

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DURANTE A
SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA MORFOLÓGICA DE SEMENTES DE
ANNONA CRASSIFLORA.**

PATRÍCIA SOUZA DA SILVEIRA

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

BOTUCATU - SP

Fevereiro - 2014

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

**ESTUDOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DURANTE A
SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA MORFOLÓGICA DE SEMENTES DE
ANNONA CRASSIFLORA.**

PATRÍCIA SOUZA DA SILVEIRA

Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

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

BOTUCATU - SP

Fevereiro – 2014

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

S587e Silveira, Patrícia Souza da, 1982-
Estudos fisiológicos e moleculares durante a superação da dormência
morfológica de sementes de *Annona crassiflora* / Patrícia Souza da
Silveira. - Botucatu : [s.n.], 2014
xi, 131 f. : fots. color., grafs., tabs., ils. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Fa-
culdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014
Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva
Inclui bibliografia

1. Sementes - Dormência. 2. Biodiversidade. 3. Ácido ri-bonucleico. 4.
Cerrados - Brasil. I. Silva, Edvaldo Apare-cido Amaral da. II.
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de
Botucatu). Faculdade de Ciên-cias Agrônômicas. III. Título.

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

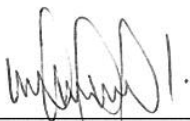
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ESTUDOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DURANTE A
SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA MORFOLÓGICA DE SEMENTES DE
ANNONA CRASSIFLORA"

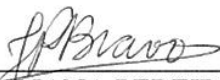
ALUNA: PATRÍCIA SOUZA DA SILVEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

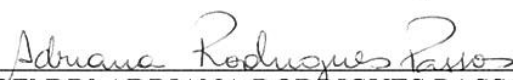
Aprovado pela Comissão Examinadora



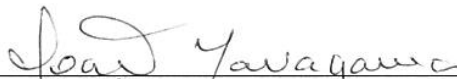
PROF. DR. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA



PROFª DRª JULIANA PEREIRA BRAVO



PROFª DRª ADRIANA RODRIGUES PASSOS



PROF. DR. JOÃO NAKAGAWA



PROF. DR. ALESSANDRO DE MELLO VARANI

Data da Realização: 25 de fevereiro de 2.014.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Patrícia Souza da Silveira, filha de M^a das Graças Souza da Silveira e Leonel Tolentino da Silveira Filho, nasceu na cidade de Cruz das Almas no Estado da Bahia.

No semestre de 2002.2 foi aprovada no vestibular para Engenharia Agrônoma na Universidade Federal da Bahia (UFBA), atual Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

Durante a graduação (2002-2007), foi estagiária voluntária da UFBA/UFRB, trabalhando com Extensão Universitária (2003-2005).

Na Embrapa Mandioca e Fruticultura foi estagiária voluntária (2004-2006), trabalhou no Laboratório de Entomologia agrícola (Controle biológico de pragas); Microbiologia do solo (Uso de lodo de esgoto na produção de fruteiras) e Fitopatologia (Tristeza do citrus).

Foi bolsista PIBIC/CNPq em 2006-2007 na UFRB na área de concentração de Fisiologia de plantas cultivadas com o projeto: Uso de Bioreguladores vegetais em cultura de soja.

Em 26 de fevereiro de 2008 graduou-se em Engenharia Agrônoma pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

Em março de 2008, iniciou o curso de pós-graduação em Ciências Agrárias, área de concentração Fitotecnia na UFRB, com linha de pesquisa Ecofisiologia de plantas cultivadas, com término do mestrado e aprovação do título de Mestre em Ciências Agrárias no dia 23 de fevereiro de 2010.

Em março de 2011 iniciou o Doutorado no Programa de Agronomia, pós-graduação em Agronomia, área de concentração Agricultura, na Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu/UNESP, com linha de pesquisa na Produção, Tecnologia e Armazenamento de Sementes e Produtos Agrícolas, com término do doutorado e aprovação do título de Doutor em Agronomia no dia 25 de fevereiro de 2014.

Em março de 2014 iniciou o pós doutorado (Capes-PNPD) na Embrapa Mandioca e Fruticultura, área de concentração Melhoramento genético de bananeira (Duplicação de cromossomos).

*“Se avexe não...
Amanhã pode acontecer tudo
Inclusive nada
Se avexe não...A lagarta rasteja
Até o dia em que cria asas.
Se avexe não...
Que a burrinha da felicidade
Nunca se atrasa.
Se avexe não...
Amanhã ela pára
Na porta da tua casa
Se avexe não...
Toda caminhada começa
No primeiro passo
A natureza não tem pressa
Segue seu compasso
Inexoravelmente chega lá...
Se avexe não...
Observe quem vai
Subindo a ladeira
Seja princesa, seja lavadeira...
Pra ir mais alto
Vai ter que suar...”*

Santanna, O Cantador
(Letra: Accioly Neto)

*A minha mãe Maria das Graças pelos ensinamentos
e esforços que motivaram e fizeram com que eu
chegasse até aqui e as minhas irmãs Tatiane e
Karina pelo apoio, mesmo na distância.*

DEDICO

*In memoriam a meu pai Leonel Tolentino da Silveira
Filho, aos meus sobrinhos Kaique Carlos,
Alessandra Kalind e meus amigos.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar e me guiar em todos os momentos, principalmente nos que necessitei de sabedoria e paciência.

Aos meus pais, pelo dom da vida em especial a minha mãe Maria das Graças pelo esforço feito para que pudesse realizar mais este sonho; e minhas irmãs Tatiane e Karina pela compreensão mesmo com a distância.

A minha mãe de coração Auderice Vieira pela paciência e compreensão em todos os momentos de correria e estresse desde a graduação. Por toda a ajuda e carinho dedicado.

À minha tia Gilda, que desde pequena sempre incentivou nos estudos. Obrigada pelo seu carinho, atenção.

À Universidade Estadual Paulista – UNESP (Faculdade de Ciências Agrônomicas-Botucatu), pela oportunidade de crescimento profissional com a realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão da bolsa para que pudesse realizar meus estudos em Botucatu, sem esta não seria possível.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, pela oportunidade de orientação, agradeço toda a dedicação e esforço para montar toda a estrutura laboratorial para a realização dos experimentos, orientação, apoio e paciência para que tudo desse certo.

Ao Prof. Dr. Cláudio Cavariani, pela indicação do Prof. Edvaldo Ap. Amaral da Silva como orientador, pela participação na banca de qualificação e colaborações para que o trabalho fosse realizado.

Ao Prof. Dr. João Nakagawa, pela participação na banca de qualificação e defesa pela atenção e ajuda.

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

Aos funcionários do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal, em especial Valéria, Dorival, Amanda e Vera, por toda ajuda em todos os momentos que precisei.

Aos funcionários do Viveiro de mudas da Ciência Florestal, Sr. Claudinho, Sr. João e Sr. Chiquinho pela convivência.

Ao IAC- Instituto Agrônomo em Campinas, em especial a funcionária Denise por envio dos dados climáticos da estação meteorológica de Manduri, colaborando nos resultados.

À minha amiga, antes do Laboratório de Genética do Instituto de Biociências e agora do Laboratório de Sementes e Biologia Molecular da FCA, Juliana Bravo, pela paciência em esclarecer todas as minhas dúvidas neste assunto tão novo para mim e por toda a ajuda, conselhos e tempo dedicados.

As companheiras de república Rita Camila e Luciane Sato pela convivência e paciência na “nossa humilde residência” pelos momentos de atenção, alegria e amizade durante meu doutorado.

Aos amigos que conheci em Botucatu, Euménes Farias, Barbara Panoff, Viviane Sene, Bruna Luiza, Denise Basso, Helen Siglia, Juliana Lima, Iara Brito, Ciça Evangelista, Tiago Gianeti, Moniki, Edypo Jacob, Itaynara, Deivid, Darlin, Renake, Rubiana por todo apoio, companheirismo, amizade em todos os momentos. Agradeço pelo carinho, risadas, reflexões e apoio durante nossa convivência. Levarei um pouco de todos para sempre.

Aos amigos de sempre Everton Hilo, Juliana Alves, Suely, Isabelle, Priscila, Gleize, Rita de Cassia, Marly, Marcos Paulo, Toinha, Sinézio, Dona Dite, Katja Polissení que desde a graduação incentivaram e participaram de minha vida com amizade, respeito, carinho e compreensão mesmo na distância estão sempre presentes.

Ao Prof. Dr. Alessandro Varani juntamente com Camila Fernandes da UNESP-Jaboticabal pela colaboração no trabalho e participação da minha banca de defesa.

A professora Adriana Passos da UEFS-BA pelo aceite de banca examinadora e pelas contribuições na redação final da tese.

A todos que estiveram presentes na minha vida e puderam contribuir de alguma forma em minha formação.

Meus Sinceros Agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE: FAMÍLIA ANNONACEAE.....	6
2.2. DORMÊNCIA EM SEMENTES	9
2.3-GERMINAÇÃO DE SEMENTES.....	13
2.4- REGULAÇÃO HORMONAL: DORMÊNCIA/GERMINAÇÃO DE SEMENTES	17
2.5- ESTUDO DA EXPRESSÃO DE GENES EM SEMENTES	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1- COLETA E EXTRAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>ANNONA CRASSIFLORA</i>	28
3.2- DADOS CLIMÁTICOS E DE SOLO.....	29
3.3- DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DAS SEMENTES	30
3.4- CURVA DE EMBEBIÇÃO EM ÁGUA	30
3.5- GERMINAÇÃO EM CONDIÇÕES DE CAMPO	30
3.6- TRATAMENTO COM GIBERELINA.....	31
3.7-DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DO EMBRIÃO	32
3.8- EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	32
3.9-SEQUENCIAMENTO DE RNA (RNAseq).	33
3.10-ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA E ANOTAÇÃO.	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1-DADOS CLIMÁTICOS E INTERAÇÃO COM TEOR DE ÁGUA E GERMINAÇÃO DE SEMENTES.....	35

4.2-DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DAS SEMENTES	36
4.3- CURVA DE EMBEBIÇÃO EM ÁGUA	37
4.4- GERMINAÇÃO CONDIÇÕES DE CAMPO	38
4.5-COMPRIMENTO DO EMBRIÃO	39
4.6- ANÁLISE DA QUALIDADE DO RNA	44
4.7- SEQUENCIAMENTO (RNAseq) E ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	44
5. CONCLUSÕES.....	100
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tamanho dos transcritos (pb) e valor de expressão em porcentagem do embrião de <i>A. crassiflora</i> durante a superação de dormência morfológica em condições naturais.....	45
Tabela 2- Relação dos cinquenta transcritos mais expressos durante a superação natural de dormência morfofisiológica de sementes de <i>A. crassiflora</i> e suas categorias funcionais relacionadas com a função fisiológica conforme anotação manual feita através do programa BLAST do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).....	47
Tabela 3- Relação de transcritos classificados como dos hormônios observados dentre os 32.884 transcritos durante a superação natural de dormência morfológica de sementes de <i>Annona crassiflora</i> conforme anotação feita através do programa Blast2Go.....	94
Tabela 4- Relação dos vinte últimos transcritos do embrião de <i>A. crassiflora</i> , valor de expressão e tamanho dos (pb), durante a superação de dormência morfológica natural no campo e descrição da sequência feita por anotação manual através do programa BLAST do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).....	98

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Sequencia de atividades realizadas desde o transporte até a extração das sementes de *Annona crassiflora*. **A**-Frutos de *Annona crassiflora* coletados e transportados para o viveiro; **B**-Início do procedimento de extração das sementes; **C**-Betoneira usada para separar a polpa do fruto das sementes; **D**- Separação das sementes dos restos dos frutos; **E**-Sementes com alguns resíduos dos frutos; **F**- Sementes limpas usadas nos experimentos de tecnologia, fisiologia e biologia molecular.....29
- Figura 2-** **A**-Disposição das sementes de *Annona crassiflora* durante a germinação em condições de campo colocadas em sacos de polietileno e enterradas no mês de abril, logo após a dispersão; **B**- Detalhe do saco de polietileno com malha de 5 mm de diâmetro; **C**- Semente intacta logo após o período de dispersão utilizada para os experimentos.....31
- Figura 3-** Dados Climáticos de precipitação total (mm) e temperaturas mínima, média e máxima (° C) a 6cm de profundidade do solo, da estação meteorológica de Manduri (SP). Fonte: IAC-Instituto Agrônomo de Campinas (2012/13).....36
- Figura 4-** Teor de água de sementes de *Annona crassiflora* no período de abril de 2012 a dezembro de 2013 enterradas no solo para germinação.....37
- Figura 5-** Curva de embebição de sementes de *Annona crassiflora* na presença de água na temperatura de 30° C.....38
- Figura 6-** Porcentagem de germinação (barra: germinação mensal e linha germinação acumulada) das sementes de *Annona crassiflora* que foram mensalmente desenterradas e tiveram a germinação avaliada (protrusão radicular) de agosto de 2012 a dezembro de 2013.....39

- Figura 7-** Comprimento do embrião de sementes de *Annona crassiflora* ao longo da superação da dormência morfofisiológica e germinação em condições de campo (abril 2012 até dezembro de 2013).....41
- Figura 8-** Comprimento do embrião de sementes de *Annona crassiflora* logo após a dispersão (abril) embebidas 8 dias em água e embebidas em solução de 100 μ M GA₄ após 28 dias antes da protrusão radicular.....42
- Figura 9-** Sementes de *Annona crassiflora* logo após a dispersão no mês de abril (**A**, **B** e **D**); (**A**): Aspecto do endosperma de *Annona crassiflora* no momento de dispersão (seco); (**B**): Semente cortada longitudinalmente mostrando o endosperma micropilar, lateral e o embrião após a dispersão embebidas em água por 8 dias; (**C** e **D**): Detalhe do tamanho do embrião, mostrando a radícula, hipocótilo e cotilédones-imagens geradas pelo microscópio Stereo/Zoom Luxeo 2S-Labomed; (**E**): Tegumento com fissura que demonstra o crescimento interno do embrião antes da germinação (protrusão radicular); (**F**): Aspecto do endosperma pós tratamento com solução de GA₄; (**G**): Tamanho do embrião pós tratamento com solução de GA₄ antes da germinação.....43
- Figura 10 -** Integridade do RNA (região 18S e 28S) extraído de embriões de sementes de *Annona crassiflora*, com dormência morfológica superada, analisadas por Bionalyzer utilizada no sequenciamento.....44
- Figura 11-** Categorias funcionais dos cinquenta transcritos mais expressos durante a superação natural de dormência morfológica de sementes de *A. crassiflora*.....46
- Figura 12-** Categoria funcional: metabolismo dos cinquenta transcritos mais expressos durante a superação natural de dormência morfofisiológica de sementes de *A. crassiflora*.....51
- Figura 13.** Categoria funcional: ciclo celular e processamento de DNA dos cinquenta transcritos mais expressos durante a superação natural de dormência morfológica de sementes de *A. crassiflora*.....60

Figura 14. Ciclo celular consiste de uma fase mitótica (M), durante a qual ocorrem a primeira divisão nuclear (mitose) e a divisão celular (citocinese). A fase M é seguida de um período longo de crescimento conhecida como interfase (I). A interfase em células que se dividem possui três subfases (G0, G1, S e G2).

Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/figuras/Citologia2/mitose.jpg>.....62

Figura 15. Categoria funcional: resposta ao estresse dos cinquenta transcritos mais expressos durante a superação natural de dormência morfológica de sementes de *A. crassiflora*.....68

Figura 16. Categorias funcionais: Síntese de proteína (■); Comunicação celular (■); Hormônio (■) e transcrição (■) dos cinquenta transcritos mais expressos durante a superação natural de dormência morfológica de sementes de *A. crassiflora*.....79

Figura 17. Diagrama esquemático de GA Metabolismo e vias de resposta. No círculo a ação da família dos GA2ox (1, 3, 5, 6 e 9) na conversão de GA12 e GA53 para GA110 e GA97, respectivamente, por 2β-hidroxilação foi demonstrado experimentalmente apenas para GA2ox6 neste estudo. GA2ox5, GA2ox6, e GA2ox9 são propostos têm funções semelhantes, devido à presença dos três conservados únicas para C 20 GA2oxs. Inativação de precursores C-19 GA, GA 1 e GA 4 pelos C 19 GA2oxs, GA2ox1 e GA2ox3, em arroz foi demonstrado experimentalmente (SAKAMOTO et al., 2001; SAKAI et al., 2003). Bioativo GA regula positivamente a germinação, caule e raiz de alongamento e desenvolvimento da flor, mas regula negativamente OSH1 e TB1 que controlam o perfilhamento. GA também regula negativamente o desenvolvimento das raízes adventícias. Em plantas transgênicas de *Arabidopsis* e tabaco (*Nicotiana tabacum*) estudos demonstraram que GA2oxs são responsáveis pela redução do nível de GAs ativos nas plantas.....91

ESTUDOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DURANTE A SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA MORFOLÓGICA DE SEMENTES DE *ANNONA CRASSIFLORA*. Botucatu, 2014. **146p.** Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: PATRÍCIA SOUZA DA SILVEIRA

Orientador: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

RESUMO

A ocorrência de dormência se opõe ao pleno sucesso da propagação futura das espécies nativas de interesse para fins comerciais. Assim, o principal objetivo é o estudo fisiológico e molecular de sementes (embrião) de *Annona crassiflora* durante a superação da dormência morfofisiológica natural no campo. As sementes foram coletadas de áreas do cerrado do Estado de Minas Gerais, secas em temperatura entre 20-25°C, em condições de laboratório, até atingirem umidade de 10% com base úmida. Foram feitas no mesmo lote de sementes a determinação da curva de embebição em água, germinação em campo, teor de água e crescimento do embrião mensal. As sementes foram colocadas em sacos de poliéster com orifícios de 0,5 cm de diâmetro e, enterradas no mês de abril. Em paralelo, sementes foram colocadas para embeber em solução de giberelina (GA_4) na concentração de 100 μ M, por oito dias e tiveram o comprimento do embrião e teor de água avaliados. Em novembro, as sementes enterradas a campo foram desenterradas e as que apresentaram rupturas no tegumento (sem protrusão radicular) tiveram o embrião isolados para a extração de RNA. Em seguida a integridade do RNA foi verificada em Bioanalyzer (Agilent 2100) e as bibliotecas foram preparadas utilizando o protocolo TruSeq RNA sample prep v2. O sequenciamento foi realizado no HiScanSQ (Illumina) e os dados gerados analisados pela plataforma CLC Genomics Workbench versão 6.0.2 (CLC bio, Denmark) para montagem do transcriptoma referência e quantificação da expressão por valores de RPKM (*Reads per Kilobase per Million of mapped reads*). Os *contigs* foram anotados usando o programa BLAST2Go e manualmente. A semente de *A. crassiflora* estava totalmente embebida em torno de sete dias de embebição e o teor de água variou de acordo com as condições de umidade do solo, sendo maior no período de germinação. O crescimento do embrião iniciou-se no mês de agosto indo até janeiro, com pico de germinação em outubro. Após este período, as sementes que não germinaram formaram banco de sementes e não houve crescimento do embrião. Após 28 dias do início da embebição em GA_4 , a primeira semente apresentou ruptura do tegumento, indicando crescimento do embrião. Foram gerados 32.883 transcritos, dos quais os cinquenta mais expressos estão relacionados ao metabolismo, resposta ao estresse, ciclo celular e processamento de DNA, síntese de proteína, comunicação celular, hormônio e transcrição celular. Os vinte menos expressos foram associados à signal-peptide que comumente estão relacionados à translocação em eucariotos entre membranas.

Palavras-chave: biodiversidade, RNA (seq), cerrado, conservação.

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR STUDIES DURING OVERCOMING OF THE MORPHOLOGICAL DORMANCY IN SEEDS OF *ANNONA CRASSIFLORA*. Botucatu, 2014. **146p.** Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: PATRÍCIA SOUZA DA SILVEIRA

Adviser: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

ABSTRACT

The occurrence of dormancy opposes to the success of the future propagation of species. Thus, the objective of this study was to perform physiological and molecular studies in seed of *Annona crassiflora* during overcoming morphological dormancy under field conditions. The seeds were collected from areas of the Cerrado biome from the Minas Gerais State, dried at room temperature until the moisture content of 10% on wet basis. The imbibition curve, germination in the field, water content and growth of the embryo were made in the same batch of seeds. The seeds were placed in polyester bags with holes of 0.5 cm diameter, buried in April. In parallel, seeds were also imbibed in gibberellin (GA₄) at a concentration of 100µM during seven days and had the embryo length measured. In October, embryos were isolated from seeds showing growth of the embryo but without radicle protrusion for RNA extraction. The integrity of the RNAs was verified in Bioanalyzer (Agilent 2100). Following, cDNA libraries were prepared using the TruSeq RNA sample prep protocol v2. Sequencing was performed in HiScanSQ (Illumina) and the analyses of the data was performed by using the CLC Genomics Workbench platform version 6.0.2 (CLC bio, Denmark) for transcriptome assembly and quantification of the expression values for RPKM (Reads per kilobase per Million of mapped reads). The contigs were annotated using the program BLAST2Go and manually. The seed is fully imbibed at seven days imbibitions, and the water content varies with soil conditions being higher during germination. The growth of the embryo starts in August and maintained until January, with peak of germination observed in November. After this period, the seeds that did not germinate formed a soil seed bank and there was no growth of the embryo. After 28 days from the start of imbibitions in GA₄ the first seeds showed testa rupture indicating growth of the embryo. From the sequencing experiments 32,883 transcripts were generated, of which fifty were highly expressed being related to metabolism, stress response, cell cycle and DNA processing, protein synthesis, cell communication, cell hormone transcription and twenty signal-peptide that are commonly associated translocation across membranes in eukaryotes.

Keywords: biodiversity, RNA (seq), cerrado conservation.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com muita diversidade compreendendo os biomas que são estrutural e funcionalmente complexos, que abriga a maior diversidade vegetal do mundo (FORZZA et al., 2012), e que apresenta uma oportunidade única para desvendar questões de longa data, como a dormência de sementes, usando nossa flora como um modelo de estudo (SILVEIRA, 2012). Portanto, padronizando a comunicação entre os cientistas de sementes para uma mais profunda compreensão sobre a filogenética e biogeografia da distribuição de dormência das sementes. Estudo da dormência das sementes é realmente uma tarefa difícil (FINCH-SAVAGE e LEUBNER METZGER, 2006), pois as pesquisas devem ter uma multiplicidade de processos correlatos que podem afetar os resultados de experimentos de germinação.

A maneira amplamente utilizada até o momento para se avaliar a qualidade fisiológica de sementes é o teste de germinação. Todavia, a germinação é o final de várias etapas que ocorrem, na semente, antes que haja a emergência da plântula. Além disso, um grande número de sementes é necessário para que o resultado do teste de germinação obtido seja estatisticamente aceito.

Portanto, métodos alternativos, rápidos e eficientes para diagnosticar a qualidade de sementes precisam ser desenvolvidos. Nos últimos anos o desenvolvimento da biologia molecular tem possibilitado o uso e a aplicação de técnicas moleculares que podem levar ao entendimento do estado em que a semente se encontra. Por exemplo, se uma semente não germina, ela pode estar morta, todavia ela pode também estar quiescente ou dormente. Testando vários parâmetros moleculares é possível detectar qual destas condições está presente. Além disso, é possível inferir se a dormência é endógena (localizada no embrião) ou, exógena (localizada no endosperma ou parte do fruto) e qual o tipo de dormência.

Dormência de sementes é uma propriedade inata da semente que esta, diretamente, associada às condições ambientais em que a semente é capaz de germinar (FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER, 2006). É determinada por fatores genéticos com uma substancial influência ambiental e fornece adaptação a uma diversidade de habitats. Dormência da semente é, portanto, um importante componente para a sobrevivência das plantas (DONOHUE et al., 2005; HUANG et al., 2010).

Vários genes têm sido descritos estarem envolvidos com germinação, dormência e outros parâmetros da qualidade de sementes. Quando compreendida a expressão destes genes, mRNAs poderão ser utilizados como marcadores da qualidade de sementes para um grande número de espécies. O estudo da expressão de genes pode ser feita pela análise dos transcritos através de sequenciamento, a fim de observar o transcriptoma completo.

O transcriptoma é o conjunto completo de RNA de um organismo, um grupo de células ou mesmo de uma célula específica em uma determinada condição fisiológica. O RNA é sintetizado do DNA através de um processo conhecido como transcrição. O RNA presente em uma célula determina quais genes serão expressos e pode mudar durante a vida do organismo, diferentemente do DNA, que se mantém estático. Alterações ambientais são uma das principais causas de mudanças, tendo em vista que o organismo tenta se adaptar a estas mudanças para continuar vivo (SILVA, 2012).

Dentre várias técnicas de avaliar um transcrito, a técnica de RNA-Seq é o sequenciamento em larga escala de RNA, utilizando sequenciadores de nova geração que contribui para representar os resultados dos transcriptomas analisados. Essas informações geradas são analisadas por softwares específicos, tornando-as mais claras aos pesquisadores que as utilizam em novas pesquisas e comparações de organismos.

Estes estudos têm a vantagem de em uma experiência de RNA-seq único, pode derivar, não só uma, exata, quantitativa medida da expressão do gene individual (como com um padrão expressão microarray), mas também, descobrir novas regiões transcritas de uma maneira imparcial (como com uma abordagem do genoma inteiro como referência). Em experimentos de RNA-seq, os limites da dinâmica intervalo medido é determinado apenas pela quantidade do sequenciamento obtida. Isto significa que, a continuação do sequenciamento de uma dada biblioteca, deve ser possível para eventualmente medir a expressão de toda transcrição presente e assim a

dinâmica" intervalo "representa apenas a real diversidade biológica do transcriptoma (WILHELM e LANDRY, 2009).

Embora estudos da ecofisiologia da germinação em sementes de *Annona crassiflora* tenha permitido classificar o tipo de dormência presente nas sementes e quando a mesma é superada, ainda não se sabe qual ou quais são as mudanças moleculares envolvidas com a superação da dormência fisiológica e morfológica em sementes de *Annona crassiflora*. Por exemplo, o que muda no embrião ao nível de transcritos após a dispersão, que permite a superação da dormência fisiológica (nos meses de março a agosto) e a superação da dormência morfológica (a partir de setembro).

Assim o objetivo deste trabalho foi de relizar estudos fisiológicos e moleculares nas sementes (embrião) de *Annona crassiflora* durante a superação da dormência morfológica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caracterização da espécie: família Annonaceae

A família Annonaceae Juss. (1789) junto com as famílias Magnoliaceae Juss. (1789), Myristicaceae R.Br. (1810), Degeneriaceae I.W.Bailey e A.C.Sm. (1942), Eupomatiaceae Orb. (1845) e Himantandraceae. Diels (1917) compõe a ordem Magnoliales Juss. Ex Bercht. EJ.Presl (1820), pertencente ao clado das Magnoliídeas, grupo basal das Angiospermas (APGIII, 2009). Apresenta distribuição predominantemente tropical, incluindo aproximadamente 130 gêneros e 2200 espécies (SOUZA e LORENZI, 2008).

Os registros de florestas tropicais de todos os continentes, invariavelmente, listam a família Annonaceae como uma das plantas mais diversificadas (PHILLIPS e MILLER, 2002). Em termos de riqueza de espécie se abundância de indivíduos, Annonaceae contribui significativamente para a diversidade de árvores de Florestas neotropicais (GENTRY, 1988; VALENCIA, BALSLEV e PAZ Y MIÑO, 1994) e lianas e árvores em florestas tropicais do Velho Mundo (VAN GEMERDEN et al., 2003; SLIK et al., 2003; TCHOUTO et al., 2006). Cerca de 2.400 espécies em 108 gêneros são atualmente reconhecidas na família (RAINER e CHATROU, 2006), mais de 300 dos quais têm sido descritos a taxonomia em literaturas científicas, monografias e floras regionais ou continentais, desde o início do projeto Annonaceae internacional

há quase 30 anos (MAAS, 1983; CHATROU, 1999). Em paralelo, com os renovados esforços taxonômicos dos últimos anos têm visto de estudos cada vez mais detalhados da filogenética da Annonaceae (DOYLE e LE THOMAS, 1994, 1996; MOLS et al., 2004; PIRIE et al., 2006; COUVREUR et al., 2008; ERKENS, MAAS e COUVREUR, 2009; CHARTROU et al., 2012).

No território brasileiro, estão registrados 33 gêneros e cerca de 250 espécies, com ocorrência em praticamente todas as formações naturais (SOUZA; LORENZI, 2008). No Brasil, apenas as espécies do gênero *Annona* são cultivadas comercialmente. Destacam-se, deste gênero, as espécies *Annona squamosa* L. (fruta-do-conde), *Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L. (atemóia; híbrido interespecífico entre a fruta-do-conde e a cherimóia), as quais o cultivo visa a produção de frutos para consumo *in natura* e a espécie *Annona muricata* L. (graviola), explorada com a finalidade de produção de polpa industrializada (DONADIO, 1997; SCALOPPI JUNIOR, 2007). Sugere-se o uso das espécies silvestres, ou seja pouco domesticadas como a *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer e a *Annona crassiflora* como porta enxerto para as espécies da família Annonaceae (TOKUNAGA, 2000; SCALOPPI JUNIOR, 2007). A necessidade do conhecimento de aspectos fisiológicos da germinação, visando fornecer subsídios para a produção de mudas de qualidade para a instalação de novos pomares, é fundamental para o processo de produção agrícola, considerando que a forma de propagação mais indicada para as anonáceas comerciais é a enxertia (GEORGE e NISSEN, 1987; GAMA e MANICA, 1994).

Dentre as inúmeras frutíferas nativas que apresentam potencial de utilização em sistemas tradicionais de produção agrícola a *Annona crassiflora* Mart., constitui a única espécie frutífera característica e exclusiva do cerrado brasileiro. Apresenta distribuição bastante ampla, desde o Estado de São Paulo até Tocantins, passando por Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Maranhão, Pará, Bahia, Piauí em áreas de cerrados e cerradões, sendo mais frequente em terrenos elevados e de solos arenosos (LORENZI, 1998; RIBEIRO et al., 2000).

A *A. crassiflora* é conhecida popularmente como araticum, cabeça-de-negro, cortiça, pana, cascudo, pinha-do-cerrado ou marolo (MELO, 2005; FERREIRA, 2011) e destaca-se pelo sabor de seus frutos, que são muito apreciados em decorrência da polpa levemente adocicada e cheiro agradável. Sendo por isso, facilmente comercializável (ALMEIDA, 1998), nas ruas, mercados, feiras e à beira de estradas, podendo ser consumido *in natura* ou processado na forma de doces, licores,

sorvetes, existindo um mercado para o fruto durante os meses de fevereiro a abril, no período de dispersão da espécie (MELO, 2005).

A. crassiflora é descrita por Lorenzi (1998) como uma planta arbórea decídua, xerófita e hemafródita, com altura variando entre 4m e 8m e o diâmetro da copa chegando aos 4m. O tronco é geralmente tortuoso, variando entre 20cm e 30cm de diâmetro, revestido por uma casca áspera e corticosa resistente à ação do fogo. As folhas são crasso-membranosas, glaucas, coriáceas quando maduras e ferrugineo-hirsutas quando jovens (LORENZI, 1998). A planta possui sistema radicular do tipo axial ou pivotante que atinge grandes profundidades (CARVALHO, 2002). A planta floresce, geralmente, entre os meses de outubro a novembro (LORENZI, 1998).

As flores são geralmente solitárias, podendo ser encontra das flores agrupadas, axilares, com pétalas engrossadas e carnosas de cor verde amarelada e sedosas (LORENZI, 1998), são ainda hermafroditas e apresentam protoginia, isto é, o gineceu - órgão feminino - amadurece primeiro que o androceu - órgão masculino - (CARVALHO, 2002). A polinização é do tipo entomófila (realizada por insetos), principalmente, por pequenos coleópteros, mais frequentemente a espécie *Cyclocephola octopunctata* (CAVALCANTE et al., 2009). As flores ainda, apresentam o fenômeno de termogênese, isto é, a flor totalmente formada sofre um leve aquecimento no início da noite, mais ou menos 10°C no seu interior, quando comparada com a temperatura externa. Devido a esse aquecimento interno, a flor exala um forte cheiro que atrai seus polinizadores (CARVALHO, 2002). Contudo, há baixa taxa de frutificação, devido à alta taxa de aborto dos botões florais, podendo alcançar 50% do total dos frutos produzidos (RIBEIRO et al., 1981; BRAGA FILHO, 2003; BRAGA e FILHO et al., 2005).

O fruto de *A. crassiflora* é uma baga subglobosa de superfície tomentosa e tuberculada ou papilosa, contendo polpa branca, aquosa, levemente adocicada e de cheiro agradável, com numerosas sementes que possuem tegumento liso (LORENZI, 1998). A dispersão dos frutos ocorre por meio da gravidade (barocórica). Entretanto, Melo (2005), descreve que besouros, também, podem ser dispersores ao enterraram as sementes longe da planta mãe. Golin, Santos-Filho e Pereira (2011) relatam que animais maiores como a Anta (*Tapirus terrestris*) são responsáveis pela dispersão secundária e efetiva de *A. crassiflora*, e a espécie de besouro *Spermologus rufus* e a vespa *Bephratelloide spomorum* são predadores de suas sementes.

As sementes são grandes, de tamanho variável, tegumento coriáceo e endosperma rígido (RIZZINI, 1973). O endosperma é o principal componente da semente, apresentando células de formato isodiamétrico; a presença de óleos tem sido relatada (HEIJDEN e BOUMAN, 1988). As paredes celulares das células do endosperma da Annonaceae são bastante rígidas (HEIJDEN e BOUMAN, 1988), possivelmente, compostas de celulose, mananas ou galactomananas. O embrião de *A. crassiflora* é pequeno, localizado na região do endosperma micropilar com aproximadamente dois mm de comprimento no momento da dispersão das sementes, sendo possível distinguir o eixo e os cotilédones (SILVA et al., 2007).

2.2. Dormência em sementes

Embora muitos pesquisadores estudem a dormência de sementes, não há uma definição amplamente usada para o fenômeno, talvez por ser manifestada é superada de diversas maneiras em diferentes espécies (BEWLEY e BLACK, 1994). Assim, a dormência de sementes é o processo caracterizado pelo atraso da germinação ou até mesmo sua ausência, mesmo estando estas sementes em condições ambientais satisfatórias para a germinação. Componentes do processo de germinação, tais como embebição, respiração, síntese de ácidos nucleicos e proteínas e inúmeros outros eventos metabólicos, podem ocorrer em uma semente dormente, sem que haja protrusão da radícula (BEWLEY e BLACK, 1994).

De acordo com Eira e Caldas (2000), a dormência de sementes é apresentada como estado fisiológico em que a germinação é bloqueada por mecanismos relacionados à própria semente, que podem ser induzidos por efeitos ambientais e/ou genéticos durante o desenvolvimento ou após a dispersão, consistindo de diversos mecanismos diferentes, que bloqueiam o desenvolvimento em qualquer etapa necessária para germinação.

Este mecanismo de adaptação é devido ao processo de seleção ao longo da história evolutiva das espécies, onde a dormência se tornou uma característica chave para a sobrevivência da espécie frente às condições de estresse que suas sementes e plântulas enfrentavam a cada ciclo reprodutivo. Como a dormência é o resultado de adaptação para as mais variadas situações encontradas no planeta terra, várias são as formas em que este fenômeno se manifesta, podendo ser desde alguma resistência a entrada de água para a germinação, até os mais complexos mecanismos

hormonais que controlam o desenvolvimento da semente (BEWLEY e BLACK, 1994). O grau de dormência é, normalmente, relacionado com o grau de germinação. Há uma dificuldade em determinar se um fator influencia a germinação ou a dormência. Segundo Bewley e Black (1994), a essência de se desvendar os mecanismos de dormência está na capacidade de se distinguir a sua causa e o efeito.

Bewley e Black (1994) relatam, ainda, que a dormência “embrionária” apresenta inibidores de germinação no eixo embrionário, como ácido abscísico. Coll et al. (2001) citam que além do ácido abscísico, há também, dormência relacionada com embrião rudimentar ou imaturo. Na dormência morfológica há diferenciação do embrião, porém o mesmo se encontra pouco desenvolvido. Frequentemente, é observado em Annonaceae, Arecaceae, Araceae, Liliaceae, Magnoliaceae e outras, sendo a maioria de clima tropical e poucas espécies de clima temperado (BASKIN e BASKIN, 1998). Uma das características das sementes de *A. crassiflora* é a presença de embrião rudimentar e de desenvolvimento lento, mesmo quando o fruto está maduro. Esse estado perdura mesmo depois de extraídas as sementes dos frutos e só ocorrerá germinação quando completar a diferenciação ou quando o embrião crescer (SANEWSKI, 1991; SMET et al., 1999 referindo-se a citação de HAYAT, 1963, SILVA et al., 2007). Na natureza, o período que passam, seja em ambiente quente ou frio, colabora para completar o desenvolvimento do embrião após a semente ter sido dispersa da planta mãe (BASKIN e BASKIN, 1998).

As sementes de *Annona crassiflora* apresentam longo período de dormência, sendo que o início da germinação naturalmente ocorre entre 237 a 292 dias após a dispersão. Assim, a produção de mudas de *A. crassiflora* é dificultada, pois demora muito tempo para obtê-las. A dormência morfofisiológica ocorre desde o momento da dispersão, sendo necessário que as sementes superem inicialmente a dormência fisiológica e depois a dormência morfológica, para que a germinação ocorra (SILVA et al. 2007).

Tanto a indução, quanto a superação da dormência fisiológica pode ser iniciada por variações ambientais. Essas causas podem ter características da sazonalidade, como por exemplo, as variações na temperatura, onde a dormência pode ser quebrada por altas ou baixas temperaturas, variando de espécie para espécie de acordo com a estação do ano. Condições como fotoperíodo, temperatura e qualidade da luz que ocorrem durante a maturação e depois da dispersão das sementes, são conhecidas como variações ambientais que podem alterar o grau de dormência

(profundidade de dormência) e, modificar as condições requeridas para que ocorra a germinação. Assim, é possível que a larga variedade de interações entre o ambiente e dormência fisiológica revele a possibilidade de ocorrência de mecanismos genéticos, especificamente adaptados através de variação alélica natural em genes regulatórios considerados chave (FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER, 2006).

Dormência de sementes é uma propriedade inata da semente definida pelas condições ambientais em que a semente é capaz de germinar (FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER, 2006). É determinada por fatores genéticos, e é uma característica complexa, influenciada por fatores ambientais e endógenos, fornecendo adaptação a uma diversidade de habitats. Além disso, o nível final de dormência é determinado pelas contribuições dos diferentes tecidos que compreendem uma semente, as diferentes espécies de plantas apresentam uma variedade de estruturas de semente (LINKIES et al., 2010).

Dormência da semente é, portanto, um importante componente da planta de habilidade para sobrevivência (fitness) (DONOHUE et al., 2005; HUANG et al., 2010). Baixos níveis de dormência em sementes podem levar a germinação antes do início de uma temporada de crescimento favorável, ocasionando mortalidade das plântulas. Em contraste, níveis muito altos de dormência da semente atrasam a germinação e reduzem o período da estação de crescimento (DONOHUE et al., 2010).

A grande maioria dos estudos molecular genéticos sobre a dormência das sementes foi realizada em sementes completas e não levou em consideração as contribuições individuais destes tecidos. Mais recentemente, diversos estudos começaram a abordar o papel dos tecidos separados no controle de dormência. A dormência é uma característica quantitativa cuja profundidade varia ao longo tempo. Contudo, a dormência primária é induzida durante a fase de maturação da semente e atinge um nível elevado em sementes recém-colhidas. Durante o armazenamento, a secagem subsequente das sementes a dormência reduz lentamente (HOLDSWORTH, BENTSINK e SOPPE, 2008).

Quando o nível de dormência de um lote de sementes diminui gradualmente, o período de condições ambientais para germinação está se ampliando. As sementes também superam rapidamente dormência durante a embebição em condições específicas. Por exemplo, altas ou as baixas temperaturas por alguns dias (FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER, 2006) ou compostos presentes na fumaça (FLEMATTI et al., 2004) a dormência das sementes é superada em sementes

embebidas. Em condições naturais no banco de sementes, o nível de dormência das sementes geralmente ciclos ao longo do ano, permitindo a sementes têm o maior potencial de germinação no início da estação de crescimento (FOOTITT et al., 2011).

Silva et al. (2007) observaram a formação de banco de sementes de *Annona crassiflora* e germinação adicionais de um ano para o outro com o início da germinação, após o aumento da temperatura mínima e máxima. Constataram ainda, o aumento do comprimento do embrião coincidiu com o início da divisão celular anterior à emissão da radícula, observado por microscopia eletrônica de varredura, que começou em setembro. Embriões de sementes que permaneceram dormentes no solo (cerca de 40%) não cresceram. Assim, apenas as sementes que estavam germinando mostraram um aumento no comprimento do embrião. Esse comportamento indica que a espécie pode contribuir para a formação de bancos de sementes do solo, permitindo a germinação de apenas uma parte da população de sementes no ano de dispersão. Cerca de 20% das sementes germinaram no ano seguinte (2004), com um calendário semelhante ao de 2003, enquanto as sementes remanescentes foram predadas por insetos ou deteriorada naturalmente no solo. Este mecanismo permite a sobrevivência das plantas para se manter e perpetuar no Cerrado.

Assim, as sementes “agem” como sensores ambientais e ajustam seu estado de dormência como resposta a uma série de fatores ambientais (FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER, 2006; FOOTITT et al., 2011; KENDALL et al., 2011). Sintoniza resposta ciclos dormência com as estações do ano e oferece o tempo ideal para a germinação de sementes e estabelecimento de plântulas. Dentre os principais fatores ambientais, destacam-se a temperatura, nitrato, luz, água, oxigênio, fumaça e aleloquímicos. Estes influenciam nos níveis de dormência, durante o desenvolvimento da semente na mãe planta ou no banco de sementes do solo. De acordo com FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER (2006), a germinação requer condições ambientais específicas à sensibilidade das sementes e os fatores ambientais mudam continuamente.

A natureza e a escala dessas alterações podem ser uma espécie ou ecotipo específico para adaptação de seus habitats. Portanto, um estado dormente, claramente definido, não existe, ocorrem apenas diferentes requisitos para a germinação. Algumas destas exigências de germinação pode ser tão extremo que não ocorre normalmente na espécie em seu habitat natural. A exposição à condições ambientais específicas é, geralmente, necessária para trazer a sensibilidade de

germinação de volta em um intervalo que ao corresponde potencial ambiental em exposição (FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER, 2006).

2.3-Germinação de sementes

O período de repouso fisiológico é sucedido pelo início do processo de germinação, que pode ser conceituado de diversas maneiras dependendo do ponto de vista e da forma de abordagem da questão. Segundo o conceito clássico, definido por Berlyn (1972) a germinação é uma sequência de eventos morfogenéticos que resultam na transformação do embrião em plântula. Todo processo é dependente de uma série complexa de transformações físicas e químicas interligadas.

Morfológicamente, a germinação é a transformação do embrião em plântula, enquanto, sob o ponto de vista fisiológico, a germinação consiste na retomada do metabolismo e do crescimento, que estão reduzidos ou suspensos após a maturidade, e transcrição do genoma. Bioquimicamente a germinação refere-se à diferenciação sequencial dos caminhos oxidativos e de síntese e a retomada de uma sequência de processos bioquímicos característicos do crescimento vegetativo e do desenvolvimento (JANN e AMEN, 1980).

A germinação de uma semente por definição, começa com a absorção de água e completa-se com a protrusão da raiz, através de seus tecidos circundantes. Definições como esta, levam a diversas contradições de eventos celulares e moleculares que ocorrem durante a germinação, quando na verdade, o crescimento da plântula também faz parte da germinação (NONOGAKI et al., 2010). De acordo com Marcos Filho (2005), a água é de fundamental importância ao metabolismo celular da germinação, pois interfere na atividade enzimática, na solubilização e transporte de fotoassimilados, atuando como reagente na digestão das reservas da semente. Assim, Bewley e Black (1978) propuseram um padrão trifásico de absorção de água, satisfazendo grande parte dos resultados dos estudos de curva de embebição de sementes de diferentes espécies.

Segundo Borghetti (2004), a germinação é um processo composto por três fases que consistem na embebição (fase I), na ativação dos processos metabólicos requeridos para o crescimento do embrião (fase II) e na iniciação do crescimento do embrião (fase III). A duração de cada fase depende de propriedades

inerentes à semente, como a permeabilidade do tegumento e o tamanho da semente e, também, das condições durante a embebição, como temperatura e composição do substrato (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000), sendo que a temperatura influencia na velocidade de absorção de água, germinabilidade, velocidade e uniformidade de germinação e nas reações bioquímicas que determinam todo o processo (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Embora a utilização destas fases seja conveniente para ilustrar os eventos que ocorrem na germinação de sementes, estas não definem os eventos metabólicos, pois, o conteúdo celular de uma semente seca é estabelecido durante um prévio desenvolvimento, o que permite a retomada dos acontecimentos metabólicos rapidamente após a reintrodução de água (NONOGAKI et al., 2010). Ainda conforme esses autores acima, como produto de germinação, o metabolismo da semente, presumivelmente, torna-se envolvido nos processos vitais para o surgimento da radícula. A velocidade de absorção de água pela semente varia com a espécie, permeabilidade do tegumento, disponibilidade de água, temperatura, pressão hidrostática, área de contato da semente/água, forças intermoleculares, composição química e condição fisiológica da semente (CARVALHO et al., 2012).

Portanto, é característico da família Annonaceae possuir um tempo superior de embebição (Fase I), conforme relatado por diversos autores. Ferreira et al. (1997) observaram que em sementes de *atémóia*, com 12 horas após o início do contato com substrato úmido, a embebição continuava crescente, demonstrando estar na fase I, enquanto as de *fruta-do-conde*, com 5 horas, a fase I já havia sido concluída. Posteriormente, Ferreira et al. (2006) verificaram que as sementes de *atémóia* apresentaram ponto de mudança entre as fases I e II após 27 horas de embebição e início da fase III após 234 horas. Melo (2005) observou que, em sementes de *A. crassiflora*, somente após sete dias de embebição as mesmas entraram na fase II da germinação.

Genes associados com qualidade de sementes podem ser divididos em duas classes. A primeira classe seriam genes envolvidos com o metabolismo, os quais têm a expressão aumentada durante a embebição da semente. A expressão destes genes pode indicar a viabilidade das sementes. Por exemplo, Gallardo et al., (2001a) e Gallardo et al., (2001b), usando a técnica de proteoma, observaram que giberelina induz α -2,4-tubulina e aparentemente este gene está fortemente associado com germinação. Além destes genes, Potokina et al. (2002) identificaram mais de 1440 genes associados com germinação em sementes de *Hordeum vulgare* L (aveia). Bem

como genes envolvidos com degradação de reservas, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de lipídeos, metabolismo de nitrogênio e etc. Assim, genes e produtos gênicos relacionados com os eventos mencionados acima podem ser excelentes marcadores da germinação de sementes.

Existe um segundo grupo de genes, que estão associados com dormência. Quando a semente está dormente, estes genes podem ter a expressão aumentada ou ter a expressão diminuída, quando a semente não está dormente. Finch-Savage et al. (2007) apresentaram resultados que mostram uma clara evidência que o balanço entre os hormônios ABA e GAs em sementes de *Arabidopsis thaliana*. Esses autores observaram que genes envolvidos com a síntese GA, como *GA3ox1*, têm a expressão aumentada com a superação da dormência e germinação, enquanto que os genes envolvidos com a síntese de ABA têm a expressão diminuída, como *NCED4*; *NCED6*; *NCED9*.

Resultado obtido por Finch- Savage et al., (2007), com relação ao balanço em ABA e GA interferindo na expressão gênica durante a superação da dormência fisiológica em *Arabidopsis thaliana*, pode ocorrer também em sementes de *Annona crassiflora*, durante a superação da dormência fisiológica em condições de campo no período de março a agosto (outono e inverno) e na superação da dormência morfológica (a partir de setembro) (SILVA et al., 2007). Quando se trata de persistência de sementes em bancos de solo como ocorre na *A. crassiflora*, as respostas aos estímulos ambientais e fenológicos, adaptação às mudanças ambientais para a germinação, é importante terem em conta que os resultados obtidos a partir da interpretação de experiências ecológicas representam uma combinação de efeitos de dormência bem como nos mecanismos da germinação.

Alguns fatores ambientais, como, a temperatura do solo e umidade, estão relacionados para retardar as mudanças sazonais e indicar quando existe adequado momento do ano e espaço climático (janela temporal). Estes sinais são integrados ao longo do tempo para alterar a profundidade de dormência e, portanto, a sensibilidade a um segundo conjunto de fatores ambientais. Estes incluem nitrato, luz e as temperaturas alternadas, e indicará de modo mais imediato se as condições são apropriadas para terminar a dormência e induzir a germinação (janela espacial). Esta janela espacial inclui solo apropriado, profundidade, temperatura, umidade e falta de plantas concorrentes. Se a janela correta espacial não ocorre, a janela temporal será fechada por mais um ano (FOOTITT et al., 2011).

Usando uma investigação da expressão do gene alvo em relação ao ciclo de dormência das sementes de *Arabidopsis cvi* no campo, Footitt et al. (2011) investigaram a forma como estes mecanismos são sazonalmente coordenados. Profundidade de dormência e padrões de expressão de genes foram correlacionadas com mudanças sazonais na temperatura do solo. Verificou-se sinalização do ABA ligada a dormência profunda no inverno e reprimida na primavera, quando a profundidade da dormência diminuiu.

A dormência das sementes *Arabidopsi cvi* aumentou durante o inverno, a temperatura do solo diminuiu e a expressão de genes da síntese do ABA (*NCED6*) e ácido giberélico (GA) catabolismo (*GA2ox2*) aumentaram, assim, a dormência em seguida, caiu na primavera e verão. ABA endógeno diminuiu juntamente com a sinalização positiva ABA como expressão de genes *ABI2*, *ABI4*, catabolismo ABA (*CYP707A2*) e síntese (GA) *GA3ox1* aumentou. No entanto, durante a fase de baixa dormência no verão, a expressão de transcritos para os repressores da germinação RGA e RGL2 foi aumentada (FOOTITT et al., 2011).

Trabalhos que ajudam na compreensão da dormência e no controle da germinação em sementes resultante da grande escala no perfil de expressão gens de RNA e os níveis de proteína são relatados por Finch-Savage e Leubner-Metzger, 2006; Bradford e Nnogaki, 2007; Holdsworth et al., 2008 a, b; Catusse et al. 2008a, b; Finkelstein et al., 2008; Henk et al., 2010.

É claro nos trabalhos que ambos, transcriptoma (OGAWA et al., 2003; NAKABAYASHI et al., 2005; CAO et al., 2006; CADMAN et al., 2006; FINCH-SAVAGE et al., 2007; CARRERA et al., 2007, 2008) e do proteoma (GALLARDO et al., 2001; RAJJOU et al., 2004; JOB et al., 2005; CHIBANI et al., 2006; ORACZ et al., 2007), tem alterações na expressão do genoma envolvidas no controle da ciclagem através de diferentes níveis de dormência e a transição final para a conclusão da germinação.

Grandes avanços foram alcançados no conhecimento das vias hormonais para determinação da dormência e nas interações entre essas vias. Além disso, a existência de importantes reguladores de dormência que não sejam diretamente parte das vias hormonais está se tornando cada vez mais claros. Apesar do progresso dos últimos anos, várias questões importantes permanecem sem resposta, como em relação a temperatura, por exemplo. Mesmo, mais importante, a identidade molecular da dormência em sementes não é completamente compreendida. Muitos fatores que

influenciam a dormência têm sido descritos, mas não é conhecido para a maioria deles como eles interagem e se relacionam. Também não se sabe se a natureza molecular da dormência consiste de uma combinação de vários fatores diferentes, ou se um único agente central é responsável por todos os outros fatores envolvidos (GRAEBER et al., 2012).

2.4- Regulação hormonal: dormência/germinação de sementes

A indução de dormência da semente é controlada por uma diversidade de grupos de reguladores que atuam em vários níveis e que mostram diferentes graus de especificidade (GRAEBER et al., 2012). Vários estudos genéticos, utilizando o ácido abscísico (ABA) e mutantes da biossíntese e sinalização de giberelina (GA), têm demonstrado que estes dois hormônios são essenciais e têm papéis antagônicos na dormência e germinação. O equilíbrio entre os níveis destes dois hormônios e suas respectivas vias de sinalização são importante na regulação de indução e manutenção de dormência e promoção da germinação (FINKELSTEIN et al., 2008).

Antagônica à ação de ABA, GA, etileno e outros hormônios são importantes em promover a germinação (HOLDSWORTH et al., 2008; MATILLA e MATILLA-VÁZQUEZ, 2008; LINKIES e LEUBNER-METZGER, 2012). Sinais ambientais, tais como a luz e a temperatura durante a embebição e germinação, são associados com a biossíntese de GA e a sinalização por fatores de transcrição como fitocromo *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5 (PIL5)* e *SPATULA (SPT)* (PENFIELD et al., 2005; OH et al., 2009). Tem sido demonstrado que o etileno regula o enfraquecimento e o rompimento do endosperma micropilar em *Lepidium sativum* (agrião de jardim-uma Brassicaceae), contrario a ação da ABA (LINKIES et al., 2009).

O ácido abscísico (ABA) desempenha um papel proeminente na dormência, o controle de germinação precoce (HILHORST, 1995; KERMODE, 2005), a tolerância a dessecação, o desenvolvimento da semente e as respostas do vegetal ao estresse hídrico (TAIZ e ZEIGER, 2006). A falta de ABA em algumas espécies de plantas produzem sementes vivíparas (MCCARTY, 1995), enquanto que mutantes e linhagens transgênicas que super acumulam ABA a dormência se mostra acentuada

(THOMPSON et al., 2000; QIN e ZEEVAART, 2002; OKAMOTO et al., 2006, 2010, NAMBARA et al., 2010).

Estudos comprovaram que o fitormônio ácido abscísico (ABA) é o principal agente envolvido no estabelecimento da dormência embrionária durante a maturação da semente na planta-mãe. Normalmente, o conteúdo de ABA é baixo no início da embriogênese, atingindo os níveis mais elevados na fase intermediária desse processo e, então, diminui gradualmente reduzindo os níveis até a semente atingir a maturidade. Assim, há um grande pico de acúmulo de ABA na semente, correspondendo ao período entre as fases intermediária e tardia da embriogênese (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O ABA acumula nas sementes durante o seu desenvolvimento e é aumentado durante fase intermediária e final da maturação. Em *Arabidopsis*, ABA é largamente sintetizado nos tecidos zigóticos, incluindo a testa, e é assim transportado da planta-mãe e acumulado durante a fase de maturação (KARSEN et al., 1983; KOORNNEEF et al., 1989). Este ABA maternalmente fornecido contribui para o desenvolvimento do embrião em *Nicotiana plumbaginifolia* (RAZ et al., 2001; FREY et al., 2004) e em *Arabidopsis* é responsável pela indução de dormência primária.

ABA acumulado durante o desenvolvimento está presente em sementes secas e declina após embebição. Em sementes de *Arabidopsis* esta redução ocorre nas sementes dormentes e não-dormentes, e depende, em grande parte, da atividade do gene *CYP707A2* (ALI-RACHEDI et al., 2004; BALI et al., 2004; MILLAR et al., 2006; OKAMOTO et al., 2006; LIU et al., 2009; PRESTON et al., 2009). A aplicação de nitrato nas plantas-mãe reduz o conteúdo de ABA de sementes maduras secas, enquanto a adição de nitrato em um meio de germinação leva a um declínio mais rápido de ABA em sementes embebidas do que apenas embebidas em água (MATAKIADIS et al., 2009). Estas alterações no conteúdo de ABA são causadas, principalmente, pelo gene *CYP707A2* (MATAKIADIS et al., 2009), o qual é induzido por nitrato, durante o desenvolvimento, embebição e durante a germinação das sementes.

As sementes dormentes são caracterizadas por um elevado conteúdo de ABA (ácido abscísico) no estado seco, e principalmente, por uma retomada da síntese de ABA após a embebição. A clonagem do gene *ABA2* (*zeaxanthine epoxidase*) da via de biossíntese de ABA, forneceu um instrumento que permitiu

controlar a síntese deste hormônio nos grãos de cevada e o controle da dormência e da germinação (TAIZ e ZEIGER, 2004).

De acordo com Kucera et al. (2005), o ABA é um hormônio regulador positivo da dormência e negativo da germinação das sementes. Pesquisas voltada ao papel do ABA, durante a germinação de sementes, mostram o efeito inibitório no afrouxamento das paredes celulares do embrião, o acúmulo da proteína β -tubulina, o crescimento e a divisão celular do embrião, a organização transversal dos microtúbulos e a replicação do DNA nuclear durante a embebição (SCHOPFER e PLACHY, 1985; BEWLEY, 1997; CHEN et al., 2001; TAIZ e ZEIGER, 2004; da SILVA et al., 2008). Em sementes de café, o ABA promove a inibição da síntese de DNA e da degradação das paredes celulares, impedindo seu alongamento, resultando em uma elevada rigidez no endosperma da semente (SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2008).

Outra importante função de ABA no desenvolvimento da semente é a aquisição da tolerância à dessecação. Durante períodos entre as fases intermediária e tardia do desenvolvimento da semente, ocorre tanto um acúmulo de RNAs-mensageiros específicos quanto um aumento nos níveis endógenos de ABA (TAIZ e ZEIGER, 2009). Assim, o envolvimento de ABA em vários processos fisiológicos importantes, em várias espécies vegetais, já é estabelecido e caracterizado, proporcionando importantes ferramentas para aplicação na área sementeira e biotecnológica.

Efeitos antagônicos do ABA e GA na germinação das sementes têm sido bem documentados. Entretanto, evidências a respeito se os níveis endógenos de GA são regulados pelo ABA, ou vice-versa, continuam inconclusivos. Seo et al. (2006) sugerem que o ABA suprime os níveis de GA nas sementes tratadas com um pulso de luz vermelho-distante e embebidas no escuro em *Arabidopsis*. No entanto, o ABA desempenha um papel relativamente secundário na regulação dos níveis de GA em comparação com o papel desempenhado pela luz. Durante a germinação de sementes de *Arabidopsis*, os genes *GA20ox*, *GA20ox1*, *GA20ox2*, e *GA20ox3* e genes *GA3ox*, *GA3ox1* e *GA3ox2*, estão envolvidos na síntese de GA (OGAWA et al., 2003). A expressão significativa de genes *GA3ox1*, *GA3ox2*, *GA20ox2* e *GA20ox3* em sementes mutantes ABA-deficiente em alta temperatura, sugere fortemente que esses genes da biossíntese de GA são regulados pelo ABA (TOH et al., 2008).

Embora estas informações já sejam conhecidas, ainda não se sabe como ocorre a expressão de genes envolvidos com a síntese de ácido abscísico (ABA) e giberelina (GA) durante a superação da dormência fisiológica, morfológica de sementes de espécies tropicais. O conhecimento dos genes envolvidos com dormência fisiológica e morfológica são parâmetros adequados para serem investigados objetivando a melhor compreensão da dormência de sementes e a possibilidade de desenvolvimento, no futuro, de métodos para diagnósticos rápido da qualidade de sementes para as condições brasileiras.

Giberelinas são conhecidas como hormônios de promoção do crescimento, sendo envolvidos em vários processos durante o desenvolvimento da planta, como o crescimento da parte aérea, lançamento e desenvolvimento da flor, dormência e germinação das sementes (LINKIES e LEUBNER-METZGER, 2012). A giberelina é um promotor da germinação que, quando em maior concentração que os inibidores, induz a germinação. O tratamento de sementes com GA bioativa, frequentemente pode substituir o tratamento com luz ou com frio necessário para a quebra de dormência (TAIZ e ZEIGER, 2009; 2013).

Durante a germinação, as GAs induzem a síntese de enzimas hidrolíticas, tais como amilases e proteases em cereais. Essas enzimas degradam reservas nutritivas acumuladas, no endosperma ou no embrião, à medida que a semente amadurece. Essa degradação de carboidratos e de proteínas de reserva proporciona alimento e energia para sustentar o crescimento da plântula (BORGHETTI, 2004; TAIZ e ZEIGER, 2013). Este hormônio apresenta receptores nas células das sementes e desencadeia a expressão de genes relacionados com a síntese de hidrolases que irão agir na degradação das reservas do endosperma. A citocinina também auxilia na superação da dormência e induz a germinação juntamente com às giberelinas, através da regulação do ciclo celular, o qual corresponde ao processo central de crescimento e desenvolvimento vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Os principais bioativos de Gas, que incluem GA₁, GA₃, GA₄ e GA₇, apresentando normalmente um grupo hidroxila em C-3 β , um grupo carboxila em C-6, e uma lactona entre C-4 e C-10. O grupo 3 β -hidroxi pode ser substituído por outras funcionalidades na C-2 e C-3 para atuar como formas bioativas, como em GA₅ e GA₆. O GA₁ foi identificado, frequentemente, em uma variedade de espécies de plantas (MACMILLAN, 2002), o que implica que ele age como um bioativo hormonal generalizado. No entanto, também, ocorre GA₄ na maioria das espécies, e é,

provavelmente, o principal bioativo de GA em *Arabidopsis thaliana* e em alguns membros das Cucurbitaceae. Os papéis relativos à GA₁ versus GA₄ (GA₃ versus GA₇), ainda precisam ser esclarecidos por meio da identificação dos genes que codificam GA 13-oxidase (GA13ox) e mutantes sem esta atividade enzimática (YAMAGUCHI, 2008).

Enquanto as partes da via de sinalização de GA, tais como o GID1 (receptor GA solúvel que interage diretamente com proteína DELLA numa maneira GA-dependente) e homólogos DELLA (membros da Família de proteínas GRAS que reprimem respostas GA; degradadas pelo 26S proteasome em interacção com o complexo GID1-GA) repressores, foram já evidenciados em plantas terrestres primitivas, como o musgo *Physcomitrella patens*, a sinalização de GA-dependente completa caminho surgiu mais tarde, durante evolução das plantas da terra (YASUMURA et al., 2007; VANDENBUSSCHE et al., 2007; YAMAGUCHI, 2008; DEPUYDT HARDTKE, 2011). As giberelinas estimulam a degradação de proteínas com domínio DELLA localizadas no núcleo. Uma proteína DELLA de *A. thaliana*, RGA (codifica regulador negativo de resposta a GA) é degradada na presença de GA, provocando uma resposta no crescimento, assim, as proteínas DELLA regulam indiretamente a transcrição através de interação com outras proteínas (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Do ponto de vista da regulação as três enzimas mais conhecidas são da etapa 3 da rota dos GAs são: GA20-oxidase (GA20ox) e GA 3-oxidase (GA3ox) que catalisam as fases anteriores a GA bioativa e a GA 2-oxidase (GA2ox), envolvida na desativação da GA. As três enzimas são classificadas como dioxigenases e utilizam 2-oxoglutarato como um cossustrato e Fe²⁺ co-fator. Por essa razão, elas são referidas como dioxigenases (2ODDs) dependentes de 2-oxoglutarato (TAIZ e ZEIGER, 2013). Em *A. thaliana* não é conhecido fenótipo mutante para a enzima GA “desativante”, GA 2-oxidase. Contudo, em mutante de ervilha o gene SLENDER (SLN) que codifica uma GA 2-oxidase durante a maturação da semente, não são desativadas na mesma extensão que as sementes tipo selvagem, e algumas GAs, potencialmente ativas, permanecem na semente madura. Durante a germinação elas são convertidas em GA₁ bioativa, que acentua o alongamento do nó e entrenó na plântula jovem e produz um fenótipo “slender” mais alto que a selvagem (REID et al., 1992).

Estudos com gene-repórter tem mostrado que GA1, que codifica CPS, a primeira enzima relacionada à biossíntese de GA, é expressa em sementes imaturas, ápices de caule e raízes e anteras em plantas selvagens de *A. thaliana*

(SILVESTONE et al., 1997). Conforme esperado exibe dormência de sementes, hábito de nanismo extremo e esterilidade dos estames, indicando a correlação e que a biossíntese do GA e a atividade da CPS e fenótipo podem ocorrer nos mesmos órgãos.

As condições ambientais, também, podem influenciar na biossíntese do GA, pois as giberelinas exercem um papel importante na mediação dos efeitos dos estímulos ambientais no desenvolvimento do vegetal, principalmente a luz e a temperatura. Em muitos ambientes, esses fatores podem alterar o metabolismo de outros hormônios ou a resposta a eles, adicionalmente as GAs. A razão da GA bioativa com ABA é, especialmente importante, bem como a sensibilidade relativa de tecidos diferentes a esses dois hormônios (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Múltiplos hormônios estão frequentemente envolvidos com a regulação de um determinado processo biológico. Como os hormônios diferentes, cooperativamente regulam um processo comum de desenvolvimento tem sido uma questão importante. Em ervilha (*Pisum sativum*), auxina-regulação da biossíntese de GA, também, é evidente durante o desenvolvimento do fruto (OGAWA et al., 2003). Crescimento do fruto de ervilhas jovens (pericarpo) é dependente com a presença de sementes em desenvolvimento. A regulação da auxina, na biossíntese de GA, desempenha um papel na coordenação do controle de crescimento entre diferentes órgãos/tecidos. Nestes casos, auxina funciona como um sinal celular que modula a síntese de outros hormônios de crescimento, GAs (YAMAGUCHI, 2008).

Estudos usando várias auxina-resposta mutantes revelou que o Aux/IAA (auxina/ácido indol-3-acético) e IRA-dependente de vias de sinalização que estão envolvidos nestas alterações transcricionais, ao passo que eles são independentes da regulação por regulamentação mediada por proteínas DELLA. Redução parcial de vários fenótipos e o ganho de função de genes mutantes Aux/IAA por aplicação GA sugere que mudanças no metabolismo do GA (deficiente GA) mediam parte da ação de auxina durante desenvolvimento de plântulas de *Arabidopsis* (FRIGERIO et al., 2006). O papel do brassinosteróides (BR) como um regulador do metabolismo GA é menos clara. Jager et al., (2005) concluiu que o crescimento em ervilha resposta BR não é mediada por mudanças nos bioativos com conteúdo de GA.

As sementes possuem níveis altos de BRs, que também promovem germinação de sementes, de forma independente ou pela interação com outros hormônios os BRs promovem a germinação das sementes (MUSSING, 2005). Contudo, as bases moleculares dessas interações não são bem esclarecidas. Leubner-

Metzger (2001) observou que os BRs podem aumentar a germinação de semente de tabaco, independente da sinalização do GA. Mutantes BR são mais sensíveis a inibição pelo ABA que o tipo selvagem (STEBER e McCOURT, 2001). Assim, os BRs podem estimular a germinação e são necessários para superar o efeito de inibição do ABA. De acordo com Taiz e Zeiger, (2013) os BRs são conhecidos por estimular a expansão e divisão celular e acredita-se que facilitam a germinação por estimulação do crescimento do embrião.

Além dos hormônios já citados, os efeitos do etileno são conhecidos no atraso do florescimento de *Arabidopsis*, reduzindo níveis bioativos GA (ACHARD et al., 2006). O etileno apresenta a capacidade de quebrar dormência e iniciar a germinação em algumas espécies de cereais, além de aumentar a germinação de sementes em várias espécies. No amendoim (*Arachis hypogaea*) existe uma estreita correlação entre a produção de etileno e a germinação (TAIZ e ZEIGER, 2013).

2.5- Estudo da expressão de genes em sementes

Nos últimos anos o desenvolvimento da biologia molecular tem possibilitado o uso e a aplicação de técnicas moleculares avançadas que podem levar ao entendimento do estado em que a semente se encontra. Por exemplo, se uma semente não germina, ela pode estar morta, todavia ela pode também, estar quiescente ou dormente. Testando vários parâmetros moleculares é possível dizer qual destas opções esta presente. Além disso, é possível inferir se a ausência de germinação encontra-se no embrião ou no endosperma e, possivelmente, qual o tipo de dormência. Vários genes têm sido descritos como envolvidos com germinação, dormência e outros parâmetros da qualidade de sementes. Quando compreendida a expressão destes genes, mRNAs poderão ser utilizados como marcadores da qualidade de sementes para um grande número de espécies.

Marcadores da qualidade de sementes podem ser divididos em duas classes. A primeira classe de marcadores seriam genes envolvidos com o metabolismo, os quais têm a expressão aumentada durante a embebição da semente. A expressão destes genes pode indicar a viabilidade das sementes. Por exemplo, Gallardo et al. (2001a) e Gallardo et al. (2001b), usando a técnica de proteoma, observaram que giberelina induz α -2,4-tubulina e aparentemente, este gene esta fortemente associado com a germinação. Além destes genes, Potokina et al. (2002) identificou mais de 1440

genes associados com germinação em sementes de *Hordeum vulgare* L (aveia). Entre estes genes, os autores encontram genes que estão envolvidos com degradação de reservas, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de lipídeos, metabolismo de nitrogênio e etc. Assim, genes e produtos gênicos relacionados com os eventos mencionados acima podem ser excelentes marcadores da germinação de sementes.

Além dos marcadores que podem estar envolvidos com germinação, existe uma segunda classe de marcadores que podem estar envolvidos com dormência. Quando a semente esta dormente, tais genes podem ter a expressão aumentada (up-regulated) ou ter a expressão diminuída, quando a semente não está dormente (down-regulated). Finch-Savage et al. (2007), apresentaram resultados que mostram uma clara evidencia que o balanço entre os hormônios ABA e GAs, e que possuem mecanismos complementares, onde genes envolvidos com a produção de ABA tem a expressão diminuída, enquanto que genes envolvidos com a síntese de GAs tem a expressão aumentada durante a superação da dormência e germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana*. Embora estas informações já sejam conhecidas, ainda não se sabe os mecanismos moleculares envolvidos na superação da dormência fisiológica, morfológica das sementes de *Annona crassiflora*.

A pesquisa na área da biologia molecular associada ao controle de qualidade de sementes tem evoluído rapidamente e novas técnicas têm-se mostrado úteis na obtenção de classes distintas de marcadores moleculares (VASCONCELOS et al., 2010). Estes auxiliam na elucidação dos fatores que afetam a qualidade, a identificação e preservação do material genético, permitindo o monitoramento de todo processo produtivo. Contudo, ainda são escassos os trabalhos voltados a expressões de genes durante o processo germinativo e dormência nas espécies vegetais do bioma cerrado. Neste contexto, tecnologias para facilitar as investigações da complexidade funcional, o estudo pelo transcriptoma aliada ao sequenciamento pelo RNAseq pode gerar grande quantidade de informação e fornecer pistas iniciais para a compreensão da função dos genes com base em seu tempo, lugar e nível de expressão na semente.

O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos de uma célula, e as suas respectivas quantidades, para um fim específico, estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica. Compreender o transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma, revelando os componentes moleculares de células e tecidos, e também, para a compreensão do desenvolvimento de alguma doença. Os principais objetivos de transcriptomas são: catalogar todas as espécies de

transcrição, incluindo mRNAs, RNAs não-codificantes e pequenos RNAs, para determinar a estrutura de transcrição de genes, em termos de seus locais de início, 5' e 3', os padrões de *splicing* e de outras modificações pós-transcricionais, e para quantificar as alterações nos níveis de expressão de cada transcrição durante o desenvolvimento e sob diferentes condições (WANG et al., 2009).

O desenvolvimento de novas metodologias de alto rendimento de sequenciação de RNA/DNA proporcionou um novo método, tanto para mapeamento, quanto para quantificação transcriptomas. Este método, designado por RNASeq (*RNA sequencing*), tem vantagens claras sobre as abordagens existentes e espera-se revolucionar a maneira pela qual transcriptomas eucarióticos são analisados, sendo aplicado inicialmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, rato e humano. Atualmente, estudos têm utilizado esta abordagem, em diversas espécies como arroz, amendoim, soja, tomate, beterraba e outras plantas cultivadas (WANG et al., 2009; XU et al., 2012; ZHANG et al., 2012; JONES e VOCKIN, 2013; BELEKER et al., 2011; MUTASA-GOTTGENS et al., 2012).

RNA-Seq usa tecnologias desenvolvidas recentemente em que, uma população de RNA (totais ou fracionadas, tais como poli (A)+) é convertido para uma biblioteca de fragmentos de cDNA com adaptadores ligado a uma ou ambas as extremidades. Cada molécula, com ou sem amplificação, é então sequenciada de uma forma de alto rendimento para se obter a partir de pequenas sequências, um fim (sequenciamento *single-end*) ou ambas as extremidades (sequenciamento *par-end*). As leituras são tipicamente 30-400 pb, dependendo da tecnologia de sequenciação de DNA utilizado. Em princípio, qualquer tecnologia de sequenciação de alto rendimento pode ser utilizada para o RNA-Seq, os sistemas Illumina IG18-21,23 Applied Biosystems SOLiD e Roche 454 Vida Science, tem sido aplicados para este fim (BORBARZUK et al., 2007; EMIRICH et al., 2007; HOLT e JONES, 2008; MORIN et al., 2008; CLOONAN et al., 2008). Após o sequenciamento, o resultado obtido é alinhado a um genoma de referência ou feito um genoma de referência, ou montados, *de novo* para espécie sem um genoma ou sequência para produzir um mapa de transcrição (WANG et al., 2009).

Xu et al. (2012) avaliou o desenvolvimento de embrião de arroz (*Oryza sativa*), utilizando a técnica de RNA-Seq nos períodos de 3-5 dias após a polinização (DAP), 7 DAP e 14 DAP cultivados em casa de vegetação, observaram um

grande número de genes relacionados com o metabolismo, regulação da transcrição, replicação de ácido nucléico/processamento, e transdução de sinal, expressos predominantemente, nas fases iniciais e meio (7 DAP) de embriogênese. Genes biosíntese proteína acumulada predominantemente em embriões na fase de meio. Genes de amido/sacarose metabolismo e modificação da proteína foram altamente expressos nos estágios intermediários e finais da embriogênese. Além disso, verificou-se que muitas famílias de fatores de transcrição podem desempenhar papéis importantes em diferentes fases de desenvolvimento, não apenas no início do embrião, mas, também em outros processos de desenvolvimento. Estes resultados demonstram o complexo molecular e eventos celulares na embriogênese de arroz e fornecem uma base para futuros estudos sobre o desenvolvimento do embrião em arroz e outras culturas de cereais.

Jones e Vodkin (2013) realizaram um estudo detalhado do desenvolvimento de sementes de soja (*Glycine max* cv. Williams, grupo de maturação III) de alguns dias pós- fertilização até a a maturação da semente, usando a técnica do sequenciamento do transcriptoma (RNA-Seq), demonstrando que uma centena de genes modelos foram identificados com elevada expressão, exclusivamente, nas fases jovens de semente, começando apenas quatro dias após a fertilização. Estes genes estão relacionados a vários componentes e processos básicos, tais como histonas e proteínas ricas em prolina.

Os mesmo autores referidos acima observaram, também, genes que codificam proteínas de armazenamento, tais como glicinina e beta-conglicinina. Estas apresentaram alto nível de expressão nas fases de maior peso fresco, confirmando o conhecimento prévio que estes produtos de armazenamento são rapidamente acumulados antes que a semente comece o processo de dessecação. Outros genes apresentaram elevada expressão nas sementes maduras secas, possivelmente, indicando a preparação das vias que são importantes mais tarde, para os estágios iniciais de embebição. Muitos dos genes modelos altamente expressos na fase de semente seca são, anotados como proteínas hidrófilas associados à baixas condições de água, tais como abundantes proteínas e dehydrina do final da embriogênese (LEA), que ajudam a preservar estruturas celulares durante a dessecação.

Trabalhos relacionados com a expressão de genes em sementes dormentes, ainda, são pouco relatados na literatura. Cadman et al. (2006) observaram expressão gênica em sementes de *Arabidopsis* cvi durante ciclos de dormência (primária

embebidas por 24h, 48h e 30 dias no escuro e em sementes com dormência secundária), em sementes germinadas na luz ou escuro, com e sem exposição anterior a luz vermelha depois de 20h de embebição, e sementes tratadas com 100 μ l GA_{4/7} e 38 μ l Fluridone utilizando a análise de microarray e validação por PCR quantitativo (QRT-PCR). Os autores demonstraram que as sementes recém embebidas diferem das sementes dormentes em comparação com as sementes mantidas em estado de dormência primária e secundária. Sementes dormentes e após a maturação parecem ser igualmente ativas apesar da expressão de genes distintos. Sementes dormentes com expressão de genes reduzida associada com síntese de proteína, respondem potencialmente pelo controle da conclusão da germinação. Elementos responsivos ao ácido abscísico (ABA) foram representados no conjunto de genes cuja expressão foi aumentada. A regulação da dormência ainda foi apoiada pelos padrões de expressão de genes-chave na síntese e do catabolismo de ABA e superação da dormência na presença do Fluridone.

Estes dados confirmam a teoria do balanço hormonal entre o ABA e o ácido giberélico (GA), hormônios que dependem de rotas sintéticas e catabólicas. Ogawa et al. (2003) e Yamauchi et al. (2004) relatam sobre este equilíbrio entre hormônios que está ligado a germinação e perda de dormência primária durante tratamentos com baixa temperatura. Cadman et al. (2006), também, demonstraram no nível de transcrito, que muitos genes altamente expressos em estado latente eram relacionados, as respostas ao estresse de ABA e a dormência, mesmo na ausência de estresse abiótico.

Assim, diante da falta de trabalhos relacionando a expressão de genes utilizando a técnica do RNAseq em sementes (embriões) em espécies do bioma Cerrado para determinação e quantificação dos genes relacionados a dormência e germinação, faz se necessário o desenvolvimento de pesquisas para a compreensão dos eventos relacionados na superação naturalmente da dormência morfológica em sementes de *Annona crassiflora*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Coleta e extração das sementes de *Annona crassiflora*

Os frutos de *Annona crassiflora* foram coletados no período de dispersão (fevereiro/março) do ano de 2012, em populações de várias plantas naturais do bioma Cerrado, no município de Divinópolis, no Estado de Minas Gerais. Posteriormente, e foram despulpados utilizando uma betoneira, onde os frutos foram colocados juntamente com água e misturados durante 1 hora até que os frutos se desfizessem e formassem uma mistura homogênea. Em seguida as sementes foram separadas manualmente e secadas em temperatura entre 20/25°C, em condições de laboratório até atingirem umidade de 10% (base úmida) e, foram armazenadas em embalagens impermeáveis, mantidas em câmara fria a 10°C, para posterior uso nos experimentos (Figura 1 A, B, C, D, E e F).



Figura 1- Sequência de atividades realizadas desde o transporte até a extração das sementes de *Annona crassiflora*. **A-**Frutos de *Annona crassiflora* coletados e transportados para o viveiro. **B-**Início do procedimento de extração das sementes. **C-**Betoneira usada para separar a polpa do fruto das sementes. **D-** Separação das sementes dos restos dos frutos. **E-**Sementes com alguns resíduos do frutos. **F-**Sementes limpas usadas nos experimentos de tecnologia, fisiologia e biologia molecular.

3.2-Dados climáticos e de solo

Dados climáticos de precipitação pluvial total (mm) e temperaturas mínima, média e máxima ($^{\circ}$ C) a 6cm de profundidade do solo foram obtidos da estação meteorológica de Manduri (SP), cedidos pelo IAC-Instituto

Agrônomo nos anos de 2012/13, localizada a uma latitude 23°00'12" sul e a uma longitude 49°19'19" oeste, estando a uma altitude de 710 metros (CEPAGRI, 2014).

O clima de Botucatu é classificado como subtropical, com médias de temperatura do ar em torno de 20° C e, pluviosidade média anual entre 1244 a 1324 mm (CLIMATE-DATA.org, 2014) e solo classificado como latossolo. Segundo PIROLI et al. (2002), em levantamento pedológico no município de Botucatu, constatou cinco ordens de solos: Argissolos, Latossolos, Neossolos e Gleissolos, Nitossolos, sendo a maior ocorrência de Latossolo Vermelho distrófico, textura média no qual foram enterradas as sementes de *Annona crassiflora* para avaliação da germinação ao longo dos meses de 2012/13.

3.3- Determinação do teor de água das sementes

O teor de água das sementes de *Annona crassiflora* durante a germinação em condições de campo foi determinado mensalmente. Foram utilizadas três repetições de quatro a cinco sementes cada, colocadas em estufa com circulação de ar a temperatura de $\pm 103^{\circ}\text{C}$ durante 17h (BRASIL, 2009). Foram anotados os pesos úmidos e as amostras foram levadas à estufa. Após 17 horas, as amostras foram retiradas da estufa, esfriadas em dessecador contendo sílica-gel e pesadas em balança de precisão digital. A umidade foi obtida pela média das três repetições e calculada pela diferença de peso, em base úmida. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.4- Curva de embebição em água

As sementes de *Annona crassiflora* foram lavadas para retirar vestígios de polpa, tratadas com hipoclorito de sódio a 1% por dez minutos, lavadas novamente em água corrente e dispostas entre folhas de papel toalha (Germitest) umedecidas 2,5 vezes o valor do peso seco do papel com água destilada. Em seguida, as sementes foram colocadas para embeber em BOD a temperatura de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob luz constante. Foram utilizadas cinquenta sementes e a massa da matéria fresca das sementes foi avaliada em balança com precisão de 0,000g a cada hora, nas primeiras doze horas de embebição e diariamente, até atingir massa constante.

3.5- Germinação em condições de campo

A germinação das sementes foi realizada em condições de campo, conforme Silva et al. (2007). Para isso, as sementes foram separadas em 8 repetições de 800 sementes cada e colocadas dentro de sacos de poliéster com orifícios de 0,5 cm de diâmetro e, enterradas a 5cm em área de sementeira reservada para avaliações mensais (Figura 2 A, B e C). As avaliações mensais foram realizadas ao longo do período da dispersão (março) até a completa germinação no mês de março do ano seguinte. As sementes foram desenterradas e computadas aquelas que apresentavam protrusão da raiz (2 mm de comprimento) e retiradas do canteiro. As sementes não germinadas foram enterradas novamente para avaliações posteriores da germinação.

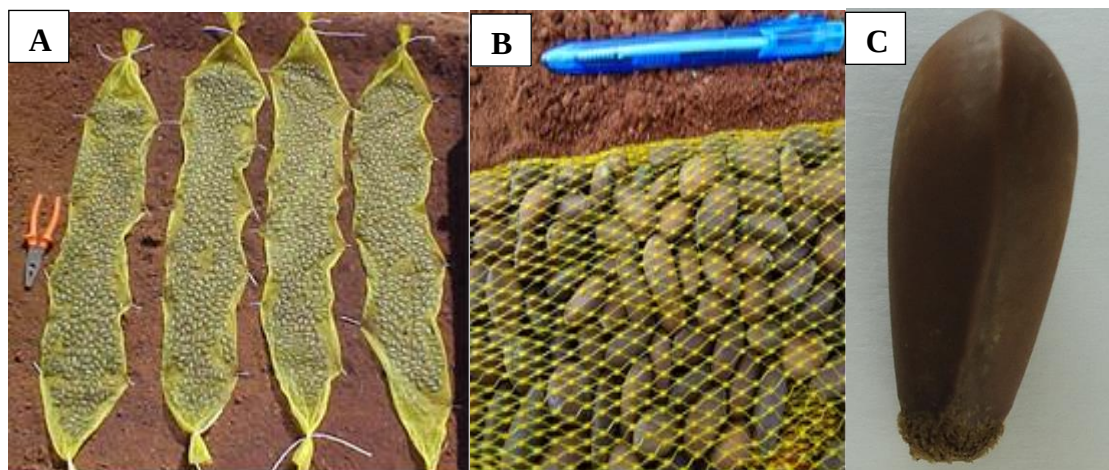


Figura 2- A-Disposição das sementes de *Annona crassiflora*, durante a germinação em condições de campo, colocadas em sacos de polietileno e enterradas no mês de abril, logo após a dispersão; B- Detalhe do saco de polietileno com malha de 5 mm de diâmetro; C- Semente intacta logo após o período de dispersão utilizada para os experimentos.

3.6-Tratamento com giberelina

Em paralelo, ao experimento de germinação em campo, três repetições de 80 sementes recém coletadas, foram embebidas diretamente em solução de Giberelina (GA₄) (Sigma Aldrich®) na concentração de 100 µM a temperatura de 25°C±2°C por oito dias. A solução de giberelina foi obtida diluindo em KOH 1N e ajustada a pH 7,0 com HCl 1N (SILVA et al., 2007). Em seguida, as sementes foram semeadas na profundidade de 5cm em areia autoclavada com umidade de 60%, temperatura de 30±2°C em BOD por 28 dias, sob luz constante.

3.7-Determinação do comprimento do embrião.

O comprimento do embrião foi determinado em trinta sementes colocadas para germinar em condições de campo, de abril 2012 a dezembro de 2013. As sementes foram desenterradas mensalmente, seccionadas longitudinalmente e tiveram o embrião isolado para mensuração do comprimento. O mesmo foi feito com as sementes tratadas com giberelina (GA₄) na concentração de 100 µM, no 28º dia. O comprimento do embrião (mm) foi obtido com o auxílio de um paquímetro digital.

3.8- Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de 100 embriões oriundos de sementes com dormência fisiológica e morfológica superada naturalmente (sementes rachadas e com raiz até 2mm de comprimento) enterradas nos sacos de polietileno no campo. Para extração de RNA, utilizou-se o Kit NucleoSpin RNA Plant[®] da Macherey-Nagel. Conforme descrito no protocolo, foram transferidos aproximadamente 100mg de embriões macerados em nitrogênio líquido para um microtubo de 1,5mL. Em capela, foram adicionados 350µL de tampão de extração e 3,5 µL de β-mercaptoetanol (β-ME) a amostra e homogeneizada com um agitador Vortex. Para redução da viscosidade, as amostras foram filtradas no NucleoSpin Filter[®] e coletadas em tubos coletores de 2mL em centrífuga por um minuto a 11.000 rpm. Os filtrados de cada amostra, foram transferidos para microtubos de 1,5mL e adicionados 350 µL de Etanol 70%.

Logo após as amostras foram transferidas para colunas de NucleoSpin RNA Plant[®] e coletadas em tubos coletores de 2mL em centrifuga por 30 segundos, a 11.000 rpm. O filtrado foi descartado e a coluna de filtração foi acondicionada em outros tubos coletores. Em cada amostra, foram adicionadas 350 µL de Membrane Desalting Buffer[®] na coluna de filtração e centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm, até a membrana da coluna de filtração ficar seca. Adicionou-se no centro da membrana de sílica da coluna de filtração 95 µL de DNase reaction mix[®] e deixado em repouso a temperatura ambiente, por 15 minutos. Todas as colunas de NucleoSpin RNA Plant[®] foram submetidas a lavagem com 200µL de tampão e centrifugadas por 30 segundos a 11.000 rpm.

Após acondicionamento em novos tubos coletores, as colunas de filtração foram submetidas a uma segunda lavagem adicionando 600 µL de tampão

RA3 e centrifugadas por 30 segundos, a 11.000 rpm. Após o descarte da solução do tubo coletor, adicionou-se 250 µL de tampão em colunas de NucleoSpin RNA Plant[®] e centrifugado por dois minutos a 11.000 rpm até secar a membrana por completo. Transferidas as colunas de NucleoSpin RNA Plant[®] para novos microtubos de 1,5 mL, foram adicionados 20µL de água livre de RNase-free nas colunas de NucleoSpin RNA Plant[®] e centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm. Os RNAs extraídos foram quantificados em espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) e seus resultados expressos em ng/µL.

3.9-Sequenciamento de RNA (RNAseq).

As amostras contendo RNA extraído dos embriões das sementes de *A. crassiflora* foram sequenciadas, no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP de Jaboticabal, usando a plataforma Illumina (HiScan), seguindo a metodologia proposta pela empresa. A avaliação da qualidade do RNA foi realizada pelo equipamento Bioanalyser (Agilent 2100). O Bioanalyser determina o parâmetro RIN que permite avaliar a integridade das amostras de RNA total extraídas. O valor varia entre 0 e 10, sendo tanto melhor a integridade das amostras quanto mais próximo de 10 estiver o valor.

Os RNAs foram sequenciados usando os kits comercialmente disponíveis para o sequenciamento e o equipamento de sequenciamento da plataforma HiScan (Illumina). Inicialmente, os RNAs totais foram preparados para sequenciamento (obtenção apenas dos mRNAs), seguido da construção de uma biblioteca de cDNA, ligação de adaptador, validação da biblioteca de cDNA, clusterização e sequenciamento. Todas estas etapas foram realizadas seguindo rigorosamente as orientações do fabricante do equipamento de sequenciamento, dos kits e os utilizados na clusterização, no sequenciamento e nas análises dos dados.

3.10-Análise de bioinformática e anotação

Como não foi utilizado um genoma de referência, em função de não haver genoma para *Annona crassiflora* disponível em banco de dados públicos, a estratégia utilizada na identificação de novos transcritos associados com dormência

morfológica, foi montagem *de novo*. A reconstrução independente do genoma foi feita com a montagem de transcritos consenso diretamente a partir dos *reads* obtidos. Os dados gerados foram analisados pela plataforma CLC Genomics Workbench versão 6.0.2 (CLC bio, Denmark), para a montagem do transcriptoma de referência e quantificação da expressão por valores de RPKM (*Reads per Kilobase per Million of Mapped Reads*). A identificação dos *contigs* de transcritos foi realizada por meio da plataforma BLAST2Go, ferramenta adequada para pesquisa genômica funcional em espécies não-modelo. A plataforma BLAST2Go encontra-se disponível para acesso no endereço: <http://www.blast2go.com/b2ghome>. Em seguida, 50 transcritos mais expressos e os 20 transcritos menos expressos foram submetidos ao programa BLAST disponível para acesso no endereço: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, individualmente para possível classificação manual em categorias funcionais de acordo com a descrição da sequência baseada na maior similaridade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Dados climáticos e interação teor de água e germinação das sementes

De acordo com os dados climáticos no ano de 2012, apresentou maior precipitação pluvial total, máxima temperatura e menor temperatura em comparação com o ano de 2013, isto influenciou diretamente na variação da umidade de solo e, conseqüentemente no teor de água das sementes ao longo dos meses do ano (Figura 3 e 4). Entretanto, em ambos os anos a maior diferença foi na precipitação mensal total do mês de setembro, no qual o ano de 2012 foi quando iniciou a germinação das sementes (Figura 6).

Praticamente não ocorreu chuva (0,30mm), assim, as condições de campo antes de setembro pode ter sido determinante para a quebra do (fisiológica) dormência também observado por Melo (2005) e Silva et al., (2007) em condições edafoclimáticas de Lavras no estado de Minas Gerais, classificando esta espécie como pertencente ao grupo de espécies de síndrome seca intermediária, a ocorrência de dormência evita a germinação durante curtos períodos úmidos durante a estação seca.

Contudo, no mês de outubro com o pico de germinação no início do período chuvoso. A temperatura foi o que diferenciou sendo que no ano de 2012 a média de temperatura do solo, a 6cm de profundidade foi de 22,5°C. No ano de 2013 a

temperatura apresentou-se mais amena de 20,9°C além da ocorrência de maior precipitação acumulada, este fato pode ter influenciado na maior porcentagem de germinação no ano de 2013 do que no ano de 2012, indicando que a espécie tenha desenvolvido uma estratégia para maximizar a taxa de sobrevivência de suas plântulas com início das chuvas (Figura 3 e 6).

Silva et al. (2007) relata a possível relação da quebra de dormência esta relacionada com a amplitude de temperaturas máximas e mínimas (temperatura diurna versus noturna), principalmente como resultado da diminuição das temperaturas mínimas. Em Minas Gerais, observaram temperaturas menores que 15°C, e nesse trabalho a menor temperatura foi de 16,6°C.

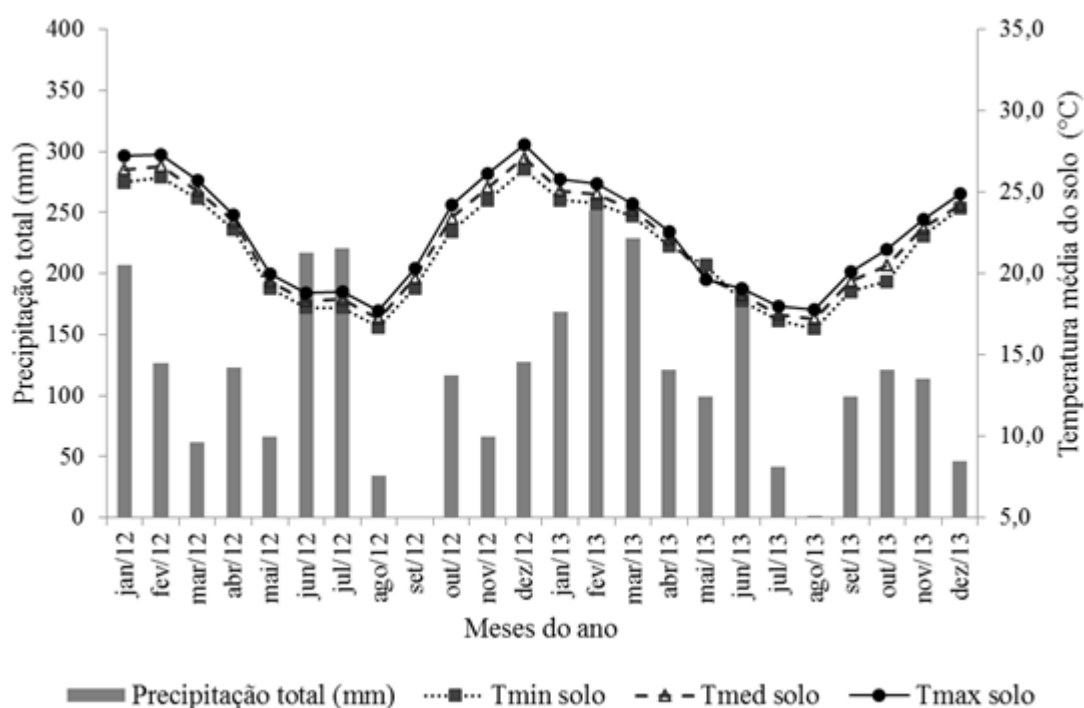


Figura 3- Dados Climáticos de precipitação pluvial total (mm) e temperaturas mínima, média e máxima (°C) a 6 cm de profundidade do solo, da estação meteorológica de Manduri (SP).

Fonte: IAC-Instituto Agronômico de Campinas (2012/13).

4.1-Determinação do teor de água das sementes

O teor de água das sementes de *Annona crassiflora* variou ao longo do período de germinação, em condições de campo (Figura 4). A pluviosidade

no período de germinação foi irregular, com maior quantidade de chuvas nos meses anteriores a germinação principalmente nos meses de junho e julho (Figura 3). Aparentemente, a mudança no teor de água acompanhou a variação da precipitação pluvial, ao longo dos anos de 2012 e 2013. No mês de outubro, com pico da germinação, a pluviosidade foi de 116,6 e 121,4 mm respectivamente, nos anos de 2012 e 2013. A temperatura do solo (6 cm) ficou entre 23,4 e 20,5°C, com máximas de 24,2 e 21,5°C e mínimas de 22,6 e 19,5°C.

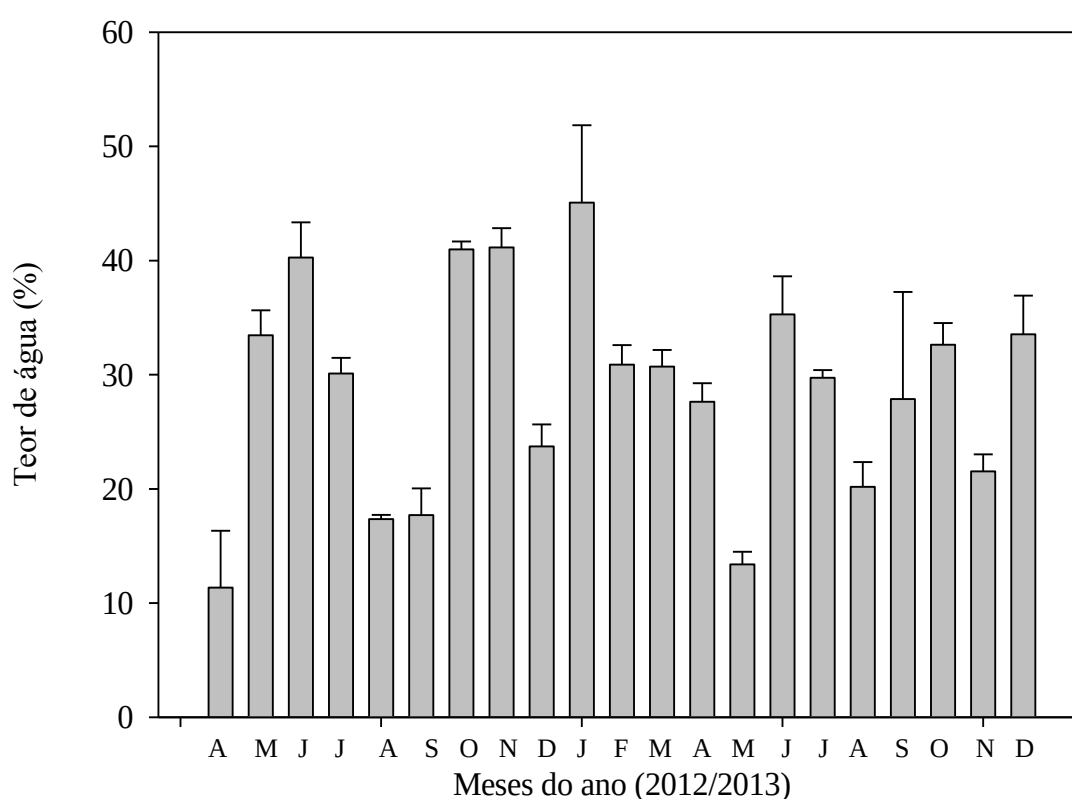


Figura 4- Teor de água de sementes de *Annona crassiflora* no período de abril de 2012 a dezembro de 2013 enterradas no solo para germinação.

4.3- Curva de embebição em água

As sementes de *Annona crassiflora*, quando submetidas à embebição em água, apresentaram aumento na massa de matéria fresca logo nas primeiras horas (Fase I), e com 8 dias estavam totalmente embebidas, indicando

ausência de impermeabilidade do tegumento. Muito provavelmente, a embebição ocorreu devido a um processo físico, em decorrência a diferença de potencial hídrico entre a semente e o meio. Todavia, não atingiu o padrão trifásico comum na maioria das sementes, ocorrendo apenas um prolongamento da fase II, que foi atingido no sexto dia de embebição (Figura 5). Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Melo (2005) que após o sétimo dia de embebição, o peso das sementes de *A. crassiflora* se estabilizou e as mesmas entraram na fase II da embebição.

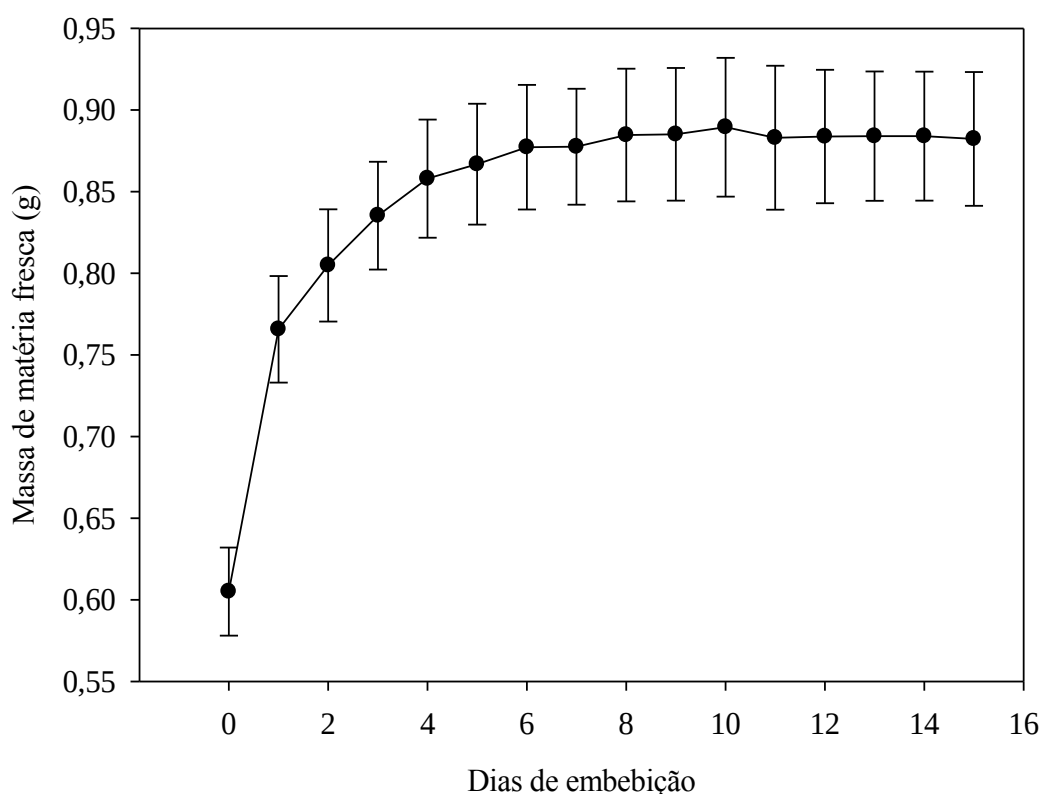


Figura 5- Curva de embebição de sementes de *Annona crassiflora* na presença de água na temperatura de 30° C.

4.4- Germinação condições de campo

A germinação de sementes de *Annona crassiflora* ocorreu após 140 dias do início do experimento em condições de campo. A germinação das sementes iniciou em agosto de 2012, com germinação em torno de 0,048% (Figura 6). A partir do mês de setembro houve coincidência entre o início das alterações morfológicas no embrião e bioquímicas no endosperma com o início da germinação das

sementes (Silva et al. 2007). Estas modificações coincidiram com o início do aumento na temperatura e precipitação, ou seja, ao final da estação de inverno (agosto) e início da primavera (setembro), conforme pode ser observado na Figura 3.

No mês de outubro foi observada a maior porcentagem de germinação em ambos os anos 2012/13 (Figura 6). Resultado este semelhante aos encontrados por Melo (2005) e Silva et al. (2007), segundo os quais, o pico de germinação, no mês de outubro, pode indicar que a espécie apresenta a estratégia de permitir que as sementes germinadas em outubro tenham condições de se estabelecer como plantas no solo, valendo-se os meses seguintes da estação chuvosa e das altas temperaturas que ocorrem no bioma cerrado.

Do início da germinação, no mês de agosto de 2012, até a última avaliação, no mês de dezembro de 2013, a porcentagem total acumulada de germinação foi de 67,96% (Figura 6). Parte da população de sementes, permanece, aparentemente, dormente, sem apresentar alteração morfológica, durante o período de janeiro até a ocorrência da próxima germinação, no mês de setembro de 2013. Este comportamento indica que a espécie contribui para a formação de banco permanente de sementes no solo.

Estes resultados, corroboram com as observações anteriores realizadas por Rizzini, (1973), Melo (2005) e Silva et al. (2007) que as sementes de *A. crassiflora* apresentam germinação lenta, necessitando de 240 a 260 dias em condições de campo para que no mínimo 50% da população de sementes germine. Também foi observado conforme descrito por Melo (2005) o rompimento natural do tegumento da semente antes da germinação, considerando este fato como um marcador morfológico do processo da germinação das sementes dessa espécie. No período entre o rompimento do tegumento e a germinação da semente, ocorreu a formação de uma protuberância no endosperma micropilar, indicando o início do crescimento do embrião.

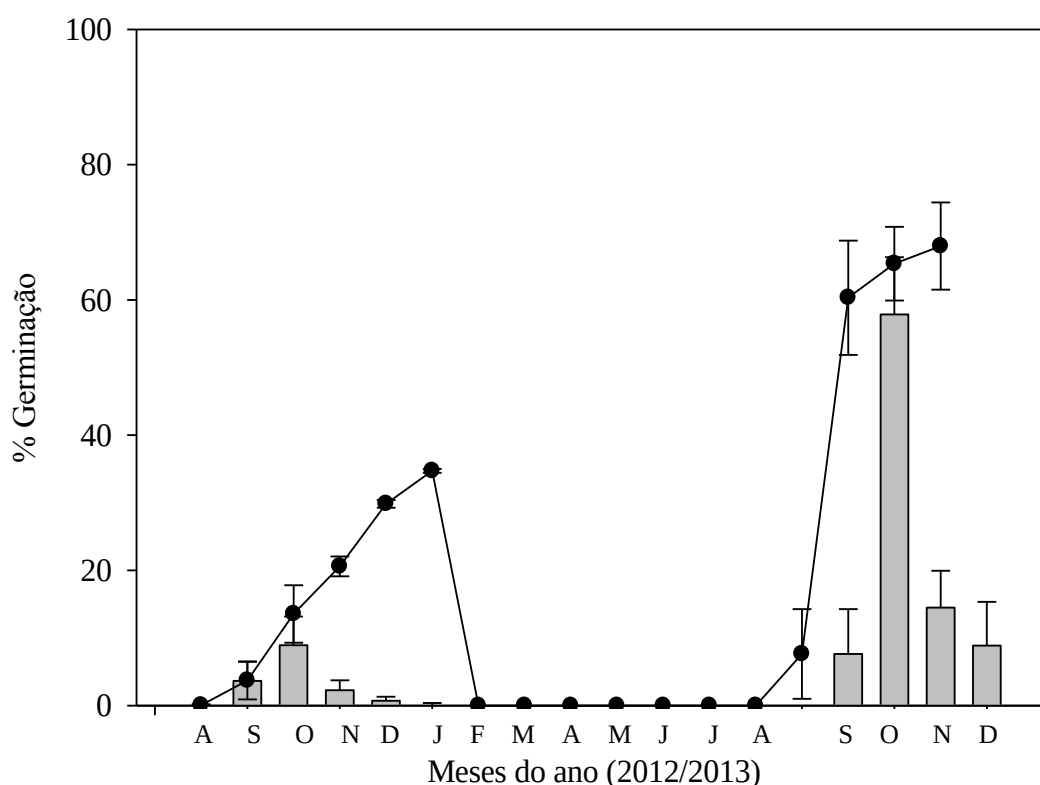


Figura 6- Porcentagem de germinação (barra: germinação mensal e linha: germinação acumulada) das sementes de *Annona crassiflora* que foram mensalmente desenterradas e tiveram a germinação avaliada (protrusão radicular) de agosto de 2012 a dezembro de 2013.

4.4-Comprimento do embrião

Na dispersão do fruto, no mês de abril, o embrião das sementes de *Annona crassiflora* tinha em média de 1,80mm. Nos meses seguintes, observou-se crescimento do embrião entre 3,04-3,26mm antes da germinação (protrusão radicular), caracterizando crescimento de 3,5 vezes em relação ao comprimento do embrião no momento da dispersão das sementes (Figura 7).

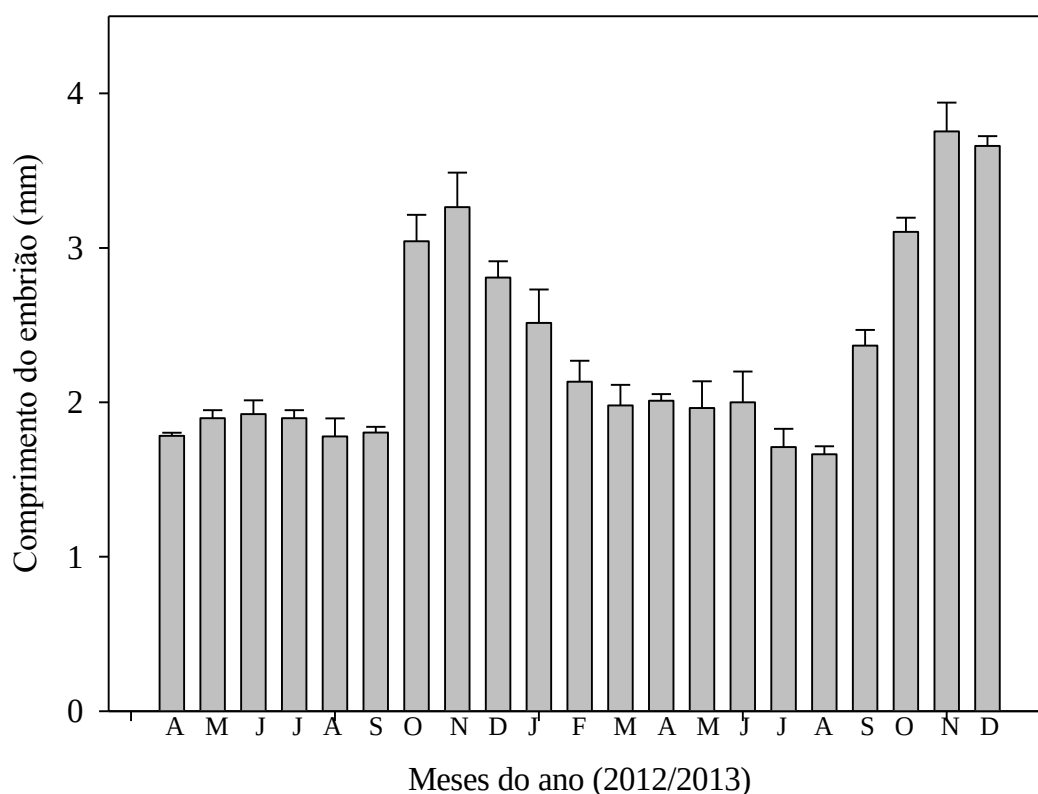


Figura 7- Comprimento do embrião de sementes de *Annona crassiflora* ao longo da superação da dormência morfofisiológica e germinação em condições de campo (abril 2012 até dezembro de 2013).

Melo (2005), também observou que o embrião das sementes de *A. crassiflora* apresentou crescimento significativo, após um período de repouso, na qual ocorreu primeiro a superação da dormência fisiológica e posterior a morfológica, caracterizada pelo crescimento do embrião internamente na semente e em seguida a ruptura do tegumento, o que coincide com o início da germinação. Os fatores que determinam essas alterações fisiológicas e morfológicas, ainda, não estão claras.

Entretanto, Melo (2005) e Silva et al. (2007) relataram o início da atividade da endo β mananase no endosperma micropilar em setembro, o que coincide com o início do crescimento e ganho de massa da matéria fresca do embrião. Já a atividade no endosperma lateral é superior a atividade do endosperma micropilar, somente após a protrusão radicular em novembro. Aparentemente, a atividade de endo β mananase, observada, inicialmente no endosperma micropilar, tem a função de dar suporte ao crescimento do embrião, por meio da degradação do endosperma. Contudo, não há trabalhos, informando sobre a interação hormonal internamente na semente,

sabe-se que com a embebição em solução de giberelinas (GA_3 , GA_{4+7}), as respostas são positivas, com a superação da dormência fisiológica que acelera o processo de germinação (LIMA-BRITO et al., 2006; BERNARDES et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009; da Silva et al., 2007).

Quando as sementes foram submetidas a embebição em solução de GA_4 , na concentração de $100\mu M$, observou-se crescimento do embrião para até 2,39 mm, quando comparado a embebição em água (1,80mm), o que representa um aumento de 1,4 vezes no período de 28 dias em que as sementes permaneceram em contato com GA_4 (Figura 8). Após esse período algumas sementes apresentaram rompimento do tegumento e protrusão radicular.

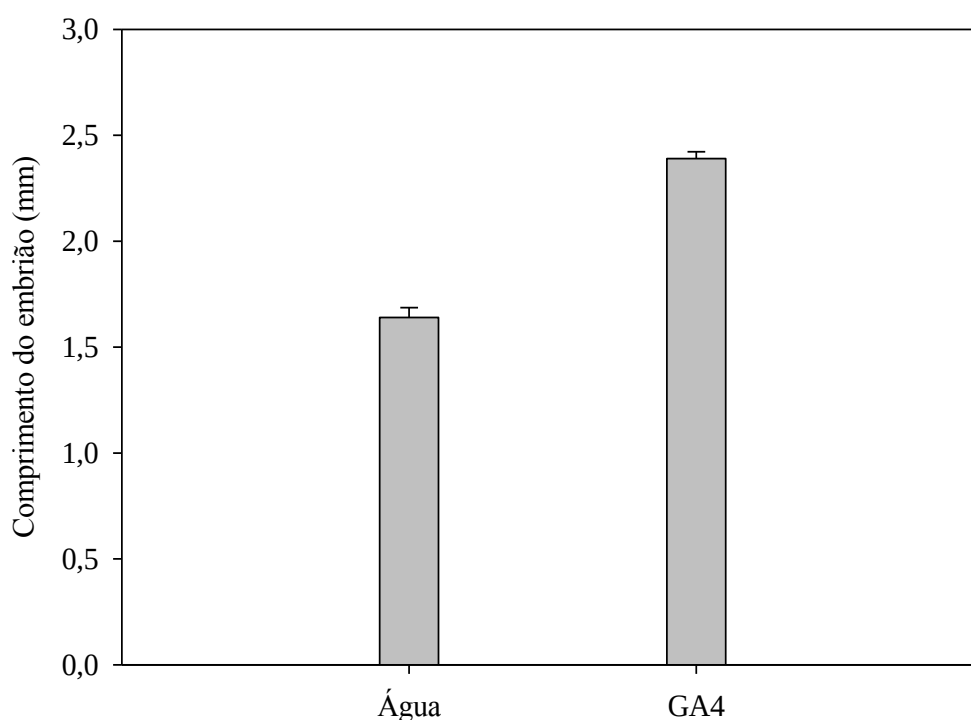


Figura 8- Comprimento do embrião de sementes de *Annona crassiflora* logo após a dispersão (abril) embebidas 8 dias em água e embebidas em solução de $100\mu M$ GA_4 após 28 dias antes da protrusão radicular.

Logo após a dispersão da semente o embrião já apresenta suas estruturas (Cotiledones, hipocótilo e radícula), contudo, rudimentares (9B, C, D). O rompimento natural do tegumento (9E) considerado um marcador morfológico que caracteriza o crescimento interno do embrião, outra característica observada foi a mudança da coloração externa do endosperma de bege/amarronzado (9A) para um tom

mais rozado (9F) quando embebida com solução de GA₄, possivelmente pela atuação das enzimas e degradação das reservas do endosperma para o crescimento do embrião (Figura 9G).

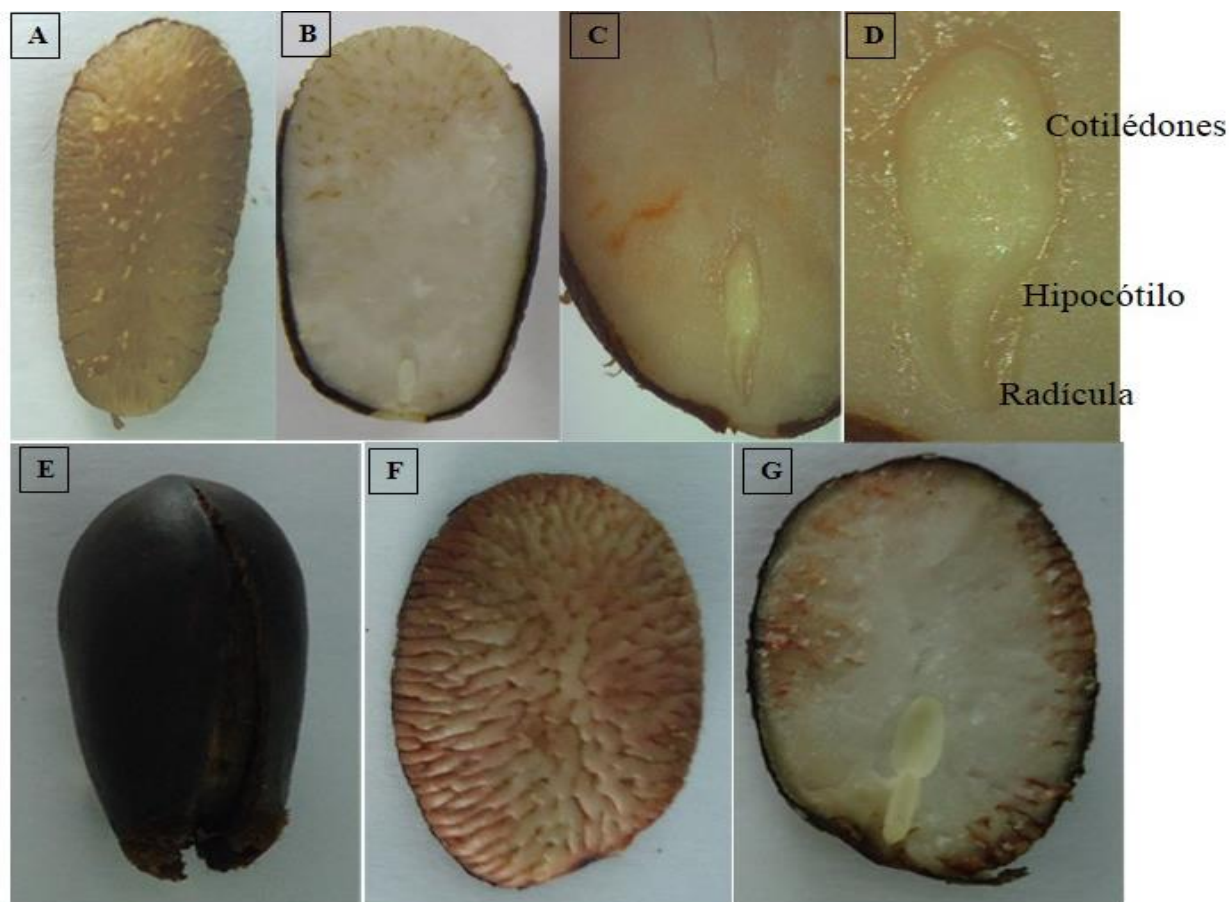


Figura 9- Sementes de *Annona crassiflora* logo após a dispersão no mês de abril (**A**, **B**, **C** e **D**); (**A**): Aspecto do endosperma de *Annona crassiflora* no momento de dispersão (seco); (**B**): Semente cortada longitudinalmente mostrando o endosperma micropilar, lateral e o embrião após a dispersão embebidas em água por 8 dias; (**C** e **D**): Detalhe do tamanho do embrião, mostrando a radícula, hipocótilo e cotilédones-imagens geradas pelo microscópio Stereo/Zoom Luxeo 2S-Labomed; (**E**): Tegumento rachado que demonstra o crescimento interno do embrião antes da germinação (protrusão radicular); (**F**): Aspecto do endosperma pós tratamento com solução de GA₄; (**G**): Tamanho do embrião pós tratamento com solução de GA₄ antes da germinação.

4.6- Análise da qualidade do RNA

A amostra de RNA dos embriões, oriundos de sementes com dormência fisiológica a morfológica superada, teve RIN de 9,1 (bem próximo ao valor máximo recomendado). Este valor demonstra RNA de excelente qualidade e recomendável para ser sequenciado, de acordo com o protocolo da Illumina (Figura 10).

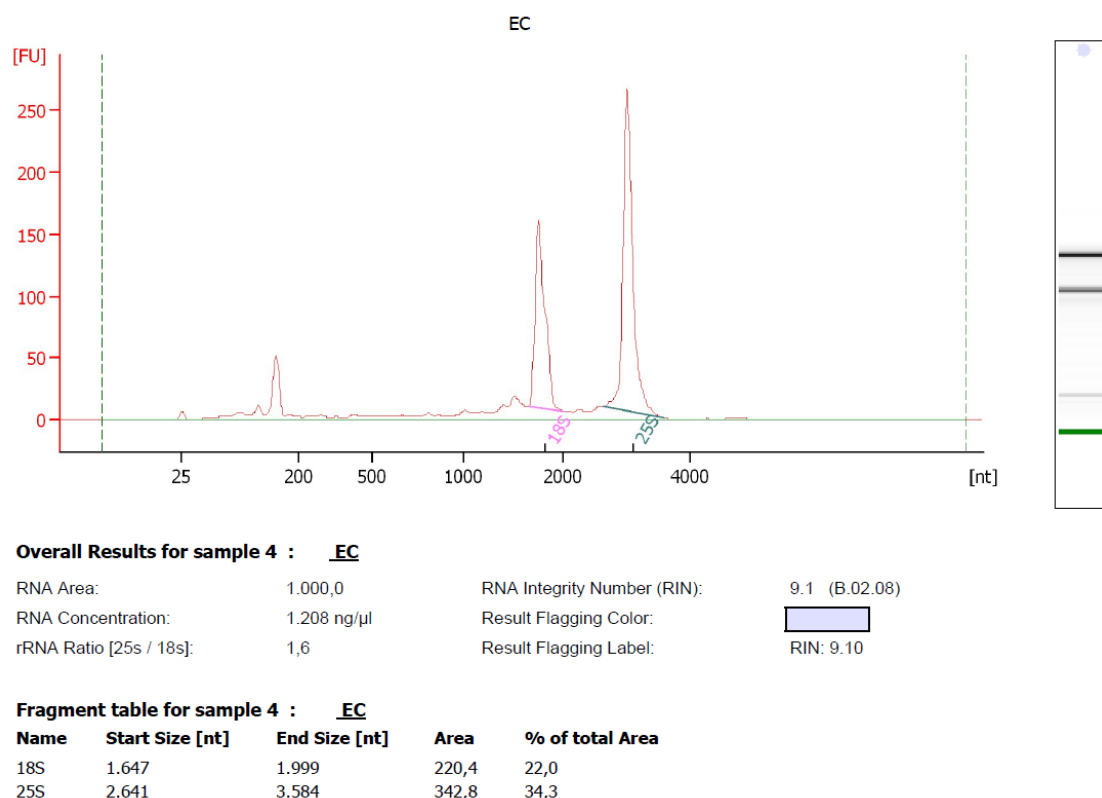


Figura 10 - Integridade do RNA (região 18S e 28S) extraído de embriões de sementes de *Annona crassiflora*, com dormência fisiológica e morfológica superada, analisadas por Bionalyzer utilizada no sequenciamento.

4.7- Sequenciamento (RNAseq) e análise de bioinformática

O estabelecimento de interações entre a germinação e a dormência, está associado à ativação de diversas rotas metabólicas na semente. A identificação e caracterização molecular de transcritos envolvidos nestas rotas metabólicas são variáveis de acordo, principalmente, com a espécie, a condição avaliada e o habitat. A identificação de genes relacionados à germinação pode ajudar a

compreender a via de transdução de sinal que leva a resposta do momento entre a germinação e/ou a manutenção do estado de dormência. Foram gerados 32.883 transcritos, em que o menor comprimento do transcrito observado foi de 181pb e o maior de 11.314pb, com nível de expressão variando entre 3,1 a 7.010,3. Contudo, a maior parte dos transcritos estão entre o tamanho de 250 e 500 pb (44%), e cerca de 95% estão relacionados ao nível de expressão entre 3,0 e 100 (Tabela 1).

Tabela 1- Tamanho dos transcritos (pb) e valor de expressão em porcentagem do embrião de *A. crassiflora* durante a superação de dormência morfológica em condições naturais.

Tamanho do transcrito (pb)	Número total de Transcritos	Valor em Porcentagem (%)	Valor de expressão (RPKM)	Número total de Transcritos	Valor em Porcentagem (%)
180--250	5.537	16,84	3,0--100	31.111	95,40
251--500	14.520	44,15	101--250	1.368	4,16
501--1000	7.601	23,11	251--500	261	0,80
1001--2500	4.477	13,61	501--1000	95	0,29
2501--5000	690	2,09	1001--2500	34	0,10
5001--7000	51	0,15	2501--4500	07	0,02
> 7000	07	0,02	> 4500	07	0,02
Total			32.883		100

Em decorrência da ausência de uma espécie com genoma sequenciado onde fosse possível fazer a analogia caracterizando as funções descritas na literatura, foram anotadas e atribuídas funções moleculares aos cinquenta transcritos mais expressos manualmente, obedecendo às subcategorias descritas por Cadman et al. (2006), em *Arabidopsis Cvi*, durante a superação da dormência fisiológica. Foram observadas durante a superação da dormência morfológica de *A. crassiflora* as categorias funcionais representadas nesta ordem: metabolismo (36%), ciclo celular (14%), resposta ao estresse (12%), síntese de proteína (6%), comunicação celular (8%); hormônio (4%) e transcrição (2%), entretanto não foram identificados (18%) dos transcritos, pois não tinha anotação ou por constituírem sequências fragmentadas (Figura 11).

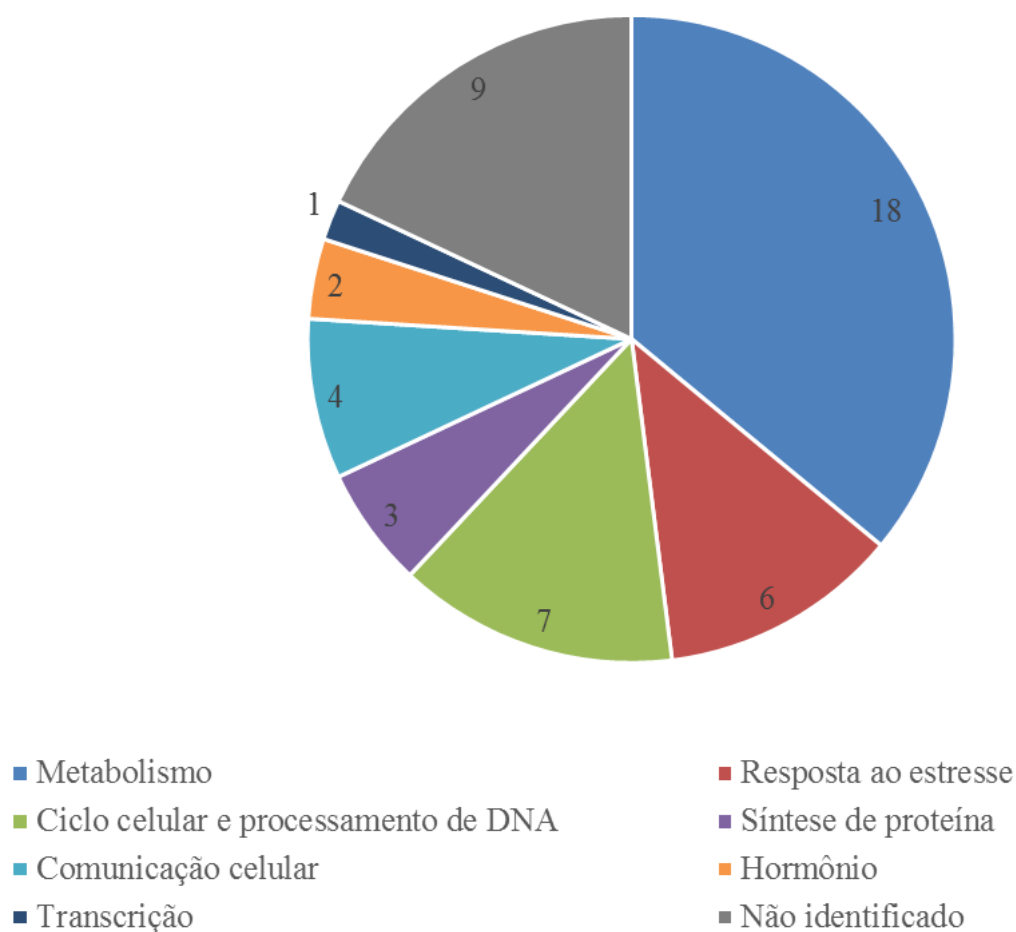


Figura 11- Categorias funcionais dos cinquenta transcritos mais expressos durante a superação natural de dormência morfológica de sementes de *A. crassiflora*.

Do total de 32.883 transcritos observados, os cinquenta mais expressos anotados manualmente e representando em cada função molecular, para as quais foram encontrados similares no <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> e detalhes de sua anotação funcional estão representados na Tabela 2. A categoria funcional de metabolismo foi a que mais foi associada aos transcritos no momento da superação da dormência morfológica de *A. crassiflora*, isso se deve ao fato de que as sementes já passaram pelo processo de embebição, ocorrendo multiplicação e divisão celular, respiração, transformação e consumo de reservas para o crescimento interno do embrião, posteriormente a ruptura do tegumento e saída da raiz primária (Figura 11).

Tabela 2- Relação dos cinquenta transcritos mais expressos durante a superação natural de dormência morfofisiológica de sementes de *A. crassiflora* e suas categorias funcionais relacionadas com a função fisiológica conforme anotação manual feita através do programa BLAST do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).

Número do transcrito	Valor de expressão	Descrição da sequencia	Categoria funcional	Função fisiológica
transcript_90	7010,383	ADH álcool desidrogenase	Metabolismo	Fermentação.
transcript_64	5702,725	Não Identificado	?	?
transcript_208	5600,843	Enolase	Metabolismo	Glicólise ou fermentação.
transcript_684	5024,588	Thioredoxin h3	Resposta ao estresse	Glicolise.
transcript_31	4769,717	Não Identificado	?	?
transcript_186	4650,699	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 isoform 1	Metabolismo	Glicolise.
transcript_144	4646,4	Metallothionein-likeprotein	Resposta ao estresse	Estresse abiótico, choque térmico.
transcript_78	3967,934	ATP synthasesubunit beta	Metabolismo	Enzima que sintetiza ATP.
transcript_92	3305,939	UDP-glucose pyrophosphorylase	Metabolismo	Enzima para produção de energia.
transcript_1369	3249,777	Glycinamideribonucleotide (GAR) synthetaseisoform 2	Metabolismo	Enzima catalisação química.
transcript_959	2981,677	Glycinamideribonucleotide (GAR) synthetaseisoform 2	Metabolismo	Enzima catalisação química.
transcript_592	2927,427	Glycine-richrnabinding protein 1	Resposta ao estresse	Proteína de defesa da planta, processamento de mRNA.
transcript_118	2643,562	Fructose-bisphosphate aldolase	Metabolismo	Enzima catalizadora, via anaeróbica.
transcript_157	2507,81	Sucrose synthase	Metabolismo	Catalisa reação química, metabolismo de amido e sacarose.
transcript_552	2300,218	Glycinamideribonucleotide (GAR) synthetaseisoform 2	Metabolismo	Enzima catalisação química.
transcript_871	2290,721	Não Identificado	?	?
transcript_1192	2244,738	Enolase	Metabolismo	Glicólise.
transcript_138	2164,316	Não Identificado	?	?

transcript_653	2091,109	RRNA intron-encoded homing endonuclease	Ciclo celular e processamento de DNA	Enzima de restrição.
transcript_1126	1896,491	Translationally controlled tumor-like protein	Ciclo celular e processamento de DNA	Proteína conservada, desenvolvimento do embrião, ciclo celular, proliferação de células, crescimento, resposta ao estresse, regulação química.
transcript_134	1761,34	Ribosomal protein L16p/L10 e family protein	Síntese de proteína	Processo de metabolismo de proteínas, constituinte do ribossomo, desenvolvimento e crescimento.
transcript_474	1761,105	Aspartate amino transferase Asp2	Metabolismo	Ciclo de Krebs.
transcript_166	1646,752	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump	Comunicação celular	Transporte de íons, transporte de componente celular.
transcript_1010	1607,024	Não Identificado	?	?
transcript_2402	1587,512	Não Identificado	?	?
transcript_2421	1518,435	Gibberellin 2-oxidase	Hormônio	Enzima do metabolismo dos GAs.
transcript_2051	1514,295	Não Identificado	?	?
transcript_1621	1508,499	Maternal effect embryo arrest 14 isoform 1	Ciclo celular e processamento de DNA	Embriogênese
transcript_568	1480,931	Metallothionein 2A, partial	Resposta ao estresse	Família da Cisteína, proteínas de estresse.
transcript_478	1450,972	Aluminum induced protein with YGL and LRDR motifs	Resposta ao estresse	Tolerância a solos ácidos em arabidopsis.
transcript_754	1434,332	DNA-binding protein	Ciclo celular e processamento de DNA	Proteína que se liga ao DNA.
transcript_1372	1372,972	Gibberellin 2-oxidase	Hormônio	Metabolismo das GAs.
transcript_1598	1337,82	GTP binding Elongation factor Tu family protein isoform 3,	Síntese de	

partial		proteína	Região conservada em eucariotos.
transcript_289	1321,808	Early nodulin-93	Metabolismo
transcript_457	1320,417	Heatshockcognateprotein 70-1 isoform 1	Comunicação celular
transcript_772	1286,718	F-box familyprotein	Ciclo celular e processamento de DNA
transcript_83	1258,724	Pyruvate decarboxylase	Metabolismo
transcript_1026	1219,752	F-box familyprotein	Ciclo celular e processamento de DNA
transcript_1421	1203,093	Elongation factor 1 alpha	Síntese de proteína
transcript_766	1150,678	Não Identificado	?
transcript_1161	1126,245	Histone H3.3	Ciclo celular e processamento de DNA
transcript_577	1103,205	Sucrose synthase SusA1	Metabolismo
transcript_907	1098,019	Putative cytosine/adenosine de aminase	Metabolismo
transcript_61	1096,454	Smallubiquitin-likemodifier 1	Transcrição
transcript_1650	1072,193	Não Identificado	?
transcript_868	1047,976	ADP-ribosylation fator	Comunicação celular
transcript_1865	1046,077	DNAJ isoform 3	Comunicação celular
transcript_1896	1039,193	Aspartate aminotransferase Asp2	Metabolismo

Estrutura celular, metabolismo do carbono, transporte de aminoácido.

Proteína de choque térmico.

Funções celulares, transdução de sinal e regulação do ciclo celular.

Enzima catalizadora.

Funções celulares, transdução de sinal e regulação do ciclo celular.

Reativação da síntese proteica e tradução.

Proteína envolvida na estrutura da cromatina. Catalisa reação química, metabolismo de amido e sacarose.

Processos metabólicos, ligação de íons de zinco. Codifica proteína, transporte nuclear, regulação de transcrição.

Remodulação de actina, tráfego celular.

Transporte de proteína, translocação.

Enzima de metabolismo de aminoácidos.

transcript_285	995,582	Cu-Zn superoxide dismutase	Resposta ao estresse	Defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio.
transcript_66	985,979	Pyruvate kinase Family protein	Metabolismo	Atividade de piruvato Kinase, ligação de íons de potássio, de magnésio, atividade catalítica, envolvidas em resposta a íons de Cadmio e glicólise, biossíntese de esteróis, metabolismo de lipídio e maturação da semente.

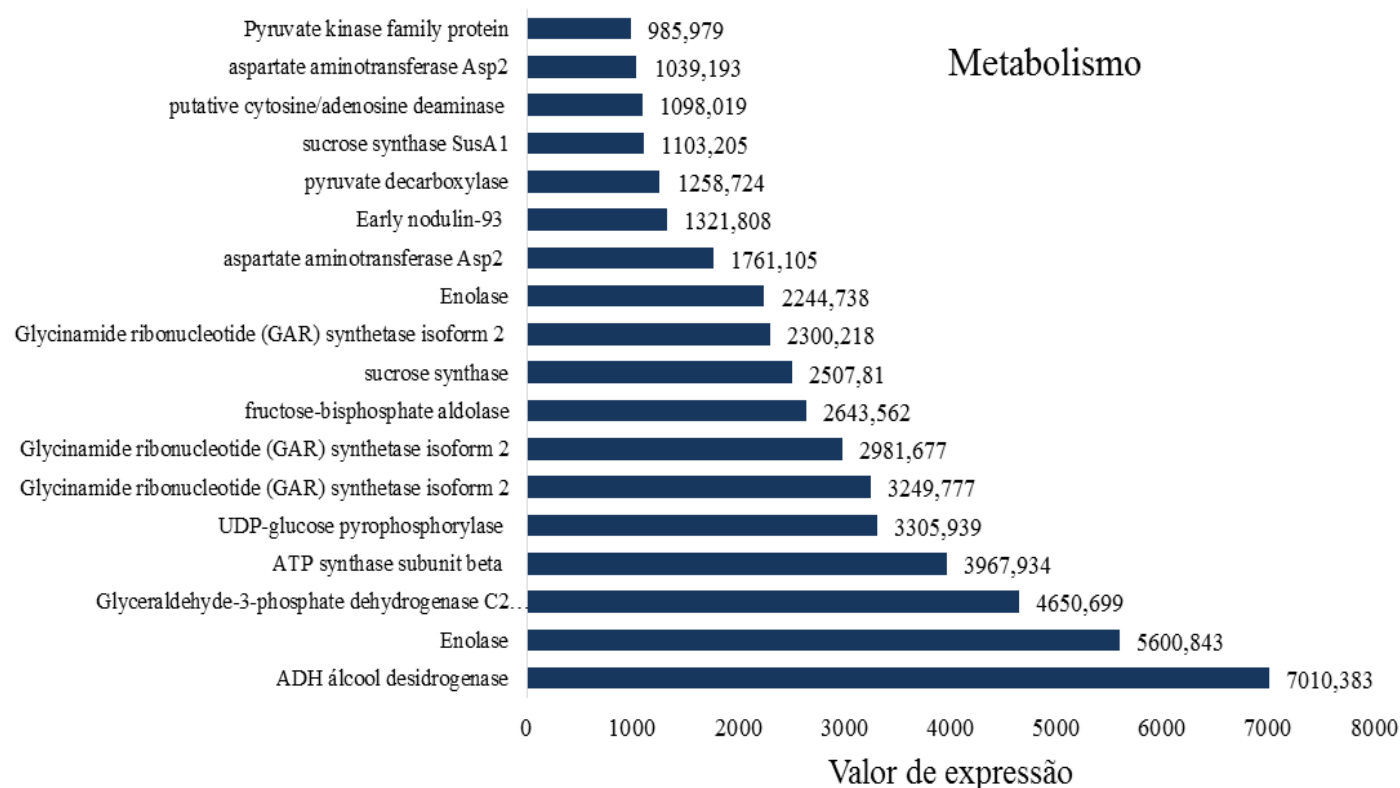


Figura 12- Categoria funcional: metabolismo dos cinquenta transcritos mais expressos durante a superação natural de dormência morfofisiológica de sementes de *A. crassiflora*.

De acordo com Bewley et al. (2013) a maior mobilização das reservas presentes nos tecidos de armazenamento da semente inicia após a protrusão radicular, ou seja, é um evento pós-germinativo. Contudo, a mobilização de algumas destas reservas podem ocorrer, muitas vezes, no eixo e numa região limitada (por exemplo, região micropilar) do endosperma antes da germinação. Neste caso, as reservas estão geralmente presentes em quantidades menores, embora os produtos da sua hidrólise possam ser importantes para o início da germinação e o estabelecimento das plântulas. Como as reservas contidas nos tecidos de armazenamento são mobilizadas, estes são convertidos em formas que são facilmente transportáveis para os locais onde eles são necessários (geralmente a metabolizar mais rapidamente e os órgãos de crescimento das mudas) para o apoio de eventos produtoras de síntese de energia.

Apesar das sementes de *A. crassiflora* serem dormentes, não existe nenhum impedimento físico no processo de embebição. Existe um prolongamento da Fase II e a germinação completa, apenas, das sementes que concluem a Fase III da embebição. A absorção de água esta associada com o aumento de divisões mitóticas, expansão celular e alongamento do eixo embrionário, perdendo assim, sua tolerância à desidratação (FERREIRA e BORGHETTI, 2004). Assim, a embebição de água durante a Fase III não é propriamente a embebição por si, mas sim a primeira consequência da realização da germinação. Como as células vegetais em expansão, por absorção de água, estica as paredes das células, o aumento na absorção de água durante a Fase III indica o início do crescimento do embrião para a conclusão da germinação.

O intenso metabolismo das sementes na germinação é acompanhado por altas taxas de respiração. Nos tecidos de reserva, a taxa respiratória aumenta durante o processo germinativo e cai ao iniciar a senescência. Para o eixo da plântula, como um todo a respiração total continua a aumentar durante a germinação. A atividade fisiológica dos tecidos de reserva durante o processo germinativo tem sido descrita como catabólica ou degradativa, em contraste com atividade anaeróbica ou sintetizante das regiões de crescimento do embrião. É difícil estabelecer o final da germinação e o início do desenvolvimento/crescimento. No caso da *A. crassiflora* ocorre crescimento do embrião internamente e, concomitantemente, após este, germina com a protrusão radicular.

Neste processo três vias respiratórias são considerados ativas na semente embebida, ou seja, a glicólise, a via das pentoses fosfato e o ciclo ácido cítrico

(ciclo de Krebs ou do ácido tricarboxílico). A glicólise opera sob condições aeróbicas e anaeróbicas para produzir piruvato, mas na ausência de O_2 , este é reduzido para etanol mais CO_2 , ou ácido láctico se a descarboxilação não ocorrer. Respiração anaeróbia, também chamada de fermentação, produz apenas duas moléculas de ATP por molécula de glicose respirados, em contraste com seis ATP produzido durante a formação de piruvato, sob condições aeróbicas (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Como descrito acima, muitas sementes em condições temporárias de baixa disponibilidade de O_2 (hipoxia), durante a embebição, tanto o etanol e ácido láctico, produtos de fermentação de respiração anaeróbica, acumulam no interior da semente, podendo ocorrer em proporções diferentes em diferentes espécies.

O transcrito mais expresso com valor de expressão de 7.010,38 (Figura 12) foi descrito como *Álcool desidrogenase (ADH)*, enzima que está relacionada à respiração anaeróbica, promovendo redução do acetaldeído a etanol (BUCHANAN et al., 2005), e, também, a síntese e a remoção de etanol. Em condições aeróbicas, a enzima converte lactato a piruvato, o qual pode, então, ser utilizada pelo ciclo do ácido cítrico, e este último converte etanol em acetaldeído, que é oxidado a acetato pelo acetaldeído desidrogenase.

A ausência do oxigênio promove o início do metabolismo fermentativo, através da indução da álcool-desidrogenase em que o acetaldeído é reduzido a etanol pela Adenina dinucleotídeo-nicotinamida (NADH). Os produtos finais desse metabolismo fermentativo são tóxicos para as células, e, segundo Taiz e Zeiger (2013), o etanol parece ser o produto do metabolismo fermentativo menos deletérico comparado ao lactato, pois a acumulação deste último promove a acidificação do citossol.

O acetato é ativado em acetil-CoA, que pode ser usada em muitos processos metabólicos, não surpreendentemente, ADH tendem a ocorrer em sementes durante a germinação. Em sementes de algumas espécies, as atividades de ADHs aumentam bastante (dez vezes ou mais), durante a germinação e depois desta, ocorre um declínio quando as condições são aeróbicas (BEWLEY et al., 2013).

O acetaldeído acelera a deterioração das sementes (ZHANG et al., 1994); portanto, com o aumento da atividade da ADH, as sementes ficam mais protegidas contra a ação deletérica deste composto. Brandão Jr. et al. (2002) concluíram que a via fermentativa é fundamental para a manutenção da viabilidade de sementes de café após secagem, devido a maior atividade da ADH em frutos maduros (tipo cereja).

O número de espécies que consegue germinar sob anoxia é muito limitado (CRAWFORD, 1992). A maioria delas corresponde a herbáceas adaptadas ao alagamento, como é o caso de algumas gramíneas dos gêneros *Oryza* e *Echinochloa* (CRAWFORD, 1992; LOBO e JOLY, 1998) e da espécie *Typhalatifolia* (FRANKLAND et al., 1987). No entanto, a capacidade de germinar em condições anaeróbicas não está restrita apenas a espécies aquáticas, conforme constatado em *Chorisia speciosa*, cujas sementes emitem radícula na ausência total de oxigênio. Neste caso, a anoxia é condicionada pela presença de mucilagem nas sementes (CRAWFORD, 1992; LOBO e JOLY, 1998).

Contudo, para *A. crassiflora* não há presença de mucilagem nas sementes submetidas a germinação. Uma das possibilidades a serem consideradas seria a espessura do tegumento que limita a entrada de O₂ e pelo processo de embebição da semente aliado a condições de umidade do solo flutuante nesta fase, o embrião está em desenvolvimento expandido para a emissão da radícula e a alternância de água pode ter desencadeado mecanismo de proteção e obtenção de energia através da respiração anaeróbica.

É necessária a realização de estudos para determinar se a espécie teria capacidade de germinar sob anoxia total, o que seria de fundamental importância para definir os limites de tolerância da planta ao déficit de oxigênio, durante as primeiras fases de seu desenvolvimento.

Em espécies florestais do bioma da Amazônia, a submersão da semente diminuiu a produção de plântulas de *Himatanthus sucuuba*, pois todas as sementes do tratamento não-alagado, que germinaram, produziram 100% de plântulas. Contudo, entre aquelas que germinaram, no tratamento de alagamento, 84% formaram plântulas (FERREIRA et al, 2006). A germinação e subsequente crescimento de plântulas sob condições de hipóxia, causada por alagamento, ocorre em outras espécies tropicais, como *Inga affinis* e *Sesbania virgata* (LOBO e JOLY, 1998), *Mora paraensis*, *Vatairea guianensis*, *Crateva benthami*, *Nectandra amazonum* (PAROLIN e JUNK, 2002) e *Carapagui anensis* (SCARANO et al., 2003).

Em ambiente de cerrado, a limitação de água do período da germinação da semente de *A. crassiflora*, pode ter ativado a rota fermentativa de produção de energia para continuação do crescimento e desenvolvimento do embrião e para que ocorresse a germinação, há uma escassez de trabalhos na literatura, sobre a

influência do ambiente, no período de germinação, em sementes do cerrado correlacionado com atividade enzimática.

O segundo transcrito mais expresso foi a *Enolase* (5.600,84), também, associada ao metabolismo (Figura 12), cuja, principal função fisiológica é reversível a conversão de 2- fosfo -D- glicerato e a fosfoenolpiruvato (PEP) dentro da via glicolítica (WOLD e BALLOU, 1957; VAN DER STRAETEN et al., 1991). PEP não é só importante como um substrato para uma reação adicional glicolítica, mas, também representa um precursor para a biossíntese de ácidos graxos (ANDRIOTIS et al., 2010). A enolase foi observada abundantemente em sementes de girassol de alto teor de óleo (HAJDUCH et al., 2007), bem como de ácidos graxos acumulados em sementes de Brassica (HAJDUCH et al., 2006).

A enolase também, faz parte da gliconeogênese sendo importante na acumulação de amido de sementes de milho (MECHIN et al., 2007) e cevada (OSTERGAARD et al., 2004). Em sementes de *Cyclamen persicum*, uma planta ornamental, o amido e ácidos graxos são utilizados como compostos de armazenamento (REINHARDT, 2006). Além disso, são necessárias grandes quantidades de PEP para o abastecimento de energia no tecido em desenvolvimento, ocorrendo alta concentração de enolase (RODE et al., 2011).

Alta abundância de enolase, não é encontrada nas sementes inteiras, mas sim em embriões. Andriotis et al. (2010) analisando transcritos, encontraram valores máximos para enolase dentro do estágio torpedo de embriões *Arabidopsis*. Por meio da análise de quatro estágios de desenvolvimento de embriogênese somática em *Picea*, Lippert et al. (2005) relataram a enolase como uma das proteínas mais abundantes nas fases mais amadurecidas, sugerindo que a enolase fosse um marcador de maturação.

Hoehenwarter et al. (2008), relatam uma ligação interessante entre patatina e enolase, encontrados no estudo de proteomas de seis cultivares de tubérculos de batata. Estes autores analisaram os peptídeos específicos de patatina, considerados altamente abundantes em cinco deles, mas em um cultivar, peptídeos específicos da enolase foram encontrados, sugerindo substituição provável de patatina como um composto de armazenamento deste especial cultivar.

Rode et al. (2011), relatam que o grupo da enolase, são necessárias nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário e formação da

semente, podendo ser “inativada” e “convertida” na forma de proteínas de armazenamento.

De uma maneira geral, durante a formação da semente, observa-se inicialmente, um acúmulo de açúcares tais como sacarose, frutose e glicose, bem como, compostos nitrogenados como aminoácidos e amidas. Estas substâncias drenadas da planta mãe são os principais metabólitos para a formação dos tecidos da semente e das substâncias de reserva que serão acumulados para fornecimento de energia e substâncias básicas para o desenvolvimento do processo de germinação. Desta forma, à medida que a semente vai se desenvolvendo há uma diminuição na quantidade destas substâncias mais simples e, ao mesmo tempo, um acúmulo de moléculas maiores e mais complexas como as proteínas, amido, lipídios, celulose, etc. (GUIMARÃES, 1999). Durante a germinação, essas substâncias são mobilizadas para a produção de energia e de novas moléculas para o crescimento e desenvolvimento das plântulas (BEWLEY e BLACK, 1985).

De acordo com Shewry et al. (1995) as principais proteínas de reserva das sementes são albuminas, globulinas ou prolaminas. Osborne (1924) classificou as proteínas da semente com base na sua solubilidade em diferentes solventes em: (1) albuminas - proteínas solúveis em água, (2) globulinas - proteínas solúveis em soluções salinas, (3) prolaminas - solúveis em soluções de álcool/água e (4) glutelinas - solúveis em soluções ácidas ou básicas diluídas.

Baleroni et al., 2002 e Cruz (2011) determinaram a composição química de sementes de *A. crassiflora* na qual contém a maior quantidade de açúcar total (20,14g 100g⁻¹ de massa seca - MS), proteína bruta (10,4g 100g⁻¹MS) composto de prolamina, glutamina e albumina, carboidrato (30,899mg g⁻¹), amido (1,010 mg g⁻¹), lipídios (0,325 mg g⁻¹) e grande acúmulo de fosforo associado a presença de fitina, composto tido como reserva de fósforo para a germinação. Além de microminerais, tais como cobre, manganês, zinco e ferro para ativação enzimática.

Silva et al. (2007) observaram a presença de atividade de endo- β -mananase no endosperma micropilar e lateral, correlacionada com a germinação. Neste caso, a atividade da endo- β -mananase é maior no endosperma micropilar antes da emissão da radícula do que no endosperma lateral. A atividade da endo- β -mananase tem sido associada a hidrólise de galactomanano, contido no endosperma, para liberar hidratos de carbono como fonte de energia para o crescimento interno do embrião e reduzir a barreira mecânica para o crescimento da radícula.

Diante desse contexto, o metabolismo durante a superação da dormência morfológica demonstrados pela glicólise, metabolismo de carbono, amido e sacarose representam os processos fisiológicos mais proeminentes no embrião de *A. crassiflora*, representados pelos transcritos anotados: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 isoform 1*, *ATP synthase subunit beta*, *UDP-glucose pyrophosphorylase*, *Glycinamide ribonucleotide (GAR) synthetase isoform 2*, *fructose-bisphosphate aldolase*, *sucrose synthase*, *aspartate aminotransferase Asp2*, *Early nodulin-93*, *pyruvate decarboxylase* (Figura 12).

Mesmo com a embriogênese finalizada há um processo associado com o desenvolvimento ligado a biossíntese de muitos compostos, a divisão celular e alongamento celular, antes da protrusão da radicular, no qual o crescimento interno do embrião se faz necessário para completar a germinação. Neste contexto, a glicólise é importante para o fornecimento de energia e a formação de vários intermediários metabólicos como PEP (biossíntese de ácidos graxos e de compostos aromáticos), piruvato e 3-fosfo-D-glicerato (biossíntese de aminoácidos).

Rode et al. (2011) observaram, em embriões somáticos e zigóticos de *Cyclamen persicum*, que as enzimas desta via têm função chave em ambos os tipos de tecidos embrionários. Pontos que representam as enzimas glicolíticas GAPDH, enolase e malato-desidrogenase aumentaram em embriões zigóticos e somáticos, ao mesmo tempo, mas em posições diferentes do gel. Este resultado indica a presença de isoformas ou modificações pós-traducionais, tais como a fosforilação, glicosilação e ou ubiquitinação.

No entanto, para muitas proteínas, a função biológica pode não ser facilmente obtida com base na sua função bioquímica (SUBBAIH et al., 2007). Isto parece ser particularmente verdadeiro quando o gene que codifica a proteína tem uma história de duplicação e está representada por uma família de parálogos (genes de igual função e com similaridade de sequência em um mesmo organismo). A *Sacarose sintase* (SUS), é uma enzima chave na planta, responsável pelo catabolismo da sacarose, e é a única capaz de mobilizar sacarose em várias vias envolvidas em funções metabólicas, estruturais e de armazenamento.

Subbaih et al. (2007) indicam que a função biológica do SUS pode se estender para além da sua atividade catalítica. Esta dedução é baseada nas seguintes observações: (a) A associação específica de tecido, isoforma-dependente e metabolicamente regulada de SUS com a mitocôndria e (b) interação isoforma

específica e sensível de anoxia SUS, com o canal dependente (VDAC-voltage-dependent anion channel), a principal proteína da membrana mitocondrial externa, que em milho a VDAC e SUS também são localizados no núcleo, em tecidos de plântulas. A sua regulação intrincada sob anóxia indica que estas duas proteínas podem ter um papel na sinalização inter-compartimental (mitocôndria, núcleo, e os compartimentos não relacionados ao metabolismo de sacarose).

Em milho e outras espécies, as isoformas de *sacarose sintase* (SUS), são quase idênticas a suas propriedades catalíticas (ENDCHT e CHOUREY, 1995; BARRET et al., 2001). No entanto, as características de fenótipos mutantes de isoformas específicas sugerem que as isoformas contribuem muito para diferentes funções do organismo (SUBBAIAH e SACHS, 2001; BARRET et al., 2001), podendo elucidar a base molecular desta diversidade funcional. Além disso, esta isoforma específica, a compartimentação das isoformas SUS, é influenciada por estímulos de desenvolvimento, bem como do meio ambiente, juntamente com o SUS e VDAC, que também, é localizada no núcleo. Estas duas proteínas são inversamente reguladas nestes dois compartimentos em estresse anóxico, indicando interação SUS-VDAC, podendo desempenhar um papel na sinalização inter-compartimental.

Assim, as proteínas de reservas são hidrolisadas, na presença de proteases, em aminoácidos e peptídeos e estes pelas peptidases em aminoácidos, sendo que a maioria das proteases é sintetizada no primeiro estágio da germinação. Os lipídios mais comuns, na forma de triglicerídeos, são convertidos em ácidos graxos e glicerol que é oxidado via glicólise e ciclo de Krebs. Os ácidos graxos são oxidados via β -oxidação, resultando no complexo Acetil-CoEzima A, que pode ser completamente oxidado via ciclo de Krebs ou ainda convertido em sacarose via ciclo de ácido glicoxílico. O processo germinativo inicia pela degradação dos componentes de reserva, pela atividade enzimática e fluxo de componentes solúveis as regiões de crescimento. Os aminoácidos (oriundos das proteínas) e a sacarose proveniente dos polissacarídeos (ou dos lipídeos) são produtos translocados predominantes, em relação a outros compostos, incluindo fosfatados, certos precursores de fitohormônios, essenciais ao desenvolvimento do embrião (MARCOS FILHO, 2005).

O último transcrito anotado como *Piruvato-Kinase* (PK) é uma enzima essencial para o metabolismo da via glicolítica e de carbono em geral, que, também funciona como esqueleto de carbono para a biossíntese de ácidos graxos (Figura 12). A *piruvato-kinase* catalisa a reação final da via glicolítica, a conversão

de ADP e de fosfo *enol* piruvato (PEP) em ATP e piruvato, o qual é, subsequentemente, importada para mitocôndrias e utilizada como um substrato para a respiração. As enzimas específicas da planta podem expressar em duas isoformas diferentes, como isoenzimas citosólica (PKC) e plastídica (PKP), em contraste com PKs com características cinética e molecular variáveis. Ambas as enzimas consistem em subunidades α e β e parecem existir como 3α e 3β heterohexamer (PLAXTON, 1991).

De acordo com Sangwan et al. (1992), há evidências consideráveis presentes na literatura acerca da existência de uma via glicolítica em ambos citosol e no plasto, comprovada pela atividade de piruvato-quinase plastídica que apresenta forte correlação com a fase mais ativa de biossíntese de lípidos. PEP desempenha uma função fundamental no direcionamento de carboidratos de sementes via plastídica para biossíntese de ácidos graxos (RUUSKA et al., 2002). Este desenvolvimento incomum juntamente com recente descoberta em *Arabidopsis* do seu envolvimento na biossíntese de óleo (ANDRE et al., 2007), certamente, renovou o interesse por esta via glicolítica. Estudos do embrião em desenvolvimento de sementes de colza/canola (*Brassica napus*), permitiu observar a atividade PKP e, a concentração foi correlacionado com a fase mais ativa da biossíntese de lipídios (SANGWAN et al., 1992).

Mandal et al. (2011), observaram em mostarda indiana (*Brassica juncea*), atividades de PK de diferentes tecidos foram comparadas, e verificaram que plântulas após a germinação tinham uma atividade muito maior do que em outros tecidos, porque nos primeiros dias após a germinação, o fluxo glicolítico melhora, conduzindo à formação de piruvato e de síntese de ATP. Em estágios iniciais de germinação, o desenvolvimento mitocondrial não encontra-se completo, tornando-se incapaz de produzir ATP através da fosforilação oxidativa. Assim, seguindo a embebição o fluxo glicolítico poderia até certo ponto reabastecer a exigência enorme de ATP da célula. Isso pode ter ocorrido no embrião de *A. crassiflora*, durante a superação da dormência morfológica, que justifica a expressão da *piruvato-Kinase* nesta fase.

O desenvolvimento e a germinação de sementes são respectivamente, caracterizados pela inativação e reativação do crescimento. Evidentemente, o ciclo celular tem função relevante no contexto destes eventos. Foram observados sete transcritos relacionados a essa função durante a superação da dormência morfológica de *A. crassiflora* (Figura 13).

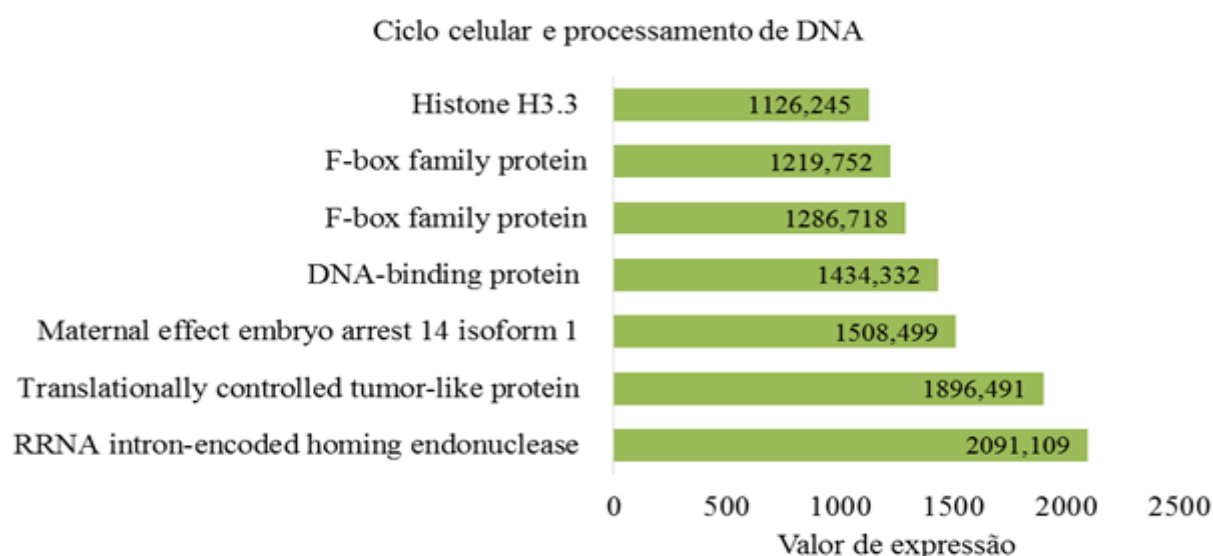


Figura 13. Categoria funcional: ciclo celular e processamento de DNA dos cinquenta transcritos mais expressos durante a superação natural de dormência morfológica de sementes de *A. crassiflora*.

Desenvolvimento de sementes geralmente é dividido em duas fases distintas conceitualmente: a primeira fase é considerada um período de morfogénese durante o qual o plano do corpo do embrião é estabelecido através de divisões celulares intensivas e os órgãos embrionários e tecidos são formados (GOLDBERG et al., 1994; MEINKE, 1995; OESTE e HARADA, 1993). A segunda fase é considerada um período posterior a maturação das sementes, que inclui a formação de tecido e de órgãos, o acúmulo de reservas de nutrientes, mudanças no tamanho do embrião e dos pesos fresco e seco, a supressão da germinação precoce, a aquisição de tolerância à dessecação, desidratação e quiescência, e em muitas espécies, a indução de dormência (KOORNNEEF e KARSSSEN, 1994). Nesse estado desidratado, a semente pode sobreviver aos estresses ambientais e, a menos que esteja dormente, recomeçará a atividade metabólica, o crescimento e o desenvolvimento quando as circunstâncias condutoras à germinação e ao crescimento forem estabelecidas (BORGHETTI e FERREIRA, 2004).

A germinação e o crescimento após a germinação representam as fases durante as quais ocorre “reativação” metabólica e morfogenética da semente quiescente (BEWLEY, 1997; HARADA et al., 1988, HARADA, 1997). Os programas de regulação que controlam a detenção de crescimento e metabolismo durante o desenvolvimento, e o que leva a quiescência e em alguns casos a dormência, ou a

reativação do crescimento e do metabolismo, durante a germinação, são, portanto, de relevância, embora, pouco estudados, tendo como espécie modelo o tomate. Ambas as fases certamente envolvem a inativação e reativação de eventos relacionados ao ciclo celular.

O crescimento depende de divisão celular e de alongamento. A sequência dos processos que ocorrem durante a divisão da célula é referido como o ciclo celular, a qual é dependente da síntese de DNA, que conduz a padrões específicos de organogênese e morfogênese, no que diz respeito à diferenciação celular. Nos níveis citológicos e moleculares, o ciclo celular envolve um ciclo cromossômico em que a síntese de DNA para a replicação ocorre durante a interfase, e um ciclo mitótico, que leva à divisão celular.

A replicação do DNA ocorre durante a interfase e pode durar várias horas. Portanto, a intérfase é uma fase que, dentro do ciclo celular, dura mais tempo do que a mitose. Dentro de intérfase, há uma fase de quiescência (G0), acoplado a uma fase de crescimento e de pré-síntese (G1), durante o qual os núcleos de células diplóides contêm um valor arbitrário de DNA 2C, referindo-se a quantidade de DNA por cada núcleo, e durante o qual pode ocorrer reparação do DNA. Subsequentemente, a síntese para a replicação do DNA ocorre durante a síntese ou da fase S. Finalmente, a fase G2, que compreende núcleos com valores de DNA 4C, em que a célula encontra-se em preparação para a mitose. A fase mitótica compreende várias fases distintas, baseadas nas matrizes microtubulares, isto é, (pré) prófase, metáfase, anafase e telofase (Figura 14).

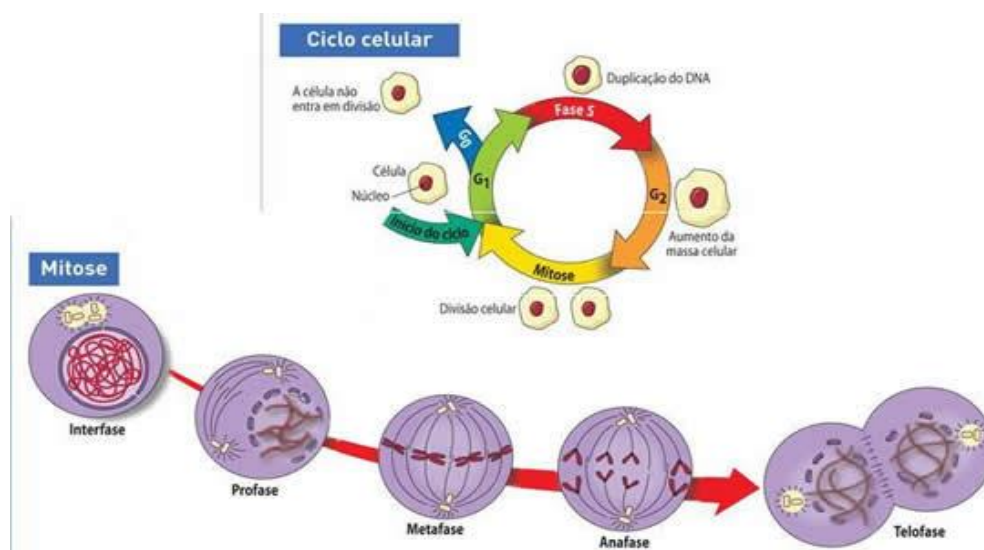


Figura 14. Ciclo celular consiste de uma fase mitótica (M), durante a qual ocorrem a primeira divisão nuclear (mitose) e a divisão celular (citocinese). A fase M é seguida de um período longo de crescimento conhecida como interfase (I). A interfase em células que se dividem possui três subfases (G₀, G₁, S e G₂).
 Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/figuras/Citologia2/mitose.jpg>

Os processos que constituem a síntese de DNA como a organização microtubular tem sido bastante estudada em sementes, levando em consideração temas como eventos celulares na embriogênese e formação do endosperma durante o desenvolvimento da semente, e organogênese durante o crescimento post germinativo (BERSHADSKY e VASILIEV, 1988; BARLOW, 1993; CLAYTON, 1985; FRANCIS e HERBERT, 1993; RAGHAVAN, 1997; XU HAN, 1995; DE CASTRO e HILHORT, 2000). Diante desse contexto, podem ser relacionados os transcritos anotados como *RRNA intron-encoded homing endonuclease*, caracterizada como enzima de restrição (corta moléculas de DNA através do reconhecimento de sequências de nucleotídeos específicas); *maternal effect embryo arrest 14 isoform 1* que está relacionada com a embriogênese em *Arabidopsis thaliana*; *DNA-binding* proteína que se liga ao DNA, que se relaciona diretamente com a fase em que o embrião das sementes de *A. crassiflora* estão em crescimento, com aumento da atividade metabólica, respiração e mobilização de reservas para o suprimento de energia necessários para o desenvolvimento do embrião e início da germinação (Figura 13).

Os estudos moleculares e genéticos nas plantas estão começando a elucidar a maquinaria de crescimento básico e sua regulação que controlam e integram estes processos para gerar a enorme variedade de tamanhos e formas de órgãos na

natureza. A proteína *TCPT-translationally controlled tumor-like protein* é encontrada em todos os eucariotas. Nas plantas, a expressão de mRNA de *TCPT* se correlaciona com a mitose em raízes e é induzida gradualmente em períodos de ausência de luz (SANGE-ONO et al., 1998). Ainda em plantas, a proteína TCTP foi também proposta como sendo importante no movimento de longa distância de proteínas do floema e no crescimento do tubo polínico (AOKI et al., 2005; BERKAWITZ et al., 2010). Estes dados publicados sugerem que TCTP não só regula o crescimento do organismo, mas também tem funções específicas na plantas. No entanto, os mecanismos moleculares e bioquímicos e a função TCTP ainda não estão bem caracterizadas.

Estas experiências de complementação interespecies fornecem evidências de que a TCTP atua como um regulador de crescimento, controlando a divisão celular, e que esta função é conservada em todo o reino animal e de plantas. É um gene essencial em *Arabidopsis*, em que a perda da função do gene *AtTCTP* resulta no desenvolvimento retardado do embrião, pois afeta a divisão celular, as plantas apresentam fenótipo anão, em comparação as plantas normais. Atuam também como regulador positivo no crescimento mitótico, mas não na expansão de células. Na regulação da proliferação celular, há um maior acúmulo de proteínas *AtTCTP* em *Arabidopsis* associado a tecidos jovens proliferantes como meristemático e zonas de divisão celular de raiz ou do embrião (BRIODES et al., 2010). Esse fato pode ser correlacionado com a superação da dormência morfológica (crescimento do embrião) de *A. crassiflora* e expressão da TCPT neste período.

Outro transcrito anotado durante a superação da dormência morfológica foi o da família da proteína *F-box* (Figura 13), que de acordo com Xu et al., (2008), os genes da *F-box* formam uma das maiores superfamílias multigênicas que controlam muitas funções biológicas importantes. No entanto, não está claro como e por que as plantas tenham adquirido um grande número de genes *F-box*. Assim, estes classificaram os genes *F-box* com função conhecida em duas categorias: (i) aqueles que estão envolvidos nos processos relativamente conservados (como embriogênese, desenvolvimento da plântula, ritmos circadianos, desenvolvimento floral e senescência), e (ii) aqueles que estão envolvidos em processos relativamente específicos (tais como o reconhecimento de pólen e resposta patogênico). Observou-se também que os genes que pertencem à primeira categoria sofreram pouca ou nenhuma alteração no número de genes. Em contraste, os genes que pertencem à segunda categoria, geralmente formam aglomerados específicos de linhagem e duplicações de genes frequentes.

A regulação de diversos processos de desenvolvimento das plantas, como por exemplo a fotomorfogênese, regulação do relógio circadiano, a auto-incompatibilidade floral e meristema floral, determinação da identidade dos órgãos, envolve proteínas *F-box* (SULLIVAN et al., 2003; MOON et al., 2004; SMALLE e VIERSTRA, 2004). Até agora, as funções de apenas 23 proteínas *F-box* (18 de *Arabidopsis* [*Arabidopsis thaliana*]) foram relatados a partir de plantas. Em órgãos florais atípicos (UFO), a primeira proteína *F-box* foi identificada em plantas, e relacionada a um papel importante na identidade do meristema floral e desenvolvimento do órgão floral (LEVIN e MEYEROWITZ, 1995; LAUFS et al., 2003; HEPWORTH et al., 2006). *LKP1/ZTL*, *LKP2/FKL* e *FKF1* são proteínas *F-box* que estão envolvidas em fotomorfogênese, a regulação do relógio circadiano, e no controle do tempo de floração (SOMERS et al., 2000, 2004; SCHULTZ et al., 2001; IMAIZUMI et al., 2003, 2005).

Recentemente, foi relatado que muitas proteínas *F-box* (*TIR1*), que já eram conhecidas há algum tempo na regulação da estabilidade das proteínas Aux/IAA, atuam como receptores de auxina em *Arabidopsis* (GRAY et al., 2001; DHARMASIRI et al., 2005a, 2005b; KEPINSKI e LEYSER, 2005). O papel das proteínas *F-box* em etileno (EBF1 e EBF2) e ácido giberélico (SLY1 e PND) de sinalização, também, tem sido estabelecida (GUO e ECKER, 2003; Dill et al., 2004; STRADER et al., 2004). Outra proteína *F-box*, *SON1*, regula negativamente a resistência sistêmica adquirida e a resposta de defesa *NIM1* independente (KIM DELANEY, 2002).

Em arroz (*Oryza sativa*), vários genes codificadores de proteínas *F-box* exibem expressão específica durante as várias fases do desenvolvimento da panícula e de sementes. Além disso, as proteínas *F-box* parecem servir como componentes da maquinaria envolvida na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, durante todo seu ciclo de vida, sendo influenciada por fatores abióticos. Todavia, as funções da maioria das proteínas *F-box*, ainda precisam ser estudadas, não obstante o fato de que elas desempenham funções importantes em muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta, de acordo com a sua espécie (JAIN et al., 2007).

Lechner et al., (2006) afirmam que muito provavelmente por causa da função na ubiquitinação e degradação de proteínas, genes *F-box* de plantas foram encontrados geneticamente associados a muitos processos cruciais, tais como a embriogênese, respostas hormonais, desenvolvimento de plântulas, a organogênese

floral, senescência e resistência de patógenos. Contudo, devido à grande variabilidade de funções desta família, estudos têm sido feitos para cada espécie observando o verdadeiro papel desses genes em determinadas condições. Provavelmente, em *A. crassiflora* a *F-box* deve desempenhar o papel de regulação do crescimento e desenvolvimento do embrião para formação da plântula, visto que há também expressão de genes relacionados com a rota de giberelinas, auxinas e etileno.

Em arroz (*Oryza sativa*) e *Arabidopsis thaliana* as proteínas DELLA são reguladores negativos da ação da Giberelina (GA), localizadas no núcleo, que precisam ser degradadas para que ocorra resposta a GA. Mutações recessivas *GA-insensitive dwarf 2 (gid2)* e *sleepy (spy1)* originam fenótipos anões insensíveis a GA e codificam proteínas com domínio F-box conservados, que são componentes de complexos ubiquitina E3 ligase, também conhecidos como complexos SCF. A degradação da proteína DELLA pela mudança na conformação do domínio GRAS, facilita sua ligação ao componente F-box de um complexo SCF, assim a proteína F-box realiza a poliubiquitinação do domínio GRAS da proteína DELLA. Concluindo a degradação da proteína DELLA, a planta exibirá uma resposta a GA (TAIZ e ZAIGER, 2013).

Durante a superação da dormência morfológica, o transcrito denominado de como *Histone H3.3* foi observado (Figura 13). Duas classes principais de histonas podem ser distinguidas, de acordo com o modo de incorporação. Histonas canônicas (*Canonical histone*) são expressos durante a fase de síntese de (S) do ciclo celular e contribuem para a síntese de “nova” cadeia de DNA (HENIKOFF e AHMAD 2005). Por outro lado, as *H2A*, *H2B*, *H3* têm variantes, que são expressos durante todas as fases do ciclo celular e podem ser montadas em nucleossomos nas células diferenciadas (MALIK e HENIKOFF, 2003; BERNSTEIN e HAKE, 2006).

De acordo com Olivier et al. (2013), ocorrem diferentes modificações das histonas (muitas vezes modificam as interações DNA-histonas), que afetam a estrutura local e global da cromatina, proporcionam um vasto potencial para respostas funcionais. A maioria dos estudos, têm-se centrado sobre o papel das várias modificações do gene na regulação da transcrição, sendo escassos em outros aspectos da estrutura dos cromossomos durante a divisão celular eucariótica, principalmente na meiose. Este mesmo autor relata, também, que existem pequenas diferenças entre a distribuição cromossômica dessa modificação entre dicotiledôneas (*Arabidopsis thaliana*) e monocotiledôneas-cereais (*Aegilops sp.* e *Secale cereale*), e até agora em

plantas, na condensação ao longo do cromossomo, a divisão celular parece estar relacionado com uma combinação particular de modificações *H3*. Além disso, a distribuição e dinâmica, dessas modificações parecem ser específicas da espécie e diferentes mesmo entre a mitose e meiose na mesma espécie.

A regulação da atividade da cromatina por modificações covalentes das histonas são reconhecidas na literatura. As histonas, que constituem os nucleossomos são codificadas por uma grande família de genes e exibem um elevado grau de conservação e existem variantes de histonas descritos claramente que desempenham um papel importante na regulação do genoma. No entanto, a maioria dos estudos sobre o papel da *Histone 3 (H3)* e variantes no controle transcricional vem de modelos animais. Os dados emergentes em plantas sugerem conservação funcional, embora as funções específicas são prováveis em plantas (INGOUFF e BERGER, 2010).

Ainda, segundo Ingouff e Berger (2010) famílias de genes *H3* são encontrados nas espécies de plantas: *Oryza sativa ssp japonica*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* e *Populus trichocarpa*. Em *Arabidopsis* ela está presente no zigoto e no endosperma, possível herança epigenética de informações a partir do genoma paterno para o endosperma.

A família de *histona H3* compreende, pelo menos, três tipos de variantes de *H3* na maioria dos eucariotas (MALIK e HENIKOFF, 2003; LOYOLA e ALMOUZNI, 2007). *Centromeric H3 (CenH3)* variantes diferem da outra proteína *H3* por uma longa extensão da cauda de terminal-N que está mal conservada entre eucariotas (MALIK e HENIKOFF, 2003). *CenH3s* são essenciais para a segregação dos cromossomos durante a mitose (DALAL et al., 2007). Em contraste com *CenH3*, as variantes de *histona H3* chamados *H3.3* são semelhantes na sequência de aminoácidos e no comprimento e com *H3.1* canônica, exceto em algumas posições (WATERBORG e ROBERTSON, 1996; MALIK e HENIKOFF, 2003).

Desenvolvimento pós-embrionário em plantas está associado com uma sucessão de transições de desenvolvimento (HENDERSON e DEAN, 2004). Muitas destas transições são induzidos por sinais ambientais. Esses fatores extrínsecos levam a um repertório de mudanças pós-translacionais de caudas das histonas conhecidos por afetar a expressão gênica (HE e AMASINO, 2005; REYES, 2006; FARRONA et al., 2008). Regulação epigenética tem sido associada ao crescimento adaptativo das plantas em resposta a sinais ambientais (luz, água, sal e temperatura, ataque de patógenos) e sinais de desenvolvimento (HSIEH et al., 2003;

FARRONA et al., 2008; STRATMANN e MAS, 2008 ; CHINNUSAMY e ZHU, 2009; RUIZ-FERRER e VOINNET, 2009).

No entanto, evidências para o papel de *H3.3* nestas respostas adaptativas é ainda preliminar. Uma propriedade das proteínas *H3.3* é a sua capacidade de transmitir estados de cromatina ativa sobre a divisão celular. Estas variantes podem contribuir para a memória epigenética dos estados da cromatina ativa, permitindo a transmissão de programas de desenvolvimento fiel adaptadas em células somáticas. Também, é possível que as variantes *H3* serem caracterizadas por um padrão de expressão específico, dependendo do tipo de célula e estágios de desenvolvimento. A combinação de estudos detalhados, análises de *H3* modificações pós-translacionais e padrões de distribuição ampla de genoma, pode fornecer pistas para as funções de variantes *H3* (INGOUFF e BERGER, 2010). Assim, faz-se necessário estudos específicos em *A. crassiflora* para esclarecer qual o verdadeiro papel da *H3.3* durante o desenvolvimento do embrião e no período da superação da dormência, já que o nível de expressão depende do tipo de célula e o estágio de desenvolvimento.

Estresses abióticos como estresse hídrico, salino, térmico e oxidativo podem comprometer a germinação e desenvolvimento de plantas. Tais estresses são considerados a primeira causa de perda de plantações por todo o mundo, e o entendimento dos mecanismos de resposta das plantas aos estresses abióticos é de extrema importância para avanços na área (WANG et al., 2004). A biologia molecular assume papel central na identificação dos genes envolvidos na resposta ao estresse. A indução ou a inibição destes genes leva a ativação de vias biossintéticas de compostos químicos e de complexos proteicos, cuja função é auxiliar ou mediar os mecanismos de defesa da planta.

Estudos relacionados à expressão de genes associados a estresses abióticos com espécies vegetais da região do cerrado, ainda são escassos. Os trabalhos relacionados à *A. crassiflora*, até então, publicados estão restritos às condições de campo, superação de dormência com uso de fitohormônios vegetais, produção de mudas assexuada, tolerância a doenças e outros, não havendo publicações em relação aos genes envolvidos na resposta ao estresse e sobre a sua expressão. Assim, foram observados, neste trabalho, seis transcritos relacionados com a resposta ao estresse, no qual a *Thioredoxin h3* destaca-se com maior expressão (5024,58) em relação ao demais (Figura 15).

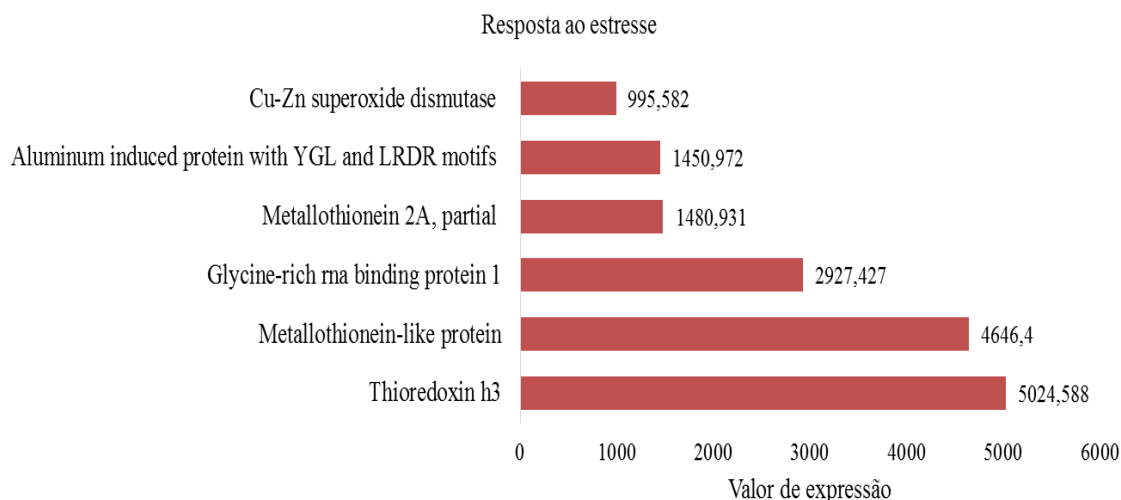


Figura 15. Categoria funcional: resposta ao estresse dos cinquenta transcritos mais expressos durante a superação natural de dormência morfológica de sementes de *A. crassiflora*.

Thioredoxins (Trx), também, denominada de redoxins, estão envolvidos na defesa antioxidante, fornecendo reduzido poder de tiol peroxidase (PRX), metionina sulfóxido redutase (MSR) e arsenato redutases (Figura 15). Elas, também, são obrigatórias para a redução de sulfato a sulfureto, que é dependente de sulfato phosphoadenylyl (PAPS) redutase, outra redutase, que obtém o seu poder redutor através de um par de cisteínas. Uma característica de plantas é o número muito grande de tipos de Trx e, com a maioria, é codificada por vários genes e a ser todo codificado pelo genoma nuclear. Esta alta complexidade deve-se ao fato que Trx está envolvida num grande número de vias metabólicas. Além disso, evidências sugerem que estes dois sistemas suportam funções específicas em termos de características bioquímicas (MEYER et al., 2012; ZAGORCHEV et al., 2013).

De acordo com Myer et al. (2012), a descoberta de Trx em plantas e mais conhecimento sobre suas funções, foram estabelecidas pela primeira vez pela bioquímica. O sequenciamento do genoma revelou o elevado número de tipos de Trx e sua conservação entre as plantas vasculares, sugerindo funções conservados durante a evolução. Abordagens proteômicas revelaram que numerosas proteínas estão envolvidas em quase todos os aspectos da vida da planta, sendo potencialmente regulados por dissulfeto de redução, e, conseqüentemente, a Trx é um integrador entre o

metabolismo, desenvolvimento e adaptação ao ambiente. No entanto, na maioria dos casos, as consequências dessas normas em termos de desenvolvimento, adequação ou adaptação às novas condições ambientais, ainda, não foram estabelecidos *in planta*. Este continua a ser o caso para a regulação do metabolismo de carbono fotossintético observadas em condições experimentais em laboratório e em mutantes em condições normais (ideais), ou seja, sem nenhum tipo de estresse.

Ainda, segundo o mesmo autor acima, estudos bioquímicos têm demonstrado uma alta especificidade de Trx por enzimas metabólicas. Isto é, particularmente, verdadeiro para o metabolismo relacionado com a fotossíntese no cloroplasto, para o qual é necessária uma estrita regulação dependente da luz a fim de evitar desperdício de energia. Tais especificidades enzimáticas estão, provavelmente, para favorecer a manutenção de genes durante a evolução Trx planta terra. TRXs são bons redutores de pontes dissulfeto, mas catalisadores pobres do deglutathionylation proteína, sendo também capazes de se ligar ao ferro-enxofre estáveis ou instáveis.

Em *Arabidopsis thaliana* as TRXs foram localizadas no cloroplasto, citosol, mitocôndrias, núcleo e membrana. Contudo, a maioria dos estudos sobre Trx plastidial têm sido focadas na sua função cloroplástica, mas também em várias proteínas Trx, tais como Trxy1 (COLLIN et al., 2004), Trxf (de DIOS BARAJAS-LOPEZ et al., 2007). NTRC, e APR são expressos em tecidos que não sejam verde, incluindo as raízes e sementes, enquanto que a sua implicação em germinação de sementes também foi reportado para os cereais (LI et al., 2009).

Renard et al. (2011), descreveram *tiorredoxinas (TRX) H*, como pequenas redutases dissulfureto e redutases NADP-tiorredoxina (NTR) acumuladas em sementes de diferentes espécies de plantas e que desempenham funções importantes na fisiologia de sementes. Estes autores observaram doze isoformas *Trx H* identificadas em *Mendicago truncatula* que pertencem aos grupos anteriormente descritos: *H1* a *H3* (grupo I), *H4* para *H7* (grupo II), e *H8* para *H12* (grupo III). Além disso, *TRX H1*, *H2* e *H6* foram encontrados presentes em sementes secas e na germinação. *TRXs H1* e em menor grau *H2* são abundantes em eixos embrionários e cotilédones, enquanto *Trx H6* está principalmente presente nos cotilédones. Assim, sementes de *M. truncatula* contêm isoformas distintas de *Trx H* que diferem na distribuição espacial e propriedades cinéticas, sugerindo que eles desempenham papéis diferentes.

A NADP-thioredoxin (NTR) do tipo A/B e *TRXs H* acumulam-se a um nível elevado em sementes de trigo, cevada, ervilha e algumas leguminosas

como soja (LOZANO et al., 1996; GAUTIER et al., 1998; SERRATO et al., 2001, 2002; MAEDA et al., 2003; MARX et al., 2003; MONTRICHARD et al., 2003; SERRATO e CEJUDO, 2003; CAZALIS et al., 2006; ALKHALFIOUI et al., 2007a) e desempenham um papel importante na fisiologia de sementes. As isoformas *Trx H* permitem promover a ativação de α -amilase, pululanase e proteases em conjunto com a redução de proteínas de armazenamento, resultando na mobilização das reservas de hidratos de carbono e proteínas que sustentam a germinação das sementes (KOBREHEL et al., 1991, 1992; JIAO et al., 1992, 1993; WONG et al., 1995; BESSE et al., 1996; LOZANO et al., 1996; YANO et al., 2001a).

Um envolvimento de *TRXs H* na acumulação de reservas e estrutura de proteína de armazenamento durante o desenvolvimento da semente, foi proposto por Serrato e Cejudo (2003); Guo et al (2007). Experimentos com grão transgênico confirmaram que as *Trx* foram altamente expressas no endosperma de cevada (*Hordeum vulgare*) acelerando a germinação, que acompanhou a libertação de enzimas de hidrólise de amido, e a redução de proteínas de armazenamento (CHO et al., 1999; WONG et al., 2002). Por outro lado, as sementes de trigo transgênico (*Triticum aestivum*), nas quais foram suprimidas a expressão *Trx* mostrando um atraso na germinação (GUO et al., 2007; LI et al., 2009). Em ervilha, a *TRXs* foram encontrada como constituintes em sementes, acumuladas nos eixos embrionários, cotilédones, raiz e folhas (TRAVERSO et al., 2007).

TRXs também foram encontradas nas sementes secas e germinadas de *Mendicago truncatula*, com *Mth2* presente no eixo embrionário e cotilédones e provavelmente é sintetizado em raízes (RENARD et al., 2011). Assim, as *TRXs* estão presentes em diversas espécies e dependendo do local em que se encontram podem exercer diferentes funções; em *A. crassiflora*, foi observada no embrião, assim como nas espécies de trigo, cevada, tomate, soja e *M. truncatula*, com função semelhante, provavelmente na redução de proteínas armazenadas, e na mobilização de reservas auxiliando, assim, no crescimento do embrião e futuramente na germinação.

Outro grupo expresso durante a superação da dormência morfológica de *A. crassiflora* são os da *Metallothionein* em dois diferentes níveis de expressão (4.646,4 e 1.480,9), que fazem parte de uma série de outras famílias de proteínas envolvidas em diversas respostas ao estresse (Figura 15). No entanto, essas famílias metalotioneínas (MTs), composta de proteínas citosólicas, se destaca por ser envolvida na homeostase, tanto de metal essencial e a uma variedade de respostas de

estresse que não se limitam a íons de metais. Os MTs são proteínas de baixo peso molecular (<10 000 Da), cujas estruturas primárias são ricas em CC e altamente conservadas, CXC e CXXC, que conferem uma capacidade notável para ligar um número significativo de íons de mono ou de metais bivalentes, em particular de Cu (I), Zn (II) e de Cd (II), dotando-MT, com a capacidade para participar na homeostase metal essencial e (tóxico) destoxificação de metais (LESZCZYSZYN et al., 2013).

Apesar da MT serem, originalmente, identificadas em animais pela sua capacidade para proteger contra a toxicidade do cádmio, o seu papel em plantas ainda, esta a ser determinado (GRENNAN, 2011). MT têm sido relatados por desempenhar um papel em outros processos celulares, incluindo a regulação do crescimento celular e a proliferação, reparação de danos do DNA e a eliminação de espécies reativas de oxigénio-ROS (CHERIAN e KANG, 2006), estresse ao frio durante a germinação (QUEVAL et al., 2007) e com o papel de doador de zinco também encontrado para várias metaloproteínas (CHERIAN e KANG, 2006).

Zhu et al. (2009) observaram que a MT2 implica tolerância a ROS, em que os dois indutores conhecidos em *Arabidopsis thaliana* de ROS, foram expostos a estresse ao frio e peróxido de hidrogénio (H₂O₂), o que aumentou a expressão de *MT2a*. A inserção do mutante *mt2a* T-DNA, mostraram-se sensíveis ao estresse frio durante a germinação, com uma maior produção de H₂O₂ em relação ao tipo selvagem. A expressão de MT2a é aumentada após a exposição ao frio no mutante catalase *cat2*, o que aumentou os níveis de H₂O₂, quando cultivada sob condições de ambiente (QUEVAL et al., 2007). Reciprocamente, o mutante *mt2a* aumentou a expressão *CAT2*, levando os autores a hipótese de que estas duas proteínas possam ser complementares uma a outra, em processos antioxidantes em *Arabidopsis*.

Blindauer e Schmid (2010) afirmam que embora a importância das MTs durante todo o ciclo de vida de uma planta tenha sido demonstrado, os papéis ou funções não são claramente entendidos. A grande diversidade nas regiões de ligação de metal da planta MTs sugere que eles têm a capacidade de se ligar a uma maior gama de metais do que os animais e, conseqüentemente apresentar uma maior diversidade de funções (GRENNAN, 2011).

Leszczyszyn et al. (2013) relatam que a expressão de genes MT Tipo 2, com base na literatura disponível parece ser, predominantemente, e aproximadamente iguais, relatada em ambas as folhas e raízes (ocorrem em pelo menos 54 e 50% dos perfis, respectivamente) de acordo com Moriguchi et al. (1998), Liu et al.

(2002), Ledger e Gardner (1994) e Waters et al. (2005), este gene se encontra-se também na parte aérea, no desenvolvimento de sementes e no início desenvolvimento dos frutos de *Citrus reticulata* (Satsuma), *Musa acuminata* (banana), *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* (kiwi) e *Vitis vinífera* cv. Shiraz (uva).

A expressão parcial e temporal de transcritos de MTs foram observadas nas seguintes espécies: *Arabidopsis thaliana*, na fase de desenvolvimento do embrião até a fase de cotilédones verdes (ZHAU e GOLDSBROUGH, 1995; GUO et al., 2003; REN et al., 2012); *Glycine max* (soja), apresentando níveis altos de expressão em folhas e baixo em raízes (KAWASHIMA et al., 1991; PAGONI et al., 2012); *Oryza sativa* (arroz) na fase de desenvolvimento de sementes, folhas jovens e maduras, no meio e no final do estágio de desenvolvimento da panícula, em estresse abiótico pela seca e salino (NaCl) em plântulas, e infecção por *M. grisea* (GAUTAM et al., 2012); *Nelumbo nucifera* (lótus ou flor-de-lótus) nas flores, em níveis altos em sementes em desenvolvimento, sendo maior no início da embebição de sementes e germinação (ZHOU et al., 2012); *Quercus suber* (arvore da família do carvalho) em embriões sob estresse por H₂O₂ e Paraquat (MIR et al., 2004).

O surgimento de padrões de expressão temporal e espacial, na ausência de agentes de estresse exógenos, apontam para funções benéficas relativos a homeostase essencial de zinco e cobre (GUO et al., 2003; ROOSENS et al., 2005) e a proteção endógena contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) em condições saudáveis (MIR et al., 2004). Leszczyszyn et al. (2013) afirmam que geralmente MTs podem exercer uma dupla função como antioxidantes, podendo reagir diretamente com espécies reativas de oxigênio, mas também, podem reduzir e permitir a ligação com cobre e, portanto, evitar a geração de radicais hidroxila.

Assim, o nível de expressão das MTs dependem das condições avaliadas e das diferentes partes da planta. Contudo, em sementes, se demonstram expressão, tanto, durante a embriogênese como durante a germinação. Em sementes de *A. crassiflora*, as MTs, provavelmente, devem ter a função de proteção frente a oxidação do embrião, e contra o estresse provocado pela alternância de temperatura ou umidade do solo e às condições ácidas típicas dos solos do cerrado.

O transcrito *Glycine-rich RNA binding protein 1* com nível de expressão de 2.927,4, relacionado, principalmente, a resposta ao estresse a frio, foi observado durante a superação da dormência morfológica de *A. crassiflora* (Figura 15). Essas proteínas de ligação ao RNA são proteínas celulares onipresentes que regulam a

expressão do gene, principalmente, ao nível pós-transcricional, que envolvem splicing de pré-mRNA, transporte do mRNA para o nucleo-citoplasmático, estabilidade e tradução do mRNA. As proteínas de ligação a RNA que abrigam RRM (RNA-recognition motif) na região N-terminal tem uma região rica em glicina no C-terminal, e são referidos como proteínas de ligação ao RNA rico em glicina - GRPs (KIM et al., 2010).

Em plantas as GRPs são encontradas de acordo com Carpenter et al., 1994; Ferullo et al., 1997; Moriguchi et al., 1997; Horvath e Olson, 1998; Aneeta et al., 2002; Stephen et al., 2003; Nomata et al., 2004; Shinozuka et al., 2006, nas espécies: *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Medicago sativa* (alfafa), *Euphorbia esula* L. (nativa da Europa e Ásia), *Sorghum bicolor* (sorgo), *Prunus avium* (cereja selvagem), *Physcomitrella patens* (musgo) e *Lolium mutiforum* (azavén), são relacionadas com um aumento na expressão de genes de GRP sob baixas temperaturas, reforçando a hipótese de que GRP podem estar envolvida nas respostas das plantas a condições de estresse frio.

São relatados que três AtGRPs das plantas transgênicas AtGRP2, AtGRP4 e AtGRP7, de oito membros da família AtGRP em *Arabidopsis*, têm diferentes impactos sobre a germinação das sementes, o crescimento das mudas e a tolerância ao estresse de plantas *Arabidopsis* sob diversas condições de estresse abióticos, tais como salinidade, desidratação e estress a frio (KWAK et al., 2005; KIM et al., 2007a , 2008).

Para Mangeon et al. (2010) o mecanismo molecular pelo qual os GRPs conferem tolerância ao frio em plantas continua, a ser elucidado, pois acredita-se que as GRPs estão envolvidas na regulação do gene de ação pós-transcricional, incluindo o transporte de mRNA nucleo-citoplasmático, estabilidade do mRNA e tradução, parece provável que as GRPs executam uma função nestes processos celulares e desempenham papéis centrais nas respostas das plantas ao estresse pelo frio. Novos estudos devem ser direcionados para a caracterização das interações RNA GRP-alvo e da regulamentação GRP-mediada do metabolismo de RNA, que é um passo indispensável para a formulação de uma visão mais abrangente das funções celulares dos GRPs, em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas sob condições de estresse.

Contudo, a literatura relata trabalhos com plântulas ou plantas relacionando as GRPs com controle e tempo do florescimento, número de estames reduzido, desenvolvimento embrionário anormal, perturbação dos processos de

alongamento celular, constituinte da parede celular, tolerância ao frio e congelamento principalmente em *Arabidopsis*. Devido a diversidade em termos de estrutura, padrão de expressão, modulação e a localização subcelular de GRPs nas plantas, tornaM muito forte a indicação de que estas proteínas executam funções muito distintas nas plantas (MANGEON et al., 2010; KWAK et al., 2005; KIM et al., 2007a, 2008).

Entretanto, em sementes poucos trabalhos são relacionados e focados principalmente na tolerância a estresse abiótico induzido. As alternâncias de temperatura no solo nas condições naturais e climáticas do cerrado podem ser um sinal para a ocorrência da expressão das GRPs durante a superação de dormência morfológica nas sementes de *A. crassiflora*, como já foi verificado em *Arabidopsis*, e que pode se relacionar também ao desenvolvimento embrionário e alongamento celular.

O transcrito *Aluminum induced with YGL and LRDR motifs* com valor de expressão 1.450,9 (Figura 15) em *A. crassiflora*, classificado na categoria funcional de resposta ao estresse, anotado também em *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum*, inferida a partir de sequencia ou semelhança estrutural como componente do citoplasma e membrana plasmatica, porém sem função especificada na literatura (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=DetailsSearch&term=AT5G19140>, acesso em 27/11/2013; <http://solcyc.solgenomics.net/LYCO/NEW-IMAGE?type=ENZYME-IN-RXN-DISPLAY&object=SOLYC06G054370.1-MONOMER>, acesso em 27/11/2013).

Durante a superação da dormência morfológica de *A. crassiflora* foi observada a expressão de Cu-Zn superoxidase dismutase (995,5) que fazem parte de um grupo de enzimas antioxidantes (Figura 15). Em plantas estudos relacionados a função, nível de expressão e homologia da Cu-Zn superoxidase dismutase tem sido descrito em *Arabidopsis thaliana*, tomate (*Solanum lycopersicum*), ervilha (*Pisum sativum*), soja (*Glycine max*), milho (*Zea mays*), batata doce (*Ipomoea batatas*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*). Contudo, em sementes, os trabalhos são voltados para a transgenia para subsidiar tolerância a estresse ambiental (hídrico, salino, temperaturas baixas, congelamento e seca), principalmente, com sementes de tabaco.

Quando os tecidos das plantas são submetidos a uma secagem, ocorre um aumento da permeabilidade da membrana, resultando em perdas das suas funções e perturbações no metabolismo (BEWLEY, 1986; CROWE et al., 1992; VERTUCCI e FARRANT, 1995; LEPRINCE et al., 1999). Nesses distúrbios

metabólicos na secagem, as sementes são acompanhadas por um acúmulo de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS incluem superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH), produzidos por todos os organismos vivos durante processos metabólicos normais, como subprodutos ou sinal transdutores. Além disso, ROS podem causar oxidação da membrana celular e destruir a sua função. Algumas macro-moléculas biológicas, tais como clorofila, proteínas e DNA, também, são oxidados e podem levar à morte das plantas em condições de estresse.

Uma pequena alteração no estado homeostático dos níveis de ROS intracelulares sinaliza a célula para modular o seu metabolismo, expressão gênica e modificações pós-translacionais das proteínas (FINKELE e HOLBROOK, 2000; KANNAN e JAIN, 2000; HALLIWELL e GUTTRIDGE, 2002). Portanto, a capacidade das sementes para suportar a dessecação pode ser positivada com a sua capacidade para captar ROS para evitar a peroxidação lipídica da membrana e a desnaturação das proteínas durante dessecação (HENDRY et al., 1992; LEPRINCE et al., 1993; VERTUCCI e FARRANT, 1995).

Lee et al. (2010) relatam enzimas antioxidantes importantes, como a catalase, superóxido dismutase (SODs), peroxidases e enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, contudo as SODs (EC 1.15.1.1) tem o papel de catalisar a dismutação de dois radicais superóxido (O_2^-) e água em, H_2O_2 e O_2 . Três genes SOD são distinguidos por suas localizações e íons metálicos catalíticos covalentemente ligados: 1) SOD Manganês tem Mn (III) no sítio ativo e está localizada na mitocôndria (Zelko et al., 2002); 2) Ferro SOD tem Fe (III) no local ativo e pode ser encontrada nos cloroplastos e 3) CuZnSOD tem Cu (II) além de Zn (II) no local ativo e encontra-se no citossol e nos plastídios.

CuZnSOD e APX (Ascorbate peroxidase) são a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo em plastídios. Diversos autores descrevem os efeitos sinérgicos da expressão simultânea de enzimas ROS - eliminadoras de tolerância ao estresse (AONO et al., 1995; PAYTON et al., 2001; KWON et al., 2002; LEE et al., 2010). Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) transgênicas com expressão dos genes CuZnSOD e APX (plantas CA), exibiram uma maior tolerância ao estresse oxidativo induzido por metilviologênio do que as plantas não transgênicas (plantas NT)

(KWON et al., 2002). Lee et al. (2010), usando sementes de plantas NT e CA, avaliaram o efeito sobre a germinação e super expressão simultânea de CuZn -SOD e APX, nas sementes durante o armazenamento prolongado e condições adversas de germinação, demonstraram que a superexpressão de ambos, CuZnSOD e APX, nos plastídios melhorou a longevidade das sementes e as taxas de germinação sob condições ambientais desfavoráveis.

Estresse osmótico, sal e baixas temperaturas são estresses ambientais comuns que afetam negativamente a germinação das semente e crescimento da planta. Na natureza, as sementes encontram uma combinação destas tensões ambientais, que têm efeito muito mais prejudicial sobre a germinação do que as tensões individuais. Cada estresse ambiental reduz a germinação das sementes, devido ao aumento da produção de ROS (BAILLY, 2004). Combinações de estresse osmótico, o sal, o congelamento e as baixas temperaturas são acompanhados pela formação de ROS, diminuindo assim, significativamente a germinação das sementes (HOLMBERG e BULOW, 1998; DAT et al., 2000).

As sementes de *A. crassiflora* sobrevivem às condições de estresse característico do bioma Cerrado, em que ocorrem variações de temperatura, estresse pela seca e solos ácidos (pH de 4,0 a 5,0; altos níveis de Al^{+3} , Fe e Mn), tóxico para maioria das plantas agrícolas, devido principalmente, a baixa taxa da capacidade de troca catiônica, soma de bases e alta saturação por Al^{+3} , que caracterizam os solos distróficos impróprios para a agricultura. A combinação destes fatores ambientais justifica a expressão da *Cu Zn superoxidase dismutase*. Bailly (2004) afirma que as ROS são as principais moléculas responsáveis pela redução da longevidade das sementes depois de um armazenamento prolongado e, também, pode ser um fator de inibição da germinação durante condições de estresse. Para garantir plantas produtivas em várias condições de estresse, é necessário aumentar a germinação da semente e o estabelecimento de plântulas, fortalecendo o mecanismo antioxidante através de sobre-expressão de enzimas antioxidantes (AHMAD et al., 2013).

As defesas antioxidantes parecem desempenhar um papel importante na germinação. Os dois principais antioxidantes solúveis, em células vegetais, o ascorbato (ASC) e glutathione (GSH), aumentaram durante a germinação de sementes trigo e de *Pinus pinea* (GARA et al., 1997; TOMMASI et al., 2001). Em sementes de cevada dormentes, tratadas com H_2O_2 , aumentaram a atividade da catalase (CAT) e glutathione redutase (GR) após 8 e 24h de embebição, respectivamente (BAHIN

et al., 2011). Também foi observado aumento de GR e CAT, germinação de sementes de girassol, antes da protrusão radicular, e esta resposta foi paralela à diminuição nos níveis de conteúdos da H_2O_2 e de peroxidação lipídica (BAILLY, 2004). Um aumento semelhante na atividade de CAT foi descrita durante a germinação de outros sementes, tais como o milho, soja, *Arabidopsis*, e milho doce (PUNTARULO et al., 1991; GALLARDO et al., 2001; POSMYK et al., 2001; CHIU et al., 2002).

Aumentos de superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e GR foram descritos por vários autores (PUNTARULO et al., 1991; TOMMASI et al., 2001; LEE et al., 2010; LEE et al., 2013; DIAZ-VIVANCOS et al., 2013), revelando que ROS podem induzir a atividades enzimáticas nos sistemas de eliminação de ROS durante a embebição das sementes e pós-embebição, um processo que é crucial para a restauração do metabolismo durante a germinação.

No entanto, a maioria desses estudos não foi realizada a partir da germinação de sementes para a fase de plântula (DIAZ-VIVANCOS et al., 2013). Recentemente, o H_2O_2 , na formação de raízes laterais induzidas, foi descrita em plântulas de arroz (CHEN et al., 2013). Barba-Espín et al. (2010) avaliaram o efeito de H_2O_2 na iniciação no metabolismo antioxidante em plântulas de ervilha (até 48h pós-embebição) e correlacionou alterações no crescimento de mudas com as mudanças nos níveis de enzimas antioxidantes. Além disso, os autores observaram que H_2O_2 , na embebição, aumentou a atividades das APX, reductase monodehydroascorbato (MDHAR), POX e ascorbato oxidase (AAO), em mudas de ervilha após 48 h de pós-embebição. O aumento na atividade da APX foi acompanhada pela indução de mRNAs, correspondentes a citosólica APX (cyt APX) em estroma APX (r APX), o que sugere que o H_2O_2 pode estar envolvido na estimulação da atividade APX em plântulas de ervilha, aumentando expressão da APX.

O H_2O_2 na embebição de sementes de ervilha, também, afetou o conteúdo de anti-oxidantes não enzimáticos. Deste modo, uma acumulação de ascorbato oxidado (DHA), bem como um decréscimo na glutathione reduzida tem sido relatada em plântulas de ervilha (BARBA-ESPÍN et al., 2010). Em alguns estudos tem sido relatada a interação entre ROS e vias de sinalização hormonais em processos de desenvolvimento controlados em plantas (MILLER et al., 2008; KWAK et al., 2006). No entanto, a existência de receptores intracelulares das ROS, na sinalização da hormônios, não foi, ainda demonstrada (MORI et al., 2009). O peróxido de hidrogênio, além de provocar alterações no metabolismo antioxidante, também pode

modular o metabolismo de hormônios como o ABA, GAs, citocinina zeatina riboside (ZR- cytokinin zeatin riboside), ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA), quer através da redução da sua síntese ou por aumento do seu catabolismo (BARBA-ESPÍN et al., 2010, 2011, BAHIN et al., 2011).

Os mecanismos moleculares pelos quais a germinação de sementes é regulada por ABA e GAs parecem ser influenciadas pela sinalização ROS. A interação ROS/ABA tem sido estudada, principalmente em células guarda, em que ROS são considerados segundos mensageiros na via de transdução de ABA (WANG e SONG, 2008). É bem reconhecido que o ABA inibe a germinação das sementes e induz a dormência das sementes (FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER, 2006).

Segundo Wang et al. (1998) e Barba-Espín et al. (2010) a estimulação com H_2O_2 , para germinação de sementes, foi acompanhada por uma redução nos níveis de ABA em cevada e ervilha. Além disso, H_2O_2 atua na ativação de *ABI1* e *ABI2*, proteína fosfatases 2C (PP2C), duas enzimas envolvidas na sinalização ABA (MEINHARD e GRILL, 2001; MEINHARD et al., 2002).

Estudos *cross-talk* entre ROS e hormônios vegetais durante a germinação de sementes e no crescimento inicial da plântula (BARBA-ESPÍN et al. 2010, 2011), relatam-se com a diminuição drástica do conteúdo de ABA em mudas de ervilha quando as sementes foram embebidas com H_2O_2 , enquanto que apenas foi observado um ligeiro efeito nos níveis de ABA em sementes de ervilha. No entanto, a presença de ABA, durante os processos de embebição e pós-embebição produziu um aumento de duas vezes no conteúdo de ABA em plântulas de ervilha. O efeito descrito de H_2O_2 , na diminuição do conteúdo de ABA, parece ser importante para a estimulação do crescimento das plântulas, pois a adição de ABA superou o efeito positivo de H_2O_2 para o crescimento de plântulas de ervilha. Além disso, a embebição de sementes de ervilha na presença de 10 μ M de ABA, produziu uma diminuição no nível endógeno de H_2O_2 em plântulas de ervilha em 72h pós-embebição. As diferenças na quantidade de ABA, observadas em plântulas de ervilha e em sementes de ervilha inteiras, indicaram que o H_2O_2 pode atuar direta ou indiretamente, por dificultar o transporte ABA de cotilédones para o embrião e promover a germinação de sementes (BARBA-ESPÍN et al., 2012; DIAZ-VIVANCOS et al., 2013).

Bahin et al. (2011) descreveram que o H_2O_2 pode regular a dormência das sementes através da ativação de sinalização e/ou biossíntese de GA, através do bloqueio da via de sinalização ABA. Esta conclusão enfatizou a importância

de ROS e a relação ABA/GA em dormência das sementes: sinalização ABA é ativado em sementes dormentes, enquanto sinalização GA é reduzida, resultando em dormência. O tratamento com H₂O₂ alterou esta rede, favorecendo sinalização de GA através de uma alteração no equilíbrio do ABA/GA, permitindo a germinação.

Liu et al. (2010) relataram que a H₂O₂ atuam na regulação de GA e ABA, durante a dormência das sementes, agindo em genes envolvidos no metabolismo do ABA e GA. Durante a superação da dormência morfológica de *A. crassiflora* pode ter ocorrido a produção de H₂O₂, devido as condições de estresse no ambiente, que favoreceu a regulação hormonal fazendo que a semente passasse para o processo germinativo.

Foram observados também durante a superação de dormência morfológica a expressão de genes relacionados as funções de síntese de proteína, ciclo celular, hormônios e transcrição (Figura 16).

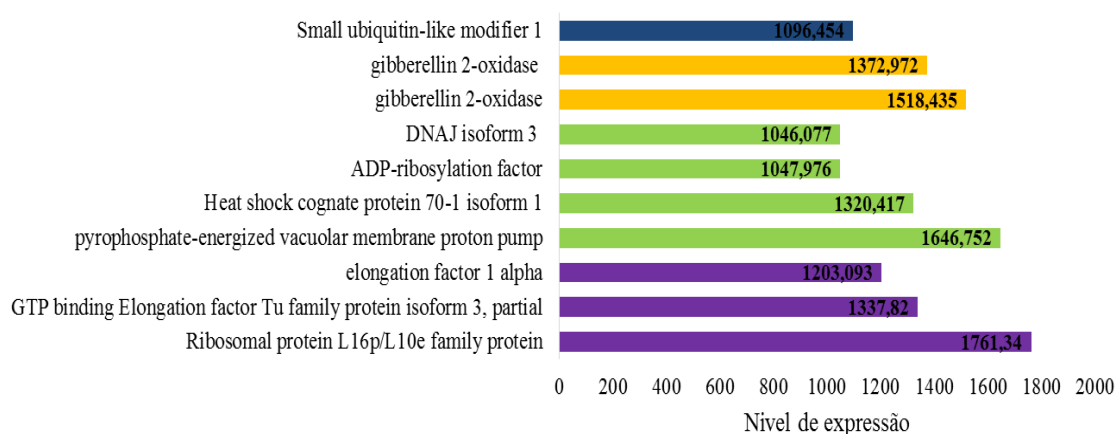


Figura 16. Categorias funcionais: Síntese de proteína (■); Comunicação celular (■); Hormônio (■) e transcrição (■) dos cinquenta transcritos mais expressos durante a superação natural de dormência morfofisiológica de sementes de *A. crassiflora*.

Dentro do grupo funcional de síntese de proteína durante a superação da dormência morfológica de *A. crassiflora*, a expressão da *Ribosomal protein L16p/L10 family protein* (1.761,34), que compreende uma grande família de proteínas ribossomais, ainda, pouco estudadas em sementes, principalmente na interação entre L16/L10 (Figura 16). De acordo com Korobeinikova et al. (2012) as razões para a variedade de proteínas ribossomais, que surgiram há mais de 40 anos atrás, ainda estão

abertas. Algumas são características de todos os domínios da vida (proteínas ribossomais universais), enquanto outras são específicas em bactérias, archaea ou eucariotos. No entanto, a função da maioria de proteínas ribossomais na formação e funcionamento do ribossoma ainda não é muito clara, dados de bioinformática apresentam uma avaliação abrangente do conservadorismo estrutural de proteínas ribossomais de organismos evolutivamente distantes.

Considerando o conhecimento atual sobre os recursos da organização estrutural das proteínas universais e seus contatos intermoleculares, é discutido um possível papel de proteínas individuais e seus elementos estruturais na formação e funcionamento dos ribossomos. O conservadorismo estrutural e funcional da maioria das proteínas, deste grupo, sugere que elas devam estar presentes no ribossoma já nos primeiros estádios da sua evolução (KOROBENIKOVA et al., 2012).

É difícil atribuir uma função especial a atividade ribossômica de translação para uma única proteína ribossomal. Esta dificuldade deve-se a natureza altamente cooperativa das interações entre o ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) e as proteínas e entre as próprias proteínas (STELZEL et al., 2013). A síntese de proteínas é catalisada pelo ribossoma, uma enzima de duas subunidades composta por quatro RNAs ribossomais em *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), 81 proteínas ribossomais (proteínas-r). Genes r-proteína vegetal existem como famílias de múltiplos membros, mas, apenas um r-proteína de cada família é incorporada a qualquer ribossomo, sugerindo que muitos genes r-proteína podem ser funcionalmente redundantes ou desenvolvimento / tecido / estresse específico (DEGENHORDT e BONHAM-SMITH, 2008).

Em eucariotos, os ribossomos citosólicos consistem em grandes e pequenas 60S e 40S subunidades. Genes de proteínas ribossomais em *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) existem como famílias compostas de dois a sete membros, que podem ser, diferencialmente, incorporados ao ribossomo citosólico em situações específicas (SCHMID et al., 2005; BYRNE, 2009; FERREYRA, et al., 2013). Desta forma, a heterogeneidade ribossômica permitiria tradução seletiva de mRNAs específicos em condições celulares particulares (BARAKAT et al., 2001; SZICK-MIRANDA e BAILEY-SERRES, 2001; GIAVALISCO et al., 2005; CARROLL et al., 2008; CARROLL, 2013). Mutantes de *Arabidopsis* em proteínas ribossomais exibem uma grande variedade de fenótipos de desenvolvimento de anormalidades, incluindo radicais letalidade embrionária, sugerindo que os ribossomas, também, possuem

funções específicas que regulam a expressão de genes de desenvolvimento (VAN LIJSEBETTENS et al., 1994; DEGENHARDT e BONHAM-SMITH, 2008; BYRNE, 2009; HORIGUCHI et al., 2011, 2012; SZAKONYI e BYRNE, 2011).

Rosado et al. (2012) demonstraram que as proteínas ribossomais podem controlar programas de desenvolvimento mediada por auxina, pela regulação da tradução de fatores de resposta de auxina. Além disso, a caracterização de um único, duplo, e, em certos casos, os mutantes triplos, bem como complementação por genes parálogos demonstraram completa, parcial, e sem qualquer redundância entre os membros de famílias de proteínas ribossomais (BRIGGS et al., 2006; GUO e CHEN, 2008; GUO et al., 2011; HORIGUCHI et al., 2011; STIRNBERG et al., 2012).

Willians e Sussex (1995) relatam que raízes laterais podem ser induzidas de forma sincronizada, em *Arabidopsis*, por um breve tratamento de auxina. Um acontecimento precoce na evolução de um primórdio de raiz lateral é a acumulação de mRNA que codificam as proteínas ribossomais. Hibridizações *in situ* mostraram que, mRNA codificando uma proteína ribossômica L16, acumula em todos os tecidos de proliferação rápida, incluindo parte aérea e de raiz, meristemas apicais e primórdios de raízes laterais. Entretanto, a proteína ribossômica L10 (RPL10) são proteínas onipresentes no reino vegetal, e em milho e *Arabidopsis* RPL10s são regulamentadas por tecido específico, mostrando altos níveis de expressão em tecidos com a divisão celular ativa.

Experimentos indicam que RPL10s, em *Arabidopsis*, estão associados com proteínas de transcrição, o que demonstra ser um componente dos ribossomas 80S. Entretanto, os genes RPL10 não são redundantes em participar no desenvolvimento e tradução sob estresse UV-B (FALCONE et al. 2010). A associação das proteínas ribossomais L16/10 não tem sido, ainda, relatada na literatura, até o presente momento, sendo avaliado seu efeito ou expressão isolados.

A expressão da *GTP binding Elongation factor Tu Family* (1337,8) e *elongation factor 1 alfa* (1203,0), classificadas no grupo de síntese de proteína (Figura 16), são fatores de alongamento que pertencem a uma família de proteínas que promovem a ligação dependente de *GTP aminoacil tRNA* para o local A dos ribossomos, durante a biossíntese de proteínas, e catalisam a translocação da cadeia da proteína sintetizada a partir de A para o sítio P. No EF-1-alfa, uma região específica [PMID: 3126836] foi mostrada por ser envolvida em uma mudança conformacional

mediada pela hidrólise de GTP em GDP. Foi também, observada nas espécies *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* subsp. *japonica* (INTERPRO, 2013).

A ligação GTP possui as funções relatadas relacionadas a atividade de fator de tradução alongamento, ligação de íons cobalto, ligação de íons de zinco, ligação de ATP; e são envolvidos na resposta ao íon cádmio; podendo ser localizada na mitocôndria e parede celular. Possui expressão observada em 27 estruturas de planta e expressa também durante 13 estágios de crescimento (MINPS, 2013).

Pesquisas relacionadas com fatores de alongação estão voltadas, principalmente, para as monocotiledôneas (milho, trigo, arroz). Em dicotiledôneas trabalhos são relatados com *arabidopsis* e tabaco, sendo relacionadas com mutação e/ou desenvolvimento inicial de plantas. Em sementes, poucos trabalhos são descritos sobre a função desse transcrito isoladamente. Sacchini et al. (2005) relatam que a etapa de alongamento da síntese de proteínas, em eucariotas, é realizada por duas enzimas solúveis diferentes de elongation fator (EF): EF-1 e EF-2. Estudos que visam identificar o mecanismo bioquímico e os aspectos regulatórios desta etapa tem dirigido a atenção para EF-1, devido as suas características moleculares. Em particular, duas formas deste fator foram purificadas de gérmen de sementes de trigo secas: uma forma pesada, EF-1_H, e um forma leve, a EF-1_L. EF-1_H, é uma agregação de três diferentes peptídios (A, B e C), enquanto que a EF-1_L, é formado por um único, que corresponde ao péptido A de EF-1_H.

A conversão de EF-1_H a EF-1_L foi completa em 40h de germinação, quando 66% de sementes de trigo (*Triticum uestivum* cv. Marimp 8) tinham concluído o processo de germinação com o protrusão da radícula e coleóptilo. Este fato sugere que a conversão da EF-1_H a EF-1_L, durante a germinação, é um fenomeno precoce durante o início do processo da germinação de sementes, ligadas a reativação do mecanismo de síntese protéica. Galleie et al. (1995) observaram durante a germinação de trigo, que altos níveis de fatores de alongamento (EF) 1 alfa e 2 estão presentes em tecidos conhecidos por participar ativamente na tradução.

A indução de um fator de alongação da tradução (EF-Tu), em ervilha após tratamento com baixa temperatura e aplicação de ácido salicílico, uma das mais importantes moléculas sinalizadoras de defesa contra doenças em plantas, foi demonstrada previamente (SINGH et al., 2004). Silva (2008) encontrou o fator de alongação da tradução EF1- α superexpressos em um genótipo de soja suscetível e outro

resistente a ferrugem asiática. São escassas as informações da literatura que esclarecem o papel de fatores de alongação da tradução nas respostas de defesa de plantas.

Transcritos com a função de comunicação celular, também, foram observados durante a superação da dormência morfológica de *A. crassiflora*; o mais expresso foi o *Pyrophosphate energized vacuolar membrane proton pump* (valor de expressão: 1646,7, Figura 16). As proteínas de membrana são de fundamental importância para manter o funcionamento da célula e a homeostase iônica dos seres vivos. Na membrana plasmática das plantas, as mais importantes bombas são as H^+ e Ca^{2+} -ATPases que bombeiam o íon para o meio exterior ou apoplasto. Há uma diversidade de proteínas que ajudam a manter o gradiente iônico entre o meio intra e extracelular, entre as quais, a H^+ -ATPase e a H^+ -pirofosfatase (H^+ -PPase) tem um importante destaque. A H^+ -PPase está presente na membrana do vacúolo das células das plantas e sua principal função é transportar H^+ para o lúmen, criando uma força eletromotriz que impulsiona o transporte secundário de íons e compostos orgânicos. Esta enzima é diferencialmente regulada, em condições de estresse, conferindo uma maior tolerância das plantas aos fatores bióticos e abióticos, sendo que o gene que codifica a H^+ -PPase quando super-expressado, estimula o crescimento vegetal via um maior desenvolvimento radicular e, conseqüentemente, maior absorção de água e nutrientes (SIQUEIRA et al., 2008).

O tonoplasto regula o tráfego de íons e metabólitos entre o citosol e o vacúolo, assim como a membrana plasmática regula a entrada de substâncias na célula. A H^+ -ATPase vacuolar (também chamada de V-ATPase) difere tanto estruturalmente, como funcionalmente da H^+ -ATPase da membrana plasmática. A hidrólise do ATP pela ATPase vacuolar não envolve a formação de um intermediário fosforilado (SIQUEIRA et al., 2008). As ATPases vacuolares pertencem a uma classe geral de ATPases que estão presentes no sistema de endomembranas de todos os eucarióticos. São grandes complexos enzimáticos, de aproximadamente 750 kDa, formados por diferentes subunidades e organizadas no complexo periférico catalítico, V1 e no complexo de canal integrado a membrana, V0.

Devido as importantes funções desempenhadas pelo vacúolo tais como: armazenamento de várias substâncias, regulação do pH e homeostase iônica, defesa contra patógenos microbianos e herbívoros, presença de pigmentos, hidrólise e reciclagem de componentes celulares, homeostase de metais pesados e detoxificação, é esperado que a atividade da V-ATPase, que é a maior bomba de H^+ do tonoplasto, seja

modulada para acompanhar as mudanças ambientais e metabólicas. Apesar da importância da enzima para energização vacuolar, estudos detalhados nas respostas da V-ATPase ao nível de transcrito de proteína e de atividade foram encontrados em condições de estresse salino e em menor extensão em condições de baixas temperaturas. Os níveis de mRNA das subunidades da V-ATPase e a quantidade dessa proteína são alterados em resposta aos estresses ambientais (SOBREIRA, 2003; 2009).

Maeshima (1996) relata a presença de H^+ -PPase em membranas vacuolares de tecidos em crescimento, de *Vigna radiata*, comparadas com partes maduras do hipocótilo. Assim, as H^+ -PPases de células em crescimento mantêm a força osmótica, suficiente para compensar o efeito da diluição causado pelo influxo, de água. Contudo, o alto nível de H^+ -PPase, nestas células, esteja relacionado à acidificação dos vacúolos, em expansão, e ao sistema de transporte secundário que utiliza a força próton-motriz. Esta enzima é considerada a principal bomba de prótons do vacúolo de membranas, na maioria dos tecidos jovens. Em contraste, o nível da H^+ -PPase decresce durante o desenvolvimento tecidual e o nível de V-ATPase permanece constante, durante o crescimento e maturação. Assim, a V-ATPase se torna a maior bomba de prótons de membranas vacuolares em tecidos maduros.

Levando-se em conta as diferentes funções da V-ATPase no metabolismo celular, pode-se propor a hipótese que algumas isoformas correspondem a genes de manutenção, enquanto que outras são expressas dentro de condições de estresses ambientais. O estudo da expressão dos genes das bombas de prótons (VuVHA-A, VuVHA-E, VuHVP) de folhas e de raízes de plântulas de *Vigna unguiculata* (feijão de corda), diferencialmente regulada em função do estresse aplicado (salino e osmótico) e dos tempos de exposição aos referidos estresses (6, 12 e 24 horas), revelou que o gene VuHVP parece ter papel crucial em resposta ao estresse salino e os genes VuVHA-A e VuVHA-E em resposta ao estresse osmótico (SOBREIRA, 2009). Contudo, a literatura relata poucos trabalhos voltados para a ação da *Pyrophosphate energized vacuolar membrane proton pump* durante a germinação de sementes de dicotiledôneas, havendo uma forte associação a resposta à estresse biótico e abiótico que ainda precisam ser avaliados (SOBREIRA, 2003; 2009).

O segundo transcrito mais expresso relacionado com a comunicação celular foi a *Heat shock cognate protein 70-1 isorform 1*, com valor de expressão de 1320,41 (Figura 16). Denominadas de proteínas de choque térmico de 70 kDa, é uma família altamente conservadas e constitutivamente expressa (Hsc70s) em

vários organismos e em diferentes compartimentos celulares dentro do mesmo organismo (GUY e LI, 1998). Em plantas, a Hsp70s são codificadas por uma família de múltiplos genes. Estas proteínas multifuncionais estão envolvidas no tráfego de proteína, dobrando e montando complexos de proteínas, cuja família Hsc70/Hsp70 consiste de membros situados no plasto, mitocôndria, citosol e retículo endoplasmático.

Os Hsc70s são uma família multi-genes com funções importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como em respostas das plantas ao estresse ambiental, envolvidos, também, numa variedade de processos celulares, incluindo o enrolamento de proteínas, o transporte de proteínas através da membrana, a modulação da atividade da proteína, a regulação da degradação de proteína, e a prevenção da agregação de proteínas irreversíveis (SU e LI, 2008).

Funções da Hsp70s, na maioria dos compartimentos das plantas, têm sido estudada extensivamente, demonstrado que em plantas *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) transgênicas, Hsp70-antisense citosólicas reduziram termotolerância (LEE e SCHÖFFL, 1996). A superexpressão cytosolic Hsc70-1 em *Arabidopsis* resultou na tolerância ao calor em algumas condições (SUNG e GUY, 2003). A superexpressão de Hsp70 do retículo endoplasmático (ER), em tabaco (*Nicotiana tabacum*), aliviou o estresse no ER na seca (LEBORGNE-CASTEL et al., 1999), mas não conferiu tolerância ao aquecimento (ALVIM et al., 2001). Em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), ER Bip e em matriz mitocondrial a função Hsp70 como precursor de proteína translocação molecular nessas organelas, através de ciclos repetidos de hidrólise de ATP (PILON E SCHEKMAN, 1999; STRUB et al., 2000), sendo provável que Hsp70 ER Bip e mitocondrial em planta também têm uma função similar.

Um grupo de proteínas citosólicas VrHsc70, acumulado em sementes desidratadas durante sua maturação, manteve-se durante o início da germinação de mungbean (leguminosa do sudoeste da Asia) e, também, um alto nível de Hsc70s citosólica no eixo embrionário, mostrando a necessidade de Hsc70s para a divisão celular rápida e expansão, semelhante em ervilha (PsHsp71.2) e Hsp70 transcrição citosólica de *Arabidopsis* (DEROCHER VIERLING, 1995; SUNG et al., 2001; YI-JIUN et al., 2004).

Embora, as proteínas Hsc70 funcionem muitas vezes também como acompanhantes, a sua especificidade de ligação não é totalmente compreendida, especialmente, diferentes proteínas citosólicas individuais Hsc70 no mesmo organismo

podendo estar envolvidas no atraso da maturação das sementes, tolerância à dessecação, durante o desenvolvimento tardio de semente, em sementes maduras e órgãos vegetativos (YI-JIUN et al., 2004).

Yi-Jiun et al. (2004) relatam, ainda, 43 sequências de aminoácidos deduzidas a partir de suas Hsc70/Hsp70 cDNAs completos, obtidos a partir da base de dados do NCBI. O número de acesso é listado depois de cada gene Hsc/Hsp70 em plantas dicotiledoneas: At: *Arabidopsis thaliana*, Bn: *Brassica napus*, Cm: *Cucurbita maxima*, Cs: *Cucumis sativus*, Gm: *Glycine max*, Le: *Lycopersicon esculentum*, Ll: *Lilium longiflorum*, Ph: *Petunia x hybrida*, Ps: *Pisium sativum*, Sm: *Saussurea medusa*, So: *Spinacia oleracea*, Ta: *Triticum aestivum*, Vr: *Vigna radiata*, ZM: *Zea mays*.

As HSP70s são consideradas envolvidas com a chaperonas e no dobramento de proteínas, e podem ser importantes para manter a homeostase celular e biogênese da proteína adequada, durante aclimação ao frio de *Spinacia oleracea* (espinafre). Trabalhos anteriores indicaram que proteínas Hsc70, em espinafre, são ativamente sintetizadas durante condições de aclimação ao frio, e não é expresso durante o choque de calor ou estresse hídrico (ANDERSON, et al., 1994).

Su e Li (2008) avaliando proteínas de choque térmico Hsp70s, essenciais para o desenvolvimento da planta e na termotolerância de germinação de sementes de *Arabidopsis*, e concluíram que as Hsp70s do estroma e plastídio são importantes para termotolerância de sementes em germinação, indicando que a fisiologia plastídio é importante para as sementes suportarem o estresse ao calor. Os plastídios estão envolvidos na assimilação de nitrogênio e nas sínteses de lipídios e muitos hormônios, que são importantes para a germinação das sementes e no crescimento das raízes. Portanto, é razoável ter acompanhantes que protegem as enzimas de biossíntese durante o estresse térmico. O acúmulo de intermediários tóxicos devido a inativação das enzimas pelo calor podem, também, ter contribuído para a inibição do crescimento da raiz observada em *Arabidopsis*.

No período da germinação (superação da dormência morfológica) nos meses de agosto, setembro, outubro, (pico de germinação) novembro e dezembro as condições climáticas do cerrado em geral, são de temperaturas do solo entre 16,7°C a 28°C. A precipitação média mensal apresenta uma grande estacionalidade, concentrando-se nos meses de primavera e verão (outubro a março), que é a estação chuvosa. No período de maio a setembro, os índices pluviométricos

mensais reduzem-se bastante, podendo chegar a zero (junho a agosto inverno seco). Porém, curtos períodos de seca, podem ocorrer em meio a esta estação chuvosa, o que provavelmente “ativou” a maior expressão dos genes da família Hsc70/Hsp70, causado pelo estresse a seca. Neste momento, também, há desenvolvimento do embrião com intensa atividade celular, contribuindo para o crescimento/desenvolvimento do embrião, termotolerância e regulação da resposta ao choque térmico.

O mecanismo geral do tráfego intracelular é pensado para ser semelhante em vários organismos, o que implica que os aspectos fundamentais do tráfego intracelular entre o retículo endoplasmático (ER), e o aparelho de Golgi, vacúolo e membrana de plasma são similares em células de plantas. Nesse contexto a expressão da *ADP-ribosylation factor* foi observada durante a superação de dormência morfológica de *A. crassiflora* (Figura 16). Conhecida como ARFs, constituem uma família altamente conservada, pertencente à superfamília Ras de proteínas ou guanosina trifosfato de guanosina (GTP) e vinculativos triphosphatases (GTPases) (COEMANS et al., 2007). Como todos os membros da superfamília dos Ras, ARFs podem funcionar como interruptores moleculares entre um 'inativo' guanosina difosfato (GDP)-bound e um estado "ativo" ligada a GTP. Fatores de permuta de guanina (GEFs) convertem inativo cytosolic PIB-ARF em ativos, membrana associado GTP-ASEAN e proteínas de ativação GTPase (GAPs) reforma PIB-IRA (KJELDGAARD et al., 1996). ARF1s em plantas são bem conhecidas por desempenhar um papel crítico na formação de transporte vesicular por recrutar proteínas citosólicas do tegumento para os locais de vesícula brotação (KIRCHHAUSEN, 2000).

Os membros destes GTPases pequenas estão presentes em vários organismos eucariotes, incluindo levedura, mamíferos e várias plantas superiores, tais como o *Arabidopsis thaliana* (REGAD et al., 1993), arroz (HIGO et al., 1994), batata (MULLER-SZOPA e RÖBER, 1994), milho (VERWOERT et al., 1995), cenoura (KIYOSUE e SHINOZAKI, 1995) e trigo (KOBAYASHI-UEHARA et al., 2001). A análise de hibridação tem sugerido que várias cópias NbARF1 genes podem estar presentes no genoma na *Nicotiana benthamiana*, indicando que ARF são genes organizados em um pequeno multigene família em plantas (HIGO et al., 1994; KOBAYASHI-UEHARA et al, 2001).

Além ARF GTPases, outra família de GTPases pertence à superfamília Ras de GTPases, as GTPases Rho, para as quais tem sido demonstrado que desempenham um papel-chave na resistência à doença e resposta ao estresse abiótico

em plantas (AGRAWAL et al., 2003; GU et al., 2004). Coemans et al. (2007) concluem que ARF1 é envolvido na sinalização da morte celular, tal como a sua sobre-expressão de célula que provoca morte em *Nicotiana benthamina*. Implicam ainda, um papel para ARF1 na defesa das plantas, como a expressão de NbARF1 e NtARF1 que é induzida com o agente patogênico não hospedeiro do *P. cichorii* e TMV (Tobacco mosaic virus), respectivamente.

Em *Arabidopsis*, ARF-GAPs pertencem a uma família de 15 membros, que é subdividido em quatro classes. A AGD1 codifica a classe I ARF-GAP, que está intimamente relacionada com a dos mamíferos contendo vários domínios AZAP-type ARF-GAPs (VERNOUD et al, 2003; INOUE e RANDAZZO, 2007). Yoo et al. (2008) relataram uma função adicional para a classe I ARF-GAPs, em plantas, na manutenção da direcionalidade do crescimento do pelo da raiz de *Arabidopsis*. A função de AGD1 no crescimento é, provavelmente, específica para pelos da raiz, uma vez que não foram observadas quaisquer defeitos de germinação do pólen ou do crescimento do tubo polínico em mutantes *agd1*.

Em um estudo dos padrões das quatro classes I ARF-GAPs em *Arabidopsis* usando RT-PCR e AGD1 não foi detectada em cotilédones e hipocótilo e muito baixa expressão em raízes e folhas (SIEBURTH et al., 2006). Assim, a baixa abundância de AGD1, provavelmente, reflete sua função em apenas alguns tipos de células, e o fenótipo observado em mutantes *agd1* indicam fortemente que AGD1 pode operar, especificamente, em pêlos radiculares. Em sementes, trabalhos relacionados com a expressão e função da AFRs, são pouco conclusivos, sendo necessário pesquisas para elucidar a relação com a germinação de sementes.

O transcrito menos expresso classificado no ciclo celular foi a *DNAJ isoform 3*, com valor de expressão de 1046,0 (Figura 16). A *DNAJ* foi originalmente, caracterizada a partir de *Escherichia coli* como uma proteína de choque térmico de 41 kDa. Posteriormente, foi demonstrado em ambos os experimentos bioquímicos e genéticos que DnaJ interage diretamente com DnaK e GrpE (SCIDMORE et al., 1993), constituindo uma máquina chaperona molecular (MIERNYK 1997, 1999). Além disso, há evidências de que DnaJ pode atuar independentemente ou com um acompanhante (LAUFEN et al., 1999). DnaJ liga-se ao trifosfato de adenosina (ATP), ligado de forma a DnaK e estimula a hidrólise a adenosina-5'-difosfato de mais fosfato inorgânico (Pi). As proteínas J-domínio do modelo de floração da planta *A. thaliana* compreendem uma família de chaperonas sem

precedentes, em tamanho e complexidade (MIERNYK, 2001). É provável que isto tenha resultado da necessidade de plantas para responder continuamente as diversidades ambientais (NOVER e MIERNYK, 2001).

Proteínas contendo o domínio J são cochaperonas importantes para as proteínas da família Hsp70. O domínio J interage com Hsp70, quando a Hsp70 está ligada a ATP, e estimula a hidrólise de ATP por Hsp70. Proteínas de domínio específico J muitas vezes recrutam Hsp70 para executar funções específicas. Recentemente, foi mostrado que Hsp70s estromais cloroplastos são importantes para a importação de proteínas para os cloroplastos (SHI e THEG, 2010; SU e LI, 2010).

Segundo Chiu et al. (2010) as proteínas da família Hsp70 estão envolvidas em muitos processos celulares, incluindo a dobragem da proteína, translocação de proteína através da membrana e na regulação da degradação da proteína. Proteínas Hsp70 são, frequentemente, recrutados para executar certa função de proteínas, contendo o domínio J especificamente localizado. O cochaperone contendo domínio J específico, que recruta o cloroplasto estromal Hsc70 para a membrana do invólucro mais interno para ajudar na translocação da proteína, foi identificado em ervilha (*Pisum sativum*).

Em sementes podem atuar na formação de embriões zigóticos da planta, ou seja, na formação do zigoto ao fim de dormência da semente (<http://www.nextprot.org/db/term/GO%3A0009790>; <http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF09320/alignment/ncbi>), contudo, não há relatos na literatura, apenas citação (predita) em bancos de dados.

Dentre os cinquenta primeiros transcritos mais expressos durante a superação da dormência morfológica de *A. crassiflora* na classificação hormônio apenas a *Giberellin 2-oxidase* foi transcrita em dois momentos não seguidos com valor de expressão de 1518,4 e 1372,9 (Figura 16). As Giberelinas (GAs) são uma classe de hormônios essenciais, pois controlam uma variedade de processos que envolvem crescimento e desenvolvimento, durante todo o ciclo de vida das plantas. Plantas com defeito na biossíntese de GA mostram fenótipos GA deficiente, tais como: nanismo, folhas pequenas verde-escuras, inibição do crescimento das raízes, floração com defeito, falha no desenvolvimento da antera e da formação do pólen, esterilidade masculina, dormência/ germinação prolongada, produção de sementes reduzida, aumento do aborto de sementes (REI e EVANS, 2003; SAKAMOTO et al., 2004; FROTA e SUN, 2005; TANIMOTO, 2005; WANG e LI, 2005; TAZ e ZEIGER, 2013).

Portanto, é importante para as plantas produzirem e manterem os níveis ótimos de GAs bioativo para assegurar um crescimento e desenvolvimento normais.

O GAs bioativo sintetizado por plantas superiores são GA₁, GA₃, GA₄ e GA₇ (HEDDEN e PHILLIPS, 2000). A maioria dos genes que codificam enzimas que catalisam a biossíntese de GA e catabolismo já foi identificada (GRAEBE, 1987; HEDDEN e PHILLIPS, 2000; OLSZEWSKI et al., 2002; SAKAMOTO et al., 2004; YAMAGUCHI, 2008). A principal via de catabolismo é iniciada por uma reação 2β-hidroxilação catalisada por GA2ox (Figura 17). GA2oxs C 19, identificados em várias espécies de plantas, pode hidroxilar o C-2 do C ativo 19-GAS (GA₁ e GA₄) ou C precursores 19-GA (GA₂₀ e GA₉) para produzir gás biologicamente inativo (GA₈, GA₃₄, GA₂₉, e GA₅₁, respectivamente) (SAKAMOTO et al., 2004). Recentemente, três novos C 20 GA2oxs, incluindo *Arabidopsis thaliana* GA2ox7 e GA2ox8 e espinafre (*Spinacia oleracea*) GA2ox3, foram encontrados para hidroxilar precursores C 20-GA (convertendo GA 12 e GA 53 a GA 110 e GA 97, respectivamente), mas não C 19-GAS (SCHOMBURG et al., 2003; LEE e ZEEVAART, 2005).

O 2β-hidroxilação de precursores C 20-GA para GA 110 e GA 97 torna incapazes de ser convertido para gás ativo e, portanto, diminui os níveis de GA ativos. A classe C 20 GA2oxs contem três motivos de aminoácidos únicas e conservadas que estão ausentes na classe C 19 GA2oxs (LEE e ZEEVAART, 2005).

desenvolvimento das plantas foram impedidos pela sua baixa abundância e variação no tempo e no espaço. O exame de expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese e catabolismo de GA proporciona uma abordagem alternativa para tais estudos (SHUHEN-FANG et al., 2008).

Shuhen-Fang et al. (2008) demonstraram que dois genes da família dos *GA2oxs* de arroz têm funções semelhantes (redução da altura, época de floração retardada, menor crescimento do hipocótilo e raiz e atraso na produção e germinação de sementes) em monocotiledóneas e dicotiledóneas, sendo *GA2ox5* mais potente na inativação de GA que *GA2ox6* em ambos arroz e tabaco transgênico Kim et al. (2005) e Schmid et al. (2005), também observaram em *Arabidopsis* níveis elevados de expressão de genes da biossíntese de GA nas sementes em desenvolvimento. Yamauchi et al. (2007) demonstraram que *GA2ox2* contribui para a supressão de germinação em sementes *Arabidopsis* embebidas no escuro.

Song et al. (2011) verificaram que as enzimas que catalisam os passos mais tardios (*ZmGA20ox*, *ZmGA3ox* e *ZmGA2ox*), também, são codificados por uma família de genes no milho, mas enzima *GA3ox* é susceptível de ser codificada por um único gene. Também observaram que a análise de perfis de expressão exibem transcrições de 15 genes metabólicos GA detectadas durante a germinação de sementes de milho, o que forneceu uma evidência adicional de que o aumento da síntese de GA ativo no embrião é necessário para fatos geradores de germinação. Além disso, foram detectados vários padrões de expressão de genes temporais de genes metabólicos GA, demonstrando a complexidade do mecanismo GA para o regulamento da germinação de sementes de milho.

Devido a complexidade dos fatores envolvidos na biossíntese do GAs e conseqüentemente da família do *GA2oxs*, faz se necessário mais estudos relacionando a germinação e a superação da dormência de sementes. Trabalhos relacionam o desenvolvimento das plantas através de silenciamento ou mutação de plantas para estudos com a família dos *GAsoxs*, principalmente, em arroz, milho e *Arabidopsis*. Contudo, ainda, há eventos a serem elucidados e futuramente, serem correlacionados a outras espécies, tais como as florestais pouco analisadas, devido, sobretudo, a forte interação com o meio ambiente (luz, temperatura, água, salinidade e outros). Possivelmente em *A. crassiflora*, a expressão do *GA2ox* esta relacionada ao crescimento do embrião internamente dentro da semente, já que os GAs são sintetizados

pelo embrião em outras espécies, podendo relacionar, também, com o balanço hormonal e posterior germinação.

Outros transcritos, relacionados com a classificação fisiológica dos hormônios, foram também observados durante a superação de dormência morfológica das sementes de *A. crassiflora*, contudo com expressão bem menor que a dos GAs, são eles: etileno, ácido abscísico e auxina (Tabela 3). Esses hormônios são relacionados ao processo de superação da dormência e início da germinação, além de atuarem também durante o desenvolvimento e crescimento do embrião das sementes.

De acordo com Kucera et al. (2005), o ácido abscísico (ABA) é um regulador positivo da indução de dormência e, provavelmente, também a manutenção, pois é um regulador negativo de germinação. As Giberelinas (GAs) liberam da dormência, promovem a germinação e são contrárias aos efeitos de ABA, já o Etileno na semente promove a germinação e também neutraliza os efeitos de ABA. Xiaodong et al. (2013) relatam que a auxina atua como um gatilho versátil em diversos processos do desenvolvimento e também desempenha um papel crítico na dormência da semente em *Arabidopsis*; a ação da auxina na dormência das sementes requer a via de sinalização ABA (e vice-versa), o que indica que os papéis de auxina e ABA na dormência das sementes são interdependentes.

O último transcrito, dentre os cinquenta, está relacionado com o processo de transcrição a Small ubiquitin-like modifier 1 com nível de expressão de 1.096,45 (Figura 16). A small ubiquitin-like modifier (SUMO) é uma pequena proteína (~ 12 kDa) que ocorre em todos os eucariontes e participa na modificação pós-tradução reversível de proteínas celulares alvo. A estrutura tridimensional de SUMO e ubiquitina (Ub) são sobreponíveis, embora haja muito pouca semelhança nas suas sequências de aminoácidos primários. Em todos os organismos, a conjugação e desconjugação de Ub e SUMO procedem pelas mesmas reações, com o uso de enzimas específicas em cada via. A conjugação, SUMO, nas plantas é uma parte dos controles que regem os processos biológicos importantes, tais como o crescimento, o desenvolvimento, floração (abióticos), as respostas ao estresse ambiental e infecção do patógeno e sinalização pelos hormônios ABA e ácido salicílico. De especial interesse são as observações que os vários estresses abióticos induzem destacando o aumento substancial e reversível em SUMO1/2 conjugados, possivelmente como uma forma de proteger as plantas de mudanças ambientais (PARK e YUN, 2013; MILLER e VIERSTRA, 2011).

Tabela 3. Relação de transcritos classificados como dos hormônios observados dentre os 32.884 transcritos durante a superação natural de dormência morfofisiológica de sementes de *Annona crassiflora* conforme anotação feita através do programa *Blast2Go*.

Hormônio	Transcrito	Valor de expressão	Transcrito	Valor de expressão
Etileno	3312	277,21	6919	51,53
	966	215,56	8450	27,88
	5795	198,72	11558	22,10
	2276	173,6	10308	20,49
	3307	148,39	11892	15,26
	5566	102,53	18001	10,28
	1146	58,27	19975	8,64
	13290	58,21	15372	7,04
Ácido Abscísico			294	112,81
			5716	80,34
			22734	29,36
	Transcrito	Valor de expressão	Transcrito	Valor de expressão
Auxina	5672	208,77	9014	23,79
	4268	197,98	12196	23,41
	1560	177,30	10634	22,66
	2345	152,49	370	22,06
	1120	111,57	15701	21,98
	9174	104,49	15417	21,78
	4060	95,27	4096	21,40
	3680	92,88	19295	21,16
	2528	86,99	7766	20,55
	10653	64,90	18760	20,16
	827	63,11	13676	19,97
	10710	61,20	16431	19,70
	14374	32,82	9924	19,55
	6807	32,15	10963	18,19
	8767	31,73	12150	17,66
	1849	30,48	19929	16,61
	12974	30,40	7226	16,60
	7048	29,84	19006	16,47
	1957	29,40	16204	15,30
	6408	28,54	20859	15,28
	13874	28,17	1891	14,06
	6722	27,18	13984	11,84

Estudos recentes em mutantes de *Arabidopsis* descrevem e tentam compreender o processo das atividades SUMO que afeta a interação proteína-proteína, proteína de localização subcelular, atividade enzimática e a estabilidade, o que por sua vez, regulam vários processos biológicos, incluindo o ciclo celular, a reparação do DNA e a atividade de transcrição (HAY, 2005; VERGER et al., 2003). Além disso,

esse processo é importante para as respostas hormonais e ambientais em plantas (MIURA et al., 2007; 2010).

SUMO conjugação (Sumoylation) direciona proteínas que envolve as ações sequenciais de ativação (E1), conjugação (E2) e ligadura (E3) e enzimas como na ubiquitinação. Como uma característica de contraste diferente da ubiquitinação, sumoylation é guiado por sequências de consenso curtas, Ψ -KXE/D (Ψ , grande aminoácido hidrofóbico; K, aceitador de lisina; X, qualquer aminoácido; E/D, glutamato ou aspartato) (SCHMIDT e MÜLLER, 2003). Ubiquitinação é geralmente associada com a degradação proteossomal de proteínas alvo, ao passo que está ligado à sumoylation papéis na regulação da transcrição, transdução do sinal no ciclo celular, reparação do DNA, importação nuclear e compartimentalização subnuclear (JOHNSON, 2004; HAY, 2005). Esse processo é melhor compreendido em células de leveduras e de animais (PARK et al., 2010).

No genoma de *Arabidopsis*, todos os componentes necessários para “sumoilação” foram caracterizados bioquimicamente e geneticamente (NOVATCHKOVA et al., 2004; COLBY et al., 2006; PARK et al., 2010). Estes componentes são essenciais para o desenvolvimento da planta e adaptação durante estresses abióticos e bióticos (SARACCO et al., 2007; MIURA, et al., 2009).

Zeng et al. (2012), relatando o processo de sumoylation na germinação de mutantes de *Arabidopsis*, em resposta hormonal com ABA, verificaram que várias linhas de evidência sugerem que SIZ1 (que modula a expressão de genes em resposta a sinalização AR, BR, e ABA, bem como durante a transição para a floração) sumoylation de MYB30 (SALK_122884) e ABI5 (SALK_013163 mutantes) regula sinalização ABA durante a germinação; observaram que: a perda de função dos dois fatores de transcrição altera germinação em resposta ao ABA; a resposta de germinação do MYB30 ABI5, duplo mutante do tipo selvagem, restaura as respostas ao ABA, durante a germinação e a estabilidade dos dois fatores de transcrição é provavelmente regulada por SIZ1 sumoylation em resposta a ABA (MIURA, et al., 2009).

Além disso, Zeng et al. (2012) sugerem que MYB30 e ABI5 regulam vias paralelas durante a germinação, em resposta a ABA. Os dois fatores de transcrição regulam diferentes conjuntos de genes em resposta a SIZ1 sumoylation (MIURA, et al., 2009) e diferentes subgrupos de genes responsivos ABA, sugerindo, ainda que a regulação da ABI5 e MYB30 por SIZ1 sumoylation poderia servir para equilibrar a expressão gênica em resposta a ABA.

Arabidopsis como outros eucariotas examinados (GOLEBIOWIOSKI et al., 2009; YOO, et al., 2006; TEMPE, et al., 2008) e reversivelmente dramaticamente para aumentar os níveis de proteínas SUMO de vários estresse abiótico (MILLER, et al., 2010; KUREPA, et al., 2003; SARACCO, et al., 2007). Este aumento envolve isoformas especificamente de SUMO1/2 e requer o SIZ1 E3 (SARACCO, et al., 2007), o que pode explicar o fenótipo pleiotrópico de mutantes *siz1* nulos e sua sensibilidade ao estresse (MIURA, et al., 2005, 2007, 2009, 2010; SARACCO, et al., 2007). Miller e Vierstra (2011) identificaram alterações nos padrões de Arabidopsis Sumoylation durante estresse por calor (tensão de calor de 37°C durante 30 minutos em mudas de sete dias) aumentou o nível de SUMO1/2 conjugados por 3 vezes (medida 30 minutos mais tarde no pico), que foi acompanhada por uma queda proporcional no nível de livre SUMO1/2.

Miller e Vierstra (2011) comprovaram em estudos de proteômica, que Sumoylation é um processo extremamente dinâmico, que afeta uma ampla gama de alvos nucleares em Arabidopsis, com uma capacidade de modificar muitos componentes importantes para a montagem de transcrição e cromatina sugerindo que ela representa uma importante marca epigenética para afetar a expressão gênica global e da estabilidade da cromatina. Certamente, uma compreensão mais completa da dinâmica de sumoylation, especialmente durante o estresse, será essencial para compreender plenamente o papel exato (s) de SUMO.

Quando se relaciona a função das *Small ubiquitin-like modifier* (SUMO) em sementes ainda faltam trabalhos que demonstrem sua ação durante o processo germinativo, sendo que existem relatos, principalmente, em Arabidopsis em mudas ou plantas. Contudo, bem provável que a função em sementes não se diferencie da de plantas, visto que, durante o processo germinativo de *A. crassiflora* a regulação da transcrição, a transdução do sinal no ciclo celular, a reparação do DNA estão ativos, nesse processo de crescimento e expansão do embrião, durante a superação da dormência morfológica, justificando o elevado nível de expressão das SUMOs.

Também dentre os 32.884 transcritos expressos no embrião durante a superação da dormência morfológica de *A. crassiflora*, os vinte últimos transcritos menos expressos estão relacionados a *Signal-peptide*, sendo sete deles não identificados, com valor de expressão entre 4,053 e 3,185 e tamanho entre 294 e 204 pb (Tabela 4).

Segundo Irving e Gehring (2012) as plantas têm evoluído com um conjunto complexo de moléculas de sinalização para facilitar o seu crescimento e desenvolvimento e suas interações com o meio ambiente. Um grande número de diferentes moléculas de peptídeo formam importantes componentes, mas, até recentemente, muitas vezes esquecido entre estas moléculas de sinalização. Sinais de peptídeos de plantas estão envolvidos na regulação do crescimento do meristema e organogênese, modulando o crescimento das plantas e as respostas homeostáticas. Eles, também, têm um papel importante como a sinais de perigo iminente ou ataque de patógenos.

Sinais de peptídeos são de tamanho pequeno (geralmente <20 aminoácidos na forma madura e raramente mais de ~ 120 aminoácidos como um precursor de corpo inteiro) e, muitas vezes presente em muito baixas (faixa nanomolar) concentrações fisiológicas. Então, encontrá-los é um desafio. Além disso, microarrays e outras ferramentas projetadas para a identificação de genes, diferencialmente expressos não têm sido uma ferramenta, particularmente útil, na sinalização caracterização peptídeo.

Pequenos genes são muitas vezes ignorados ou não adequadamente representados em matrizes, mal previstos por algoritmos de previsão, sendo assim difíceis de distinguir os genes com aleatórios quadros de leitura abertas e curtas. O problema é ainda agravado devido aos baixos níveis de expressão de péptidos de sinalização (OLSEN et al, 2002; LEASE e WALKER, 2006).

Abordagens de genética têm permitido o progresso na sinalização biologia peptídeo. Entretanto, um grande problema com peptídeos é o número limitado (caracterizado) de mutantes de perda de função, já que a maioria não tem, disponíveis inserções de T-DNA úteis. Em parte, porque os pequenos genes, tais como potenciais péptidos de sinalização segregados, são menos susceptíveis de ser diretamente atingida por um T-DNA. Para complicar, ainda mais, a redundância funcional de alguns peptídeos de sinalização pode mascarar fenótipos quando apenas um membro da família é interrompida com sucesso. No entanto, dois peptídeos de sinalização foram descobertos através de mutantes de inserção de T-DNA de triagem, IDA e TPD1 em *Arabidopsis* (MURPHY et al., 2012).

Tabela 4- Relação dos vinte últimos transcritos do embrião de *A. crassiflora*, valor de expressão e tamanho dos (pb), durante a superação de dormência morfológica natural no campo e descrição da sequência feita por anotação manual através do programa BLAST do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).

Transcrito	Valor de expressão	Tamanho (pb)	Descrição da sequência
transcript_29829	4,053	204	Signal-peptide
transcript_31453	4,053	221	Signal-peptide
transcript_31889	4,053	238	Signal-peptide
transcript_22272	4,036	239	?
transcript_28628	4,020	240	Signal-peptide
transcript_31574	3,995	276	Signal-peptide
transcript_22859	3,986	242	?
transcript_19945	3,960	261	?
transcript_32392	3,930	263	?
transcript_28817	3,929	228	Signal-peptide
transcript_20628	3,886	266	?
transcript_20240	3,812	235	?
transcript_26946	3,764	238	Signal-peptide
transcript_22460	3,733	240	unnamed protein product
transcript_21089	3,708	223	?
transcript_26740	3,662	207	Signal-peptide
transcript_31534	3,652	283	Signal-peptide
transcript_32762	3,308	250	Signal-peptide
transcript_31660	3,281	294	Signal-peptide
transcript_28854	3,185	238	Signal-peptide

A identificação de vários genes de codificação de péptido de sinalização mostra que em métodos *in silico*, utilizando ferramentas da bioinformática, pode ser útil para a identificação inicial de pequenos péptidos de sinalização. Alguns dos resultados obtidos a partir de uma pesquisa inicial de um SignalP na base de dados do genoma *Arabidopsis*, foram comparadas por homologia com péptidos conhecidos, utilizando vários tipos de pesquisa BLAST e alinhamentos ClustalW, que conduziram à descoberta da família de genes não caracterizados RALFL em *Arabidopsis* (OLSEN et al., 2002; MURPHY et al., 2012). Ainda, em *Arabidopsis*, foi observado cerca de 40 genes RALFL que são expressos em toda a planta e afetam vários processos de desenvolvimento, incluindo o desenvolvimento de mudas, desenvolvimento de caule e desenvolvimento radicular (MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009; BEDINGER et al., 2010; MINGOSSO et al., 2010).

Murphy et al. (2012) relatam que muito do conhecimento depende de alguns membros da família que foram investigadas em profundidade, e a

família CLE, que foi mostrada estar associado com o desenvolvimento de vários órgãos de Arabidopsis. Vários péptidos CLE demonstraram ser expressos durante a embriogênese, especificamente, CLE8 foi diretamente ligada a proliferação e diferenciação do embrião e do endosperma (FIERS et al., 2004; JUN et al., 2010; FIUME et al., 2011; FIUME E FLETCHER, 2012). Os mutantes nocauteados de *cle8* e CLE8 linhas microRNA artificiais não apresentam quaisquer fenótipos aberrantes vegetativas óbvias, mas com pequenos defeitos, subdesenvolvidas e mal formadas sementes ocorrem frequentemente dentro “siliquas” maduras. Este correlacionado com desvios em embrião precoce padrões de divisão celular e na proliferação e diferenciação de endosperma. Linhas transgênicas sobre-expressando CLE8 revelam um ligeiro aumento no comprimento do embrião e tamanho global, sugerindo uma correlação positiva entre o péptido CLE8 e tamanho da semente (FIUME e FLETCHER, 2012).

Contudo, diversos autores concordam que os pequenos péptidos de sinalização desempenham um papel essencial no crescimento e desenvolvimento da planta, porém apenas revelaram a ponta do iceberg no que diz respeito ao seu potencial de sinalização, incluindo a interação com os receptores e alterações (MURPHY et al., 2012), sendo necessário mais trabalhos para elucidar esses aspectos, principalmente, em outras espécies, incluindo as florestais já que foi observado pós embriogênese em *A. crassiflora* o que pode ser correlacionado indiretamente com o crescimento do embrião durante o processo de superação de dormência morfofisiológica.

5. CONCLUSÕES

A semente *A. crassiflora* está totalmente embebida em torno de sete dias e o teor de água varia de acordo com as condições do solo sendo maior no período de germinação. O crescimento do embrião inicia-se no mês de agosto indo até janeiro, com pico de germinação em outubro. Após este período, as sementes que não germinaram, formam um banco de sementes e não há crescimento do embrião.

Após 28 dias do início da embebição em GA₄ a primeira semente teve ruptura do tegumento indicando crescimento do embrião.

O processo de superação de dormência morfológica gerou 32.883 transcritos, dos quais os cinquenta mais expressos estão relacionados ao metabolismo, resposta ao estresse, ciclo celular e processamento de DNA, síntese de proteína, comunicação celular, hormônio e transcrição celular.

Os vinte transcritos menos expressos foram descritos como à *signal-peptide* que, comumente, estão relacionados à translocação entre membrana em eucariotos.

Genes relacionados ao metabolismo energético tais como, a Álcool desidrogenase e Enolase, podem ser considerados um marcador molecular da superação de dormência morfológica em *Annona crassiflora*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGRAWAL, G.K.; IWAHASHI, H.; RAKWAL, R. Small GTPase ‘Rop’: molecular switch for plant defense responses. **FEBS Lett.** 546, 173–180. 2003.

AHMAD, I., SMA BASRA, I. AFZAL, M. FAROOQ E A. WAHID, Stand establishment improvement in spring maize through exogenous application of ascorbic acid, salicylic acid and hydrogen peroxid. **Int. J. Agric. Biol.** 15: 95-100. 2013.

ALI-RACHEDI, S., BOUINOT, D., WAGNER, M.H., BONNET, M., SOTTA, B., GRAPPIN, P. AND JULLIEN, M. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. **Planta** 219, 479–488. 2004.

ALKHALFIOUI, F.; RENARD, M.; MONTRICHARD, F. Unique properties of NADP-thioredoxin reductase C in legumes. **J Exp Bot** 58: 969–978. 2007a.

ALMEIDA, S. P. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In SANO, S.N.; ALMEIDA, S. P. (org.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. p. 245-285.

ALVIM, F.C; CAROLINO, S.M.; CASCARDO, J.C.; NUNES, C.C; MARTINEZ, C.A; OTONI, W.C. FONTES, E. P. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiol** 126: 1042–1054. 2001.

- ANDRE, C.; BENNING, C. Arabidopsis seedlings deficient in a plastidic pyruvate kinase are unable to utilize seed storage compounds for germination and establishment. **Plant Physiol** 145:1670–1680. 2007.
- ANDRE, C.; FROELICH, J.E.; MOLL, R.M.; BENNING, C. A heteromeric plastidic Pyruvate kinase complex involved in seed oil biosynthesis in Arabidopsis. **Plant Cell** 19:2006–2022. 2007.
- ANDRIOTIS, V.M.; KRUGER, N.J.; PIKE, M.J.; SMITH, A.M. Plastidial glycolysis in developing Arabidopsis embryos. **New Phytol** 185:649–662. 2010.
- ANEETA, NS-M.; TUTEJA, N.; SOPORY, S.K. Salinity- and ABA-induced up-regulation and light-mediated modulation of mRNA encoding glycine-rich RNA-binding protein from *Sorghum bicolor*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 296:1063-1068. 2002.
- AOKI, K. et al. Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. **Plant Cell**. 17:1801–1814. 2005.
- AONO, M.; SAJI, H.; SAKAMOTO, A.; TANAKA, K.; KONDO, N.; TANAKA, K. Paraquat tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. **Plant and Cell Physiology**. 36, 1687-1691. 1995.
- BAHIN, E.; BAILLY, C.; SOTTA, B.; KRANNER, I.; CORBINEAU, F.; LEYMARIE, J. Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathway regulates grain dormancy in barley. **Plant Cell Environ**. 34:980-993. 2011.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidant in seed biology. **Seed Science Research** 14, 93–107. 2004.
- BAILLY, C. **Active oxygen species and antioxidants in seed biology**. Seed Sci Res 14:93–107. 2004.
- BARAKAT, A.; SZICK-MIRANDA, K.; CHANG, I.F.; GUYOT, R.; BLANC, G.; COOKE, R.; DELSENY, M.; BAILEY-SERRES, J. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the Arabidopsis genome. **Plant Physiol** 127: 398-415. 2001.
- BARBA-ESPÍN, G.; CLEMENTE-M., M.J.; NICOLAS, E.; ALMANSA, M.S.; CANTERO, E.; ALBACETE, A.; HERNANDEZ, J.A.; DIAZ-VIVANCOS, P. Role of thioproline on seed germination: interaction ROS-ABA and effects on antioxidative metabolism. **Plant Physiol Biochem** 59:30–36. 2012.
- BARBA-ESPÍN, G.; DIAZ-VIVANCOS, P.; CLEMENTE-MORENO, M.J.; ALBACETE, A.; FAIZE, L.; FAIZE, M.; PÉREZ-ALFOCEA, F.; HERNÁNDEZ, J.A. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. **Plant Cell Environ** 33:981-994. 2010.
- BARBA-ESPÍN, G.; DIAZ-VIVANCOS, P.; JOB, D.; BELGHAZI, M.; JOB, C.; HERNÁNDEZ, J.A. Understanding the role of H₂O₂ during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. **Plant Cell Environ** 34:1907-1919. 2011.

BARON, D.; FERREIRA, G.; BOARO, C.S.F.; MISCHON, M.M. Avaliação de substratos na emergência de plântulas de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 2, p. 575-586, 2011.

BASKIN C. C, BASKIN J. M. **Seeds – ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego, CA, USA: Academic Press. 1998.

BEDINGER, P.A.; PEARCE, G.; COVEY, P.A. RALFs: Peptide regulators of plant growth. **Signal Plant. Behav** 5 :1342-1346. 2010.

BERKOWITZ, O.; JOST, R.; POLLMANN, S.; MASLE, J. Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 20:3430–3447. 2008.

BERNSTEIN, E.; HAKE, S.B. The nucleosome: a little variation goes a long way. **Biochem Cell Biol** 84:505–517. 2006.

BESSE, I.; WONG, J.H.; KOBREHEL, K.; BUCHANAN, B.B. Thiocalcin: a thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium. **Proc Natl Acad Sci USA** 93: 3169–3175. 1996.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Development, germination and growth**. v.1, Berlin: Springer Verlag, 1978, 306p.

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

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

BEWLEY, J.D; BRADFORD, K.J; HILHORST, H.W.M; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**, 3rd ed. New York: Springer. 392p. 2013.

BERNARDES, T. G.; ESTRÊLA, C. T.; NEVES, R.V.; REZENDE, C.F.A.; MESQUITA, M.A.; PIRES, L.L. Efeito do armazenamento e de fitohormônios na qualidade fisiológica de sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 37(3): 163-168, 2007.

BORGHETTI, F. Dormência embrionária. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artimed, 2004, p.109-123. Borneo. **Journal of Biogeography** 30: 1517–1531. 2003.

BRAGA E FILHO, J. R. et al. Danos de *Telemus chapadanus* (Casey 1922) sobre o florescimento do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) no Estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.35, n.1, p.25-29, 2005.

BRAGA FILHO, J. R. **Comportamento produtivo do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) no cerrados do Estado de Goiás**. 2003. 73f. Dissertação (Mestrado em

Agronomia: Produção vegetal) Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Goiás. 2003.

BRANDÃO JR, D.S.; VIEIRA, M.G.G.C.; HILHORST, H.W.M. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.4, p.673-681, 2002.

BRIGGS, G.C.; OSMONT, K.S.; SHINDO, C.; SIBOUT, R.; HARDTKE, C.S. Unequal genetic redundancies in Arabidopsis: a neglected phenomenon? **Trends Plant Sci** 11: 492-498. 2006.

BRIOUDES, F.; THIERRY, A.M.; CHAMBRIER, P.; MOLLEREAU, B.; BENDAHDANE, M. Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 107: 16384-16389. 2010.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2005, 1367p.

BYRNE, M.E. A role for the ribosome in development. **Trends Plant Sci** 14: 512-519. 2009.

CADMAN, C.S.; TOOROP, P.E.; HILHORST, H.W. ; FINCH-SAVAGE, W.E. Gene expression profiles of *Arabidopsis cvi* seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. **Plant Journal** 46, 805–822. 2006.

CAO, D.N.; CHENG, H.; W.,U .W; SOO, H.M; PENG, J.R. Gibberellin mobilizes distinct DELLA dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development. **Plant Physiol** 142:509–525. 2006.

CARRERA, E., HOLMAN, T.; MEDHURST. A.; PEER, W.; SCHMUTHS, H.; FOOTITT, S.; THEODOULOU, F.L.; HOLDSWORTH, M. J. Gene expression profiling reveals defined functions of the ABC transporter COMA TOSE late in phase II of germination. **Plant Physiol** 143:1669–1679. 2007.

CARRERA, E.; HOLMAN, T.; MEDHURST, A.; DIETRICH, D.; FOOTITT, S.; THEODOULOU, F.L.; HOLDSWORTH, M.J. Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in Arabidopsis. **Plant Journal** 53, 214–224. 2008.

CARROLL, A.J. The Arabidopsis cytosolic ribosomal proteome: from form to function. **Front Plant Sci** 4: 32. 2013.

CARROLL, A.J.; HEAZLEWOOD, J.L.; ITO, J.; MILLAR, A.H. Analysis of the Arabidopsis cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. **Mol Cell Proteomics** 7: 347-369. 2008.

CARVALHO, C.A.M.; GUIMARÃES, R.M. SILVA, T.T.A. Condicionamento fisiológico em matriz sólida de sementes de café (*Coffea arabica* L.) com e sem pergaminho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.34, n.1, p. 94-98, 2012.

- CARVALHO, J. A. **Marolo**: o doce sabor do cerrado; sugestões de cultivo. Editora Folha machadense, 2002.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. 4ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588p.
- CATUSSE, J. JOB, C. JOB, D. Transcriptome- and proteome-wide analyses of seed germination. **C R Biol** 331:815–822. 2008a.
- CATUSSE, J.; STRUB, J-M.; JOB, C.; VAN DORSSELAER, A. JOB, D. Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigour and its tissue specific expression. **ProcNatAcad SciUSA**105:10262–10267. 2008b.
- CAVALCANTE, T. R. M. et al. Polinização e formação de frutos em araticum. **Bragantia**. Campinas.v.68, n.1, p.13-21, 2009.
- CAZALIS, R.; PULIDO, P.; AUSSENAC, T.; PÉREZ-RUIZ, J.M.; CEJUDO, F.J. Cloning and characterization of three thioredoxin h isoforms from wheat showing differential expression in seeds. **J Exp Bot** 57: 2165–2172. 2006.
- CEPAGRI** - Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura. <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>; Acesso em 17 de janeiro de 2014.
- CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J., COUVREUR, T. L. P., NEUBIG, K.M., ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.;CHASE, M.W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, 169, 5–40.2012.
- CHATROU, L.W; HE, P. **Studies in Annonaceae XXXIII**. A revision of Fusaea (Baill.) Saff. **Brittonia**52: 181–203. 1999.
- CHEN, Y.-H.; CHAO Y.-Y.; HSU, Y.Y.; KAO C.H. Heme oxygenase is involved in H₂O₂ induced lateral root formation in apocynin-treated rice. **Plant Cell Rep.** 32:219-226.
- CHERIAN, M.G.; KANG, Y.J. Metallothionein and liver cell regeneration. **Exp Biol Med** (Maywood) 231: 138–144. 2006.
- CHIBANI K, ALI-RACHEDI. S.;JOB, C.; JOB, D.; JULLIEN, M.; GRAPPIN, P. Proteomic analysis of seed dormancy in Arabidopsis. **Plant Physiol** 142:1493–1510. 2006.
- CHIBANI, K.; ALI-RACHEDI, S.; JOB, C.; JOB, D.; JULLIEN, M.; GRAPPIN, P. Proteomic analysis of seed dormancy in Arabidopsis. **Plant Physiology** 142, 1493-1510. 2006.
- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Curr Opin Plant Biol** 12:133–139. 2009.

CHIU, C.-C.; CHEN, L.-J.; LI, H.-M. Pea Chloroplast DnaJ-J8 and Toc12 Are Encoded by the Same Gene and Localized in the Stroma. **Plant Physiology**, Vol. 154, pp. 1172-1182, 2010.

CHIU, K.Y.; CHEN, C.L.; SUNG, J.M. Effect of priming temperature on storability of primed sh-2-sweet corn seed. **Crop Sci** 42:1993–2003. 2002.

CHO, M.J.; WONG, J.H.; MARX, C.; JIANG, W.; LEMAUX, P.G.; BUCHANAN, B.B. Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. **Proc Natl Acad Sci USA** 96: 14641–14646. 1999.

CLIMATE-DATA. <http://pt.climate-data.org/location/4227/>. Acesso em 17 de janeiro de 2014.

COEMANS, B.; TAKAHASHI, Y.; BERBERICH, T.; ITO, A.; KANZAKI, H.; MATSUMURA, H.; SAITOH, H.; TSUDA, S.; KAMOUN, R.; SÁGI, L.; SWENNEN, R.; TERAUCHI, R. High-throughput in planta expression screening identifies a ADP-ribosylation factor (ARF1) involved in non-host resistance and R gene-mediated resistance. **Molecular plant pathology**. 8 (6), 1-12, 2007.

COLBY, T.; MATTHAI, A.; BOECKELMANN, A.; STUIBLE, H. P. SUMO-conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from Arabidopsis. **Plant Physiology** 142, 318-332. 2006.

COLL, J.B.; RODRIGO, G.N.; GARCIA, B.S.; TAMES, R.S. **Fisiologia vegetal**. Madrid: Ediciones Pirámide, 2001. 566p.

COUVREUR, T.L.P.; RICHARDSON, J.E.; SOSEF, M.S.M.; ERKENS, R.H.J.; CHATROU, L.W. Evolution of syncarpy and other morphological characters in African Annonaceae: a posteriori mapping approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 47: 302–318. 2008.

CRAWFORD, R.M.M. Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. In: Bergon, M.; Fitter, A.H. (Eds.). **Advances in ecological research**. Academic Press, London. p. 93-185. 1992.

CROWE, J.H.; HOEKSTRA, F.A.; CROWE, L.M. Anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology** 54, 570–599. 1992.

DALAL Y, FURUYAMA T, VERMAAK D, HENIKOFF S Structure, dynamics, and evolution of centromeric nucleosomes. **Proc Natl Acad Sci USA** 104:15974–15981. 2007.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences** 57, 779–795. 2000.

De DIOS BARAJAS-LOPEZ, J.; SERRANO, A.J.; OLMEDILLA, A.; CHUECA, A.; SAHRAWY, M.; Localization in roots and flowers of pea chloroplastic thioredoxin f and

thioredoxin m proteins reveals new roles in monphotosynthetic organs. **Plant Physiol.**145:946-960, 2007.

De GARA, L.; de PINTO, M.C.; ARRIGONI, O. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. **Physiol Plant** 100:894-900. 1997.

DEGENHARDT, R. F.; BONHAM-SMITH; P. C. Arabidopsis Ribosomal Proteins RPL23aA and RPL23aB Are Differentially Targeted to the Nucleolus and Are Disparately Required for Normal Developmen. **Plant Physiology**. vol. 147 no. 1, 128-142. 2008.

DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; ESTELLE, M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **Nature** 435: 441-445. 2005a.

DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; WEIJERS, D.; LECHNER, E.; YAMADA, M. HOBBIE, L.; EHRISMANN, J.S.; JURGENS, G.; ESTELLE, M. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F-box proteins. **Dev Cell** 9:109–119. 2005b.

DIAZ-VIVANCOS, P., BARBA ESPIN, G. & HERNÁNDEZ, J. A. Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. In: **Plant Cell Reports**. 32, 10, p. 1491-1502. 2013. Publication: Research - peer-review › Journal article – Annual report year: 2013.

DILL, A.; THOMAS, S.G.; HU, J.; STEBER, C.M.; SUN, T.P. The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. **Plant Cell** 16: 1392–1405. 2004.

DOWNLOAD-PFAM <http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF09320/alignment/ncbi>;
Acesso em 12 de dezembro de 2013.

DONADIO, L.C. Situação atual e perspectivas das anonáceas, pp.1-4 in SÃO JOSÉ, A.R., SOUZA, I.V.B., MORAIS, O.M. e REBOUÇAS, T.N.H. **Anonáceas, Produção e Mercado: Pinha, Graviola, Atemóia e Cherimólia**. Vitória da Conquista, DFZ/UESB. 1997.

DONOHUE K.; RUBIO DE CASAS R.; BURGHARDT L.; KOVACH K.; WILLIS DONOHUE, K. Seeds and seasons: interpreting germination timing in the field. **Seed Science Research**.15: 175–187. 2005.

DOYLE, J.A.; LE THOMAS, A. Cladistic analysis and pollen evolution in Annonaceae. **Acta Botanica Gallica**. 141: 149–170. 1994.

DOYLE, J.A.; LE THOMAS, A. Phylogenetic analysis and character evolution in Annonaceae. **BulletinduMuséumNational d’HistoireNaturelle**, Paris, 4e série,Section B, Adansonia18: 279–334. 1996.

EIRA, M. T. S.; CALDAS, L. S. Seed dormancy and germination as concurrent processes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 85-104, 2000. (Edição especial).

ERKENS, R.H.J; MAAS, J.W.; COUVREUR, T.L.P. From Africa via Europe to South America: migrational route of a speciesrich genus of Neotropical lowland rain forest trees (Guatteria; Annonaceae). **Journal of Biogeography** 36: 2338–2352. 2009.

FARRONA, S.; COUPLAND, G.; TURCK, F. The impact of chromatin regulation on the floral transition. **Semin Cell Dev Biol** 19:560–573. 2008.

FERREIRA, C. S.; PIEDADE, M.T. F.; BONATES, L. C. Germinação de sementes e sobrevivência de plântulas de *Himatanthussucuuba* (Spruce) Wood. em resposta ao alagamento, nas várzeas da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, vol.36, no.4, Manaus, 2006.

FERREIRA, G.; CEREDA, E.; SILVA, C.P.; CUNHA, R.J.P.; CATANEO, A. Imbibition study of sugar apple (*Annona squamosa* L.) and atemoya (*Annona squamosa* L.x *A. cherimola* Mill.) sedes. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS, 1.1997, México. **Memorias** Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo, 1997. p.210-224.

FERREIRA, G.; GUIMARÃES, V.F.; PINHO, S.Z.; OLIVEIRA, M.C.; RICHART, A.; BRAGA, J.F.; DIAS, G.B. Curva de absorção de água em sementes de atemoia (*Annona cherimola* MILL.x *Annona squamosa* L.) CV. 'Gefner'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.121-124. 2006.

FERREIRA, M. F. M. **Análises genéticas de Annonacrassiflora (Annonaceae): implicações para conservação da espécie**. 2011. 127 f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

FERREYRA, M. L. F.; CASADEVALL, R.; LUCIANI, M.D.; PEZZA, A.; CASATI, P. New Evidence for Differential Roles of L10 Ribosomal Proteins from Arabidopsis. **Plant Physiology**. vol. 163 no. 1 378-391. 2013.

FIERS, M.; HAUSE, G.; BOUTILIER, K.; CASAMITJANA-MARTINEZ, E.; WEIJERS, D.; OFFRINGA, R.; VAN DER GEEST, L.; VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M.; LIU, C.M. Mis-expression of the CLV3/ESR-like gene CLE19 in Arabidopsis leads to a consumption of root meristem. **Gene** 327:37-49. 2004.

FINCH-SAVAGE, W. E.; CADMAN, C. S. C.; TOOROP, P.E.; LYNN, J. R.; HILHORST, H. W. M. Seed dormancy release in *Arabidopsis* Cvi by dry after ripening, FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and control of germination. **New Phytologist**, v.171, n.3, p.501-523, 2006.

FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytol** 171:501-523. 2006.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature** 408, 239–247. 2000.

FINKELSTEIN R.; REEVES W.; ARIIZUMI T.; STEBER C. Molecular aspects of seed dormancy. **Annual Review of Plant Biology** 59, 387–415. 2008.

FIUME, E.; FLETCHER, J.C. Regulation of Arabidopsis embryo and endosperm development by the polypeptide signaling molecule CLE8. **Plant Cell** 24:1000-1012. 2012.

FIUME, E.; MONFARED, M.; JUN, J.; FLETCHER, J.C. CLE polypeptide signaling gene expression in Arabidopsis embryos. **Plant Signal. Behav.** v. 6, p. 443-444, 2011.

FLEMATTI G. R.; GHISALBERTI E. L.; DIXON K. W.; TRENGOVE R. D. A compound from smoke that promotes seed germination. **Science** 305, 977. 2004.

FOOTITT, S.; DOUTERELO-SOLER, I.; CLAY, H.; FINCH-SAVAGE, W.E.; Dormancy cycling in Arabidopsis seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 20236–20241, 2011.

FORZZA, R.C.; BAUMGRATZ, J.F.A; BICUDO, C.E.M; CANHOS, D.A.L.; CARVALHO JR, A.A.; COELHO, M.A.N; COSTA, A.F; COSTA, A.F.; COSTA, D.P.; HOPKINS, M.G; LEITMAN, P.M; LOHMANN, L.G.; LUGHADHA, E.N; MAIA, C.L.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M.F.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA, S. SOUZA, V.C.; STEHMANN, J.R.; SILVESTRE, L.S.; WALTER, B.M.T.; ZAPPI, D.C. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. **BioScience**, California. v. 62, p. 39-45, 2012.

FRANKLAND, B.; BARTLEY, M.R.; SPENCE, D.H.N. Germination under the water. In: Crawford, R.M.M. (Ed.). **Plantlife in aquatic and amphibious habitats**. Special publication series of the British Ecological Society, Number 5. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England. p. 167-178. 1987.

FREY, A., GODIN, B., BONNET, M., SOTTA, B.; MARION-POLL, A. Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana glauca*. **Planta** 218, 958–964. 2004.

GALLARDO, K., JOB, C., GROOT, S. P. C., PUYPE, M. E. JOB, D. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. **Plant Physiology**, Bari, Itália 126, 835-848. 2001a.

GALLARDO, K., JOB, C., GROOT, S. P. C., PUYPE, M. E. JOB, D. Proteomics of Arabidopsis seed germination a comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. **Plant Physiology** Bari, Itália 129, 823-837, 2001b.

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

GALLEIE, D.R.; LE, H.; CALDWELL, C.; BROWNING, K.S. Analysis of translation elongation factors from wheat during development and following heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 245(2):295-300, 1998.

GAMA, F.; MANICA, I. Propagação, pp.30-37 in Manica, I. **Cultivo das Anonáceas: Ata, Cherimólia, Graviola**. Porto Alegre, EVANGRAF. 1994.

GAUTAM, N.; VERMA, P.; VERMA, S.; TRIPATHI, R.; TRIVEDI, P.; ADHIKARI, B.; CHAKRABARTY, D. Genome-wide identification of rice class I metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to heavy metal stress. **Funct. Integr. Genomics**, 2012, 12, 635-647.

GENTRY, A.H. Tree species richness of upper Amazonian forests. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 85: 156–159. 1988.

GEORGE, A.P.; NISSEN, R.J. Propagation of *Annona* species, a review. **Scientia Horticulturae**, v.33, p.75-85, 1987.

GIAVALISCO, P.; WILSON, D.; KREITLER, T.; LEHRACH, H.; KLOSE, J.; GOBOM, J.; FUCINI, P. High heterogeneity within the ribosomal proteins of the *Arabidopsis thaliana* 80S ribosome. **Plant Mol Biol** 57: 577–591. 2005.

GOLEBIEWSKI, F.; MATIC, I.; TATHAM, M.H.; COLE, C.; YIN, Y.; NAKAMURA, A; COX, J. et al. System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. **Sci Signal**. 2:24. 2009.

GOLIN, V.; SANTOS-FILHO, M.; PEREIRA, M.J.B. Dispersão e predação de sementes de araticum no cerrado de Mato Grosso Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41,n.1, p.101-107, 2011.

GRAEBER, K., et al. Molecular mechanisms of seed dormancy. **Plant Cell Environment**. Hoboken, v. 35, n. 10, p. 1769-1786, 2012.

GRENNAN, A. L. Metallothioneins, a Diverse Protein Family. **Plant Physiology**, vol. 155 no. 4 1750-1751. 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.900407>.

GU, Y.; WANG, Z.; YANG, Z. ROP/RAC GTPase: an old new master regulator for plant signaling. **Curr. Opin. Plant Biol.** 7, 527–536. 2004.

GUIMARÃES, R.M. **Fisiologia de sementes** – produção e tecnologia de sementes. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 129p. IPEF. Reflorestamento. Disponível em: < <http://www.ipef.com.br> >. Acesso em: 12 jan. 2000.

GUO, H.; ECKER, J.R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2) dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. **Cell** 115: 667–677. 2003.

GUO, H.X.; YIN, J.; REN, J.P.; WANG, Z.Y.; CHEN, H.L. Changes in proteins within germinating seeds of transgenic wheat with an antisense construct directed against the thioredoxin. **Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao** 33: 18–24. 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287565>.

GUO, J.; CHEN, J-G. RACK1 genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in *Arabidopsis*. **BMC Plant Biol** 8: 108. 2008.

GUO, J.; WANG, S.; VALERIUS, O.; HALL, H.; ZENG, Q.; LI, J.F.; WESTON, D.J.; ELLIS, B.E.; CHEN, J.G. Involvement of Arabidopsis RACK1 in protein translation and its regulation by abscisic acid. **Plant Physiol** 155: 370-383. 2011.

GUO, W. J., BUNDITHYA, W.; GOLDSBROUGH, P. B. Characterization of the Arabidopsis metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. **New Phytologist**, 159, 369-381.2003.

HAJDUCH, M.; CASTEEL, J.E.; TANG, S.; HEARNE, L.B.; KNAPP, S.; THELEN, J.J. Proteomic analysis of near-isogenic sunflower varieties differing in seed oil traits. **J Prot Res** 6:3232–3241. 2007.

HAJDUCH, M.; CASTEEL, J.E.; HURRELMAYER, K.E.; SONG, Z.; AGRAWAL, G.K.; THELEN, J.J. Proteomic Analysis of Seed Filling in Brassica napus. Developmental characterization of metabolic isozymes using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiol** 141:32–46. 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and mMedicine**, 3rd edn. New York, NY: Oxford University Press. 2002.

HAY, R. T. SUMO: A history of modification. **Mol Cell**. 18:1-12. 2005.
HE, Y.; AMASINO, R.M. Role of chromatin modification in flowering-time control. **Trends Plant Sci** 10:30–35. 2005.

HEIJDEN, E.; BOUMAN, F. Studies in Annonaceae. X Seed Anatomy of the Annona group. **Botanish Jahrbucher fur Systematik**, Leipzig, v. 110, 117- 135, 1988.

HENDERSON, I.R.; DEAN, C. Control of Arabidopsis flowering: the chill before the bloom. **Development** 131:3829–3838. 2004.

HENDRY, G.A.; FINCH-SAVAGE, W.E.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; BUCKLAND, S.H.; NILSSON, K.A.; SEEL, E. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species Quercus robur L. **New Phytologist** 122, 273–279. 1992.

HENIKOFF, S.; AHMAD, K. Assembly of variant histones into chromatin. **Annu Rev Cell Dev Biol** 21:133–153. 2005.

HEPWORTH, S.R.; KLENZ, J.E, HAUGHN, G.W. UFO in the Arabidopsis inflorescence apex is required for floral-meristem identity and bract suppression. **Planta** 223: 769–778. 2006.

HIGO, H.; KISHIMOTO, N.; SAITO, A.; HIGO, K. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a small GTP-binding protein related to mammalian ADP-ribosylation factor from rice. **Plant Sci**. 100, 41-49.1994.

HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. **Seed Science Research**, Ardingly, Haywards Heath, v. 5, p. 61-73, 1995.

HOEHENWARTER, W.; VAN DONGEN, J.T.; WIENKOOP, S.; STEINFATH, M.; HUMMEL, J.; ERBAN, A.; SULPICE, R.; REGIERER, B.; KOPKA, J.; GEIGEN-

BERGER, P.; WECKWERTH, W. A rapid approach for phenotype- screening and database independent detection of cSNP/protein polymorphism using mass accuracy precursor alignment. **Proteomics** 8:4214–4225. 2008.

HOEKSTRA, F.A.; WOLKERS, W.F.; BUITINK, J.; GOLOVINA, E.A.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M. Membrane stabilization in the dried state. **Comparative Biochemistry and Physiology** 117A, 335–341. 1997.

HOLDSWORTH, M. J.; BENTSINK, L.; SOPPE, W. J. J. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. **New Phytologist**. 179, 33–54. 2008.

HOLMBERG, N.; BULOW, L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. **Trends in Plant Science** 3, 61–66. 1998.

HORIGUCHI, G.; MOLLÁ-MORALES, A.; PÉREZ-PÉREZ, J.M.; KOJIMA, K.; ROBLES, P.; PONCE, M.R.; MICOL, J.L.; TSUKAYA, H. Differential contributions of ribosomal protein genes to Arabidopsis thaliana leaf development. **Plant J** 65: 724-736. 2011.

HORIGUCHI, G.; VAN LIJSEBETTENS, M.; CANDELA, H.; MICOL, J.L.; TSUKAYA, H. Ribosomes and translation in plant developmental control. **Plant Sci** 191-192: 24-34. 2012.

HORVATH, D.P.; OLSON, P.A. Cloning and characterization of cold-regulated glycine-rich RNA-binding protein genes from leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) and comparison to heterologous genomic clones. **Plant Molecular Biology**. 38:531–538. 1998.

HUANG, X.; SCHMITT, J.; DORN, L.; GRIFFITHS, C.; EFFGEN, S.; TAKAO, S.; KOORNNEEF, M.; DONOHUE, K. The earliest stages of adaptation in an experimental plant population: strong selection on QTLs for seed dormancy. **Molecular Ecology** 19, 1335–1351. 2010.

IMAIZUMI T, TRAN HG, SWARTZ TE, BRIGGS WR, KAY SA FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in Arabidopsis. **Nature** 426: 302–306. 2003.

IMAIZUMI, T.; SCHULTZ, T.F.; HARMON, F.G.; HO, L.A.; KAY, S.A. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. **Science** 309: 293–297. 2005.

INGOUFF, M.; BERGER, F. Histone3 variants in plants. **Chromosoma** 119, 27-32. 2010.

INOUE, H.; RANDAZZO, P.A. Arf GAPs and their interacting proteins. **Traffic** 8 1465-1475. 2007.

InterPro - Protein sequence analysis & classification. Elongation factor, GTP-binding domain (IPR000795). <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR000795>, Acesso em 06 de dezembro de 2013.

- IRVING, R. H.; GEHRING, C. **Plant Signaling Peptides**. Signaling and Communication in Plants. v. 16, 2012. ISBN: 978-3-642-27602-6 (Print) 978-3-642-27603-3 (Online).
- JANN, R.C.; AMEN, R.D. What is germination? In: Khan, A.A. (ed.). **The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination**. New York: Elsevier/North Holland Inc. 2nd ed., p.7-28, 1980.
- JIAO, J.; YEE, B.C.; WONG, J.H.; KOBREHEL, K.; BUCHANAN, B.B. Thioredoxin-linked changes in regulatory properties of barley α -amylase/subtilisin inhibitor protein. **Plant Physiol Biochem** 31: 799–804. 1993.
- JIAO, J.A.; YEE, B.C.; KOBREHEL, K.; BUCHANAN, B.B. Effect of thioredoxin-linked reduction on the activity and stability of the Kunitz and Bowman-Birk soybean inhibitor proteins. **J Agric Food Chem** 40: 2333–2336. 1992.
- JIAO, Y.; TAUSTA, S.L.; GANDOTRA, N.; SUN, N.; LIU T, et al. A transcriptome atlas of rice cell types uncovers cellular, functional and developmental hierarchies abiotic factors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n.2, p. 523-530, 2004.
- JOB, C.; RAJJOU, L.; LOVIGNY, Y.; BELGHAZI, M.; JOB, D. Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. **Plant Physiology** 138, 790–802. 2005.
- JOHNSON, E.S. Protein modification by SUMO. **Annual Review of Biochemistry**. 73, 355-382. 2004.
- JOSÉ, A.C.; LIGTERINK, W.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A.; HILHORST, H.W.M. Changes in gene expression during drying and imbibitions of desiccation sensitive *Magnolia ovate* (A. St.-Hil.) Spreng seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, MG, v.31, n.1, p. 270-280, jan. 2009.
- JUN, J.; FIUME, E.; ROEDER, A.H.; MENG, L.; SHARMA, V.K.; OSMONT, K.S.; BAKER, C.; HÁ, C.M.; MEYEROWITZ, E.M.; FELDMAN, L.J.; FLETCHER, J.C. Comprehensive analysis of CLE polypeptide signaling gene expression and overexpression activity in Arabidopsis. **Plant Physiol**. 154: 1721–1736. 2010.
- KAMIYA, Y., KOSHIBA, T. AND NAMBARA, E. CYP707A1 and CYP707A2, which encode ABA 80-hydroxylases, are indispensable for a proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, USA, 141, 97–107, 2006.
- KANNAN, K.; JAIN, S.K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology** 7, 153-163. 2000.
- KARSSSEN, C.D.; BRINKHORST-VANDER, S. et al. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: Studies of abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Planta** v.157, p.158-165, 1983.

KAWASHIMA, Y.; INOKUCHI, M.; CHINO, M.; KIMURA, SHIMIZU, N. Isolation of a gene for a metallothionein protein from soybean. **Plant Cell Physiol.** 32: 913-916. 1991.

KENDALL, S.L.; HELLWEGE, A.; MARRIOT, P.; WHALLEY, C.; GRAHAM, I.A.; PENFIELD, S. Induction of Dormancy in Arabidopsis Summer Annuals Requires Parallel Regulation of DOG1 and Hormone Metabolism by Low Temperature and CBF Transcription Factors. **The Plant Cell**, Vol. 23: 2568–2580, July 2011.

KEPINSKI, S.; LEYSER, O. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **Nature** 435: 446–451. 2005.

KERMODE, A. R. Role of abscisic acid in seed dormancy. **Journal of Plant Growth Regulation**, Berlin, Germany, 24, 319–344. 2005.

KIM JY, PARK SJ, JANG B, JUNG C-H, AHN SJ, GOH C-H, CHO K, HAN O, KANG H. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. **The Plant Journal.** 50:439–45. 2007a.

KIM, H.S.; DELANEY, T.P. Arabidopsis SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. **Plant Cell** 14: 1469–1482. 2002.

KIM, J. Y.; KIM, W. Y. [...], AND KANG, H. Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* during cold adaptation process. **Journal of Experimental Botany.** 61(9): 2317-2325. 2010.

KIM, J.S; JUNG, H.J.; LEE, H.J.; KIM, K.A.; GOH, C-H.; WOO, Y.; OH, S.H.; HAN, Y.S.; KANG, H. Glycine-rich RNA-binding protein7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal.** 55:455–466. 2008.

KIM, Y.C.; NAKAJIMA, M.; NAKAYAMA, A.; YAMAGUCHI, I. Contribution of gibberellins to the formation of Arabidopsis seed coat through starch degradation. **Plant Cell Physiol.** 46: 1317-1325. 2005.

KIRCHHAUSEN, T. Three ways to make a vesicle. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 1, 187-198. 2000.

KJELDGAARD, M.; NYBORG, J.; CLARK, B.F.C. The GTP binding motif: variations on a theme. **FASEB J.** 10, 1347–1368. 1996.

KOBAYASHI-UEHARA, A.; SHIMOSAKA, E.; HANDA, H. Cloning and expression analysis of cDNA encoding an ADP-ribosylation factor from wheat: tissue-specific expression of wheat ARF. **Plant Sci.** 160, 535–542. 2001.

KOBREHEL, K.; WONG, J.H.; BALOGH, A.; KISS, F.; YEE, B.C.; BUCHANAN, B.B. Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. **Plant Physiol** 99: 919-924. 1992.

- KOBREHEL, K.; YEE, B.C.; BUCHANAN, B.B. Role of the NADP/thioredoxin system in the reduction of α -amylase and trypsin inhibitor proteins. **J Biol Chem** 266: 16135-16140. 1991.
- KOORNNEEF, M.; HANHART, C.J.; HILHORST, H.; KARSSSEN, C.M. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol** 90: 463-469. 1989.
- KOORNNEEF, M.; KARSSSEN, C.M. **Seed dormancy and germination**. In *Arabidopsis*, E.M. Meyerowitz and C.R. Somerville, eds (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 313-334. 1994.
- KOROBENIKOVA, A.V.; GARBER, M.B.; GONGADZE, G.M. Ribosomal proteins: Structure, function, and evolution. **Biokhimiya**, Moscow, vol. 77, No. 6, pp 686-700. 2012.
- KUCERA, B.; COHN, M.A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research** 15, 281–307. 2005.
- KUREPA, J.; WALKER, J.M.; SMALLE, J.; GOSINK, M.M.; DAVIS, S.J.; DURHAM, T.L. et al. The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. **J Biol Chem**. 278:6862-6872. 2003.
- KWAK, J.M.; NGUYEN, V.; SCHOEDER, J.L. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. **Plant Physiol** 141:323–329. 2006.
- KWAK, K.J.; KIM, Y.O.; KANG, H. Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. **Journal of Experimental Botany**. 56:3007–3016. 2005.
- KWON, S.Y.; JEONG, Y.J.; LEE, H.S.; KIM, J.S.; CHO, K.Y.; ALLEN, R.D.; KWAK, S.S. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. **Plant, Cell and Environment** 25, 873-882. 2002.
- LANCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**, RiMa Artes e textos. São Carlos. 531p. 2004.
- LAUFEN, T.; MAYER, M.P.; BEISEL, C.; KLOSTERMEIER, D.; MOOR, A.; REINSTEIN, J.; BAKAU, B. Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. **Proc Natl Acad Sci USA** 96: 5452–5457. 1999.
- LAUFS, P.; COEN, E.; KRONENBERGER, J.; TRAAS, J.; DOONAN, J. Separable roles of UFO during floral development revealed by conditional restoration of gene function. **Development** 130: 785–796. 2003.
- LEASE, K.A.; WALKER, J.C. The *Arabidopsis* unannotated secreted peptide database, a resource for plant peptidomics. **Plant Physiol**. 142: 831-838. 2006.

- LEBORGNE-CASTEL, N.; JELITTO-VAN DOOREN, E.P.; CROFTS, A.J.; DENECKE, J. Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. **Plant Cell** 11: 459–470. 1999.
- LEDGER, S.E.; GARDNER, R.C. Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). **Planta Mol. Biol.**, 25, 877-886. 1994.
- LEE, J. H. SCHÖFFL, F. An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Mol Gen Genet** 252: 11–19.1996.
- 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. **J. Exp. Bot**, 61: 2499-2506. 2010.
- LEE, YOUNG-PYO; AHMAD, R.; LEE, HAENG-SOON; KWAK, S. S.; SHAFQAT, M. N.; KWON, SUK-YOON. Improved tolerance of Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase expressing transgenic tobacco seeds and seedlings against multiple abiotic stresses. **Int. J. Agric. Biol.**, Vol. 15, No. 4, 2013.
- LEPRINCE, O.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F.A. Radicles and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. **Journal Experimental Botany** 338, 1515–1524. 1999.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G.A.F.; MCKERSIE, B.D. The mechanism of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research** 3, 231-246. 1993.
- LESZCZYSZYN, O. I.; IMAM H. T.; BLINDAUER, C. A. Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions. **Metallomics**, 5, 1146-1169. 2013.
- LEUBNER-METZGER G. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. **Planta** 213: 758–763. 2001.
- LEVIN, J.Z.; MEYEROWITZ, E.M. UFO: an *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. **Plant Cell** 7: 529–548. 1995.
- LI, Y.C; REN, J.P.; CHO, M.J.;ZHOU,S.M.; KIM,Y.B.;GUO,H. X.;FRICK, O.L.;YIN,J.; BUCHANAN,B.B. The level of expression. Of thioredoxin in linked fundamental properties and applications of wheat seed. **Mol plant**.2:430-441, 2009.
- LIMA-BRITO, A.; CAMPOS, V.C.A.; SANTANA, J.R.F.; DORNELLES, A.L.C. Efeito do ácido giberélico (GA₃) na emergência de plântulas de *Annona crassiflora* Mart., *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v.18, n.1, p.27-33, 2006.

- LINKIES A.; MÜLLER K.; MORRIS K., *et al.* Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell** 21, 3803–3822. 2009.
- LINKIES, A.; GRAEBER, K.; KNIGHT, C.; LEUBNER-METZGER, G. The evolution of seeds. **New Phytologist**, 186, 817–831. 2010.
- LIPPERT, D.; ZHUANG, J.; RALPH, S.; ELLIS, D.E.; GILBERT, M.; OLAFSON, R.; RITLAND, K.; ELLIS, B.; DOUGLAS, C.J.; BOHLMAN, J. Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. **Proteomics** 5:461–473. 2005.
- LIU, P.; GOH, C.-J.; LOH, C.-S.; PUA, E.-C. Differential expression and characterization of three metallothionein-like genes in Cavendish banana (*Musa acuminata*). **Physiol. Plant.** , 114, 241-250. 2002.
- LIU, X.; ZHANG, H.; ZHAO, Y.; FENGA, Z.; LI, Q.; YANG, H-Q; LUAN, S.; LI, J.; HEA, Z-H. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America**. 1-6. 2013. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1304651110.
- LIU, Y., SHI, L., YE, N., LIU, R., JIA, W.; ZHANG, J. Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. **New Phytologist** 183, 1030–1042. 2009.
- LIU, Y.; YE, N.; LIU, R.; CHEN, M.; ZHANG, J. H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. **J Exp Bot.** 61:2979–2990. 2010.
- LOBO, P.C.; JOLY, C.A. 1998. Tolerance to hypoxia and anoxia in Neotropical tree species. **Oecologia Brasiliensis**, 4: 137-156.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1998.
- LOYOLA, A.; ALMOUZNI, G. Marking histone H3 variants: how, when and why? **Trends Biochem Sci** 32:425–433. 2007.
- LOZANO, R.M.; WONG, J.H.; YEE, B.C.; PETERS, A.; KOBREHEL, K.; BUCHANAN, B.B. New evidence for a role for thioredoxin h in germination and seedling development. **Planta** 200: 100-106. 1996.
- MAAS, P.J.M. Project systematics of Annonaceae. **Taxon**. 32: 528–529. 1983.
- MAEDA, K.; FINNIE, C.; STERGAARD, O.; SVENSSON, B. Identification, cloning and characterization of two thioredoxin h isoforms, HvTrxh1 and HvTrxh2, from the barley seed proteome. **Eur J Biochem** 270: 2633–2643. 2003.
- MAESHIMA M. Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells. **J. Plant Resv.** 109, p. 119-125, 1996.

- MAHMOOD, S.; WAHID, A.; RASHEED, R.; HUSSAIN, I.; BASRA, S.M.A. Possible antioxidative role of endogenous vitamins biosynthesis in heat stressed maize (*Zea mays*). **Int. J. Agric. Biol.** 14: 705-712.2012.
- MALIK, H.S.; HENIKOFF, S. Phylogenomics of the nucleosome. **Nat Struct Biol** 10:882–891. 2003.
- MANDAL, S.; BOSE, P.; DAWAR, S.; RAJARANI, A. P. ; SANTHA, I. M. Kinetic and expression profiling of cytosolic pyruvate kinase enzyme during seed development of Indian mustard (*Brassica juncea*). **Journal Plant Biochem. Biotechnol.** 20(1):102–109, 2011.
- MANGEON, A.; JUNQUEIRA, R. M.; SACHETTO-MARTINS, G. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. **Plant Signaling & Behavior.** 5 (2):99-104, 2010.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas.** 12. v. São Paulo: Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 2005. 495p.
- MARX, C.; WONG, J.H.; BUCHANAN, B.B. Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. **Planta** 216: 454-460. 2003.
- MATAKIADIS, T.; ALBORESI, A.; JIKUMARU, Y. et al. The Arabidopsis abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. **Plant Physiology** 149: 949–960. 2009.
- MATOS, J.L.; FIORI, C.S.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. A conserved dibasic site is essential for correct processing of the peptide hormone AtRALF1 in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Lett.** 582: 3343–3347. 2008.
- MCCARTY, D. R. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. **Annual Review of Plant Physiology and PlantMolecular Biology**, Palo Alto, Canadá, 46, 71–93, 1995.
- MECHIN, V.; THEVENOT, C.; LE GUILLOUX, M.; PRIOUL, J.L.; DAMERVAL, C. Developmental analysis of maize endosperm proteome suggests a pivotal role for pyruvate orthophosphate dikinase. **Plant Physiol** 143:1203–1219. 2007.
- MEINHARD, M.; GRILL, E. Hydrogen peroxide is a regulator of ABA1, a protein phosphatase 2C from Arabidopsis. **FEBS Lett** 508:443–446. 2001.
- MEINHARD, M.; RODRIGUEZ, P.L.; GRILL, E. The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links abscisic acid-response regulator to redox signalling. **Planta** 214:775–782. 2002.
- MELO, D.L.B. **Dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart.** 2005. 51f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras.2005.
- MEYER, Y.; BELIN,C.; DELORME-HINOUSE, V.; REICHHELD, J. P.; RIONDET,C. Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants, molecular mechanisms,

crossatls and functional significance. **Antioxidantes & Redox signaling**. 17 (8):1124-1160, 2012.

MIERNYK, J. A. The J-domain proteins of *Arabidopsis thaliana*: an unexpectedly large and diverse family of chaperones. **Cell Stress & Chaperones**. 6 (3), 209–218. 2001.

MIERNYK, J.A. Protein folding in the plant cell. **Plant Physiol** 121:695–703. 1999.

MIERNYK, J.A. The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones. **Trends Plant Sci** 2: 180–187.1997.

MILLER, G.; COUTU, J.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signalling in plants. In: Yang Z (ed) Annual plant reviews, intracellular signaling in plants, vol 33. **Wiley-Blackwell**, Oxford, pp 189–201. 2008.

MILLER, M.J.; BARRETT-WILT, G.A.; HUA, Z.; VIERSTRA, R.D. Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in *Arabidopsis*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 107:16512-16517. 2010.

MINGOSSO, F.B.; MATOS, J.L.; RIZZATO, A.P.; MEDEIROS, A.H.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. SacRALF1, a peptide signal from the grass sugarcane (*Saccharum spp.*), is potentially involved in the regulation of tissue expansion. **Plant Mol. Biol.** 73: 271-281. 2010.

Minps: munich information center for protein sequence. *Arabidopsis thaliana* Project
<http://mips.helmholtzmuellen.de/plant/athal/reportsjsp/geneticElement.jsp?gene=AT4G02930.1>. Acesso em: 06 de dezembro de 2013.

MIR, G.; DOMENECH, J.; HUGUET, G.; GUO, W. J.; GOLDSBROUGH, P.; ATRIAN, S.; MOLINAS, M. A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. **J. Exp. Bot.**, 2004, 55, 2483-2493.

MIURA, K.; JIN, J.B.; HASEGAWA, P.M. Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. **Curr Opin Plant Biol.** 10:495-502. 2007.

MIURA, K.; LEE, J.; JIN, J.B.; YOO, C.Y.; MIURA, T.; HASEGAWA, P.M. Sumoylation of ABI5 by the *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 106, 5418-5423. 2009.

MIURA, K.; LEE, J.; MIURA, T.; HASEGAWA, P.M. SIZ1 controls cell growth and plant development in *Arabidopsis* through salicylic acid. **Plant Cell Physiol.** 51:103-113. 2010.

MIURA, K.; RUS, A.; SHARKHUU, A.; YOKOI, S.; KARTHIKEYAN, A.S.; RAGHOTHAMA, K.G. et al. The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. **Proc Natl Acad Sci USA**. 102:7760-7765. 2005.

- MOLS, J.B; GRAVENDEEL, B; CHATROU, L.W; PIRIE, M.D; BYGRAVE, P.; CHASE, M.W.; KEßLER, P.J.A. Identifying clades in Asian Annonaceae: monophyletic genera in the polyphyletic Miliuseae. **American Journal of Botany** 91: 590–600. 2004.
- MONTRICHARD, F.; RENARD, M.; ALKHALFIOUI, F.; DUVAL, F.D.; MACHEREL, D. Identification and differential expression of two thioredoxin h isoforms in germinating seeds from pea. **Plant Physiol** 132: 1707–1715. 2003.
- MOON, J.; PARRY, G.; ESTELLE, M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. **Plant Cell** 16: 3181–3195. 2004.
- MORI, I.C.; MURATA, Y.; URAJI, M. Integration of ROS and hormone signalling. In: del Río LA, Puppo A (eds) Reactive oxygen species in plant signalling. **Springer**, Dordrecht, pp 25-42. 2009.
- MORIGUCHI, K.; SUGITA, M.; SUGIURA, M. Structure and subcellular localization of a small RNA-binding protein from tobacco. **The Plant Journal**. 6:825–834. 1997.
- MORIGUCHI, T.; KITA, M.; HISADA, S.; ENDO-INAGAKI, T.; OMURA, M. Characterization of gene repertoires at mature stage of citrus fruits through random sequencing and analysis of redundant metallothionein-like genes expressed during fruit development. **Gene**, 211, 221-227. 1998.
- MURPHY, E.; SMITH, S.; SMET, I-D. Small Signaling Peptides in Arabidopsis Development: How Cells Communicate Over a Short Distance. **Plant Cell**. 24 (8) : 3198-3217. 2012.
- NAKABAYASHI, K.; OKAMOTO, M.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, Y.; NAMBARA, E. Genome-wide profiling of stored mRNA in Arabidopsis thaliana seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. **Plant J** 41: 697–709. 2005.
- NAMBARA, E.; OKAMOTO, M.; TATEMATSU, K.; YANO, R.; SEO, M. and KAMIYA, Y. Abscissic acid and the control of seed dormancy and germination. **Seed Science Research**, Holland, Amsterdam, 20, 55–67, 2010.
- NEXTPROT BETA** <http://www.nextprot.org/db/term/GO%3A0009790>; Acesso em 12 de dezembro de 2013.
- NOMATA, T.; KABEYA, Y.; SATO, N. Cloning and characterization of glycine-rich RNA-binding protein cDNAs in the moss *Physcomitrella patens*. **Plant and Cell Physiology**. 45:48–56. 2004.
- NOVATCHKOVA, M.; BUDHIRAJA, R.; COUPLAND, G.; EISENHABER, F.; BACHMAIR, A. SUMO conjugation in plants. **Planta**. 220, 1-8. 2004.
- NOVER, L.; MIERNYK, J.A. A genomics approach to the chaperone network of Arabidopsis thaliana. **Cell Stress Chaperones** 6: 175–176. 2001.

OGAWA, M.; HANADA, A.; YAMAUCHI, Y.; KUWAHARA, A.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. **Plant Cell** 15: 1591–1604. 2003.

OKAMOTO, M., KUWAHARA, A., SEO, M., KUSHIRO, T., ASAMI, T., HIRAI, N., C.G. Germination, post germination adaptation, and species ecological ranges. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41, 293–319. 2010.

OLIVER, C.; PRADILLO, M.; CORREDOR, E.; CUÑADO, N. The dynamics of histone H3 modifications is species-specific in plant meiosis. **Planta**; 238 (1) :23-33. 2013.

OLSEN, A.N.; MUNDY, J.; SKRIVER, K. Peptomics, identification of novel cationic Arabidopsis peptides with conserved sequence motifs. In **Silico Biol.** (Gedruckt) 2:441-451. 2002.

ORACZ, K.; BAILLY, C.; GNIAZDOWSKA, A.; COME, D.; CORBINEAU, F.; BOGATEK, R. Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. **Journal of Chemical Ecology** 33: 251-264. 2007.

OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**. 2 ed. London: Longmans, 1924. 154 p.

OSTERGAARD, O.; FINNIE, C.; LAUGESEN, S.; ROEPSTORFF, P.; SVENSSON, B. Proteome analysis of barley seeds: Identification of major proteins from two-dimensional gels (p 4–7). **Proteomics** 4:2437–2447. 2004.

PAGANI, M. A.; TOMAS, M.; CARRILLO, J.; BOFILL, R.; CAPDEVILA, M.; ATRIAN, S.; ANDREO, C. S. The response of the diferente soybean metallothionein isoforms to cádmium intoxication. **J. Inorg. Biochem**, 117, 306-315. 2012.

PAI-HSIANG, S.; HSOU-MIN, L. Arabidopsis Stromal 70-kD Heat Shock Proteins Are Essential for Plant Development and Important for Thermotolerance of Germinating Seeds. **Plant Physiology**. vol. 146 no. 3 1231-1241. 2008.

PARK, H. C.; HUN, K.; KOO, S. C.; PARK, H. J.; BAEK, D.; WOO, S. C.; KIM, D. H.; BREASSAN, R. A.; LEE, S. Y.; BOHNERT, H. J.; YUN, D-J. Functional characterization of the SIZ/PIAS-type SUMO E3 ligases, OsSIZ1 and OsSIZ2 in rice. **Plant, Cell & Environment**. v. 33, Issue 11, p. 1923-1934. 2010.

PARK, H.J.; YUN, D.J. New insights into the role of the small ubiquitin-like modifier (SUMO) in plants. **Int Rev Cell Mol Biol**. 300:161-209. 2013.

PAYTON, P.; WEBB, R.; KORNIEYEV, D.; ALLEN, R.; HOLADAY, A.S. Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. **Journal of Experimental Botany** 52, 2345-2354. 2001.

PENFIELD S.; JOSSE E.-M.; KANNANGARA R.; GILDAY A.D.; HALLIDAY K.J.; GRAHAM I.A. Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. **Current Biology** 15, 1998–2006. 2005.

PHILLIPS, O.L.; MILLER, J. Global patterns of plant diversity: Alwyn H. Gentry's forest transect data set. St. Louis, MO: **Missouri Botanical Garden Press**. 2002.

PILON, M.; SCHEKMAN, R. Protein translocation: how Hsp70 pulls it off. **Cell** 97: 679–682. 1999.

PIRIE, M. D.; CHATROU, L.W; MOLS, J.B; ERKENS, R.H.J; OOSTERHOF, J. 'Andean-centred' genera in the short-branch clade of Annonaceae: testing biogeographical hypotheses using phylogeny reconstruction and molecular dating. **Journal of Biogeography** 33: 31–46. 2006.

PIROLI, E.L.; **Geoprocessamento na determinação da capacidade e avaliação do uso da terra do município de Botucatu - SP**. Dissertação. Doutorado em Agronomia-Área de concentração Energia na Agricultura. Botucatu: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho - Faculdade de ciências agrônômicas, Campus de Botucatu, 2002. 122 p.

PLAXTON, W.C. Leucoplast pyruvate kinase from developing castor oil seeds: characterization of the enzymes degradation by a cysteine endopeptidase. **Plant Physiol** 97:1334–1338. 1991.

POSMYK, M.M.; CORBINEAU, F.; VINEL, D.; BAILLY, C.; CÔME, D. Osmoconditioning reduces physiological and biochemical damage induced by chilling in soybean seeds. **Physiol Plant**. 111:473-482. 2001.

POTOKINA E, SREENVASULU, N. Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L.) **Funct. Integr. Genomics**. Perth, Australia, 2, 28-39, 2002.

PUNTARULO, S.; GALLEANO, M.; SANCHEZ, R.A.; BOVERIS, A. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. **Biochem Biophys Acta** 1074:277–283. 1991.

QIN, X. Q.; ZEEVAART, J. A. D. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana glauca* increases abscisic acid and phaseic acid and Phaseic Acid Levels and Enhances Drought Tolerance. **Plant Physiology**. 128(2): 544-551. 2002.

QUEVAL, G.; ISSAKIDIS-BOURGUET, E.; HOEBERICHTS, F.A.; VANDORPE, M.; GAKIÈRE, B.; VANACKER, H.; MIGINIAC-MASLOW, M.; VAN BREUSEGEM, F.; NOCTOR, G. Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. **Plant J** 52: 640–657. 2007.

RAINER, H.; CHATROU, L.W. 2006. **AnnonBase: world species list of Annonaceae** – version 1.1, 12 Oct 2006. Available at: <http://www.sp2000.org> and <http://www.annonaceae.org>. Accessed 4 December 2011.

RAJJO, L.; GALLARDO, K.; DEBEAUJON, I.; VANDEKERCKHOVE, J.; JOB, C.; JOB, D. The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. **Plant Physiol** 134: 1598–1613. 2004.

RAZ, V.; BERGERVOET, J.H.W. ; KOORNNEEF, M. Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. **Development** 128, 243–252. 2001.

REGAD, F.; BARDET, C.; TREMOUSOYUE, D.; MOUSAN, A.; LESCURE, B. AXELOS, M. cDNA cloning and expression of na arabidopsis GTP-biding protein of the ARF Family. **FEBS Lett.** 316, 133-136, 1993.

REINHARDT, S. **Vergleichende morphologische-anatomische und physiologische Untersuchung zur Samenanlagenqualitaet von Cyclamen persicum Mill.** Unter besonderer Beruecksichtigung der Saatgutqualitaet. Dissertation, Friedrich-Schiller-University Jena, Germany. 2006.

REN, Y.; LIU, Y.; CHEN, H.; LI, G.; ZHANG, X.; ZHAO, J. I. E. Type 4 metallothionein genes are involved in regulating Zn ion accumulation in late embryo and in controlling early seedling growth in Arabidopsis. **Plant, Cell & Environment**, 35, 770-789. 2012.

REYES, J.C. Chromatin modifiers that control plant development. **Curr Opin Plant Biol** 9:21–27. 2006.

RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. de; SCALOPPI JUNIOR, E. J.; FONSECA, C. E. L. da. **Araticum (Annona crassiflora Mart.)** Jaboticabal – SP – Embrapa Cerrados, 2000. 52 p.

RIBEIRO, M.N.O. et al. In vitro seed germination and seedling development of *Annona crassiflora*. **Scientia Agricola**, v.66, p.410-413, 2009.

RIEUA, I.; ERIKSSONB, S.; POWERSC, S. J.; GONGA, F.; GRIFFITHSA, J.; WOOLLEYA, L.; BENLLOCHB, R.; NILSSONB, O.; THOMASA, S. G.; HEDDENA, P.; PHILLIPSA, A. L. Genetic Analysis Reveals That C19-GA 2-Oxidation Is a Major Gibberellin Inactivation Pathway in Arabidopsis. **The Plant Cell**. vol. 20, no. 9, 2420-2436. 2008.

RIZZINI C.T. 1973. Dormancy in seeds of *Annona crassiflora* Mart. **Journal of Experimental Botany** 24: 117–123.

RODE, C.; GALLIEN, SE ´B.; HEINTZ, D.; DORSSELAER, A. V.; BRAUN, H.-P.; WINKELMANN, T. Enolases: storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. **Plant Mol Biol** 75:305–319. 2011.

Roosens, N.H.; Leplae, R.; Bernard, C.; Verbruggen, N. Variations in plant metallothioneins: the heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as a study case. **Planta**. 2005, 222, 716-729.

ROSADO, A.; LI, R.; VAN DE VEN, W.; HSU, E.; RAIKHEL, N.V. Arabidopsis ribosomal proteins control developmental programs through translational regulation of auxin response factors. **Proc Natl Acad Sci USA** 109: 19537-19544. 2012.

RUIZ-FERRER, V.; VOINET, O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. **Annu Rev Plant Biol** 60:485–510. 2009.

RUUSKA, S.A.; GIRKE, T.; BENNING, C.; OHLROGGE, J.B. Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling. **Plant Cell** 14:1191–1206. 2002.

SACCHIN, G. A.; ZOCCHINI, G.; COCUCCIS, S. Changes in form of elongation factor 1 during germination of wheat seeds. **European Journal of Biochemistry**. v.139, Issue 1, Article first published online: 3 março de 2005.

SAKAMOTO, T., KOBAYASHI, M., ITOH, H., TAGIRI, A., KAYANO, T., TANAKA, H., IWAHORI, S., AND MATSUOKA, M. Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice. **Plant Physiol.** 125: 1508–1516. 2001.

SAGE-ONO, K.; ONO, M.; HARADA, H.; KAMADA, H. Dark-induced accumulation of mRNA for a homolog of translationally controlled tumor protein (TCTP) in *Pharbitis*. **Plant Cell Physiol** 39:357–360. 1998.

SANGWAN, R.S.; GAUTHIER, D.A.; TURPIN, D.H; POMEROY, M.K.; PLAXTON, W.C. Pyruvate kinase isoenzymes from zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus*-Developmental profiles and subunit composition. **Planta** 187:198–202. 1992.

SARACCO, S.A.; MILLER, M.J.; KUREPA, J.; VIERSTRA, R.D. Genetic analysis of Sumoylation in Arabidopsis: heat-induced conjugation of SUMO1 and SUMO2 is essential. **The Plant Physiology** 145, 119-134. 2007.

SAS Institute Inc. **Sas/Stet user'r guide: statistics**, version 9.1. 3ed. Cary, 2004.

SCALOPPI JUNIOR, E. J. **Propagação de espécies de Annonaceae com estacas caulinares**. 92f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrônômicas e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.

SCARANO F.R., PEREIRA T.S.; ROCAS G. Seed germination during floatation and seedling growth of *Carapaguianensis*, a tree from flood-prone forests of the Amazon. **Plant Ecology**, 168(2): 291-296. 2003.

SCHMID, M.; DAVISON, T.S.; HENZ, S.R.; PAPE, U.J.; DEMAR, M.; VINGRON, M.; SCHÖLKOPF, B.; WEIGEL, D.; LOHMANN, J.U. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. **Nat Genet** 37: 501-506. 2005.

SCHMID, M.; DAVISON, T.S.; HENZ, S.R.; PAPE, U.J.; DEMAR, M.; VINGRON, M.; SCHOLKOPF, B.; WEIGEL, D.; LOHMANN, J.U. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. **Nat. Genet.** 37: 501–506. 2005.

SCHMIDT, D.; MÜLLER, S. PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences** 60, 2561-2574. 2003.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C. Control of seed germination by abscisic acid. III. Effect on embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 77, n. 3, p. 676-686, Mar. 1985.

SCHULTZ, T.F.; KIYOSUE, T.; YANOVSKY, M.; WADA, M.; KAY, A.S. A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. **Plant Cell** 13: 2659–2670. 2001.

SCIDMORE, M.A.; OKAMURA, H.H.; ROSE, M.D. Genetic interactions between KAR2 and SEC63, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ in the endoplasmic reticulum. **Mol Biol Cell** 4:1145–1159. 1993.

SEO, M.; HANADA, A.; KUWAHARA, A.; ENDO, A.; OKAMOTO, M.; YAMAUCHI, Y.; NORTH, H.; MARION-POLL, A.; SUN, T.P.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S.; NAMBARA, E. Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. **Plant J** 48: 354-366. 2006.

SERRATO, A.J.; CEJUDO, F.J. Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. **Planta** 217: 392–399. 2003.

SERRATO, A.J.; CRESPO, J.L.; FLORENCIO, F.J.; CEJUDO, F.J. Characterization of two thioredoxins h with predominant localization in the nucleus of aleurone and scutellum cells of germinating wheat seeds. **Plant Mol Biol** 46: 361–371. 2001.

SERRATO, A.J.; PÉREZ-RUIZ, J.M.; CEJUDO, F.J. Cloning of thioredoxin h reductase and characterization of the thioredoxin reductase-thioredoxin h system from wheat. **Biochem J** 367: 491–497. 2002.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The Plant Cell** v.7, n. 3, p. 945-950. 1995.

SHI, L.X.; THEG, S.M. A stromal heat shock protein 70 system functions in protein import into chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*. **Plant Cell** 22: 205–220, 2010.

SHINOZUKA, H.; HISANO, H.; YONEYAMA, S.; SHIMAMOTO, Y.; JONES, E.S.; FORSTER, J.W.; YAMADA, T.; KANAZAWA, A. Gene expression and genetic mapping analyses of a perennial ryegrass glycine-rich RNA-binding protein gene suggest a role in cold adaptation. **Molecular Genetics and Genomics**. 275:399-408.2006.

SIEBURTH, L.E.; MUDAY, G.K.; KING, E.J.; BENTON, G.; KIM, S.; METCALF, K.E.; MEYERS, L.; SEAMEN, E.; VAN NORMAN, J.M. SCARFACE encodes an ARF-GAP that is required for normal auxin efflux and vein patterning in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. 18 1396–1411. 2006.

SILVA, E. A. A., DE MELO, D. L. B., DAVIDE, A. C., DE BODE, N., ABREU, G. B., FARIA, J. M. R., HILHORST, H. W. M. Germination Ecophysiology of *Annona crassiflora* Seeds. **Annals of Botany**, New York, NY, 99: 823–830, 2007.

SILVA, D. C. G. da. **Mapeamento de genes de resistência da soja à ferrugem asiática e análise transcricional na interação patógeno-hospedeiro**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 153f. Jaboticabal, 2008.

SILVA, J.T. **Genetic transcript analyzer-ferramenta computacional para análise de transcrição gênica por RNA-seq**. Dissertação (mestrado bioinformática)-Universidade Federal do Paraná, 64f. Curitiba, 2012.

SILVEIRA, F.A.O. Sowing seeds for the future: the need for establishing protocols for the study of seed dormancy. **Acta Botanica Brasilica**. Feira de Santana. 27(2): 264-269. 2013.

SILVERSTONE, A.L.; CHANG, C.; KROL, E.; SUN, T. P. Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene *GA1* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**. 12:9-19. 1997.

SINGH, B. N.; MISHRA, R.N.; AGARWAL, P.K.; GOSWAMI, M.; NAIR, S.; SOPORY, S.K.; REDDY, M.K. A pea chloroplast translation elongation factor that is regulated by abiotic factors. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 320, 2. 523-530p. 2004.

SLIK, J.W.F; POULSEN, A.D; ASHTON, P.S; CANNON, C.H; EICHHORN, K.A.O; KARTAWINATA, K.; LANNIARI, I.; NAGAMASU, H.; NAKAGAWA, M.; VAN, NIEUWSTADT MGL, PAYNE J, SARIDAN A.; SIDIYASA, K.; VERBURG, R.W.; WEBB, C.O.; WILKIE, P. A floristic analysis of the low land dipterocarp forests of Borneo. **Journal of Biogeography** 30: 1517–1531. 2003.

SMALLE, J.; VIERSTRA, R.D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. **Annu Rev Plant Biol** 55: 555–590. 2004.

SMET, S. DE; DAMME, P. VAN; SCHELDEMAN, X.; ROMERO, J. Seed structure and germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Acta Horticulturae**, n.497, p.269-278,1999.

SOBREIRA, A.C. M. **Atividade e expressão das bombas de prótons de tonoplasto de *Vigna unguiculata* (L.) Walp em condição de estresse salino**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 2003.

SOBREIRA, A.C. M. **Estudo da expressão dos genes de bomba de prótons (V-ATPase e V-PPase) e dos contra transportadores (NHX) vacuolares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp submetidos a estresse abiótico**. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 2009.

SOMERS, D.E.; KIM, W.Y.; GENG, R. The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. **Plant Cell** 16: 769–782. 2004.

SOMERS, D.E.; SCHULTZ, T.F.; MILNAMOW, M.; KAY, S. A. ZEITLUPE encodes SONG, J.; GUO, B.; SONG, F.; PENG, H.; YAO, Y.; ZHANG, Y.; SUN, Q.; NI, Z. Genome-wide identification of gibberellins metabolic enzyme genes and expression profiling analysis during seed germination in maize. **Gene**. 15;482(1-2):34-42. 2011.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 704p.

SRIVASTAVA, R.; LIU, J.X.; GUO, H.; YIN, Y.; HOWELL, S.H. Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis. **Plant J.** 59: 930-939. 2009.

STELZEL, U.; CONNELL, S.; NIERHOUS, K.H.; WITTHANN-LIEBOLD, B. Ribosomal proteins: role ribosomal functions. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001 Nature Publishing Group**. 1-12; 2001. www.els.net. Acesso em 04 de dezembro de 2013.

STEPHEN, J.R.; DENT, K.C; FINCH-SAVAGE, W.E. A cDNA encoding a cold-induced glycine-rich RNA binding protein from *Prunus avium* expressed in embryonic axes. **Gene**.320:177-183. 2003.

STIRNBERG, P.; LIU, J.P.; WARD, S.; KENDALL, S.I; LEYSER, O. Mutation of the cytosolic ribosomal protein-encoding RPS10B gene affects shoot meristematic function in Arabidopsis. **BMC Plant Biol** 12: 160. 2012.

STRADER, L.C.; RITCHIE, S.; SOULE, J.D.; MCGINNIS, K.M.; STEBER, C.M. Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene SLEEPY1 are rescued by overexpression of its homologue, SNEEZY. **Proc Natl Acad Sci USA** 101: 12771-12776 .2004.

STRATMANN, T.; MAS, P. Chromatin, photoperiod and the Arabidopsis circadian clock: a question of time. **Semin Cell Dev Biol** 19:554–559. 2008.

STRUB, A.; LIM JH, P.; FANNER, N.; VOOS, W. The mitochondrial protein import motor. **Biol Chem** 381: 943–949. 2000.

SU, P.H.; LI, H-M. Stromal Hsp70 is important for protein translocation into pea and Arabidopsis chloroplasts. **Plant Cell** 22: 1516–1531, 2010.

SULLIVAN, J.A.; SHIRASU, K.; DENG, X.W. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. **Nat Rev Genet** 4: 948–958. 2003.

SUNG, D.Y; GUY, C.L. Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in Arabidopsis. Evidence for pleiotropic consequences. **Plant Physiol** 132: 979-987.2003.

SZICK-MIRANDA, K.; BAILEY-SERRES, J. Regulated heterogeneity in 12-kDa P-protein phosphorylation and composition of ribosomes in maize (*Zea mays* L.). **J Biol Chem** 276: 10921–10928. 2001.

TAIZ, T; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2006.722p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2013.918p.

TCHOUTO, M.G.P; YEMEFACK, M.; DE BOER, W.F.; DE WILDE, J.J.F.E; VAN DER MAESEN, L. J.G; CLEEF, A.M. Biodiversity hotspots and conservation priorities in the Campo-Ma'narain forests, Cameroon. **Biodiversity and Conservation** 15: 1219–1252. 2006.

TEMPE, D. PIECHACZYK, M.; BOSSIS, G. SUMO under stress. **Biochem Soc Trans.** 36:874-878. 2008.

THOMPSON, A.J., JACKSON, A.C., SYMONDS, R.C., MULHOLLAND, B.J., DADSWELL, A.R., BLAKE, P.S., BURBIDGE, A. and TAYLOR, I.B. Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes overproduction of abscisic acid. **Plant Journal**, Michigan, USA, 23, 363–374, 2000.

TOH, S.; IMAMURA, A.; WATANABE, A.; NAKABAYASHI, K.; OKAMOTO, M.; JIKUMARU, Y.; HANADA, A.; ASO, Y.; ISHIYAMA, K.; TAMURA, N.; IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y.; NAMBARA, E.; KAWAKAMI, N. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in arabidopsis seeds. **Plant Physiology**, v. 146, pp. 1368-1385. 2008.

TOKUNAGA, T.A. **A cultura da atemóia**. Campinas: CATI, 2000. 80 p.

TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; DE PINTO, M.C., DE GARA, L. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. **J Exp Bot** 52:1647–1654.2001.

TRAVERSO, J.A.; VIGNOLS, F.; CAZALIS, R.; PULIDO, A.; SAHRAWY, M.; CEJUDO, F.J.; MEYER, Y.; CHUECA, A. PsTRXh1 and PsTRXh2 are both pea h-type thioredoxins with antagonistic behavior in redox imbalances. **Plant Physiol** 143: 300-311. 2007.

VALENCIA, R.; BALSLEV, H.; PAZ Y MIÑO, C. G. High tree alpha-diversity in Amazonian Ecuador. **Biodiversity and Conservation** 3: 21–28. 1994.

VAN DER STRAETEN, D.; RODRIGUES POUSADA, R.A.; GOODMAN, H.M.; VAN MONTAGU, M. Plant enolase-gene structure, expression, and evolution. **Plant Cell** 3:719–735. 1991.

Van GEMERDEN, B.S; OLFF, H.; PARREN, M.P.E; BONGERS, F. The pristine rain forest? Remnants of historical human impacts on current tree species composition and diversity. **Journal of Biogeography** 30: 1381–1390. 2003.

VAN LIJSEBETTENS, M.; VANDERHAEGHEN, R.; DE BLOCK, M.; BAUW, G.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M. An S18 ribosomal protein gene copy at the Arabidopsis PFL locus affects plant development by its specific expression in meristems. **EMBO J** 13: 3378–3388. 1994.

VANDENBUSSCHE, F.; VAN DER STRAETEN, D. One for all and all for one: cross-talk of multiple signals controlling the plant phenotype. **Journal of Plant Growth Regulation**;26:178-187. 2007.

VASCONCELOS, M.; GONDIM, D.C.; GOMES, L.J.; SILVA-MANN, R. Expressão gênica diferencial de sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi. submetidas ao estresse combinado de temperatura e restrição hídrica. **Scientia Plena**, São Cristovão, SE, v.6, n.12, 2010.

VENGLAT, P.; XIANG, D.; QIU, S.; STONE, S.L.; TIBICHE, C.; CRAM, D.; ALTING-MEES, M.; NOWAK, J.; CLOUTIER, S.; DEYHOLOS, M.; BEKKAOUI, F.; SHARPE, A.; WANG, E.; ROWLAND, G.; SELVARAJ, G.; DATLA, R. Gene expression analysis of flax seed development. **BMC PlantBiology**, Canada, v.11, n.74, p. 1-14, 2011.

VERGER, A.; PERDOMO, J.; CROSSLEY, M. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. **EMBO Rep.** 4:137-142. 2003.

VERNOUD, V.; HORTON, A.C.; YANG, Z.; NIELSEN, E. Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. **Plant Physiol** 131 1191-1208. 2003.

VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Kigel J, Galili G, eds. **Seed development and germination**. New York, NY: Marcel Dekker, 237-271. 1995.

VERWOERT, I.I.G.S.; BROWN, A., SLABAS, A.R.; STUITJE, A.R. A *Zea mays* GTP-binding protein of the ARF family complements na *Escherichia coli* mutant with a temperature-sensitive malonyl-coenzyme A: acyl carrier protein transacylase. **Plant Mol. Biol.** 27, 629-633. 1995.

WANG, M.; VAN DER MEULEN, R.M.; VISSER, K.; VAN SCHAIK, H.P.; VAN DUIJN, B.; DE BOER, A.H. Effects of dormancy-breaking chemicals on ABA levels in barley grain embryos. **Seed Sci Res** 8:129–137. 1998.

WANG, P.; SONG, C.P Guard-cell signaling for hydrogen peroxide and abscisic acid. **New Phytol.** 178:703-718. 2008.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**. Vol 9, n 5. 2004.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet** 10: 57–63. 2009.

WATERBORG, J.H.; ROBERTSON, A.J. Common features of analogous replacement histone H3 genes in animals and plants. **J Mol Evol** 43:194–206. 1996.

WATERS, D.L.E.; HOLTON, T.A.; ABLEFF, E.M.; LEE, L.S.; HENRY, R.J. cDNA microarray analysis of developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) berry skin. **Funct. Integr. Genomics**, 5, 40-58. 2005.

WEI, G.; TAO, Y.; LIU, G.; CHEN, C.; LUO R, et al. A transcriptomic analysis of superhybrid rice LYP9 and its parents. **Proc Natl Acad Sci USA** 106: 7695-7701. 2009.

WILHELM, B.T.; LANDRY, J.R. RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. **Methods**. Jul;48(3):249-57. 2009.

WILLIAMS, M.E.; SUSSEX, I.M. Regulação do desenvolvimento de genes de proteínas ribossomais L16 em *Arabidopsis thaliana*. **Planta J.** 8 (1):65-76. 1995.

WOLD, F.; BALLOU, C.E. Studies on the enzyme enolase. **J. Biol. Chem.** 227:301-328. 1957.

WONG, J.; JIAO, J.A.; KOBREHEL, K.; BUCHANAN, B. Thioredoxin-dependent deinhibition of pullulanase of barley malt by inactivation of a specific inhibitor protein. **Plant Physiol** 108: 67. 1995.

WONG, J.H.; KIM, Y.B.; REN, P.H.; CAI, N.; CHO, M.J.; HEDDEN, P.; LEMAUX, P.G.; BUCHANAN, B.B. Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 16325-16330. 2002.

XIANG, D.; VENGLAT, P.; TIBICHE, C.; YANG, H.; RISSEUW, E. et al. Genome-wide analysis reveals gene expression and metabolic network dynamics during embryo development in *Arabidopsis*. **Plant Physiol** 156: 346-356. 2011.

XU, H.; GAO, Y.; WANG, J. Transcriptomic Analysis of Rice (*Oryza sativa*) Developing Embryos Using the RNA-Seq Technique. **PLoS ONE**. Canadá. 7(2): e30646. 2012.

YAMAGUCHI, S. Gibberellin metabolism and its regulation. Annual Review of. **Plant Biology** 59, 225-251. 2008.

YAMAUCHI, Y.; TAKEDA-KAMIYA, N.; HANADA, A.; OGAWA, M.; KUWAHARA, A.; SEO, M.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds. **Plant Cell Physiol.** 48: 555–561. 2007.

YANO, H.; WONG, J.H.; CHO, M.J.; BUCHANAN, B.B. Redox changes accompanying the degradation of seed storage proteins in germinating rice. **Plant Cell Physiol** 42: 879-883.2001a.

- YI-JIUN, C.; MIIN-FENG, W.; YUEH-HSIANG, Y.; MING, F. T.; TSAI-YUN, L. Developmental Expression of Three Mungbean Hsc70s and Substrate-binding Specificity of the Encoded Proteins. **Plant Cell Physiol.** 45(11): 1603–1614. 2004.
- YOO, C.-M.; JIANGQI, W.; MOTES, C. M.; SPARKS, J.A.; BLANCAFLOR, E.B. A Class I ADP-Ribosylation Factor GTPase-Activating Protein Is Critical for Maintaining Directional Root Hair Growth in Arabidopsis. **Plant Physiol.** 147(4): 1659–1674. 2008.
- YOO, C.Y.; MIURA, K.; JIN, J.B.; LEE, J.; PARK, H.C.; SALT, D.E. et al. SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermotolerance in Arabidopsis independent of salicylic acid. **Plant Physiol.** 142:1548-1558. 2006.
- ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FUTIHATA, Y.; NORAMURA, Y.I, ESASHI, Y. A machanism of seed deterioration in relation to volatiles produced by dry seeds themselves. **Seed Science Research**, v.4, n.1, p.49-56, 1994.
- ZHENG, Y.; SCHUMAKER, K. S.; GUO, Y. Sumoylation of transcription factor MYB30 by the small ubiquitin-like modifier E3 ligase SIZ1 mediates abscisic acid response in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. vol. 109. n. 3, 12822-12827. 2012.
- ZHOU, J. M.; GOLDSBROUGH, P. B. Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in Arabidopsis. **Molecular & General Genetics**, 248, 318-328. 1995.
- ZHOU, Y. L.; CHU, P.; CHEN, H. H.; LI, Y.; LIU, J.; DING, Y.; TSANG, E. W. T.; JIANG, L. W.; WU, K. Q.; HUANG, S. Z. Overexpression of *Nelumbo nucifera* metallothioneins 2a and 3 enhances seed germination vigor in Arabidopsis. **Planta**, 235, 523-537. 2012.