al., 2008) e de *C. fissilis* (OLIVEIRA et al. 2014). As temperaturas acima ou abaixo da ótima interferem negativamente na germinação, como ocorreu com sementes de *M. brauna* mantidas em 10 °C e em 40 °C (ATAIDE et al., 2016). O vigor das sementes de *Dalbergia nigra* foi reduzida com o aumento do tempo de exposição nas temperaturas de 5 °C, 15 °C, 35 °C e 45 °C (MATOS et al., 2015).

As sementes utilizam compostos de reserva tais como carboidratos, amido, proteínas e lipídios para gerar energia e estrutura físicas durante o processo germinativo. A proporção dessas substâncias e suas utilizações podem variar entre as espécies e dentro de uma mesma espécie (CORTE et al., 2006). Embora a mobilização de reservas em sementes tenha sido tema de várias pesquisas envolvendo diferentes espécies (BORGES et al., 2002, DANTAS et al., 2008, MAGALHÃES et al., 2010, PAULA et al., 2016, TESFAY et al., 2016, ATAIDE et al., 2017 e ZHAO et al., 2018), percebe-se que a área florestal é pouco abordada, especialmente quando envolve fatores ambientais, como a temperatura.

A temperatura tem estreita relação com a permeabilidade das membranas celulares. Na transição gel-fluida da bicamada de fosfolipídios da membrana constituída por dimirostoilfosfatidilcolina, a permeabilidade, medida entre 10 e 36 °C, é máxima próxima da temperatura de fusão, 24 °C (KRASKE e MOUTCASTLE, 2001). Segmentos de raiz de plantas de *Coffea arabica* submetidas às temperaturas de 10, 15, 20 e 25 °C tiveram aumentos no teor de malonaldeído e no de exsudatos de eletrólitos na temperatura de 11 °C (ALONSO et al., 1997). Os autores consideraram essa temperatura como a de transição. A viscosidade da membrana plasmática de plantas de *Arabidopsis thaliana* correlacionou negativamente com a temperatura ambiental quando ela foi constante (MARTINIÈRE et al., 2011). Houve decréscimo na proporção de ácidos poli-insaturados quando as plantas foram transferidas da temperatura de 27 °C

para 12 °C. A semipermeabilidade da membrana em sementes de *Dalbergia nigra* não foi recuperada nas temperaturas de 5 e 45 °C (MATOS et al., 2015), ao contrário do que foi observado nas temperaturas mais adequadas para a germinação. As sementes de *Melanoxylom brauna* apresentaram o menor valor de CE na temperatura de 27 °C (FLORES et al., 2014), próximas de 30 °C, definida como ótima para a germinação.

Considerando a ausência de informação a respeito do comportamento das sementes de *C. fissilis* frente às mudanças na temperatura ambiental, os objetivos deste trabalho foram identificar a influência da temperatura na germinação e as alterações bioquímicas e metabólicas durante a germinação em diferentes temperaturas.

## 2-Material e Métodos

**Teste de germinação:** As sementes foram colocadas em solução de Captan (0,5%) por 2 min e posteriormente dispostas sobre duas folhas de papel germitest umedecidas com 5 mL de água destilada, em placas de petri com 9 cm de diâmetro. As placas foram incubadas em germinadores do tipo BOD nas temperaturas constantes de 15, 20, 25, 30 e 35 °C sob luz contínua proporcionada por quatro lâmpadas fluorescentes 40 W tipo luz do dia. Amostras independentes foram incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas em 35 °C e posteriormente transferidas para 25 °C sob luz constante para verificar a viabilidade após o estresse. Esses períodos foram considerados para duração total do teste de germinação, que totalizaram 10 dias. A avaliação da germinação foi feita diariamente, sendo considerada como germinada a semente com protrusão da raiz primária. **Índice de velocidade de germinação (IVG):** foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Maguirre (1962), sendo utilizadas as sementes do teste de germinação. **Curva de embebição:** O ganho de peso de água (%) foi calculado em relação ao peso inicial das sementes (BRASIL et al., 2009). As sementes foram pesadas em balança digital de precisão de 0,0001 g e colocadas nas temperaturas de 25, 30 e 35 °C conforme descrito no teste de germinação. As sementes foram pesadas a cada duas horas durante as primeiras doze horas de embebição. Em seguida, a cada 12 horas até que atingissem 50% de germinação ou até o décimo dia após o início da embebição. Antes de cada pesagem, as sementes foram secadas superficialmente com papel toalha. Foram utilizadas cinco repetições de 20 sementes para todas as três variáveis. **Condutividade elétrica (CE):** Foi avaliada em sementes secas e imersas em 75 ml de água por 24, 48, 72 e 96 horas nas temperaturas de 25, 30 e 35 °C. Foi utilizado condutivímetro MICRONAL, modelo B 330, eletrodo com constante 1,0 e os



resultados expressos em  $\mu\text{S cm}^{-1}\text{semente}^{-1}$  (SOARES *et al.*, 2015). Foram utilizadas cinco repetições com 50 sementes para cada temperatura. **Quantificação de reservas:** As quantificações de lipídios, proteínas e carboidratos foram realizadas em sementes secas e embebidas nas temperaturas de 25, 30 e 35 °C por 0, 24, 48, 72 e 96 horas. **Teor de lipídios:** A quantificação de lipídios foi realizada de acordo com a metodologia modificada proposta por Folch (1957), que consiste em secar o material em estufa a 50 °C por 48 horas com posterior maceração. Ao macerado adicionou-se 10mL de solução clorofórmio-metanol 2:1 (v/v), sob agitação por 10 minutos, seguido de filtração em papel filtro. A operação foi repetida três vezes. O material filtrado foi mantido em estufa na temperatura de 50°C por 24 horas e, por diferença de massa, foi determinada a porcentagem de lipídios presentes nas amostras. **Determinação de proteínas totais:** Utilizado o método Semi Micro de Kjeldahl (AOAC 1995). Amostras constituídas de 0,2 g de sementes trituradas e desengorduradas foram postas em tubos de ensaios juntamente com 1 g de mistura de sulfato de sódio (120 g), sulfato de cobre (20 g), selênio (0,4g) e 5 mL de ácido sulfúrico. As amostras foram digeridas em bloco digestor, a 180° C, por 60 min, seguida por 350° C, por mais 60 min. Após a digestão, acrescentou-se 10 mL de hidróxido de sódio 0,1N procedendo-se a destilação. O destilado foi coletado em erlenmeyer (75 mL), contendo 10 mL de ácido bórico (5%). A titulação foi realizada utilizando-se solução de ácido clorídrico 0,02 N. O teor de proteínas foi estimado através do fator de 6,25 (CECCHI *et al.*, 2003). Os teores foram expressos em  $\text{mg.g}^{-1}\text{matéria seca}$ . **Quantificação de açúcares solúveis e amido:** A extração dos açúcares solúveis foi realizada seguindo a metodologia adaptada de BLACK *et al.* (1996). Amostras sem óleo de 0,1 foram diluídas em 1 mL de álcool 80 % e incubadas em banho maria (75 °C), durante 30 minutos. Os microtubos foram retirados do banho maria e centrifugados a 10.000 g durante 5 minutos. Este procedimento foi repetido por 3 vezes. Após as extrações as amostras foram levadas à estufa por 24 horas, a 45 °C, e em seguida ressuspensas com 1,0 ml de água destilada, que foram utilizadas para as análises de açúcares solúveis totais e amido. Estes foram quantificados pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), usando-se a curva de glicose como padrão. **Quantificação de monossacarídeos dos açúcares:** As análises dos monossacarídeos foram feitas por cromatografia gasosa. As extrações de monossacarídeos foram realizadas conforme metodologia descrita por BLACK *et al.*, (1996), com modificações. O material seco e moído foi homogeneizado com etanol 80%, a 75 °C, por 30 minutos, e então centrifugado a 10.000 g, por 5 minutos. O

sobrenadante foi separado e seco a 50 °C por 24 horas, sendo, então, ressuspensionado com 1 mL de água ultrapura. Retirou-se 0,5 mL, que foi usado para o preparo do alditol acetato. Foram feitas cinco repetições de cada extração e quantificação. Os monossacarídeos foram quantificados conforme ENGLYST; CUMMINGS (1984), utilizando cromatógrafo a gás Shimadzu GC14-A, equipado com detector de ionização de chama (FID), acoplado a um registrador e integrador C-R6A chromatopac. Foi utilizada coluna polar e 50% de cianopropilfenil-dimetilsiloxane. O fluxo de gás foi de 0,25 mL.min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor, detector da coluna e da coluna foram de 250, 220 e 275 °C, respectivamente. A razão de divisão foi de 1/40, tendo sido injetado 1,0 µL de alditol acetato. Utilizou-se de curva de glicose como padrão. **Quantificação de açúcares solúveis extravasado:** As sementes foram dispostas em placas de petri contendo 10 ml de água destilada e mantidas em câmaras tipo BOD nas temperaturas de 25 °C e 35 °C por 24, 48, 72 e 96 horas. Foram retirados 5 mL do exsudado de cada placa e quantificados os açúcares solúveis pelo método Fenol-Sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), usando-se a curva de glicose como padrão. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo 5 repetições com 20 sementes cada. **Atividade respiratória:** A atividade respiratória foi avaliada através do consumo de oxigênio em câmara de reação fechada, com agitação constante, a 25 °C, com a capacidade de 1 mL, por 10 minutos. O consumo de oxigênio foi avaliado com eletrodo tipo Clark (ESTABROOK *et al.*, 1967). O índice de controle respiratório foi avaliado pela razão entre a velocidade consumo de oxigênio, por minuto, por massa fresca de semente inserida na câmara de reação (CHANCE e WILLIAMS, 1956). Os resultados foram expressos em nmol O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Nessa avaliação foram utilizadas 20 sementes, com 5 repetições cada, colocadas para embeber nas temperaturas de 25 e 35 °C. Para análises de compostos de reserva utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3x5x5. Sendo três temperaturas (25 °C, 30 °C e 35 °C), cinco tempos (0, 24, 48, 72 e 96 horas), com cinco repetições contendo 20 sementes, totalizando 100 sementes em cada teste. Os resultados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey (P≤0,05).

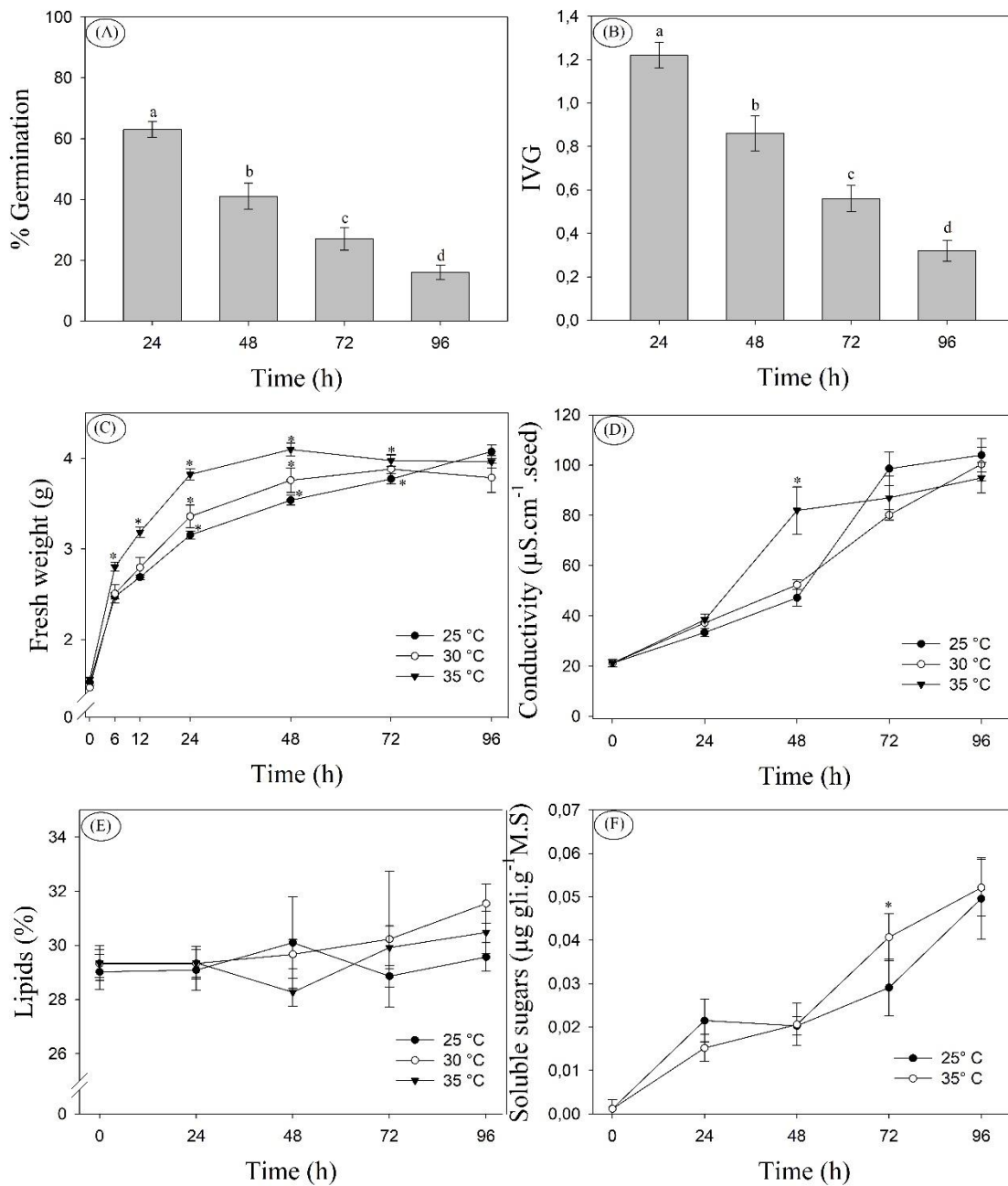
### 3-Resultados

A germinação diferiu significativamente entre as temperaturas de 25 e 35 °C. As porcentagens médias de germinação para os tratamentos foram 71% (20 °C), 98% (25

°C) e 82% (30 °C). Em 15 °C não foi observada germinação após 10 dias, enquanto que em 35 °C não ocorreu germinação. Os valores de IVG não diferiram significativamente entre as temperaturas de 20 e 30 °C (1,78 e 2,0 respectivamente), porém apresentaram diferença em relação a 25 °C (2,46). Os maiores valores de germinação (98%) e IVG (2,46) foram observados em 25 °C. A porcentagem de germinação e o IVG diferiram significativamente entre as temperaturas testadas (Fig. 1A e 1B), ambas as variáveis decrescendo à medida que se ampliou o tempo na temperatura de 35 °C (Fig. 1B).

O aumento da massa fresca foi maior nas sementes encubadas nas temperaturas de 30 e de 35 °C nas primeiras 48 h de embebição (Fig. 1C), estabilizando a partir de 72 h. Quando em 25 °C o aumento na hidratação foi contínuo por 72 horas. Durante a hidratação, a temperatura de 35 °C foi significativamente diferente das demais nos períodos de 72 horas, havendo também diferenças estatísticas entre 30 e 25 °C nos tempos de 24 e 48 horas.

Os valores de CE aumentaram continuamente durante a hidratação em todas as temperaturas (Fig. 1D). A condutividade em 35 °C diferiu significativamente das demais temperaturas em 48 horas, tornando-se similar às demais em 72h.



**Figura 1:** Porcentagem de germinação (A) e índice de velocidade de germinação (B) de *Cedrela fissilis*, em diferentes temperaturas alternadas (Temperaturas de 35 °C por 24, 48, 72 e 96 horas e retorno para temperatura 25 °C); curva de embebição (C); condutividade elétrica (D); teores de lipídios (E); quantificação de açúcares solúveis presentes em exsudatos durante a germinação (F). Média ± erro padrão, n= 5; letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,05).

As reservas de lipídios não apresentaram diferenças significativas entre as sementes incubadas nas diferentes temperaturas (Fig. 1E), com variações no conteúdo ao longo do

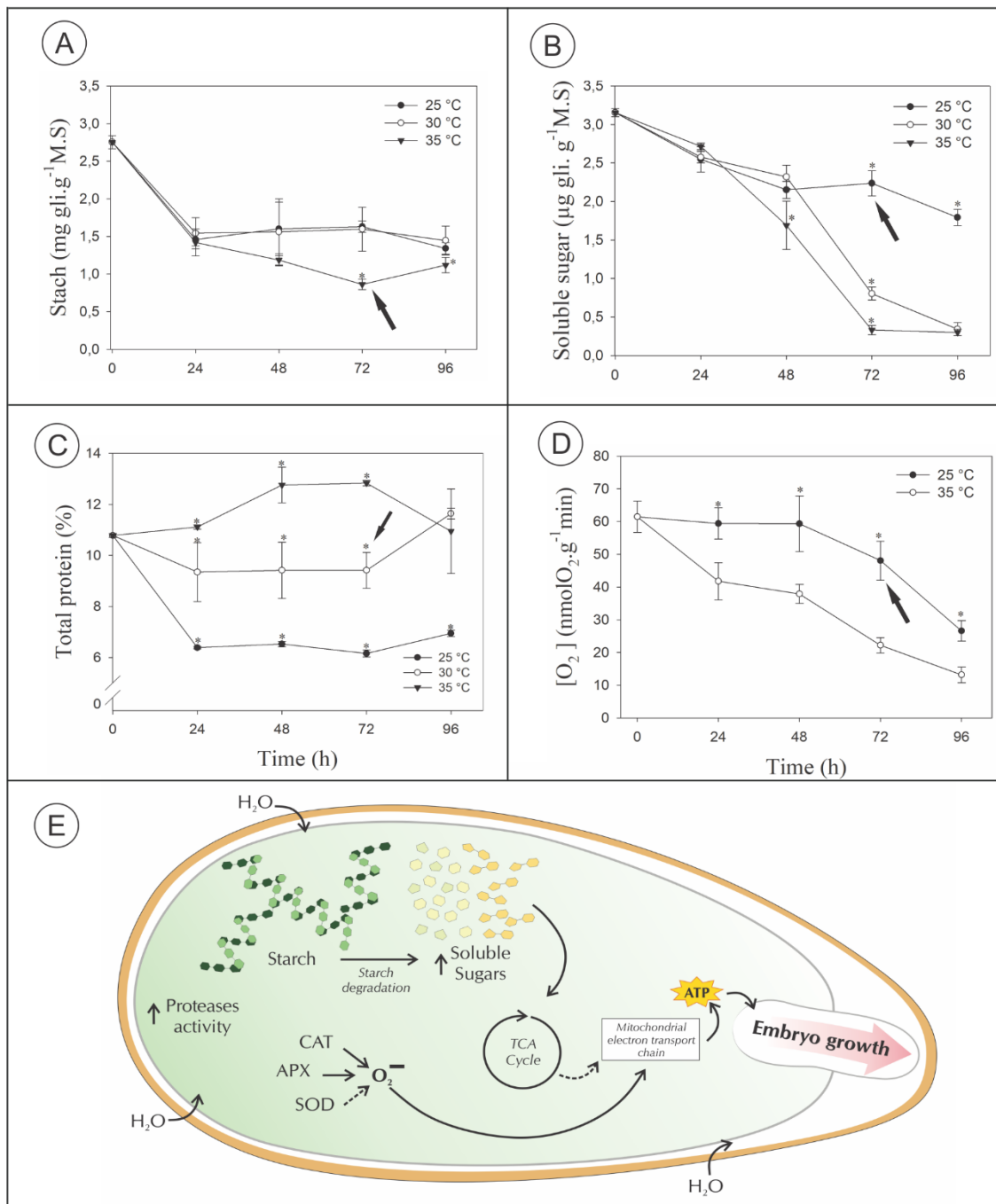
tempo. Os teores de açúcares solúveis extravasados aumentaram continuamente em ambas as temperaturas ao longo do tempo (incremento de 233 % em 25 °C e 346% em 35 °C), diferindo significativamente entre as temperaturas apenas em 72 horas (Fig. 1F).

Os teores de amido reduziram em todas as temperaturas no período de 24 horas (Fig. 2A). Na temperatura de 35 °C a redução foi significativamente menor que nas demais em 72 e 96 horas (Fig. 2A). O teor de amido das sementes submetidas às temperaturas de 25 e 30 °C não diferiram significativamente entre si, mantendo os valores mais altos. Os teores de açúcares solúveis reduziram-se em todas as temperaturas ao longo do tempo (Fig. 2B), com maior decréscimo em 35 °C e menor em 25 °C. Na temperatura de 35 °C a redução foi significativa em relação às outras temperaturas no período de 48 a 72 horas. Todas as temperaturas influenciaram significativamente na utilização dos açúcares no período de 72 horas, permanecendo em 25 °C a utilização significativamente menor do que nas demais temperaturas (Fig. 2B).

Houve decréscimo no teor de proteína total em 25 °C diferindo significativamente das temperaturas de 30 e 35 °C (Fig 2.C). Em 30 °C o teor de proteínas manteve-se estável até 72 horas com posterior acréscimo a 96 horas. Houve aumento do teor de proteínas em 48 e 72 horas com posterior redução em 96 horas em 35 °C.

O consumo de oxigênio reduziu nas temperaturas de 25 e 35 °C ao longo do tempo, tendo o maior consumo em 35 °C. Na temperatura de 25 °C houve estabilidade na respiração nas primeiras 48 horas, vindo a aumentar a seguir, com a mesma tendência de 35 °C. A respiração diferiu significativamente entre as temperaturas em todos os tempos de avaliação (Fig. 2D).

Na Figura 2E é apresentada diagrama em que são evidenciados diferentes eventos metabólicos que ocorrem nas células e que estão envolvidas no crescimento do embrião durante o processo germinativo. É também mostrada a presença de espécies reativas do oxigênio, na forma de superóxido, e algumas das enzimas do sistema enzimático que mantêm a concentração de tais substâncias nos níveis adequados e funcionando como sinalizadoras do metabolismo.



**Figura 2:** Teores de amido (A); açúcares solúveis (B); proteína total (C); consumo de oxigênio (D); hipóteses de alterações e mobilização de compostos de reserva durante a germinação de *Cedrela fissilis* em diferentes temperaturas (E). As setas indicam alterações significativas em diferentes compostos em 72 h. n= 5,0 ±erro padrão.

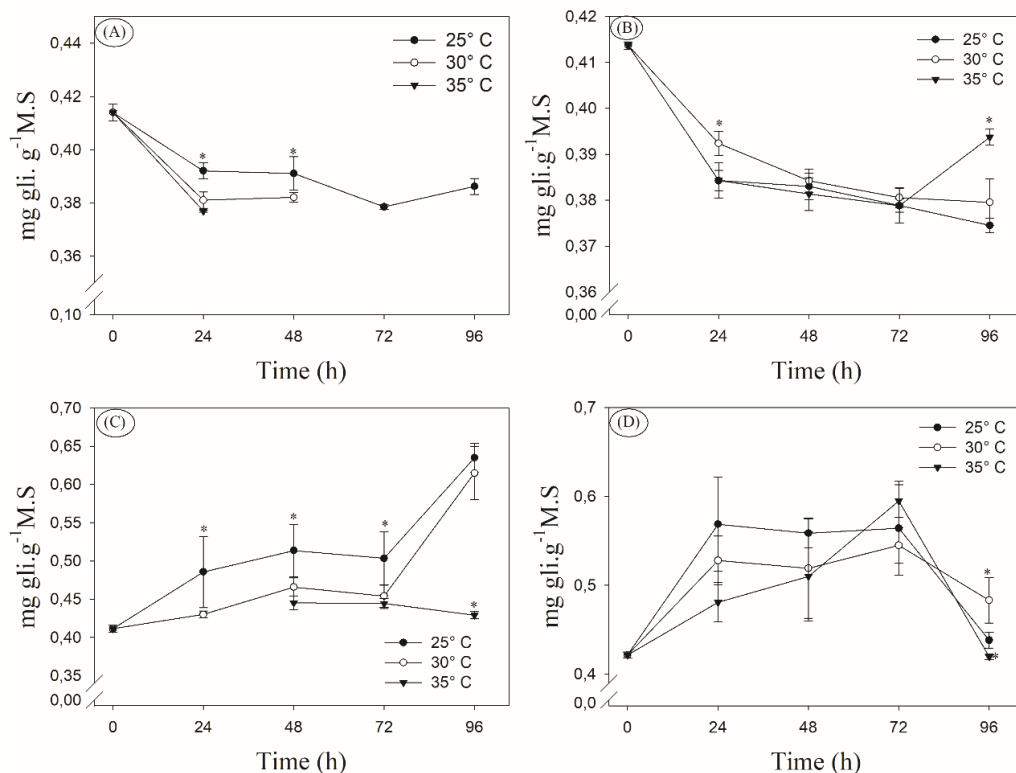
A arabinose foi detectada em todos tempos analisados em 25 °C, apresentando redução no teor durante o período (Fig. 3A). Os teores presentes nas sementes sob temperatura de 25 °C diferiram significativamente daqueles das temperaturas de 35 e 30

°C, nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente, quando, então, não foram mais detetados.

Os teores de xilose decresceram em todas as temperaturas em 72 horas, aumentando significativamente na temperatura de 35 °C em 96 horas. Os teores em 30 °C foram significativamente superiores aos demais em 24 h. (Fig. 3B).

Os teores de manose em 25 °C diferiram significativamente dos de 35 °C no período de 72 horas, com incremento em 96 horas. Comportamento semelhante ocorreu na temperatura de 30 °C, mas em menor proporção. Na temperatura de 35° C não se detetou presença desse monossacarídeo nas primeiras 48 horas. No intervalo de 48 a 96 horas o seu teor alterou pouco, diferindo significativamente dos demais tratamentos em 96 horas (Fig. 3C).

A elevação no teor de glicose ocorreu na temperatura de 35 °C por até 72 horas, vindo a decrescer para valores significativamente menores em relação às outras temperaturas em 96 horas. Os comportamentos nas temperaturas de 25 e de 30 °C foram similares. Após aumento em 24 horas, os teores estabilizaram nas próximas 48 horas. Em 96 horas ambos decresceram, embora em escala significativamente menor que na temperatura de 30 °C (Fig. 3D).



**Figura 3:** Teores médios de arabinose (A), xilose (B), manose (C) e glicose (D) em sementes de *Cedrela fissilis* sob diferentes temperaturas e tempos.

#### 4-Discussão

A maior porcentagem de germinação e IVG foram observados na temperatura de 25 °C, similarmente a Aragão et al. (2015) e Oliveira e Barbosa (2014), embora com valores discrepantes em relação aos obtidos nessa pesquisa. Essas diferenças se devem, provavelmente, ao vigor das sementes desenvolvidas em ambientes com diferentes condições ambientais, como temperatura e umidade relativa. As diferentes temperaturas utilizadas (15, 20, 25, 30 e 35 °C) permitiram identificar as que inibiram (15 °C), estimularam (20, 25 e 30 °C) ou resultaram na morte das sementes (35 °C). A permanência das sementes sob alta temperatura por tempo prolongado resulta na morte, sendo os danos cumulativos, como visto na temperatura de 35 °C. Esta temperatura ou acima causaram redução no vigor de sementes de *Myracrodruon urundeuva* (OLIVEIRA et al., 2014), *Dalbergia nigra* (MATOS et al., 2015), *Mimosa caesalpinifolia* (HOLANDA et al., 2015) e *Melanoxylon brauna* (SANTOS et al., 2017). Por outro lado, não houve danos às sementes de *Tabebuia ochracea*,



*Melanoxylon brauna* e *Salvia hispania* em temperaturas de 25, 30 e 35 °C (KLEBER et al., 2012; FLORES et al., 2014; SORANA et al., 2018).

A temperatura, dentro de certos limites, afeta o padrão e a velocidade de entrada de água nas sementes, essencial para a reativação do metabolismo e aumento do potencial de crescimento do embrião (BEWLEY et al., 2013). As sementes de cedro apresentaram padrão trifásico na absorção de água. A fase I ocorreu em 48 horas (Fig. 1C), independente da temperatura. Entretanto, a maior hidratação nas maiores temperaturas permite supor que o estímulo do metabolismo seria o componente principal. Uma vez que a maior mobilização de reservas e a respiração foram maiores nas temperaturas mais elevadas, mesmo que não tenham, de modo geral, estimulado a germinação. Como a hidratação nessa fase é puramente física, a mobilização das reservas estaria sendo utilizada na manutenção do baixo potencial hídrico e/ou na disponibilização de substrato para produção de energia, na forma de ATP. A fase II estabilizou após de 48 horas nas temperaturas de 30 e 35 °C (Fig. 1C). Por outro lado, esta fase não ocorreu na temperatura de 25 °C. É provável que nas temperaturas mais altas a presença de substâncias osmoticamente ativas foram disponibilizadas mais rapidamente, resultando em absorção de água em menor espaço de tempo. O consumo e a exudação de açúcares redutores podem ter concorrido para a redução do potencial osmótico, alterando a curva de embebição no sentido da estabilização. A 25 °C tal fato pode não ter ocorrido com a mesma intensidade que em 35 °C, haja vista que respiração foi menor em 25 °C, e o consumo de reservas foi claramente menor. A emissão da raiz primária ocorreu após 96 horas, caracterizando a fase III e encerrando o processo de germinação.

O extravasamento de solutos para o meio durante a hidratação indica desorganização dos fosfolipídios das membranas plasmática e tonoplasto, com conseqüente elevação do valor de CE e de exsudados de açúcares e de íons (BEWLEY et al., 2013; SORANA et al., 2018). A contínua perda de soluto ao longo da hidratação pode ser considerada como embebição das diversas camadas de células que compõem os tecidos da semente. Nas sementes desidratadas a temperatura de fusão dos fosfolipídios é modificada, com as membranas alterando da fase líquida para gel. Com a hidratação os diferentes fosfolipídios alcançam as respectivas temperaturas de fusão e alternam da fase gel para a fase líquida. Por conseqüência, durante o tempo de reestruturação há o vazamento, aumentando quando se aproxima da temperatura de fusão, decrescendo em seguida, à medida que se alcança a fase líquida. A temperatura também exerce influência na conformação das membranas. A manutenção de membrana

desidratada, composta de determinado ácido graxo, cuja temperatura de fusão esteja acima ou na respectiva temperatura de fusão manterá a membrana na fase líquida. É provável que na temperatura de 35 °C, no tempo de 48 horas, as membranas tenham alcançado a fase líquida em menor tempo, considerando que a temperatura de fusão tenha sido alcançado mais rapidamente nas camadas mais externas. Por outro lado, o tempo necessário para que isso ocorra nas demais temperaturas seja maior.

O comportamento claramente diferenciado nos teores de proteínas entre as temperaturas sugere que na temperatura ótima ou próxima, 25 e 30 °C, respectivamente, houve perda para o meio externo ou consumo. Considerando que a 25 °C a respiração se manteve estável por 48 horas e o teor total de proteínas tenha taxa de redução mais acentuada que as demais, pode-se supor que tenha havido mais extravasamento para o meio. A 35 °C, a inversão do comportamento, com provável síntese de proteínas relacionadas ao controle das espécies reativas de oxigênio bem como aquelas relacionadas à resistência ao estresse térmico.

O maior consumo progressivo de oxigênio nas sementes submetidas a 35 °C, com aumento ao longo do tempo de hidratação. O decréscimo acentuado nas primeiras 24 horas, provavelmente esteja relacionado à rehidratação dos tecidos de reserva e, provável consumo do oxigênio, durante a fase 1. Outra alternativa seria a reativação da respiração durante as fases subsequentes da germinação. Nessa temperatura, a necessidade de energia, na forma de ATP, é maior pelo aumento da atividade metabólica. Por outro lado, a respiração se manteve estável em 25 °C, aumentando somente após 48 horas. Verifica-se coindência nas duas curvas da respiração a partir de 48 horas quando adquirem taxas similares e positivas de respiração. É provável que ambas estejam relacionadas à respiração preponderante do eixo embrionário devido ao estímulo do crescimento potencial do embrião.

Os teores de lipídios variaram ao longo do tempo, mas, provavelmente, devido à amostragem, e não por utilização para fins metabólicos ou síntese. Ademais, a elevada abundância de açúcares pode inibir a degradação de ácidos graxos nas primeiras horas de embebição (MARTIN et al., 2002; TO et al., 2002; SOUZA et al., 2017). A entrada de água nas sementes, permite a reativação metabólica, como a atividade de diversas enzimas relacionadas a degradação de compostos de reserva (TAIZ e ZINGER, 2015). A mobilização das reservas inicia-se com a quebra de compostos de alto peso molecular para formação de compostos menores como glicose e a sacarose que são translocadas de estruturas de armazenamento, como o cotilédone/endosperma, para as células do

embrião em crescimento. A mobilização de reservas lipídicas se torna especialmente importante no período pós germinativo e no estabelecimento de plântulas (SHIMADA et al., 2018).

As variações nos teores de amido nas diferentes temperaturas ocorreram de forma mais intensa nas primeiras 24 horas, especialmente na temperatura de 35 °C. Percebe-se, entretanto, que há decréscimos significativos nos teores de açúcares solúveis, entre eles a glicose, nas temperaturas de 30 e 35 °C, com menor redução desses açúcares em 25 °C, temperatura menor, mas dentro da faixa ótima de germinação. As variações no conteúdo de reservas não se adequam, tendo em vista que os valores de açúcares solúveis são semelhantes inicialmente, mas alcançam valores menores do que a decomposição do amido. Dessa forma, está implícito que há outras fontes de carboidratos envolvidos na disponibilização de nutrientes, como os oligossacarídeos.

Açúcares de parede celular poderiam estar sendo disponibilizados, considerando-se que os quatro tipos detectados nas análises fazem parte da pectina ou da hemicelulose. Além disso, a expansão do eixo embrionário requer que haja enfraquecimento da parede celular da região da micrópila para que ocorra a protrusão da raiz primária. A utilização de cada um deles ocorre de maneira independente e varia ao longo do tempo e com a temperatura. É notável que a arabinose não é detectada em 35 °C nas primeiras 48 horas, seguida da temperatura de 30 °C em 72 horas. A xilose decresceu e a manose tem seu teor aumentado. A manose, por outro lado, somente é identificada em 48 horas. A glicose é, aparentemente, utilizada somente após 72 horas de hidratação. Não há, pois, comportamento similar entre eles que indicasse o destino de cada um durante a germinação. Tanto poderiam estar sendo usados na respiração, sendo extravasado ou incorporado na parede celular na nova síntese. O aumento do metabolismo celular estimulou a translocação e a assimilação mais eficiente dos carboidratos de reserva, como o amido, na temperatura de 25 °C em sementes de *Dalbergia nigra* (CARRIJO et al., 2010) e de *Melanoxylon brauna* (ATAIDE et al., 2017). Em temperaturas mais altas, que favoreceram o metabolismo celular, houve maior degradação de açúcares, fornecendo substrato para produção de energia na germinação de sementes de *Fagopyrum esculentum* (ROSENTAL et al., 2014), *Carica papaya* (PARNIAKOV et al., 2015) e *Melanoxylon braúna* (ATAÍDE et al., 2017).

Assim, percebe-se que a temperatura altera o metabolismo das sementes de *Cedrela fissilis*, acelerando-o quando submetido a temperaturas elevadas. Como

consequência, causam alterações de reservas como amido, glicose, proteína, monossacarídeos e maior consumo de oxigênio. Entretanto, as temperaturas mais elevadas não estimulam a germinação, mas inibição ou morte. A elevação na temperatura ambiental, que já ocorrem com frequência, alcançando aquelas temperaturas mostradas aqui, interferem negativamente na germinação e no metabolismo.

## 5-Conclusões

- 25 °C é a temperatura ótima para a germinação, enquanto 30 °C e 35 °C são prejudiciais à germinação das sementes

-Na temperatura de 35 °C ocorre o maior consumo de oxigênio e de carboidratos.

-Não há alteração significativa nos teores de lipídios; os teores de proteína e de carboidratos alteram-se de forma distinta em cada temperatura.

## 6-Referências bibliográficas

ALONSO, A.; QUEIROZ, C.S.; MAGALHÃES, A.C. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea Arabica* L.) seedlings. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1323, p.75-84, 1997.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods analysis Association of Official Analytical Chemists**. 17<sup>a</sup> ed, Arlington, USA, 1995. 1141p.

ARAGÃO, V. P. M.; NAVARRO, B.V.; PASSAMANI, L. Z.; MACEDO, A.F.; FLOH, E.I. Free amino acids, polyamines, soluble sugars and proteins during seed germination and early seedling growth of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), an endangered hardwood species from the Atlantic Forest in Brazil. **Theoretical Experimental Plant Physiology**, v.27, n.2, p. 157–169, 2015.

ATAIDE, G.M.; BORGES, E.E.L.; FILHO, A.T. Alterações fisiológicas e biométricas em sementes de *Melanoxylon brauna* durante a germinação em diferentes temperaturas. **Revista Árvore**, v.40, n.1, p.61-70, 2016.

ATAÍDE, M.; BORGES, E.E.L.; PICOLI, E.A.T.; FILHO, A.T.; FLORES, A.V. Alterações nas reservas de sementes de *Melanoxylon brauna* (Fabaceae Caesalpinoideae) durante a germinação em diferentes temperaturas. **Agrária - Revista Brasileira Ciências Agrárias**, v.12, n.3, p.372–379, 2017.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 445 p. 1994.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, H.W.M.; NONOGAKI, H.N. **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy** (3<sup>rd</sup> edition). London, 2013. 393 p.

BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GRZESIK, M.; GUY, P. Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. **Journal Experimental Botany**, v.47, n.2, p.161–169, 1996.

BOREK, S.; RATJCZAK, W.; TARAJCZAK, L. Ultrastructural and enzymatic research on the role of sucrose in mobilization of storage lipids in germinating yellow lupine seeds. **Plant Science**. v.170, n.3, p.411-423, 2006.

BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G.; SOARES, C.P.B.; PEREZ, S.C.J.G. Crescimento e mobilização de carboidratos em embrião de sementes de fedegoso (*Senna macranthera* Irwin et Barneby) durante a germinação. **CERNE**, v.8, n.1, p.69-76, 2002.

BRANCALION, P.H.S.; NOVENBRE, A.D.L.C.; RODRIGUES, R.R. Temperatura ótima de germinação de sementes de espécies arbóreas brasileiras. **Journal Seed Science**, v.32, n.4, p.15-21, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.  
[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/2946\\_regras\\_analise\\_sementes.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise_sementes.pdf)

CARRIJO, L.C.; BORGES, E.E.L.; PONTES, C.A.; LOPES, M.R.; BRUNE, A. Galactosidase activity and carbohydrate mobilization in seeds of *Dalbergia nigra* (Vell.) – Fabaceae (Brazilian Rosewood) during germination. **Revista Cerne**, v.16, n.3, p.283-289, 2010.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Editora UNICAMP, 2003. 208.p

CHANCE, B., WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advances Enzymology Related Areas Molecular Biology**, v.17, p.65-134, 1956.

CORTE, V.B.C.; BORGES, E.E.L.; PONTES, C.A.; LEITE, I.T. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae Caesalpinioideae). **Árvore**, v.30, n.6, p.941-949, 2006.

- DANTAS, B.F.; CORREIA, J.S.; MARINHO, L.B.; ARAGÃO, C.A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.). **Revista Brasileira Sementes**, v.30, n.1, p.221-227, 2008.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p. 350–356, 1956.
- DZIADEK, K.; KOPEC, A.; PASTUCHA, E.; PIATKOWSHA, E. Basic chemical composition and bioactive compounds content in selected cultivars of buckwheat whole seeds, dehulled seeds and hulls. **Journal Cereal Science**, v.69, n.1, p.1–8, 2016.
- ENGLYST, H.N.; CUMMINGS, J.H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **The Analyst**, v.109, n.7, p.937, 1984.
- ESTABROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements of ADP/O ratios. **Methods Enzymology**, v.10, p.41-47. 1967.
- FERREIRA, L.B.S.; FERNANDES, N.A.; AQUINO, L.C.; SILVA, A.R. Temperature and seed moisture content affect electrical conductivity test in pea seeds. **Seed Science**, v.39, n.4, p.410–416, 2017.
- FLORES, A.V.; BORGES, E.E.L.; GUIMARAES, V.M.; ATAIDE, G.M. Germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott em diferentes temperaturas. **Árvore**, v.38, n.6, p.1147–1154, 2014.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Biology Chemistry**, 1957. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/226/1/497.short>>
- HOLANDA, A.E.R.; MEDEIROS FILHO, S.; DIOGO, I.J.S. Influência da luz e temperatura na germinação de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth. - Fabaceae). **Gaia Scientia**, v.9, n.1, p.22–27, 2015.
- KLEBER, A.M.O.; RIBEIRO, J.W.F.; PEREIRA, K.C.L.P.; SILVA, C.A.A. Temperaturas para germinação de sementes de *Tabebuia ochracea*. **Comunicata Scientiae**, v.3, n.2, p.98-103, 2012.

- KRASKE, W.V.; MOUNTCASTLE, D.B. Effects of cholesterol and temperature on the permeability of dimiristoylphosphatidylcholine bylayers near the chain melting phase transition. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1514, p.159-164, 2001.
- MAGALHÃES, S.R.; BORGES, E.E.L.; BERGER, A.P.A. Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S.F. Black durante a germinação. **Ciência Florestal**, v.20, n.4, p.589-595, 2010.
- MARTIN, T.; OSWALD, O.; GRAHAM, I. A. Arabidopsis seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. **Plant Physiology**, v.128, n.2, p.472–481, 2002.
- MARTINIÈRE, A.; SHVEDUNOVA, M.; THOMSON, A.J.W.; EVANS, N.H.; PENFIELD, S.; RUNIONS, J.; McWATTERS, H.G. Homeostasis of plasma membrane viscosity in fluctuating temperatures. **New Phytologist**, v.192, p.328-337, 2011.
- MATOS, A.C.B.; BORGES, E.E.L.; SILVA, L.J.D.A. Fisiologia da germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) sob diferentes temperaturas e tempos de exposição. **Árvore**, v.39, n.1, p.115–125, 2015.
- MEDINA, C.V. RODRIGUEZ, E.A.G.; BAGATIM, A.G.; ANDRADE, R.A.; Temperature and storage on the germination of mabolo (*Diospyros blancoi* Willd). **Nucleus**, v.13, n.1, p. 189–198, 2016.
- MENGARDA, L.H.G.; LOPES, J.C.; ALEXANDRE, R.S.; ZANOTTI, R.F. Alternating temperature and accelerated aging in mobilization of reserves during germination of *Carica papaya* L. seeds. **Seed Science**, v.37, n.1, p. 16–25, 2015.
- OLIVEIRA, A.K.M.; BARBOSA, L.A. Efeitos da temperatura na germinação de sementes e na formação de plântulas de *Cedrela fissilis*. **Floresta**, v.44, n.3, p.441-450, 2014.
- OLIVEIRA, G.M.; MATIAS, J.R.; RIBEIRO, R.C.; BARBOSA, L.G. Germinação de sementes de espécies arbóreas nativas da Caatinga em diferentes temperaturas. **Scientia Plena**, v.10, n.4, p. 1–6, 2014.
- OLIVEIRA, L.M.; CAVELHEIRO, L.B.D.V.; DARIO, V.M. Medição do CO<sub>2</sub> como método alternativo para a diferenciação do vigor de lotes de sementes de melancia. **Ciência Rural**, v.45, n.4, p.606-611, 2015.

OLIVEIRA, N.C.C.; LOPES, P.S.N.; RIBEIRO, L.M. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees - Structure and Function**, v.27, n.6, p. 1633–1645, 2013.

PARNIAKOV, O.; ROSELLO-SOTO, E.; BARBA, F.J.; GRIMI, N. New approaches for the effective valorization of papaya seeds: Extraction of proteins, phenolic compounds, carbohydrates, and isothiocyanates assisted by pulsed electric energy. **Food Research International**, v.77, n.4, p.711–717, 2015.

PASSOS, M.A.A.; SILVA, F.J.B.C.; SILVA, E.C.A.; PESSOA, M.M.L.; SANTOS, R.C. Luz, substrato e temperatura na germinação de sementes de cedro-vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.2, p.281-284, 2008.

PAULA, S.O.; SOUSA, J.A.; BRITO, E.S.; GALLÃO, M.I. The morphological characterization of the dry seeds and reserve mobilization during germination in *Morinda citrifolia* L. **Ciência Agrônômica**, v.47, n.3, p.556-563, 2016.

PEREIRA, J. G.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, K. M.; FERREIRA, P. I.; DACOREGIO, H.M. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia involucrata*. **Ciências Agroveterinárias**, v.15, n.2, p.118-123, 2016

ROSENTAL, L.; NONOGAKI, H.; FAIT, A. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. **Seed Science Research**, v.24, n.1, p.1–15, 2014.

SALVIANO, M. F.; GROppo, J. D.; PELLEGRINO, G. Q. Análise de tendências em dados de precipitação e temperatura no Brasil. **Revista Brasileira Meteorologia**, v.31, n.1, p. 64–73, 2016.

SANCHES, M. C.; MARZINEK, J.; BRAGIOLA, N.G; NASCIMENTO, A.T. Morphophysiological responses in *Cedrela fissilis* Vell. submitted to changes in natural light conditions: implications for biomass accumulation. **Trees - Structure and Function**, v.31, n.1, p. 215–227, 2017.

SANTOS, C.M.; SOUZA, G.R.L.; SILVA, J.R.; SANTOS, V.L.M. Efeitos da temperatura e do substrato na germinação de semente do maracujá (*Passiflora edulis*) **Seed Science**, v.21, n.1, p.1-6. 1999.

SANTOS, J.; MUHL, F.R.; MOREIRA, M.; SCHOENHALS, A.F. Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja produzidas no município de



- Frederico Westphalen/RS. **Revista Ciências Agroveterinarias Alimentos**, v.1, n.1, p. 1-14, 2016.
- SANTOS, M.M.; BORGES, E.E.L.; ATAIDE, G.M.; SOUZA, G.A. Germination of Seeds of *Melanoxylon brauna* Schott. under Heat Stress: Production of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Activity. **Forests**, v.8, n.11, p.405, 2017.
- SHIMADA, T.L.; HAYASHI, M. L.; HARA, I. Membrane dynamics and multiple functions of oil bodies in seeds and leaves. **Plant Physiology**, v.176, n.1, p.199-207, 2018.
- SOARES, G.C.M.; DIAS, D.C.F.S.; FARIA, J.M.R.; BORGES, E.E.L. Physiological and biochemical changes during the loss of desiccation tolerance in germinating *Adenanthera pavonina* L. seeds. **Anais Academia Brasileira Ciencias**, v.87, n.4, p.2001–2011, 2015.
- SORANA, C.K.P.M.; CARDOSO, F.B.; REGO, C.H.Q.; CANDIDO, A.C.S.; ALVES, C.Z. *Chia* seeds storage in different environmental conditions and packages. **American Journal Plant Sciences**. v.9, n.1, p.74-82, 2018.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Artmed, 918 p. 2015.
- TESFAY, S.Z.; MODI, A.T.; MOHAMMED, F. The effect of temperature in moringa seed phytochemical compounds and carbohydrate mobilization. **South African Journal Botany**, v.102, n.1, p.190–196, 2016.
- TO, J.P.C.; REITER, W.D.; GIBSON, S.I. Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. **BMC plant biology**, v.2, n.4, p.4-11, 2002.
- VERMA, G.; MISHRA, S.; SANGWAN, S.; SHARMA, S. Reactive oxygen species mediate axis-cotyledon signaling to induce reserve mobilization during germination and seedling establishment in *Vigna radiata*. **Plant Physiology**, v.184, n.20, p.79–88, 2015.
- ZHAO, M.; ZHANG, H.; YAN, H. QUIU, L.; BASKIN, C.C. Mobilization and role of starch, protein, and fat reserves during seed germination of six wild grassland species. **Frontiers in Plant Science**, v.9, n.234, p.1-11, 2018.

## Artigo 2

Alterações enzimáticas e anatômicas na germinação de *Cedrela fissilis* em diferentes temperaturas.

**Resumo:** *Cedrela fissilis* Vell, popularmente conhecida como “cedro rosa” no Brasil, é uma árvore pioneira da família Meliaceae. A madeira desta espécie é conhecida por sua alta qualidade, boa trabalhabilidade em serraria e significativo valor econômico, fatores estes que têm levado à super exploração da espécie através do extrativismo indiscriminado ou pela perda de habitat florestal. O aumento de temperatura acarretará mudanças nos cenários agrícolas atuais, pois afetará a germinação e a sobrevivência das plantas em seus ambientes de origem. Condições de estresse durante a germinação podem levar a diversas alterações metabólicas, afetando a germinação e a produção excessiva de EROs. O objetivo deste trabalho foi analisar as alterações anatômicas e enzimáticas que ocorrem durante a germinação de sementes de cedro sob estresse térmico. Foram realizadas análises das enzimas proteases, invertase, APX, CAT, POX, SOD, assim como avaliado o teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e análises anatômicas das sementes de *C. fissilis*. Ocorreu maior atividade enzimática de protease, invertases à medida que se eleva a temperatura de 30 °C e o teor de peróxido de hidrogênio apresentou incremento em temperaturas de 30 e 35 °C. As atividades da SOD e da CAT foram comprometidas em 35 °C. Não houve diferença na atividade da APX e a POX apresentou redução significativa a 30 e 35 °C. O teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi maior em 35 °C. Ocorreu consumo do endosperma lateral ao longo do processo germinativo em todos tratamentos avaliados. Houve redução do teor de proteínas durante o processo germinativo. E a temperatura de 35 °C é prejudicial para germinação de *C. fissilis*.

### 1- Introdução

*Cedrela fissilis* Vell, popularmente conhecida como “cedro rosa” no Brasil, é uma árvore pioneira da família Meliaceae, com ocorrência abrangendo do sul do Brasil (32°S) até o norte da Costa Rica (12°N). Sua dispersão é ampla, porém com baixa frequência de indivíduos, sendo considerada uma espécie rara (NAVROSKI et al., 2016). A madeira desta espécie é conhecida por sua alta qualidade, boa trabalhabilidade em serraria e significativo valor econômico, fatores estes que têm levado à super exploração da espécie através do extrativismo indiscriminado (SANCHES et al., 2017).

Neste sentido, são necessários estudos para a preservação e conservação da espécie que tem sua principal propagação via seminal.

A adaptação das espécies em condições ambientais adversas tem sido muito discutida atualmente devido à intensificação das mudanças climáticas que são assunto recorrente sobre a realocação da aptidão agrícola dos mais diversos ecossistemas. O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) concluiu em seu quinto relatório de avaliação que as mudanças climáticas afetarão a frequência, intensidade e duração de eventos extremos, tais como temperaturas e precipitações extremas, além de secas prolongadas (IPCC et al., 2018). Segundo essas projeções, poderá ocorrer aumento na temperatura entre 1,2 a 5,4 °C, dependendo do cenário avaliado (baixo impacto e alto impacto), até o final do século XXI. Este aumento de temperatura acarretará mudanças nos cenários agrícolas atuais, pois afetará a germinação e a sobrevivência das plantas em seus ambientes de origem (COCHRANE et al., 2014).

A temperatura é um dos componentes determinantes na ocorrência de determinada espécie em um bioma. Ela influencia a germinação da semente e o crescimento da planta. Parte do território brasileiro estará dentro da faixa que até 2100 poderá sofrer com a alteração da temperatura, que deverá variar de 0,5 a 5 °C. Essa alteração já será suficiente para afetar negativamente a germinação de sementes desta espécie (KHARIN et al. 2013). Cada espécie apresenta uma temperatura mínima, máxima e ótima para a germinação. A temperatura é chamada de ótima quando ocorre o máximo de germinação no menor tempo. Abaixo e acima dos limites mínimo e máximo, respectivamente, pode ocorrer a morte dos embriões. A faixa de 20 a 30 °C mostra-se adequada para a germinação de grande número de espécies subtropicais e tropicais (BRANCALION et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014). Essa faixa de temperatura se mostra ideal também para as sementes de cedro, que acima a 35 °C não apresentaram taxa de germinação elevada (OLIVEIRA et al., 2014). Melhores resultados de germinação para o cedro foram obtidos em temperaturas de 20 e 25 °C, sendo temperaturas acima de 30 °C consideradas estressantes (OLIVEIRA et al., 2014).

Condições de estresse durante a germinação podem causar diversas alterações metabólicas, como, por exemplo, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), afetando a germinação e o vigor das sementes (KOOSHKI et al., 2018). Estas moléculas existem nas células mesmo em condições normais, por agirem em diversos processos metabólicos (FUNDO et al., 2017). A ruptura do endosperma e do tegumento durante a germinação das sementes é resultado do crescimento do embrião pelo

alongamento do eixo hipocótilo radícula e do enfraquecimento da região da micrópila. As EROs agem favorecendo o enfraquecimento da região micropilar (ZHANG et al., 2014). No entanto, como esse enfraquecimento ocorre é ainda um mecanismo pouco explorado, principalmente em sementes de espécies florestais.

O estresse térmico aumenta a produção e a acumulação das EROs em sementes (SUZUKI et al., 2011, SANTOS et al., 2017). As EROs são formadas nos cloroplastos, nas mitocôndrias e nas membranas plasmáticas ou por subprodutos de vias metabólicas em diferentes compartimentos celulares (HEYNO et al., 2014). O excesso de EROs é altamente danoso para planta, pois pode superar a capacidade do sistema antioxidante de defesa, causando dano oxidativo (SRIVASTAVA et al., 2011). O aumento da temperatura afeta a atividade de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase (POX), que constituem um dos principais mecanismos celulares de combate ao estresse oxidativo (MATOS et al., 2015).

O aumento da temperatura previstas para as próximas décadas, as alterações nas áreas aptas para o cedro e o desconhecimento a respeito do comportamento fisiológico das sementes da espécie frente ao estresse térmico, tornam fundamental estudar o comportamento germinativo de suas sementes em diferentes temperaturas. Dessa forma, propõe-se neste trabalho analisar as alterações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante a germinação de sementes de cedro sob estresse térmico.

## **2- Material e métodos**

As sementes foram coletadas em setembro de 2016 e armazenadas em câmara fria (5 °C), com baixa umidade (60% UR) até utilização. Em seguida, foram beneficiadas e incubadas em câmara tipo BOD em placas de petri (9 cm de diâmetro) nas temperaturas 25, 30 e 35 °C sob luz branca (40 w) constante. As sementes foram consideradas germinadas quando ocorreu a emissão da raiz primária. Foram utilizadas 20 sementes por placa com 5 repetições cada, totalizando 100 sementes por tratamento. O esquema utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado ( $P \leq 0,5$ ).

Os extratos enzimáticos usados para determinar as atividades da SOD, da ascorbato peroxidase, da CAT e da POX, foram obtidos pelo método descrito por Hodges (1997) com adaptações. Amostras de 50 mg foram pesadas, maceradas e homogeneizadas com 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 e 1% (m/v) polyninylpolypyrrolidona (PVPP). Este extrato foi centrifugado a 19.000 g por 30 min a

4 °C e o sobrenadante coletado foi usado como extrato enzimático. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4 °C.

**Atividade da SOD:** A atividade da superóxido dismutase foi determinada pelo ensaio contendo 30 µL do extrato enzimático bruto e 2,97 mL de um meio de reação constituído de: 1500 µL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,5, 780 µL de metionina 50 mM, 225 µL de azul de *p*-nitro tetrazólio (NBT) 1 mM, 60 µL de EDTA 5 mM, 60 µL de riboflavina 2 µM e 345 µL de água destilada (DEL LONGO et al., 1993). A reação foi conduzida a 25 °C em câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após cinco minutos de exposição à luz, a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm. A leitura obtida em 560 nm foi subtraída da amostra que recebeu iluminação (GIANNOPOLITIS et al., 1977). O controle foi determinado sob as mesmas condições citadas anteriormente, porém mantendo a reação no escuro. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP et al., 1971).

**Atividade da APX:** A atividade da ascorbato peroxidase foi determinada pelo ensaio contendo 100 µL do extrato enzimático bruto e 1400 µL de um meio de reação constituído de 700 µL de tampão de fosfato 50 mM, pH 7,8, 400 µL de ácido ascórbico 0,25 mM contendo EDTA 0,1 mM, e 300 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mM, adaptado de Ramalheiro (2009). O decréscimo na absorbância a 210 nm, à temperatura de 25 °C, foi medido durante dois minutos com intervalo de 10 segundos entre cada leitura, sendo a atividade da APX determinada com base na inclinação da reta após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (NAKANO et al., 1981). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 nmol de substrato em produto por minuto, por mL, nas condições do ensaio.

**Atividade da CAT:** A atividade da catalase foi determinada pelo ensaio contendo 100 µL do extrato enzimático bruto e 1400 µL de um meio de reação constituído de 900 µL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,8 e 500 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,97 M, adaptado de Hodges (1997). O decréscimo na absorbância a 240 nm, à temperatura de 25 °C foi medido durante dois minutos de reação a cada 10 s, sendo a atividade da CAT determinada com base na inclinação da reta após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

(ANDERSON et al., 1995). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 mmol de substrato em produto por minuto, por mL, nas condições do ensaio.

**Atividade da POX:** A atividade da peroxidase de fenóis (POX) foi determinada conforme Kar & Mishra (1976). Alíquotas de 0,02 mL do extrato foram transferidas para tubos de ensaio contendo 4,9 mL de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), ácido pirogálico 20 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 1 min e a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5% (v/v). Em seguida, as leituras foram realizadas a 420 nm e a atividade de POX foi expressa em nmol purpurogalina g<sup>-1</sup> MS min<sup>-1</sup>.

**Atividade da protease:** A atividade da protease foi determinada com alíquota de 50 µL de extrato enzimático extraídos de 2 mL de tampão Tris-HCl (pH 6,8) provenientes de 250 µg de sementes secas e liofilizadas. Foram adicionados 450 µL de BSA (2%), completando o volume de 500 µL. Esse extrato foi centrifugado 3 vezes a 10.000 g. Foi retirado o sobrenadante, em seguida, levado para incubação a 37 °C por 20 min. A leitura foi realizada a 280 nm expressa em U por mL consumido de substrato.

**Atividade da Invertase:** A atividade da invertase foi determinada usando 100 mg de semente seca e liofilizada, maceradas com 2 mL do tampão do Invetase Assay Kit Mak 118 (Sigma Aldrich). O macerado foi centrifugado duas vezes a 14.000 g por 20 min, retirando o sobrenadante. Foram coletados 500 µL para ependorf com filtro de 10 kDa e centrifugado por 10 min a 10.000 g. Em seguida, coletado 50 µL de amostra e adicionado 200 µL de tampão de reação. O ensaio de reação foi feito com 95 µL do ensaio de reação, 1 µL de mix de enzimas invertase KitMak118 e 1 µL de reagente corante com posterior reação por 20 min a 25 °C. A leitura foi realizada em microplaca de 96 poços a 570 nm.

**Análises anatômicas:** As sementes foram incubadas nas diferentes temperaturas de germinação, nos diferentes tempos mencionados anteriormente. Em seguida foram fixadas em FAA50, por 48 h e estocados em etanol 70% (JOHANSEN et al., 1940). Posteriormente incluídas em metacrilato (Historesin-Leica), segundo as recomendações do fabricante. O material foi seccionado longitudinalmente em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica microsystems Inc., Deerfield, USA), com 5 µm de espessura, corado com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1981). As imagens da

análise foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan), acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision. As imagens foram avaliadas quanto a alterações decorrentes da germinação.

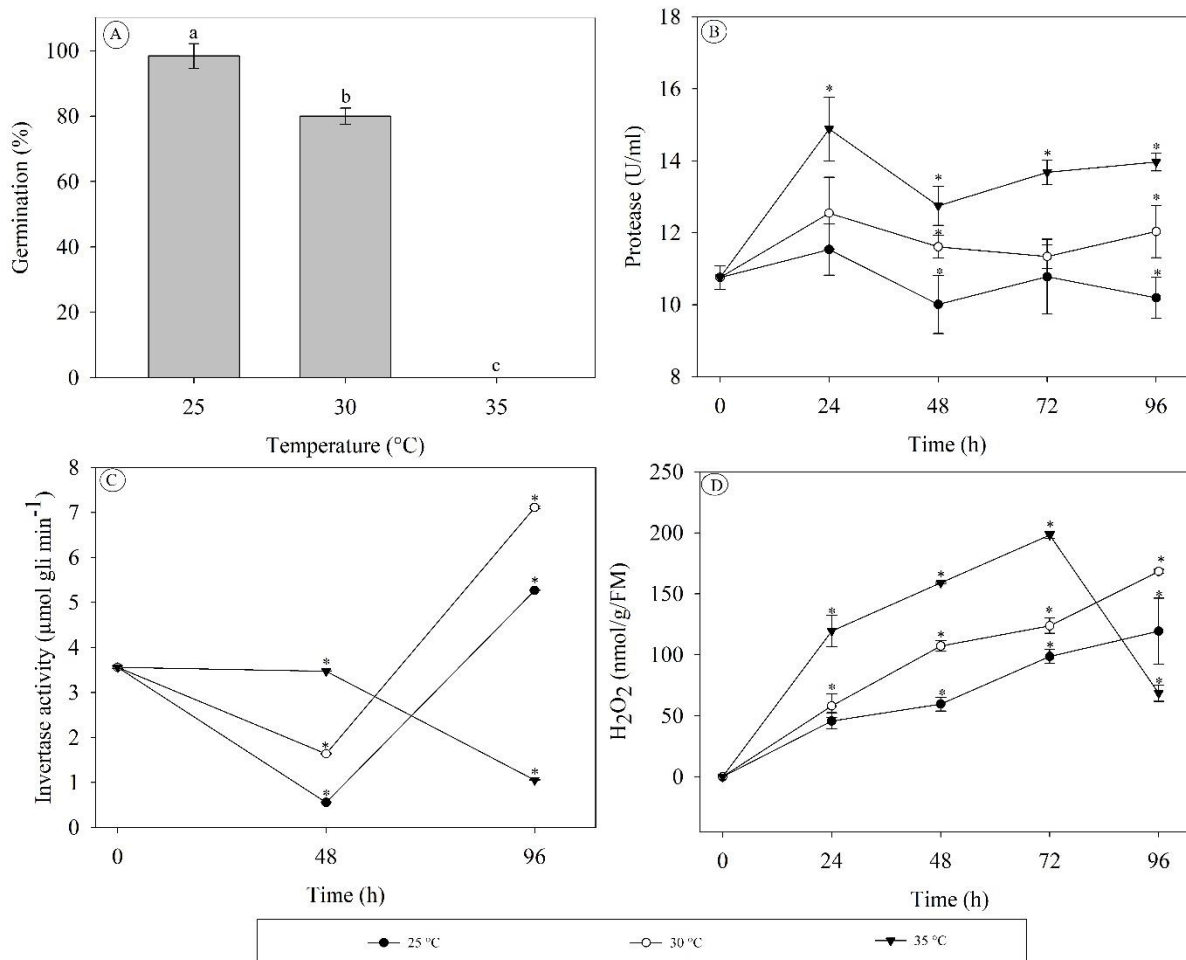
### **3- Resultados**

As sementes de cedro apresentaram maior de germinação (96%) e IVG (1,2) quando incubados a 25 °C, diferindo significativamente das demais temperaturas. Não foi observada germinação a 35 °C no período avaliado (Fig. 1A).

A maior atividade de protease foi encontrada nas sementes mantidas a 35 °C (Fig. 1B), enquanto a menor a 25 °C. Houve diferença significativa na germinação das sementes submetidas à 35 °C em 24, 48, 72 e 96 h. A atividade 30 °C apresentou diferença das demais temperaturas apenas em 96 horas.

Houve diferenças na atividade da invertase em todos tratamentos e tempos avaliados. As amostras submetidas a 25 e 30 °C apresentaram redução em 48 h com posterior aumento da atividade em 96 h. A atividade desta enzima a 35 °C manteve-se estável em 48 h com posterior redução em 96 h (Fig. 1C).

O teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou diferença significativa entre todas temperaturas e períodos avaliados. Houve incremento nesse teor nas sementes em todas as temperaturas em 24, 48 e 72 h, e redução apenas em 35 °C no período de 96 h (Fig. 1D).



**Figura 1:** (A) Porcentagem de germinação, (B) Atividades específicas de protease, (C) invertase e (D) Teor do peróxido de hidrogênio em sementes de *Cedrela fissilis*, durante o período de germinação em diferentes temperaturas. \* Indica diferença significativa pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ),  $n = 5$ ,  $\pm$  erro padrão.

Não houve diferença significativa na atividade da APX nas diferentes temperaturas e tempos (Fig. 2 A), diferente das atividades específicas das enzimas POX, SOD e CAT nas temperaturas e tempos avaliados.

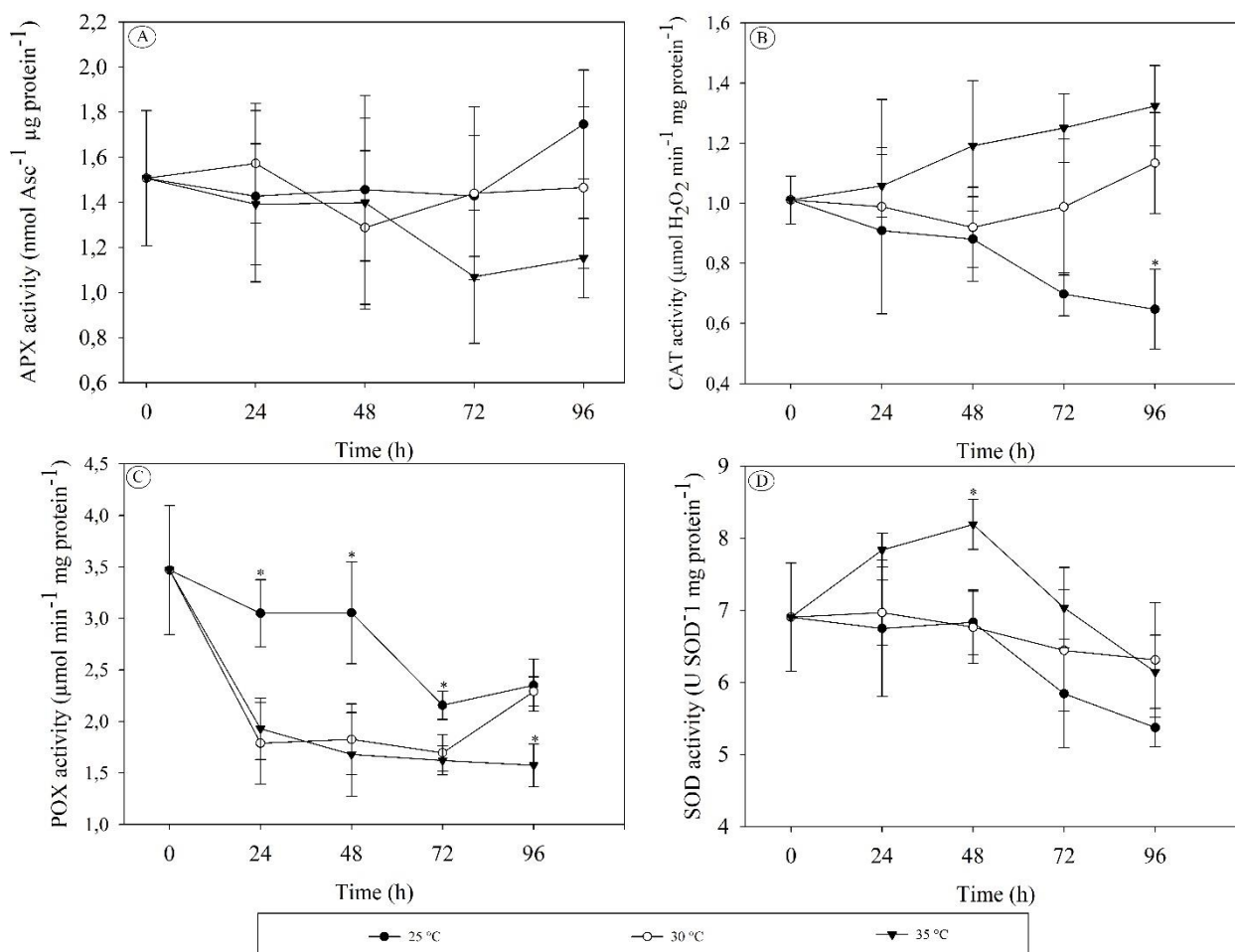
A atividade da POX reduziu ao longo do período em todas as temperaturas, contudo, mostrou diferença significativa apenas na temperatura de 25 °C em 24, 48 e 72 h de incubação. As sementes submetidas às temperaturas de 30 e 35 °C não apresentaram diferenças na atividade da POX, apesar de apresentarem acentuada redução (Fig. 2 C).

Quando incubadas a 35 °C, a atividade da SOD aumentou até 48 h nas sementes com posterior redução até 96 h, sendo diferente apenas em 48 h. Em 30 e 25



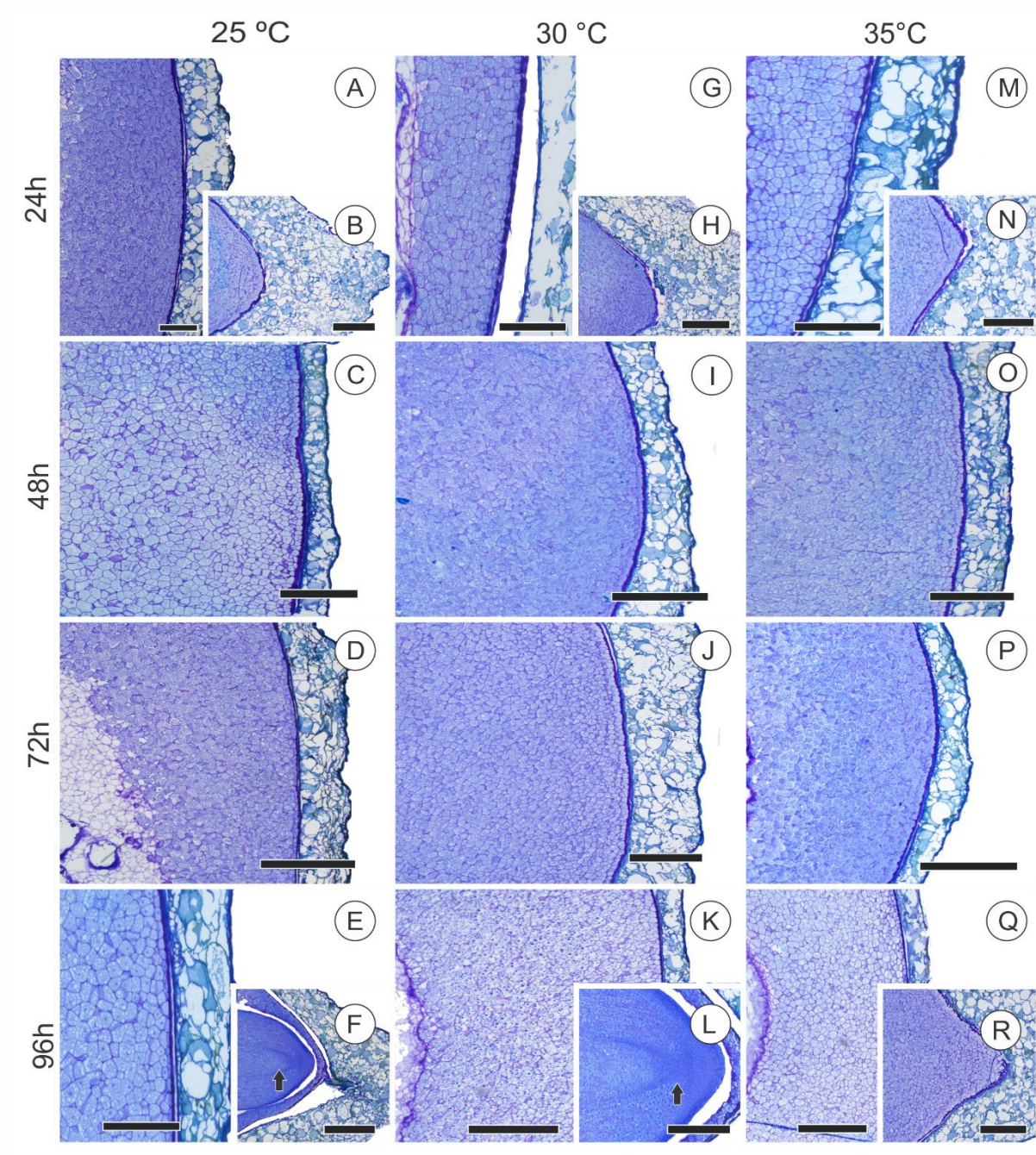
°C não houve diferença significativa e a atividade foi decrescente durante o período avaliado (Fig. 2 D).

A CAT apresentou maior atividade em 30 °C e 35 °C, com atividade crescente nos tempos, não havendo diferenças significativas entre essas duas temperaturas, mas ambas diferiram significativamente de 25 °C em 96 h.

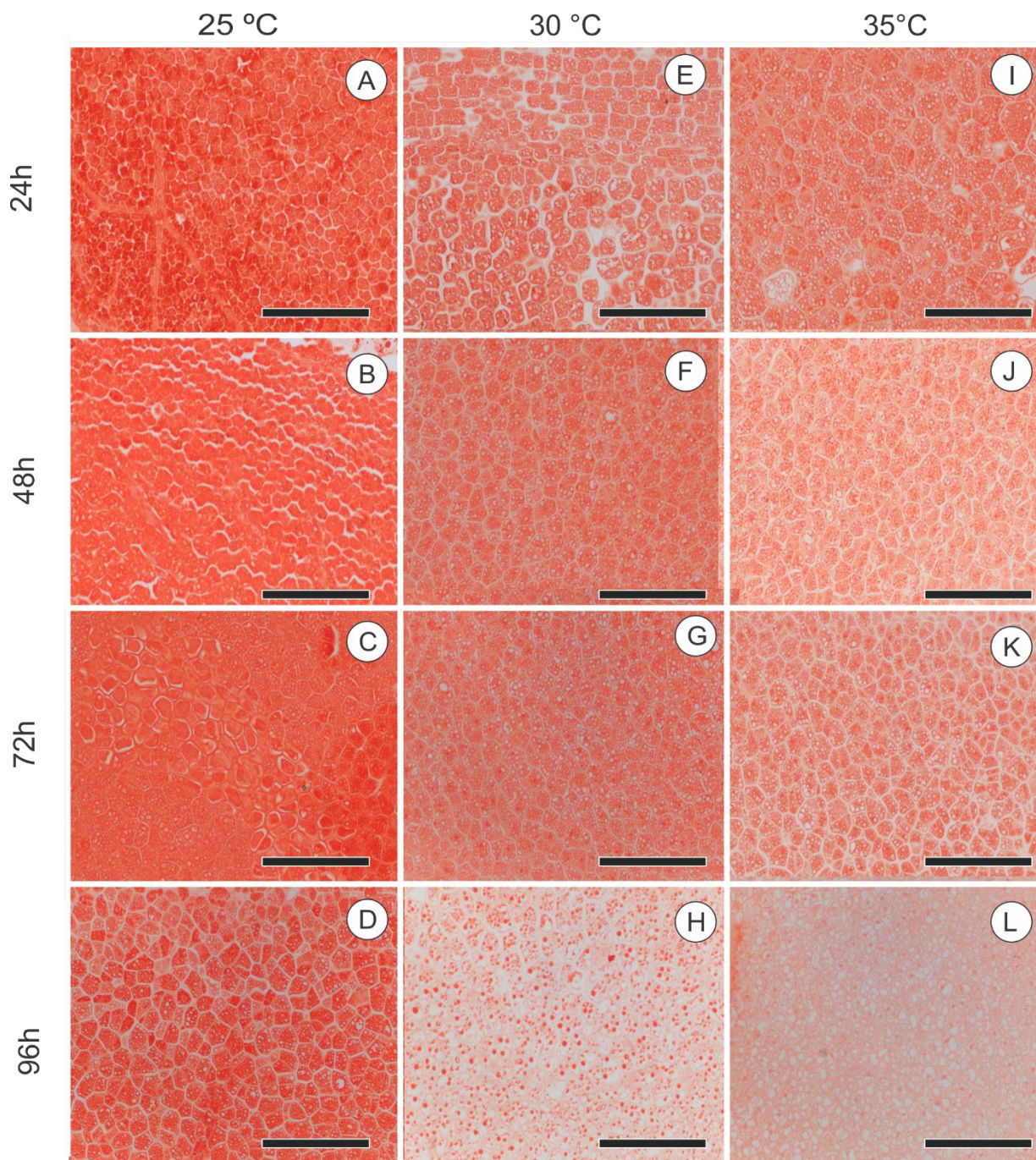


**Figura 2:** Atividade específica de (A) ascorbato peroxidase (B) catalase, (C) peroxidase e (D) superóxido dismutase em sementes de *Cedrela fissilis* durante o período de germinação em diferentes temperaturas. \* Indica diferença estatística pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ),  $n = 5$ ,  $\pm$  erro padrão.

Alterações na atividade enzimática e mobilização de reservas também foram percebidos quando avaliados anatômica e histoquimicamente as sementes (Fig. 3).



**Figura 3:** Cortes longitudinais de sementes de *Cedrela fissilis* durante a embebição coradas com azul de toluidina em A, C, D, E, G, I, J, K de 250  $\mu\text{m}$ ; região micropilar em B, F, H, L, N e R com barras de 500  $\mu\text{m}$ . As setas indicam alongamento do embrião. Sendo: T1: 25  $^{\circ}\text{C}$ /24 h, T2: 25  $^{\circ}\text{C}$ /48h, T3: 25 $^{\circ}\text{C}$ /72h, T4: 25  $^{\circ}\text{C}$ /96h, T5: 30  $^{\circ}\text{C}$ /24h, T6: 30  $^{\circ}\text{C}$ /48h, T7: 30  $^{\circ}\text{C}$ /72h, T8: 30  $^{\circ}\text{C}$ /96h, T9: 35  $^{\circ}\text{C}$ /24h, T10: 35 $^{\circ}\text{C}$ /48 h, T11: 35  $^{\circ}\text{C}$ /72 h, T12: 35  $^{\circ}\text{C}$ /96h.



**Figura 4:** Cortes transversais de sementes coradas para proteína com Xiluidine Ponceo durante a embebição em de sementes de *Cedrela fissilis*. Barras= 250  $\mu$ m. T1: 25 °C/24 h, T2: 25 °C/48h, T3: 25°C/72h, T4: 25 °C/96h, T5: 30 °C/24h, T6: 30 °C/48h, T7: 30 °C/72h, T8: 30 °C/96h, T9: 35 °C/24h, T10: 35°C/48 h, T11: 35 °C/72 h, T12: 35 °C/96h.

As sementes mantidas a 25 e 30 °C apresentaram desgaste dos tecidos do tegumento e estreitamento do endosperma micropilar (Fig. 3 A, B, C, F, G, H, K e L). As sementes mantidas a 35 °C, ainda que apresentassem desgaste das células dos

tecidos do tegumento, apresentaram modificações, como alongamento do eixo hipocótilo/radicula que sinaliza para uma germinação positiva.

As sementes mantidas na temperatura de 25 °C apresentaram maior integridade de proteínas durante todo período avaliado (Fig. 4 A – D), semelhante às sementes mantidas a 30 °C (Fig. 4 E - G), com exceção do último tempo de embebição, no qual observa-se coalescência das proteínas (Fig. 4H). Por outro lado, nas sementes mantidas a 35 °C observa-se coalescência dos corpos proteicos e grande consumo dessa reserva ao final do tempo avaliado (Fig. 4 I-L).

#### **4- Discussão**

As diferenças nas porcentagens de germinação de sementes de cedro nas diferentes temperaturas estão de acordo com o descrito por Flores (2018) e por Aragão (2015). Esses autores verificaram germinação de 94 e 87%, a 25 °C, respectivamente, sendo esta a faixa ótima para esta espécie. Contudo, houve redução na germinação quando submetidas às temperaturas de 30 e 35 °C. A atividade das proteases foi superior em 35 °C (Fig. 1B), podendo estar atuando como reguladora na germinação e no alongamento da raiz primária (WILSON et al., 2018). Por outro lado, a atividade dessa enzima pode estar relacionada à degradação das sementes e quebra acelerada de proteínas, conforme visto em 30 e 35 °C (Fig.4).

A presença de proteases é essencial para formação de enzimas glicolíticas, ATP sintases mitocondriais, aldolases redutases, metionina sintases, moléculas chaperonas estimulam a germinação e podem proteger a célula contra os efeitos negativos das EROs (WOJTYLA et al., 2016). Essa regulação proteolítica foi estudada em arroz, na qual a expressão dos genes responsáveis pelo alongamento e tamanho celular (OTS1-RNAi), foram inibidos, comprometendo as atividades de proteases e mostrando ser a função regulatória dessas enzimas determinante para o crescimento da cultura. (SRIVASTAVA et al., 2016).

A invertase hidrolisa a sacarose em frutose e glicose para que esses açúcares sejam utilizados como substratos respiratórios para geração de energia. Esta enzima é mais ativa durante o início da germinação para suprir a demanda energética (KOCH et al., 2004). Outro fator relevante é o aumento da disponibilidade de glicose proporcionado pela invertase. A glicose e os demais açúcares redutores são moléculas

sinalizadoras (NOCTOR et al., 2017; SOUZA et al., 2017), que atuam em diferentes rotas metabólicas e diversos processos, como a germinação.

Além disso, os carboidratos afetam a expressão de diversos genes (BLASSING et al., 2005; KUMAR et al., 2015). A invertase possibilita alterações das concentrações locais de carboidratos e da razão sacarose/monossacarídeos, favorecendo a germinação a 25 °C. Na temperatura de 35 °C a atividade da invertase inicialmente maior pode estar relacionada à reativação metabólica e à germinação. No entanto, após um maior período sob essa temperatura a atividade enzimática foi afetada drasticamente, comprometendo a germinação, possivelmente ligada à redução da disponibilidade de açúcares para a germinação. Isso provavelmente ocorreu com finalidade de manter a homeostase celular, com a não conversão de substratos e sinalização relacionada ao estresse térmico.

Outro fator que influenciou a germinação das sementes mantidas a 25 e a 30 °C foi a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sempre crescente, porém em níveis menores que o produzido a 35 °C (Fig.1 D). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também é considerado molécula sinalizadora e desempenha papel importante na germinação, enfraquecendo as ligações entre os componentes da parede celular e sinalizando para a síntese e atividade de enzimas hidrolíticas, favorecendo a germinação (BEWLEY et al., 2013; KUMAR et al., 2015). Porém, em quantidades altas causa a morte celular, o que ocorreu provavelmente com as sementes encubadas a 35 °C. O aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode também estar relacionado à retomada da respiração e de atividades metabólicas. Essa molécula é responsável por sinalização celular, ativação de canais de Ca<sup>+2</sup>, inibidora de fosfatases, ativação da tradução de MAPKs, apoptose (PCD) e ativação da expressão de genes que estão ligados a sistema antioxidativo (AWASTHI et al., 2016). Porém, podem causar dano às membranas celulares quando encontram-se em elevadas concentrações, levando à sua desestruturação.

Em elevadas temperaturas o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode levar à peroxidação lipídica e ao aumento da produção de malonaldeído, que é um indicador de elevadas taxas de peroxidação. Assim, a elevada atividade de peroxidação lipídica, associada a radicais livres e peróxidos é uma possível causa da perda de viabilidade das sementes de cedro submetida a 35 °C. Sementes de *C. fissilis* mantidas a 20 °C em baixa umidade (34% UR), apresentaram maiores quantidades de malonaldeído e maior condutividade elétrica, portanto maior perda da integridade da membrana e perda da viabilidade das sementes (FLORES et al., 2017), confirmando que as sementes de *C. fissilis* são susceptíveis a peroxidação lipídica em condições de estresse.

A APX pode atuar como antioxidante celular usando o ascorbato como um doador de elétrons para a reação (ASADA et al., 2006; ALI et al., 2016). Esta enzima age em conjunto com a SOD e a CAT modulando o teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evitando o estresse e favorecendo a germinação em temperaturas ótimas, pois a SOD dismuta o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que é utilizado pelo ciclo da glutathiona-ascorbato para eliminar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sem causar danos oxidativos à célula (FLORES et al., 2014). Neste sentido, sugere-se que a APX é dependente em temperaturas próximas à ótima para a germinação de cedro. A atividade da APX em todos tratamentos avaliados indica que ascorbato peroxidase está funcional e mantém o sistema antioxidante mesmo em condições de estresse térmico. Semelhante à baixa germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa*), quando submetidas ao estresse térmico está associada à queda da atividade a SOD, APX e CAT com elevados teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comprometendo o sistema antioxidante e impedindo a germinação devido ao dano oxidativo (ALI et al., 2016).

A primeira barreira ao excesso de EROs nas células é a atividade da SOD que desmuta o O<sub>2</sub><sup>-</sup> em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gerando o substrato para ação da CAT (AKTER et al., 2017). As maiores atividades dessas enzimas a 35 °C indicam maior produção de EROs. Como resultado, não houve germinação. A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está envolvida com danos causados à germinação, conforme foi observado no eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon braúna*, onde a atividade da SOD e da CAT tiveram maiores alterações ao longo da germinação a 15 e a 40 °C, demonstrando que temperaturas estressantes provocam danos oxidativos (FLORES et al., 2014). Em sementes de *Dalbergia nigra*, o teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decresceu em todas as temperaturas, com exceção a 5 °C (MATOS et al., 2014). Isso porque na temperatura de 40 °C, provavelmente ocorreu desnaturação de enzimas importantes no processo metabólico. Em sementes de *Dalbergia nigra*, o aumento da temperatura também causou aumento na produção de superóxido e as sementes não germinaram (MATOS et al., 2014; ATAIDE et al., 2015).

As POXs estão envolvidas no processo de lignificação de parede celular, catalisando o último passo enzimático da biossíntese de lignina (HIGUCHI et al., 1985). Esta enzima apresenta um caráter bifuncional no metabolismo oxidativo, pois podem utilizar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para oxidar vários substratos por meio do seu ciclo catalítico peroxidativo e também podem produzir OH<sup>-</sup> a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por intermédio do seu ciclo catalítico hidroxílico (SOUZA et al., 2018). Assim, as POXs de parede mantêm a viabilidade, o alongamento celular devido à produção de OH<sup>-</sup> e à clivagem não enzimática dos polissacarídeos de ligação cruzada (MAIA et al., 2012). Por outro lado,

estas enzimas também podem restringir o crescimento por meio do espessamento da parede celular em decorrência da eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associada à polimerização dos precursores da lignina. Como consequência, as POXs podem estar envolvidas na regulação do crescimento celular envolvendo o metabolismo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Adicionalmente, já foi relatado que a peroxidase Classe III (guaiacol peroxidase) não apenas age como sistema antioxidante, mas também cumpre papel na formação da lignina, suberina, regulação de auxinas durante a germinação de sementes de arroz em baixas temperaturas (BAEK et al., 2018), mantendo assim a viabilidade de sementes. Neste sentido, as EROs também agem favorecendo a germinação, atuando no enfraquecimento do endosperma ou tegumento das sementes, assim como na proteção da raiz primária contra microrganismos patogênicos e sinalizadores celulares (SCHOPFER et al., 2001; SOUZA et al., 2018).

Através do papel da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a atividade de enzimas hidrolíticas facilitam a expansão celular, regulam a turgidez, promovem o enfraquecimento do endosperma micropilar de *C. fissilis* durante a germinação. Assim, a redução deste compartimento é visivelmente percebido durante o processo germinativo (Figura 3). Também é possível observar o consumo do endosperma lateral, que serve como fonte de energia para crescimento embrionário (Figura 3 F, L, R). O padrão de consumo de microsperma lateral também foi relatado em sementes de braúna submetidas a 25 °C (SANTOS et al., 2017).

O teor de proteínas presentes no tegumento e endosperma foi reduzido ao longo do processo germinativo (Figura 4). Nota-se que em 96 h em todos tratamentos ocorreu a redução do teor em comparação em 24 h e o mesmo correu com relação a temperatura. Sabe-se que, de forma geral, os teores proteicos de reservas de sementes servem, principalmente, como fonte de aminoácidos para a síntese de novas proteínas ou como fonte de esqueleto de carbono para síntese de energia (BEWLEY et al., 2013).

Estes resultados indicam que a 25 °C ocorre baixa concentração de EROs e a atividade antioxidante é suficiente para manutenção das atividades celulares, favorecendo a germinação. Por outro lado, as sementes a 35 °C, provavelmente em condição de estresse, têm o sistema antioxidante e de membranas comprometidos, resultando no aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que leva a perda de vigor e da germinação de *Cedrela fissilis*.

## 5- Conclusões

A temperatura ótima de germinação de cedro é 25 °C.

Ocorre maior atividade enzimática de protease e invertases à medida que se eleva a temperatura até 30 °C.

A atividade da SOD e da CAT é comprometida em 35 °C, levando à morte da semente. Não houve diferença na atividade de APX em todos tratamentos avaliados. E a atividade da POX teve redução significativa a 30 e 35 °C.

O teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é maior em 35 °C.

Ocorre consumo do endosperma lateral ao longo do processo germinativo em todos tratamentos avaliados. Há redução no teor proteico das reservas das sementes ao longo do processo germinativo. As sementes submetidas as 35 °C tiveram redução acentuada do teor de proteínas.

A temperatura de 35 °C é prejudicial ao processo germinativo das sementes de *Cedrela fissilis*.

## 6- Referências bibliográficas

AKTER, N.; ISLAM, M.R. Heat stress effects and management in wheat. A review. **Agronomy Sustainable Development**. v.37, n.37, p.1-17, 2017.

ALI, M.K.; AZHAR, A.; REHMAN, H,U.; GALANI, S. Antioxidant defence system and oxidative damages in rice seedlings under heat stress. **Pure Applied Biology**, v.5, n.4, p.1131-1141, 2016.

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, n.4, p.1247-1257, 1995.

ARAGÃO, V.P.M.; NAVARRO, B.V.; PASSAMANI, L.Z.; MACEDO, A.F.M. Free amino acids, poltarnides, soluble sugars and proteins during seed germination and early seedling growth of *Cedrela fissilis*, an endangered hardwood species from the Atlantic Forest in Brazil. **Theoretical Experimental Plant Physiology**, v.27, n.2, p.157-169, 2015.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v.82, p.235–241, 1992.



- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, **Plant Physiology**, v.141, n.2, p.391–396, 2006.
- ATAIDE, G.M.; BORGES, E.E.L.; FILHO, A.T.L. Alterações fisiológicas e biométricas em sementes de *Melanoxylon brauna* durante a germinação em diferentes temperaturas. **Árvore**, v.40, n.1, p.61-70, 2015.
- AWASTHU, R.; BHANDARI, K.; NAYYAR, H. Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. **Environmental Science**, v.3, n.11, 2016.
- BAEK, J.S.; CHO, E.E.; LEE, D.B.; CHUNG, N.J. Evaluation of seed vigor tests for predicting seedling establishment at low temperature in rice (*Oryza sativa*). **Crop Science Biotechnology**, v.21, n.2, p.155-163, 2018.
- BEUCHAMP, C.; FRIDOVICK, I. Superoxide dismutase improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, n.1, 276–287, 1971.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. 3.ed. Springer. 392p. 2013.
- BLÄSSING, O.E.; GIBON, Y.; GÜNTHER, M.; HÖHNE, M.; MORCUENDE, R.; OSUNA, D.; THIMM, O.; USADEL, B.; SCHEIBLE, W.; STITT, M. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.17, n.2, p.3257-3281, 2005.
- BRANCALION, P.H.S.; NOVENBRE, A.D.L.C.; RODRIGUES, R.R. Temperatura ótima de germinação de sementes de espécies arbóreas brasileiras. **Revista Brasileira Sementes**, v. 32, n. 4, p.15-21, 2010.
- COCHRANE, A.; HOYLE, G.L.; YATES, C.J.; WOOD, J.; NICOTRA, A.B. Predicting the impact of increasing temperature on the seed germination among populations of western Australian *Banksia* (Proteaceae). **Seed Science Research**, v.24, n.3, p.195-205, 2014.
- DEL LONGO, O.T.; GONZALES, C.A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v.34, n.7, p.1023–1028, 1993.

- FLORES, A.V.; ATAÍDE, G.M.; CASTRO, V.O.; BORGES, E.E.L.; PEREIRA, R.M.D. Physiological and biochemical alterations on the storage of *Cedrela fissilis* seeds. **Floresta**, v.48, n.1, p.1-8, 2017.
- FLORES, A.V.; BORGES, E.E.L.; GUIMARÃES, V.M.; ATAÍDE, G.M. CASTRO, R.V.O. Germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* em diferentes temperaturas. **Árvore**, v.38, n.6, p.1147-1154, 2014.
- FLORES, V.A.; ATAÍDE, G.M.; CASTRO, V.O.; BORGES, E.E.L.; PEREIRA, R.M.D. Physiological and biochemical alterations on the storage of *Cedrela fissilis*. **Floresta**, v.48, n1, p.01-08, 2018.
- FUNDO, J.F.; MILLER, F.A.; GARCIA, E.; SANTOS, J.R. Physiochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity in juice, pulp, peel and seeds of *Cantaloupe* melon. **Food Measure**, v.12, n.1, p.929-300, 2017.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I- Occurrence in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v.59, n.2, p.309–314, 1977.
- HEYNO, E.; INNOCENTI G.; LEMAIRE, S.; ISSAKIDIS-BOURGUET, E.; KRIEGER-LISZKAY, A. Putative role of the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalling in *Arabidopsis*. **Philosophical Transactions Royal Society**, v.369, n.1614, 2014.
- HIGUCHI, T. Biosynthesis of lignin. In: HIGUCHI, T. (Ed.). **Biosynthesis and biodegradation of wood components**. New York: Academic Press, 1985, p. 141-160.
- HODGES, P.W.; BUTLER, J.E.; MCKENZIE, D.; GANDEVIA, S.C. Contraction of the human diaphragm during postural adjustments. **Physiology**, v.505, n.2, p. 539-548, 1997.
- IPCC, **Intergovernmental panel on climate change: Global warming of 1,5 °C**. Summary of policymakers, p.32. 2018
- JOHANSEN, D. A.; **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill. p.523, 1940.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, n.2, p.315-319, 1976.

KHARIN, V.V.; ZWIERS, F.W.; ZHANG, X.; WEHNER, M. Changes in temperature and precipitation extremes in the CMIP5 ensemble. **Climatic Change**, v.119, n.2, p.345–357, 2013.

KOOSHKI, M.M.; MORADI, A.; BALOUCHI, H.; FAHLIANI, R.A. Evaluation of the germination performance and biochemical índices of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds stored at diferente temperatures and moisture contents. **Plant Process Function**, v.7, n.25, p.17-30, 2018

KUMAR, S.P.J.; PRASAD, S.R.; BANERJEE, R.; THAMMINENI, C. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Botany**, v.116, n.4, p.663-668, 2015.

MAIA, J.; SILVA, S.L.F.; VOIGT, E.L.; MACEDO, C.E.C.; PONTE, L.F.A.; SILVEIRA, J.A.G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.2, p.342-249, 2012.

MATOS, A.C.B.; BORGES, E.E.L.; SEKITA, M.C. Production of reactive oxygen species in *Dalbergia nigra* seeds under thermal stress. **Seed Science**. v.36, n.3, p.282-289, 2014.

MATOS, A.C.B.; BORGES, E.E.L.; SILVA, L.J. Fisiologia da germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. sob diferentes temperaturas e tempos de exposição. **Árvore**, v.39, n1, p.115–125, 2015.

MOLLE, F.R.D.; BRANDÃO, A.D.; TINÉ, M.A.S. Variação ao longo do dia da atividade de enzimas do catabolismo de sacarose em plântulas de *Hymenaea courbaril* durante a mobilização de xiloglucano de reserva. **Revista Brasileira Botânica**, v.32, n.1, p.143-153, 2009.

NAKANO, Y. ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**. v.22, n.5, p.867-880, 1981.

NAVROSKI, M.C.; TONETT, E.L.; MAZZO, M.V.; FRIGOTTO, T.; PEREIRA, M.O.; GALVANI, L.V. Procedência e adubação no crescimento inicial de mudas de cedro. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.36, n.85, p.17-24, 2016.

NOCTOR, G.; REICHHELD, J.P.; FOYER, C.H. ROS related redox regulation and signaling in plants. **Cell Developmental Biology**, v.80, n.1 p.3-12, 2018.

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. 1981. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Termarcarphy Pty. Australia: Melbourne, 352 p.

OLIVEIRA, A.K.M.; BAUER, P.J.; BARBOSA, A.A. Efeitos da temperatura na germinação de sementes e na formação de plântulas de *Cedrela fissilis*. **Floresta**, v. 44, n. 3, p. 441–450, 2014.

RAMALHEIRO, J.P.S.C. **Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades**. 2009, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal. p.51, 2009.

SANCHES, M. C.; MARZINEK, J.; BRAGIOLA, N.G; NASCIMENTO, A.T. Morpho-physiological responses in *Cedrella fissilis* Vell. submitted to changes in natural light conditions: implications for biomass accumulation. **Trees - Structure Function**, v. 31, n. 1, p. 215–227, 2017.

SANTOS, M.M.; BORGES, E.E.L.; ATAIDE, G.G.; SOUZA, G.A. Germination of seeds of *Melanolydon brauna* under heat stress: Production of reactive oxygen species and antioxidant activity. **Forests**. v.8, n.11, p.405-418, 2017.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. **Plant Physiology**, v.125, n.4, p.1591-1602. 2001.

SHARMA, P.; AMBUJ, B.J.; RAMA, S.D.; MOHAMMAD, P. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Botany**, v.2, n.1, p.1–26, 2012.

SHEN, W.; YAO, X.; YE, T.; MA, S.; LIU, X.; YIN, X. Arabidopsis aspartic ASPG1 affects seed dormancy, seed longevity and seed germination. **Plant Cell Physiology**, v.59, n.7, p.1415-1431, 2018.

SOUZA, G.A.; DIAS, C.F.S.; PIMENTA, T.M.; ALMEIDA, A.L.; PICOLI, E.A.T. Sugar metabolism and developmental stages of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) seeds. **Physiologia Plantarum**, v.162, n.4, p.495-505, 2017.

SOUZA, G.A.; DIAS, D.C.F.S.; PIMENTA, T.M.; CARDOSO, A.Á.; PIRES, R.M.O.; ALVARENGA, A.P.; PÍCOLI, E.A.T. Morpho-anatomical, physiological and

biochemical changes in rubber tree seeds. **Brazilian Academy Sciences**, v.90, n.2, p.1625-1641, 2018.

SRIVASTAVA, A.K.; ZHANG, C.; SADANANDOM, A. Rice OVERLY TOLERANT SALT 1 (OTS1) SUMO protease is a positive regulator of seed germination and root development. **Plant Signaling Behavior**. v.11, n.5, p.3, 2016.

SRIVASTAVA, S.; DUBEY, R.S. Manganase excesso induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidantes and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v.64, n.1, p.1-16, 2011.

SRIVASTAVA, S.; DUBEY, R.S. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v.64, n.1, p1-16, 2011.

SUZUKI, S.; MILLER, G.; MORALES, J.; SHULAEV, V.; TORRES, M.A.; MITTLER, R. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. **Plant Biology**, v.14, n.6, p.691-699, 2011.

WANG, W.Q.; LIU, S.J.; SONG, S.Q. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. **Plant Physiology Biochemistry**, v.86, n.2, p.1-15, 2015.

WILSON, K.A.; WILSON, A.T. Proteases catalysing vicilin cleavage in developing pea (*Pisum sativum* L.) seeds. **Plant Physiology**, v.224, n.2, p.86-94, 2018.

WOJTYLA, L.; LECHOWSHA, K.; KUBALA, S.; GARNCZARSKA, M. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. **Plant Science**, v.7, n.66, p.346-357, 2016.

ZHANG, Y.; CHEN, B.; XU, Z.; SHI, Z.; CHEN, S.; HUANG, X.; CHEN, J.; WANG, X.F. Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. **Experimental Botany**, v.65, n.12, p.3189-3200, 2014.

### Artigo 3

#### Análise qualitativa de proteínas de *Melanoxylon brauna* por espectrometria de massas em diferentes temperaturas

##### Resumo

A crescente emissão de gases de efeito estufa e a elevação da temperatura global afetam a fisiologia das sementes tropicais devido a mudanças no perfil proteico pelas alterações pós transcricionais. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil proteico expresso em sementes de *Melanoxylon brauna* em três temperaturas. Foram utilizados três géis SDS PAGE com short run para cada temperatura utilizada (0, 25 e 40 °C), feita digestão trípica e realizada a leitura em UPLC nanoAcquity MS. Foram encontradas 69 proteínas no perfil expresso. A presença de proteínas em T0 estão relacionadas à proteção e ao desenvolvimento inicial da semente. Em 25 °C as proteínas pertencem à síntese de ATP, ao sistema antioxidante, à proteção celular e à síntese de novo. As proteínas em 40 °C integram vias ligadas ao estresse oxidativo, ao sistema antioxidante e à manutenção celular.

##### 1-Introdução

A crescente industrialização, destruição das florestas e o uso indiscriminado do solo e de seus recursos impactam negativamente o clima do planeta. Os aumentos nas concentrações de monóxido e de dióxido de carbono na atmosfera possivelmente alterarão o clima e a vida no planeta. Como consequência, prevê-se mudanças na precipitação, no aumento da temperatura global e alteração do nível do mar (BEGUN et al., 2018; TAVARES et al., 2018). É estimado aumento em torno de 1 a 5 °C para a região tropical sul americana (IPCC et al., 2018). O segundo relatório da FAO (2016) informa que a taxa de desmatamento no período de 2010-2015 foi de 2,2 milhões de hectares por ano para a América Latina, correspondente a 14% da degradação mundial de solos. Tal situação coloca em risco a Mata Atlântica e o Cerrado, dois biomas brasileiros que estão na lista de *hotspots* da biodiversidade (FERRERO et al., 2017). Os cenários criados a partir dos modelos que projetam alterações na precipitação e na temperatura alertam para consequências negativas, especialmente para o bioma Mata Atlântica devido à sua pequena e fragmentada cobertura florestal (PBMC, 2017).

As sementes e mudas das espécies florestais nativas poderão apresentar diferentes níveis de sensibilidade a estas oscilações, mesmo sendo selvagens,

dependendo de fatores como interações bióticas, genótipo, plasticidade fenotípica, ciclo evolutivo, localização geográfica, nicho ecológico e magnitude das variações climáticas (DAWSON et al., 2011; NEALE et al., 2011; COCHANE et al., 2016). De acordo com Penedo (2015), 23% das espécies da flora brasileira encontram-se na categoria de risco próxima da extinção (*Extintas* ou *Extintas na natureza*). Tal fato demonstra a importância de estudos que visem a conservação, o entendimento do comportamento fisiológico e bioquímico frente ao estresse biótico ou abiótico e a preservação em diferentes biomas brasileiros.

Dentre as espécies da Mata Atlântica, a braúna (*Melanoxylon brauna*) está classificada como *vulnerável* na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção (BRASIL - MMA, 2008). A braúna é uma espécie arbórea, secundária tardia, família Fabaceae: Caesalpinioideae, que tem ocorrência nos estados de AL, BA, DF, ES, MG, RJ e SP, principalmente em áreas de fitofisionomias do domínio atlântico, mas também pode ser encontrada em áreas do domínio do cerrado. Esta espécie apresenta elevado interesse econômico devido a sua trabalhabilidade e rentabilidade da madeira, tornando-a alvo da predação e do uso indiscriminado (LORENZI et al., 2008). Tendo em vista o risco de extinção da braúna e sua importância para uso antrópico, é urgente a necessidade de estudos para sua preservação e conservação.

A semente é a via de propagação da braúna, seja para fins de restauração ou produção de madeira. Logo, a qualidade da semente é um fator importante para produção e preservação desta espécie. Um dos fatores que afetam a germinabilidade das sementes é a elevação da temperatura, seja na sua amplitude máxima ou média. Essa influência está relacionada às alterações na velocidade das reações enzimáticas, bem como ao controle da cinética de absorção de água (OLIVEIRA et al., 2017). Estudos apontam que 25 °C é a faixa de temperatura ótima para a espécie, com até 98% de germinação. Porém, em temperaturas mais elevadas (30, 35 e 40 °C) a porcentagem de germinação tende a ser nula (FLORES et al., 2014). Temperaturas de 35, 40 e 45 °C elevam a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs), com maiores danos ao sistema de membranas (ATAIDE et al., 2018), maior acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comprometimento do sistema antioxidante e posterior morte das sementes (SANTOS et al., 2017).

É fundamental entender como a temperatura influencia a base molecular dos processos de adaptação das sementes. Para isso, o rápido desenvolvimento das técnicas denominadas “ômicas” tem favorecido novas perspectivas. Dentre as quais vale citar a

genômica, transcriptômica, metabolômica e proteômica são combinadas com linhas de pesquisas tradicionais têm possibilitado o conhecimento da base funcional e molecular de adaptação e evolução de culturas com interesse econômico (FAROOQ et al., 2009, SMOLIKVA et al., 2018). A proteômica é uma área da bioquímica que estuda as proteínas contidas numa amostra biológica em uma dada célula, tecido ou organismo (AGRAWAL et al., 2015). Esses estudos podem abordar o desenvolvimento, a tolerância à dessecação, a germinação, a dormência, vigor das sementes assim como condições de estresses (WANG et al., 2015). Para elucidar os mecanismos de resposta das sementes aos diferentes estresses abióticos, técnicas pós-genômicas como a proteômica têm se mostrado valiosas para ajudar na compreensão de tais fenômenos, como a sinalização e vias metabólicas envolvidas (TAN et al., 2013).

São incipientes os trabalhos realizados com sementes de espécies arbóreas nativas do Brasil com base na análise proteômica. Foram identificadas em sementes de *Hevea brasiliensis*, a beta glucosidase, a giberelina, a rubisco e o ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano (ACC), precursor imediato do etileno, antes e após a germinação (WONG et al., 2005). Proteínas como BiP (membro de heat shock 70 protein), endopeptidase, ATP sintase e ascorbato peroxidase durante o desenvolvimento de sementes de *Ocotea catharinensis* (DIAS et al., 2010). Vicilina, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e ATPase em embriões secos e germinados de *Araucaria angustifolia* (BALBUENA et al., 2011). “Legumin”, proteína de reserva durante estudo de tolerância à dessecação, em sementes de *Magnolia ovata* (JOSÉ et al., 2011). Ainda são escassos no Brasil os trabalhos que investigam o efeito da temperatura na germinação das sementes florestais utilizando a ferramenta proteômica. Sementes de *Eucalyptus urophylla* osmocondicionadas e sob estresse térmico (45 °C) tiveram maior abundância de proteínas associadas à regulação do ciclo celular, sugerindo que 22 proteínas estariam envolvidas na proteção contra o efeito térmico e EROs (MARTINS et al., 2017). Identificou-se 48 proteínas diferencialmente abundantes em sementes de *Cariniana legalis*, na temperatura ótima de germinação (25 °C), relacionadas à oxirredução, processos de regulação, enovelamento e via de carboidratos, além de quantificar atividades de enzimas do sistema antioxidante (catalase, peroxidase, superóxido dismutase e flavanona-3-hidroxilase) (TRINDADE et al., 2018).

Dessa forma, estudos que envolvem a análise proteômica podem contribuir significativamente para desvendar as possíveis relações entre a regulação diferencial de proteínas das plantas ao estresse térmico (KOSOVÁ et al., 2011). No cenário das



mudanças climáticas em curso, torna-se de grande importância a elucidação dos mecanismos que ocorrem nas plantas sob estresse térmico. Sendo assim, os objetivos foram avaliar o efeito térmico no proteoma de sementes de *Melanoxylon brauna* e então, identificar e qualificar funcionalmente o perfil proteico exposto que é relevante para as sementes em diferentes temperaturas.

## **2-Material e métodos**

*Tratamento e excisão do eixo embrionário:* As sementes foram coletadas, beneficiadas e posteriormente armazenadas em câmara fria (5 °C/ 60% umidade relativa) até utilização. As sementes foram imersas em captan 1% por três minutos e colocadas em placas de petri (9 cm Ø) sobre duas folhas de papel germitest umedecidas com água destilada. Os tratamentos consistiram em tempo 0 (semente que não foi embebida, T0), sementes mantidas a 25 °C por 48 h (T1) e a 40 °C por 48 h (T2). O eixo embrionário foi retirado com ajuda de bisturi e pinça para as análises. Foram colocadas 100 sementes por tratamento distribuídas em 5 repetições biológicas de 20 sementes cada.

*Extração e quantificação das proteínas:* As quantificações de proteínas das amostras do extrato bruto dos diferentes tratamentos foram realizadas pelo método de Bradford, em triplicata (BRADFORD et al., 1976). Uma curva padrão foi preparada com concentrações crescentes de soro albumina bovina (BSA) na faixa de 0 e 15 µg µL<sup>-1</sup>.

*Eletroforese desnaturante SDS-PAGE:* A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes, de acordo com o método de Laemmli (LAEMMLI, 1970). O gel de separação utilizado teve 1,5 mm de espessura e concentração de 10% de poliacrilamida tamponada em 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8. Foram utilizados 3 géis de corrida, um para cada tratamento com 5 repetições técnicas, considerando a canaleta uma repetição. Cada canaleta recebeu 50 µg de proteínas totais, derivadas das amostras previamente desnaturadas com temperatura e tampão de amostra composto por 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25% glicerol, 2 % SDS e 0,01% azul de bromofenol. Na corrida do gel foi utilizada a corrida de menor tempo ou “Short Run”, que consiste na migração das proteínas por aproximadamente 1 centímetro no gel de separação. Alcançando essa marca a corrida é interrompida (LIEBLER; HAM 2009; RESJO et al., 2017). A imobilização das proteínas totais do gel de separação foi utilizada visando a redução do

número de interferentes e a perda de proteínas (SILVA et al., 2018b). A corrida eletroforética foi executada a 200 V para, em seguida, o gel foi fixado em solução aquosa de 10% metanol e 5% ácido acético por 2 horas sob agitação. A coloração foi realizada em solução de coomassie G250 até o aparecimento das bandas correspondentes às proteínas. Em seguida foi realizada a descoloração até o gel ficar translúcido.

*Digestão tríplica:* As bandas constituídas com as proteínas de interesse foram retiradas do gel com o auxílio de um bisturi, fragmentadas e colocadas em microtubos devidamente identificados. Os fragmentos de gel foram descorados por meio de sucessivas lavagens em solução de acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25 mM (SHEVCHENKO et al., 2006).

Os géis foram desidratados com acetonitrila 100% por 5 min (2 vezes) e secos em speed vac por 15 min. As proteínas foram reduzidas em solução de 65 mM DTT e 100 mM bicarbonato de amônio por 30 min a 56 °C. Em seguida, as proteínas foram alquiladas em solução 200 mM de iodoacetamida e 100 mM bicarbonato de amônio por 30 min à temperatura ambiente e protegido da luz. Os géis foram lavados com 100 mM bicarbonato de amônio durante 10 min por 2 vezes, desidratados em acetonitrila 100% durante 5 min. Após repetir esse ciclo de lavagem por mais 3 vezes, os géis foram concentrados e secos em sistema de centrifugação a vácuo durante 15 min.

Para a digestão enzimática, os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (Trypsin, from porcine pancreas, Proteomics grade) 25 ng mL<sup>-1</sup> em solução de 40 mM bicarbonato de amônio pH 8,0 e acetonitrila 10%. Foram adicionados 20 µL da solução com enzima a cada microtubo contendo os géis e submetidos a banho de gelo durante 45 min para penetração no gel. Decorrido esse tempo, 50 µL de solução de bicarbonato de amônio (50 mM) foram adicionadas e as amostras foram incubadas a 37 °C por 20 h (overnight). Posteriormente, os géis foram submetidos a banho ultrassônico durante 10 min, centrifugados a 200 g por 2 min e a solução removida para novos microtubos. Foram adicionados 40 µL de solução de ácido fórmico 5% e acetonitrila 50% nos géis restantes para recuperar maior quantidade de fragmentos trípticos. Os microtubos contendo fragmentos de géis foram novamente submetidos a banho ultrassônico durante 2 min, centrifugados e a solução transferida aos novos microtubos. As soluções contendo os fragmentos trípticos foram concentradas a vácuo até secagem total e armazenados a -20 °C.

*Identificação, classificação de proteínas homologas por espectrometria de massas:* Os peptídeos digeridos foram dessalinizados por meio de micro colunas do tipo Zip-Tip (Millipore®), contendo resina de fase reversa (C18) previamente ativada com acetonitrila 100% e equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%. Os peptídeos constituintes das réplicas oriundas do short-run foram solubilizados em 40 µL de solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (grau de pureza LCMS) e acondicionados em recipientes “vial total recovery” para a aplicação no sistema nano LC-MS/MS. Após o preparo da amostra, 1 µL da solução foi analisado por nano LC-MS, utilizando o sistema UPLC nanoAcquity (Waters, EUA), contendo uma coluna trap modelo nanoAcquity UPLC® 2G-V/M Trap 5 µm Symmetry® C18 180 µm x 20 mm, em uma taxa de fluxo de 7 µL min<sup>-1</sup>, durante 3 min. A separação dos peptídeos ocorreu por uma coluna nanoAcquity UPLC® 1.7 µm BEH130 100 µm x 100 mm, operando com taxa de fluxo de 0,4 µL min<sup>-1</sup>. A fase móvel do processo cromatográfico teve como solventes a água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila (ACN) acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente B). A separação cromatográfica ocorreu conforme a seguinte programação de B: 2% por 1 min; gradiente de 2 a 30% de B por 209 min; gradiente de 30 a 85% de B por 10 min; manutenção em 85% de B por 5 min; gradiente de 85 a 2% por 5 min e manutenção em 2% por 10 min, totalizando 240 min de análise cromatográfica. Os peptídeos eluídos foram automaticamente injetados em espectrômetro de massas modelo MAXIS 3G (Bruker Daltonics, Alemanha), atuando no modo online, com fonte de ionização CaptiveSpray. A análise dos peptídeos foi realizada por meio do método IE\_GCF\_01-02-2017, com o fluxo de gás de secagem de 3 L min<sup>-1</sup>, temperatura da fonte de ionização de 150 °C e voltagem de transmissão de 2 kV. Os dados brutos foram convertidos em listas de massas na extensão .mgf (Mascot Generic Format), e na extensão .mzXML (*Extensible Mark-up Language*), as quais foram submetidas aos softwares Mascot Daemon, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK) e PEAKS, versão 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá), respectivamente, para a comparação contra as sequências de proteínas da família Fabaceae (download em 12/03/2019, com 757.885 entradas) com depositadas no banco de dados UniProt Knowledgebase (The UniProt Consortium, 2017). Os parâmetros usados para a pesquisa no Mascot Daemon foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável, carga de íons variando entre +2 e +4, tolerância de erro de 30 ppm para o íon parental e 0,5 Da para os fragmentos,

excluindo os peptídeos monocarregados (+1). Os parâmetros usados para a pesquisa no PEAKS foram os mesmos acima descritos, acrescentando como critério de aceitação para a identificação das proteínas, pelo menos, dois peptídeos identificados com FDR (*False Discovery Rate*) < 1% e a proteína identificada ter sua presença comprovada em, pelo menos, duas réplicas. Os resultados obtidos pelo MASCOT Daemon foram validados estatisticamente pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software Inc., Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados foi aplicado o algoritmo *Peptide Prophet* (KELLER et al., 2002) e para as proteínas o algoritmo *Protein Prophet* (NESVIZHISKII et al., 2003), como critério de aceitação para a identificação das proteínas foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90% de probabilidade de identificação para ambos, peptídeos e proteínas, com a presença de pelo menos dois peptídeos encontrados em cada proteína identificada e a presença dessa proteína ter sido comprovada em, pelo menos, duas réplicas.

Os dados de pI teórico, massa e cobertura foram obtidos com uso do Expsy Proteomics utilizando a ferramenta ProtParam utilizando da sequencia FASTA obtida no Uniprot de cada proteína identificada.

As proteínas identificadas em ambos os softwares como “Uncharacterized” foram analisadas usando o software BLAST, versão 2.4.0 (ALTSCHUL et al., 1990). Nessa análise, foi possível identificar quais as proteínas depositadas no banco de dados *protein non-redundant* (nr) do NCBI que apresentaram maior identidade com as sequências das proteínas “Uncharacterized”.

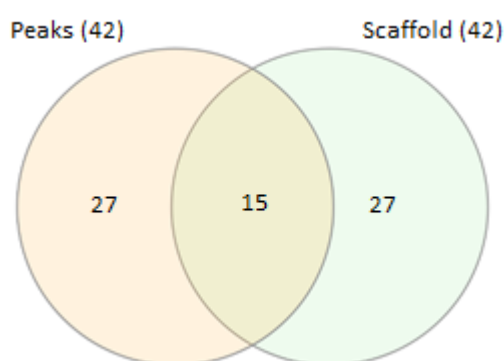
A classificação funcional das proteínas identificadas e validadas foi realizada por meio da comparação de suas sequências com as proteínas ortólogas de eucariotos disponíveis no banco de dados KOG (TATUSOV et al., 2003). Nessa classificação, um ID do KOG foi atribuída a cada proteína que alinhou significativamente (*E-value* < 10E-10) com aquelas depositadas nesse banco de dados, usando o *Reverse Position Specific* BLAST (RPS-BLAST) (MARCHLER-BAUER et al., 2002; SCHÄFFER et al., 1999).

As redes de interação entre as proteínas identificadas foram reconstruídas utilizando o aplicativo STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*, versão 11.0 ([http:// http://string-db.org/](http://string-db.org/))) (SZKLARCZYK et al., 2015). Nessa análise, as redes foram obtidas usando a espécie *Glycine max* como organismo de referência para as buscas nas bases de dados por meio das estratégias de *textmining*, *experiments*, *database* e *co-expression*, dentro de um nível de confiança acima de 0,90 e no máximo

20 interações na primeira chamada. O gráfico da rede de interações foi gerado no modo *confidence view*, no qual os nós maiores representam proteínas com estrutura 3D conhecida e a espessura da linha entre os nós indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação.

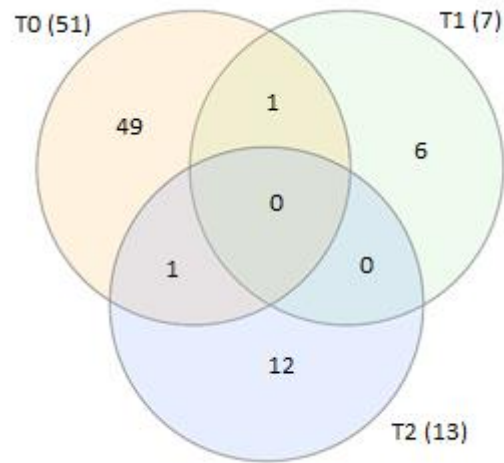
### 3-Resultados

Foram identificadas 69 proteínas homologas, sendo 27 distintas em cada abordagem (PEAKS e Mascot Scaffold) e 15 proteínas homologas que são expressas em ambas abordagens (Fig. 1).



**Figura 1:** Proteínas homologas identificadas de acordo com as abordagens PEAKS e Mascot/Scaffold em sementes de *Melanoxylon brauna* em diferentes temperaturas.

As proteínas foram separadas de acordo com cada tratamento sendo expressas 49 proteínas homologas no T0 e 6 e 12 proteínas para as temperaturas de 25 °C (T1) e a 40 °C (T2), respectivamente (Fig. 2).



**Figura 2:** Proteínas homologas identificadas conforme cada tratamento térmico em sementes de *Melanoxylon brauna*.

Os resultados das identificações das 69 proteínas expressas estão descritas na tabela 1, explicitando seus respectivos nomes, IDs, scores, coberturas, PI, massas e abordagens utilizadas.

**Tabela 1:** Identificação de proteínas do embrião de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas a diferentes temperaturas, identificadas por QTOF, algoritmo MASCOT e softwares SCAFFOLS e PEAKS.

ID	Nome	Score	Cobertura	pI teórico	Massa	Abordagem	Peptídeo	Tratamento	Grupo KOG
A0A1S3UMV1	40S ribosomal protein S11	134	25	10,57	17853,03	Peaks	HSNIPAHISPCFR VKEGDHVIGQCRPLSK SIGLGFKTTPR	T2	J
A0A151SCU0	40S ribosomal protein S14 (Fragment)	140	18	10,73	16263,65	Peaks	IGRIEDVTPIPSDSTR TPGPGAQSALR	T0	J
A0A1S3UNE2	40S ribosomal protein S15a-like	219	19	10,05	14855	Scaffold	FDVGVKEIEPWTAR VRVSVLNDALK	T0	J
A0A1S2YWL1	40S ribosomal protein S19-3	78	15	10,10	27810,46	Peaks	GGLGVGAFQR TVKDVPHEFVK	T0	J
A0A151SUX4	40S ribosomal protein S2-4	187	15	10,32	29927	Scaffold	LSVIPVRR KVLQFAGIEDVFTSSR SPFQEYTDLLAKPTGK	T0	J
A0A0B2P1D1	40S ribosomal protein S4	222	13	10,08	27810,46	Peaks	SRECLPLILIR MGNVFIIGKGTKPWVSLPK	T1	J
A0A0B2NSC6	40S ribosomal protein S5	163	16	9,62	22524,0	Peaks	NIKTIAECLADELINA RVNQAIYLLTTGAR	T0	J
A0A0B2R8J9	40S ribosomal protein S9-2	45	16	10,41	21916	Scaffold	IFEGEALLR VDSQKHIDFSLTSP LGGGRPGR HIDFSLTSP LGGGRPGR	T1	J
A0A371EPF6	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase (Fragment)	792	6	6,51	88932,78	Peaks	KYTEVKPALTNMVA AAK EGVKYGAGIGPGV YDIHSPR FLFAGVVDGR	T2	E
C6TGA6	60S acidic ribosomal protein	157	11	5,02	34225	Scaffold	GDLKEVSEEVAK VGSSEAALLAK GTVEIITPVELIK	T2	J
A0A0B2SI69	60S ribosomal protein L3	160	7,2	10,16	44654	Scaffold	HGSLGFLPR KVACIGAWHPAR VSFTVAR	T0	J

ID	Nome	Score	Cobertura	pI teórico	Massa	Abordagem	Peptídeo	Tratamento	Grupo KOG
							VACIGAWHPAR		
A0A0A6ZDS3	60S ribosomal protein L4/L1	354	21	10,44	44640,73	Peaks	RAGHQ TSAESWG TGR IPRVPGGGTHR ASIRPDI VTFVHDNISK KGPLIVYGTEGAK NIPGVEVANVER MALLAEAQRVK	T2	A
A0A0B2RR69	60S ribosomal protein L8-3	160	21	10,72	28129,36	Peaks	ASGDY AIVISHNPDNDTSR AMIGQVAGGGRTEKPLLK GVVTDVIHDPGRGAPLAK	T0	J
Q96440	Actin (Fragment)	21	6	5,38	37173,55	Peaks	AGFAGDDAPR AVFPSIVGRPR	T0	Z
Q684J9	Alcohol dehydrogenase	329	9	5,92	41096,13	Peaks	IIGVDLVSSRFEGAK GQTPLFPR TLKGT FYGNYKPR	T1	Q
Q40108	Aspartate aminotransferase	420	9	8,36	45819,38	Peaks	LNLGVGAYRTEEGKPLVLNVVR TVPHLADAIHAAVTRVV	T2	E
T2DNA5	Aspartic proteinase nepenthesin-1	103	6,5	9,22	47462	Scaffold	SVVPIASGRQIIQSPTYIVR LGPVAQPIR	T0	O
A0A072USG1	ATP-dependent chaperone ClpB	620	4	6,15	94581,13	Peaks	TAVVEGLAQR AGLGRPQQPTGSFLFLGPTGVGKT ELAK	T0	O
P94084	Class I chitinase	882	20	7,79	35927	Scaffold	GPIQISWNYNYGQCGR TALWFWMTQSPKPSCHDVITGR LSGYGTVTNIINGGLECGR IGFYKR	T0	R
C6EVF9	Elongation factor 1-alpha	254	5	9,03	49397,01	Peaks	IGGIGTVPVGR STTTGHLIYK	T0	J
A0A151S2W2	Elongation factor 2	774	15	5,77	92596,49	Peaks	AMKFSVSPVVR RVFYASQLTAKPR LLEPVYLVEIQAPEQALGGIYSVLN QKR AYLPVIESFGFSSTLR	T0	J



ID	Nome	Score	Cobertura	pI teórico	Massa	Abordagem	Peptídeo	Tratamento	Grupo KOG
							STLTDSLVAAGIIAQEVAGDVR NATLTNEKEVDAHPIR RGHVFEEMQRPGTPLYNIK		
A0A151T9F2	Eukaryotic initiation factor 4A-10 (Rubisco)	341	8	5,37	46681,4	Peaks	GLDVIQQAQSGTGK VLITDILLAR GIVPFCK	T1	J
I1M561	Fructokinase-2	107	7	5,29	35397,63	Peaks	TALAFVTLR APGGAPANVAIAVSR	T0	G
T2B9M0	Fructose-bisphosphate aldolase	1560	25	7,73	38587	Scaffold	ANSEATLGTYK VAPEVVAEHTVR EGGVLPGIKVDK GILAADESTGTIGKR GKKPWSLSFSFGR YHDELIANAAYIGTPGK AQEAFLTR	T0	G
V7D036	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	509	25	6,97	36991	Scaffold	IGINGFGR EYKPELDIVSNASCTTNCLAPLAK GGRAASFNIIPSSGAAK VLPALNGK GILGYTEEDVVSTDFVGDSR AVGKVPALNGK SSIFDAK	T2	G
A0A0L9UHF2	GTP-binding nuclear protein	173	10	9,22	46217,89	Peaks	VCENIPIVLCGNK SNYNFEKPFLYLAR IRFYCWDTAGQEK	T2	U
A0A1S2YP37	Heat shock 70 kDa protein	992	16	7,98	71565	Scaffold	TTPSYVAFTDTER NQVAMNPQNTVFDKR NAVVTVPAYFNDSQR DAGAISGLNVLR IINEPTAAAIAYGLDKK NSLENYAYNMR IDKSNVHEVVLVGGSTR VQQLLQDFNGKELCK	T2	O

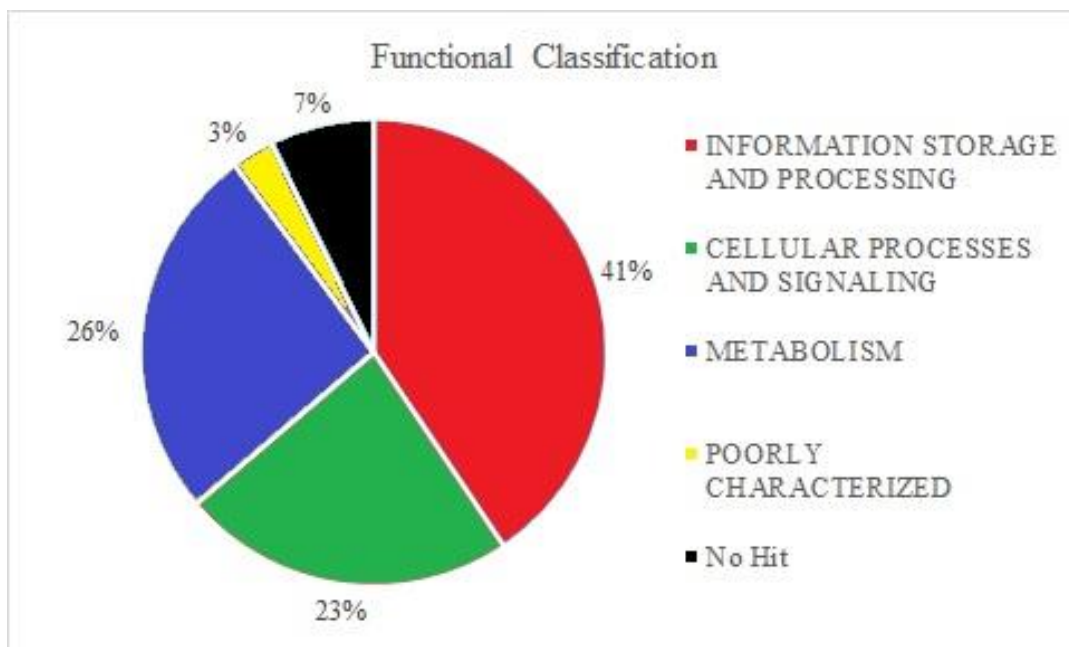
ID	Nome	Score	Cobertura	pI teórico	Massa	Abordagem	Peptídeo	Tratamento	Grupo KOG
Q9SMJ4	Legumin-like	199	3,6	6,2	56251	Scaffold	CAGVALSR LSAEFGSLHK	T0	No hit
A0A151SWU6	Malate dehydrogenase	65	14	8,22	35771	Scaffold	VAVLGAAGGIGQPLSLLMK VAVLGAAGGIGQPLSLLMKLNPLV SSLSLYDIAGTPGVAADVSHINTR TQDGGTEVVEAK	T2	C
A0A371E6Z3	Nucleoside diphosphate kinase	509	24	7,98	17863	Scaffold	GLIGEISR KIIGATNPAQSEPGTIR GDFRIDGR	T0	F
G7J743	Phenylcoumaran benzylic ether reductase-like protein Fi	188	8	8,37	34636	Scaffold	VVILGDGNPK AVFNKEEDIATYTIK	T0	No hit
A0A151QRU3	Phosphoglycerate kinase	531	14	5,97	42549	Scaffold	AAVPTIK VILSSHLGRP YSLKPLVPR LASLADLYVNDAFGTAHR ELDYLVGAVANPK	T0	G
A0A0S3T5C9	GTP-binding nuclear protein	96	9	11,53	24176,03	Peaks	GIVYGRPTNG GVTQLKFQR	T1	J
A0A0B2R0P9	Superoxide dismutase	138	11	8,56	26690	Scaffold	ALEQLQDAIAK LVVETTANQDPLVTK	T0, T1	P
A0A1S3TL68	T-complex protein 1 subunit beta	436	5	5,44	57126,89	Peaks	SLAIEAFSR GREVTVTNDGATILK	T1	O
A0A0B2QY64	Transaldolase	121	14	6,05	47944,4	Peaks	GVTSNPAIFQK LADDTEGTIEAAKWLHK TVLHDLYEKEGQSPWYDNLCRPVT DL	T2	G
A0A1S2XBZ0	Triosephosphate isomerase, cytosolic	108	13	5,48	27256	Scaffold	VSNWDNVVLAIEPVWAIGTGK FFVGGNWK	T0	G
P86451	Trypsin inhibitor	169	14	5,83	19457,25	Peaks	DLGISIDENNRR DGDPLAVRFVK	T0	No hit
A0A2K3N8N3	Tubulin beta chain	276	5	4,78	49903,36	Peaks	LAVNLIPFPR LHFFMVGFAPLTSR	T0	Z
A0A371EZD8	40S ribosomal protein S14	316	13	11,02	22512	Scaffold	TPGPGAQSALR	T0	J

ID	Nome	Score	Cobertura	pI teórico	Massa	Abordagem	Peptídeo	Tratamento	Grupo KOG
	(Fragment)						IGRIEDVTPIPSDSTR		
A0A0B2P9E6	40S ribosomal protein S5	127	9,2	9,57	22826	Scaffold	IGSAGVVR RVNQAIYLLTTGAR VNQAIYLLTTGAR	T0	J
A0A1J7H6Y5	40S ribosomal protein S6	192	11	10,71	28596	Scaffold	KGDNDLPGLTDIEKPR IQRLVTPLTLQR	T0	J
A0A0B2QW44	60S ribosomal protein L10	403	15	10,26	25419	Scaffold	FAGKDAFHLR GAFGKPQGTGAR VAIGQVLLSVR	T0	J
A0A1S2YKJ4	60S ribosomal protein L12-3-like	272	22	8,96	18006	Scaffold	VTGGEVGAASSLAPK IGPLGLSPK VAVVPSAALVIK	T0	J
C6T0E8	60S ribosomal protein L18a	69	12	10,44	21381	Scaffold	VTFRFHQYQVVGR IKFPLVFQK TATIPAKLCK	T0	J
A0A0B2SWL8	60S ribosomal protein L23	174	19	10,74	15174	Scaffold	KVLPVAVIVR GSAITGPIGKECADLWPR	T0	J
A0A1S3TDS0	60S ribosomal protein L4	416	17	10,43	44717	Scaffold	AGHQTSAESWGTR AGQGAFGNMCR KGPLIVYGTEGAK SAFEKLDISIYGSFDPKPEK KGYLLPR	T0	A
A0A371HWK3	Adenosylhomocysteinase (Fragment)	432	10	5,95	54055	Scaffold	IVGVSEETTTGVKR SKFDNLYGCR KVVVLPK VAVVCGYGDVGKGCASALK	T0	H
A0A072UQA8	ATP-dependent chaperone ClpB	72	7,3	5,85	101462	Scaffold	TKNNPVLIGEPGVGK TAVVEGLAQR GDVPSNLADVRLIALDMGALVAG AK VVGQDQAVNAVAEAVLR	T0	O
A0A151SGI9	Cell division cycle protein 48 isogeny	214	6,3	5,19	85215	Scaffold	GILLYGPPGSGK AFEEAEKNSPSIIFIDELDSIAPK	T0	O

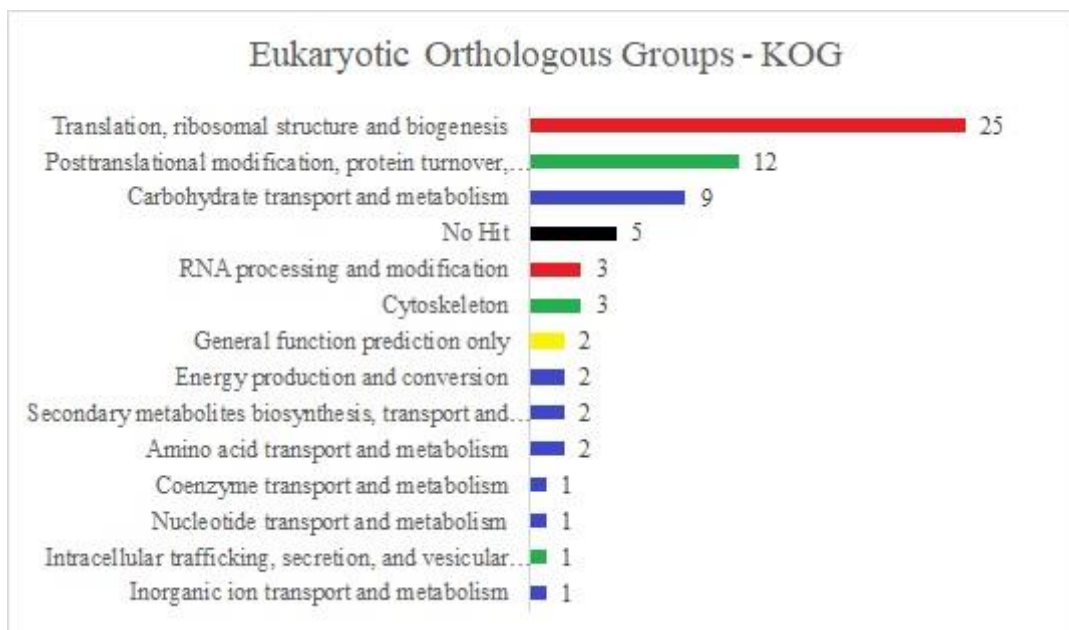
ID	Nome	Score	Cobertura	pI teórico	Massa	Abordagem	Peptídeo	Tratamento	Grupo KOG
							QSAPCVLFFDELDSIATQR SPISKDVDLAALAR		
A0A371F0K4	Chaperonin CPN60-2, mitochondrial (Fragment)	134	4	5,99	61712	Scaffold	NVVIEQSFGGPK AGIIDPLKVIR	T0	O
W0TSA0	Chitinase	126	9,9	5,91	35706	Scaffold	DNFNQMLKHR AIGVDLLNPNPDLVATDPVISFK	T0	R
A0A1J7I5T3	Elongation factor 1-alpha	461	4,7	9,15	49614	Scaffold	STTTGHLIYK IGGIGTVPVGR	T0	J
A0A0L9VP84	Formate dehydrogenase, mitochondrial	48	4,8	5,61	43971	Scaffold	EGQLASQYR KGVLIANNAR ILILIR	T0	C
A0A151TV39	Fructose-bisphosphate aldolase	973	22	6,62	38930	Scaffold	LASINVENVETNR YAAICQENGLVPIVEPEILVDGPHDI NK GILAADESTGTIGKR EGGVLPGIKVDK KPWSLSFSFGR	T0	G
A0A151U689	Heat shock protein 83	417	8,6	4,98	80778	Scaffold	LDAQPELFIR ADLVNNLGTIAR GVVDSDDLPLNISR SGDEMTSLKDYVTR AVENSPFLER	T0	O
A0A151TDI0	Lactoylglutathione lyase	92	6,8	8,26	25843	Scaffold	VRIALAEK LIAWAKR SPLLLQMNPIHK	T0	O
A0A1S2XBN2	Lipoxygenase	157	3,5	5,85	97717	Scaffold	DTMNINALAR TITPKLQTLIDLSVIEILSR	T0	No hit
A0A371HC55	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment)	275	19	7,68	18445	Scaffold	IVMELFADTTTPR ALCTGEGKIGR FADENFIKK	T0	O
A0A1S2YLS1	Protein SLE2	521	26	5,53	10618	Scaffold	GGLSTMDKSGEER SLEAQEHLAEGRSK	T0	No hit
A0A151UB50	Pyruvate kinase	78	4,8	8,15	54785	Scaffold	TKIVCTLGPASR	T0	G

ID	Nome	Score	Cobertura	pI teórico	Massa	Abordagem	Peptídeo	Tratamento	Grupo KOG
							GLVPILSAASAR AALILVLTR		
A0A0L9UFJ2	Uncharacterized protein	364	3,4	5,88	41650	Scaffold (Blast P)	TLKGTFFYGNYKPR GTFYGNYKPR	T0	Q
A0A0L9T8U8	60S ribosomal protein L4-1	50	100	65	41,41	Scaffold (Blast P)	WGTGRAVSRI HGIRPGKGM	T0	A
A0A0L9TNS3	Uncharacterized protein	181	21	10,72	28145,75	Scaffold (Blast P)	AMIGQVAGGGRTEKPLLK ASGDYAIVISHNPDNDTSR GVVTDVIHDPGRGAPLAK	T0	J
A0A1J7I337	PREDICTED: actin, cytoplasmic 2 isoform X2	55,4	100	58,87	41,71	Scaffold (Blast P)	DLAGRDLTDA EVLFPQSMIG	T0	Z
A0A1J7GCZ1	Uncharacterized protein	391	20	8,79	13500	Scaffold (Blast P)	TVPNVFIGGK AKEIASSPVVVFSK	T0	O
A0A1J7FWG3	Uncharacterized protein	164	7	5,11	37994	Scaffold (Blast P)	AGSYAANVVIQR SGCTYPEKPDFH	T2	G
A0A371FRW2	Uncharacterized protein	166	8,3	6,06	28826	Scaffold (Blast P)	ALHIVGPKK LSFLYPATTGR	T0, T2	O

As proteínas foram classificadas de acordo com suas funções anotadas no Eukaryotic Orthologous Groups (KOG), recuperadas do UNIPROT. As categorias funcionais abordadas foram Classificação Funcional e Grupos (Figuras 3 e 4).



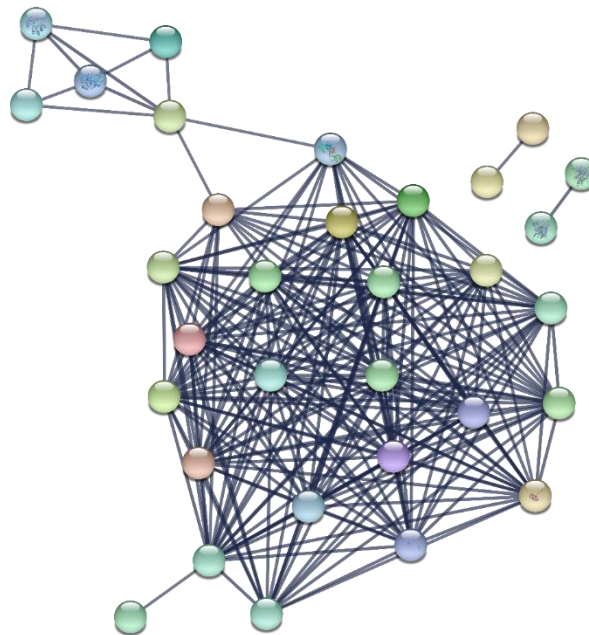
**Figura 3:** Classificações funcionais (%) das proteínas identificadas em sementes de *Melanoxylon brauna* pelo KOG.



**Figura 4:** Classificação funcional das proteínas identificadas em sementes de *Melanoxylon brauna* pelo KOG – Funções versus número de proteínas.

De acordo com a classificação funcional das proteínas identificadas (Figura 3), 41% pertencem ao processamento e armazenamento de informações celulares, 23% a sinalização celular, 26% relacionam-se ao metabolismo, 3% foram pouco caracterizadas e 7% não houve alinhamento das proteínas com o banco de dados (*no hit*). A análise de agrupamento no KOG (Figura 4) demonstrou que o maior grupo identificado (36%), pertence à tradução e à biossíntese de ribossomos, seguida da modificação pós transcricional e *turn over* de proteínas com 18% dos grupos. O metabolismo de carboidratos e transporte representa 14% dos grupos encontrados. Esses três grupos em conjunto correspondem a 68% das funções realizadas pelas proteínas nas condições deste trabalho.

A análise String (Figura 5) demonstrou que existe forte interação no agrupamento de 18 proteínas ribossomais e 4 não caracterizadas. Há interação em um pequeno grupo de 5 proteínas da glicólise/gliconeogênese. Quatro proteínas pertencente ao ciclo do ácido cítrico se mostraram desconexas das demais, mas com interações apenas entre si.



**Figura 5:** Análise de string de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas a diferentes temperaturas.

#### 4-Discussão

A expressão de proteínas encontradas em T0 (49), pode estar associada ao processo de maturação. Sendo assim, a semente se encontra com todas as reservas acumuladas durante seu desenvolvimento, nas diferentes fases de embriogênese, histodiferenciação, maturação, dispersão até a germinação (TAN et al., 2017). De acordo com XU (2012), um grupo de 10 proteínas relacionadas às peroxidases, síntese de amido, defesa contra patógenos, tolerância a dissecação (LEAs) e pós maturação foram encontradas em sementes de arroz sem embebição, relacionando-as à embriogênese. Por outro lado, foram identificadas proteínas ligadas à função energética, metabolismo de carboidratos e regulação hormonal, abundantemente presentes nas fases de dispersão, dormência e embebição de sementes. Pesquisas têm buscado entender os mecanismos da embriogênese através do processo biológico (MA et al., 2012, CANGAHUALA et al., 2014), expressão gênica (VESTMAN et al., 2012, GE et al., 2012) e alterações no perfil proteico expresso (ALMEIDA et al., 2012, RODE et al., 2012). A análise proteômica associada à embriogênese de culturas têm sido aplicadas em milho (SUN et al., 2013, VARHANIKAVA et al., 2014), arroz (XU et al., 2012, ZHANG et al., 2012), laranja (PAN et al., 2010), entre outras espécies de interesse econômico e, neste sentido, é necessário aplicar as mesmas técnicas frente ao estresse ambiental como a temperatura.

Segundo Bulgakov (2019), há correlação positiva com as mudanças no perfil proteico e os diferentes estresses sofridos pelas plantas como a temperatura acima da ótima (25 °C), associando o aumento de proteínas ao sistema antioxidante, regulação hormonal de etileno e síntese de proteínas precursoras de vias energéticas em diferentes etapas da formação até a dispersão de sementes de *Arabidopsis*. Ao caracterizar o perfil proteico de sementes ortodoxas de *Pinus occidentalis* verificou-se diferença na abundância de proteínas entre a fecundação e a maturação das sementes. Aquelas envolvidas em desenvolvimento estão associadas ao grão de pólen e são relacionadas à oxirredução, resposta ao estresse e expressão gênica. Enquanto as proteínas relacionadas à dissecação (LEA7-4 e LEA 7-2), e tolerância ao dano oxidativo, como catalase e metabolismo de carboidratos, estão presentes nas sementes de pinus (FRANCISCO et al., 2016).

A classificação funcional (Figura 3) demonstrou que 41% das atividades das proteínas homologas identificadas estão classificadas na categoria de processamento e armazenamento de informações, que envolvem atividades como tradução,



processamento e modificação do RNA, replicação, recombinação e reparo de DNA, assim como estrutura e dinâmica da cromatina durante a fase de mitose - necessárias para o crescimento da célula (SREEHASHA et al., 2016). A presença dessas proteínas em T0, T1 e T2 sugere que grande parte das atividades essenciais para manutenção da viabilidade e tolerância ao estresse de braúna ocorre indistintamente em todos tratamentos. A variação sazonal alterou a expressão do gene H3K4me3 responsável pela dormência (DOG1) em *Arabidopsis*, implicando menor tolerância à mudança de temperatura e regime hídrico (JOHNOVA et al., 2016). A menor expressão de genes ligados a cromatina (H2B), resultou na perda da dormência e, conseqüentemente, à morte de sementes expostas a condições desfavoráveis à germinação (ZANTEN et al., 2012). Da mesma forma, a expressão de genes H3K79me3 ligados a acetil-trasferase de histonas (Lys-79) está positivamente relacionada ao aumento da temperatura de 25 para 30 °C com finalidade de manutenção da dormência para sobrevivência das sementes (FOOTITT et al., 2015).

Cerca de 23% das proteínas homologas identificadas nesse estudo correspondem à categoria processamento e sinalização celular. Essa categoria está agrupada em atividades que correspondem ao controle celular, mecanismos de defesa, sinalização/modificação pós transducional, biossíntese de membrana e parede celular, citoesqueleto, transporte intracelular e secreção de vesículas. Sugerindo que a sensibilidade e a sinalização da elevação de temperatura são fatores importantes para a tolerância ao estresse. Pelo menos quatro sensores desse tipo de estresse são utilizados pelas células: canais de cálcio da membrana, histonas nucleares e chaperonas presentes no retículo endoplasmático e no citosol (MITTLER et al., 2012). De acordo com Wang (2017), esse aumento de temperatura levou a redução na sinalização celular e mudanças pós transcricionais em proteínas relacionadas à fotorrespiração (glutamina sintase, glicina desidrogenase), foto reação (foto sistema I e II, clorofila a/b), ciclo de Calvin (rubisco ativase, fosfoglicerato quinase, gliceraldeído-3-fosfato), síntese de ATP (ATP sintase, ATP sintase subunidades  $\beta$  e  $\gamma$ , proteína do citocromo C oxidase, plastocianina e ferridoxina-NAPH oxidase) e sinalização (fosfolipase C, ATP-ase de transporte de Ca, nucleosídeo difosfato quinase e proteínas de canais de cálcio). Tais alterações causam danos ao sistema fotossintético, sinalizador e reduz a tolerância ao estresse de plantas em elevadas temperaturas (WANG et al., 2017).

As atividades que envolvem a categoria metabolismo representaram 26% das funções celulares, identificadas exclusivamente em T1 e T2. Essas envolvem produção

e conversão de energia, metabolismo de carboidratos, aminoácidos, lipídios, nucleotídeos, transporte e catabolismo de metabolitos secundários. De acordo com Dong (2015), a atividade de metabolismo é evidente a partir da fase 2 do processo germinativo em que a hidrólise de reserva e a mobilização para o eixo embrionário é essencial como fonte de carbono e energia (via glicólise ou ciclo do TCA), para crescimento e emissão da raiz primária. As categorias *poorly characterized* e *no hit* (3 e 7% respectivamente), representaram proteínas que não foram caracterizadas ou que ainda não houve alinhamento das proteínas do banco de dados com a classificação funcional realizada no KOG.

As proteínas legumin-*like* (Q9SMJ4) são membros da família 11S ou 11-13S globulinas, presentes em várias espécies de Fabaceae, e representam umas das mais abundantes e principais fontes de reservas em sementes de dicotiledôneas (DURANTI et al., 1997; SHEORAN et al., 2005; FOLEY et al., 2015). Proteínas de reserva em sementes têm papel fundamental durante a germinação e o estabelecimento de plântulas, sendo fonte de aminoácidos e nitrogênio (YACOUBI et al., 2011). Esses aminoácidos são destinados ao desenvolvimento do eixo embrionário e utilizados para síntese de outras proteínas estruturais e enzimas após a fase de embebição das sementes. (TAN et al., 2013). A braúna apresenta decréscimo no teor de compostos de reserva durante o processo germinativo em 25 °C, porém, em 30 e 35 °C esse declínio é mais acentuado, levando à rápida hidrólise de compostos de reservas das sementes quando submetidas a estresse térmico (ATAIDE et al., 2017).

O processo germinativo é um evento complexo e requer grande quantidade de energia (NONOGAKI et al., 2010, WEITBRECHT et al., 2011). Os resultados deste trabalho apontam que as proteínas homologas frutoquinase 2 (I1M561) e gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (V7D036) estão presentes nos três tratamentos, sugerindo que essas proteínas podem estar diretamente relacionadas à via da glicólise ou a via da pentose fosfato e e à hidrólise de compostos de reserva, como o amido. Essas proteínas estão envolvidas na produção de energia e na geração de estruturas de carbono. A presença de frutoquinase (YANG et al., 2007, HE et al., 2011), frutoquinase-1 (SANO et al., 2012), frutoquinase-2 (KIM et al., 2009) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (KIM et al., 2009) foram observadas em sementes de *Oryza sativa* durante a germinação. Nas sementes de braúna houve redução dos teores de amido e elevação dos açúcares totais durante o processo germinativo em temperaturas de 25 e 30 °C,

sugerindo a mobilização de reservas dos cotilédones para geração de energia ao eixo embrionário utilizando a rota da glicólise (ATAIDE et al., 2017).

A malato desidrogenase (A0A151SWU6) é uma das enzimas do ciclo de Krebs que catalisa a conversão do malato em oxalacetato (usando NAD<sup>+</sup>). A piruvato carboxilase converte o piruvato em oxalacetato na mitocôndria. O oxalacetato é reduzido pela malato desidrogenase a malato, que depois atravessa a membrana mitocondrial. Em seguida, o oxalacetato é oxidado pela malato desidrogenase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase converte o oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, que age como fonte de energia usando o GTP como doador de fosfato. A piruvato quinase (A0A151UB50) é uma enzima que participa da décima etapa da glicólise, catalisando a transferência de um grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para o ADP, gerando uma molécula de piruvato e uma de ATP. A presença de ATP dependente chaperone (A0A072UQA8), também estão envolvidas na síntese de novo e no enovelamento de proteínas da via glicolítica e gliconeogênese das sementes.

A nucleosídeo difosfato quinase (A0A371E6Z3) é uma proteína inter membrana mitocondrial. Ela desempenha papel de reduzir o GTP a GDP com auxílio da proteína transmembrana translocase. A enzima succinil-CoA sintetase converte succinil-CoA em succinato nas cristas mitocondriais, gerando o substrato para geração de energia do ciclo de Krebs (YE et al., 2016). Essa proteína apresenta-se conservada em todos os grupos de plantas, principalmente por estarem ligadas a transformação de proplastídeos fotossintéticos em cloroplastos ativos, sendo essencial para desenvolvimento de cloroplastos e seu funcionamento. Além disso, mantêm a regulação de nucleosídeo trifosfato e nucleosídeo difosfato celular e medeia indiretamente o balanço de fitocromos (WANG et al., 2016). Logo, a presença dessas proteínas demonstra a geração de energia, mas também todo o preparo fotossintético que a semente reorganiza próximo a emissão da radícula e próximo da emissão de folhas cotiledonares da braúna.

A presença e abundância de proteínas estruturais como tubulin beta chain (A0A2K3N8N3), elongation factor alpha (A0A1J715T3) e cell division cycle protein (A0A151SGI9) ocorrem indistintamente em T0, T1 e T2, sugerindo que a formação tubulina age como precursor da protrusão radicular durante a germinação assim como a preparação para alongamento celular, estruturando e mantendo a homeostase da célula em crescimento (LIU et al., 2014). Os mesmos resultados foram encontrados com *A. thaliana* embebidas por um dia, em que tubulina  $\alpha$ -3,5 (GALLARDO et al., 2002, RAJJOU et al., 2006), tubulina  $\alpha$ -2, 4 e tubulina  $\beta$ -2 (GALLARDO et al., 2002)

apresentaram incremento em condições de osmocondicionamento, atuando na estrutura, manutenção e preservando a integridade da parede celular.

O grupo das proteínas do ciclo de divisão celular que englobam as CDKs (CKS1, CYCA1, CDKA1), *heat shock* (HSP1) e auxinas (ácido 3-indoloacético, ácido 1-naftalenoacético, ácido 3-indol-bitirico e ácido 2,4-diclorofenoxiacético) desempenham papéis no desenvolvimento da raiz primária, proteção ao dano causado pelo crescimento e manutenção das células. A diferença em expressão de genes e abundância de proteínas ligadas ao ciclo celular foi demonstrada em sementes de *Zea mays* durante a germinação, com aumento de HSP e CKDs pelas auxinas em condições de temperaturas ótimas e elevadas (CRUZ et al., 2015). Esses resultados indicam que a presença de proteínas nos T1 e T2 demonstram o estímulo à arquitetura da raiz primária pelas auxinas assim como sua proteção durante a germinação de braúna, que ocorre em 72 h.

A actina (Q96440), cumpre papel importante na morfogênese das células das plantas, envolvendo o transporte de organelas, vesículas, membranas de células componentes da parede como pelos radiculares, tricomas e tubos polínicos (LI et al., 2005). Tal como a iniciação rápida da proliferação, expansão e diferenciação celular, que são fundamentais para o crescimento das plantas (KANDASAMY et al. 2001). Ao avaliarem a expressão conservada de actina em *Arabidopsis*, verificaram variabilidade na atividade da ACT1-GUS em tecidos vasculares jovens (AN et al., 1996). Ao analisarem a expressão da actina (GhACT) em *Gossypium hirsutum*, Li et al. (2005) verificaram maior atividade na fibra, especialmente na fase de alongação das células.

A actina é conhecida em níveis de expressão por aumentar a exposição de auxinas (KANDASAMY et al., 2001). O controle da germinação das sementes e o crescimento da raiz envolve hormônios, como ácido abscísico e ácido giberélico para germinação e também auxina e citocinina para o crescimento da raiz (LOVEGROVE et al., 2000 e RASHOTTE et al., 2000). Li et al. (2005) propõem que expressões funcionais especializadas de genes que codificam para actina são necessários para o desenvolvimento adequado das células e podem refletir a evolução divergente no desenvolvimento da planta. Dessa forma, a presença de actina em sementes de braúna é explicado pela proximidade da protrusão da raiz primária em 72 h, assim como pela ativação das auxinas.

A germinação é um processo por si só estressante para as sementes (KIM et al., 2009). Logo, a presença de proteínas como heat shock 83 (A0A151U689) e heat shock

70 kDa (A0A152YP37) cumprem papel de defesa durante todo processo germinativo. O grupo das heat shock protein (HSPs) age como chaperonas moleculares, reparando e auxiliando no enovelamento de proteínas e evitando o dano por estresse (SUN et al., 2002). Esse grupo de proteínas pode ocorrer em todas as fases de processo germinativo, devido ao estresse causado pela rápida hidratação das células durante a embebição até o rompimento do tegumento (HUANG et al., 2012). Neste trabalho identificou-se a presença de HSP em T1 e T2, na medida em que a temperatura aumentou, elevando-se a abundância e a atividade de proteínas contra o estresse térmico na célula. Esses dados se correlacionam com a presença de tubulina em todos tratamentos aplicados, onde a HSP atua na proteção celular e a tubulina confere rigidez e forma da célula para os eventos metabólicos.

Identificou-se proteínas homólogas do sistema antioxidativo como a superóxido dismutase (A0A1S3TL68) e a lipoxigenase (A0A1S2XBN2), que atuam na redução do dano oxidativo. Essas proteínas auxiliam na redução dos danos causados pela degradação oxidativa de ácidos graxos e altos níveis de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), durante todo processo germinativo. Trabalhos com lipoxigenases em soja têm demonstrado que as isoenzimas de LOX apresentam função de síntese de hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados. Esses agem catalisando a incorporação do oxigênio molecular que contém o grupo 1,4-pentadieno, atuando assim como intermediários-chaves de várias rotas metabólicas, além de agir como reguladora sob estresse biótico e abiótico (CORDEIRO et al., 2018). Além disso, a peroxidase pode ter papel na modulação de  $H_2O_2$  via sistema antioxidante em resposta ao estresse abiótico (QIAO et al., 2009). A lipoxigenase também atua na manutenção baixa dos níveis de  $H_2O_2$  (GORECKA et al., 2005; CLARK et al., 2012). A abundância dessas proteínas nos T1 e T2 está de acordo com o que foi descrito por Santos (2017), uma vez que foi verificada incrementos de  $H_2O_2$  em 48 h de embebição, nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C.

A quitinase (W0TSA0) e a classe I quitinase (P94084) foram identificadas apenas em T0, ou seja, sem embebição das sementes. As quitinases são um grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na quebra da ligação  $\beta$ -1-4-N acetil-D-glicosamina de quitina e estão associadas à resistência a patógenos como fungos (SHARMA et al., 2012) e ataque de insetos (DOWD et al., 2018). Pesquisas sugerem que a menor expressão de quitinases podem estar relacionadas à maior suscetibilidade de sementes a pragas (*Callosobruchus maculatus*) e menor longevidade das sementes de feijão ao

armazenamento (SILVA et al., 2017). A presença de quitinase apenas em T0 corresponde ao mecanismo de defesa durante o repouso fisiológico das sementes de braúna, uma vez que não foi durante o processo germinativo.

Nos T1 e T2 ocorreram abundância de proteínas eukaryotic initiation factor 4A-10–Rubisco- (A0A151T9F2), que é a principal enzima da fotossíntese com capacidade oxigenativa e carboxilativa (KUMAR et al., 2019). Essa enzima é responsável pela utilização de CO<sub>2</sub> atmosférico como doador de carbono e O<sub>2</sub> como acceptor de elétrons para produção de açúcares nas plantas (SCAFARO et al., 2019). A regulação da rubisco é feita via substrato pela utilização da ribulose-1-5-bifosfato (RuBP) ou via rubisco activase (RCa) como fonte de energia para quebra de compostos de reserva usados na germinação de plantas (SHIVHARE et al., 2017). Em temperaturas elevadas a rubisco é limitada pela maior reação enzimática de RCa ou pela disponibilidade de substrato presentes até certo nível máximo, de forma que, após esse limite, não ocorre incremento. Em *Triticum aestivum* (SCAFARO et al., 2019), *Oryza sativa* (SCAFARO et al., 2016) e *Agave tequilana* (SHIVHARE et al., 2017) foram relatadas que a termorregulação de RCa pode auxiliar na manutenção da capacidade fotossintética das primeiras folhas cotiledonares e assim estabelecimento e sobrevivência de cultivares quando colocadas em temperaturas próximas 35 °C. Porém, em casos em que a termorregulação é comprometida com redução da atividade de RCa, a germinação e o estabelecimento de espécies não tolerantes é prejudicado, principalmente por danos relacionados a EROs (SCAFARO et al., 2019). Assim, a presença de proteínas termorreguladoras indica a tolerância da semente quando submetida em temperatura alternada (45 e 25 °C) conforme descrito por Santos (2017).

Foram identificadas as proteínas ribossomais 40S, relacionadas ao metabolismo proteico. Essas são componentes do ribossoma e fazem parte de um grande complexo de ribonucleoproteínas responsáveis pela síntese proteica na célula (RAMAKRISHNAN et al., 1998). Esse grupo ribossomal tem característica citoplasmática e pertencente à família S24E. Participam da regulação da transcrição de genes e da regulação de células de proliferação e apoptose, através de funções extra-ribossômicas (HSU et al., 2014). Syversen e Kaur (2012) sugerem alterações conformacionais em proteínas ribossômicas ocasionadas pelo estresse térmico, indicando sua tolerância ao estresse até certos níveis. Esse grupo de proteínas tem funções essenciais no metabolismo, divisão celular, síntese e regulação a estresse abiótico em sementes de *Ricinus comunis* (WANG et al., 2019), logo são indispensáveis para manutenção de estruturas, organelas e síntese de novo de

proteínas em sementes como a braúna. Esse grupo de proteínas ribossomais é visualmente descrito na figura 5. Percebe-se uma forte interação provavelmente destinada a síntese de proteínas devido ao processo germinativo das sementes de *M.braúna*.

De acordo com TUC (2017), o conhecimento sobre proteínas tem crescido rapidamente em todo o mundo, elucidando os processos biológicos. Mas são necessários estudos e buscas por caracterizações de proteínas não descritas, de forma a melhorar a utilidade e eficiência em benefícios de todos. Dessa forma, a baixa quantidade de proteínas alinhadas com o banco de dados disponíveis indicam que ainda existem grupos de proteínas que precisam ser estudadas e incluídas no banco de dados. Ressaltando a necessidade de informações e a importância de estudos com espécies florestais como a braúna.

Nota-se a integração de diferentes mecanismos envolvidos durante a germinação. Para quitinases, HSPs, actinas, legumins em condições livres de estresse, a regulação é coordenada por mecanismos pré-formados. Após o fornecimento de energia, mobilização de reservas, a fase de transição entre semente e plântula é mediada pela atividade de enzimas do sistema antioxidante. Já sob estresse térmico, rubisco, tubulinas, cromatinas, fatores de divisão celular, HSPs, superóxidos, lipoxigenase, malato desidrogenase, frutoquinases, fosfoglicerato quinase, gliceraldeído-3-fosfato fazem a regulação de processos como a divisão celular, fornecimento de energia, mobilização de reservas, sinalização para controle dos níveis de EROs e manutenção do redox celular sob estresse. Em algum momento destas rotas ocorre a interrupção de um dos seus reguladores, evitando que o embrião cresça em condições de estresse.

## **5-Conclusões**

Houve diferença em número e diversidade das proteínas identificadas nas sementes submetidas a 25 e 40 °C.

Foram identificadas 69 proteínas em sementes de braúna.

A presença de proteínas restritas ao tratamento T0 (sem embebição) podem estar relacionadas a proteção e processo germinativo inicial da semente.

Em 25°C as proteínas identificadas de forma mais expressiva apreñsetam correlação com a síntese de ATP, sistema antioxidante, proteção celular e síntese de novo.

As proteínas identificadas no tratamento de 40 °C podem estar correlacionadas com a integração entre as vias ligadas ao estresse oxidativo, sistema antioxidante, manutenção celular.

## 6-Referências bibliográficas

AGRAWAL, P.K.; BABU, B.K.; SAINI, N. Omics of model plants. In: BARH, D.; KHAN, M.S.; DAVIES, E. **Plant Omics: The Omics of Plant Science**, Springer, India, 2015, p.1-32.

ALMEIDA, A.M.; PARREIRA, J.R.; SANTOS, R.; DUQUE, A.S.; FRANCISCO, R. A proteomics study of the induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* using 2DE and MALDI-TOF/TOF. **Physiol. Plant**, v.146, n.2, p.236-249, 2012.

ALTSCHUL, S.F.; MILLER, G.W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403–10, 1990.

AN, Y.; HUANG, S.; MCDOWELL, J.M.; MCKINNEY, E.C.; MEAGHER, R.B. Conserved expression of the *Arabidopsis* ACT1 and ACT3 actin subclass in organ primordial and mature pollen. **The Plant Cell**, v.8, n.1, p.15-30, 1996.

ATAIDE, G.G.A.; BORGES, E.E.L.; PICOLI, E.A.T.; FILHO, A.T.L.; FLORES, A.V. Alterações nas reservas de sementes de *Melanoxylon brauna* (Fabaceae Caesalpinoideae) durante a germinação em diferentes temperaturas. **Agrária**, v.12, n.3, p.372-379, 2017.

ATAÍDE, G.M.; BORGES, E.E.L.; FLORES, A.V. Electrical conductivity test in *Melanoxylon brauna* Schott. seeds (Fabaceae-Caesalpinoideae). **Revista de Agricultura Neotropical**, v.5, n.4, p.7-12, 2018.

BALBUENA, T.S.; JO, L. PIERUZZI, F.P.; DIAS, L.L.C.; SILVEIRA, V.; SANTACATARINA, C.; JUNQUEIRA, M.; THELEN, J.J.; SHEVCHENKO, A.; GLOH, E.I.S. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v.72, v.5, p.302-311, 2011.



BEGUN, S.B.; KUDO, K.; RAHMAN, M.H.; NAKABA, S. Climate change and the regulation of wood formation in trees by temperature. **Trees**. v.32, n.1, p.3-15, 2018.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.2, p.248–254, 1976.

BRASIL, MMA – Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa nº 6, de 23 de dezembro de 2008. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**.

BULGAVOK, V.P.; WU, H.C.; JINN, T.L. Coordination of ABA and chaperone signaling in plant stress responses. **Cell Press**, v.24, n.7, p.636-651, 2019.

CANGAHUALA, G.C.I.; SILVEIRA, V.; CAPRESTANO, C.A.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M.P. Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic embryogenesis of *Acacia sellowiana*. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant** v.50, n.2, p.166-175, 2014.

CERRI, C.E.P.; CERRI, C.C.; MAIA, S.M.F.; CHERUBIN, M.B. Reducing amazona deforestation through agricultural intensification in the cerrado for advancing food security and mitigating climate change. **Sustainability**. v.10, n.4, p. 989, 2018.

CHIBANI, K.; ALI-RACHEDI, S.; JOB, C.; JOB, D.; JULLIEN, M.; GRAPPIN, P. Proteomic analysis of seed dormancy in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.142, n.4, p.1493- 1510, 2006.

CLARK, G.B.; MORGAN, R.O.; FERNANDEZ, M.P.; ROUX, S.J. Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles. **New Phytologist**, v.196, n.3, p.695-712, 2012.

COCHRANE, A. Can sensitivity to temperature during germination help predict global warming vulnerability? **Seed Science Research**, v.26, n.1, p.14-29, 2016.

CORDEIRO, E.G.; SILVA, C.R.; CORDEIRO, G.; JUNIOR, E.R.S.; OLIVEIRA, M.G.A. Resposta da soja, com e sem supressão de lipoxigenases, às injúrias mecânicas e do percevejo-marrom. **Amazonian**, v.61, n.1, 2018.

- CRUZ, E.M.; RAMIREZ, E.G.; RAMOS, J.M.V.; CRUZ, H.R.; BUCIO, J.L. Auxins differentially regulate root system architecture and cell cycle protein levels in maize seedlings. **Plant Physiology**, v.176, n.15, p.147-156, 2015.
- DAWSON, T.P.; JACKSON, S.T.; HOUSE, J.I.; PRENTICE, I.C.; MACE, G.M. Beyond predictions: biodiversity conservation in a changing climate. **Science**, v.332, n.6025, p.53-58, 2011.
- DIAS, L.L.C.; BALBUENA, T.S.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; SCHEVCHENKO, A.; FLOH, E.I.S. Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: a recalcitrant seed species. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.22, n.1, p.23-33, 2010.
- DONG, K.; ZHEN, S.; CHENG, Z.; CAO, H.; GE, P.; YAN, Y. Proteomic analysis reveals key proteins and phosphoproteins upon seed germination of wheat (*Triticum aestivum*). **Plant Science**, v.6, n.1, p.1-14, 2015.
- DOWD, P.F.; NAUMANN, T.A.; PRICE, N.P.J.; JOHNSON, E.T. Identification of a maize (*Zea mays*) chitinase allele sequence suitable for a role in ear rot fungal resistance. **Agri Gene**, v.7, n1, p.15-22, 2018.
- DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**. v.53, p.31-45, 1997.
- FAO, 2016. **Panorama da segurança alimentar e nutricional**. Sumário executivo: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. Santiago, 2016.
- FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy Sustainable Development**, v.29, n.1, p.185-212, 2009.
- FERRERO, R.; LIMA, M.; GONZALEZ-ANDUJAR, J.L. Crop production structure and stability under climate change in South America. **Annals Applied Biology**. v.172, n.1, p.65-73, 2017.
- FLORES, A.V.; BORGES, E.E.L.; GUIMARÃES, V.M.; ATAÍDE, G.M.; CASTRO, R.V.O. Germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* schott em diferentes temperaturas. **Revista Árvore**, v.38, n.6, p.1147–1154, 2014.

FOLEY, R.C.; JIMENEZ-LOPEZ, J.C.; KAMPHUIS, L.G.; HANE, J.K.; MELSER, S.; SINGH, K.B. Analysis of conglutin seed storage proteins across lupin species using transcriptomic, protein and comparative genomic approaches. **BMC Plant Biology**, v.15, n.1, p.106-118, 2015.

FOOTITT, S.; MULLER, K.; KERMODE, A.R.; SAVAGE, W.F. Seed dormancy cycling in *Arabidopsis*: chromatin remodeling and regulation of DOG1 in response to seasonal environmental signals. **Plant**, v.81, n.3, p.413-425, 2015.

FRANCISCO, L.R.; RODRIGUEZ, M.C.R.; CERRILO, R.M.N.; MININO, V.; PERDOMO, O.; NOVO, J.V.J. Characterization of the orthodox *Pinus occidentalis* seed and pollen proteomes by using complementary gel based and gel free approaches. **Proteomics**, v.143, n.1 p.382-389, 2016.

GALLARDO, K.; JOB, C.; GROOT, S.P.C. Proteomics of *Arabidopsis* seed germination. A comparative study of wild type and gibberellin deficient seeds. **Plant Physiol**, v.129, n.2, p.823-837, 2002.

GALLARDO, K.; JOB, C.; GROOT, S.P.C.; PUYPE, M.; DEMOL, H.; VANDEKERCKHOVE, J.; JOB, D. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. **Plant Physiol**, v.126, n.2, p.835-848, 2001.

GE, X.X.; CHAI, L.J.; LIU, Z.; WU, X.M.; DENG, X.X.; GUO, W.W. Transcriptional profiling of genes involved in embryogenic, non-embryogenic calluses and somatic embryogenesis of Valencia sweet orange by SSH-based microarray. **Plant**, v.236, n.4, p.1107-1124, 2012.

GILLILAND, L.U.; PAWLOSKI, L.C.; KANDASAMY, M.K.; MEAGHER, R.B. *Arabidopsis* actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. **Plant**, v.33, p.319-328, 2003.

GORECKA, K.M.; KONOPKA-POSTUPOLSKA, D.; HENNIG, J.; BUCHET, R.; PIKULA, S. Peroxidase activity of AnnAt1 from *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.336, n.3, p.868-875, 2005.

GUPTA, D.B.; SHEKHAR, S.; AGRAWAL, L. Plant Proteomics: Technologies and Applications. In: BARH, D.; KHAN, M. S.; DAVIES, E. **Plant Omics: The Omics of Plant Science**, Springer, India, 2015, p.213-256.

HE, D.; HAN, C.; ANDYANG, P. Gene expression, profile changes in germinating rice. **Integrative Plant Biololy**, v.53, n.10, p.835–844, 2011.

HSU, H.H.; KUO, W.W.; JU, D.T.; YEH, Y.L.; TU, C.C.; TSAI, Y.L.; SHEN, C.Y.; CHANG, S.H.; CHUNG, L.C.; HUANG, C.Y. Estradiol agonists inhibit human LoVo colorectal-cancer cell proliferation and migration through p53. **World Journal Gastroenterology**, v.20, n.44, p.16665-16673, 2014.

HUANG, H.; MØLLER, I.M.; SONG, S.Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. **Proteomics** v.75, n.4, p.1247–1262, 2012.

HUTYRA, L.R.; MUNGER, J.W.; NOBRE, C.A.; SALESKA, S.R.; VIEIRA, S.A. Climatic variability and vegetation vulnerability in Amazônia. **Geophysical Research Letters**, v.32, n.24, p.1-4, 2005.

IPCC, 2018. **Intergovernmental panel on climate change: Global warming of 1,5 °C**. Summary of policymakers, 2018.

JOHNOVA, P.; SKALAK, J.; FERNANDEZ, I.S.; BZOBOHATY, B. Plant responses to ambiente temperature fluctuations and water limiting conditions: a proteome wide perspective. **Proteins Proteomics**, v.1864, n.8, 2016.

JOSÉ, A.C.; SILVA, E.A.A.; DAVIDE, A.C.; TOOROP, P. Protein expression upon desiccation and imbibition of *Magnolia ovata* seeds. **Brazilian Archives Biology Technology**, v.54, n.3, p.465-476, 2011.

KANDASAMY, M.K.; GILLILAND, L.U.; MCKINNEY, E.C.; MEAGHER, R.B. One plant actin isovariant, ACT7, induced by auxin and required for normal callus formation. **Plant Cell**, v.13, n.7, p. 1541-1554, 2001.

KELLER, A.; NESVIZHSKII, A.I.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical Chemistry**, v.74, n.20, p.5383–5392, 2002.

KIM, S.T.; WANG, Y.M.; KANG, S.Y.; KIM, S.G. Developing rice embryo proteomics reveals essential role for embryonic proteins in regulation of seed germination. **Proteome Research**, v.8, n.7, p.3598-3605, 2009.

KOSOVÁ, K. VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plants tress response. **Proteomics**, v.74, n.8, p.1301–1322, 2011.

KUMAR, R.R.; GOSWAMI, S.; DUBEY, K.; SINGH, K.; SINGH, J. Rubisco activase – a catalytic chaperone involved in modulating the Rubisco activity and heat stress tolerance in wheat. **Plant Biochemistry Biotechnology**, v.28, n.1, p.63-75, 2019.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680–685, 1970.

LI, X.; FAN, X.; WANG, X.; CAI, L.; YANG, W. The cotton ACTIN1 gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. **Plant Cell**, v.17, n.3, p. 859-875, 2005.

LIEBLER, D.C.; HAM, A.J.L. Spin filter-based sample preparation for shotgun proteomics. **Nature Methods**, v.6, n.11, p.785, 2009.

LIU, S.J.; XU, H.H.; WANG, W.Q.; LI, N.; WANG, W.P. A proteomic analysis of rice seed germination as affected by high temperature and ABA treatment. **Physiologia Plantarum**, v.154, n.1, p.142-161, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, 5th ed.; Instituto Platarum: Nova Odessa, Brasil, 2008; 368p.

LOVEGROVE, I.I.; HOOLEY, I.I. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. **Trends Plant Science**, v.5, n.3, p. 102-110, 2000.

MA, L.; XIE, L.; LIN, G.; JIANG, S.; CHEN, H.; T, LI.; J, TAKÁC. Histological changes and differences in activities of some antioxidant enzymes and hydrogen peroxide content during somatic embryogenesis of Musa AAA cv. Yueyoukang 1, **Scientia Horticulture** v.144, n.1, p.87-92, 2012.

MARCHLER-BAUER, A.; PANCHENKO, A.R.; SHOEMAKER, B.A.; THIESSEN, P.A. CDD: A database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.1, p.281–283, 2002.

- MARTINS, R.S.; JOSÉ, A.C.; FARIA, J.M.R.; OLIVEIRA, L.C. Proteomic analysis of osmoprimed and heat shock treated *Eucalyptus urophylla* seeds. **Trees**, v.31, n.1, p.313-324, 2017.
- MITTLER, R.; FINKA, A.; GOLOUBINOFF, P. How do plants feel the heat. **Trends Biochemical Sciences**, v.37, n.3, p.118–125, 2012.
- NEALE, D. B.; KREMER, A. Forest tree genomics: growing resources and applications. **Nature Reviews Genetics**, v.12, n.2, p.111-122, 2011.
- NESVIZHSKII, A.I.; KELLER, A.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.75, n.17, p.4646–4658, 2003.
- NONOGAKI, H. BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination – Still a mystery. **Plant Science**, v.179, n.6, p.574-581, 2010.
- OLIVEIRA, D.M.; LIMA, A.T.; ROCHA, E.A.; MEIADO, M.V. O aumento da temperatura reduz a tolerância ao estresse hídrico na germinação de sementes de *Perekia grandifolia* (Cactaceae)? **Gaia Scientia**, v.11, n.4, p.26-36, 2017.
- PAN, Z.; ZHU, S.; GUAN, R.; DENG, X. Identification of 2,4-D-responsive proteins in embryogenic callus of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) following osmotic stress. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v.103, n.2, p.145-153, 2010.
- PBMC, 2017 - Painel brasileiro de mudanças climáticas (Relatório Mudanças Climáticas e Cidades). Disponível em: [http://www.pbmc.coppe.ufrj.br/documentos/Relatorio\\_UM\\_v10-2017-1.pdf](http://www.pbmc.coppe.ufrj.br/documentos/Relatorio_UM_v10-2017-1.pdf), acessado em 16/07/2019.
- PENEDO, T.S.A.; MORAES, M.A.; BORGES, R.A.X.; MOURENZA, D.; JUDICO, D.M.; MARTINELLI, G. Considerations on extinct species of Brazilian flora. **Rodriguésia**, v.66, n.3, p.711-715, 2015.
- QIAO, D. L.; KE, C. L.; HU, B.; LUO, J. G.; YE, H.; SUN, Y. Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. **Carbohydrate Polymers**, v.78, n.2, p.199–204, 2009.

- RAJJOU, L., HUGUET, R., ROBIN, C., BELGHAZI, M. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. **Plant Physiology**, v.141, n.3, p.910-923, 2006.
- RAMAKRISHNAN, V.; WHITE, S.W. Ribosomal protein structures: insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome. **Trends Biochemical Sciences**, v.23, n.6, p.208-212, 1998.
- RASHOTTE, A.M.; BRADY, S.R.; REED, R.C. ANTE, S.J.; MUNDAY, G.K. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.122, n.2, p. 481-490, 2000
- RESJÖ, S.; BRUS, M.; ALI, A.; MEIJER, H.J.G.; SANDIN, M.; GOVERS, F. Proteomic analysis of phytophthora infestans reveals the importance of cell wall proteins in pathogenicity. **Molecular Cellular Proteomics**, v.16, n.11, p.1958–1971, 2017.
- RODE, C.; LINDHORST, K.; BRAUN, H.P.; WINKELMANN, T. From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*. **Planta**, v.235, n.5, p.995-1011, 2012.
- S. BAGINSKY.; L. HENNIG.; P. ZIMMERMANN.; W. GRUISSEM. Gene expression analysis, proteomics, and network discovery. **Plant Physiology**, v.152, n.2, p.402–410, 2010.
- SANO, N.; PERMANA, H.; KUMADA, R.; SHINOZAKI, Y.; TANABATA, T.; YAMADA, T.; HIRASAWA, T.; KANEKATSU, M. Proteomic analysis of embryonic proteins synthesized from long-lived mRNAs during germination of rice seeds. **Plant Cell Physiology**, v.53, n.4, p.687–698, 2012.
- SANTOS, M.M.; BORGES, E.E.L.; ATAIDE, G.M.A.; SOUZA, G.A. Germination of seeds of *Melanoxylon brauna* under heat stress: production of reactive oxygen species and antioxidante activity. **Forests**, v.8, n.11, p.405, 2017.
- SCAFARO, A.P.; BAUTSOENS, N.; BOER, B.; GALLE, A. A conserved sequence from adapted species improves Rubisco activase thermostability in wheat. **Plant Physiology**, v.180, n.3, p.19, 2019.

SCAFARO, A.P.; GALLE, A.; RIE, J.V.; SILVA, E.C.; SALVUCCI, M.; ATWELL, B.J. Heat tolerance in a wild *Oryza* species is attributed to maintenance of Rubisco activation by a thermally stable Rubisco activase homolog. **New Phytologist**, v.211, n.13, p.899-911, 2016.

SCHAFFER, A.A.; WOLF, Y.I.; KOONIN, E.V.; ARAVIND, L. IMPALA: matching a protein sequence against a collection of PSI-BLAST-constructed position-specific score matrices. **Bioinformatics**, v.15, n.12, p.1000–1011, 1999.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M.P. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Botany**, v.2012, ID217037, p.26, 2012.

SHEORAN, I. S.; OLSON, D. J.; ROSS, A. R.; SAWHNEY, V. K. Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. **Proteomics**, v.5, n.14, p.3752- 3764, 2005.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v.1, n.6, p.2856-2860, 2006.

SHIVHARE, D.; MUELLER-CAJAR, O. In Vitro characterization of thermostable CAM Rubisco Activase Reveals a Rubisco interacting surface loop. **Plant Physiology** v.174, n.3, p.1505-1516, 2017.

SILVA, M.J.J (b). **Análise proteômica de cristalino de *Felis catus***. 2018. 95.f. (Dissertação de mestrado em Bioquímica Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.

SILVA, N.C.M.; CONCEIÇÃO, J.G.C.; VENTURY, K.E.; SÁ, L.F.R.; OLIVEIRA, E.A.G. Soybean seed coat chitinase as a defense protein against the stored product pest *Callosobrunchus maculatus*. **Society Chemical Industry**, v.74, n.6, p.1149-1456, 2018.

SILVA, R.B.; MATOS, V.P.; FARIAS, S.G.G.; SENA, L.H.M.; SILVA, D.Y.B.O. Germinação e vigor de plântulas de *Parkia platycephala* em diferentes substratos e temperaturas. **Ciência Agrônômica**, v.48, n.1, p.142-150, 2017.



SMOLIKVA, G.; LUKASHEVA, E.; STOLYARENKO, G.M.; BILOVA, T.; SOBOLEVA, A.; TSAREV, A.; PODOLSKAYA, E.; ZHUKOV, V. Discovering seed proteome: challenges and perspectives. **Preprints**, v.1, 2018.

SREEHARSHA, R.V.; MUDALKAR, S.; SINGHA, K.; REDDY, A.R. Unravelling molecular mechanisms from floral initiation to lipid biosynthesis in a promising biofuel tree species, *Pongamia pinnata* using transcriptome analysis. **Scientific Reports**, v.6, n.34315, 2016.

SUN, L.; WU, Y.; ZOU, H.; SU, S.; LI, S.; SHAN, X.; XI, J.; YUAN, Y. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays* L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v.113, n.1, p.103-119, 2013.

SUN, W.; MOTANGU, M.V.; VERBRUGGEN, N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. **Biochemical Biophysical Acta** v.1577, n.1, p.1-9, 2002.

SYVERSEN, T.; KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. **Trace Elements Medicine Biology**, v.26, n.4, p.215-226, 2012.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v.43, n. D1, p. D447–D452, 2015.

TAN, B.C.; LIM, Y.S.; LAU, S.E Proteomics in comercial crops: an overview. **Proteomics**, v.169, n.3, p. 176-188, 2017.

TAN, L.; CHEN, S.; WANG, T. DAI, S. Proteomic insights into seed germination in response to environmental factors. **Proteomics**, v.13, n.12, p.1850-1870, 2013.

TATUSOV, R.L.; FEDOROVA, N.D.; JACKSON, J.D.; JACOBS, A.R.; KIRYUTIN, B.; KOONIN, E.V. The COG database: An updated vesion includes eukaryotes. **BMC Bioinformatics**, v.4, n.41, p.1–14, 2003.

TAVARES, P.S.; GIAROLLA, A.G.; CHOU, S.C.; SILVA, A.J.P.; LYRA, A.A. Climate change impacto on the potencial yield in southeast Brazil. **Regional Environmental Change**, v.18, n.3, p.873-883, 2018

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D158–D169, 4 jan. 2017.

TRINDADE, B.M.C.; REIS, R.S.; VALE, E.M.; CATARINA, C.S.; SILVEIRA, V. Proteomics analysis of the germinating seeds of *Cariniana legalis* (Meliaceae): an endangered specie of the brazilian atlantic rainforest. **Brazilian Journal Botany**, v.41, n.1, p.117-128, 2018.

TUC, The Uniprot Consortium. Uniprot: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v.45, n.1, p.158-169, 2017.

VARHANÍKOVÁ, M.; UVACKOVA, L.; SKULTETY, L.; PRETOVA, A.; OBERT, B.; HAJDUCH, M. Comparative quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli in maize suggests the role of oxylipins in plant totipotency. **Proteome**, v.104, n.2, p.57-65, 2014.

VESTMAN, D.; LARSSON, E.; UDDENBERG, D.; CAIRNEY, J.; CLAPHAM, D.; SUNDBERG, E. Important processes during differentiation and early development of somatic embryos of Norway spruce as revealed by changes in global gene expression, **BMC Proceedings**, v.5, n.7, p.78, 2012.

WANG, W.Q.; SONG, B.Y.; DENG, Z.J.; WANG, Y.; LIU, S.J. Proteomic analysis of lettuce seed germination and thermoinhibition by sampling of individual seeds at germination and removal of storage proteins by polyethylene glycol fractionation. **Plant Biologists**, v.167 n.4, p.1332-1350, 2015.

WANG, X.; LI, M.; LIU, X.; ZHANG, L.; DUAN, Q.; ZHANG, J. Quantitative proteomic analysis of Castor (*Ricinus communis*) seeds during early imbibition provided novel insights into cold stress response. **Molecular Sciences**, v.16, n.20, p.355, 2019.

WANG, X.; OH, M.W.; SAKATA, K.; KOMATSU, S. Gel-free/label-free proteomic analysis of root tip of soybean over time under flooding and drought stresses. **Proteome**, v.130, n.1, p.42-45, 2016.

WANG, X.; XU, C.; CAI, X.; WANG, Q.; DAI, S. Heat responsive photosynthetic and signaling pathways in plants: insight from proteomics. **Molecular Sciences**, v.18, n.10, p.1-19, 2017.

WEITBRECHT, K.; MULLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: early seed germination. **Experimental Botany**, v.62, n.10, p.3289-3309, 2011.

WONG, P-F.; ABUBAKAR, S. Post-germination changes in *Hevea brasiliensis* seeds proteome. **Plant Science**, v.169, n.2, p.303-311, 2005.

XU, H.; ZHANG, W.; GAO, Y.; ZHAO, Y.; GUO, L.; WANG, J. Proteomic analysis of embryo development in rice (*Oryza sativa*). **Planta**, v.235, n.4, p.687-701, 2012.

YACOUBI, R.; JOB, C.; BELGHAZI, M.; CHAIBI, W.; JOB, D. Toward characterizing seed vigor in alfalfa through proteomic analysis of germination and priming. **Proteome Research**, v.10, n.9, p.3891-3903, 2011.

YANG, P.; LI, X.; WANG, X.; CHEN, H.; SHEN, S. Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. **Proteomics** v.7, n.18, p.3358–3368, 2007.

YE, W.; HU, S.; WU, L.; GE, C.; CUI, Y.; CHEN, P.; WANG, X.; XU, J. *White stripe leaf 12* (WSL12), encoding a nucleoside diphosphate kinase 2 (OsNDPK2), regulates chloroplast development and abiotic stress response in rice (*Oryza sativa*). **Molecular Breeding**, v.36, p.57, p.1-15, 2016.

ZANTEN, M.; CARLES, A.; LI, Y.; SOPPE, W.J.J. Control and consequences of chromatin compaction during seed maturation on *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling Behavior**, v.7, n.3, p.338-341, 2012.

ZHANG, J.; ZI, J.; WANG, Q.; LIN, L.; TONG, W.; BAI, X.; ZHAO, J. Proteomics study of rice embryogenesis: discovery of the embryogenesis-dependent globulins. **Electrophoresis**, v.33, n.7, p. 1129–1138, 2012.

### **Conclusões Gerais**

A faixa de temperatura ótima de germinação do cedro é 25 °C.

Em 35°C ocorre maior respiração, translocação de reservas, alterações na membrana plasmática e maior quantidade de exsudatos em cedro.

As sementes de cedro sofrem maior dano oxidativo quando em temperaturas de 30 e 35 °C.

Ocorre consumo do endosperma lateral e redução no teor de proteínas durante a germinação do cedro.

A elevação da temperatura é fator determinante para germinação de cedro.

A análise proteômica de braúna encontrou um perfil de 69 proteínas nas temperaturas avaliadas.

Destas as proteínas sem embebição estão relacionadas a proteção e processo germinativo inicial da semente. Em 25°C as proteínas presentes pertencem a síntese de ATP, sistema antioxidante, proteção celular e síntese de novo. As proteínas em 40 °C integram vias ligadas ao estresse oxidativo, sistema antioxidante, manutenção celular.