

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E LONGEVIDADE EM
SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* (L.) MERR.).**

BÁRBARA PANOFF VALÁRIO

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em Agronomia
(Agricultura).

BOTUCATU - SP

Agosto - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E LONGEVIDADE EM
SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* (L.) MERR.).**

BÁRBARA PANOFF VALÁRIO

Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU - SP

Agosto – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

V137e Valário, Bárbara Panoff, 1988-
Estudo da tolerância à dessecação e longevidade em sementes de soja (*Glycine max* (L.) MERR.) / Bárbara Panoff Valário - Botucatu : [s.n.], 2016
xi, 95 f. : fots. color., ils. color., grafs. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2016
Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva
Inclui bibliografia

1. Soja - Sementes - Viabilidade. 2. Sementes - Qualidade. 3. Soja - Fisiologia. 4. Proteínas. 5. Armazenamento. I. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ESTUDO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E LONGEVIDADE EM SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* (L.) MERR.)"

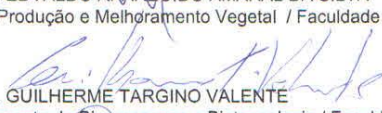
AUTORA: BÁRBARA PANOFF VALÁRIO

ORIENTADOR: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:



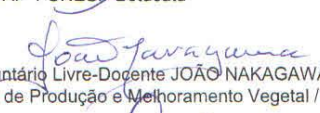
Prof. Dr. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA
Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu



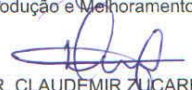
Prof. Dr. GUILHERME TARGINO VALENTE
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP



Prof. Dr. LUCIENE DELAZARI DOS SANTOS
CEVAP / UNESP Botucatu



Voluntário Livre-Docente JOÃO NAKAGAWA
Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu



PROF. DR. CLAUDEMIR ZUCARELI
Departamento de Agronomia / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Botucatu, 12 de agosto de 2016.

*"Troco o peso do conhecimento pela
leveza da sabedoria."*

Flavio Siqueira

Ao meu marido, Anderson, por toda paciência, amor e carinho oferecidos nesse período primordial de minha vida.

DEDICO

Aos meus pais, Ciro e Terezinha, que mesmo longe se fizeram tão presentes.

OFEREÇO

AGRADECIMENTO

À Deus por me guiar e dar forças em todos os momentos que achei que não seria capaz.

Aos meus pais, Terezinha e Ciro, que mesmo longe estiveram presentes me dando todo o carinho e forças suficientes para que eu pudesse continuar.

Ao meu marido Anderson pela paciência e compreensão nesses anos de pouca atenção. Agradeço por estar sempre ao meu lado me apoiando em todos os momentos, sem você não conseguiria chegar até aqui.

À minha segunda família do C.U.J.A., à minha mãe de coração Teresa, e todos meus irmãos e guias espirituais que me deram conselhos e forças para a conclusão do trabalho.

À Universidade Estadual Paulista – UNESP (Faculdade de Ciências Agrônomicas), pela oportunidade de realizar o meu sonho de ser doutora e levar o nome desta instituição que tanto estimo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2014/14638-0) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes pela concessão da bolsa e da reserva técnica para que o trabalho pudesse ser executado.

Ao Laboratório de sementes florestais-LSF da UFLA, que me receberam com tanto carinho e deram o suporte para a realização das análises proteômicas da tese.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, agradeço a paciência e a dedicação nesses 5 anos de parceria e por sempre confiar em meu potencial.

À Prof. Dra. Lucilene Delazari dos Santos, pela amizade, colaboração e ensinamentos para que a parte proteômica ficasse impecável.

Ao Prof. Dr. Anderson Cleiton José, pela atenção e ajuda para que eu pudesse adentrar

nesse mundo desconhecido da proteômica.

Ao Prof. Dr. João Nakagawa, pela participação da banca de qualificação e toda contribuição intelectual.

Ao Dr. Júlio Maia, por participar da banca de qualificação e por me auxiliar em todos os questionamentos acerca do trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Magalhães Padilha por ceder o laboratório de Biologia Geral e Aplicada do departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da UNESP para que pudesse realizar parte do meu experimento.

À todos os professores do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP/ Botucatu pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura, em especial Valéria, Eliane, Iara, Thiago e Vera, por toda a ajuda e paciência.

À todos os amigos do Laboratório de Análise de Sementes pela ajuda em todas as coletas de soja, pelas risadas e por todo o carinho que me receberam nesses anos.

Aos amigos Patrícia Silveira, Euménes Farias, Denise Basso, Viviane Sene, Iara Brito, Rose Santos, Giovana Constantino por estarem sempre presentes, mesmo que haja uma distância física, sei que sempre estiveram comigo. A amizade de todos foi e sempre será muito importante na minha vida. Gratidão.

À todos que torceram por mim.

Meus Sinceros Agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DA SOJA.....	6
3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOLÓGICA DA CULTURA DA SOJA.....	7
3.3 DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DE SEMENTES.....	9
3.4 TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES.....	12
3.5 AQUISIÇÃO DE LONGEVIDADE EM SEMENTES	15
3.6 PROTEÍNAS <i>LEA</i>	18
3.7 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (<i>HSPs</i>)	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 PRODUÇÃO DAS SEMENTES E CARACTERIZAÇÃO DOS ESTÁDIOS REPRODUTIVOS	24
4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA	27
4.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA FRESCA E MASSA SECA DAS SEMENTES	27
4.4 GERMINAÇÃO	27
4.5 AQUISIÇÃO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO	28
4.6 ESTUDO DA AQUISIÇÃO DA LONGEVIDADE	28
4.7 ESTUDO DO PROTEOMA	28
4.7.1 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	29
4.7.2 COLORAÇÃO DOS GÉIS	30

4.7.3 ANÁLISE DOS GÉIS	30
4.7.4 DIGESTÃO <i>IN GEL</i>	31
4.7.5 SEQUENCIAMENTO PEPTÍDICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO ESI-Q-ToF	31
4.7.6 BIOINFORMÁTICA PROTEÔMICA	32
5. RESULTADOS	33
5.1 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DA MATURAÇÃO DE SMENETES DE SOJA.....	33
5.2 O ESTUDO DO PROTEOMA DURANTE A MATURAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA	36
5.3 ESTUDO DO PROTEOMA ASSOCIADO COM A FASE FINAL DA MATURAÇÃO EM SEMENTES DE SOJA	37
5.3.1 O PROTEOMA ASSOCIADO COM A AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E/OU LONGEVIDADE EM SEMENTES DE SOJA	40
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
9. ANEXO 1.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos estádios fenológicos vegetativos da soja de acordo com a descrição de Fehr e Caviness (1977) com adaptações.....	8
Tabela 2. Caracterização dos estádios fenológicos reprodutivos da soja de acordo com a descrição de Fehr e Caviness (1977) com adaptações por Ritchie et al (1994) com adaptações.....	8
Tabela 3. Propriedades químicas do solo de 0-0,2 m referente à área de semeadura anterior à semeadura da safra 2013/2014.....	25
Tabela 4. Descrição dos estádios reprodutivos das sementes de soja baseada no trabalho de Ritchie et al. (1994) com adaptações.....	26
Tabela 5. Proteínas identificadas por espectrometria de massas, dos estádios R71 a R9, que apresentam diferença de expressão na maturação tardia em sementes de soja em relação à R7.2.....	39
Tabela 6. Relação de proteínas com diferença de expressão e exclusivas ao longo da maturação de sementes de soja.....	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Levantamento climático e pluviométrico referente ao período de safra correspondente à Novembro/2013 à maio/2014. As linhas tracejadas correspondem à temperatura e as linhas contínuas se referem à pluviosidade.....25
- Figura 2.** Caracterização do desenvolvimento em sementes de soja. Vagens inteiras e abertas e sementes isoladas em diferentes dias após o florescimento. Barra corresponde a 1 cm. A caracterização foi realizada conforme Fehr e Caviness (1977) adaptado por Ritchie et al. (1994).....27
- Figura 3.** Mudanças no Massa Seca (mg/semente) e no Massa Fresca (mg/semente) e no Conteúdo de Água (CA/gH₂O por g PS) em sementes de soja. Os dados são médias de quatro repetições de 20 sementes cada. Barras representam desvio padrão.....34
- Figura 4.** Mudanças na porcentagem germinação de sementes secas nos diferentes estádios de maturação e armazenamento.....35
- Figura 5.** Germinação de sementes úmidas (●) em comparação à Aquisição de Tolerância à Dessecação (TD) (○) e Longevidade (▲) durante a maturação de sementes de soja.....35
- Figura 6.** (A) Gel integridade de dos estágios reprodutivos da soja com uma amostra controle e (B) Gel teste, perfil isoelétrico de 3-10 e teste com 200 µg de amostra proteica.....36
- Figura 7.** Diferença do proteoma de sementes de soja ao longo da maturação. Os géis 2D mostram as proteínas em R7.1 (A), R7.2 (B), R7.3 (C), R8.1 (D), R8.2 (E), R8.3 (F) e R9 (G).....37
- Figura 8.** Gel de referência de R7.2 com diferença de expressão ao longo da maturação de sementes de soja. Duzentos microgramas de proteínas foram separados por SDS-PAGE usando uma fita de 13 cm com pI 4-7.....38
- Figura 9.** Mudanças de intensidade dos *spots* com comportamento similar à aquisição de Longevidade em sementes de soja. Ganho gradual (barras) em relação à Longevidade em P50 (linha). Dehidrina *MAT1* (*Spot* 2) (A); Dehidrina *MAT9* (*Spot* 156) (B).....41
- Figura 10.** Rede de interações entre os 2 grupos de dehidrinas presentes durante a maturação de sementes de soja. As dehidrinas *MAT1* e *MAT9* estão representadas em vermelho (A). As proteínas *HSP* e Lipoxigenase são as que têm função intracelular e interagem diretamente com as dehidrinas de interesse (B).....41
- Figura 11.** Mudanças de intensidade dos *spots* com comportamento similar à aquisição de Longevidade em sementes de soja. Ganho gradual (barras) em relação à Longevidade em P50 (linha). *LEA_5* (*Spot* 1) (A); *LEA SBP65* (*Spot* 68) (B).....42
- Figura 12.** Mudanças de intensidade dos *spots* com comportamento similar à aquisição de Longevidade em sementes de soja. Ganho gradual (barras) em relação à Longevidade em P50 (linha). *LEA 51kDa* (*Spot* 86) (A); *LEA MP2* (*Spot* 90) (B).....43
- Figura 13.** Rede de interações entre *LEAs* presentes durante a maturação de sementes de soja. As associações mais fortes são representadas pelas linhas mais grossas. O *spot*

1 (GLYMA18G43320.1) e a relação direta com ácido abscísico (ABA) proteínas destacadas em vermelho.....43

Figura 14. Rede de interações entre os 4 tipos de *LEAs* presentes durante a maturação de sementes de soja. As proteínas *MP2*, *SBP65*, *LOC732637* (51 kDa *Maturation*) e *GLYMA18G43320.1* (*LEA 5*) e suas relações proteicas.....44

Figura 15. Acúmulo de *LEAs*, Dehidrinas e *seed maturation protein* presentes durante a maturação de sementes de soja.....45

Figura 16. Rede de interações entre todas as proteínas presentes durante a maturação de sementes de soja.....46

Figura 17. Rede de interações entre todas as proteínas presentes durante a maturação de sementes de soja. As proteínas em destaque participam de processos biológicos em sementes de soja.....47

Figura 18. Rede de interações entre todas as proteínas presentes durante a maturação de sementes de soja. As proteínas em destaque participam de processos moleculares em sementes de soja.....47

ESTUDO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E LONGEVIDADE EM SEMENTES DE SOJA (*Glycine max* (L.) MERR.). Botucatu, 2016. 95 pg. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: BARBARA PANOFF VALÁRIO

Orientador: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

RESUMO

Não existe consenso sobre qual o estágio de desenvolvimento que a tolerância à dessecação e longevidade são adquiridos em sementes de soja e quais proteínas estão associadas com estes eventos. Portanto, o presente trabalho teve o objetivo caracterizar a aquisição da tolerância à dessecação e longevidade em sementes de soja e identificar proteínas associadas. O estudo foi realizado na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas-UNESP-Botucatu em parceria com o Centro Virtual de Toxicologia (CEVAP), Campus de Botucatu-SP e com o Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As sementes foram produzidas na safra 2013/2014 seguida da coleta e caracterização morfofisiológica (caracterização visual, germinação e teor de água) das sementes nos estádios reprodutivos R5.1, R5.2, R5.3, R5.4, R5.5, R6, R7.1, R7.2, R7.3, R8.1, R8.2, R8.3 e R9. Posteriormente, realizou-se a determinação do teor de água, matéria seca e fresca das sementes. Em seguida, as sementes foram secas e armazenadas de 5 a 85 dias à 35°C e 75% umidade relativa (UR), para caracterizar a aquisição de longevidade. Para tolerância à dessecação, as sementes foram secas em gerbox contendo carbonato de potássio à 42% de umidade e 35°C até 0.10g água por grama de massa seca. Para se conhecer o perfil proteômico, foram extraídas proteínas de cada estágio de desenvolvimento, separadas em fitas de pI e géis de acrilamida e analisados no ImageMaster Platinum 7.0. Os *spots* significativos e exclusivos de cada estágio foram recortados e analisados por espectrometria de massas ESI-QToF. Foram sequenciadas e identificadas 167 proteínas, sendo que trinta e cinco tiveram a expressão diferencial ao longo da fase tardia da maturação. A tolerância à dessecação foi adquirida no estágio R7.2, porém a longevidade foi adquirida em estádios fenológicos posteriores. As proteínas *LEAs* *MAT1*, *SBP65* e *MP2* estão relacionadas com tolerância à dessecação e as pertencentes ao grupo 3 (51 kDa, *SBP65* e *MP2*) juntamente com a *MAT9* e algumas *LEAs* do grupo 5 (*Small hydrophilic plant seed protein*) estão relacionadas com aquisição de longevidade.

Palavras-chave: maturação de sementes, proteínas, germinação, armazenamento maturidade fisiológica.

STUDY OF DESICCATION TOLERANCE AND LONGEVITY IN SOYBEAN (*Glycine max* (L.) MERR.) SEEDS. Botucatu, 2016. 95 pg. Thesis (Doctorate in Agronomy/Agriculture) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: BARBARA PANOFF VALÁRIO

Adviser: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

ABSTRACT

There is no consensus regarding when desiccation tolerance and longevity are acquired in soybean seeds. Therefore, this study aimed at to characterize the acquisition of desiccation tolerance and longevity in soybean seeds and identify proteins associated. The study was performed at the Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), Colegue of Agricultural Science-UNESP-Botucatu in collaboration with the Virtual Center for Toxicology (CEVAP), Botucatu-SP and with the Forest Seeds Laboratory at the Federal University of Lavras (UFLA). Seed production was carried out in the crop year 2013/2014 followed by the collection and characterization of seeds at the reproductive stages R5.1, R5.2, R5.3, R5.4, R5.5, R6, R7.1, R7.2, R7.3, R8.1, R8.2, R8.3 and R9. Subsequently, it was performed the determination of water content, dry and fresh weight of the seeds. Then, seeds were dried and stored at 35 °C and 75% relative humidity (RH), to characterize the acquisition of longevity. To know the proteomic profile, proteins were extracted from each stage of development, separated in acrylamide gels and analyzed by ImageMaster Platinum 7.0. The significant spot and unique to each stadium were cut and analyzed by mass spectrometry ESI-QTOF mass. They were sequenced and identified 167 proteins, and thirty-five had the differential expression along the late stage of maturation. The desiccation tolerance was acquired at the stage R7.2 but longevity was acquired at later during seed development. Proteins *LEAs* *MAT1*, *SBP65* and *MP2* are related to desiccation tolerance and those belonging to group 3 (51 kDa, *SBP65* and *MP2*) together with *MAT9* and some *LEAs* group 5 (Small hydrophilic plant seed protein) are related to acquisition of longevity.

Keywords: seed maturation, proteins, germination, storage, physiological maturity. .

1. INTRODUÇÃO

A agricultura moderna demanda o uso de tecnologias para que haja altas produtividades e sejam produzidas sementes de qualidade. Segundo Marcos Filho (1998), qualidade de sementes é o conjunto de características que determinam o valor das sementes para a semeadura considerando a interação de atributos de natureza genética, física, fisiológicas e de sanidade. Já Hampton (2002) definiu qualidade de sementes como um conjunto de características que determinam o potencial de desempenho da semente após a semeadura em campo ou durante o armazenamento.

A qualidade de fisiológica de sementes é adquirida durante o desenvolvimento e refere-se ao vigor, capacidade de armazenamento (longevidade) e germinação rápida e uniforme.

Durante a maturação as sementes chamadas de ortodoxas adquirem tolerância à dessecação, o que permitem a secagem dos mesmos a níveis inferiores a 10% de água (em base úmida) com a retomada da atividade normal após a reidratação (LEPRINCE e BUITINK, 2010). A tolerância à dessecação e a capacidade de germinação não são características expressas em todos os estádios de desenvolvimento das sementes, mas adquiridas após a histodiferenciação, em que há aumento na massa fresca e deposição de reservas, e antes da fase de secagem na maturação (BEWLEY et al., 2013; KERMODE, 1997; VEIGA et al., 2007).

Sun e Leopold. (1993), descrevem que em sementes de soja a tolerância à dessecação é adquirida ao longo do desenvolvimento da semente aos 48

dias após o florescimento (DAF) (estádio R6), enquanto que para Zanakakis et al. (1994) a tolerância à dessecação é adquirida em torno de 66 (DAF) (estádio R7.3).

Além de tolerância à dessecação, as sementes ortodoxas também adquirem capacidade de tolerar o armazenamento, chamada de longevidade. A longevidade corresponde ao período máximo em que as sementes permanecem vivas, quando armazenadas sob condições ambientais ideais (TOLEDO e MARCOS FILHO, 1977).

A longevidade é conferida pela capacidade das sementes em estabilizar moléculas, suspendendo a sua atividade metabólica através do estado vítreo, que diminui consideravelmente as reações associadas com a deterioração (BUTINK e LEPRINCE, 2004; CHATELAIN et al., 2012).

Embora os estádios finais do desenvolvimento em sementes de soja sejam importantes para maximizar a qualidade ainda não existe consenso na literatura sobre quando alguns parâmetros de qualidade (longevidade e tolerância à dessecação) são adquiridos e quais proteínas estão associadas com a aquisição destes eventos. O estudo da expressão gênica permite obter um perfil molecular e fornece oportunidades para identificação de importantes alterações que ocorrem no nível de RNA. Entretanto, a análise dos transcritos é prejudicada pela sua susceptibilidade à degradação e pela falta de concordância entre sua concentração e a de proteína (GYGI et al., 1999). Na verdade, o proteoma não é apenas a soma dos produtos traduzidos a partir das sequências genômicas, mas inclui também proteínas resultantes de processos pós-transcricionais e pós-traducionais, bem como complexos formados por essas biomoléculas (AHRENS et al., 2010). Além de sua grande complexidade, o proteoma é dinâmico e seu perfil se altera de acordo com o *status* fisiológico e as fases da diferenciação celular (BARBOSA et al., 2012).

Assim, a identificação na alteração do perfil das proteínas ao longo a aquisição da tolerância à dessecação e a longevidade das sementes é de extrema importância para programas futuros de melhoramento genético, no desenvolvimento e identificação de indivíduos com longevidade superior, após o desligamento da planta mãe, evitando a perda de qualidade, mesmo em condições de campo. O uso da tecnologia de transformação de plantas, que leve a obtenção de genótipos com maior longevidade e a tecnologia de seleção assistida por marcadores também devem ser consideradas.

2. OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivos caracterizar fisiologicamente o desenvolvimento das sementes de soja e identificar as proteínas associadas com a aquisição da tolerância à dessecação e a longevidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos gerais da cultura da soja

A soja (*Glycine max*, $2n = 40$ cromossomos) é uma das principais “commodities” produzidas no mundo. No levantamento da safra mundial de soja 2015/16, é prevista uma produção de 320,2 milhões de toneladas, crescimento de 1,6 milhão de toneladas ou 0,5% em relação à safra 2014/15. O Brasil é o segundo maior produtor com 33.244,6 ha de área plantada sendo estimada para a safra de 2015/2016 a produção de 101,2 milhões de toneladas (CONAB, 2016). As sementes de soja são ricas em proteínas e lipídios (MANARA, 1988).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das mais importantes culturas na economia mundial. Seus grãos são muito usados pela agroindústria (produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal), indústria química e de alimentos. Recentemente, vem crescendo também o uso como fonte alternativa de biocombustível (COSTA NETO e ROSSI, 2000).

A implantação de programas de melhoramento de soja no Brasil possibilitou o avanço da cultura para as regiões de baixas latitudes, através do desenvolvimento de cultivares mais adaptados por meio da incorporação de genes que atrasam o florescimento mesmo em condições de fotoperíodo indutor, conferindo a característica de período juvenil longo (KIIHL e GARCIA, 1989).

No Brasil, a partir da colheita 1996-1997, o Ministério da Agricultura, Pecuária, alimentos e Abastecimento (MAPA) realiza estudos sobre os riscos climáticos aplicados na agricultura conhecidos como "Zoneamento Agroecológico no Brasil". De acordo com Evangelista et al. (2013), zoneamento agrícola tem sido usado como um instrumento de política agrícola e gestão de riscos na agricultura e começaram a contribuir de forma significativa para aumentar a produção agrícola nacional e reduzir as perdas de rendimento devido à variabilidade climática.

O sucesso da cultura da soja depende de vários fatores e, sem dúvida, o mais importante deles é o uso de sementes de alta qualidade, produzindo plantas vigorosas, com desempenho superior no campo (FRANÇA-NETO et al., 2014), tolerando potenciais tensões existência de diferentes condições ambientais (solo e clima). Por outro lado, médio ou baixo vigor das sementes e sementes deterioradas resultam em plântulas com baixo vigor e com pouca ou nenhuma chance de sucesso em estabelecer-se de forma competitiva (KRZYZANOWSKI et al., 2008). O uso de sementes de boa qualidade permite acesso aos avanços genéticos, com garantia de qualidade em diferentes regiões, garantindo maior produtividade. Portanto, o estabelecimento da cultura de soja com sementes de alta qualidade é de fundamental importância (PADUA et al., 2014)

3.2. Caracterização fenológica da cultura da soja

O conhecimento da fenologia da cultura da soja é fundamental na identificação do melhor manejo em situações normais ou adversas para que a cultura possa responder de forma favorável contribuindo em maiores produções (CÂMARA, 1998).

O ciclo fenológico da soja foi detalhadamente estudado por Fehr e Caviness (1977), que elaboraram uma escala fenológica alfanumérica, subdividindo a fenologia em duas grandes fases: vegetativa (Tabela 1) e reprodutiva (Tabela 2), simbolizadas, respectivamente, pelas letras maiúsculas V e R. Recentemente, essa escala vem sofrendo novas subdivisões, em estádios reprodutivos específicos, facilitando a adoção de medidas de manejo relacionadas à condução da cultura, até o ponto de colheita (FARIAS, 2009).

Tabela 1. Caracterização dos estádios fenológicos vegetativos da soja de acordo com a descrição de Fehr e Caviness (1977) com adaptações.

Estádios	Formação	Descrição
Ve	Emergência	Os cotilédones estão acima da superfície do solo
Vc	Cotilédone Desenvolvido	Cotilédones desenvolvidos
V1	Primeiro nó	Folhas unifolioladas completamente abertas
V2	Segundo nó	Primeira folha trifoliolada aberta
V3	Terceiro nó	Segunda folha trifoliolada aberta
Vn	“n” nó	“n” folha trifoliolada aberta

Tabela 2. Caracterização dos estádios fenológicos reprodutivos da soja de acordo com a descrição de Fehr e Caviness (1977) com adaptações por Ritchie et al (1994) com adaptações.

Estádios	Formação	Descrição
R1	Início do florescimento	Uma flor aberta em qualquer nó da haste principal
R2	Florescimento pleno	Maioria das flores abertas na haste principal
R3	Início da frutificação	Vagem com 0,5 a 1,5 cm de comprimento no terço superior da haste principal
R4	Frutificação plena	Maioria das vagens no terço superior da haste principal com comprimento de 2 a 4 cm (“canivete”)
R5.1	Início da granação	Até 10% da granação máxima na maioria das vagens localizadas no terço superior da haste principal
R5.2		Maioria das vagens no terço superior da haste principal com 10 a 25% da granação máxima
R5.3	Média granação	Maioria das vagens no terço superior da haste principal com 26 a 50% da granação máxima
R5.4		Maioria das vagens no terço superior da haste principal com 51 a 75% da granação máxima
R5.5	Final da granação	Maioria das vagens no terço superior da haste principal com 76 a 100% da granação máxima
R6	Granação plena	100% de granação. Maioria das vagens no terço superior contendo sementes verdes em seu volume máximo
R7.1	Maturidade fisiológica	Até 50% de folhas e vagens amareladas
R7.2	Maturidade fisiológica	Entre 51% a 75% de folhas e vagens amareladas
R7.3	Maturidade fisiológica	Acima de 76% de folhas e vagens amareladas
R8.1	Desfolha natural	Até 50% de desfolha
R8.2	Desfolha natural	Acima de 50% de desfolha. Aproxima-se o ponto de colheita
R9	Maturidade de campo	95% de vagens com a cor da vagem madura

3.3. Desenvolvimento e maturação de sementes

A fertilização determina o início do processo de formação da semente. Após a fertilização, o zigoto é envolvido por uma parede celular e dentro dela ocorrem divisões celulares até resultar na formação de uma massa de células que se desenvolve formando o embrião da semente. A embriogênese ocorre dentro do saco embrionário e é no seu interior que as células se reorganizam e formam linhas de polaridade como preparo para posterior crescimento e divisão. Antes das divisões, a oosfera fertilizada se alonga horizontalmente. Em seguida, ocorrem divisões sucessivas e a partir das divisões da célula basal, forma-se o pró-embrião que se difere do suspensor. O suspensor tem como função “empurrar” o embrião em desenvolvimento o centralizando no óvulo e transferindo nutrientes e reguladores de crescimento (MARCOS-FILHO, 2015).

Segundo o mesmo autor, após a formação do suspensor, há uma intensa divisão celular com origem na célula distal o que caracteriza o desenvolvimento do embrião. A partir desse estágio, em dicotiledôneas, há um achatamento da extremidade superior e uma intensa divisão celular na região da direita e esquerda do pró-embrião formando os primórdios dos cotilédones. Entes eles, se diferencia a plúmula e na região inferior se encontra o eixo hipocótilo-radícula.

No começo do desenvolvimento, as sementes possuem elevado teor de água e realizam inúmeras divisões celulares. Nesta fase ocorre a histodiferenciação e morfogênese do plano básico do embrião, com aumento na massa fresca e na deposição de reservas, acompanhado por um rápido aumento na massa seca durante a maturação (CASTRO et al., 2004). O acúmulo de massa seca cessa e o de massa fresca diminui a partir do ponto de maturidade fisiológica. Após a histodiferenciação e antes da secagem na maturação, as sementes adquirem a habilidade para germinar e tolerar a dessecação (PAMMENTER et al., 1994). Com a deposição de reservas a massa seca aumenta e as sementes iniciam a perda de água (BEWLEY et al., 2013).

O desenvolvimento das sementes do óvulo até a maturidade é dividido em quatro fases. As fases I e II correspondem às divisões e alongamento celular, na fase III há o acúmulo de reservas e matéria seca e após o total acúmulo de

matéria seca as sementes começam a perder conteúdo de água, o que corresponde a fase IV (DURE, 1975; MARCOS FILHO, 2015).

A maturidade consiste no desligamento da semente da planta mãe. Este ponto é o que muitos autores afirmam ser o máximo de acúmulo de matéria seca (BEWLEY e BLACK, 1994).

De acordo com Marcos Filho (2015), maturidade fisiológica foi primeiramente descrita por Shaw e Loomis (1950) como sendo o estágio de desenvolvimento em que as sementes atingem a máxima massa de matéria seca. Todavia, esse estágio foi denominado por Ellis e Prieta Filho (1992) como “maturidade de massa”, pois as sementes adquiriram o máximo potencial fisiológico após a maturidade fisiológica.

Desde então estudos estão sendo conduzidos com sementes individuais e em populações, porém há uma dificuldade de estabelecer um padrão, pois cada semente, neste caso, pode atingir a maturidade em um momento diferente. Como exemplo tem a soja que o máximo de matéria seca ocorre quando a semente atinge 50% de teor de água, porém quando se avalia a população que atingiu o estágio R7, as sementes individualmente apresentam variação de grau de umidade de 40 a 65%, dificultando a padronização devido a desuniformidade de maturação. Mesmo com essa dificuldade de consenso propõe-se o conceito de que maturidade fisiológica consiste no “período em que não mais ocorrem alterações significativas da massa de matéria seca” (MARCOS FILHO, 2015).

Miles et al. (1988) descreveram que o acúmulo máximo de massa seca nas sementes de soja é atingida com a transição desta da cor verde para a cor amarela. Fehr et al. (1971) determinou que a maturidade fisiológica na soja foi alcançada na fase de desenvolvimento reprodutivo R7. O estágio R7 caracteriza o ponto de maturidade fisiológica, que é o de máximo de vigor e matéria seca (HOWELL et al., 1959).

Os máximos níveis de massa seca e vigor são alcançados após a máxima germinação não é totalmente surpreendente. Esta é avaliada sob condições ótimas de ambiente e nessa situação a semente não precisaria completar o acúmulo de reservas para expressar o máximo poder germinativo, principalmente se for com base na protrusão da raiz primária. Sabe-se que o consumo para formar uma plântula normal é menor do que para estabelecer plântulas vigorosas. Sendo assim, é possível que, em estudos de maturação de sementes, a máxima germinação seja detectada mais

precocemente que o máximo de vigor, pois a semente germinada origina plântula com partes desenvolvidas, mas não invariavelmente vigorosas (MARCOS FILHO, 2015).

Zanakis et al. (1994), trabalhando com diferentes cultivares de soja, contrariam a definição de Harrington (1972) que afirma que a maturidade fisiológica consiste também na máxima qualidade da semente.

Após a maturidade fisiológica ocorre a perda gradativa de água (MARCOS FILHO, 2015). Em sementes ortodoxas, o mesmo autor afirma que as sementes, ao se aproximarem da maturidade fisiológica, se tornam mais tolerantes à dessecação (secagem com menos de 10% de conteúdo de água) e apresentam maior capacidade de germinar rapidamente e formar plântulas normais.

Já Sun et al. (1993), descrevem que a tolerância à dessecação em sementes de soja é adquirida ao longo do desenvolvimento das sementes tendo continuidade após a maturidade fisiológica.

Em soja, a transição dos estágios R7 para o R8, ativam os mecanismos de tolerância à dessecação e a semente passa a tolerar a secagem em até determinado conteúdo de água sem danos permanentes (OLIVER; BEWLEY, 1997). As sementes de soja continuam perdendo conteúdo de água até o ponto de maturidade de colheita onde o teor de água baixo possibilita o uso de colheitadeiras mecânicas (DELOUCHE, 1980). Durante o tempo de armazenamento em campo, tempo de espera entre a maturidade fisiológica (máximo acúmulo de matéria seca) e a colheita, a influência das condições ambientais em campo podem causar efeitos negativos sobre a viabilidade e o vigor das sementes de soja (TEKRONY et al., 1980).

No entanto, quando o enchimento das sementes é finalizado, a maioria das espécies não vai diretamente para a secagem final, mas apresentam uma fase denominada "fase de maturação tardia", que até agora tem recebido pouca atenção (PROBERT et al., 2007).

Segundo Baud et al. (2008), em *Arabidopsis thaliana* a maturação tardia ocorre entre 17 e 20 DAP (dias após a polinização). A síntese de compostos de armazenamento termina quando o embrião começa a ficar metabolicamente quiescente e tolerante à dessecação. Na fase de maturação tardia das sementes, o conteúdo de água cai de 32% para menos de 10%. Em contraste à essa perda drástica de água, a síntese continua, com rafinose e estaquiose sendo especificamente armazenadas durante essa fase de maturação tardia (BAUD et al., 2002; FAIT et al., 2006).

O grande intervalo de tempo da fase de maturação tardia em *Medicago truncatula* fornece um modelo para regular esses mecanismos (CHATELAIN et al., 2012). Usando uma combinação de abordagens fisiológicas, metabolômica e transcriptômicas, foi construída e parcialmente validada uma rede de regulação genética que revelou vários módulos de desenvolvimento relacionados com a aquisição de tolerância à dessecação, longevidade e final de secagem/abscisão com funções biológicas específicas e distintas (VERDIER et al., 2013).

Após a tolerância à dessecação, durante o final de maturação, as sementes adquirem progressivamente a longevidade, que é a capacidade de se manter viva no estado seco por determinados períodos de tempo (SINNIAH et al., 1998; VERDIER et al., 2013). Portanto, é bastante evidente que em algumas sementes a qualidade ainda aumenta após o máximo acúmulo de matéria seca.

3.4. Tolerância à dessecação em sementes

Tolerância à dessecação é definida como a capacidade da semente em sobreviver à remoção de toda ou quase toda a água do interior das células sem danos irreversíveis (LEPRINCE e BUITINK, 2010). Mais na fase final do desenvolvimento, os organismos tolerantes à dessecação têm a capacidade de sobreviverem à desidratação inferior a 0,1 g de água por grama de massa seco e ainda retomarem normalmente o metabolismo após re-hidratação (BEWLEY et al., 2013). Ao longo das fases iniciais do desenvolvimento, as sementes ainda não possuem completa capacidade de germinação e tolerância à dessecação (GRUWEZ et al., 2013).

As sementes que passam por um período prévio de secagem e apresentam redução na quantidade de água durante a fase final do processo de maturação, e continuam viáveis após o processo, são denominadas ortodoxas (ROBERTS, 1973; WEBER et al., 2005). Já as sementes intolerantes à dessecação, que são dispersas com teores de água elevados, são chamadas de recalcitrantes (WALTERS, 2000).

Sementes maduras ortodoxas são assim definidas por terem a habilidade de servirem como um mecanismo adaptativo para sobreviverem à estresses ambientais e de preservar a sua viabilidade durante longo armazenamento à seco (LEPRINCE et al., 1990; SUN e LEOPOLD, 1993).

No desenvolvimento das sementes ortodoxas, a tolerância à dessecação e a capacidade de germinação das sementes são características expressas após a histodiferenciação, em que há inicialmente o aumento na massa fresca e deposição de reserva, e antes da fase de secagem na maturação (KERMODE, 1997).

A redução do teor de água nessas sementes proporciona uma redução do metabolismo e um estado de quiescência do embrião. As sementes no estado de quiescência resistem às condições adversas do ambiente e, quando expostas às condições adequadas e na ausência de dormência, têm a capacidade de retomada do metabolismo no processo de germinação (BEWLEY e BLACK, 1994).

A transição de intolerância para tolerância à dessecação tem sido usualmente reportada como uma mudança drástica, ocorrendo em alguns dias e determinada como a tolerância para um nível de secagem (LONG et al., 1981). Segundo Oliver e Bewley (1997), em soja, na transição do estágio R7 ao R8, o metabolismo do mecanismo de tolerância à dessecação é intensificado e a semente passa a tolerar altas temperaturas de secagem.

A tolerância à dessecação é bastante incomum em eucariotos, porém sementes denominadas ortodoxas, além de tolerar a dessecação podem sobreviver no estado desidratado por períodos relativamente longos de acordo com as condições de armazenamento (TOLLETER et al., 2007). A redução no conteúdo de água resulta em redução da atividade metabólica, o que possibilita manter a capacidade de germinação por períodos consideráveis (RAJJOU & DEBEAUJON, 2008).

A tolerância à dessecação é uma característica complexa e, conseqüentemente, um conjunto de mecanismos está envolvido na proteção e reparação de estruturas celulares para lidar com a sobrevivência no estado seco e posteriormente a embebição. A repressão controlada do metabolismo oxidativo para evitar estresse, o acúmulo de moléculas de proteção (principalmente açúcares e proteínas) e a transição para um estado vítreo no citossol, contribuem para a tolerância à dessecação (MACHEREL et al., 2007; BEWLEY et al., 2013).

Alguns desses mecanismos incluem uma redução no grau de vacuolização, alterações na quantidade e natureza das reservas insolúveis acumuladas, conformação do DNA e arquitetura da cromatina, desdiferenciação intracelular, "desligamento" do metabolismo, a ativação dos sistemas antioxidantes, acúmulo de moléculas de proteção, tais como proteínas *LEA* (*Late abundant embryogenesis*) como as *LEAs* *PM25*, *EM6* e *PM18* em *Medicago truncatula* e açúcares (sacarose, rafinose e

estaquiose), posicionamento de moléculas anfipáticas, proteção da composição de óleos por oleosinas e a presença de mecanismos de reparo durante a reidratação (PAMMENTER e BERJAK, 1999; JOSÉ et al., 2011; BEWLEY et al., 2013).

Compostos acumulados durante a maturação da semente, tais como: sacarose, rafinose e ciclitóis (tipo de carboidrato solúvel) podem estar envolvidos na formação e manutenção do estado vítreo e podem facilitar a formação de vidro em sistemas *in vitro*. As proteínas *LEA* e *smHSPs* (*small heat shock proteins*) também podem promover a formação vítrea, talvez em conjunto com os açúcares (BEWLEY et al., 2013).

Nas sementes tolerantes à dessecação, proteínas hidrofílicas como as *LEAs*, são tipicamente acumuladas durante as fases finais da embriogênese em resposta à secagem, à baixa temperatura, salinidade ou tratamento exógeno de ABA, e sua expressão cessa rapidamente após embebição (BLACKMAN et al., 1991). Outra forma de tolerância à dessecação é o acúmulo de *HSPs* (proteínas de choque térmico) como a *HSP18.2* que atua tanto na aquisição de tolerância à dessecação como na longevidade de sementes de *Arabidopsis thaliana* (MACHEREL et al., 2007).

Durante a fase final da maturação das sementes o ácido abscísico (ABA) é um dos hormônios responsável pela aquisição da tolerância à dessecação. Normalmente o conteúdo de ABA durante o início da embriogênese é baixo, atingindo níveis mais elevados na fase intermediária desse processo (NAMBARA et al., 2010). Em sementes em desenvolvimento, a concentração de ABA diminui próximo ao final da fase de desenvolvimento, enquanto a tolerância à dessecação é aumentada (PAMMENTER et al., 1994).

Em *Arabidopsis thaliana*, a maturação das sementes é controlada por reguladores que interagem de uma forma complexa e inclui a ligação do fator *Leafy cotyledon* (*LEC1*) e os três conteúdos de domínio B3 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE (*ABI3*), FUSCA (*FUS3*) e *LEC2*) (MAIA et al., 2014). Na mesma espécie há ainda um controle no desenvolvimento de processos a fim de garantir o desenvolvimento da semente e a maturação incluindo a aquisição de tolerância à dessecação que afeta a expressão de outros fatores de transcrição (FT), vias hormonais e a expressão de proteínas de armazenamento das sementes (*SSPs*) e genes de proteínas *LEA* (JIA et al., 2013; MAIA et al., 2014).

A tolerância à dessecação provavelmente não pode ser atribuída a um simples mecanismo de proteção; ao contrário, ela parece ser um fenômeno

multifatorial em que cada componente é igualmente crítico, agindo em sinergismo e que é controlado pelo genoma (LEPRINCE et al., 1993).

3.5. Aquisição de longevidade

Durante o desenvolvimento da semente a longevidade é a última característica a ser adquirida (BEWLEY et. al. 2013). De acordo com Sano et al. (2015) a longevidade das sementes é definida como o período de tempo total durante o qual as sementes permanecem viáveis, considerada uma característica importante para a ecologia, a agronomia e a economia. Esta característica permite a conservação da biodiversidade, especialmente para plantas produtoras de sementes ortodoxas, que têm tolerância à dessecação e se mantêm viáveis ao longo do armazenamento a seco.

A longevidade de sementes é variável entre as espécies sendo que para lótus (*Nucifera nelumbo*) a longevidade foi de cerca de 1300 anos (SHEN-MILLER, 2002) e *Phoenix dactylifera* com mais de 2000 anos (SALLON et al., 2008) enquanto que em outras espécies, como a cebola e a pimenta a longevidade é menor.

Zanakis et al. (1994) trabalhando com diferentes cultivares de soja observaram que o potencial de longevidade aumentou durante algum tempo após a maturidade fisiológica(máximo acúmulo de matéria seca) e a longevidade máxima foi atingida pouco antes ou na maturidade de colheita. Esses autores também confirmaram os relatos de Ellis e Roberts (1980;1981) onde a determinação da longevidade das sementes é um método útil especialmente para quantificar as diferenças na qualidade de sementes.

A longevidade é conferida pela capacidade para estabilizar o sistema biológico por longos períodos de tempo suspendendo a sua atividade metabólica e formando uma matriz amorfa altamente viscosa (isto é, um estado vítreo) que retarda severamente as reações de deterioração (BUITINK e LEPRINCE, 2004; CHATELAIN et al., 2012).

Segundo Bewley et al. (2013), a longevidade das sementes também é estendida em baixas temperaturas. Relações quantitativas entre o teor de água e a temperatura de sementes e sua potencial longevidade foram desenvolvidas o que permite uma melhor previsão do armazenamento de sementes para fins agrícolas ou de conservação. Como as sementes recalcitrantes são incapazes de sobreviver à

dessecação, elas devem ser armazenadas hidratadas e geralmente têm vidas bastante curtas durante o armazenamento.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é a reação de envelhecimento mais prejudicial durante armazenamento de sementes à seco. Estressada ou não as células de sementes geram ROS em vários compartimentos das células, normalmente em peroxissomos, mitocôndrias e citoplasma. O acúmulo de ROS leva a disfunção mitocondrial, a inativação da enzima, perturbação da membrana e a oxidação de lipídios, proteínas, e do material genético (DNA e RNA) (MOLLER et al., 2007).

Segundo Nguyen et al. (2012), a capacidade das sementes para lidar com tais tensões é determinada pela eficiência dos mecanismos de proteção para evitar, limpar e neutralizar moléculas reativas. Sementes maduras secas são equipadas com sistemas antioxidantes que consistem de enzimas e antioxidantes não enzimáticos. Os radicais superóxido são convertidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD) (GRENE, 2002; BAILLY et al., 2008). O H_2O_2 é então neutralizado pela catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). A CAT transforma H_2O_2 diretamente em água e oxigênio, enquanto APX catalisa a reação entre o ácido ascórbico (vitamina C) e H_2O_2 para formar dehidroascorbato e água (BLOKHINA et al., 2003). A remoção de H_2O_2 por APX requer o envolvimento de glutathione (GSH) como uma parte do ciclo de ascorbato-glutathione (NOCTER e FOYER, 1998).

Nguyen et al (2012) observaram também que as metalotioneínas (MTs) desempenham um papel na eliminação de ROS. Zhou et al. (2012) mostrou que três tipos de metalotioneínas em sementes de lótus (*Nelumbo nucifera*) (NnMT2a, NnMT2b e NnMT3) foram altamente expressas no desenvolvimento e germinação destas. A sobre-expressão de NnMT2a e em NnMT3 *Arabidopsis* melhora significativamente a germinação e vigor de sementes após o tratamento de envelhecimento e sob estresses abióticos (ZHOU et al., 2012). Em tabaco, simultaneamente, a sobre-expressão de genes que codificam superóxido Cu/Zn-superóxido (CuZnSOD) e APX em plastídeos melhora longevidade das sementes e a germinação sob várias condições de estresse ambiental (LEE et al., 2010).

A vitamina E (tocoferol) age contra os radicais de fosfolipídios e impede a peroxidação lipídica durante o armazenamento de sementes, germinação e estabelecimento de plântulas (GRENE, 2002; SATTLER et al, 2004). A importância de compostos de eliminação de radicais é apoiada pelo fato de que as sementes

recalcitrantes precisam de um nível constante mais elevado de vitamina C do que semente ortodoxa para se proteger de ROS (TOMMASI et al., 1999). As sementes são equipadas com sistemas antioxidantes que funcionam de forma redundante, portanto, um único mutante não pode conferir o fenótipo. Os processos de radicais-livres e neutralização de mecanismos de desintoxicação estão intimamente relacionados com o controle do equilíbrio de pró-oxidantes/antioxidantes durante o armazenamento e a germinação de sementes. Quando o sistema de eliminação de antioxidantes e os pró-oxidantes são saturados pela oxidação de ROS, mecanismos de desintoxicação podem ser afetados e o controle de ROS é perdido, resultando em sementes mortas (NGUYEN et al., 2012).

Walters et al. (2005) verificaram que a longevidade das sementes é afetada pelas condições de armazenamento, incluindo temperatura e umidade (em relação ao conteúdo de umidade das sementes). Foi demonstrado que tanto a baixa temperatura e teor de água prolongam a vida útil das sementes durante o armazenamento.

A viabilidade das sementes diminui gradualmente devido aos "processos de envelhecimento" e/ou "eventos de deterioração", durante o armazenamento à seco. Os primeiros sintomas são sementes com atraso na germinação e estabelecimento de plântulas pouco vigorosas, com perda total da viabilidade observada como uma incapacidade para germinar, o que muitas vezes resulta na redução da produtividade da cultura (GHASSEMI-GOLEZANI et al. 2010; SANO et al., 2015). Os mesmos autores afirmam que a longevidade da semente diminui rapidamente durante o armazenamento sob umidade relativa elevada e alta temperatura. Isto é devido ao aumento da fluidez do citoplasma que, por sua vez, promove a agregação irreversível de proteínas desnaturadas. A oxidação de moléculas tais como lipídios, membranas celulares, DNA, RNA e proteínas (RAJJOU et al., 2008), mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS), também afeta a longevidade das sementes, como citado anteriormente (GROOT et al., 2012).

Como a atividade metabólica é extremamente baixa em sementes maduras, estas devem ser equipadas com "mecanismos de proteção" contra estresse oxidativo durante o desenvolvimento da semente para prolongar a longevidade. No entanto, mesmo com tais mecanismos de proteção, sementes secas e maduras acumulam gradualmente danos celulares durante o envelhecimento. Uma vez que as sementes são embebidas, o citoplasma das células das sementes se retransforma de um

estado vítreo para o estado fluido e o metabolismo é ativado. Nesta condição, as sementes podem reparar os danos, influenciando no aumento do vigor (SANO et al., 2015).

3.6. Proteínas LEA

Várias proteínas têm sido estudadas com relação a sua função na proteção das sementes na aquisição da tolerância à dessecação e a longevidade. As ferramentas modernas de biologia molecular, tais como o estudo do proteoma vem sendo usadas no estudo de expressão destas proteínas (DAM et al., 2013; NATARAJAN, 2014).

A função de proteínas na tolerância à dessecação deve-se à sua habilidade para atrair moléculas de água, mantendo o ambiente local enriquecido de água ou de alguma forma até substituindo a água (BEWLEY e BLACK, 1985).

Os componentes protetores que têm sido abordados, por serem importantes na aquisição de tolerância à dessecação durante o desenvolvimento da semente, são as proteínas e os açúcares solúveis. O grupo de proteínas conhecidas como *Late embryogenesis abundant* ou *LEA* (DURE et al. 1989), se acumulam durante a fase de secagem ao longo da maturação e do desenvolvimento da semente. Especificamente, as proteínas *LEA* protegem macromoléculas, tais como enzimas e lípidios (SEKI et al., 2002) e tem sido amplamente aceita a hipótese de desempenharem um papel crucial na tolerância à dessecação (HINCHA e THALHAMMER, 2012).

Essas proteínas foram identificadas, pela primeira vez, como genes expressos durante as fases de maturação e dessecação do desenvolvimento de sementes de algodão (ZHU et al, 1997). Também são conhecidas por estarem envolvidas na proteção de plantas durante estresse abiótico agindo como osmoprotetoras, estabilizadoras de membrana, chaperonas antioxidantes e moleculares (KOVACS et al., 2008; SAHA et al., 2016). A maioria dos produtos dos genes *LEA* é predominantemente hidrofílica, básica na composição de aminoácidos, sem *Cys* e *Trp* e com localização no citoplasma. Proteínas *LEA* podem ser categorizadas em grupos, baseados na sequência de aminoácidos e na sua cinética da expressão (DURE, 1993).

De acordo com Bhardwaj et al. (2013) as *LEAs* são subdivididas em sete grupos e no grupo 1 estão agrupadas proteínas ricas em glicina que se acumulam em embriões. As desidrinas pertencem ao grupo 2, pois são ricas em

aminoácidos polares além de ter a função de proteção contra estresses salinos, ao frio e à seca. O grupo 3 é rico em sequências de 11 mer e reguladas por ácido abscísico (ABA). Proteínas com terminais “N” conservados, possuem de 10 a 80 resíduos longos e são encontradas em embriões secos, pertencem ao grupo 4. O grupo 5 é rico em resíduos hidrofóbicos, protegem contra estresses por injúrias e radiação ultravioleta (UV) e são encontradas em estádios tardios das sementes. As proteínas do grupo 6 são altamente conservadas e do grupo 7 são hidrofílicas, internamente desnaturadas e protegem contra o estresse salino.

Segundo Tunnacliffe et al. (2010) em planta modelo *Arabidopsis thaliana*, existem nove grupos (diferentemente de soja que são 6) diferentes de *LEA* que foram propostos recentemente com base na análise das sequências de aminoácidos (HUNDERTMARK E HINCHA, 2008). Os grupos 1, 2 e 3 são os grupos mais extensivamente estudados (SAHA et al, 2016). O maior destes grupos é o grupo 3 (*Pfam LEA_4*), que é também o principal grupo de proteínas *LEA* encontrado em organismos não-planta, sugerindo que os outros grupos têm surgido mais tarde na evolução: por exemplo, no grupo 1 as proteínas são predominantes em plantas, mas raras no reino metazoa (SHARON et al. 2009). Outro grupo de proteínas *LEA* que tem sido extensivamente estudado nos últimos anos é o Grupo 2, estas proteínas *LEA* são também conhecidas como desidrinas (*Pfam dehydrin*) e podem funcionar como formas fosforiladas (ROHIG et al., 2008).

Para o Grupo de proteínas 4, poucas análises funcionais foram relatadas até agora (SAHA et al, 2016). Dalal et al. (2009) obtiveram sucesso ao isolar os homólogos de *Arabidopsis LEA4-5*, *BnLEA4-1* a partir de *Brassica napus* e descobriram que a sobre-expressão desse gene confere reforçada tolerância ao estresse à seca. Já Olvera-Carrillo et al. (2010), reportaram a relevância de três proteínas *LEA4-1*, *LEA4-2*, *LEA4-5* referentes ao grupo 4 de *Arabidopsis* que permitem a sobrevivência sob condições de déficit hídrico.

Liu et al. (2011) revelaram que duas proteínas *LEA* do grupo 4 de soja agem como sequestradoras de íons e descreveram suas atividades como antioxidantes. Já Gu et al. (2012) isolaram famílias de genes de grão-de-bico referentes à *LEAs* do grupo 4 e observaram alta taxa de indução em resposta à seca, à salinidade, ao frio, ao calor, ABA, IAA (*Indole-3-acetic acid*), GA3 (*Gibberellic acid*) e MeJa (*Methyl jasmonate*) (SAHA et al. 2016).

Proteínas *LEA* são distribuídas em vários compartimentos celulares em plantas e provavelmente também em animais (MENZE et al., 2009). Das muitas proteínas *LEA* diferentes identificadas em plantas (51 em *Arabidopsis*) (HUNDERTMARK e HINCHA 2008), apenas um grupo minoritário foi funcionalmente e estruturalmente caracterizados (TUNNACLIFFE et al., 2010). Hundertmark et al. (2011), observaram que a redução das proteínas *LEA* do tipo desidrinas diminuíram a longevidade das sementes em *Arabidopsis thaliana*.

Segundo Kermode (1997), a regulação da expressão dos genes *LEA*, provavelmente, envolve componentes de outras vias de tradução de sinais, além de ABA. Essas proteínas são tipicamente acumuladas durante as fases finais da embriogênese ou em resposta a desidratação, baixa temperatura, salinidade ou tratamento exógeno de ABA, indicando a sua função na desidratação celular (VEIGA et al., 2007). A expressão de *LEA* é induzida pelo fitohormônio ABA, relacionado com o estresse, podendo então ser ativado por ABA endógeno ou aplicação exógena. As *LEA* são principalmente ativas durante o desenvolvimento das sementes, porém, em resposta ao estresse hídrico durante a fase vegetativa e formação das estruturas reprodutivas, seus respectivos genes também podem ser ativados (BIES et al., 1998). De acordo com Shinozaki e Yamaguchi – Shinozaki (2007), os genes que codificam estas proteínas *LEA* são induzidos pelo estresse abiótico através de transdução de sinal mediada pela via do ácido abscísico.

Proteínas *LEA* são caracterizadas por uma composição parcial de aminoácido altamente hidrofílica solúvel em água e por sua elevada estabilidade a altas temperaturas. Foi proposto que estas proteínas possuem papel de proteção das estruturas citoplasmáticas durante a desidratação (INGRAM e BARTELS, 1996). As desidrinas, devido a sua natureza anfipática, inibem a desnaturação de um grande número de macromoléculas e estabilizam estruturas intracelulares sob estresse hídrico severo. De acordo com Walters et al. (1997), as desidrinas associam-se com açúcares, tamponando a perda de água durante a secagem na maturação.

Açúcares não redutores solúveis contribuem para a formação de um citoplasma vítreo em baixo teor de água em sementes maduras e células de pólen, o que poderia estabilizar estruturas celulares durante uma grave dessecação (WOLKERS et al., 2001).

Como as plantas acumulam açúcares e proteínas *LEA* no início da dessecação, é possível que os açúcares possam afetar estruturas moleculares de

proteínas *LEA* no estado vítreo (BATAGLIA et al., 2008). Por exemplo, em altos teores de água, proteínas *LEA* ligadas à tolerância a seca podem atuar como solutos compatíveis que preferencialmente excluem agentes caotrópicos (tais como sais) a partir da superfície de macromoléculas (LIU e ZHENG, 2005; BOUDET et al., 2006). Da mesma forma, quando o teor de água é reduzido (isto é, conteúdo de água inferior a 0,3 g/g), essas proteínas podem exercer os seus efeitos protetores no estado seco, como foi encontrado para trigo, substituindo as ligações de hidrogênio nas moléculas de água formando um “vidro” que estabiliza o sistema no estado seco (BUITINK e LEPRINCE, 2004; BOUDET et al., 2006).

Nas mitocôndrias das sementes tem sido observado, por meio da análise proteômica, segundo Macherel et al. (2007), a presença abundante de proteínas *LEA* e proteínas de choque térmico. Essas proteínas protegem as enzimas que atuam na respiração, contra danos causados pela dessecação no estado vítreo. Essas proteínas e seus RNAm desaparecem logo após a embebição, sendo assim, é possível que algumas *LEA* proteínas tenham duplo papel durante o ciclo da vida vegetal, e funcionam como uma proteína de reserva durante a germinação, bem como na tolerância à dessecação durante desenvolvimento da semente (MANFRE et al., 2009).

3.7. Proteínas de choque térmico (HSPs)

Estresse por calor é um dos principais fatores que limitam a produtividade e a adaptação de culturas, especialmente quando extremos de temperatura coincidir com estágios críticos de desenvolvimento da planta. O desempenho das plantas ocorre num regime de temperatura entre 10°C e 40°C. Temperaturas abaixo ou acima deste intervalo geral causam tensões induzidas pela temperatura (HSU et al., 2010; SOARES-CAVALCANTI et al., 2012).

No caso do estresse térmico, tanto a mudança da taxa de temperatura quanto a duração e do grau das altas temperaturas contribuem para a intensidade do estresse por calor. O grau de adaptabilidade de uma planta ao estresse térmico é um determinante da sua capacidade de sobreviver a um período nessas condições (EFEOGLU, 2009; SOARES-CAVALCANTI et al., 2012). Essa adaptabilidade é proveniente de genes usualmente encontrados em plantas submetidas ao déficit hídrico (JOSHI e NGUYEN, 1996).

Proteínas de choque térmico (HSPs) foram descobertas pela primeira vez por Ritossa (1962) como um conjunto de proteínas altamente conservadas, cuja expressão foi induzida por diferentes tipos de estresse. Foi mostrado subsequentemente que a maioria das HSPs tem forte efeito citoprotetor e se comportam como chaperonas moleculares em relação a outras proteínas celulares. A inapropriada ativação das vias de sinalização poderia ocorrer durante o estresse agudo ou crônico como um resultado de desdobramento da proteína, agregação de proteínas ou interrupção de complexos de regulação (SCHMITT et al., 2007).

As HSP são altamente conservadas e diversas classes têm sido descritas em eucariotos, inclusive em plantas (COOPER, 1997). As plantas sintetizam aproximadamente 21 tipos diferentes de HSPs e que são agrupados em 6 diferentes classes (KAUR et al, 2015). Baseadas em suas massas moleculares, essas proteínas são classificadas nas famílias HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e small *heat shock proteins* (sHSPs) (BAKTHISARAN et al., 2015).

De acordo com Bozaykut et al. (2014) as proteínas membros do HSP60 são chaperonas com a função de prevenir agregação por providenciar uma dobra correta, principalmente, de proteínas mitocondriais (CALDERWOOD, 2005). As HSP70 e HSP90 ligam-se a sequências de polipeptídeos desdobrados no citoplasma e induzem o enrolamento correto (MAYER e BUKAU, 2005). HSP27 faz o intermédio entre a retenção e o dobramento de proteínas de um modo independente de ATP (D'ANDREA e REGAN, 2003). O trabalho coordenado dessas chaperonas é importante para o eficiente dobramento de proteínas e a regulação da homeostase (BOZAYKUT et al, 2013).

A maior parte das HSP provavelmente funcione como chaperonas, que ajudam no correto dobramento ou na prevenção da desnaturação das proteínas (ZHU et al., 1993). Apesar de algumas HSP serem normalmente produzidas pela célula, durante situações de estresse há um aumento na produção de HSP. Como o estresse promove a desnaturação e a agregação de proteínas, uma maior síntese de HSP ajudaria a proteger essas proteínas durante o estresse osmótico que ocorre após a desidratação da célula (ZHU et al, 1997).

Segundo Sano et al. (2016), chaperonas tais como proteínas de choque térmico (HSPs) poderiam estar envolvidas na extensão da longevidade das sementes. Além da atividade semelhante à chaperona molecular na prevenção de agregação de proteínas /peptídeos, sHSPs tais como as Hsp27 e $\alpha\beta$ -cristalina, estão

envolvidas em diversas funções celulares, tais como a tolerância a estresse, proteínas dobráveis, a degradação da proteína, manutenção da integridade do citoesqueleto, morte celular, diferenciação, ciclo celular e a transdução de sinal e desenvolvimento (CHARETTE e LANDRY, 2000; BAKTHISARAN et al., 2015).

As HSPs foram recentemente sugeridas como tendo papel importante na tolerância à dessecação e longevidade (KAUR et al., 2015). Já Personat et al. (2014) observaram que a Heat Shock Factor A9 (*HaHSFA9*) aumentou a longevidade de sementes de tabaco transgênico (*Nicotiana tabacum* L.). A variabilidade da longevidade das sementes durante o armazenamento está correlacionada com os mecanismos de proteção contra danos durante o estresse oxidativo e envelhecimento. Ao lado dos resultados da expressão do gene HSP, análises de sementes transgênicas de tabaco indicam que sHSPs são positivamente correlacionada com a longevidade das sementes (PRIETO-DAPENA et al. 2006).

As proteínas de choque térmico foram relatadas como as preferencialmente expressas em sementes e, particularmente, durante o desenvolvimento, maturação e germinação, mas o destaque é o papel na tolerância à dessecação e longevidade em sementes (ZHOU et al, 2012; KAUR et al., 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas-Campus de Botucatu com a colaboração do Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e com o Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP)- Campus de Botucatu-SP.

4.1. Produção de sementes e caracterização dos estádios reprodutivos

As sementes utilizadas no trabalho foram provenientes da semeadura conduzida durante a safra agrícola 2013/2014 na Fazenda Experimental Lageado pertencentes à UNESP, Campus de Botucatu-SP.

Foi utilizada a cultivar convencional BRS 284, grupo de maturação precoce com ciclo de 120-126 dias. Antes da semeadura, foi realizada análise de solo (Tabela 3) e de acordo com as recomendações para São Paulo (RAIJ et al., 1997) foram aplicados 250 kg ha⁻¹ da formulação 02-20-20 nos sulcos para que fossem fornecidos 5 kg ha⁻¹ de N, 50 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 50 kg ha⁻¹ de K₂O.

Tabela 3. Propriedades químicas do solo de 0-0,2 m referente à área de semeadura anterior à semeadura da safra 2013/2014.

pH	MO	P _{resina}	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
CaCl ₂	g.dm ⁻³	mg.dm ⁻³		mmol _c .dm ⁻³					(%)
5,2	20	31	2,5	42	19	37	63	100	63

As sementes foram tratadas com fungicida (Vitavax-Thiram 200 SC na dose de 250 mL do produto comercial para cada 100 Kg de sementes), com o inseticida (Cruiser 700 WS na dose de 200 mL do produto comercial para cada 100 Kg de sementes) e, em seguida, inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* spp (na proporção de 100 mL do inoculante para 100 Kg de sementes). Durante a condução do experimento foram aplicados tratamentos fitossanitários, baseado em indicações do monitoramento regular de insetos-pragas e doenças conforme recomendações da tecnologia de produção de soja (EMBRAPA, 2012).

Foi feito o levantamento climático com dados de temperatura e precipitação fornecidos pelo Departamento de Energia na Agricultura da UNESP-FCA, referente ao período de condução do experimento (Figura 1).

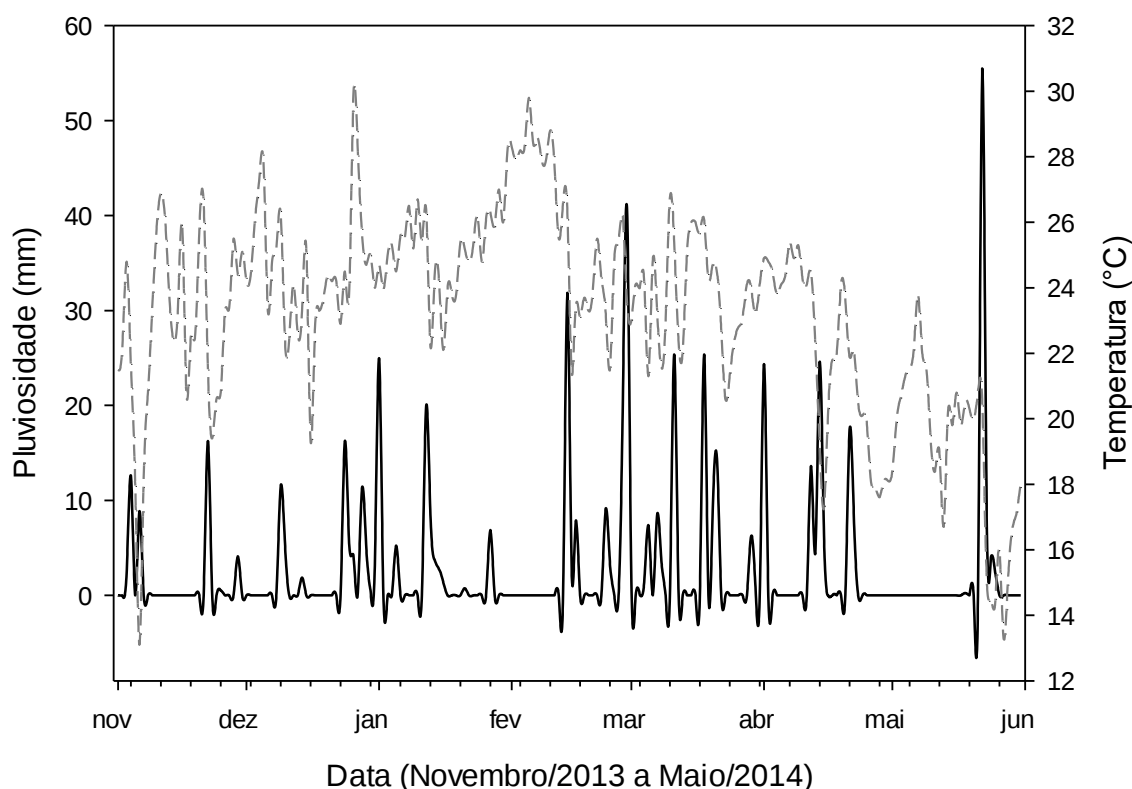


Figura 1. Levantamento climático e pluviométrico referente ao período de safra correspondente à Novembro/2013 à maio/2014. As linhas tracejadas correspondem à temperatura e as linhas contínuas se referem à pluviosidade.

As plantas foram conduzidas até a maturação plena, porém a partir do estágio reprodutivos R₁, quando os primeiros botões florais estavam formados, os mesmos foram marcados com fitas de cetim, para que pudessem ser devidamente identificados e acompanhados o número de dias após o florescimento (DAF). Os frutos foram coletados manualmente e as sementes extraídas a partir do estágio reprodutivo R_{5.1} até R₉ (Tabela 4 e Figura 2). No total foram utilizados 12 estádios reprodutivos.

Tabela 4. Descrição dos estádios reprodutivos das sementes de soja baseada no trabalho de Ritchie et al. (1994) com adaptações.

Estádios	Dias após o florescimento (DAF)	Descrição das sementes
R _{5.1}	25	Grãos perceptíveis ao tato (equivalente à 10% de granação)
R _{5.2}	25	Granação de 11 à 25%
R _{5.3}	27	Granação de 26 à 50%
R _{5.4}	27	Granação de 51 a 75%
R _{5.5}	36	Granação de 76 a 100%
R ₆	47	Grão cheio ou completo preenchendo totalmente as cavidades da vagem
R _{7.1}	57	Início da maturação com sementes verdes e eixo embrionário amarelo
R _{7.2}	63	Sementes amarelas com cotilédones esverdeados na porção central e vagens verdes
R _{7.3}	69	Sementes amarelas com vagem esverdeada
R _{8.1}	71	Início do declínio acentuado do conteúdo de água com vagem cor palha
R _{8.2}	73	Sementes com redução de tamanho e aspecto tenro
R _{8.3}	74	Sementes com baixo teor de água e aspecto “emborrachado”, vagem cor palha e seca
R ₉	77	Ponto de colheita com sementes com baixo teor de água e vagens “torcidas”. Campo com 95% das vagens maduras



Figura 2. Caracterização do desenvolvimento em sementes de soja. Vagens inteiras e abertas e sementes isoladas em diferentes dias após o florescimento. Barra corresponde a 1 cm. A caracterização foi realizada conforme Fehr e Caviness (1977) adaptado por Ritchie et al. (1994).

4.2. Determinação do teor de água

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105 ± 3 °C durante 24 horas de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), com duas repetições de 20 sementes. Os dados foram expressos em gramas de água por gramas de peso seco.

4.3. Determinação da Massa fresca e Massa seca das sementes

As sementes foram pesadas em balança de precisão de 0,001g para obtenção de massa fresca, utilizando duas repetições de 20 sementes. Em seguida, as mesmas foram colocadas em estufas de circulação de ar a 60°C até a estabilização da massa, obtendo a massa seca dessas sementes.

4.4. Germinação

A avaliação da germinação foi realizada com quatro repetições de 25 sementes. As sementes foram dispostas entre duas folhas de papel toalha do tipo germitest, umedecidas com água destilada em quantidade correspondente a 2,5 vezes a

massa do papel seco. Os rolos foram acondicionados dentro de sacos plásticos fechados mantidos em germinador regulado à temperatura de 25°C (BRASIL, 2009). As leituras foram realizadas diariamente, adotando como critério a protrusão da radícula com comprimento de 2 mm e os resultados foram expressos em porcentagem.

4.5. Aquisição da tolerância à dessecação

As sementes foram secas em ambiente com 42% de umidade relativa (UR) e 35°C gerada por uma solução de sal saturada de K_2CO_3 , de acordo com Chatelain et al. (2012) até aproximadamente 0,10 g H_2O por grama de peso seco independentemente do estágio fenológico. O tempo de secagem variou de 24 a 72 horas. As sementes foram consideradas tolerantes à dessecação quando germinaram após a secagem. A germinação das sementes foi realizada conforme descrito acima.

4.6. Estudo da aquisição da longevidade

Após secas, as sementes foram dispostas em caixas tipo gerbox contendo aproximadamente 150 sementes, de modo a não se sobreporem e ficaram em ambiente controlado com 75% de Umidade Relativa à 35°C por 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 e 85 dias. Após estes períodos, as sementes foram colocadas para germinar e a avaliação da porcentagem de sementes germinadas foi realizada conforme descrito anteriormente. Os resultados de longevidade foram definidos como tempo (em dias) para que as sementes percam 50% da viabilidade durante o armazenamento. Os resultados foram expressos em P50, calculados conforme Ellis e Roberts (1980).

4.7. Estudo do proteoma

As proteínas foram extraídas de sementes frescas coletadas a partir do estágio R7.1 até R9 e que estavam armazenadas à -80°C em ultra freezer. Quatro amostras de 250 mg de sementes (aproximadamente 10 sementes), foram moídas em nitrogênio líquido, usando um almofariz e pilão. A extração foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Gallardo et al. (2003), com modificações de José et al. (2011). Após a maceração, foi adicionado ao pó 800 µL de tampão de extração

uréia/tiouréia, contendo: uréia 7M, tiouréia 2M, Trizma HCl 18mM, 14mM base Trizma, 16 µL inibidor de protease (20 mg/mL), 12 unidades DNase I, 20 µL de RNase A (20mg/ml), 0,2% (v/v) de Triton X-100, 60mM de CHAPS e DTT 17.5mM e homogeneizado em gelo por 15 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C após a homogeneização. O sobrenadante contendo o extrato protéico total foi submetido a uma segunda centrifugação e posteriormente coletado com micropipeta e armazenado a -20 °C em alíquotas de 100 µL. A concentração das proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina bovina (BSA) como padrão.

4.7.1. Eletroforese bidimensional

As proteínas foram separadas primeiramente por Focalização Isoelétrica (IEF), usando gel em fita com 18 cm de comprimento com pH imobilizado, entre 4-7 (Immobiline Drystrips-Amersham Biosciences). As fitas para IEF foram reidratadas no suporte de reidratação individual em canaletas (Reswelling Tray Amersham Bioscience) por 15 horas a temperatura de 20°C, em tampão Tiuréia/Uréia, contendo, 7M uréia, 2M Tiuréia, 0,5%(v/v) IPG Buffer (Amersham Bioscience), 2% CHAPS (p/v), DDT (2,8 mg/ml) e azul de bromofenol. O volume final de 250 µL de tampão contendo 200 µg de proteína foram aplicados nas canaletas. Após a reidratação as fitas foram transferidas para suporte (Ettan IPGphor 3 Manifold) e cobertas com 108 ml de Drystrip Cover Fluid (Amersham Bioscience).

A focalização isoeletrica foi realizada utilizando o protocolo: 20°C a 500 V por 1 hora, 1000 V por 1 hora, 8000 V por 2:30 horas, 8000 V por 10 a 30 minutos na unidade de focalização Ettan IPGphor3 (GE Healthcare). Ao final da focalização isoeletrica, as fitas foram armazenadas em tubos a -80°C até o início da eletroforese na segunda dimensão.

Antes da eletroforese na segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em uma solução contendo 6 M uréia, 30% (v/v) Glicerol, 2% (p/v) SDS, 75mM Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8, 0,002% (p/v) Azul de Bromofenol 1%, com 65 mM DTT (primeiro passo), e com 0,2 M iodoacetamida (segundo passo - sem DTT), por 15 minutos cada passo, sob agitação. Ao final, as fitas foram mantidas na mesma solução, sob agitação, entretanto sem a adição de DTT ou iodoacetamida.

As fitas de gel equilibradas foram colocadas no topo de um gel vertical de poliacrilamida 9,4% (v/v) acrilamida/bis acrilamida, 0,3 M Trizma base pH 8,8, 0,08% (w/v) de persulfato de amônio e 0,04% (v/v) TEMED. As fitas foram seladas com agarose de baixo ponto de fusão 1% (w/v) contendo 0,2% (w/v) SDS, 50 mM base Trizma, 0,4 M glicina e traços de azul de bromofenol. Os géis permaneceram em repouso por 5 min para permitir a solidificação de agarose. A eletroforese foi realizada a 25 °C em tampão contendo 0,1% (w/v) SDS, glicina 95 mM e Trizma base 12,5 mM, por 20 minutos em 15mA/gel e 80V e 4,5 horas a 25mA/gel e 250V, numa cuba SE600. Foram utilizadas quatro repetições biológicas, obtidas por extrações independentes, para cada condição.

4.7.2. Coloração dos géis

Após a eletroforese (SDS-PAGE) os géis foram lavados em água destilada para remoção do excesso de tampão de corrida e imediatamente colocados em solução de fixação contendo 7% (v/v) de ácido acético, 40% (v/v) metanol, por 30 minutos. Em seguida, os géis foram transferidos para a solução de coloração contendo quatro partes da solução com 0,1% (p/v) de commassie brilliant blue G-250, 2% (v/v) ácido fosfórico e 15% (p/v) sulfato de amônio mais uma parte de metanol, submetidos a agitação, por 48 horas. Ao fim desse período, os géis foram neutralizados por 3 minutos em solução contendo 1,2% (p/v) tris-base, pH 6.5 aferido com ácido fosfórico. Posteriormente, foram lavados em solução contendo 40% (v/v) metanol e armazenados em solução contendo 5% (p/v) ácido acético.

Os géis corados foram digitalizados no ImageScanner III (GE), equipado com o programa LabScan 6.0 em modo transmissivo com 150 dpi, ajuste entre 2.8 a 3.3, bending de -2 a 1 e cor *grey*.

4.7.3. Análise dos géis

A análise dos géis foi realizada no software Image Master 2D Platinun v 7.05 (Ge Healthcare). Os parâmetros utilizados foram 2 (*Smooth*), 1 (*Saliency*) e 5 (*min area*) e o contraste utilizado foi o *grey* 1,3185. A autenticidade de cada “spot” foi validada por inspeção visual e editada quando necessário. Posteriormente, foram realizadas análises qualitativas de expressão protéica ANOVA

(<0,05) e *Fold* (>2) para identificação de “*spot*” exclusivos de cada grupo e suas diferenças de expressão gênica.

4.7.4. Digestão *in gel*

A digestão protéica “*in gel*” foi realizada segundo Shevchenko et al. (2006) com adaptações. Os *spot* de proteínas de interesse foram recortados dos géis, descoloridos com solução de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 e acetonitrila 50% (v/v). Em seguida, as proteínas contidas nos *spot* foram submetidas às etapas de redução e alquilação das pontes de dissulfeto na presença de DDT 10 mM e iodoacetamida (IAA) 55 mM, respectivamente. Após esta etapa, os géis foram desidratados com acetonitrila 100% (v/v), sendo então, submetidos a centrifugação a vácuo. Os spots desidratados foram incubados em uma solução 12,5 nmol/μL de tripsina (PROMEGA) em tampão bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0 durante 18 horas a 37°C. A hidrólise foi interrompida com a adição de ácido fórmico 1% (v/v) em relação ao volume da amostra e os sobrenadantes foram coletados e secos por centrifugação a vácuo, sendo então mantidos -20°C até serem analisados por espectrometria de massas.

4.7.5. Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas do tipo ESI-Q-ToF

Para análises de espectrometria de massas, foram feitas três repetições de cada amostra que continha material proteico proveniente de três repetições de géis. Foi utilizado um equipamento de espectrometria de massas do tipo electrospray (ESI) quadropolo, modelo MicrQ-TOF III (Bruker Daltonics), acoplado à um cromatógrafo líquido LC-20AT (Shimadzu).

Foi utilizado cromatógrafo líquido acoplado ao equipamento de espectrometria de massas composto por um sistema binário de bombas e um aplicador de amostras automático. A fase móvel consistiu de água (A) e acetonitrila (B), contendo ácido fórmico 0,1% (v/v). Em adição, a separação cromatográfica foi realizada por meio de uma coluna de fase reversa C18 (4,5 mm x 100 mm, 1,8 μm). As condições de eluição foram otimizadas num gradiente linear de 0 a 85% do solvente B por 60 minutos, num fluxo de 0,2 mL/min. A coluna e o aplicador automático de amostras

foram mantidos a 25°C e 10°C, respectivamente. O volume de injeção dos compostos de referência e das amostras foi de 2 uL. A espectrometria de massas (*eletrospray*) foi equipada com uma bomba de injeção de amostras automática (KD Scientific). O espectrômetro de massas atuou com 4.5 kV com temperatura de solvatação de 180°C, modo positivo em um intervalo de ionização entre 100 m/z a 1000 m/z, fluxo de nitrogênio de 6 L/min e pressão de 0.8 bar. As amostras foram solubilizadas em acetonitrila 50% (v/v) e TFA 0,1% (v/v) e injetadas usando um fluxo constante de 0,3mL/min. Para as análises de MS/MS foi utilizada o gás nitrogênio como gás de colisão. A energia de colisão utilizada foi de 1 a 200 eV. O equipamento ESI-Q-ToF foi calibrado no intervalo de massa/carga de 50 a 3000, utilizando calibrantes internos, sendo que a calibração externa foi realizada na presença de formiato de sódio. Os dados foram processados pelo software Bruker Data Analysis (versão 3.3) e analisados pelo software Mascot da Matrix Science e String 10.

4.7.6. Bioinformática proteômica

Após as aquisições dos resultados de espectrometria de massas de cada amostra, os dados foram exportados e submetidos à análise automática utilizando a ferramenta MASCOT (v2.1). Os espectros dos peptídeos e das fragmentações obtido experimentalmente foram confrontados com o conjunto de sequências de peptídeos alocada no banco de dados SwissProt. Para aumentar a precisão na determinação das proteínas, foram utilizados os seguintes parâmetros: Enzima: Tripsina como agente de clivagem; Carbamidometilação (cisteína) como modificação fixa; Oxidação (metionina e triptofano) como modificação variável; N° de clivagens perdidas pela enzima: 1; Massa molecular do tipo: Monoisotópica; Massa molecular: sem restrições; Erro de tolerância de peptídeos $\pm 0,1$ Da e erro de tolerância de MS/MS $\pm 0,1$ Da para análise de MS/MS; Protonação: +2, +3 e +4 para o estado da carga dos peptídeos; Tipo de instrumento: ESI-Quad-ToF.

Após a análise dos dados através do MASCOT, as proteínas de interesse foram identificadas com o auxílio de base de dados como o NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>), Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) e String (<http://string-db.org/>).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização fisiológica da maturação de sementes de soja

Desde o começo da granação, no estágio R5.1, houve aumento gradativo do tamanho das sementes até o estágio R6. No estágio R 7.1, as sementes possuem os cotilédones verdes, porém o eixo embrionário já apresenta coloração amarela. No estágio seguinte (R 7.2), o fruto apresenta a coloração amarelada assim como as sementes, todavia a parte central dos cotilédones ainda tem coloração verde. A partir de R 7.3, devido a degradação de clorofila, os frutos e sementes estão totalmente amarelos e a cor palha predomina com o avanço da maturação. Nos estádios subsequentes as sementes diminuem de tamanho e, aparentemente, tornaram-se endurecidas de forma a possibilitar a colheita no estágio R9.

Na Figura 3 observa-se que as sementes acumularam matéria seca ao longo da maturação com o máximo atingido em R7.2 com o conteúdo de água de $1,32 \pm 0,02$ g H₂O/g peso seco. A partir desse estágio, o acúmulo de matéria seca se estabilizou, indicando o final do enchimento das sementes. Em seguida, o conteúdo de água decresceu próximo a 0,12 g H₂O/g peso seco atingindo o ponto de colheita das sementes. Como houve uma diminuição acentuada no conteúdo de água das sementes em um curto período de tempo compreendido entre R8.2 e R9, houve a necessidade de considerar um ponto intermediário entre esses dois estágios fenológicos, sendo considerado estágio R8.3.

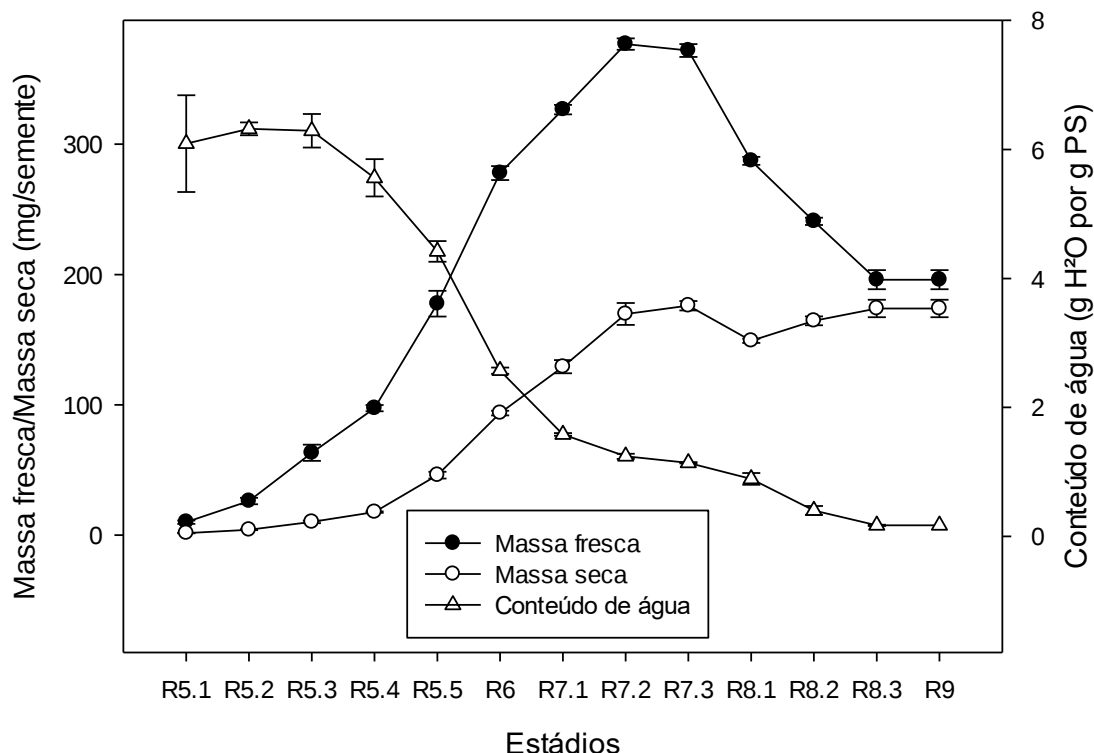


Figura 3. Mudanças no Massa Seca (mg/semente) e no Massa Fresca (mg/semente) e no Conteúdo de Água (CA/gH₂O por g PS) em sementes de soja. Os dados são médias de quatro repetições de 20 sementes cada. Barras representam desvio padrão.

A capacidade de germinação foi adquirida progressivamente durante o desenvolvimento, tendo atingido a porcentagem máxima (100%) em R 7.1. A aquisição da tolerância à dessecação, definida como a capacidade da semente em germinar após a secagem (abaixo de 0,10g/H₂O gPS), iniciou a partir do estágio R7,1 e em R 7.2 atingiu a máximo de tolerância à dessecação (Figura 5). Portanto, a aquisição da germinação iniciou primeiro do que a aquisição da tolerância à dessecação. A longevidade foi testada em sementes a partir do estágio R7.1 até o estágio R 9.

A Figura 4 representa a resposta das sementes ao armazenamento, observa-se que em R 7.1, as sementes não sobrevivem às condições adversas impostas, porém a partir da aquisição da tolerância à dessecação houve aumento progressivo da porcentagem de sementes viáveis por períodos maiores de armazenamento. Assim, longevidade é progressivamente adquirida ao longo da maturação de sementes de soja e teve o seu máximo atingido do estágio R9.

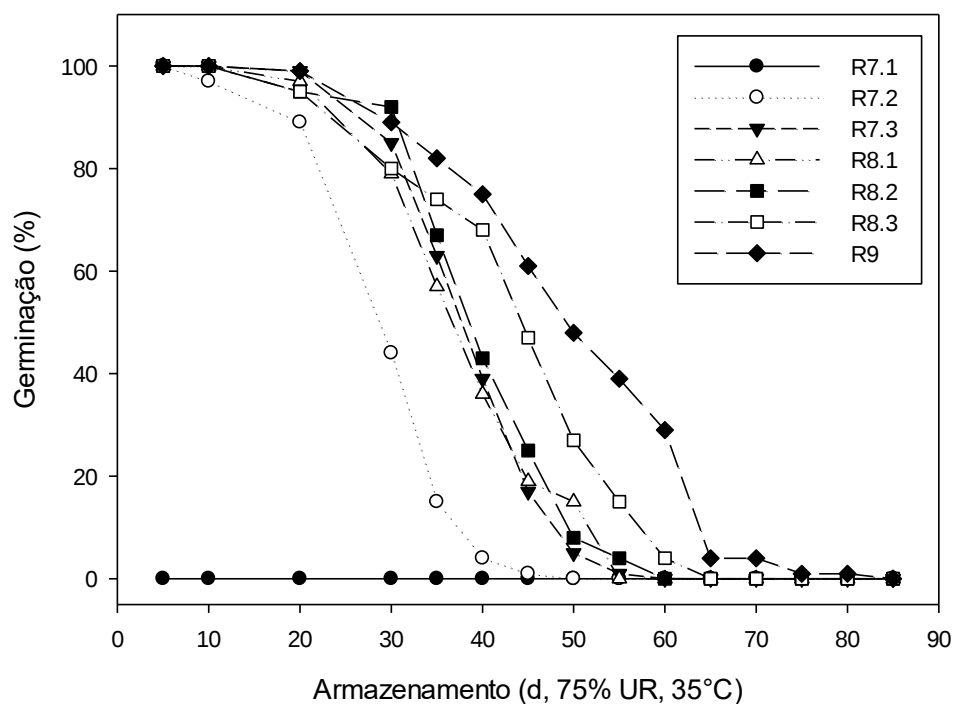


Figura 4. Mudanças na porcentagem germinação de sementes secas nos diferentes estádios de maturação e armazenamento.

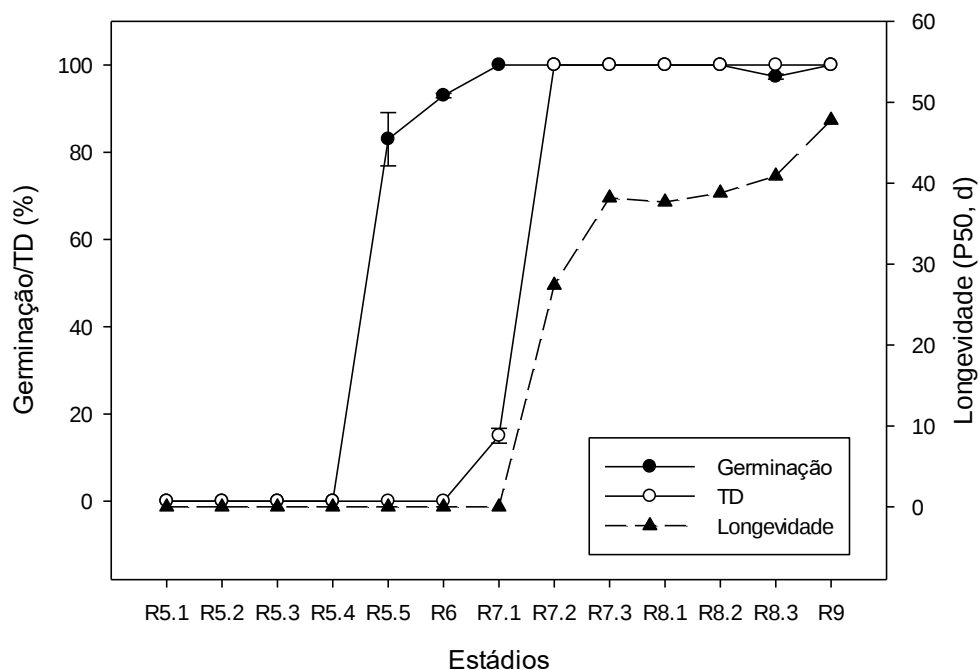


Figura 5. Germinação de sementes úmidas (●) em comparação à Aquisição de Tolerância à Dessecação (TD) (○) e Longevidade (▲) durante a maturação de sementes de soja.

5.2. O estudo do proteoma durante a maturação de sementes de soja

A verificação da integridade das proteínas extraídas foi realizada em gel de agarose 1D (Figura 6A). Na primeira coluna à esquerda, foi utilizada uma amostra controle, e as demais colunas correspondem aos estádios fenológicos. Posteriormente foi feito gel 2D de teste utilizando um perfil isoelétrico de 3-10 com 200 μ g de proteínas. De acordo com a Figura 6B, a quantidade de proteína utilizada foi suficiente para promover nitidez dos *spots*, porém o perfil isoelétrico de 3-10 teve a visibilidade de *spots* pequenos reduzida, ou seja, proteínas menos abundantes possivelmente permaneceram ocultas. A fita de pI (ponto isoelétrico) de 4-7 propiciou o detalhamento das proteínas.

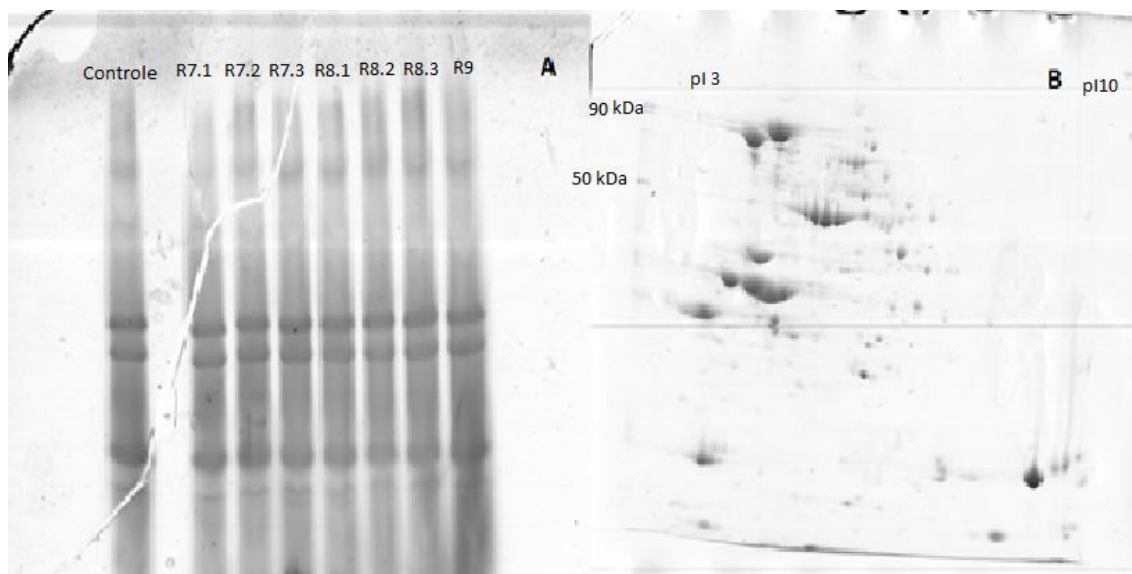


Figura 6. (A) Gel integridade de dos estágios reprodutivos da soja com uma amostra controle e (B) Gel teste, perfil isoelétrico de 3-10 e teste com 200 μ g de amostra proteica.

Na Figura 7, visualmente observa-se diferença na quantidade de *spot* ao longo da maturação das sementes de soja. Os géis referentes a cada estágio fenológico possuem em média 340 *spots*, 416 *spots*, 403 *spots*, 495 *spots*, 397 *spots*, 417 *spots* e 341 *spots* de R7.1 a R9 respectivamente.

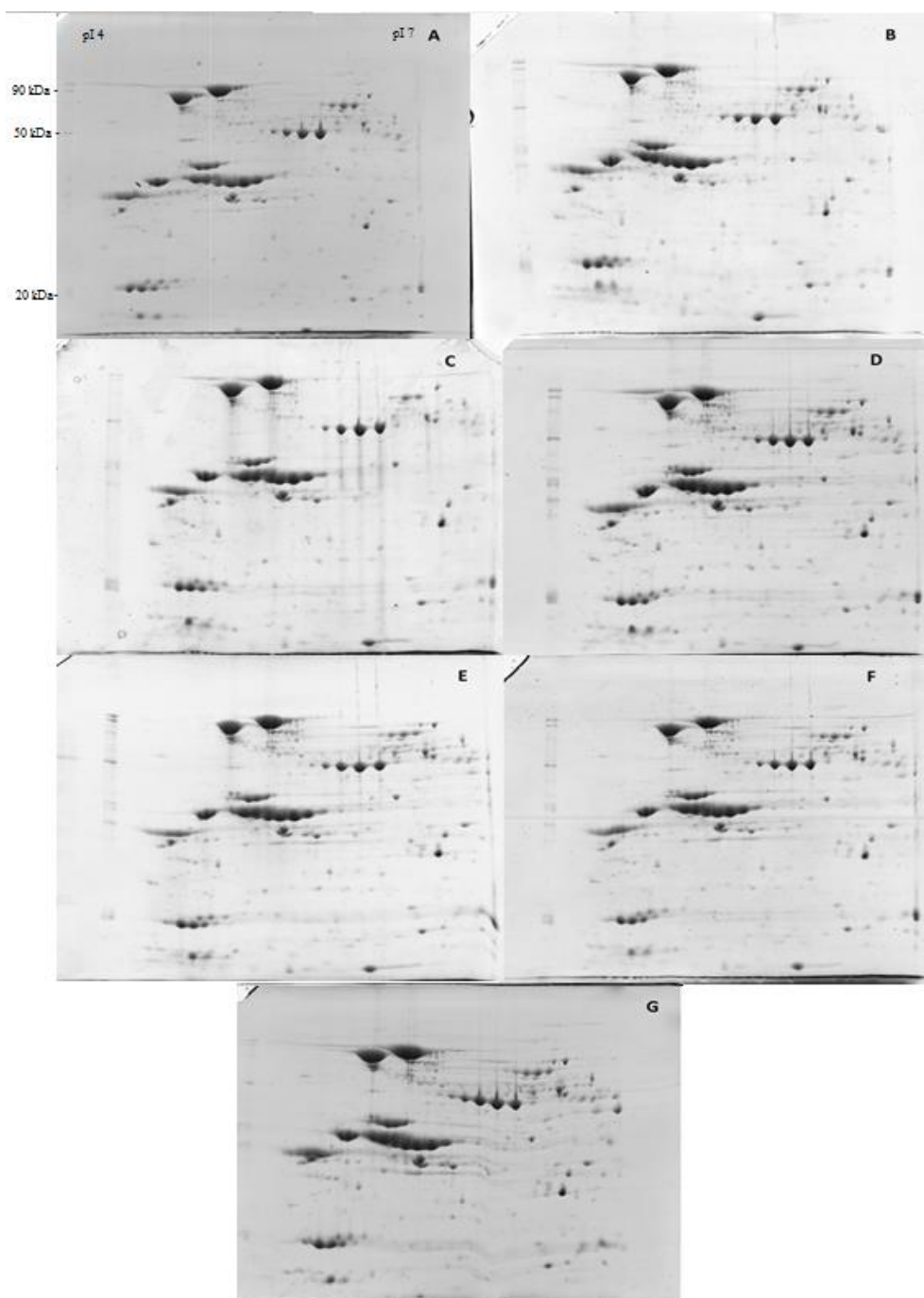


Figura 7. Diferença do proteôma de sementes de soja ao longo da maturação. Os géis 2D mostram as proteínas em R7.1 (A), R7.2 (B), R7.3 (C), R8.1 (D), R8.2 (E), R8.3 (F) e R9 (G).

5.3. Estudo do proteoma associado com a fase final da maturação em sementes de soja

Os *spots* com diferença de expressão juntamente aos exclusivos de cada estágio fenológico totalizaram 167 proteínas identificadas (Anexo 1, Tabela 6).

De todas elas, somente trinta e cinco apresentaram diferença de expressão em relação ao estágio R7.2, utilizado como referência por ser o ponto de maturidade fisiológica (Tabela 5). Entre as proteínas que apresentaram diferença em expressão as proteínas *LEA* e *HSPs* possuem relação com a aquisição de longevidade e tolerância à dessecação de sementes de várias espécies (Figura 8). As proteínas selecionadas com *fold change* maior que 2.

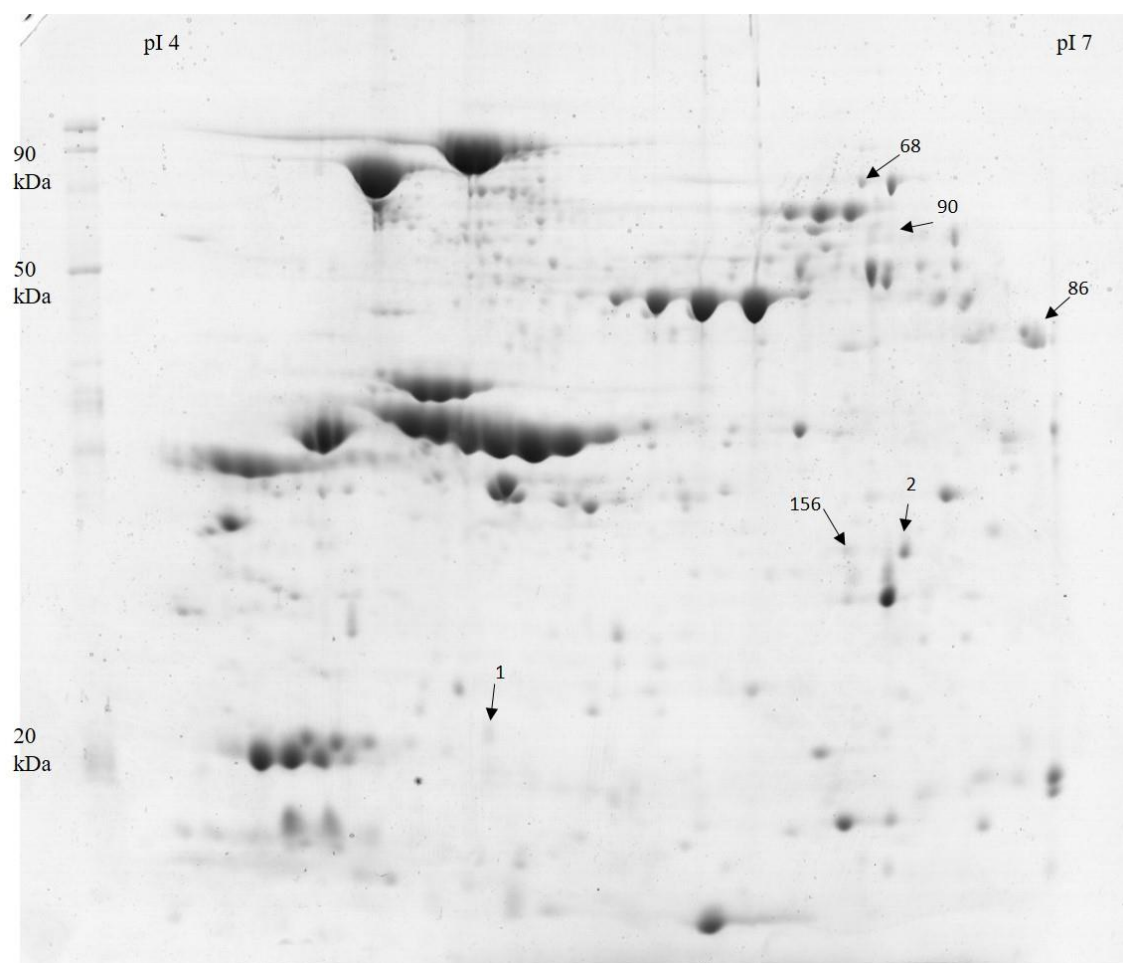


Figura 8. Gel de referência de R7.2 com diferença de expressão ao longo da maturação de sementes de soja. Duzentos microgramas de proteínas foram separados por SDS-PAGE usando uma fita de 13 cm com pI 4-7.

Tabela 5. Proteínas identificadas por espectrometria de massas, dos estádios R71 a R9, que apresentam diferença de expressão na maturação tardia em sementes de soja em relação à R7.2.

Spot	Nome da Proteína	Nº Acesso	Fold
1	Late embryogenesis abundant protein B19.3-like [<i>Glycine max</i>]	gi 356568122	2,26
2	Dehydrin [<i>Glycine max</i>]	gi 119709430	3,24
3	PREDICTED: SNF1-related protein kinase regulatory subunit gamma-like PV42a-like [<i>Glycine max</i>]	gi 571503823	5,99
4	Alpha subunit of beta conglycinin, partial [<i>Glycine max</i>]	gi 9967357	2,29
5	Alpha subunit of beta conglycinin, partial [<i>Glycine max</i>]	gi 9967357	2,64
61	Beta conglycinin beta subunit, partial [<i>Glycine max</i>]	gi 63852207	1,97
62	Glycinin [<i>Glycine max</i>]	gi 18641	2,70
63	Glycinin [<i>Glycine max</i>]	gi 18641	2,53
64	Unknown [<i>Glycine max</i>]	gi 255636164	4,89
65	51 kDa seed maturation protein [<i>Glycine max</i>]	gi 414977	1,81
66	Alpha subunit of beta conglycinin, partial [<i>Glycine max</i>]	gi 9967357	2,25
67	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [<i>Glycine max</i>]	gi 9967361	2,36
68	LEA protein [<i>Glycine max</i>]	gi 1389897	2,64
84	Unknown [<i>Glycine max</i>]	gi 255645102	4,75
85	RecName: Full=P34 probable thiol protease; Flags: Precursor	gi 129353	2,76
86	LEA protein [<i>Glycine max</i>]	gi 311698	3,00
88	PREDICTED: sucrosebinding protein like [<i>Glycine max</i>]	gi 356536206	3,76
90	Late embryogenesis abundant protein [<i>Glycine max</i>]	gi 170010	3,83
91	PREDICTED: ruBisCO large subunitbinding protein subunit beta, chloroplastic like [<i>Glycine max</i>]	gi 356556926	2,13
92	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [<i>Glycine max</i>]	gi 9967361	2,17
122	Unnamed protein product [<i>Glycine max</i>]	gi 18543	4,20
123	Glycinin [<i>Glycine max</i>]	gi 1772306	2,10
124	Unnamed protein product [<i>Glycine max</i>]	gi 218336143	2,24
125	Beta-conglycinin alpha-subunit [<i>Glycine max</i>]	gi 15425633	2,04
130	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [<i>Glycine max</i>]	gi 9967361	2,37
134	RecName: Full=Lectin; AltName: Full=Agglutinin; AltName: Full=SBA; Flags: Precursor	gi 126151	4,96
135	PREDICTED: sucrose-binding protein-like [<i>Glycine max</i>]	gi 356536206	4,48
155	Glycinin subunit G2 [<i>Glycine max</i>]	gi 18637	2,78
156	Dehydrin [<i>Glycine max</i>]	gi 37495451	7,47
157	RecName: Full=Lectin; AltName: Full=Agglutinin; AltName: Full=SBA; Flags: Precursor	gi 126151	3,63
158	Glycinin subunit G1 [<i>Glycine max</i>]	gi 18635	2,60
159	PREDICTED: sucrosebinding protein-like [<i>Glycine max</i>]	gi 356536206	2,43
160	Late embryogenesis abundant protein [<i>Glycine max</i>]	gi 170010	4,67
161	PREDICTED: sucrosebinding protein-like [<i>Glycine max</i>]	gi 356536206	2,00
162	PREDICTED: sucrosebinding protein-like [<i>Glycine max</i>]	gi 356536206	3,34

5.3.1 O proteoma associado com a aquisição de tolerância à dessecação e/ou longevidade em sementes de soja

O estudo do perfil de proteínas foi dedicado as *LEAs*, desidrinas e *HSPs*, devido o conhecimento prévio de que essas proteínas têm associação com a aquisição de tolerância à dessecação e longevidade, não descartando a importância das demais.

Os *spots* 2 e 156 são proteínas identificadas como sendo desidrinas (Figura 9A-B). O *spot* 2 corresponde à uma desidrina do tipo *DNH11* ou *MAT1* e sua expressão aumentou ao longo da maturação. Assim, as desidrinas podem estar presentes nos mecanismos de tolerância à dessecação, como ilustrado na figura 9A, onde há um aumento na intensidade dos *spot* de R7.1 a R7.3. Essa proteína pode estar relacionada à processos importantes em sementes de soja como a tolerância à dessecação e longevidade se mantendo presente em altas quantidades a partir de R7.3 DAF. Porém, esta desidrina interage com proteínas relacionadas à composição química e formação das sementes (Figura 10A-B) como a lipoxigenase (Lx1), *seed binding protein* (SBP2) que é uma proteína relacionada à tolerância à dessecação. A desidrina (*spot* 156) é do tipo *MAT9* e pode-se observar aumento na expressão de R7.3 a R8.3, período que compreende a aquisição de longevidade das sementes de soja (Figura 9B).

A desidrina *MAT9* possui relação direta com proteínas de choque térmico (*sHSPs*) e *LEAs* do grupo 5 (Figura 10A-B) que são proteínas relacionadas à aquisição de longevidade.

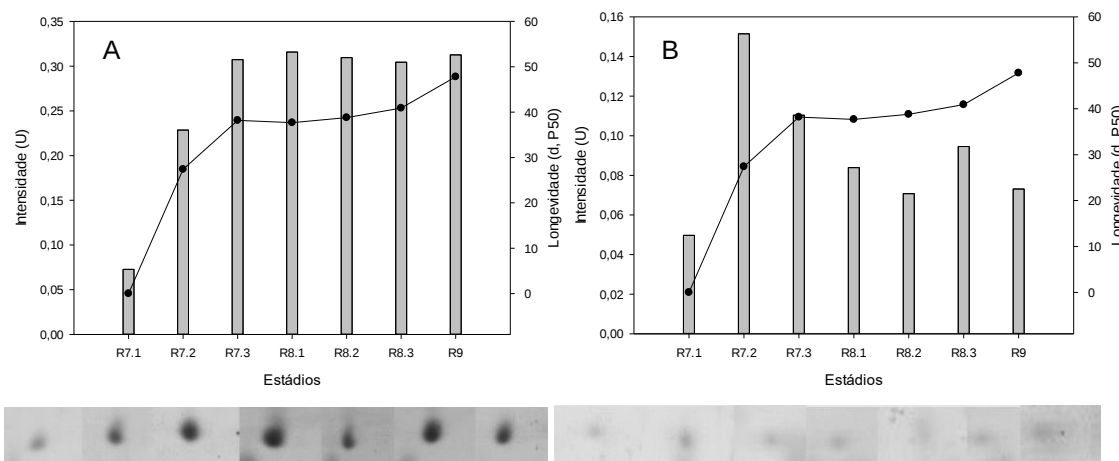


Figura 9. Mudanças de intensidade dos *spots* com comportamento similar à aquisição de Longevidade em sementes de soja. Ganho gradual (barras) em relação à Longevidade em P50 (linha). Dehidrina *MAT1* (Spot 2) (A); Dehidrina *MAT9* (Spot 156) (B).

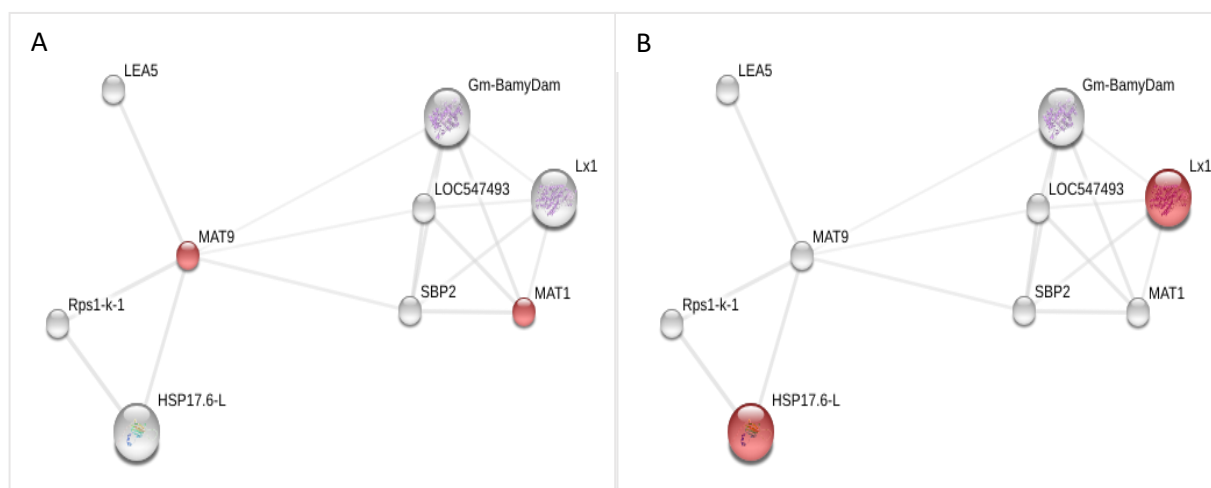


Figura 10. Rede de interações entre os 2 grupos de dehidrinas presentes durante a maturação de sementes de soja. As dehidrinas *MAT1* e *MAT9* estão representadas em vermelho (A). As proteínas *HSP* e Lipoxigenase são as que têm função intracelular e interagem diretamente com as dehidrinas de interesse (B).

O *spot 1* é uma proteína do grupo 5 das proteínas *LEA* em que a expressão aumenta gradativamente até o estágio R8.1, onde há a sua máxima expressão (Figura 11A). Em seguida, a expressão decresceu e diminui consideravelmente no ultimo estágio de desenvolvimento da semente. Como mostra a Figura 13, a *LEA* (GLYMA18G43320.1) correspondente à proteína do *Spot 1*, interage com ácido abscísico (GLYMA13G39340.2, GLYMA13G22061.1, GLYMA19G37910.1 e GLYMA10G08370.1).

A proteína *LEA* (*spot* 68) (Figura 11B) é uma biotina do tipo SBP65, seu aumento a partir de R7.3 e sua alta concentração que persiste até o final do desenvolvimento pode relacioná-la com aquisição de longevidade. Interage diretamente com o grupo 5 das proteínas *LEAs* (Figura 14).

A *LEA* correspondente ao *spot* 86, é pertence ao grupo 3 (Figura 12A). Há um aumento de concentração a partir de R 8.1 com o pico em R 8.3 o que pode relacioná-la com aquisição de longevidade.

A *LEA* correspondente ao *spot* 90 é do tipo MP2 e pertence ao grupo 3. Sua relação com a TD é contrária como observado na Figura 12B , onde mesmo com alta presença, há uma diminuição de R7.1 para R7.2. Porém sua alta expressão a partir de R7.3 pode relacioná-la à participação de mecanismos de proteção e aquisição de longevidade.

As proteínas MP2 e SBP65 interagem diretamente junto com a PM24 que também é uma proteína de maturação (figura 14).

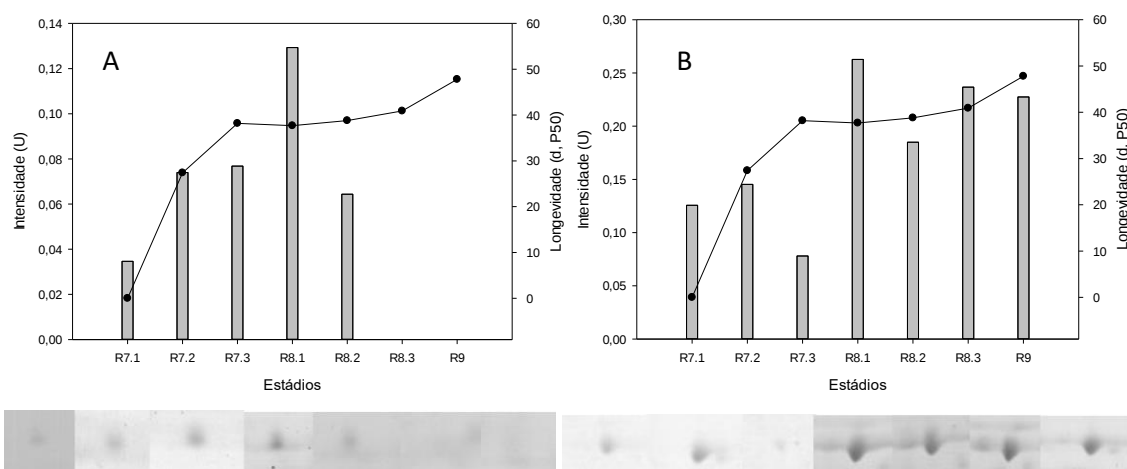


Figura 11. Mudanças de intensidade dos *spots* com comportamento similar à aquisição de Longevidade em sementes de soja. Ganho gradual (barras) em relação à Longevidade em P50 (linha). *LEA_5* (*Spot* 1) (A); *LEA SBP65* (*Spot* 68) (B).

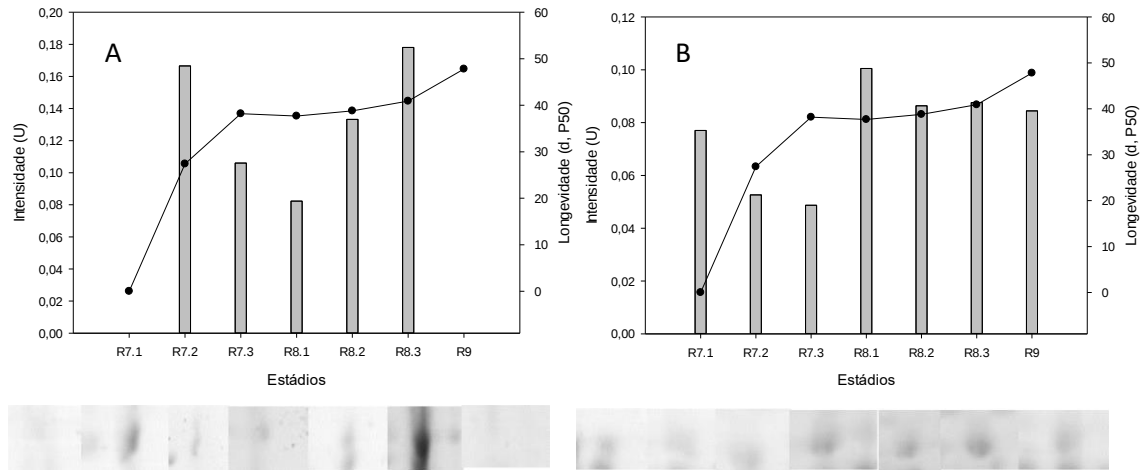


Figura 12. Mudanças de intensidade dos *spots* com comportamento similar à aquisição de Longevidade em sementes de soja. Ganho gradual (barras) em relação à Longevidade em P50 (linha). *LEA 51kDa* (Spot 86) (A); *LEA MP2* (Spot 90) (B).

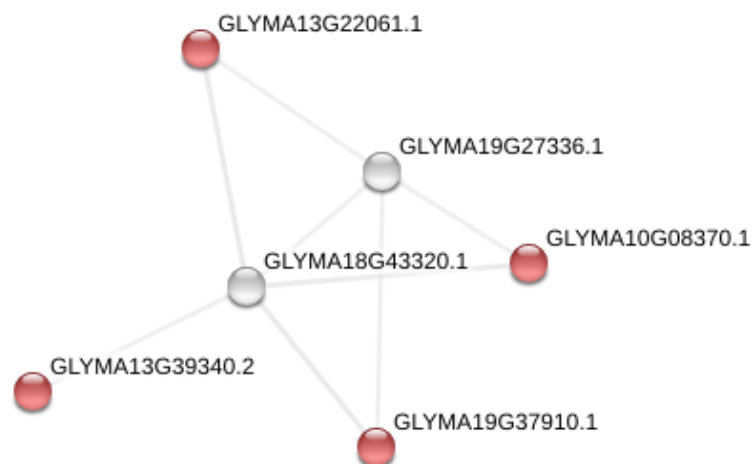


Figura 13. Rede de interações entre *LEAs* presentes durante a maturação de sementes de soja. As associações mais fortes são representadas pelas linhas mais grossas. O *spot* 1 (GLYMA18G43320.1) e a relação direta com ácido abscísico (ABA) proteínas destacadas em vermelho.

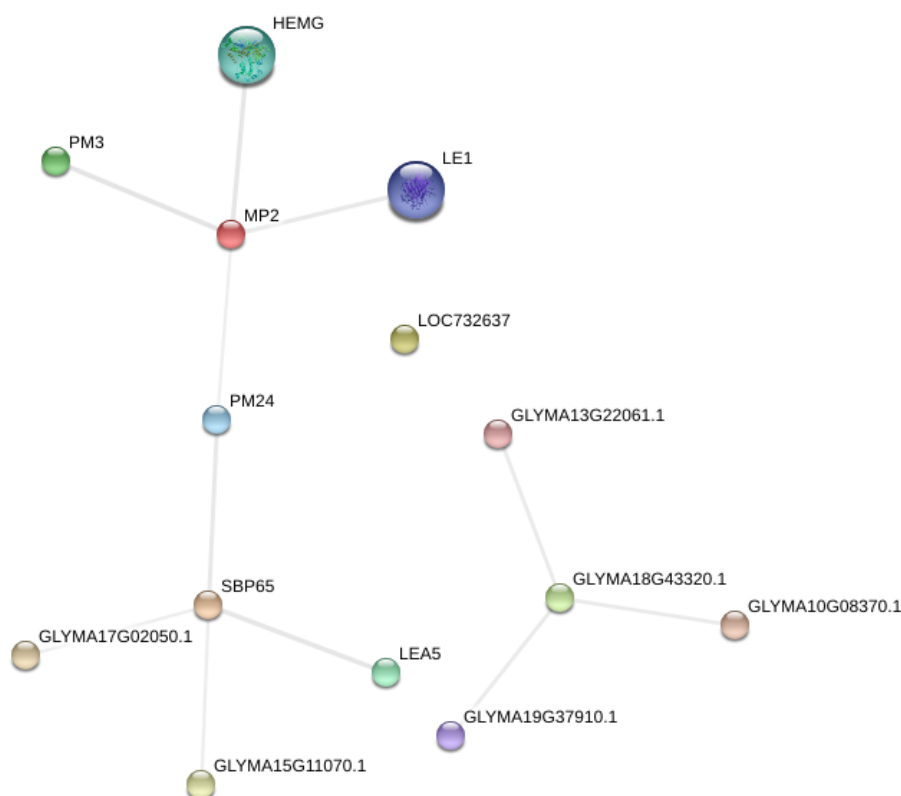


Figura 14. Rede de interações entre os 4 tipos de *LEAs* presentes durante a maturação de sementes de soja. As proteínas *MP2*, *SBP65*, *LOC732637* (51 kDa *Maturation*) e *GLYMA18G43320.1* (*LEA 5*) e suas relações proteicas.

Na figura 15, estão a porcentagem de proteínas de *LEAs*, Dehidrinas e *maturation proteins* exclusivamente encontradas em cada estágio fenológico. As maiores porcentagens foram observadas a partir da maturidade fisiológica (R 7.2) com a maior concentração em R8.1 (36%). A maior parte das proteínas *LEAs* presentes em R 8.1 são a *SBP65* e a dehidrina é a *MAT9*, o que confirma uma possível relação dessas proteínas com mecanismos relacionados à aquisição de longevidade.

As demais proteínas exclusivas de cada estágio estão relacionadas à reserva.

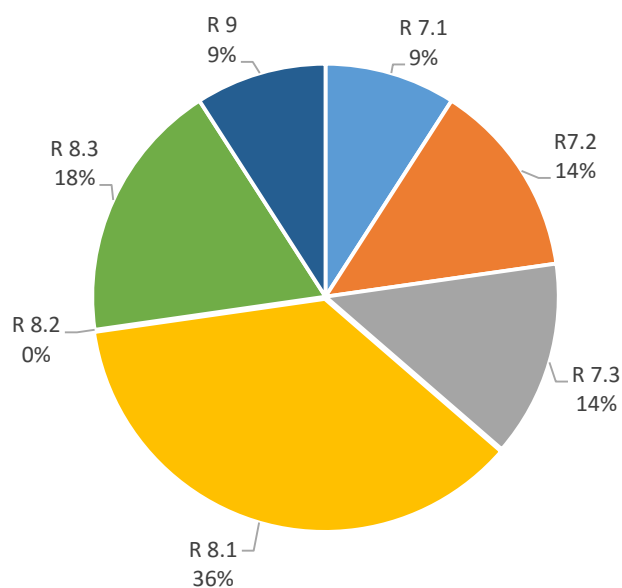


Figura 15. Acúmulo de *LEAs*, Dehidrinas e *seed maturation protein* presentes durante a maturação de sementes de soja.

Das 167 proteínas que compõe o perfil proteômico, 48 foram identificadas e inseridas em rede de relações (Figura 16). Esses grupos foram separados em 8 proteínas que participam de processos biológicos (Figura 17) e 12 que atuam em processos moleculares (Figura 18).

Os grupos proteicos que interagem são compostos basicamente por proteínas de reserva ou atuam em rotas metabólicas relacionadas.

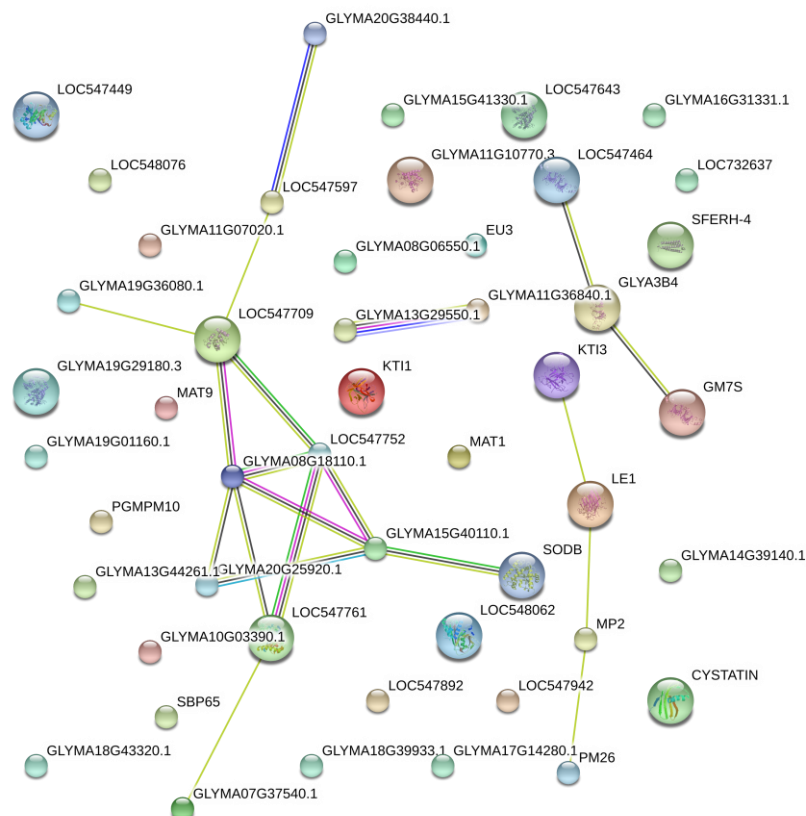


Figura 16. Rede de interações entre todas as proteínas presentes durante a maturação de sementes de soja.

A proteínas que interagem participando de processos biológicos similares são a ferritina (SFERH-4), superóxido dismutase (SODB), Alpha beta coglicinina (GM7S), inibidor de tripsina Kunitz (KTI1), thiol protease vacuolar (LOC548062), nucleoside (LOC547709), sucrose (GLYMA10G03390.1) e inibidor de tripsina (KTI3). As proteínas citadas anteriormente também participam de processos moleculares juntamente com a albumina 2S (LOC548076), glicinina (GLYA3B4) e lectina (LE1).

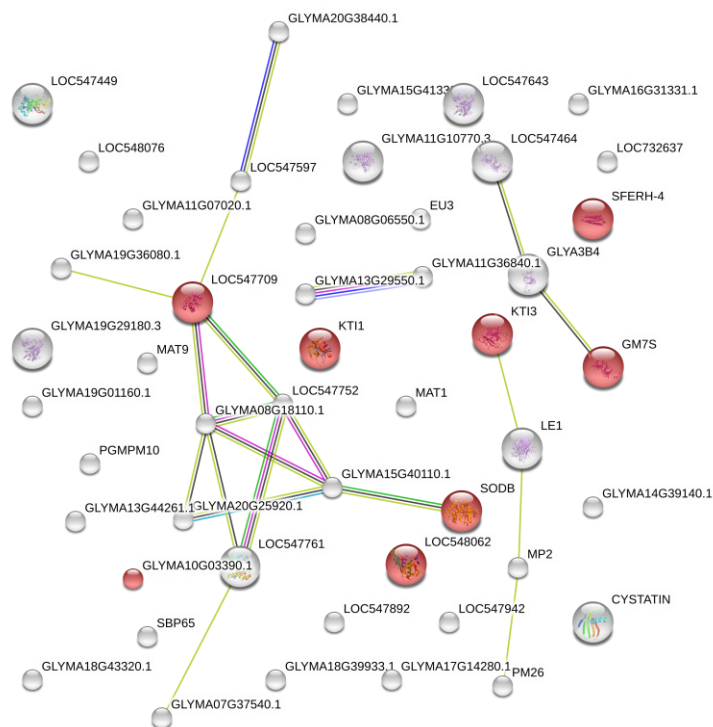


Figura 17. Rede de interações entre todas as proteínas presentes durante a maturação de sementes de soja. As proteínas em destaque participam de processos biológicos em sementes de soja.

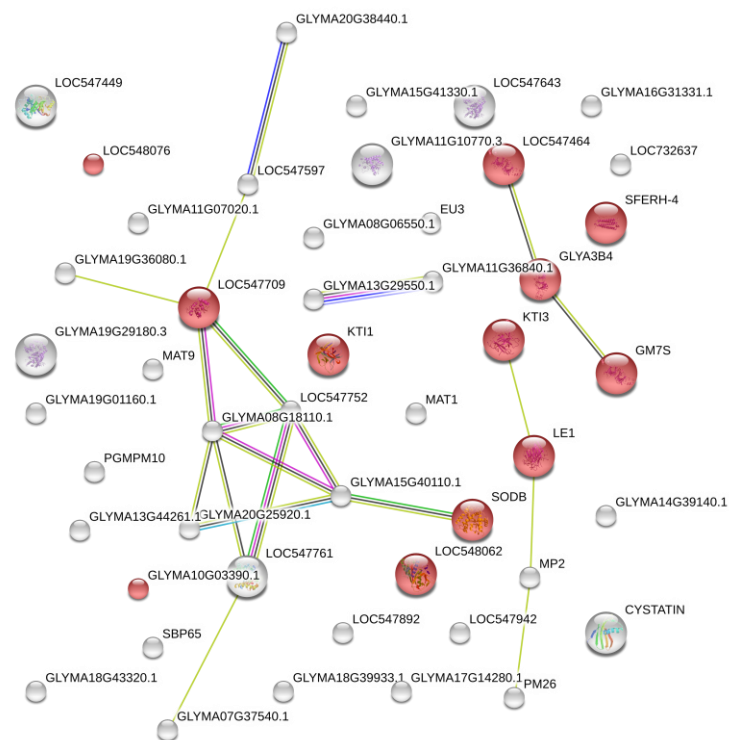


Figura 18. Rede de interações entre todas as proteínas presentes durante a maturação de sementes de soja. As proteínas em destaque participam de processos moleculares em sementes de soja.

6. DISCUSSÃO

Saldivar et al. (2011) trabalhando com diferentes cultivares de soja observaram que o tamanho da semente aumenta até atingir o valor máximo nos estádios R6 - R7 e diminuiu depois. O mesmo foi observado no presente trabalho em que a semente preenchia totalmente o lóculo da vagem no estágio R6, pois posteriormente houve um decréscimo do conteúdo de água. Eles também observaram que as sementes de soja permaneceram verdes durante os estádios R5 e R6 e começaram a adquirir a cor amarelada no estágio R7 (TEKRONY et al., 1979) o que difere do encontrado aqui, pois no estágio R 7.1 as sementes ainda se encontravam verdes. Somente no estágio R 7.3 as sementes e vagens apresentaram a cor amarela.

O desenvolvimento da semente acontece em três fases onde a fase I é caracterizada pelo acúmulo rápido de massa fresca da semente, o que correspondeu ao período compreendido pelos estádios R5.1 até R7.1. Na fase II ocorre acúmulo de material de reserva e o teor de água diminui enquanto a matéria seca substitui a água nas células, período semelhante aos estádios R7.2 e R7.3 onde houve um “platô”. Já a fase III ocorreu o declínio rápido do teor de água e da diminuição da massa fresca. A partir dessa fase há a redução gradual no metabolismo da semente, semelhante ao comportamento do final da maturação das sementes avaliadas, entre os estádios R8.1 e R9 (BEWLEY e BLACK, 1994).

Segundo Vilella (1998), após a maturação fisiológica, o declínio do teor de água das sementes passa, muitas vezes, de uma forma mais acelerada, até que

ele começa a oscilar de acordo com a umidade relativa do ar quando a colheita não for efetuada com antecedência. A diminuição do conteúdo de água se assemelha ao presente trabalho, pois a partir de R7.1 houve queda gradativa até o ponto de colheita. E como, posterior ao ponto de maturidade fisiológica, a semente está desligada da planta mãe, observou-se uma queda significativa de conteúdo de água entre R8.1 e R8.3, podendo, após esse período, sofrer danos por variação da umidade relativa.

Quanto ao acúmulo de matéria seca, após o ápice em R7.2/R8.1, a partir de R7.3 não houve acúmulo significativo. Segundo Jones et al. (2010), em R7, o acúmulo de massa da semente é quase completo, e a absorção de nutrientes desacelera. Os dados mostram que, diferentemente de Jones e colaboradores (2010), o acúmulo de massa é completo em R7.2. Porém estes dados estão de acordo com o proposto por Carlson e Lersten (2004), que observaram que nesta fase a água é perdida e o acúmulo de massa fresca total das sementes diminui juntamente com o desaparecimento do sistema de revestimento vascular.

Ritchie e colaboradores (1996) trabalhando com sementes de soja obtiveram o pico de massa fresca da cultivar Williams, com cerca de 400-500 mg; a semente continha com cerca de 60 % de umidade. Na cultivar BRS 284 utilizada neste trabalho, o pico de massa fresca foi com aproximadamente 377 mg de matéria fresca por semente e o conteúdo de água foi de 56,2% de umidade. Os mesmos autores observaram que à medida que as sementes começam a secar e ficarem amarelas, elas se tornam capazes de germinar, no entanto, a maioria ainda é incapaz de suportar o crescimento das plântulas. Os dados obtidos mostram que as sementes ainda verdes, como em R7.1 já possuem alta porcentagem de germinação. Veiga et al (2007) afirmam que a semente de soja apresenta maturidade fisiológica caracterizada pelo máximo acúmulo de matéria seca, com aproximadamente 45% a 50% de umidade (ANDREWS, 1966) e isto ocorre, geralmente, quando as sementes (e também as vagens) tornam-se amarelas ou tenham perdido completamente a cor verde (RITCHIE et al., 1994), oposto do observado no presente trabalho onde as sementes na maturidade fisiológicas ainda se encontravam esverdeadas e a umidade das sementes era de 56,2%. O máximo de acúmulo de matéria seca em R7.2 vai de acordo com o proposto por Marcos-Filho (2015) que relaciona o ponto de maturidade fisiológica com o máximo de acúmulo de matéria seca. Já Harrington (1972) que afirma que a maturidade fisiológica consiste também na máxima qualidade da semente diferindo do observado, pois a longevidade foi adquirida após a maturidade fisiológica.

Segundo Fehr e colaboradores (1971), a maturidade fisiológica de sementes de soja foi alcançada na fase de desenvolvimento reprodutivo R7. No entanto, no presente trabalho a maturidade fisiológica foi atingida no estágio R7.2, e não no R7, considerando o máximo acúmulo de matéria seca, germinação e tolerância à dessecação. Todavia, a longevidade é adquirida progressivamente ao longo do desenvolvimento, a partir de R7.3 com o máximo em R9. Portanto, as sementes de soja precisam de mais alguns dias, a partir do máximo acúmulo de matéria seca, de germinação e de tolerância à dessecação, para maximizar a sua qualidade, ou seja, obter o máximo de longevidade.

Desta forma nossos resultados confirmam que a qualidade fisiológica de sementes de soja é adquirida progressivamente após a maturidade fisiológica (máximo acúmulo de matéria seca). Além disso, pode-se afirmar que existem aproximadamente 14 dias entre o máximo acúmulo de matéria seca e a ponto de colheita das sementes de soja, quando a umidade da semente está em torno de 10% (base úmida).

A tolerância à dessecação de sementes contribui para a longevidade, como exemplo pode ser citado o que ocorre em sementes recalcitrantes, que são sensíveis à dessecação e não podem ser armazenadas por longos períodos (ANGELOVICI et al., 2010). Além disso, tem sido relatado que a longevidade das sementes aumenta gradualmente durante a maturação e após a aquisição de tolerância à dessecação (VERDIER et al., 2013). Enquanto a tolerância à dessecação é adquirida durante o desenvolvimento de sementes, a longevidade aumenta progressivamente durante a fase final da maturação das sementes (CHATELAIN et al., 2012; RIGHETTI et al., 2015), o mesmo foi obtido com o máximo de aquisição de longevidade no final da maturação (R9). Comportamento semelhante ao encontrado nos resultados apresentados onde a longevidade foi adquirida progressivamente durante o final da maturação, mais especificamente, a partir de R7.3. Resultados semelhantes são observados no presente trabalho onde a longevidade iniciou a aquisição 6 dias após máxima tolerância à dessecação (estádio R7.3).

Segundo Bewley et al. (2013), embora vários fatores influenciem a longevidade das sementes, as duas mais importantes são grau de umidade e temperatura. Com a diminuição do conteúdo de água das sementes, mesmo em alta temperatura e umidade relativa, com a maturidade as sementes de soja adquiriram

progressivamente mecanismos de proteção aumentando a capacidade de armazenamento mesmo em situações adversas.

Esse resultado vai de acordo com Righetti et al. (2015) onde afirmam que a maturação de sementes é composta por uma fase de deposição de reserva de armazenamento e a fase de secagem, que é menos caracterizada. Além disso, durante a maturação, as sementes adquirirem características fisiológicas que são cruciais para o sucesso no estabelecimento de plântulas no campo, tais como germinação vigorosa e homogênea. Estes traços mostram a capacidade notável das sementes de serem submetidas à dessecação completa sem a perda de viabilidade (tolerância à dessecação) e a de permanecerem viáveis por longos períodos de tempo, quando armazenadas no estado seco (longevidade) (BUTINK e LEPRINCE, 2010).

Os componentes protetores que têm sido abordados, por serem importantes na aquisição de tolerância à dessecação durante o desenvolvimento da semente, são as proteínas e os açúcares solúveis. As proteínas *LEAs* (*Late abundant embryogenesis*) são acumuladas no final da embriogênese e antes do final da dessecação das sementes (DURE et al., 1989). Estas proteínas são responsáveis por facilitar a retenção de água, estabilizar a membrana e sequestrar íons (DURE, 1993) assim como proteger o conteúdo do citoplasma durante o processo de desidratação das sementes (BLACKMAN et al., 1995). Neste trabalho foi observado o acúmulo de proteínas LEA a partir de R7.1 e houve aumento da expressão em R8.1, coincidindo com o aumento na aquisição da longevidade.

As desidrinas são uma classe de proteínas *LEA* que são expressas na fase tardia da maturação da semente (SAMARAH et al., 2006). Aparentemente, desidrinas estão envolvidas na aquisição de tolerância à dessecação de plantas. Em soja, duas desidrinas, *MAT1* e *MAT9*, foram clonadas a partir de embriões durante a fase de dessecação da maturação, e um gene (*DHN*) a partir de folhas desidratadas (CLOSE, 1997; MOMMA et al., 2003).

Segundo Chyan e Kriz (1992) as desidrinas, grupo 2 (*DHN11*) das *LEAs*, de sementes de soja (*Mat1*) possui uma massa molecular de 31 kDa e é sintetizada durante a fase de dessecação da maturidade do embrião que corresponde com o comportamento encontrado, onde seu ponto máximo foi em 69 DAF, período logo após à aquisição de tolerância à dessecação, que é descrita aos 63 DAF. A *Mat1* é também membro da família das proteínas relacionadas à maturação e aquisição de tolerância à dessecação de sementes (BLACKMAN et al., 1991).

As proteínas pertencentes ao grupo 2 das LEAs têm como uma das principais funções a sobrevivência em condições de seca (TUNNACLIFFE e WISE, 2007). Algumas desidrinas são “super-reguladas” e relacionam-se ao estresse abiótico e padrões de expressão semelhantes foram encontrados após tratamento das folhas de plantas com o hormônio vegetal ácido abscísico (ABA). Porém, indução de desidrinas pelo estresse (e de outras proteínas LEA), pode ser dependente de ABA (HUNDERTMARK e HINCHA, 2008).

A capacidade das desidrinas de manterem as sementes viáveis a longos períodos de armazenamentos, pode ser proveniente da capacidade que essas proteínas têm de fazer com que a semente sobreviva à períodos longos em situações de estresse como a desidratação celular causada por seca, salinidade, frio, calor, entre outras (HANIN et al., 2011).

Kleinwächter et. al. (2014) afirmam que a ocorrência da secagem na maturação induz várias reações de estresse relacionados à seca, como a expressão de desidrinas. Os mesmos autores relatam que quando a perda de água não ocorre, as respostas ao estresse correspondentes não são induzidas e, então não há a presença de mecanismos de proteção. Em consequência, as sementes continuam sensíveis à dessecação e perdem a sua viabilidade quando armazenadas por um longo período. Em contrapartida, as sementes que obtiveram o processo de secagem de maturação são tolerantes à dessecação e estão habilitadas a manterem a viabilidade durante o armazenamento.

Segundo Dalahaie et al (2013), não há dúvidas que as desidrinas juntamente com algumas proteínas *LEA* são relevantes para a tolerância à dessecação e longevidade das sementes durante o armazenamento. O que possivelmente ocorre com a *MAT9*, que está diretamente relacionada com uma proteína de choque térmico e proteínas *LEA* do grupo 5.

Manfre et al. (2009) observaram duas classes de proteínas, em *Arabidopsis thaliana*, com maior probabilidade contribuir à estabilidade celular em sementes maduras e essas incluem as pequenas proteínas de choque térmico (sHSPs) e as proteínas *LEA*.

As sHSPs, se acumulam no final do desenvolvimento da semente (WEHMEYER e VIERLING, 2000), o que pode ajudar a minimizar os efeitos de agregação e condensação do citoplasma (FEDER e HOFMANN, 1999) por agirem

como chaperonas moleculares e, assim, contribuir para a estabilização de um estado vítreo. As proteínas *LEA* são uma classe diversificada de proteínas altamente abundantes, estáveis ao calor que se acumulam no final de maturação de embriões e durante o período de desenvolvimento regulando a desidratação até final do desenvolvimento da semente.

Soares e colaboradores (2015) trabalhando com sementes de *Adenantha pavonina* observaram que as proteínas de maturação e estáveis ao calor de alguma forma desempenham um papel importante nas interações das sementes com a água, protegem as sementes contra o dano causado pela dessecação. Sabe-se que a manutenção da capacidade de tolerar a dessecação depende da ação conjunta e integrada dos diferentes mecanismos de reparação em sementes. A falta ou ineficiência de um ou mais mecanismos de proteção determina o grau de sensibilidade à dessecação em diferentes espécies (BERJAK e PAMMENTER, 2013).

Embora pouco se saiba sobre o grupo 5 das proteínas *LEA*, há este outro grupo onde os dados disponíveis indicam que as suas traduções acumulam durante a fase tardia de desenvolvimento de sementes e em resposta a condições de *stress* como a seca, a luz UV, salinidade, frio e fermento (KIM et al., 2005). No milho, *RAB28* (*LEA* do grupo 5) foi encontrada acumulada no nucléolo de células do escutelo de embriões secos (NIOGRET et al., 1996). Em *Medicago truncatula*, MtPM25 (*LEA* grupo 5) é altamente induzida pela seca (BOUDET et al., 2006).

Já a SBP65 está ligada à uma *seed maturation protein* (PM 24) e uma *LEA_5* (Figura 14), e isso pode ter uma relação com funções associadas com a aquisição de tolerância à dessecação, pois possui uma alta concentração, mesmo antes da maturidade fisiológica que perdura na maturidade o que também pode relacioná-la com aquisição de longevidade. Alternativamente, esgotando o *pool* de biotina livre durante as fases tardias de maturação do embrião, essas proteínas podem ajudar células embrionárias para entrar e /ou para manter uma característica de estado de repouso de sementes maduras secas (BEWLEY e BLACK, 1994).

Curiosamente, a SBP65 compartilha muitas características fisiológicas e moleculares com proteínas *LEA* que se acumulam no amadurecimento das sementes quando eles começam a desidratar e são propostas para proteger os tecidos de sementes contra danos induzidos por dessecação (DURE, 1993).

Hsing et al. (1998) encontraram homólogos putativos da SBP65 de ervilha e em sementes de soja. Esta descoberta foi possível pela recente clonagem de

um cDNA de soja que codifica para uma proteína chamada SMP (GenBank adesão n°. U59626) que pertence à família de proteínas relacionadas à maturação da semente, uma subclasse de proteínas *LEA*, e mostra semelhança da sequência com a SBP65 de ervilhas (JOB et al., 2001).

Outro grupo de *LEAs* presentes é o grupo 3 onde a análise da expressão de algumas proteínas vegetais deste grupo, bem como a informação disponível a partir de transcritos mostra a sua acumulação nas sementes maduras e em resposta à desidratação, salinidade ou baixas temperaturas (HSING et al., 1995; ROMO et al., 2001).

Assim como as *LEAs* de outros grupos, a expressão das proteínas pertencentes ao grupo 3 parecem ser reguladas pelo ABA durante estádios de desenvolvimento específicos e/ou sob condições de estresse (DONG e DUNSTAN, 1997; BATAGLIA et al., 2008). Assim, a proteína *LEA* (LOC732637) (Figura 14) pode estar relacionada a aquisição de longevidade mesmo que seu acúmulo não seja expressivo após a fase de aquisição de tolerância à dessecação e mesmo ela não tendo relação direta com nenhuma proteína.

O período de maturação é marcado não somente pela perda de água, mas também pelas mudanças dinâmicas na natureza das proteínas a serem sintetizadas. Essas proteínas são chamadas de proteínas de maturação (ou *LEAs*). A síntese e o acúmulo dessas proteínas sugerem que elas estão relacionadas à tolerância à dessecação, dormência de sementes, conteúdo de ABA e transição para o crescimento de plântulas (WEI et al., 1994).

Segundo Da Siva et al. (2005) a maturação de sementes começa quando os embriões interrompem a divisão celular e começam um processo de aumento do volume, devido ao acúmulo das proteínas e compostos de reserva. Esta transição está diretamente correlacionada com um aumento no conteúdo de ABA nas sementes (WANG et al. 1998). O que pode estar diretamente relacionado com o aumento da expressão até o estágio R8.1 e este fato pode estar ocorrendo em conjunto com a ativação de mecanismos protetivos da semente antes de grande perda d'água nos estádios finais da maturação e assim sua relação com a aquisição de longevidade.

Três proteínas foram correlacionadas à tolerância à dessecação e entre eles, duas destas foram relatadas por participarem diretamente do processo, são as

homólogas da PM18 e MP2 em soja e a proteína biotinilada SMP65, de ervilha (BOUDET et al., 2006).

A proteína tipo MP2 é a isoforma básica de PM18, e todas as isoformas de SBP65. Esta proteína possui um papel protetor durante condições hiperosmóticas de forma melhor do que na falta de água. Assim, acredita-se que a ligação dessas proteínas com a tolerância a seca pode exercer funções sobre a perda de água hipoteticamente devido a açúcares não redutores, que age sobre os osmólitos durante o estresse hiperosmótico e estabilizar macromoléculas no estado seco (HOEKSTRA et al., 2001; BOUDET et al., 2006).

As MP2 são proteínas ligadas diretamente com a PM24 e SBP65, que possuem funções voltadas à aquisição de longevidade e TD (Figura 14), confirmando o que foi citado anteriormente.

Assim como mostram as figuras 16, 17 e 18, as proteínas identificadas formam grandes redes de interação que podem contribuir para a aquisição de tolerância à dessecação e longevidade. Estas redes são formadas não só por LEAs, desidrinas e HSPs, mas também por proteínas de armazenamento e funções enzimáticas que também são importantes e necessitam de maiores estudos futuros.

A identificação aprofundada de todas as redes interativas de proteínas presentes durante o desenvolvimento e maturação de sementes de soja é importante para criação de programas futuros de melhoramento genético, usando como ferramentas a transformação de plantas e marcadores moleculares. A aquisição de sementes com maior longevidade logo após o desligamento da planta mãe reduz os riscos de perdas de qualidade em campo aumentando a produtividade e, se necessário, o tempo de armazenamento.

7. CONCLUSÕES

A tolerância à dessecação é adquirida no estágio R7.2 e a longevidade em sementes de soja é adquirida a partir do estágio R 7.3, com o máximo no estágio R9.

As proteínas desidrata do tipo *MAT1* e *LEAs* do tipo *SBP65* e *MP2* estão relacionadas com a aquisição de tolerância à dessecação.

As proteínas desidrata do tipo *MAT9* e as *LEAs* do grupo 3 (*51 kDa maturation*, *SBP65* e *MP2*) e do grupo 5 (*Small hydrophilic plant seed protein*) estão relacionadas com a aquisição de longevidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRENS, C.H.; BRUNNER, E.; QELI, E.; BASLER, K.; AEBERSOLD, R. Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 11(11), p. 789-801, 2010.
- ANDREWS, C. H. Some aspects of pod and seed development in Lee soybeans. Tese (Ph.D.). 75 f. **Mississippi State University, State College**, 1966.
- ANGELOVICI, R.; GALILI, G.; FERNIE, A.R.; FAIT, A. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends Plant Science**, v. 15, p. 211-218, 2010.
- BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 806-814, 2008.
- BARBOSA, E.B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G.M.; HENRIQUE, T.; MARQUI, A.B.T.; TAJARA, E.H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.
- BAKTHISARAN, R.; TANGIRALA, R.; RAO, C.M. Small *heat shock proteins*: Role in cellular functions and pathology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1854, p. 291–319, 2015.
- BATAGLIA, M.; OLVERA-CARRILLO, Y.; GARCIARRUBIO, A.; CAMPOS, F.; COVARRUBIAS, A. The Enigmatic *LEA* Proteins and Other Hydrophilins. **Plant Physiology**, v. 148, 2008.
- BAUD, S.; BOUTIN, J.P.; MIQUEL, M.; LEPINIEC, L.; ROCHAT C. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiological Biochemistry**, v.40, p.151-160, 2002.
- BAUD, S.; DUBREUCQ, B.; MIQUEL, M.; ROCHAT C.; LEPINIEC, L. Storage Reserve Accumulation in *Arabidopsis*: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling. **American Society of Plant Biologists**, doi: 10.1199/tab.0113, 2008.

- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Front Plant Science**, v. 4, p. 1-9, 2013.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. New York: **Plenum Press**, 367p, 1985.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. New York: Plenum, 445 p. 1994.
- BEWLEY, J. D. et al. **Seeds**: physiology of development, germination and dormancy. 3th ed. New York Heidelberg Dordrecht London: Springer, 2013.
- BIES, N. et al. Accumulation and degradation of Em proteins in *Arabidopsis thaliana*: evidence for post-transcriptional controls. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p. 1925–1933, 1998.
- BHARDWAJ, A. K.; VINOTHKUMAR, K.; RAJPARA, N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. **Recent patents on anti-infective drug discovery**. v. 8, p. 68–83, 2013.
- BLACKMAN, S. A.; WETTLAUER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 868-874, 1991.
- BLACKMAN S.A., OBENDORF R.L., LEOPOLD A.C. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. **Physiology Plant**. 93:630-638. 1995.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany Special**, n 91, p. 179-194, 2003.
- BOUDET, J.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A.; ROGNIAUX, H.; LARRE, C.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. Comparative Analysis of the Heat Stable Proteome of Radicles of *Medicago truncatula* Seeds during Germination Identifies Late Embryogenesis Abundant Proteins Associated with Desiccation Tolerance. **Plant Physiology**. Vol. 140, 2006.
- BOZAYKUT, P.; SOZEN, E.; KAGA, E.; ECE, A.; OZALTIN, E.; EK, B.; et al. Therole of heat stress on the age related protein carbonylation. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 238–254, 2013.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem**. 72:248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNAD/DNDV/CLAV, 398 p., 2009.
- BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. **Cryobiology**. 48: 215–228, 2004.
- BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Desiccation tolerance: From genomics to the field. **Plant Science**. 179: 554–564, 2010.
- CALDERWOOD, S.K. Evolving connections between molecular chaperones and neuronal function. **International Journal Hyperthermia**, v. 21, p. 375–378, 2005.

- CÂMARA, G.M.S. **Fenologia da soja. Informações Agrônomicas**, n.82, p.1-6, 1998.
- CARLSON, J.B.; LERSTEN, N.R. Reproductive morphology. Soybeans: Improvement, Production, and Uses Madison WI: American Society of Agronomy Boerma HR. **Specht JE**, p. 59-95, 2004.
- CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, editora Artmed, 2004.
- CHATELAIN, E.; HUNDERTMARK, M.; LEPRINCE, O.; LE GALL, S.; SATOUR, P.; DELIGNY-PENNICK, S.; ROGNIAUX, H.; BUITINK, J. Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. **Plant, Cell and Environment**, v.35, pags. 1440–1455, 2012.
- CHYAN, Y.J.; KRIZ, A.L. Analysis of maturation-specific genes: structure, desiccation induction, and abscisic acid responsiveness. PhD thesis, **University of Illinois**, Urbana-Champaign. 1992.
- CHARETTE, S.J.; LANDRY, J. The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 926, p. 126–131, 2000.
- CLOSE, T.J. Dehydrins: a commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiology Plant**, v. 100, p. 291–296, 1997.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quarto levantamento**, janeiro 2013, 29 p, Brasília, 2016.
- COOPER, G. M. The cell: A molecular approach. **ASM Press**, 673pp, 1997.
- COSTA NETO, P. R. e ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. **Química Nova**, v.23, p. 4, 2000.
- D'ANDREA, L.D.; REGAN, L. TPR proteins: the versatile helix. **Trends in Biochemical Science**, v. 28, p. 655–662, 2003.
- DAM, S.; DYRLUND, T.F.; USSATJUK, A.; JOCHIMSEN, B.; NIELSEN, K, et al. Proteome reference maps of the *Lotus japonicus* nodule and root. **Proteomics**, 2013.
- DALAHAE, J.; HUNDERTMARK, M.; BOVE, J.; LEPRINCE, O.; ROGNIAUX, H.; BUITINK, J. *LEA* polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated *LEA* protein abundance linked to desiccation tolerance. **Journal Experimental Botany**, v. 64, p. 4559–4573, 2013.
- DALAL, M.; TAYAL, D.; CHINNUSAMY, V.; BANSAL, K.C. Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 *LEA* from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. **Journal of Biotechnology**, v. 139, n. 2, p. 137–145, 2009.
- DA SILVA, E.A.A.; TOOROP, P.E.; JAAP NIJSSE, J.; BEWLEY, J.D.; HILHORST, H.W.M. Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. **The Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 1029-1038, 2005.

- DELOUCHE, J.C. Environmental effects on seed development and seed quality. **Horticultural Science**, v 15, p. 775-780, 1980.
- DONG, J.Z.; DUNSTAN, D.I. Characterization of cDNAs representing five abscisic acid-responsive genes associated with somatic embryogenesis in *Picea glauca*, and their responses to abscisic acid stereostructure. **Planta**, v. 203, p. 448–453, 1997.
- DURE III, L. S. Seed formation. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 26, p. 259–278, 1975.
- DURE, L.; CROUCH, M.; HARADA, J.; HO, T.D.; MUNDY, J.; QUATRANO, R.; THOMAS, T.; SUNG, Z.R. Common amino acid sequence domains among the *LEA* proteins of higher plants. **Plant Molecular Biology**, v. 12, p. 475-486, 1989.
- DURE III, L. Structural motifs in *LEA* proteins, in Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress, **The American Society of Plant Physiologists**, 91–103 10.1104/pp.105.072967, 1993.
- EFEOLU, B. Heat shock proteins and heat shock response in plants. **Gazi University Journal of Science**, v. 22, p. 67-75, 2009.
- ELLIS, R.H.; ROBERTS, E.H. Towards a rational basis for testing seed quality. **Seed production**, p. 605-635, 1980.
- ELLIS, R. A.; ROBERTS, E. H. The quantification of aging and survival in orthodox seeds. **Seed Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 373-409, 1981.
- ELLIS R.H.; PIETRA FILHO, C. Seed development and cereal seed longevity. **Seed Science Research**. v.2, p.9-15, 1992.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja**: região central do Brasil: 2012. 255 p. Londrina, 2012.
- EVANGELISTA, B.A.; SILVA, F.A.M.; SILVA NETO, S.P. Uso das informações agrometeorológicas no monitoramento das culturas agrícolas, tendo como referência a soja. In: Anuário **ABRASEM**. Pelotas: Editora Becker & Peske, p.38-42, 2013.
- FAIT, A.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; OHAD, I.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FERNIE, A.R.; GALILI, G. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. **Plant Physiology**, v.142, p.839-854, 2006.
- FARIAS, J.R.B. Soja. In: **Agrometeorologia dos cultivos**: o fator meteorológico na produção agrícola. (Org) MONTEIRO, B.A. INEMET. Brasília, 530p, 2009.
- FEDER, M.E.; HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243 – 282, 1999.
- FEHR, W.R. et al. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v.11, n.6, p.929-931, 1971.
- FEHR, W.R. CAVINESS, C.E. **Stage of soybean development**. Iowa State University. Special report 80, p. 25-26p, 1977.

- FRANÇA-NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; LORINI, I.; HENNING, F.A. A relação de alto vigor e a produtividade. **A Granja**, n.789, ano 70, p.34-37, 2014.
- GALLARDO K., et al. Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. **Plant Physiology**, v 133, p. 664–682. 2003.
- GHASSEMI-GOLEZANI, K.; KHOMARI, S.; DALIL, B.; HOSSEINZADEH-MAHOOTCHY, A.; CHADORDOOZ-JEDDI, A. Effects of seed aging on field performance of winter oilseed rape. **Journal Food Agriculture and Environment**, v.8, p. 175-178, 2010.
- GRENE R Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. **Arabidopsis Book 1**: e0036, 2002.
- GROOT, S.; SURKI, A.A.; VOS, R.; KODDE, J. Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analysing seed ageing under dry conditions. **Annual Botany**, v.110, p. 1149-1159, 2012.
- GRUWEZ, R.; LEROUX, O.; DE FRENNE, P.; TACK, W.; VIANE, R.; VERHEYEN, K. Critical phases in the seed development of common juniper (*Juniperus communis*). **Plant Biology**, v.15, p.210–219, 2013.
- GU, H.; JIA, Y.; WANG, X.; CHEN, Q.; SHI, S.; MA, L.; MA, H. Identification and characterization of a *LEA* family gene CarLEA4 from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 3565–3572, 2012.
- GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 1720–30, 1999.
- HAMPTON, J.G. What is seed quality? **Seed Science and Technology**, v.30, p.1-10, 2002.
- HANIN, M.; BRINI, F.; EBEL, C.H.; TODA, Y.; TAKEDA, S.; MASMOUDI, K. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. **Plant Signal.Behavior**, v.6, p. 1503–1509, 2011.
- HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. p. 145-245. In Kozłowski, T.T. (ed.) **Seed biology**. Volume III. Academic Press, New York, 1972.
- HINCHA, D.K.; THALHAMMER, A. *LEA* proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, p. 1000–1003, 2012.
- HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends Plant Science**, v.5, p.431–438, 2001.
- HSING, Y.C.; CHEN, Z.Y.; SHIH, M.D.; HSIEH, J.S.; CHOW, T.Y. Unusual sequences of group 3 *LEA* mRNA inducible by maturation or drying in soybean seeds. **Plant Molecular Biology**, v.29, p.863–868, 1995.
- HSING, Y.C.; TSOU, C.H.; HSU, T.F.; CHEN, Z.Y.; HSIEH, K.L.; HSIEH, J.S.; CHOW, T.Y. Tissue and stagespecific expression of a soybean (*Glycine max* L.) seedmaturation, biotinylated protein. **Plant Molecular Biology**, v.38, p.481–490, 1998.

- HSU, S. F.; LAI, H. C.; JINN, T. L. Cytosol-localized heat shock factor-binding protein, AtHSBP, functions as a negative regulator of heat shock response by translocation to the nucleus and is required for seed development in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 153, p.773-784, 2010.
- HOWELL, R.W.; COLLINS, F.I.; SEDGEWICK, V.E. Respiration of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) varieties. **Agronomy Journal**, Madison, v. 51, n. 11, p. 677-679, 1959.
- HUNDERTMARK, M.; HINCHA D. K. *LEA* (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v.9, p118 10.1186/1471-2164-9-118, 2008.
- HUNDERTMARK, M.; BUITINK, J.; LEPRINCE, O.; HINCHA, D. K. The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. **Seed Science Research**, v.21, p.165–173, 2011.
- INGRAM, I.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 377-403, 1996.
- JIA, H.; SUZUKI, M.; MCCARTY, D.R. Regulation of the seed to seedling developmental phase transition by the LAFL and VAL transcription factor networks. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 3, p. 135–145, 2013.
- JOB, C.; LAUGEL, S.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; JOB, D. Biochemical characterization of atypical biotinylation domains in seed proteins. **Seed Science Research**, v.11, p. 149-162, 2001.
- JONES, S.I.; GONZALEZ, D.O.; VODKIN, L.O. Flux of transcript patterns during soybean seed development. **BMC Genomics**, v. 11, p. 136, 2010.
- JOSÉ, A.C.; DA SILVA, E.A.A.; DAVIDE, A.C.; TOOROP, P. Protein expression upon desiccation and imbibition of *Magnolia ovata* A. St.-Hil seeds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, n.3, p. 465-476, 2011.
- JOSHI, C. P.; NGUYEN, H. T. Differential display-mediated rapid identification of different members of a multigene family, HSP16.9 in wheat. **Plant Molecular Biology**, v.31, p.575-584, 1996.
- KAUR, H. et al. Differentially expressed seed aging responsive *heat shock protein* OsHSP18.2 implicates in seed vigor, longevity and improves germination and seedling establishment under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, v.6, artigo 713, 2015.
- KERMODE, A. R. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seed. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, p. 75-95, 1997.
- KIIHL, R.A.S. & A. GARCIA. The use of the long juvenile trait in breeding soybean cultivars. In: Conferencia Mundial de Investigacion en Soja, 4. Buenos Aires, Argentina. **Actas. A.J. Pascale** (ed.). p.994-1000. 1989.
- KIM, H.S.; LEE, J.H.; KIM, J.J.; KIM, C.H.; JUN, S.S.; HONG, Y.N. Molecular and functional characterization of CaLEA6, the gene for a hydrophobic *LEA* protein from *Capsicum annuum*. **Gene**, v. 344, p. 115–123, 2005.

- KOVACS, D.; AGOSTON, B.; TOMPA, P. Disordered plant *LEA* proteins as molecular chaperones. **Plant Signal. Behavior**, v. 3, n. 9, p. 710–713, 2008.
- KLEINWÄCHTER, M.; RADWAN, A.; HARA, M.; SELMAR, D. Dehydrin expression. In seeds: na issue of maturation drying. *Frontiers in Plant Science*. **Plant Physiology**, v.5, n.402, 2014.
- KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A.A.; COSTA, N.P. A semente de soja como tecnologia e base para altas produtividades - Série Sementes. Londrina: Embrapa Soja, **Circular Técnica** n° 55, 8p., 2008.
- LEE, Y.P.; BAEK, K.H.; LEE, H.S.; KWAK, S.S.; BANG, J.W.; KWON, S.Y. Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. **The Journal of Experimental Botany**, n. 61, p. 2499-2506, 2010.
- LEPRINCE O.; BUITINK, J. Desiccation tolerance: from genomics to the field. **Plant Science**, v. 179, p. 554-564, 2010.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G.A.F.; MCKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, v.3, n.3, p.231-246, 1993.
- LEPRINCE, O.; BRONCHART, R.; DELTOUR, R. Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. **Plant Cell and Environmental**, v. 13, p. 539- 546, 1990.
- LIU, G.; XU, H.; ZHANG, L.; ZHENG, Y. Fe binding properties of two soybean (*Glycine max* L.) *LEA4* proteins associated with antioxidant activity. **Plant Cell Physiology**. v. 52, n.6, p. 994–1002, 2011.
- LIU, Y.; ZHENG, Y. PM2, a group 3 *LEA* protein from soybean, and its 22- mer repeating region confer salt tolerance in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Community**, v.331, p.325–332, 2005.
- LONG, S. R.; DALE, R. M. R.; SUSSEV, I. M. Maturation and germination of *Phaseolus vulgaris* embryo axes in culture. **Planta**, v. 153, p. 405-415, 1981.
- MAIA, J.; DEKKERS, B.J.W.; DOLLE, M.J.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H.W.M. Absciscic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds. **New Phytologist**, v. 203, p. 81–93, 2014.
- MACHEREL, D. et al. Function and stress tolerance of seed mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 129, p. 233-241, 2007.
- MANARA, N.T.F. Origem e expansão. IN: SANTOS, O.S. (Coord.). **A cultura da soja 1 – Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná**. Globo, São Paulo, p. 13-23, 1988.
- MANFRE, A. J. et al. Seed Dehydration and the Establishment of Desiccation Tolerance During Seed Maturation is Altered in the *Arabidopsis thaliana* Mutant atem6-1. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 2, p. 243-253, 2009.
- MARCOS FILHO, J. Avaliação da qualidade de sementes de soja. In: CÂMARA, G.M.S. (Ed.). Soja: tecnologia de produção. Piracicaba: **Ed. Publique**, Cap 12, p.206-243, 1998.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: Abrates, 660p., 2015

- MAYER, M.P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 670–684, 2005.
- MENZE, M.A.; BOSWELL, L.; TONER, M.; HAND, S.C. Occurrence of mitochondria-targeted late embryogenesis abundant (*LEA*) gene in animals increases organelle resistance to water stress. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, p.10714–10719, 2009.
- MILES, D.F.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B. Changes in viability, germination, and respiration of freshly harvested soybean seed during development. **Crop Science**, v.28, p.700-704, 1988.
- MOLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **The Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.
- MOMMA, M.; KANEKO, S.; HARAGUCHI, K.; MATSUKURA, U. Peptide mapping and assessment of cryoprotective activity of 26/27-kDa dehydrin from soybean seeds. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, p. 1832–1835, 2003.
- NAMBARA, E., OKAMOTO, M., TATEMATSU, K., YANO, R., SEO, M., KAMIYA, Y., Absciscic acid and the control of seed dormancy and germination. **Seed Research**, v.20, p. 55-67, 2010.
- NATARAJAN, S.S. Analysis of Soybean Seed Proteins Using Proteomics. J Data Mining, **Genomics Proteomics**, v.5, e113, 2014.
- NGUYEN, T.P.; KEIZER, P.; VAN EEUWIJK, F.; SMEEKENS, S.; BENTSINK, L. Natural variation for seed longevity and seed dormancy are negatively correlated in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v 160, p. 2083-2092, 2012.
- NIOGRET, M.F.; CULIÁÑEZ-MACIÀ, F.A.; GODAY, A.; ALBÀ, M.M.; PAGÈS, M. Expression and Cellular Localization of *RAB28* mRNA and *RAB28* Protein during Maize Embryogenesis. **The Plant Journal**, v. 9, p. 549-557, 1996.
- NOCTER, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49, p. 249-279, 1998.
- OLIVER, M.J.; BEWLEY, J.D. Desiccation tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. **Horticultural Reviews**, New York, v. 18, p. 171 - 213, 1997.
- OLVERA-CARRILLO, Y.; CAMPOS, F.; REYES, J.L.; GARCIARRUBIO, A.; COVARRUBIAS, A.A. Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 154, n. 1, p. 373–390, 2010.
- PÁDUA, G. P.; FRANÇA-NETO, J. B.; ROSSI, R. F.; CÂNDIDO, H. G. Agroclimatic zoning of the state of Minas Gerais for the production of high quality soybean seeds. **Journal of Seed Science**, v.36, n.4, p.413-418, 2014.
- PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; SMITH, M. T.; ROSS, G. Why do stored, hydrated recalcitrant seeds die? **Seed Science Research**, v. 4, n. 2, p. 187-191, 1994.

- PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, v.9, p.13-37, 1999.
- PERSONAT, J.M. et al. Co-overexpression of two Heat Shock Factors results in enhanced seed longevity and in synergistic effects on seedling tolerance to severe dehydration and oxidative stress. **BMC Plant Biology**, v.14, p.56, 2014.
- PRIETO-DAPENA P.; CASTAÑO R.; ALMOGUERA C.; JORDANO J. Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. **Plant Physiology**, v.142, p.1102-1112, 2006.
- PROBERT R.; ADAMS J.; CONEYBEER J.; CRAWFORD A.; HAY F. Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. **Australian Journal of Botany**, v.55, p.326–335, 2007.
- RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. rev. e atual. Campinas: Instituto Agrônomo/Fundação IAC, 285p., 1997.
- RAJJO, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, n.331, p.796–805, 2008.
- RAJJO, L.; LOVIGNY, Y.; GROOT, S.P.C.; BELGHAZI, M.; JOB, C.; JOB, D. Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: a comparison between artificial and natural aging protocols. **Plant Physiology**, v.148, p.620-641, 2008.
- RIGHETTI, K.; VU, J.L.; PELLETIER, S.; VU, B.L.; GLAAB, E.; LALANNE, D. et al. Inference of Longevity-Related Genes from a Robust Coexpression Network of Seed Maturation Identifies Regulators Linking Seed Storability to Biotic Defense-Related Pathways. **Plant Cell**, 18p., 2015.
- RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; THOMPSON, C. E.; BENSON, G. O. How a soybean plant develops. **Ames**: Iowa State University of Science and Technology, 20 p., 1994.
- RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; THOMPSON, H.E.; BENSON, G.O. How a soybean plant develops. **Ames IA**: Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension Service, Special Report, n. 53, 1996.
- RITOSSA, P. Problems of prophylactic vaccinations of infants. **Riv. Ist. Sieroter. Ital**, v. 37, p. 79–108, 1962.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499-514, 1973.
- ROHRIG, H.; COLBY, T.; SCHMIDT, J.; HARZEN, A.; FACCHINELLI, F.; BARTELS, D. Analysis of desiccation induced candidate phosphoproteins from *Cratogeomys mussoni* isolated with a modified metal oxide affinity chromatography procedure. **Proteomics**, v. 8, p. 3548–3560, 2008.
- ROMO, S.; LABRADOR, E.; DOPICO, B. Water stress-regulated gene expression in *Cicer arietinum* seedlings and plants. **Plant Physiology Biochemistry**, v.39, p.1017–1026, 2001.

SAHA, B.; MISHRAB, S.; AWASTHIA, J.P.; SAHOOB, L.; PANDA, S.K. Enhanced drought and salinity tolerance in transgenic mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern & Coss.] overexpressing *Arabidopsis* group 4 late embryogenesis abundant gene (*AtLEA4-1*). **Environmental and Experimental Botany**, v. 128, p. 99–111, 2016.

SALDIVAR, X.; WANGA, Y.J.; CHEN, P.; HOU, A. Changes in chemical composition during soybean seed development. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1369–1375, 2011.

SANO, N.; RAJJOU, L.; NORTH, H.M.; DEBEAUJON, I.; MARION-POLL, A.; SEO, M. Seed Viability During Dry Storage. **Plant and Cell Physiology**, Advance Access, 2015.

SANO, N.; RAJJOU, L.; NORTH, H.M.; DEBEAUJON, I.; MARION-POLL, A.; SEO, M. Staying Alive: Molecular Aspects of Seed Longevity. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 4, p. 660–674, doi:10.1093/pcp/pcv186, 2016.

SALLON, S.; SOLOWEY, E.; COHEN, Y.; KORCHINSKY, R.; EGLI, M.; WOODHATCH, I. et al. Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. **Science**, v.320, p.1464, 2008.

SAMARAH, N.H.; MULLEN, R.E.; CIANZIO, S.R.; SCOTT, P. Dehydrin-like proteins in soybean seeds in response to drought stress during seed filling. **Crop Science**, v. 46, p. 2141–2150, 2006.

SATTLER, S.E.; GILLILAND, L.U.; MAGALLANES-LUNDBACK, M.; POLLARD, M.; DELLAPENNA, D. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. **Plant Cell**, v. 16, p. 1419-1432, 2004.

SCHMITT, E.; GEHRMANN, M.; BRUNET, M.; MULTHOFF, G.; GARRIDO, C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 15-27, 2007.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y., et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **Plant Journal Cell Molecular Biology**, v. 31, p. 279–292, 2002.

SHARON, M.A.; KOZAROVA, A.; CLEGG, J.S.; VACRATIS, P.O.; WARNER, A.H. Characterization of a group 1 late embryogenesis abundant protein in encysted embryos of the brine shrimp *Artemia franciscana*. **Biochemistry and Cell Biology**, n.87, v.2, p.415–430, 2009.

SHAW, R.H.; LOOMIS, W.E. Bases for the prediction of corn yields. **Plant Physiology** n. 25, p. 225-44, 1950.

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

SHEN-MILLER, J. Sacred lotus, the long-living fruits of China Antique. **Seed Science Research**, v.12, p.131-143, 2002.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **The Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 221–227, 2007.

- SINNIAH, U.R.; ELLIS, R.H.; JOHN, P. Irrigation and seed quality development in rapid-cycling Brassica: soluble carbohydrates and heat-stable proteins. **Annals of Botany**, v. 82, p. 647–655, 1998.
- SOARES-CAVALCANTI, N.M.; BELARMINO, L.C.; KIDO, E.A.; PANDOLFI, V.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.; et al. Overall picture of expressed Heat Shock Factors in *Glycine max*, *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1 (suppl), p. 247-259, 2012.
- SOARES, G.C.M.; DIAS, D.C.S.F.; JOSÉ M.R. 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 da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 4, p. 2001-2011, 2015.
- SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. The glassy state and accelerated aging of soybeans. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p. 767–774, 1993.
- TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B.; BALLE, J.; PFEIFFER, T.; FELLOWS, R. J. Physiological maturity in soybean. **Agronomy Journal**, v. 71, p. 771–775, 1979.
- TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B.; PHILLIPS, A.D. Effect of field weathering on the viability and vigor of soybean seed. **Agronomy Journal**, v.72, p.749-753, 1980.
- TOLEDO, F.F.; MARCOS FILHO, J. **Manual de sementes: tecnologia da produção**. São Paulo: Ceres, 233p. 1977.
- TOLLETER, D.; JAQUINOD, M.; MANGAVEL, C.; PASSIRANI, C.; SAULNIER, P.; MANON, S.; TEYSSIER, E.; PAYET, N.; AVELANGE-MACHEREL, M-H.; MACHEREL, D. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. **Plant Cell**. v. 19, p. 1580–1589, 2007.
- TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; ARRIGONI, O. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 193-198, 1999.
- TUNNACLIFFE, A.; WISE, M.J. The continuing conundrum of the *LEA* proteins. **Naturwissenschaften Journal**, v.94, p.791–812, 2007.
- TUNNACLIFFE, A.; HINCHA, D.K.; LEPRINCE, O.; MACHEREL, D. *LEA* Proteins: Versatility of Form and Function. In: E. LUBZENS et al. (eds.), Dormancy and Resistance in Harsh Environments, Topics in Current Genetics, **Springer**, 2010.
- VEIGA, A.D.; ROSA, S.D.V.F.; SILVA, P.A.; OLIVEIRA, J.A.; ALVIM, P.O.; DINIZ, K.A. Desiccation tolerance of soybean seeds. **Ciência Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 773-780, 2007.
- VERDIER, J.; LALANNE, D.; PELLETIER, S.; TORRES-JEREZ, I.; RIGHETTI, K.; BANDYOPADHYAY, K. et al. A regulatory network-based approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. **Plant Physiology**, v. 163, p. 757-774, 2013.
- VILELLA, F. A. Water relations in seed biology. **Scientia Agricola**, v. 55, p 98-101, special issue, 1998.
- WALTERS, C.; RIED, J. L. Heat-soluble proteins extracted from wheat embryos have tightly bound sugars and unusual hydration properties. **Seed Science Research**, v.7, n. 2, p.125-134, 1997.

- WALTERS, C. Levels of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12 (Edição especial), p.7-21, 2000.
- WALTERS, C.; HILL, L.M.; WHEELER, L.J. Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. **Integrative and Comparative Biology**, v.45, p. 751–758, 2005.
- WANG, H.; Q. QI, et al. ICK1, a cyclindependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. **Plant Journal**, v. 15, n. 4, p. 50110, 1998.
- WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Molecular Physiology of Legume Seed Development. **Annual Review of Plant Biology**, v.56, p.253–279, 2005.
- WEI, Y.-H.; CHEN, C.-S.; SU, J.-C. Recent Advances In Molecular And Biochemical Research On Proteins. **Recent Advances in Molecular and Biochemical Research on Proteins**, pp. 1-297, 1994.
- WEHMEYER, N.; VIERLING, E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1099 – 1108, 2000.
- WOLKERS, W.F.; MCCREADY, S.; BRANDT, W.F.; LINDSEY, G.G.; HOEKSTRA, F.A. Isolation and characterization of a D-7 *LEA* protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. **Biochim Biophys Acta**, v.1544, p.196–206, 2001.
- ZANAKIS, G.N.; ELLIS, R.H.; SUMMERFIELD, R.J. Seed quality in relation t o seed development and maturation in three genotypes of soybean (*Glycine max*). **Experimental Agriculture**, Oxford, v.30, p.139-156, 1994.
- ZHOU, Y.; CHU, P.; CHEN, H.; LI, Y.; LIU, J.; DING, Y., et al. Over expression of *Nelumbo nucifera metallothioneins* 2a and 3 enhances seed germination vigor in *Arabidopsis*. **Planta**, v. 235, p. 523–537, doi:10.1007/s00425-011-1527-4, 2012.
- ZHU, J. K., SHI, J.; BRESSAN, R. A; HASEGAWA, P. M. Expression of an *Atriplex nummularia* gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperone Dna. **Journal Plant Cell**, v.5, p.341-349, 1993.
- ZHU, J., HASEGAWA, P. M., BRESSAN, R. A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Crit. Rev. Plant Science**, v.16, p.253-277, 1997.

9. ANEXO 1

Tabela 6. Relação de proteínas com diferença de expressão e exclusivas ao longo da maturação de sementes de soja.

Estágio	Spot Number	Protein Name	Accession Number	pI/Mr (KDa)	Matches	Sequence	Sequence Coverage (%)	Mascot Score	Peptide Sequences (ion score)
R 7.1	1	Late embryogenesis abundant protein B19.3-like [Glycine max]	gi 356568122	5.12/21	29 (8)	9 (6)	67	44	R.QGETVVPGGTGGK.S (30) K.SLEAQEHLAEGR.S (26) R.AEEEGIEIDSK.F (24) R.AEEEGIEIDSKFK.I (22) R.EGYQEMGR.K + Oxidation (M) (18)
	2	Dehydrin [Glycine max]	gi 119709430	6.43/30	27 (10)	12 (7)	46	116	R.KVDEYGNVER.Q (45) K.SVGGYNDDANK.Q (43) K.HYDDQGR.K (37) R.DHGTGTVYGLNTDR.H (37) R.GYDGD TNK.Q (30)
	3	PREDICTED: SNF1-related protein kinase regulatory subunit gamma-like PV42a-like [Glycine max]	gi 571503823	5.82/47	23 (5)	8 (2)	28	95	K.AAMLNAVPIVR.A (68) K.LIGTFSSTD LR.G (31) K.VVAVPVAAPP GK.W (28)
	4	Alpha subunit of beta conglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967357	5.01/71	52 (18)	21 (10)	43	208	R.LQESVIVEISK.E (61) R.ESYFVDAQPK.K (48) R.SPQLQNL R.D (41) R.EEGQQQGEQR.L (38) K.FFEITPEK.N (38)
	5	Alpha subunit of beta conglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967357	4.99/78	56 (19)	25 (14)	43	181	R.SPQLQNL R.D (52) K.EQQQEQQQEEQPLEVR.K (43) R.SPQLENL R.D (38) R.LITLAIPVKNKPGR.F (38) R.LQESVIVEISK (37)

6	Glycinin [Glycine max]	gi 18641	4.54/28	17 (8)	4 (2)	6	118	K.LQSPDDERK.Q (40) K.LQSPDDER.K (40) K.LQSPDDER.K (39) K.LQSPDDER.K (36) K.LQSPDDER.K (31)
7	Triosephosphate isomerase [Glycine max]	gi 77540216	6.41/30	45 (18)	19 (10)	91	275	R.EAGTTTAVVAEQTK.A (58) K.VAYALQQGLK.V (54) K.VIACIGETLEQR.E (50) K.WVHDNVSAEVAASVR.I (49) K.IVTTLNEAK.V (46)
8	Unknown [Glycine max]	gi 255628279	6.80/31	52 (12)	13 (3)	61	126	R.MGIDYEEER.K + Oxidation (M) (40) K.HDSPPPSVK.A (38) R.DTATSAIQNFAPINK.I (23) R.MGIDYEEER.K (18)
9	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 219789577	6.42/40	41 (14)	12 (7)	35	138	R.ALGQISER.L (47) K.LDLTAEELSEEK.A (45) K.LSSALSAASAACDHIR.D (41) R.LTVQVSDVK.N (40) K.MELVDAAFPLLK.G + Oxidation (M) (38)
10	Sucrose-binding protein 2 [Glycine max]	gi 29469054	6.45/63	54 (9)	16 (6)	35	104	K.FEEFFGPGGR.D (45) K.IALVMDGR.G (43) R.LTEVGPDDEK.S (36) K.LLQGIENFR.L (35) K.ETEVEEDPELV TCK.H (29)
11	Alpha' subunit of beta-conglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.47/74	45 (15)	21 (10)	39	149	K.TISSEDKPFNLR.S (42) K.LFEITPEK.N (42) K.NILEASYDTK.F (40) R.LQESVIVEISK.K (37) R.EEGQQQGEER.L (33)

12	Unknown [Glycine max]	gi 255626763	5.77/34	42 (10)	15 (7)	79	135	R.AELVLER.D (54) K.GFVIDIEETEMK.L (50) K.GFVIDIEETEMK.L + Oxidation (M) (45) R.VPEVVAMPELENLAQTYGK.F + Oxidation (M) (39) K.SAMMVQSLDPIK.Q + 2 Oxidation (M) (37)
13	PREDICTED: beta-conglycinin, alpha chain-like [Glycine max]	gi 356535993	6.76/47	32 (10)	13 (4)	16	59	R.SPQLENLR.D (34) R.QNNPFHFSSNR.F (27) R.IPAGTTVYLVNPDK.K (26) R.HQQEGVILELSK.E (20)
14	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 227483067	6.37/84	31 (6)	14 (4)	24	64	R.FLAIDAVEK.A (44) K.VTTTIGYGSPNK.A (30) K.ATADAALVEK.S (20)
15	Methionine synthase [Glycine max]	gi 33325957	6.37/90	97 (19)	34 (12)	50	258	K.YLFAGVVDGR.N (64) K.IVEVNALAK.A (44) K.SWLAFAAQK.I (44) R.IPPTEEIADR.I (44) K.FALESFWDGK.S (40)
16	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 257676113	6.41/90	73 (17)	20 (7)	32	225	K.YLFAGVVDGR.N (57) K.AGITVIQIDEAALR.E (53) K.YGAGIGPGVYDIHSPR.I (40) K.VVEVNALAK.A (41) K.DVAFFSANAAAQASR.K (37)

17	PREDICTED: elongation factor 2-like [Glycine max]	gi 356525774	6.31/103	99 (17)	31 (9)	41	156	R.GFVQFCYEPIK.Q (44) R.IMGPNYVPGEK.K (40) K.FSVSPVVR.V (38) K.AYLPVIESFGFSSTLR.A (37) K.AYLPVIESFGFSSTLR.A (34)
18	Seed maturation protein PM25 [Glycine max]	gi 6648966	4.84/32	29 (7)	10 (5)	67	134	K.AVDQSDASAIQAAEVR.A (72) K.LADILAGATAK.L (51) K.AATLQDAEGVACAEVR.N (42) R.GVTVTETK.V (34) R.DVTDVTGDR.G (34)
19	Maturation protein pPM32 [Glycine max]	gi 5733686	4.94/22	33 (13)	11 (7)	48	157	K.QGVQGAWETAK.D (47) R.EADEMSESAK.E (40) K.TEEVAASAGEALK.N (39) R.DRAESAAEK.T (39) R.TNWTYDSAEAR.R (34)
20	Unknown [Glycine max]	gi 255626785	4.18/17	26 (11)	7 (6)	45	119	K.GGGIEVDSTGK.E (57) R.DTVDGWFNIER.V (52) R.GKGGGIEVDSTGK.E (38) K.EICPLTVVQSPNELDK.G (33) R.GKGGGIEVDSTGK.E (24)
21	Glycinin [Glycine max]	gi 18641	4.36/24	14 (6)	5 (2)	10	68	K.QIVTVEGGLSVISPK.W (42) K.LQSPDDER.K (33)
22	PREDICTED: stress response protein nst1-like [Glycine max]	gi 356538162	5.64/23	7 (2)	4 (1)	9	45	R.TLLVTEFGEITAIDIK.E (46) R.TLLVTEFGEITAIDIK.E (19)
23	In2-1 protein [Glycine max]	gi 11385579	5.03/29	15 (5)	7 (3)	32	37	K.LNAYTETR.V (27) R.FQIVFAEVFK.H (25) R.VDPQEIVDLFK.K (25)

24	PREDICTED: glutathione S-transferase L3-like isoform X1 [Glycine max]	gi 356572385	5.45/29	20 (8)	8 (6)	41	73	R.FQLVFADVFK.H (46) K.LATWIEEVNK.I (37) K.EFGEELISHVDTFTEK.E (31) K.ISAYTQTR.A (28) K.ELYSALK.G (21)
25	Unknown [Glycine max]	gi 255636140	6.23/36	39 (19)	15 (9)	68	262	K.TALMLALCELLR.E (60) K.TALMLALCELLR.E + Oxidation (M) (53) K.ADILLCESGGDNLAANFSR.E (48) K.TDLAPAIGADLAVMQR.D (48) K.TDLAPAIGADLAVMQR.D + Oxidation (M) (45)
26	PREDICTED: quinone oxidoreductase-like protein At1g23740, chloroplastic-like [Glycine max]	gi 356571378	6.01/42	22 (9)	13 (6)	45	110	K.VVAAALNPIDYK.R (47) K.AIGSLAEYTAVEEK.V (34) K.ENFEELEEKFDVVYDVTGSETEK.A (34) K.FDVVYDVTGSETEK.A (31) K.VAATASTAK.L (23)
27	Late embryogenesis abundant protein [Glycine max]	gi 1762955	5.26/16	18 (8)	7 (5)	66	92	R.AQEEGIGIDESK.F (51) R.QGETVVPGGTGGK.S (38) K.SLEAQQLAEGR.S (30) R.KGGLSTVDK.S (30) K.EQLGTEGYQEMGR.K (20)
28	Trypsin inhibitor subtype A [Glycine max]	gi 18770	4.37/16	13 (8)	5 (4)	23	121	R.FIAEGHPLSLK.F (51) R.CPLTVVQSR.N (44) R.FIAEGHPLSLK.F (44) K.GIGTISSPYR.I (36) R.AAPTGNER.C (33)

29	Unknown [Glycine max]	gi 255629187	5.63/19	19 (7)	7 (6)	66	77	R.DAISANSIPAFR.K (55) K.NDDCYIVNAAVYVG.Y.- (37) K.GSSLQDMK.L (27) K.LLFVEMGVGYDLHGQDITAAAMR.A + Oxidation (M) (27) K.GSIPGVTS DHMK.L (26)
30	Napin-type 2S albumin 1 precursor [Glycine max]	gi 4097894	5.24/15	18 (8)	6 (4)	38	176	K.IMDNQSEQLEGK.E (69) R.ELMNLAIR.C (54) R.LGPMIGCDLSSDD.- (52) K.IMDNQSEQLEGK.E + Oxidation (M) (47) K.CCSEMSELK.S (36)
31	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 227247706	5.78/17	11 (7)	7 (5)	45	144	K.YTNALGLELDLTDK.G (62) R.FALLVEDLK.V (58) K.VIIFGVPGAFTPTCSLK.H (42) K.VANVESGGEFTISSAEIHK.A (36) K.YTNALGLELDLTDKGLGVR.S (33)
32	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 227247706	5.63/18	8 (4)	4 (2)	29	105	R.FALLVEDLK.V (59) K.YTNALGLELDLTDK.G (46)
33	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 218336143	6.86/43	38 (23)	17 (12)	55	354	R.IIGVDLLPNR.F (78) K.SSESNLCELLR.I (73) K.INPAAPLDK.V (66) R.TDVYWWDAK.G (52) R.ILGHEASGIVESVGK.G (51)
34	Alpha subunit of beta conglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967357	5.21/47	30 (13)	14 (9)	26	133	NILEASYDTK.F (57) K.LFEITPEKNPQLR.D (50) R.LQSGDALR.V (47) R.ESYFVDAQPK.K (43) K.LFEITPEK.N (40)

35	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.26/47	32 (11)	17 (8)	30	105	R.MITLAIPVNKPGR.F (48) K.LFEITPEK.N (37) K.AIVVLVINEGEANIELVGIK.E (34) K.LFEITPEKNPQLR.D (30) R.LITLAIPVNKPGR.F (28)
36	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.37/47	28 (11)	17 (7)	27	104	K.FFEITPEK.N (44) R.MITLAIPVNKPGR.F (43) K.LFEITPEK.N (41) NILEASYDTK.F (39) K.AIVILVINEGDANIELVGiK.E (38)
37	PREDICTED: enolase-like [Glycine max]	gi 356505318	5.57/51	33 (7)	17 (4)	41	131	K.VNQIGSVTESIEAVR.M (69) R.IEEELGAEAVYAGANFR.T (35) R.IEEELGAEAVYAGANFR.T (29) K.VNQIGSVTESIEAVR.M (28) K.AVDNVNTIIPALVGK.D (23)
38	Glycinin subunit G2 [Glycine max]	gi 18637	5.67/53	19 (12)	11 (7)	29	163	K.EAFGVNMQIVR.N (59) K.SQSDNFEYVSFK.T (52) K.LSAQYGSLR.K (43) R.RFYLAGNQEQEFLK.Y (41) K.EAFGVNMQIVR.N + Oxidation (M) (29)
39	Glycinin subunit G2 [Glycine max]	gi 18637	5.79/63	12 (6)	8 (5)	19	104	K.EAFGVNMQIVR.N (47) K.SQSDNFEYVSFK.T (44) K.LSAQYGSLR.K (37) R.RFYLAGNQEQEFLK.Y (25)
40	Chain A, Crystal Structure Of Recombinant Soybean Proglycinin A3b4 Subunit, Its Comparison With Mature Glycinin A3b4 Subunit, Responsible For Hexamer Assembly [Glycine max]	gi 119389108	5.04/57	18 (7)	12 (6)	29	111	R.ISTLNSLTLPALR.Q (47) R.KQIVTVEGGLSVISPK.W (46) K.QIVTVEGGLSVISPK.W (30) K.HFLAQSFNTNEDTAEK.L (24) R.NGVEENICTMK.L (21)

41	Sucrose-binding protein 2 [Glycine max]	gi 29469054	6.36/62	43 (18)	19 (11)	45	241	K.LLQGIENFR.L (66) K.ETEVEEDPELVTK.H (62) K.DNIVSSLDNVAK.E (61) R.LTEVGPDDEK.S (49) R.VETEGGSIR.V (42)
42	PREDICTED: sucrose-binding protein-like [Glycine max]	gi 356536206	5.47/65	9 (4)	6 (2)	14	63	K.LLQGIENFR.L (35) R.AVLGLVSESETEK.I (34)
43	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.42/65	21 (5)	12 (3)	21	54	K.NILEASYDTK.F (35) R.MITLAIPVNKPGR.F (30) R.MITLAIPVNKPGR.F + Oxidation (M) (22) K.TISSEDKPFNLR.S (18)
44	PREDICTED: stress response protein nst1-like [Glycine max]	gi 356538162	5.42/71	24 (7)	10 (5)	13	102	K.EGDAFLVPR.F (57) K.VKEGDAFLVPR.F (34) K.ATELTVGVDGEGMVR.V (32) R.SPEDSIIFR.C (31)
45	Alpha subunit of beta conglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967357	4.96/77	46 (31)	22 (17)	38	439	R.ESYFVDAQPK.K (65) R.SPQLQNL.R.D (62) NILEASYDTK.F (57) R.EEGQQQGEQR.L (57) K.EQQQEQQEEQPLEVR.K (53)
46	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.36/75	34 (16)	17 (11)	29	170	R.LQESVIVEISKK.Q (52) K.LFEITPEK.N (42) R.MITLAIPVNKPGR.F (40) NILEASYDTK.F (39) R.LITLAIPVNKPGR.F (36)

47	Enolase [Glycine max]	gi 42521309	5.46/52	29 (7)	19 (6)	52	94	K.VNQIGSVTESIEAVR.M (47) K.YNQLLR.I (39) R.GNPTVEVDLTCSDGTFAR.A (35) ISGDALKDLYK.S (34) K.LGANAILAVSLAVCK.A (30)
48	DHAR class glutathione S-transferase [Glycine max]	gi 748302947	5.80/27	20 (12)	10 (8)	58	217	R.VLLTLEEK.K (65) K.EEYVIAGWAPK.V (48) K.IFGSFVSFLK.S (44) K.WVADSDVIVGILEEK.Y (41) K.VTAVDLSLAPK.L (40)
49	RecName: Full=Glycinin; Contains: RecName: Full=Glycinin A3 subunit; Contains: RecName: Full=Glycinin B4 subunit; Flags: Precursor [Glycine max]	gi 121280	5.85/43	7 (3)	5 (2)	11	76	R.KQIVTVEGGLSVISPK.W (48) K.QIVTVEGGLSVISPK.W (46)
50	PREDICTED: late embryogenesis abundant protein B19.3-like [Glycine max]	gi 356568122	5.17/20	21 (10)	9 (7)	67	145	R.AEEEGIEIDESK.F (48) K.GGLSTMDK.S (47) R.AEEEGIEIDESKFK.I (41) R.EGYQEMGR.K (33) K.SGGERAEEEGIEIDESK.F (29)
51	Cysteine proteinase inhibitor [Glycine max]	gi 1944319	6.50/26	9 (5)	4 (3)	17	82	K.AEVIDDFAK.F (58) R.SNSLVVPYELHEVADAK.A (38) K.VWVKPWLNFK.E (37) K.VWVKPWLNFK.E (23) K.QNSLLEFAR.V (19)
52	34 kDa maturing seed vacuolar thiol protease precursor [Glycine max]	gi 1199563	4.88/34	6 (2)	3 (1)	9	128	K.EESETLV SAR.V (76)
53	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100819803 isoform X1 [Glycine max]	gi 571480931	6.02/28	17 (13)	10 (7)	51	191	R.VLLTLEEK.K (60) K.VPVVLF DGK.W (51) K.AAVGAPNVLGDCPFSQR.V (49) K.VEYVISGWAPK.V (45) K.VTAVDLSLAPK.L (44)

54	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 296510449	6.74/18	22 (13)	10 (6)	52	240	K.AAMENGVLTVTVPK.E (91) K.AAMENGVLTVTVPK.E + Oxidation (M) (62) R.VLQISGEK.T (49) K.VEVEDGR.V (48) K.ETPQAHVFSVDLPGLK.K (33)
55	PREDICTED: globulin-1 S allele-like [Glycine max]	gi 356495423	5.70/23	8 (3)	6 (2)	12	66	R.TLLVTEFGEITAIDIK.E (45) K.LTWANDDGTSTIR.L (39)
56	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 219725204	6.88/40	17 (2)	12 (2)	40	36	K.FLLTLLGK.- (33) K.GNSEEVIR.I (30)
57	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 253775905	6.72/37	16 (6)	8 (4)	24	124	K.IALVTGGDSGIGR.A (73) R.GLALQLVSK.G (39) K.EGSSIINTTSVNAYK.G (38)
58	Glycinin [Glycine max]	gi 18641	5.00/47	7 (3)	3 (2)	3	37	K.LQSPDDER.K (34) K.CAGVTVSK.L (25)
59	Chain A, Crystal Structures Of Recombinant And Native Soybean Beta-Conglycinin Beta Homotrimers Complexes With N-Acetyl-D-Glucosamine	gi 21465628	6.01/51	41 (28)	20 (18)	48	390	R.SSNSFQTLFENQNGR.I (67) R.ESYFVDAQPQQK.E (54) K.FFEITPEK.N (51) R.VLFGEEEEQR.Q (50) R.SSNSFQTLFENQNGR.I (49)
60	PREDICTED: sucrosebinding protein-like [Glycine max]	gi 356536206	6.15/56	27 (15)	15 (8)	28	285	K.LFDQQNEGSIFAISR.E (60) R.AVLGLVSESETEK.I (60) K.IALVIDGR.G (49) K.FEEFFGPGGR.D (44) K.LLQGIENFR.L (41)
61	Beta conglycinin beta subunit, partial [Glycine max]	gi 63852207	6.64/23	33 (7)	14 (7)	29	56	R.VLFGEEEEQR.Q (30) R.EDENNPFYLR.S (29) K.LAIPVKNKPGR.Y (25) K.FFEITPEKNPQLR.D (20) R.DSYNLHPGDAQR.I (15)

62	Glycinin [Glycine max]	gi 18641	4.45/26	14 (5)	4 (2)	8	64	K.QIVTVEGGLSVISPK.W (35)
								K.QIVTVEGGLSVISPK.W (49)
63	Glycinin [Glycine max]	gi 18641	4.31/32	25 (11)	7 (6)	13	151	K.LQSPDDER.K (48) K.QGQHQQEEEEEGGSVLSGFSK.H (32) R.GSVLSGFSK.H (27) K.QQLQDSHQK.I (27)
64	Unknown [Glycine max]	gi 255636164	5.90/40	39 (5)	13 (3)	47	64	K.DLEDANR.L (34) K.MGEYS DYATQK.A + Oxidation (M) (33) K.AGEYTDYAAQK.A (33)
65	51 kDa seed maturation protein [Glycine max]	gi 414977	6.77/63	102 (27)	40 (17)	59	314	K.GAAEYASDAAQR.T (55) K.EYAGDVALNAK.D (50) K.DYASDAVQK.R (40) K.DYASEASDVAQNTK.D (38) K.VSDYATDTAQK.S (37)
66	Alpha subunit of beta conglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967357	5.29/66	37 (15)	14 (8)	27	169	R.LQESVIVEISK (49) R.LITLAIPVNPGR.F (43) K.FFEITPEK.N (39) R.SPQLQNL.R.D (33) R.MITLAIPVNPGR.F (33)
67	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.15/66	53 (22)	22 (13)	37	250	R.LQESVIVEISKK.Q (52) R.LQESVIVEISK (50) K.LFEITPEK.N (45) R.EEGQQQGEER.L (36) K.FFEITPEKNPQLR.D (36)

68	LEA protein [Glycine max]	gi 1389897	6.35/86	81 (29)	25 (10)	38	256	K.SAGGTTASYVGEK.A (57) K.AAELASMSAGAVK.G + Oxidation (M) (53) R.TTAVITCTLEK.G (44) R.VMVSGEDER.V + Oxidation (M) (36) K.GLAASAGETAK.E (33)
69	Seed maturation protein PM22 [Glycine max]	gi 4585271	4.81/16	44 (19)	13 (8)	63	186	K.DTTMVDVPVK.V + Oxidation (M) (56) K.VPYSILMSLAK.D + Oxidation (M) (51) K.DTTMVDVPVK.V (44) K.GEIKLPTLSTMFA.- + Oxidation (M) (38) K.AKDTTMVDVPVK.V (37)
70	2S albumin prepropeptide [Glycine max]	gi 2305020	4.73/16	41 (21)	4 (4)	27	256	K.ELINLATMCR.F (62) K.IMENQSEEELEK.Q (62) R.FGPMIQCDLSSDD.- + Oxidation (M) (57) K.ELINLATMCR.F + Oxidation (M) (48) K.IMENQSEEELEK.Q + Oxidation (M) (41)
71	Nucleoside diphosphate kinase [Glycine max]	gi 1236951	6.45/17	19 (6)	6 (5)	40	103	K.IIGATNPAQSEPGTIR.G (68) K.LVTVDRPFAEK.H (38) R.GLIGEIISR.F (31) R.GDFAIDIGR.N (26) R.KIIGATNPAQSEPGTIR.G (21)

72	Chain A, Crystal Structures Of Recombinant And Native Soybean BetaConglycinin Beta Homotrimers Complexes With NAcetylDGlucosamine	gi 21465628	5.56/18	18 (7)	8 (4)	23	69	R.AILTLVNDDR.D (44) R.SPQLENLR.D (33) K.LAIPVKNKGR.Y (37) K.VREDENNPFLR.S (15)
73	Gly m Bd 28K allergen, partial [Glycine max]	gi 187766755	5.85/26	28 (9)	7 (5)	16	142	K.LGFIYDDELAER.R (50) R.TVVEEIFSK.E (48) K.LGFIYDDELAERR.L (33) K.SLFVPQYLDNLIFIR.R (30) R.HMHIGFISMEPK.S + Oxidation (M) (28)
74	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 218336143	6.79/46	34 (11)	15 (5)	39	176	K.kFGVTDFVNP.K.D (63) R.IIGVDLLPNR.F (58) R.IIGVDLLTNR.F (52) K.INPAAPLDK.V (45) K.GQTPLFPR.I (38)
75	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 18536	6.18/50	42 (15)	19 (10)	29	192	K.FFEITPEKNPQLR.D (45) R.ESYFVDAQPK.K (43) R.EEGQQQGEQR.L (41) K.FFEITPEK.N (40) R.SPQLENLR.D (39)
76	Sucrose binding protein 2 [Glycine max]	gi 29469054	6.35/52	51 (16)	21 (10)	42	146	K.IALVIDGR.G (49) R.HFDSEVVLFNK.G (45) K.FEEFFGPGGR.D (41) K.LLQGIENFR.L (40) R.LTEVGPDDEK.S (39)
77	PREDICTED: sucrosebinding protein like [Glycine max]	gi 356536206	6.29/52	56 (18)	19 (10)	43	195	K.IALVIDGR.G (48) K.LLQGIENFR.L (46) K.FEEFFGPGGR.D (44) K.IALVMDGR.G (33) R.HFDSEVVFFN.K.G (33)

78	Glycinin [Glycine max]	gi 18641	4.22/23	15 (5)	5 (3)	10	59	K.QIVTVEGGGLSVISPK.W (36) K.HFLAQSFNTNEDIAEK.L (27) K.LQSPDDER.K (21)
79	RecName: Full=Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic; Flags: Precursor	gi 134646	5.44/28	25 (10)	8 (3)	33	132	K.LVSWDAVSSR.L (47) K.SLEEHVTSYNK.G (44) R.RPDYISVFMDK.L (38) R.RPDYISVFMDK.L + Oxidation (M) (28)
80	RecName: Full=Lectin; AltName: Full=Agglutinin; AltName: Full=SBA; Flags: Precursor	gi 126151	5.37/29	9 (1)	5 (1)	24	39	R.TSNILSDVVDLK.T (39)
81	Glycinin [Glycine max]	gi 18641	4.25/30	10 (4)	5 (2)	10	64	K.QIVTVEGGGLSVISPK.W (37) R.KQIVTVEGGGLSVISPK.W (36)
82	Glycinin subunit G2 [Glycine max]	gi 18637	5.09/31	20 (10)	6 (3)	15	150	R.FYLAGNQEQEFLK.Y (51) K.EAFGVNMQIVR.N + Oxidation (M) (45) R.RFYLAGNQEQEFLK.Y (35) K.EAFGVNMQIVR.N (27)
83	RecName: Full=Kunitztype trypsin inhibitor KTI1; Flags: Precursor	gi 125722	4.63/51	16 (3)	6 (2)	35	59	K.GGGIEVDSTGK.E (43) R.GKGGGIEVDSTGK.E (42)
84	Unknown [Glycine max]	gi 255645102	5.27/29	24 (9)	9 (5)	35	143	K.TSGGLLLTEATK.D (49) K.DDDIVGILETDDIK.D (44) K.TGAQVVYSK.Y (40) K.DGSDYITLR.V (40) R.KPLSVTPGNTVLYSK.Y (34)
85	RecName: Full=P34 probable thiol protease; Flags: Precursor	gi 129353	4.80/35	12 (4)	3 (2)	8	89	K.EESETLV SAR.V (69) K.KGVITQVK.Y (35)
86	LEA protein [Glycine max]	gi 311698	6.95/57	75 (11)	28 (8)	52	51	K.DYVGDA AQR.S (23) K.TKDYASDTAQR.T (18) K.GYVGDA AQR.T (18)

87	51 kDa seed maturation protein [Glycine max]	gi 414977	6.80/57	89 (23)	39 (17)	58	260	K.LQDIASEAGQYSAEK.A (47) K.VSDYATDTAQK.S (46) K.TKDYASDGAQK.S (44) K.EASDYASETAK.K (44) K.DYASDTAQTSK.D (43)
88	PREDICTED: sucrosebinding protein like [Glycine max]	gi 356536206	6.04/62	55 (23)	20 (15)	45	298	R.AVLGLVSESETEK.I (60) K.LFDQQNEGSIFAISRE (55) R.HFDSEVVFFNIK.G (48) K.FEEFFGPGGR.D (44) R.LTEVGPDDDEK.S (44)
89	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.15/63	44 (13)	23 (9)	42	143	R.ESYFVDAQPK.K (51) K.LFEITPEK.N (45) R.DSYNLQSGDALR.V (43) K.EQQQEQQEQPLEVR.K (42) R.MITLAIPVNKPGR.F (42)
90	Late embryogenesis abundant protein [Glycine max]	gi 170010	6.37/64	50 (19)	19 (11)	44	284	K.VGEYADYASQK.A (68) K.TAETAEEAAK.N (50) R.TAETTDAAK.Q (50) K.EMASETAEATANK.A (45) K.EMASETAEATANK.A + Oxidation (M) (42)
91	PREDICTED: ruBisCO large subunitbinding protein subunit beta, chloroplastic like [Glycine max]	gi 356556926	5.17/68	41 (10)	21 (6)	41	153	K.VVAAGANPVLITR.G (51) R.DLINILEDIAIR.S (40) K.EVELEDPVENIGAK.L (40) K.LADLVGVTLGPK.G (32) K.SQYLDDIAILTTGGTVIR.E (29)

92	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.15/76	80 (23)	22 (10)	37	299	K.GSEEEQDER.E (64) R.EEGQQQGEER.L (56) K.TISSEDKPFNLR.S (47) R.SQQLQNLR.D (39) R.QQQEEQPLEVR.K (38)
93	LEA protein [Glycine max]	gi 1389897	6.33/81	73 (25)	32 (13)	46	405	K.AAELASMSAGAVK.G + Oxidation (M) (76) K.AAELASMSAGAVK.G (61) R.QSVVLETR.V (55) R.VGAENEGAR.T (53) R.ESGGQVVAEK.G (52)
94	Glycinin [Glycine max]	gi 18641	5.40/16	14 (7)	3 (2)	5	68	K.CAGVTVSK.L (52) R.MIIIAQGK.G + Oxidation (M) (40) R.MIIIAQGK.G (26)
95	Seed maturation protein PM22 [Glycine max]	gi 4585271	5.11/17	30 (13)	9 (6)	57	149	K.DTTMVDVPVK.V (56) K.DTTMVDVPVK.V + Oxidation (M) (48) K.IPDPSGLK.A (36) K.VPYSILMSLAK.D + Oxidation (M) (35) K.VNDMAKPEASVTDVDFKR.V + Oxidation (M) (27)
96	Unknown [Glycine max]	gi 255629187	5.66/20	24 (6)	7 (4)	65	73	R.DAISANSIPAFR.K (58) K.GSIPGVTSDHMK.L (31) K.LGVPHPLQQNLNK.D (24) K.LGVPHPLQQNLDK.D (18) K.LLFVEMGVGYDLHGQDITAAAMR.A + Oxidation (M) (17)
97	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 18609	6.80/20	11 (5)	5 (2)	14	111	K.LSAQYGSLR.K (60) R.ALVQVVNCNGER.V (34) R.ALVQVVNCNGER.V (14)

98	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 18609	5.41/20	12 (8)	4 (3)	11	120	R.LSAEFGSLR.K (48) SQSDNFEYVSFK.T (46) R.ALVQVVNCNGER.V (42) K.LSAQYGSLR.K (42) R.VFDGELQEGR.V (37)
99	Chain A, Crystal Structure Of Recombinant Soybean Proglycinin A3b4 Subunit, Its Comparison With Mature Glycinin A3b4 Subunit, Responsi	gi 119389108	5.32/20	16 (5)	7 (4)	15	92	R.ISTLNSLTLPALR.Q (55) R.QFGLSAQYVVLYR.N (48) K.THHNAVSSYIK.D (30) R.VVNCQGNVFDGELR.R (29)
100	Glycinin subunit G1 [Glycine max]	gi 18635	6.28/21	17 (6)	6 (3)	13	87	R.VFDGELQEGR.V (52) SQSDNFEYVSFK.T (44) K.LSAQYGSLR.K (29) R.ALIQVVNCNGER.V (22)
101	Unknown [Glycine max]	gi 255626785	4.65/21	32 (9)	10 (4)	52	156	K.GGGIEVDSTGK.E (56) K.NKPLVVQFQK (49) R.DTVDGWFNIER.V (47) - .DFVLDNEGNPLENGGTYIILSDITAFGG IR.A (36) R.VSDDEFNNYK.L (36)
102	Trypsin inhibitor subtype A [Glycine max]	gi 18770	5.32/21	21 (7)	8 (4)	36	100	R.CPLTVVQSR.N (44) R.VSDDEFNNYK.L (41) R.FIAEGHPLSLK.F (40) K.DAMDGWFR.L (29) R.FIAEGHPLSLK.F (28)
103	Glycinin subunit G1 [Glycine max]	gi 18635	5.50/21	17 (9)	5 (4)	11	102	R.VFDGELQEGR.V (52) R.LSAEFGSLR.K (47) R.VVNCQGNVFDGELR.R (37) R.ISTLNSLTLPALR.Q (32) R.SQSDNFEYVSFK.T (32)

104	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 63092768	6.49/23	8 (3)	2 (1)	19	50	K.AVDVTGPDGASVQGTR.R (35)
105	PREDICTED: stress response protein nst1like [Glycine max]	gi 356538162	5.31/25	11 (5)	4 (1)	9	98	R.TLLVTEFGEITAIK.E (52) R.TLLVTEFGEITAIK.E (37)
106	Gly m Bd 28K allergen, partial [Glycine max]	gi 187766755	5.51/27	6 (2)	3 (2)	9	58	R.HMHIGFISMEPK.S (39) K.LGFIYDDELAER.R (38)
107	PREDICTED: lipoamide acyltransferase component of branchedchain alphaketo acid dehydrogenase complex, mitochondrial likeisoform X1 [Glycine max]	gi 356521841	5.84/27	2 (1)	1 (1)	1	40	M.LSSRIWQR.R (40)
108	Dehydrin [Glycine max]	gi 37495451	6.34/29	30 (8)	12 (6)	60	53	K.QTDEYGNPVHAASVTYVATR.T (33) K.HYDDQGR.K (31) R.KVDEYGNVEK.Q (22) K.EKLPGGHSK.- (21) K.VDEYGNVEK.Q (15)
109	Ferritin [Glycine max]	gi 251733308	5.49/29	23 (6)	8 (3)	30	55	R.ISEYVAQLR.R (35) R.ALTGVIFEPFEEVK.K (30) K.ELDLVPTVPQASLAR.Q (23)
110	PREDICTED: proteasome subunit alpha type2Alike [Glycine max]	gi 356557004	5.49/31	23 (8)	10 (6)	43	140	R.VLTPAEIDDYLAEEV.- (48) K.EGFEGQISGK.N (45) K.EPIPVTQLVR.E (44) K.NIEIGIIGADKK.F (40) K.AANGVVIAEK.K (39)
111	Unknown [Glycine max]	gi 255628279	6.86/32	48 (23)	13 (9)	52	289	R.DTATSAIQNFAPINK.I (63) K.HDPSPPSVK.A (61) R.MGIDYEEER.K (54) R.MGIDYEEER.K + Oxidation (M) (50) R.QCLIYDSPEK.K (43)

112	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 218336145	6.27/44	39 (14)	14 (8)	35	176	K.VNPAAPLDK.I (61) R.IIGVDLVSSR.F (59) K.AFDYMLK.G (30) K.SSESNMCDLLR.I (29) K.GTFYGNYPKPR.T (29)
113	PREDICTED: FAM10 family protein At4g22670like [Glycine max]	gi 356563248	4.94/55	18 (3)	9 (2)	23	67	R.DANAALINPDSAK.G (48) R.DYLQSLGAK.L (36)
114	PREDICTED: UTPglucose1phosphate uridylyltransferase like [Glycine max]	gi 356553237	5.19/57	38 (10)	21 (8)	50	147	K.VLQLETAAGAAIR.F (54) K.SAVAGLNEISENEK.N (50) K.MEIIPNPK.E (42) R.LVVEDFLPLPSK.G (37) K.NEYCMVTPK.T (27)
115	LEA protein [Glycine max]	gi 1389897	6.59/80	64 (22)	20 (10)	41	196	K.SLTSIGEK.L (47) R.TTAVITCTLEK.G (47) K.AAELASMSAGAVK.G (45) K.ATAVGWAAAHFSAEK.T (41) K.SAGGTTASYVGEK.A (37)
116	PREDICTED: lowtemperatureinduced 65 kDa protein like [Glycine max]	gi 356561627	6.43/121	64 (21)	28 (13)	30	209	K.ISSATTAIADK.A (53) R.VVVVSPTEINQNR.T (53) K.TTQTTQTR.N (46) R.AEVEQANQGAAGER.R (46) K.LGFGDTATTTQKEK.R (41)
117	Glycinin [Glycine max]	gi 18641	4.41/25	13 (6)	4 (3)	7	93	K.QIVTVEGGLSVISPK.W (42) K.LQSPDDER.K (40) R.KQIVTVEGGLSVISPK.W (38)
118	Glycinin [Glycine max]	gi 18641	4.35/25	13 (3)	5 (2)	5	47	R.KQIVTVEGGLSVISPK.W (33) K.QIVTVEGGLSVISPK.W (26)

119	Glutathione S-transferase GST 14, partial [Glycine max]	gi 11385443	6.28/30	12 (4)	5 (3)	24	90	K.LLSFFASPF GK.R (53) K.TSLLLQLNPVHK.K (45) K.GVEY EYIEQDIFNK.T (23)
120	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 259662479	5.70/33	28 (6)	14 (5)	57	74	K.LLDNTSVTHLFPITK.Y (38) K.YLGLLATGMTADAR.T (36) K.ATEIEVG VVR.K (33) R.FTYGYEMPVDVLAK.W (26) K.AAGITSIGVR.G (25)
121	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	4.99/55	23 (4)	12 (3)	22	72	R.LQESVIVEISK (46) K.LFEITPEKNPQLR.D (45) K.AIVVLVINEGEANIELVGIK.E (19) R.ESYFVDAQPK.K (18)
122	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 18543	5.50/32	16 (6)	3 (1)	8	96	K.GAIIFGDAPNNMR.Q (54) K.GAIIFGDAPNNMR.Q + Oxidation (M) (26)
123	Glycinin [Glycine max]	gi 1772306	4.78/42	27 (9)	7 (5)	13	240	K.QIVTVEGGLSVISPK.W (75) R.KQIVTVEGGLSVISPK.W (69) R.SQQQLQDSHQK.I (38) K.QIVTVEGGLSVISPK.W (32) R.KQGQHQQQEEEGSVLSGFSK.H (23)
124	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 218336143	6.86/51	30 (11)	13 (6)	40	246	R.IIGVDLLTNR.F (76) K.INPAAPLDK.V (60) R.IIGVDLLPNR.F (55) K.SSESNLCELLR.I (46) R.ILGHEASGIVESVGK.G (41)
125	Beta-conglycinin alpha-subunit [Glycine max]	gi 15425633	5.05/64	35 (11)	17 (7)	26	135	R.LQESVIVEISKK.Q (52) K.FFEITPEK.N (51) R.LQESVIVEISK (51) R.EEGQQQGEQR.L (49) R.LITLAIPVKNKPGR.F (48)

126	PREDICTED: sucrose-binding protein-like [Glycine max]	gi 356536206	6.05/64	53 (16)	24 (8)	45	178	R.AVLGLVSESETEK.I (60) K.LLQGIENFR.L (41) K.LFDQQNEGSIFAIR.E (38) K.FEEFFGPGGR.D (36) K.ESFFFPFELPR.E (34)
127	PREDICTED: ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like [Glycine max]	gi 356575611	5.15/66	34 (12)	18 (8)	45	147	K.TVLIMELINNVAK.A (49) K.VVDLLAPYQR.G (36) R.VLNTGSPITVPVGR.A (36) K.AHGGFSVFAGVGER.T (27) R.LVLEVAQHLGEGVVR.T (27)
128	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	51.770	58 (19)	24 (12)	44	251	R.QQQEEQPLEVR.K (56) R.LQESVIVEISK.K (52) R.DSYNLQSGDALR.V (47) K.TISSEDKPFNLR.S (42) K.AIVVLVINEGEANIELVGIK.E (42)
129	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.14/78	48 (20)	23 (12)	45	274	K.AIVVLVINEGEANIELVGIK.E (59) K.TISSEDKPFNLR.S (49) R.DSYNLQSGDALR.V (47) R.LQESVIVEISK.K (42) K.LFEITPEK.N (41)
130	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.19/79	48 (15)	23 (9)	38	189	K.GSEEEQDER.E (66) R.DSYNLQSGDALR.V (49) K.LFEITPEK.N (47) R.SQQLQNL.R.D (46) K.AIVVLVINEGEANIELVGIK.E (36)
131	PREDICTED: G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g11410-like [Glycine max]	gi 356527947	5.73/19	6 (1)	1 (1)	0	40	R.VAATIGMR.E (40)

132	Glycinin subunit G1 [Glycine max]	gi 18635	6.75/22	21 (10)	6 (4)	13	171	R.VAATIGMR.E (57) R.VLIVPQNFVVAAR.S (46) R.ALIQVVNCNGER.V (39) R.LSAEFGSLRK.N (22)
133	PREDICTED: uncharacterized protein At2g37660, chloroplastic-like [Glycine max]	gi 356567949	6.69/33	17 (5)	11 (4)	60	80	K.STVLVTGAGGR.T (49) K.QNIGAADDVFVGDIR.H (44) K.ALFSQITTR.F (37) R.TGQIVYK.K (25)
134	RecName: Full=Lectin; AltName: Full=Agglutinin; AltName: Full=SBA; Flags: Precursor	gi 126151	5.23/31	7 (1)	5 (1)	21	43	K.TSLPEWVR.I (43)
135	PREDICTED: sucrose-binding protein-like [Glycine max]	gi 356536206	6.05/64	54 (13)	22 (10)	46	197	R.AVLGLVSESETEK.I (60) R.DPESVLSAFSWNVLQAALQTPK.G (45) K.FEEFFGPGGR.D (44) K.IALVIDGR.G (42) K.QIQEETR.E (40)
136	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.15/66	48 (8)	21 (6)	37	134	R.LQESVIVEISKK.Q (59) R.LQSGDALR.V (48) R.DSYNLQSGDALR.V (48) R.LQESVIVEISK (43) R.MITLAIPVKNKPGR.F (35)
137	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 219902517	5.17/70	46 (12)	20 (4)	41	168	K.VVAAGANPVLITR.G (54) R.DLINILEDAR.S (46) K.LADLVGVTLGPK.G (26) K.SQYLDDIAILTGGTVIR.E (16)
138	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.14/78	50 (15)	23 (9)	40	174	R.LQESVIVEISK (68) K.GSEEEQDER.E (51) R.EEGQQQGEER.L (39) R.MITLAIPVKNKPGR.F (38) R.LITLAIPVKNKPGR.F (36)

139	Alpha' subunit of betaconglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.19/79	48 (20)	23 (10)	40	325	R.LQESVIVEISK.K (55) R.DSYNLQSGDALR.V (47) U R.MITLAIPVKNKPGR.F + Oxidation (M) (47) K.LFEITPEKNPQLR.D (45) R.QQQEEQPLEVR.K (43)
140	Gly m Bd 28K allergen, partial [Glycine max]	gi 187766747	5.61/26	11 (4)	5 (3)	14	104	K.LGFIYDDELAER.R (63) R.TVVEEIFSK.E (30) -.LDSNLIIFIR.R (23) R.HMHIGFISMEPK.S + Oxidation (M) (18)
141	Maturation-associated protein [Glycine max]	gi 170024	6.23/30	28 (12)	8 (4)	37	160	R.TAAGGYSDDINK.Q (49) R.HHGTGTVYGIDTDR.Q (34) K.HYDDQGR.K (29) K.QHDTTNAYGVDTGR.Q (28)
142	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 227247986	6.77/30	35 (19)	10 (8)	53	225	K.LVIVGDGGTGK.T (76) R.HLTGEFEK.K (57) R.VCENIPIVLCGNK.V (53) R.FYCWDTAGQEK.F (34) K.NLQYYEISAK.S (33)
143	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100819803 isoform X1 [Glycine max]	gi 571480931	6.07/30	45 (29)	14 (8)	80	534	K.VTAVDLSLAPK.L (73) R.VLLTLEEK.K (59) K.VEYVISGWAPK.V (55) K.VPVVLFDGK.W (52) K.IFGSFVSFLK.S (44)
144	RecName: Full=Lectin; AltName: Full=Agglutinin; AltName: Full=SBA; Flags: Precursor	gi 126151	5.45/30	10 (4)	3 (1)	10	69	R.TSNILSDVVDLK.T (57)

145	Maturation-associated protein [Glycine max]	gi 170024	6.23/31	34 (17)	11 (5)	59	152	R.HHGTTGVYGIDTDR.Q (42) K.HYDDQGR.K (34) K.QHDTTNAYGVDTGR.Q (33) R.TAAGGYSDINK.Q (32) R.QQHGTGGYAGDTGR.Q (26)
146	Triosephosphate isomerase [Glycine max]	gi 77540216	6.26/32	41 (15)	14 (8)	73	227	K.AEFVDIINAATVK.K (72) R.EAGTTTAVVAEQTK.A (57) K.VIACIGETLEQR.E (46) K.IVTTLNEAK.V (42) R.EAGTTTAVVSEQTK.A (39)
147	PREDICTED: enoyl-[acylcarrierprotein] reductase [NADH], chloroplastic-like isoform X1 [Glycine max]	gi 356538571	5.76/38	35 (4)	12 (3)	44	43	R.VLPDGSLEITK.V (29) K.AALES DTR.V (28) R.AFIAGVADDNGYGWAIK.S (24)
148	PREDICTED: stress response protein nst1-like [Glycine max]	gi 356538162	5.85/48	19 (6)	7 (2)	9	131	K.EGDAFLVPR.F (62) K.ATELTVGVDGEGMVR.V (42) K.ATELTVGVDGEGMVR.V + Oxidation (M) (17)
149	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 296524578	4.57/55	31 (6)	12 (6)	28	66	K.LDCGGGYMK.L (37) K.ELPDPEAK.K (30) K.GIQTSEDYR.F (29) K.TAFEEAEK.K (26) K.YVGIELWQVK.S (21)
150	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 18536	6.17/56	41 (23)	17 (12)	26	323	R.ESYFVDAQPK.K (60) R.LQESVIVEISK.E (55) K.AIVILVINEGDANIELVGiK.E (48) R.LITLAIPVKNPGR.F (48) K.FFEITPEK.N (47)

151	LEA protein [Glycine max]	gi 1389897	6.30/82	88 (39)	28 (15)	50	407	K.AAELASMSAGAVK.G (73) K.AAELASMSAGAVK.G + Oxidation (M) (52) R.TTAVITCTLEK.G (51) K.SAGGTTASYVGEK.A (48) R.VMVSGEDER.V (42)
152	LEA protein [Glycine max]	gi 1389897	6.25/82	79 (29)	26 (11)	47	323	R.VMVSGEDER.V (64) K.AAELASMSAGAVK.G + Oxidation (M) (53) K.AAELASMSAGAVK.G (48) K.GQQGYAVTK.D (44) K.GLAASAGETAK.E (40)
153	LEA protein [Glycine max]	gi 1389897	6.21/82	74 (27)	22 (9)	43	301	K.GLAASAGETAK.E (59) K.AAELASMSAGAVK.G (59) R.QSVVLETR.V (58) R.VMVSGEDER.V (53) R.TTAVITCTLEK.G (42)
154	Unnamed protein product [Glycine max]	gi 257676113	6.41/93	75 (21)	25 (12)	43	213	K.FALESFWDGK.S (47) K.SFSLLSLLPK.V (46) K.YLFAGVVDGR.N (45) K.AGITVIQIDEAALR.E (44) K.SFSLLSLIDK.I (43)
155	Glycinin subunit G2 [Glycine max]	gi 18637	4.94/31	6 (2)	4 (1)	10	54	K.EAFGVNMQIVR.N (50)
156	Dehydrin [Glycine max]	gi 37495451	6.30/28	27 (13)	11 (8)	50	116	K.LPGGHSDK.- (41) R.TAAGGYSDINK.Q (38) K.HYDDQGR.K (30) R.KVDEYGNVEK.Q (29) K.EKLPGGHSDK.- (25)
157	RecName: Full=Lectin; AltName: Full=Agglutinin; AltName: Full=SBA; Flags: Precursor	gi 126151	5.10/32	8 (2)	4 (1)	14	63	R.TSNILSDVVDLK.T (52)

158	Glycinin subunit G1 [Glycine max]	gi 18635	4.46/37	21 (6)	10 (4)	28	56	K.EAFGVNMQIVR.N (39) R.RPSYTNGPQEIIYQQGK.G (32) K.LNALKPDNR.I (28) K.YQQEQGGHQSQK.G (23) K.NLQGENEGEDK.G (20)
159	PREDICTED: sucrosebinding protein-like [Glycine max]	gi 356536206	6.18/56	37 (12)	17 (9)	37	153	K.FEEFFGPGGR.D (50) R.AVLGLVSESETEK.I (42) K.LLQGIENFR.L (41) K.DNIVSSLDNVAK.E (39) K.IALVIDGR.G (38)
160	Late embryogenesis abundant protein [Glycine max]	gi 170010	6.35/59	67 (18)	24 (13)	50	321	K.EMASETAEATANK.A (84) K.AGEYTDYASQK.A (68) R.FDEEGVVNVER.R (63) K.VGEYADYASQK.A (55) R.AAETAEEAAK.N (47)
161	PREDICTED: sucrosebinding protein-like [Glycine max]	gi 356536206	5.97/65	61 (22)	25 (13)	52	415	K.LFDQQNEGSIFAISR.E (75) K.LLQGNENFR.L (57) K.IALVIDGR.G (56) R.HFDSEVVFFNIK.G (56) K.LLQGIENFR.L (53)
162	PREDICTED: sucrosebinding protein-like [Glycine max]	gi 356536206	5.88/65	52 (17)	24 (11)	52	233	R.AVLGLVSESETEK.I (60) K.LFDQQNEGSIFAISR.E (58) K.LLQGIENFR.L (56) K.DNIVSSLDNVAK.E (49) K.IALVIDGR.G (47)
163	Alpha' subunit of beta-conglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	5.07/71	58 (20)	26 (10)	47	264	K.SQSESYFVDAQPQQK.E (57) K.GSEEEQDER.E (48) R.DSYNLQSGDALR.V (45) R.MITLAIPVNKPGR.F (39) R.MITLAIPVNKPGR.F (38)

164	Class III acidic endochitinase [Glycine max]	gi 2934696	4.23/29	6 (2)	2 (1)	6	51	K.VFLSLGGAK.G (42)
165	Triosephosphate isomerase [Glycine max]	gi 77540216	6.20/30	13 (5)	7 (3)	33	82	K.VAYALQQGLK.V (48) K.IVTTLNEAK.V (40) K.VIACIGETLEQR.E (33)
166	Alpha' subunit of beta-conglycinin, partial [Glycine max]	gi 9967361	4.95/63	44 (11)	21 (7)	37	96	R.LQESVIVEISK (68) R.LQESVIVEISKK.Q (41) K.LFEITPEK.N (41) R.MITLAIPVKNKPGR.F (28) R.ESYFVDAQPK.K (27)
167	PREDICTED: sucrosebinding protein-like [Glycine max]	gi 356536206	5.31/63	24 (8)	13 (6)	25	76	K.LLQGIENFR.L (44) R.AVLGLVSESETEK.I (32) K.IALVIDGR.G (31) K.DNIVSSLDNVAK.E (30) R.HFDSEVVFFNIK.G (22)
