



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Fábio César Sousa Nogueira

Análise Proteômica da Deposição de Proteínas em Sementes em
Desenvolvimento e Suspensões Celulares Embriogênicas de
Feijão-de-Corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

Fortaleza - CE

2007

FÁBIO CÉSAR SOUSA NOGUEIRA

Análise Proteômica da Deposição de Proteínas em Sementes em Desenvolvimento e
Suspensões Celulares Embriogênicas de Feijão-de-Corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.].

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

Orientador: Prof. Francisco de A. P. Campos

Fábio César Sousa Nogueira

FÁBIO CÉSAR SOUSA NOGUEIRA

Análise Proteômica da Deposição de Proteínas em Sementes em Desenvolvimento e
Suspensões Celulares Embriogênicas de Feijão-de-Corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.].

Aprovada em: 22/06/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Francisco A. P. Campos
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Prof. Gilberto Barbosa Domont
Instituto de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Márcio José da Silva
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
Universidade de Campinas

*“Ser algum pode em nada desfazer-se!
Em todos eles se agita sempre o eterno.
Confia, alegre e feliz, sempre no Ser.
Que o ser é eterno; pois existem leis para
conservar os tesouros da vida, às quais o
Universo recorre para tirar beleza.”*

Goethe, Testamento

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Francisco de Assis Paiva Campos**, a quem devo grande parte do meu conhecimento intelectual. Agradeço a confiança depositada em mim e a orientação desse trabalho.

Ao **Prof. Gilberto Barbosa Domont**, por ceder gentilmente o espaço de seu laboratório, pelo apoio intelectual e pela amizade.

Ao **Dr. Márcio José da Silva**, por aceitar participar da banca examinadora dessa dissertação.

Ao **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular** da Universidade Federal do Ceará e **aos professores** desse departamento.

À **Marise**, que ajudou nas análises dos resultados de espectrometria de massa realizados nesse trabalho.

Ao **Magno**, pelo auxílio durante a realização desse trabalho. Por me receber de braços abertos em sua casa no período em que fiquei em Dresden (Alemanha).

Aos amigos, **Érico Augusto e Petrônio Augusto**, pelas trocas de experiência.

Ao **Abdul**, companheiro de grandes momentos durante o período do mestrado e pelos simples momentos, como cafezinho pela manhã.

Ao **Thiago**, que aceitou a tarefa árdua e prazerosa de encarar a química de proteínas.

Aos mais antigos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas: **Juliana Brasil, Emmanuel, Camila e Eduardo**. E aos novos integrantes do laboratório **Emanuela, Juliana Vaez, Irlaine, Nicodemos, Rafael, Nicolas e Felipe**.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Ao **Cleverson** e à **Janne**, pela amizade e apoio.

Aos meus pais, **Maria de Fátima e Sousa e Plínio Nogueira Maciel**, pelo carinho e pela dedicação em minha criação, obrigado por me propiciarem a vida. Mãe, obrigado por levantar minha cabeça sempre que ela estava com “sono”.

Aos meus irmãos, **Plínio Nogueira Maciel, Luís Carlos Sousa Nogueira e Ricardo Sérgio Sousa Nogueira**, pelo companheirismo.

À **Virgínia Paiva Figueiredo**, por ser o abrigo que me traz paz, compreensão e amor.

À minha tia, **Rita Liduína**, por conceder um lugar no seu lar, onde eu fiquei hospedado durante as temporadas no Rio de Janeiro.

Aos novos membros da família, **Amarildo, Seu Carlos (Tito), Dona Tereza, Débora, Alexandre, André, Aline, Sáfia** (minha querida e única afilhada) e **Vanderléia** (minha comadre).

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Pós-Graduação ao autor deste trabalho.

Banco do Nordeste (BNB), por concessão de auxílio à pesquisa através do Projeto de Pesquisa “Genômica Funcional, Estrutural e Comparativa do Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*)” (MCT/BNB, Programa RENORBIO – Rede Nordeste de Biotecnologia).

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios esta pesquisa foi realizada.

Laboratório de Química de Proteínas – Unidade de Proteômica do Instituto de Química (UFRJ), onde parte desta pesquisa foi realizada.

RESUMO

O feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) é uma leguminosa bastante utilizada na alimentação de famílias de baixa renda da região nordeste do Brasil. Embora suas sementes sejam ricas em proteínas, estas são deficientes em aminoácidos sulfurados na sua composição. Dessa forma, um aumento na qualidade nutricional dessas sementes é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético para essa espécie. Além de determinar o padrão de deposição de proteínas durante o desenvolvimento de embriões zigóticos e somáticos, nós pretendemos identificar genes com padrões específicos de expressão durante a embriogênese com a finalidade de utilizá-los em programas de melhoramento genético. Utilizando a técnica de eletroforese bidimensional (2D-PAGE) foi comparado o padrão proteico de sementes em desenvolvimento com 10 dias após a antese (DAA), sementes maduras e de suspensões celulares embriogênicas (SCE) obtidas de calos embriogênicos friáveis (CEF) de feijão-de-corda. Para cada estágio de desenvolvimento da semente e para as SCE foram obtidos mapas de referência proteômicos altamente reprodutíveis numa faixa de pH de 3-10 e 4-7. Vários “spots” foram selecionados baseando-se na quantidade ou volume relativo de cada “spot” e na taxa de expressão. Cerca de 800 (para sementes em desenvolvimento) e 130 (para SCE) “spots” protéicos regulados para cima, para baixo, que se mantêm constantes ou que são específicos durante o desenvolvimento foram retirados dos géis 2D para análise por espectrometria de massa. Algumas estratégias foram utilizadas para a identificação das proteínas, como: PMF (*peptide mass fingerprinting*) e busca através de dados não processados (*MS/MS ion search*). Dessa forma, cerca de 400 proteínas foram identificadas em sementes e cerca de 70 proteínas foram identificadas para SCE. A maioria das proteínas foram classificadas como proteínas do metabolismo primário, energético, proteínas de destinação/proteínas de reserva e proteínas de defesa ou relacionadas a algum tipo de estresse.

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata*) is a leguminous plant highly utilized by low-income earners of Northeastern Brazil. However, proteins found in the crop are highly deficient in sulfur-containing amino acids. In line with this, improvement of nutritional quality of cowpea seeds has been one of the major goals of breeding programs of the crop. A starting point in this respect is a concerted effort to study the basic biochemical and physiological aspects of the development of cowpea seed. Besides determining the protein deposition pattern during the development of zygotic embryos and somatic embryos of the species, we set out to identify genes with specific pattern of expression during the two processes which will be of immense importance in cowpea breeding. Using the technique of two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE), we compared the protein deposition pattern of developing cowpea seeds with 10 days after anthesis (DAA) and mature seeds and embryogenic cell suspension (ECS). From each developmental stage and for ECS, we obtained proteomic reference maps that were highly reproducible within the pH of 3-10 and 4-7. Various spots were selected based on quantity or relative volume and rate of expression. About 800 (for seeds development) and 130 (for ECS) proteins spots up- or down-regulated, remained constantly expressed and were specific for each developmental stage. The spots were removed from the 2-D gels, processed, and subjected to mass spectrometry. Some strategies like peptide mass fingerprinting (PMF) and non-processed data search (MS/MS ion search) were employed for protein identification. Over 400 proteins in seeds and over 70 proteins in ECS were identified. A large number of these proteins were found to be primary metabolism proteins, energy, protein destination and storage and defense proteins and others related to stress.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
SUMÁRIO	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. O feijão-de-corda	18
1.2. Embriogênese vegetal	20
1.2.1. Proteínas relacionadas com a embriogênese e desenvolvimento da semente.....	22
1.2.1.1. Proteínas de reserva.....	23
1.2.1.2. Proteínas LEA.....	23
1.2.1.3. Proteínas relacionadas à patogênese.....	24
1.3. A “era pós-genômica” e as técnicas de análise proteômica	25
1.3.1. A eletroforese bidimensional.....	26
1.3.2. A espectrometria de massa.....	26
1.3.3. Identificação de proteínas por espectrometria de massa.....	28
1.3.4. Proteômica de plantas.....	30
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Coleta do material biológico e estabelecimento da curva de peso fresco das sementes em desenvolvimento de feijão-de-corda (<i>V.</i> <i>unguiculata</i>)	35
3.2. Estabelecimento dos calos embriogênicos e das suspensões celulares embriogênicas de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>)	35
3.3. Extração de proteínas	37
3.3.1. Processamento do material biológico.....	37

3.3.2. Extração de proteínas totais com tampão piridina.....	37
3.3.3. Extração com tampão fosfato de potássio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0 e fracionamento em albuminas e globulinas.....	38
3.4. Dosagem de proteínas.....	38
3.5. Eletroforese bidimensional, revelação e análise da imagem.....	38
3.6. Seleção e processamento dos <i>spots</i> para espectrometria de massa.....	39
3.7. Espectrometria de massa.....	40
3.8. Pesquisa no banco de dados.....	40
3.9. Síntese de um peptídeo, preparação do antisoro e análise por western blot.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1. Análise proteômica das suspensões celulares embriogênicas (SCE) do feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>).....	44
4.1.1. Estabelecimento dos mapas de referência bidimensionais.....	44
4.1.2. Identificação das proteínas presentes em SCE.....	44
4.1.3. Classificação funcional das proteínas de SCE.....	51
4.2. Análise proteômica da deposição de proteínas em sementes do feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>).....	59
4.2.1. Estabelecimento dos mapas proteômicos de sementes com 10 DAA e sementes maduras.....	61
4.2.2. Identificação de proteínas presentes em sementes com 10 DAA e sementes maduras.....	65
4.2.3. Classificação funcional das proteínas de sementes.....	89
4.2.3.1. Proteínas dos grupos metabolismo e energia.....	91
4.2.3.2. Proteínas do grupo destinação de proteínas/proteínas de reserva.....	93
4.2.3.3. Proteínas do grupo doença/defesa.....	95
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	98
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
7. ANEXOS.....	111

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1 - Desenvolvimento de sementes do feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>).	36
2 - Mapas de referência de suspensões celulares embriogênicas (SCE) de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>).	46
3 - Mapas de referência de suspensões celulares embriogênicas (SCE) de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>) com os “spots” selecionados para análise no espectrômetro de massa.	47
4 - Distribuição funcional relativa das proteínas identificadas em suspensão celular embriogênica de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>).	52
5 - Análise por espectrometria de massa dos peptídeos trípticos eluídos do “spot” 94.	56
6 - Detecção no feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>) de proteínas que reagem com anticorpos produzidos contra o peptídeo HSKGDAPPNEDELK, correspondente a uma sequência próxima ao C-terminal da proteína PR-10.	57
7 - Análise por western blot da expressão da proteína PR-10 em suspensão celular embriogênica de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>).	58
8 - Desenvolvimento das sementes de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>).	60
9 - Mapas de referência de sementes com 10 DAA e sementes maduras de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>).	62
10 - Mapas de referência das frações ricas em albuminas de sementes com 10 DAA e sementes maduras de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>).	63
11 - Mapas de referência das frações ricas em globulinas de sementes com 10 DAA e sementes maduras de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>).	64

12 - Análise por espectrometria de massa dos peptídeos trípticos eluídos do “spot” A54.	68
13 - Mapas de referência de sementes com 10 DAA de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>) com os “spots” selecionados para análise no espectrômetro de massa.	69
14 - Mapas de referência da fração rica em albumina (FA) de sementes em desenvolvimento (10 DAA) do feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>) com os “spots” selecionados para análise no espectrômetro de massa.	70
15 - Mapas de referência da fração rica em globulina (FG) de sementes com 10 DAA e sementes maduras do feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>) com os “spots” selecionados para análise no espectrômetro de massa.	71
16 - Mapas de referência de sementes maduras de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>) com os “spots” selecionados para análise no espectrômetro de massa.	72
17 - Mapas de referência da fração rica em albumina (FA) de sementes maduras do feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>) com os “spots” selecionados para análise no espectrômetro de massa.	73
18 - Distribuição funcional relativa das proteínas identificadas em sementes com 10 DAA e sementes maduras de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>).	90
19 - Padrão de deposição de glubulinas 7S/8S em sementes com 10 DAA e sementes maduras de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>).	94

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1 - Lista das proteínas de suspensões celulares embriogênicas de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>) identificadas por MS e MS/MS.	48
2 - Lista das proteínas de sementes com 10 DAA de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>) identificadas por MS e MS/MS.	74
3 - Lista das proteínas de sementes com 18 DAA de feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i>) identificadas por MS e MS/MS.	81

ABREVIATURAS

CEF.....	Calos embriogênicos friáveis
2,4-D.....	2,4 ácido diclorofenoxiacético
ABA.....	Ácido Abscísico
2D.....	Eletroforese bidimensional
SCE.....	Suspensão celular embriogênica
DAA.....	Dia após antese
DTT.....	Ditiotreitol
IAA.....	Iodoacetamida
IPG.....	Gradiente de pH imobilizado
EST.....	Expressed sequence tag
LEA.....	Late embryogenesis abundant
PRP.....	Proteínas relacionadas com a patogênese
m/z.....	Relação massa/carga
MALDI-TOF.....	Matrix assisted laser desorption ionization – Time of flight
FA.....	Fração rica em albuminas
FG.....	Fração rica em globulinas
MS.....	Mass spectrometry
PMF.....	Peptide mass fingerprint – “Impressão digital da massa do peptídeo”
PSA.....	Persulfato de amônio
PVPP.....	Polivinilpolipirrolidona
SDS.....	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE.....	SDS-Poliacrilamida gel eletroforese
TCA.....	Ácido tricloroacético
TFA.....	Ácido trifluoroacético
NCBI.....	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
KEGG.....	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>

1. INTRODUÇÃO

O feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp.) é uma das mais importantes leguminosas cultivadas em regiões semi-áridas. Por ser tolerante a escassez de água, temperaturas elevadas, prosperar em solos pobres, ele está bem adaptado às regiões semi-áridas dos trópicos, onde outros legumes não se desenvolvem bem (Singh *et al.*, 2003). Essa cultura também é uma importante fonte de carboidratos, lipídios, minerais, vitaminas, incluindo folato, tiamina e riboflavina e, principalmente, proteínas para a população de baixa renda (Phillips *et al.*, 2003).

Essa espécie tem sido alvo de programas de melhoramento genético, tanto para melhorar características nutricionais de suas sementes, quanto para torná-lo resistente às pragas, à seca e à salinidade do solo (Ehlers e Hall, 1997; Babaoglu *et al.*, 2000; Somers *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Popelka *et al.*, 2004; Aragão e Campos, 2007). A utilização de modernas ferramentas biotecnológicas é dificultada pela falta de técnicas de cultura de tecidos que produzam células capazes de regenerar-se em uma planta completa e de protocolos para a inserção de transgenes em células competentes.

Tentativas de regenerar o feijão-de-corda *via* embriogênese somática estão sendo adotadas, pois tecidos ou células embriogênicas são excelentes alvos para a transformação genética (Arnold *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2006; Aragão e Campos, 2007). Alguns tecidos foram usados como explantes para a indução de calos embriogênicos friáveis (CEF), como folhas primárias (Muthukumar *et al.*, 1995; Ramakrishnan *et al.*, 2005a, b), cotilédones e eixo embrionário de embriões zigóticos maduros (Gonçalves, 2004). Embora os CEF sejam capazes de diferenciar-se em embriões maduros (Ramakrishnan *et al.*, 2005a, b), a frequência de recuperação é baixa, o que limita a utilização desses CEF como alvos para a transformação genética.

Os estudos relacionados com a fisiologia e bioquímica da embriogênese zigótica e embriogênese somática, assim como da formação das sementes são de suma importância quando se pretende abordar as técnicas de melhoramento genético, como, por exemplo, na utilização de tecidos ou células embriogênicas e na identificação de genes específicos relacionados à totipotência. Há muito interesse em identificar e entender o padrão de expressão de proteínas nos diferentes estágios da embriogênese e do desenvolvimento da semente. Métodos de identificação de proteínas em larga escala têm sido utilizados recentemente neste sentido e trabalhos com uma abordagem proteômica foram realizados para diferentes espécies de plantas: *Arabidopsis* (Gallardo *et al.*, 2001; Gallardo *et al.*, 2002; Chibani *et al.*, 2006, Higashi *et al.*, 2006), *Medicago truncatula* (Watson *et al.*,

2003; Gallardo *et al.*, 2003; Imin *et al.*, 2004; Imin *et al.*, 2005; Lei *et al.*, 2005) e soja (*Glycine max*) (Mooney *et al.*, 2004; Hajduch *et al.*, 2005; Natarajan *et al.*, 2005).

Neste trabalho, dados sobre o desenvolvimento da semente do feijão-de-corda e a identificação de muitas proteínas por espectrometria de massa são reportados. Este estudo não somente catalogou as proteínas identificadas, mas também descreveu seu padrão de acumulação em específicos estágios do desenvolvimento da semente, antes e depois do período de dessecação. Estes dados são uma contribuição importante para o nosso entendimento de como as redes metabólicas são reguladas durante a deposição de reservas e obtenção da tolerância a dessecação. Este trabalho também mostra a identificação de proteínas presentes em suspensões celulares embriogênicas (SCE) preparadas a partir de CEF e o papel delas na embriogênese. Este conhecimento ajudará a esclarecer questões fundamentais da embriogênese somática, como melhorar a frequência de obtenção de plantas completas através desse método e como as células adquirem competência de entrarem numa rota metabólica embriogênica.

1.1. O feijão-de-corda

O feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., é uma angiosperma dicotiledônea pertencente a Divisão Magnophyta, Classe Magnoliopsida, Subclasse Rosidae, Ordem Rosales, Família Fabaceae, Subfamília Papilionoideae, Tribo Phaseoleae, Subtribo Phaseolinae. Embora tenha pertencido a outros gêneros, *Phaseolus* e *Dolichos*, sua classificação atual como *Vigna* é mundialmente aceita. Esta espécie apresenta uma ampla distribuição geográfica e é especialmente adaptada às condições do semi-árido (Freire-Filho, 1988). A subespécie *unguiculata* reúne todas as formas cultivadas de feijão-de-corda e engloba os cultigrupos: *unguiculata*, a forma mais comum; *biflora* ou *catjang*, caracterizado pelas pequenas vagens eretas, encontrado mais frequentemente na Ásia; *sesquipedalis*, também achado na Ásia, é caracterizado pela sua grande vagem; e *textilis*, achado na África Ocidental (Freire-Filho, 1988; Ehlers e Hall, 1997).

O feijão-de-corda é uma das mais importantes leguminosas cultivadas em regiões semi-áridas, porque é tolerante a escassez de água, temperaturas elevadas, relativa capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e prosperar em solos com mais de 85% de areia, menos de 0,2% de matéria orgânica e baixos níveis de fósforo (Singh *et al.*, 2003).

Vários são os países produtores de feijão-de-corda no mundo. Eles se concentram na África, Ásia e América Central e do Sul. As maiores produções de feijão-de-corda são

registradas na Índia, no Brasil, na Nigéria e em outros países africanos (Singh *et al.*, 2003). No Brasil, onde se encontram boas condições de clima e solo, o feijão-de-corda é cultivado, predominantemente, nas regiões Norte e Nordeste do país (Araújo e Watt, 1988). Essa espécie tem uma importância muito grande para a sociedade brasileira, para a agricultura nordestina e, em especial, para o Estado do Ceará, onde ocupa uma área de 579.221 hectares, distribuída sem exceções, por todos os municípios. O feijão-de-corda é a principal fonte de proteínas, minerais e vitaminas para a população de baixa renda, que possui sérias carências protéicas e alimentares, não só das regiões Norte e Nordeste do Brasil, mas também, para as demais regiões do país (Araújo e Watt, 1988).

Apesar de ser disponibilizada uma grande área para a plantação do feijão-de-corda a produção obtida é baixa. Há um rendimento inferior aos obtidos experimentalmente e uma instabilidade na produção de ano a ano. Além dos fatores climáticos, no que concerne às secas, comuns no Nordeste brasileiro, fatores de origem abiótica (baixa fertilidade, salinidade e pH do solo, temperaturas elevadas, excesso de umidade, etc) e fatores de origem biótica (pragas e doenças) também são responsáveis pela instabilidade da produção de feijão-de-corda. Também podem-se constatar outros fatores, como: a utilização de áreas menos favoráveis à exploração da cultura; o caráter de subsistência onde são adotados o mínimo de tecnologias, já disponíveis; a ocupação das áreas exploradas pela cultura com outras espécies vegetais, consideradas de maior importância econômica e; a falta de uma política agrícola que garanta financiamento e aquisição do produto (Azevedo e Biserra, 1991; Singh *et al.*, 2003).

Com o objetivo de superar as adversidades encontradas no cultivo do feijão-de-corda, numerosos programas de melhoramento estão sendo desenvolvidos em vários países, eles visam um aumento da produtividade, uma maior qualidade dos grãos, um aumento na qualidade nutricional das sementes, uma maior resistência às secas e temperaturas severas e a resistência às pragas e doenças. Os métodos de melhoramento tradicionais principalmente utilizados são aqueles que exploram a variabilidade genética disponível nas populações originais e as que exploram a variabilidade criada pela hibridação. As novas tecnologias de melhoramento aplicam a biotecnologia como ferramenta para o melhoramento do feijão-de-corda, fornecendo, assim, novas possibilidades no aumento da produtividade dessa espécie (Aragão e Campos, 2007). O conhecimento de genes de resistência às doenças e pragas, a cultura de células vegetais *in vitro* e os programas de transformação genética são de grande valia para o melhoramento

dessa espécie. Alguns trabalhos citam a utilização da biotecnologia no melhoramento do feijão-de-corda e de outros legumes (Ehlers e Hall, 1997; Babaoglu *et al.*, 2000; Somers *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Popelka *et al.*, 2004; Popelka *et al.*, 2006).

1.2. Embriogênese vegetal

O desenvolvimento da semente é um processo importante no ciclo de vida de uma angiosperma. Ele se inicia com o processo da dupla fertilização, que conduz ao desenvolvimento do embrião zigótico e do endosperma. Em plantas diplóides, o desenvolvimento do embrião inicia com a fertilização de um ovo haplóide por um dos núcleos espermáticos, originando assim, um zigoto diplóide. Já o desenvolvimento do endosperma triplóide é iniciado quando a célula homodiplóide central é fertilizada por um segundo núcleo espermático (Chaudhury *et al.*, 2001). O desenvolvimento combinado do embrião e dos tecidos do endosperma, cada qual com diferentes ploidias, ocorre dentro dos tecidos do óvulo materno circundado por camadas esporofíticas diplóides dos integumentos internos e externos. Assim, a interação das diferentes combinações dos genomas define o desenvolvimento da semente. O entendimento da atividade dos genes em tecidos de diferentes ploidias e de diferentes origens é importante para conhecer detalhadamente o desenvolvimento das sementes (Chaudhury *et al.*, 2001).

Segundo Dodeman *et al.* (1997), o desenvolvimento da semente pode ser dividido em dois principais passos, o primeiro é a embriogênese *sensu stricto* iniciando com o zigoto e terminando com o estágio cotiledonar e o segundo passo é a maturação da semente sucedida pela germinação. Com relação à embriogênese *sensu stricto*, estudos com a *Arabidopsis thaliana* tem realçado que no desenvolvimento do embrião, ele passa através dos estágios globular, alongado, coração, torpedo, e cotiledonar e eventualmente para o embrião maduro desidratado. Estes estágios podem ser subdivididos dentro de uma sequência de 20 diferentes estágios representados por três principais eventos: i) a primeira divisão assimétrica do zigoto, formado por uma pequena célula apical que gera o embrião e uma grande célula basal que formará o suspensor, ii) um padrão específico de formação que origina um embrião globular e, iii) a transição do estágio cotiledonar que coincide com a iniciação das raízes rudimentares seguida, em dicotiledôneas, pelas partes aéreas rudimentares. Neste estágio a embriogênese *sensu stricto* pode ser considerada completa. A partir desse momento, em nível morfogenético, inicia-se a atividade meristemática e em nível fisiológico, os processos de crescimento, acumulação de reservas e maturação.

Mudanças fisiológicas como dissecação e, em muitos casos, quiescência, completam o processo de formação da semente. O fortalecimento e lignificação dos integumentos do óvulo resultam na formação de uma pele necessária para a conservação da semente (Dodeman *et al.*, 1997).

Algumas sementes podem ser produzidas sem que haja fertilização, através de diferentes vias, todas conjuntamente conhecidas como apomixia (Dodeman *et al.*, 1997). Este termo descreve a formação de um embrião no óvulo a partir de células somáticas (não sexuais). A embriogênese pode também surgir a partir de células somáticas isoladas ou mesmo células gaméticas. Observa-se naturalmente em alguns vegetais a formação espontânea de embriões somáticos no corte de folhas ou *in vitro* depois de uma indução experimental (Dodeman *et al.*, 1997). Nota-se, então, que a embriogênese somática é um processo que ocorre normalmente na natureza e que pode ser mimetizado *in vitro*.

A embriogênese somática é o processo pelo qual células ou tecidos somáticos desenvolvem-se até a formação completa de uma planta através de uma série de estágios, característicos do desenvolvimento de embriões zigóticos. Grupos de genes que são ativos nas células dos cotilédones de embriões zigóticos são também ativos em células análogas durante a embriogênese somática (Goldberg *et al.*, 1989). Este desenvolvimento envolve expressões diferenciais dos genes conferindo às células somáticas a habilidade para manifestar um potencial embriogênico (Chugh e Khurana, 2002). Imin *et al.* (2004) afirmam que a embriogênese somática é especialmente utilizada para a obtenção de plantas transgênicas. Apesar de uma eficiente indução da embriogênese somática, a recuperação de plantas do grupo das Leguminosae é limitada a poucas espécies (Lakshmanan e Taji, 2000). No caso do feijão-de-corda, a obtenção de embriões somáticos com a finalidade de transformação dessa espécie pode ser desenvolvida utilizando-se diferentes tecidos. Alguns trabalhos reportam a indução e formação de embriões somáticos a partir de suspensões celulares provenientes de calos embriogênicos friáveis (Gonçalves, 2004; Ramakrishnan *et al.*, 2005a; Ramakrishnan *et al.*, 2005b), calos derivados de folhas primárias (Muthukumar *et al.*, 1995), cotilédones e eixo embrionário de embriões zigóticos maduros (Gonçalves, 2004) e cotilédones imaturos (Anand *et al.*, 2001).

A embriogênese zigótica e somática são fenômenos complexos que são amplamente descritos na literatura (Goldberg *et al.*, 1989; Dodeman *et al.*, 1997; Lakshmanan e Taji, 2000; Chaudhury *et al.*, 2001; Chugh e Khurana, 2002). Ambos os tipos de embriogênese são bastante estudados utilizando-se abordagens genéticas, que identificam marcadores

moleculares relacionados a estágios específicos do desenvolvimento. O foco deste trabalho estará na identificação de proteínas expressas nos diferentes estágios do desenvolvimento das sementes e em suspensões celulares embriogênicas.

1.2.1. Proteínas relacionadas com a embriogênese e desenvolvimento da semente

Embriões vegetais expressam um grande número de genes, que diferem espacialmente, no eixo embrionário e no cotilédone (Borisjuk *et al.*, 1995). Embora, alguns dos genes importantes para a embriogênese sejam também expressos em tecidos vegetativos. O estudo com embriões mutantes está possibilitando um maior conhecimento das funções desempenhadas pelos genes no desenvolvimento embrionário (Dodeman *et al.*, 1997). O gene STM tem um importante papel na função do meristema apical e representa o primeiro gene envolvido na função de regulação específica durante a embriogênese vegetal. Os genes CLAVATA 1 (CLV 1) e CLV 3 controlam a diferenciação celular. Os genes CLV e STM apresentam papéis opostos ou competitivos na regulação da atividade meristemática (Dodeman *et al.*, 1997). O gene SERK é altamente expresso em células jovens que se desenvolvem em embriões e pode aumentar a competência embriogênica de células cultivadas *in vitro*. O fator de transcrição WUSCHEL (WUS) promove embriogênese e é um gene chave que regula a manutenção de células indiferenciadas no meristema apical e floral. O LEC 1 (Leafy Cotyledon 1), uma subunidade do fator de transcrição HAP 3, está envolvido na maturação do embrião. O LEC 1 é reprimido por WUS que por sua vez é reprimido por CLV 3 (Imin *et al.*, 2004). A expressão de genes em embriões vegetais sugere uma complexidade a nível molecular que não é aparente numa perspectiva anatômica. Ressalta-se a importância entre reguladores positivos e negativos da manutenção e diferenciação do embrião.

Os estágios de desenvolvimento das sementes são caracterizados pela acumulação de distintos grupos de proteínas no embrião e endosperma. Essas proteínas são altamente reguladas durante esse processo. Embora não se entenda bem o papel de todas as proteínas acumuladas durante a embriogênese e armazenadas na semente seca, as proteínas de reserva servem, principalmente, como fonte de carbono e nitrogênio para germinação das sementes. A acumulação de proteínas de reserva, marcador da fase de maturação, é seguida pela acumulação de proteínas coletivamente designadas pelo acrônimo inglês LEA (*late embryogenesis abundant*), que podem ser induzidas por ABA (ácido abscísico) e que participam da tolerância à dessecação (Goldberg *et al.*, 1989; Dodeman *et al.*, 1997).

1.2.1.1. Proteínas de Reserva

As proteínas de reservas são classificadas com base na sua extração e solubilidade em água (albuminas), solução salina diluída (globulinas), solução alcoólica (prolaminas) e solução ácida ou básica diluída (glutelinas) (Shewry *et al.*, 1995).

A maioria das proteínas em sementes de legumes consiste de proteínas de reserva de caráter globulínico, que são sintetizadas durante o desenvolvimento das sementes, estocadas em corpos protéicos e hidrolisadas durante a germinação com a finalidade de fornecer aminoácidos ou esqueletos de nitrogênio e carbono para o desenvolvimento das plântulas. As demais proteínas são, principalmente, albuminas que incluem proteínas de reserva, de manutenção, lectinas, lipoxigenases, entre outras (Shewry *et al.*, 1995; Dodeman *et al.*, 1997; Maruyama *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003).

As globulinas são geralmente classificadas como proteínas 11S/12S (leguminas) e 7S/8S (vicilinas) de acordo com seu coeficiente de sedimentação. Essas proteínas são oligoméricas, e quando submetidas à dissociação, originam polipeptídeos heterogêneos. Essa heterogeneidade é evidente pelo tamanho e pela carga dos polipeptídeos, e resulta de uma combinação de dois fatores, origem multigênica de cada globulina e modificações pós-traducionais. As principais proteínas de reserva do feijão-de-corda são as globulinas 7S ou vicilinas, que são responsáveis pelo valor nutricional da semente (Pedalino *et al.*, 1992; Shewry, *et al.*, 1995; Duranti e Gius, 1997). Recentemente a composição das proteínas de cotilédones do feijão-de-corda foi analisada por Freitas *et al.* (2004), neste trabalho as globulinas totais foram fracionadas e as principais globulinas foram nomeadas de α -, β - e γ -vignina.

1.2.1.2. Proteínas LEA

Um importante grupo de proteínas envolvido com o desenvolvimento da semente são as proteínas LEA. Proteínas LEA são classificadas em pelo menos cinco grupos, de acordo com suas seqüência de aminoácidos (Wise, 2003). Geralmente, a presença de proteínas LEA está correlacionada com a tolerância à dessecação. Elas acumulam-se em altos níveis durante o desenvolvimento das sementes no final da fase de maturação, onde a semente começa a perder água. Nessa fase, as proteínas LEA têm um papel no estabelecimento da tolerância à dessecação, atuando como osmoprotetores ou chaperonas. Outra função mais específica desempenhada por essas proteínas é de seqüestrar íons ou metabólitos durante a dessecação (Delseny *et al.*, 2001). O hormônio vegetal ABA (ácido

abscísico) tem um papel chave no controle dos processos fisiológicos e moleculares envolvidos no desenvolvimento da tolerância à dessecação em sementes, desta forma, a expressão dos genes LEA são altamente regulados pelas concentrações desse hormônio (Campalans *et al.*, 2000; Delseny *et al.*, 2001).

As *dehydrins* são imunologicamente uma distinta família de proteínas, também conhecida como família LEA D11, que tipicamente acumulam-se durante os últimos estágios da embriogênese ou em resposta a aplicação de ABA, baixa temperatura, seca, congelamento e salinidade (Close, 1996; Campbell e Close, 1997). A expressão dos genes que codificam *dehydrins* também esta associada às concentrações do hormônio vegetal ABA, que tem sua concentração aumentada em condições de desidratação. A característica que define as *dehydrins* é a presença de um domínio α -hélice anfipático em sua molécula, o segmento K, que é conservado nas plantas. A presença da *dehydrin* em feijão-de-corda foi reportada por Ismail *et al.* (1999). Os autores demonstraram que o acúmulo de uma *dehydrin* de 35 kDa coincide com o início da fase de desidratação da semente do feijão-de-corda.

1.2.1.3. Proteínas relacionadas à patogênese

A indução de proteínas relacionadas à patogênese foi descrita em muitas espécies vegetais sob infecção de fungos, bactérias, vírus ou pelo ataque de insetos. Essas proteínas são classificadas dentro de 17 famílias de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) (van Loon *et al.*, 2006). Elas ocorrem através de elicitores produzidos pelo patógeno no momento do estabelecimento do contato com a planta. Originalmente, as PRPs foram classificadas com base nas suas características de proteínas vegetais induzidas ou relacionadas com situações patológicas. No entanto, observações posteriores indicaram a presença de PRPs em plantas na ausência de patógenos. Dessa forma, o termo “proteínas relacionadas à patogênese” tornou-se mais abrangente, incluindo as proteínas induzidas por micróbios ou pelo ataque de insetos e seus homólogos presentes nos processos de desenvolvimento de tecidos e órgãos ou em situações de estresse (van Loon e van Strien, 1999; Przymusinski *et al.*, 2004; van Loon *et al.*, 2006).

Muitas PRPs estão presentes em específicos estágios de desenvolvimento. Dentre elas as proteínas das PR-3 e 4, quitinases que ocorrem em tecidos embriogênicos. As das PR-10 (ribonucleases) atuam na regulação dos hormônios vegetais, auxinas e citocininas, e no metabolismo secundário (van Loon *et al.*, 2006). Estresses abióticos também podem

induzir as PRPs, como o efeito da toxicidade do excesso de manganês no apoplasto de folhas de feijão-de-corda mostrado por Fecht-Christoffers *et al.* (2003).

1.3. A “era pós-genômica” e as técnicas de análise proteômica

A automatização do seqüenciamento do DNA mudou consideravelmente o entendimento da biologia. Antes os genes eram caracterizados individualmente, mas nos últimos anos, tornou-se possível identificar completamente a informação contida em um organismo (genoma). O termo genômica foi introduzido para caracterizar a completa informação genética de um organismo (Williams, 1999). O começo da genômica logo provocou a necessidade de se entender a enorme quantidade de dados obtidos pelos programas genômicos, surgindo, assim, a “era pós-genômica”. Sozinha, a seqüência de DNA é incapaz de prever: se e quando os produtos gênicos são transcritos e traduzidos; as concentrações relativas desses produtos; a extensão das modificações pós-traducionais; os efeitos de genes “knock-out” ou superexpressos e; o fenótipo de fenômenos de origem multigênicos, incluindo a administração de drogas, o ciclo celular, a ontogenia, o envelhecimento, o estresse e a doença (Humphery-Smith *et al.*, 1997). Para solucionar esses problemas um novo campo tem ganhado destaque na ciência das proteínas, a proteômica, ou o estudo das proteínas expressas por um genoma (proteoma). Agora é possível perceber a descrição completa, a nível protéico, de um organismo ou tecido sob determinadas condições. Diferentemente do genoma de um organismo, o proteoma é variável, sujeito a mudanças como em estágios desenvolvimento, doenças ou condições ambientais (Pandey e Mann, 2000; Sperling, 2001; Westermeier e Naven, 2002).

O avanço da proteômica foi substancialmente facilitado pelo desenvolvimento de técnicas que ocorreram paralelamente, como: (1) a melhoria na técnica de eletroforese bidimensional possibilitou uma alta resolução e reprodutibilidade dos géis obtidos, a inovação chave foi o desenvolvimento de géis com gradiente de pH imobilizado aplicados à focalização isoeletrica (Görg *et al.*, 1988; Görg *et al.*, 1999; Görg *et al.*, 2000; Görg *et al.*, 2004); (2) um software que analisa as imagens geradas pelos géis, permitindo arquivar as imagens e compará-las com outras; (3) a invenção de novas técnicas de ionização e detecção para os espectrômetros de massas, que possibilitaram a análise de proteínas e peptídeos com alta sensibilidade, acurácia e rapidez, permitindo também a análise de modificações pós-traducionais (Mann *et al.*, 2001; Mann e Jensen, 2003; Aebersold e Mann, 2003; Steen e Mann, 2003); (4) o aumento dos bancos de dados originados pelos

projetos genomas, pois a sequência de DNA de organismos é muito importante para a identificação e caracterização de proteínas com o espectrômetro de massa; e (5) o desenvolvimento no campo da bioinformática tem fornecido ferramentas para combinar e armazenar a grande quantidade de dados produzidos por esses novos métodos de análise (Westermeyer e Naven, 2002).

1.3.1. A eletroforese bidimensional

Em meados da década de 70, uma nova técnica de separação de proteínas foi introduzida por O'Farrel e Klose, independentemente. A eletroforese bidimensional utiliza duas características físico-químicas das proteínas como meio de separação de amostras complexas obtidas de células, tecidos ou outras fontes biológicas. Desse modo, essa técnica ocorre em dois passos: o primeiro passo (primeira dimensão), a focalização isoeletrica (IEF), que separa as proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI); o segundo passo (segunda dimensão), eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), que separa as proteínas de acordo com seu peso molecular (MW). Os spots gerados, de modo geral, correspondem a uma única espécie de cadeia polipeptídica da amostra, e a qualidade e quantidade de cada espécie podem ser determinadas através da revelação do gel com corantes e posterior análise de densitometria. Numa eletroforese bidimensional milhares de proteínas podem ser separadas simultaneamente, também é possível obter informações sobre o pI, a massa molecular e a abundância relativa, assim como modificações pós-traducionais, já que, geralmente, elas provocam mobilidade eletroforética alterada, dessas proteínas (Westermeyer e Naven, 2002).

O poder da eletroforese bidimensional como uma técnica de separação bioquímica foi reconhecido desde sua introdução. Sua aplicação, contudo, tornou-se significativa somente nas últimas décadas, pois a aplicação de gradientes de pH imobilizados para a primeira dimensão mostrou que a técnica é reprodutível o bastante para uma análise proteômica (Görg *et al.*, 1988; Görg *et al.*, 1999; Görg *et al.*, 2000; Görg *et al.*, 2004). Um fator determinante nessa técnica é permitir análises posteriores ao fracionamento, como, por exemplo, por espectrometria de massa (Lambert *et al.*, 2005).

1.3.2. A espectrometria de massa

A espectrometria da massa esta emergindo como uma importante ferramenta na pesquisa bioquímica, por ser altamente sensível e capaz de analisar moléculas grandes e

pequenas. Esta técnica baseia-se na determinação precisa da relação massa-carga (m/z) de íons em fase gasosa. Os íons são gerados pelo ganho ou perda de uma carga (elétron ejeção, protonação ou desprotonação). Uma vez que os íons são formados eles podem ser separados de acordo com a relação m/z e posteriormente detectados. O resultado da ionização, separação dos íons e detecção forma um espectro de massa que pode fornecer a determinação precisa da massa molecular, quantificação de cisteínas, localização de pontes dissulfeto, determinação de modificações pós-traducionais tais como glicosilações e fosforilações, determinação da sequência de aminoácidos e principalmente a identificação de proteínas (Siuzdak, 1996).

O espectrômetro de massa é constituído de três partes: uma fonte de íons, responsável pela introdução de cargas e vaporização da amostra; o analisador de massas, que determina a relação massa carga (m/z); e o detector, que registra o número de íons de cada valor m/z . As fontes de ionização mais comumente usadas para volatilizar e ionizar proteínas ou peptídeos são, a ionização por eletrospray (ESI) e a ionização por dessorção a laser auxiliado por matriz (MALDI). O ESI ioniza um analito que está em solução, enquanto o MALDI ioniza o analito numa seca e cristalina matriz via pulsos de laser. O MALDI-MS é normalmente usado para analisar misturas peptídicas relativamente simples, já o ESI-MS, quando integrado com um cromatógrafo líquido (LC-MS), é preferido para analisar amostras mais complexas. O analisador de massas é central no contexto da proteômica, seus parâmetros chave são a sensibilidade, resolução, acurácia e capacidade de gerar espectros de íons fragmentados. Há quatro tipos fundamentais de analisadores usados na pesquisa proteômica, são eles: íon trap, tempo de voo (TOF), quadrupolo (Q) e “Fourier transform ion cyclotron” (FT-MS) (Yates III, 2004).

As fontes de ionização podem ser combinadas com os analisadores permitindo, também, a construção de equipamentos híbridos de alto desempenho. Uma combinação que tem se mostrado muito eficiente é a MALDI-TOF, onde a ionização e dessorção da amostra ocorrem pela diluição desta em uma matriz orgânica, geralmente ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, que contém um grupo cromóforo que absorve luz no comprimento de onda do ultravioleta ou infravermelho. À medida que os solventes da matriz e da amostra evaporam ocorre uma co-cristalização de ambos em uma placa de aço inoxidável contendo micro-fissuras para aplicação da mistura. Este cristal, submetido a pulsos de laser na faixa de absorção do cromóforo, provoca uma fotoionização dos analitos pela transferência de carga dos íons da matriz para a amostra e posterior dessorção, fazendo que entrem na fase

gasosa. Após entrarem em fase gasosa os analitos são encaminhados ao analisador do tipo TOF, onde os íons são acelerados por uma diferença de potencial aplicada entre a fonte e o detector e, portanto percorrem um espaço livre (tubo de vôo), sob vácuo, até serem detectados. Como a voltagem de aceleração é a mesma, os íons de m/z diferentes separam-se no espaço livre e chegam a tempos diferentes proporcionais à raiz quadrada da relação massa/carga (m/z) dos íons. Assim, os componentes individuais em uma mistura de íons são separados de acordo com suas relações m/z , tornando possível a determinação da massa de cada proteína ou peptídeo, submetido à análise, através da geração dos espectros de massa (Mann *et al.*, 2001; Ashcroft, 2003). Depois de determinar os valores m/z e a intensidade de todos os picos do espectro, podem-se obter informações sobre a estrutura primária (seqüência) dos peptídeos tripticos. Esta estratégia é chamada MS em tandem, MS/MS ou MS², já que acopla dois estágios de MS e utiliza equipamentos do tipo MS/MS. Nesta técnica um íon-pai (ou precursor) é selecionado no primeiro MS e, no segundo, sofre uma fragmentação, geralmente com um gás inerte, denominada de dissociação induzida por colisão (“Collision-Induced Dissociation, CID”). Os novos picos produzidos pelos produtos gerados (íons-filhos) têm suas relações massa/carga determinadas em um segundo analisador. De modo geral, cerca de seis séries de íons que aparecem nos espectros de MS/MS sob baixa energia de colisão. Ocorrem as séries a, b, c, quando a carga permanece na porção N-terminal da molécula e as séries x, y, z quando a carga permanece na porção C-terminal. Em altas energias de colisão ocorrem às séries d, v, w, que correspondem às fragmentações de cadeias laterais dos aminoácidos. Os íons mais comuns e informativos são os íons b e y, gerados pela fragmentação, em baixa energia, da ligação peptídica existente entre os aminoácidos. Em analisadores do tipo quadrupolo, quadrupolo-TOF e TOF-TOF os íons-y são mais freqüentemente observados, já nos tipos “ion-trap”, ambas as series são observadas mais ou menos na mesma intensidade. Num dado espectro originado da fragmentação de um íon escolhido (precursor) a diferença entre dois picos subseqüentes de uma mesma série tem como resultado a massa de um resíduo de aminoácido. Então, desta maneira, pode-se determinar a seqüência de aminoácidos considerando a diferença de massa entre picos vizinhos (Steen e Mann, 2004).

1.3.3. Identificação de proteínas por espectrometria de massa

Existem algumas estratégias usadas na identificação de proteínas por espectrometria de massa. Nesse trabalho foram utilizadas, principalmente, duas estratégias, o mapeamento

das massas dos peptídeos (*peptide mass fingerprinting* - PMF) e a busca através de dados de MS/MS não interpretados.

O princípio do PMF é baseado no conceito que, se uma proteína é digerida com uma enzima que apresenta uma dada especificidade de sequência, tal como a tripsina, por exemplo, ela gera fragmentos únicos e previsíveis. Neste procedimento a proteína de interesse, em muitos casos fracionada por eletroforese bidimensional, é enzimaticamente clivada e a mistura de peptídeos obtida é analisada por espectrometria de massa. Esse perfil de clivagem gerado funciona como uma impressão digital desta proteína. O mapa peptídico obtido por espectrometria de massa é processado, e subsequentemente, seus dados submetidos a programas que permitem compará-lo com os peptídeos gerados “*in silico*” para todas as sequências presentes nos bancos de dados (Yates III, *et al.*, 1993; Henzel e Watanabe, 2003; Thiede *et al.*, 2005).

Apesar de o PMF ser bastante utilizado, há muitos problemas associados a esse método, principalmente na confiança das identificações obtidas. Uma outra estratégia adotada para a identificação de proteínas por MS é a utilização dos dados de MS/MS não processados em programas de busca disponíveis. O problema de seqüenciamento de peptídeos, utilizando-se dados de MS/MS, poderia ser convertido em um simples problema de combinação com os bancos de dados, sem precisar interpretar os espectros. O espectro de fragmentação de peptídeos pode não conter informações suficientes para derivar a sequência completa de aminoácidos sem ambigüidades, mas pode ter informação suficiente para combiná-la de maneira única com uma sequência peptídica no banco de dados usando somente os fragmentos de íons observados e esperados. Existem vários algoritmos que são usados para a busca de sequências em bancos de dados com espectros provenientes de análises de MS/MS não processados, como por exemplo, “PeptideSearch”, “Sequest”, “Mascot”, “Sonar MS/MS” e “ProteinProspector”. Na maioria destes programas é ainda possível submeter os dados de MS junto com os dados de MS/MS, gerando um único valor de significância na identificação (“score”). Uma limitação da busca em banco de dados usando somente os dados de MS e MS/MS sem processamento é a necessidade de termos a sequência da proteína no banco de dados ou a sequência de proteínas bem próximas para uma identificação cruzada por homologia (Mann *et al.*, 2001).

Outras estratégias podem ser usadas a fim de obter a identidade de proteínas. Se a proteína de interesse não está presente no banco de dados, as sequências dos peptídeos podem ser deduzidas por uma interpretação *de novo* dos espectros de MS/MS. Essas

seqüências podem ser empregadas em buscas de similaridades de seqüência em programas específicos (MS-BLAST). Essa estratégia é bastante interessante quando o organismo estudado possui poucas informações genômicas (Shevchenko *et al.*, 2001; Habermann *et al.*, 2004).

1.3.4. Proteômica de Plantas

Nos últimos anos podemos constatar uma maturidade nos dados obtidos a partir dos trabalhos publicados sobre proteômica vegetal (Glinski e Weekwerth, 2006; Rossignol *et al.*, 2006).

Os passos mais críticos no emprego da proteômica em plantas são a extração e preparação da amostra. Sabe-se que nos vegetais, grande parte do volume celular é constituída de proteínas, embora que, em relação às células animais e microorganismos, os tecidos vegetais possuam um teor menor de proteínas, pois nestes organismos parte significativa do espaço celular é ocupada pelo vacúolo, e uma série de compostos que dificultam a análise protéica como: proteases, compostos fenólicos e metabólitos secundários que têm efeito deletério durante o processo de extração de proteínas (Michaud e Asselin, 1995; Newton *et al.*, 2004). Atualmente, há uma grande preocupação no estabelecimento de um protocolo de extração que possa ser aplicado a uma vasta gama de tecidos vegetais (Giavalisco *et al.*, 2003; Saravanan e Rose, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005; Carpentier *et al.*, 2005; Isaacson *et al.*, 2006).

Recentemente foi publicada uma revisão sobre a aplicação da proteômica nos vários processos do desenvolvimento vegetal (Hochholdinger *et al.*, 2006). Vários trabalhos utilizam essa abordagem na embriogênese e no desenvolvimento das sementes. Em *Arabidopsis*, Gallardo *et al.* (2001) adotaram uma abordagem proteômica para estudar a germinação das sementes; Higashi *et al.* (2006) compararam o proteoma de sementes maduras de plantas selvagens e o proteoma de sementes de plantas mutantes (*mtol-1*) que crescem na deficiência de enxofre e; Chibani *et al.* (2006) investigaram a dormência em sementes com a finalidade de inferir os mecanismos moleculares e bioquímicos do papel do ácido abscísico (ABA) na manutenção dessa dormência. Em *Medicago truncatula*, Watson *et al.* (2003) avaliaram os proteomas órgão/tecido específicos desse legume; Gallardo *et al.* (2003) investigaram a deposição de proteínas em estágios específicos do enchimento da semente; Imin *et al.* (2004) caracterizaram as proteínas expressas em embriões somáticos na fase globular obtidos a partir de suspensões celulares de

protoplastos; Imin *et al.* (2005) investigaram o perfil protéico e suas alterações durante a indução e formação de embriões somáticos; Lei *et al.* (2005) utilizaram uma abordagem proteômica em culturas de células em suspensão obtidas de calos de raízes; e Boudet *et al.* (2006) investigaram o papel das proteínas LEA na tolerância a dessecação em radículas de sementes durante a germinação. Em soja (*Glycine max*), Mooney e Thelen (2004) identificaram as proteínas de sementes, principalmente proteínas de reserva; Natarajan *et al.* (2005) compararam diferentes métodos de extração de proteínas de soja que seja compatível com a eletroforese bidimensional; e Hajduch *et al.* (2005) investigam o padrão de deposição de proteínas em sementes em desenvolvimento. Em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), Vasconcelos (2005) e Vasconcelos *et al.* (2005), investigaram métodos de extração de proteínas compatíveis com uma análise proteômica tanto de sementes em desenvolvimento, quanto em suspensões celulares embriogênicas.

A avaliação de métodos de extração compatíveis com uma análise proteômica, a elaboração de mapas proteômicos de alta qualidade e a identificação e classificação funcional das proteínas presentes em sementes e suspensões celulares embriogênicas de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) reportados neste trabalho são de extrema valia para elucidar mecanismos moleculares relativos à embriogênese e ao desenvolvimento da semente. Mecanismos estes, que auxiliarão os modelos de regeneração e transformação genética de plantas. Tais conhecimentos levarão a caracterização de proteínas associadas com os diversos estágios da embriogênese, permitindo, assim, o estabelecimento de um paralelo entre o desenvolvimento de embriões somáticos e zigóticos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar a deposição de proteínas durante o desenvolvimento de sementes e suspensões celulares embriogênicas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.].

2.2. Objetivos específicos

- Elaborar mapas proteômicos reprodutíveis e de alta qualidade para sementes em desenvolvimento e suspensões celulares embriogênicas.
- Identificar as proteínas presentes em sementes em desenvolvimento e suspensões celulares embriogênicas.
- Classificar funcionalmente as proteínas identificadas e analisar a importância dessas proteínas nos processos de embriogênese e formação das sementes em plantas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do material biológico e estabelecimento da curva de peso fresco das sementes em desenvolvimento de feijão-de-corda (*V. unguiculata*)

Sementes de feijão-de-corda, cultivar Pitiúba, foram semeadas em um campo no Jardim Botânico do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, no Campus do Pici, em Fortaleza (Figura 1A). Imediatamente após a abertura das flores, estas receberam uma etiqueta na qual constava o dia de sua abertura (antese) (Figura 1B). Vagens (Figura 1C e D), com 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 dias após a antese (DAA) e com sementes maduras (≥ 18 DAA), foram coletadas e destas foram retiradas as sementes, no caso das vagens mais jovens (2, 4 e 6 dias), com auxílio de lupa, pinça e bisturi.

Para obter a média dos pesos frescos, 10 sementes de cada dia após a antese (DAA) foram pesadas, sendo realizadas cinco repetições de cada pesagem.

3.2. Estabelecimento dos calos embriogênicos e das suspensões celulares embriogênicas de feijão-de-corda (*V. unguiculata*)

O estabelecimento da cultura de calos embriogênicos foi feito como descrito por Gonçalves (2004). Os explantes utilizados para o início de uma cultura de calos de feijão-de-corda foram folhas de plântulas com três dias após a germinação. As sementes utilizadas passaram por uma assepsia que consistia no mergulho destas em álcool 70% por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio por 10 minutos, após o que eram lavadas exaustivamente com água destilada estéril. A germinação ocorreu em frascos, contendo algodão umedecido e previamente autoclavados.

Três dias após a germinação as folhas das plântulas foram excisadas e explantes foliares com cerca de $0,5\text{ cm}^2$, desprovidos da nervura central, foram incubados em placas de Petri contendo meio MS suplementado com sacarose 3%, agar 0,7%, glutamina e caseína 100 mg/l e 2,4-D 0,5 mg/l. O subcultivo da cultura de calos é feito a cada 15 dias. As placas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas em claro e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após três subcultivos, houve uma rápida formação de calos embriogênicos friáveis (CEF) que foram utilizados para iniciar as suspensões celulares embriogênicas (SCE). Os calos foram transferidos para frascos erlenmeyers de 150 ml contendo 30 ml de meio MS suplementado com sacarose 3%, agar 0,7%, glutamina e caseína 100 mg/l e 2,4-D 1 mg/l, e mantidos em um agitador orbital a 100 rpm, sob fotoperíodo de 16 horas em claro e temperatura de 25°C , sendo o meio de cultura renovado a cada 4 dias. Todo o procedimento foi conduzido em câmara de fluxo laminar em condições assépticas.

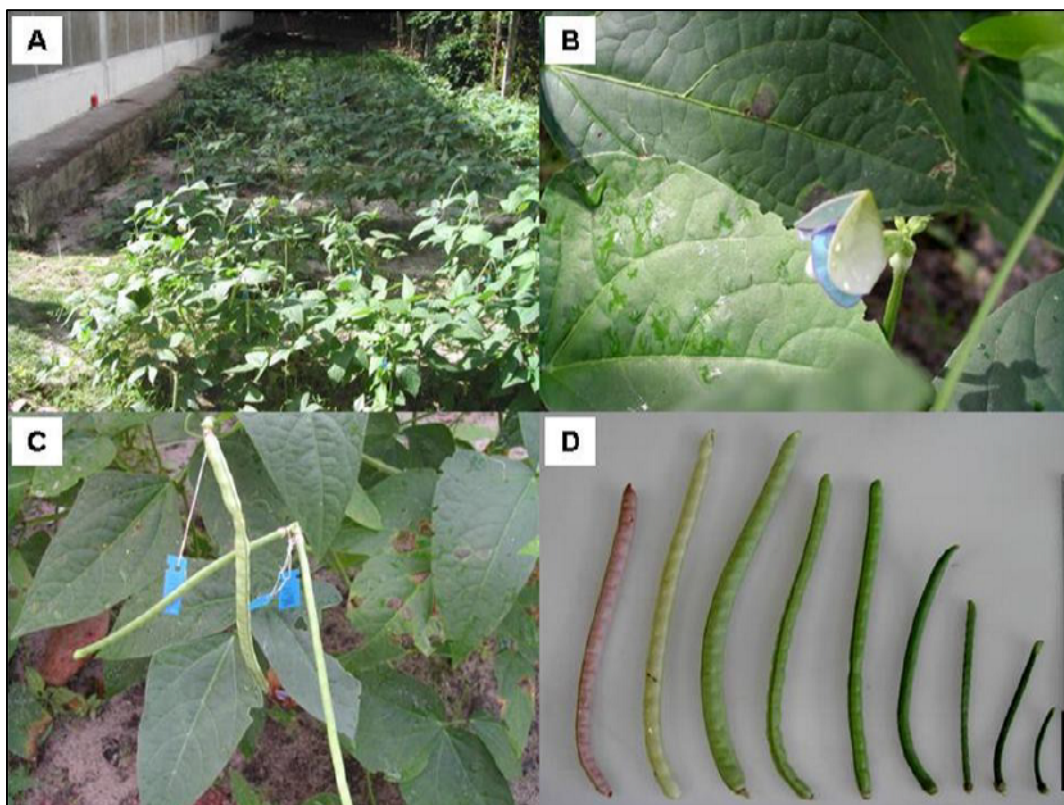


Figura 1. Desenvolvimento de sementes do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). (A) campo experimental; (B) flor após a antese; (C) vagens com etiquetas indicando sua idade e; (D) vagens coletadas com 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e ≥ 18 dias após a antese, da direita para a esquerda. A escala em “D” possui 5 cm.

3.3. Extração de proteínas

3.3.1. Processamento do material biológico

As sementes com 2 e 4 DAA foram utilizadas integralmente para a extração de proteínas, enquanto as demais (6, 8, 10, 12, 14, 16 e ≥ 18 DAA) tiveram o embrião isolado, sendo a casca e os demais tecidos não embrionários descartados. Em seguida, todos os materiais foram congelados em nitrogênio líquido e liofilizados até peso constante. O material liofilizado foi macerado até adquirir o aspecto de farinha fina, a qual foi utilizada para a extração de proteínas.

Para a extração de proteínas das suspensões celulares embrionárias, os erlemeyers contendo a SCE eram deixados em repouso por 30 minutos para que as células sedimentassem por gravidade. O sobrenadante era descartado e às células foram adicionados 50 ml de água destilada. Seguiu-se leve agito e novo repouso por 30 minutos. Este procedimento foi realizado cinco vezes para a completa subtração do meio de cultura. Após o descarte do último sobrenadante as células eram congeladas e liofilizadas até peso constante. O material liofilizado foi macerado até adquirir o aspecto de farinha fina, a qual foi utilizada para a extração de proteínas.

3.3.2. Extração de proteínas totais com tampão piridina

Utilizando o método descrito por Vasconcelos *et al.* (2005) para a extração de proteínas totais, a farinha do tecido de interesse foi misturada com tampão contendo piridina 50 mM, tiouréia 10 mM, SDS 1%, pH 5,0 na proporção de 1:40 (p/v), à mesma adicionou-se polivinilpolipirrolidona (PVPP), em quantidade igual a duas vezes a massa da amostra. A mistura ficou sob forte agitação a 4°C, passadas duas horas o material foi centrifugado a 10.000 g por 40 min. Ao sobrenadante foram adicionados quatro volumes (1:5, volume do sobrenadante/volume total) de acetona gelada contendo 10% de ácido tricloroacético (TCA) para permitir a precipitação, foi armazenado por duas horas (ou durante a noite) a -20°C. Seguiu-se centrifugação a 10.000 g por 20 min com subsequente descarte do sobrenadante. O precipitado contendo as proteínas totais foi lavado com acetona. Para tanto, o precipitado foi ressuspensão em acetona gelada (100 µl/mg do material de partida) e agitado até adquirir o aspecto de suspensão, sendo em seguida centrifugado a 10.000 g por 5 min e o sobrenadante descartado. A lavagem deve ser

realizada no mínimo duas vezes para livrar a amostra de qualquer traço de TCA. O precipitado final foi seco a vácuo no dessecador, dessa forma um pó branco foi obtido.

3.3.3. Extração com tampão fosfato de potássio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0 e fracionamento em albuminas e globulinas

Ao tecido de interesse foi adicionado, na proporção de 1:10, tampão fosfato de potássio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0, contendo um “mix” de inibidores de protease (PMSF 0,1 mM, leupeptina 50 µM, E-64 5 µM e EDTA 1 mM), e PVPP na proporção de 1:1. A mistura foi agitada durante 2 horas a 4°C e submetida a uma centrifugação (30 min, 10.000 g e a 4°C). O sobrenadante foi centrifugado (20 min, 10.000 g e a 4°C), o novo sobrenadante foi filtrado em papel de filtro (fração solúvel – FS) e, posteriormente, dialisado a 4°C contra água destilada gelada, no mínimo três trocas. Após a diálise, ocorreu uma centrifugação (30 min, 10.000 g e a 4°C), onde o sobrenadante (fração rica em albuminas – FA) foi separado do resíduo. O resíduo foi lavado com água destilada e centrifugado (20 min, 10.000 g e a 4 °C). Esse passo foi repetido três vezes. O resíduo final foi chamado de fração rica em globulinas (FG). As frações ricas em albuminas e globulinas foram congeladas a – 20°C, liofilizadas e armazenadas a – 20°C para posterior análise.

3.4. Dosagem de proteínas

O método de Bradford (1976) foi empregado para avaliar a quantidade de proteínas obtidas em cada processo de extração e estipular a quantidade de proteínas a ser utilizada nos subseqüentes experimentos.

3.5. Eletroforese bidimensional, revelação e análise da imagem

As amostras foram dissolvidas em 50-100 µl de uréia 7 M, tiouréia 2 M. Uma alíquota de cada amostra dissolvida foi utilizada para dosagem de proteínas pelo Bradford. A partir dos resultados das dosagens foi possível encontrar o volume de amostra contendo a massa de proteínas desejada a ser diluída em solução de reidratação (uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 65 mM, CHAPS 1% p/v, pharmalyte 0,5% v/v e azul de Bromofenol 0,002% p/v) para um volume final de 200 µl. Utilizou-se o sistema de reidratação passiva, visto que os 200 µl da solução de reidratação com a quantidade de amostra desejada foram aplicados no Reswelliing Tray (Pharmacia Biotech) e posteriormente os géis com gradiente de pH imobilizado (tiras de IPG), fabricados pela GE-Healthcare, foram mantidos em contato

com essa solução durante a noite. As tiras de IPG tinham 11 cm de comprimento e as faixas de pH variavam de 3 a 10 e de 4 a 7. A focalização isoeletrica foi realizada no equipamento Ettan™ IPGPhor II™ (GE-Healthcare) utilizando o seguinte programa: 1º passo, 500 V por 0:30 h; 2º passo, 4000 V por 2:30h e; 3º passo, 8000 V até atingir 18.000 Vh totais.

Após a focalização as tiras de IPG foram equilibradas sob agitação em solução (tris 50 mM, glicerol 30 %, uréia 6M, SDS 2% e azul de bromofenol) com DTT (1% p/v) por 15 minutos para a redução das proteínas e, em seguida, alquiladas com IAA (3% p/v) também em solução de equilíbrio por 15 minutos. Terminado o equilíbrio as tiras foram mergulhadas em tampão de corrida (Anexo I.I.) por 10 segundos para livrá-los do excesso de solução de equilíbrio. Logo após foram postos no topo do gel da segunda dimensão e fixados com tampão de corrida contendo ágar 0,5%. O SDS-PAGE da segunda dimensão foi realizado em sistema vertical em géis 15% de 14X14 cm contendo 30 ml do Main Gel (Anexo I.III.). O sistema foi alimentado por uma fonte Power-Pac 3000 (Bio-Rad). A corrida transcorreu em duas etapas, na primeira utilizamos 10 mA/gel durante 15 min e na segunda 20 mA/gel até que o indicador (azul de bromofenol) saísse do gel (aproximadamente 4:30h).

Terminada a corrida, o gel foi colocado em solução de fixação, etanol:ácido acético:água (4:1:5 v/v/v), durante duas horas, corado com solução de Coomassie R 350 (PhastGel Blue R) (Anexo I.IV.) durante quatro horas, descorado com solução de ácido acético: metanol: água (1:3:6) em duas lavagens de uma hora e armazenados em solução de ácido acético 5%.

Os géis foram escaneados utilizando-se o programa LabScan v. 5.0 (GE-Healthcare) no ImageScanner (Amersham Biosciences) com sistema integrado de transparência. As imagens foram analisadas no programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE-Healthcare) por uma combinação de detecção automática dos “spots”, feita pelo programa, e detecção manual. Pelo programa foram estimados os pontos isoeletricos e as massas moleculares de cada “spot”.

3.6. Seleção e processamento dos *spots* para espectrometria de massa

As proteínas de interesse foram excisadas dos géis bidimensionais com o auxílio de um bisturi e transferidas para tubos eppendorfs, onde foi realizada a digestão com tripsina, de acordo com o método de Hellman *et al.* (1995) com algumas alterações. Os “spots”

foram selecionados, cortados em pedaços de 1 mm³, totalmente descorados em solução de bicarbonato de amônio 25 mM / acetonitrila (1:1) em pelo menos 3 lavagens de 30 min, e desidratados, duas vezes, com acetonitrila 100% por 5 minutos. O solvente remanescente foi removido dos pedaços de gel em concentrador de amostra Speed Vac (Savant). Os géis foram reidratados no gelo por 1 hora, em 15 µL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM contendo 0,2 µg de tripsina grau seqüenciamento modificada (Promega). Pedaços do gel foram cobertos com 20 µL do tampão e a digestão realizada a 37°C em banho por 16 horas. Em seguida os peptídeos foram extraídos do gel com solução acetonitrila 50%, TFA 5% em água e concentrados, até um volume de aproximadamente 5 µL no Speed Vac (Junqueira, 2005).

3.7. Espectrometria de massa

A mistura de peptídeos da digestão triptica foi misturada 1:1,5 com uma solução saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila 50% / ácido trifluoroacético 0,3% em água. Um µL da mistura foi aplicada na placa de MALDI e seco a temperatura ambiente antes da análise no espectrômetro de massa.

Os espectros de massa foram obtidos usando-se o equipamento ABI 4700 TOF/TOF (Applied Biosystems). O ABI 4700 foi usado o modo interativo onde todas as amostras eram analisadas, automaticamente, no modo refletor MS sendo, posteriormente, os seis picos mais intensos submetidos a uma análise posterior por MS/MS. A intensidade do laser utilizada foi 4800 para o modo MS e 5200 para o modo MS/MS e a célula de colisão configurada para 1 kV em pressão de 1×10^{-6} torr em presença de gás atmosférico.

3.8. Pesquisa no banco de dados

Nos dados obtidos no TOF-TOF foi utilizado o programa GPS Explorer™ (Applied Biosystems) onde os dados de MS e MS/MS eram processados e submetidos conjuntamente ao programa MASCOT (Matrix Science Ltd. – www.matrixscience.com). Os dados obtidos nos espectros eram filtrados pela relação sinal/ruído dos picos que foi de 20 para os dados de MS e 10 para MS/MS; a busca foi feita utilizando-se como banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) restringido para Viridiplantae (Green Plants). Os critérios de busca foram todas as massas moleculares e pontos isoeletricos, cisteínas modificadas por carboxamidometilação e as possíveis modificações, como: oxidação de metionina, fosforilação, cisteínas modificadas por

acrilamida. Foi tolerada no máximo uma clivagem para peptídeos semi-trípticos e uma variação de massa dos peptídeos de 100 ppm. Eram consideradas positivas as identificações onde pelo menos cinco peptídeos eram encontrados e na maioria das vezes as identificações eram confirmadas com dados de MS/MS para pelo menos um peptídeo por proteína; nestes casos um espectro de MS/MS era escolhido e analisado visualmente para confirmar a sequência. Em ambos os casos os valores de *ion score* (mínimo de 30) e *protein score* (mínimo de 70) eram levados em consideração como valores estatísticos para identificação. As identificações também levaram em conta a relação entre o organismo, no qual as proteínas foram identificadas, e o organismo estudado.

3.9. Síntese de um peptídeo, preparação do antisoro e análise por western blot

O peptídeo HSKGDAPPNEDELK de sequência correspondente a uma região (121-134) próxima à porção C-terminal de uma proteína relacionada à patogênese (PR-10) identificada nesse trabalho, foi sintetizado pela Biosciences AG, Gottingen, Germany. Anticorpos policlonais foram produzidos a partir desse peptídeo em coelhas brancas da Nova Zelândia com quatro meses de idade, como descrito em Aragão *et al.* (2000). A IgG foi purificada do soro por cromatografia de afinidade (protein-A Sepharose column, GE-Healthcare) de acordo com Harlow and Lane (1988). A análise de western blot ocorreu de acordo com Towbin *et al.* (1979).

Outros dois anticorpos policlonais foram adquiridos para análise de western blot. Um anticorpo, específico para uma vicilina de aproximadamente 60 KDa, foi doado gentilmente pelo Dr. José Xavier Filho, da Universidade Estadual Norte Fluminense e; o outro, específico para uma PR-10 de aproximadamente 16 KDa de *Vigna unguiculata*, foi fornecido pelo Dr. Edward A. Gwózdź, da Faculdade de Biologia da Adam Mickiewicz University - Poznan, Poland.

Amostras de proteínas extraídas (extração com o método do tampão piridina) de embriões em diferentes dias após a antese e de células cultivadas em suspensão embriogênica foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris 62,5 mM, SDS 2%, Glicerol 10%, pH 6,8) e aplicadas nos géis de eletroforese. A transferência eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose foi feita de acordo com o método originalmente descrito por Towbin *et al.* (1979). Foi utilizado um sistema de eletroforese preparativo de 8 X 6 cm, em SDS-PAGE descontínuo, 5% Stacking Gel / 15% Main Gel (Anexo I.II. e I.III.). Para cada ensaio foram realizadas duas eletroforeses, uma

para a visualização por coramento com Coomassie R 350 (PhastGel Blue R), outra para a eletrotransferência. Para a eletrotransferência foi utilizada membrana Hybond-C (Amersham LifeScience) e o tampão de transferência (Anexo I.V.), o procedimento foi realizado em uma unidade de transferência Transphor (TE 42 – Hoefer Scientific Instruments), de 5 litros, em câmara fria a 4 °C e sob agitação. Terminada a eletrotransferência as membranas foram coradas com Ponceau S (Anexo I.VI.) para confirmação da transferência, lavadas e incubadas com solução bloqueadora, composta de tampão PBS (NaCl 0,13 M, KCl 2,6 mM, NaHPO₄ 5,3 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,4) contendo 5% de leite em pó desnatado, sob agitação por 45 min. Decorrido este tempo, a solução bloqueadora foi descartada e as membranas incubadas com o anticorpo (anti-vicilina, anti-PR10 ou anti-peptídeoPR10) específico contra a proteína de interesse. Os anticorpos anti-vicilina e anti-PR10 foram utilizados na diluição 1:2000, enquanto o anti-peptídeoPR10 foi utilizado na diluição 1:400. Todos foram diluídos em solução bloqueadora e a incubação foi feita à temperatura ambiente sob agitação lenta por 45 min. Após cinco lavagens com tampão PBS, cada uma com cinco minutos de duração e sob agitação lenta, as membranas foram incubadas com o segundo anticorpo conjugado a enzima fosfatase alcalina na diluição de 1:5000 na solução bloqueadora. Finalmente, após cinco lavagens sucessivas idênticas as anteriores, reação de coramento foi desenvolvida utilizando o substrato 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT) (Sigma). Uma pastilha do substrato foi dissolvida em 10 ml de água destilada. As membranas foram cobertas com a solução do substrato, deixadas sob agitação lenta e monitoradas até que o coramento atingisse a intensidade desejada, quando então a membrana foi transferida para uma placa de petri com água destilada para parar a reação.

Géis obtidos de eletroforeses bidimensionais de sementes maduras e de suspensão celular embriogênica também foram transferidos para membranas de nitrocelulose. Essas membranas foram incubadas com os anticorpos anti-vicilina, anti-PR10 ou anti-peptídeoPR10. O procedimento utilizado foi o mesmo descrito anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise proteômica das suspensões celulares embriogênicas (SCE) do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*)

As suspensões celulares embriogênicas (SCE) do feijão que foram obtidas tinham as mesmas características daquelas descritas por Gonçalves (2004), sendo formadas basicamente por massas pro-embriogênicas de tamanhos variados. A abordagem utilizada nesse trabalho com o propósito de identificar as proteínas presentes nestas SCE foi, primeiramente, o estabelecimento de mapas de referência bidimensionais destas SCE e, em seguida, a utilização de técnicas de espectrometria de massas para identificar os “spots” selecionados nos géis bidimensionais.

4.1.1. Estabelecimento dos mapas de referência bidimensionais

Mapas de referência bidimensionais reproduzíveis de SCE foram obtidos utilizando o método de extração com tampão piridina (Figura 2). Em análises iniciais, a separação das proteínas por focalização isoeletrica foi realizada utilizando tiras de IPG nas faixas de pH de 3-10. Observou-se que a região compreendida entre os pHs 4 a 7 apresentava uma área com grande densidade de “spots” e por esse motivo, uma análise adicional com tiras de IPG de pH de 4-7 foi realizada. Nos géis de SCE foram aplicados 700 µg de proteínas para ambas as faixas de pH. A análise dos géis utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum indicou que quando tiras de IPG com pH na faixa de 4 a 7 foram utilizadas, 520 “spots” podiam ser visualizados, enquanto nos géis onde tiras de IPG com pH na faixa de 3 a 10 foram utilizadas, o número de “spots” visualizados era de 570.

4.1.2. Identificação das proteínas presentes em SCE

Seguindo-se à separação das proteínas presentes nas SCE por eletroforese bidimensional, os 127 “spots” indicados na Figura 3 foram selecionados para análise por espectrometria de massa. Estes “spots” foram excisados dos géis, digeridos com tripsina e analisados em um espectrômetro de massa MALDI-TOF-TOF. Os dados obtidos após o processamento de todos os “spots” foram pesquisados no banco de dados NCBI para Viridiplantae (Green Plants). Dessa forma, 67 (52%) proteínas foram identificadas. Na Tabela 1 as proteínas identificadas estão listadas de acordo com sua classificação funcional. Nela estão também indicadas as massas moleculares e os pI experimentais e teóricos de cada “spot”, o “protein score” e o “ion score” de cada identificação, as seqüências dos peptídeos identificados por MS/MS, os números de entrada no NCBI das

proteínas e as descrições das proteínas. Na maioria dos casos, a massa molecular e o pI teóricos, das proteínas identificadas que possuíam a sequência completa depositada no banco de dados, coincidiram, com pequenos desvios, com a localização das proteínas nos géis 2D. Os desvios encontrados podem ser explicados por erros inerentes a técnica ou por modificações pós-traducionais, que não são consideradas para o cálculo teórico das massas. Essa abordagem (*gel based* proteomics) também tem sido empregada para a identificação de proteínas de cultura de células embriogênicas (Imin *et al.*, 2004), culturas de células em suspensão (Watson *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2005) e embriões somáticos (Imin *et al.*, 2005) de *M. truncatula*.

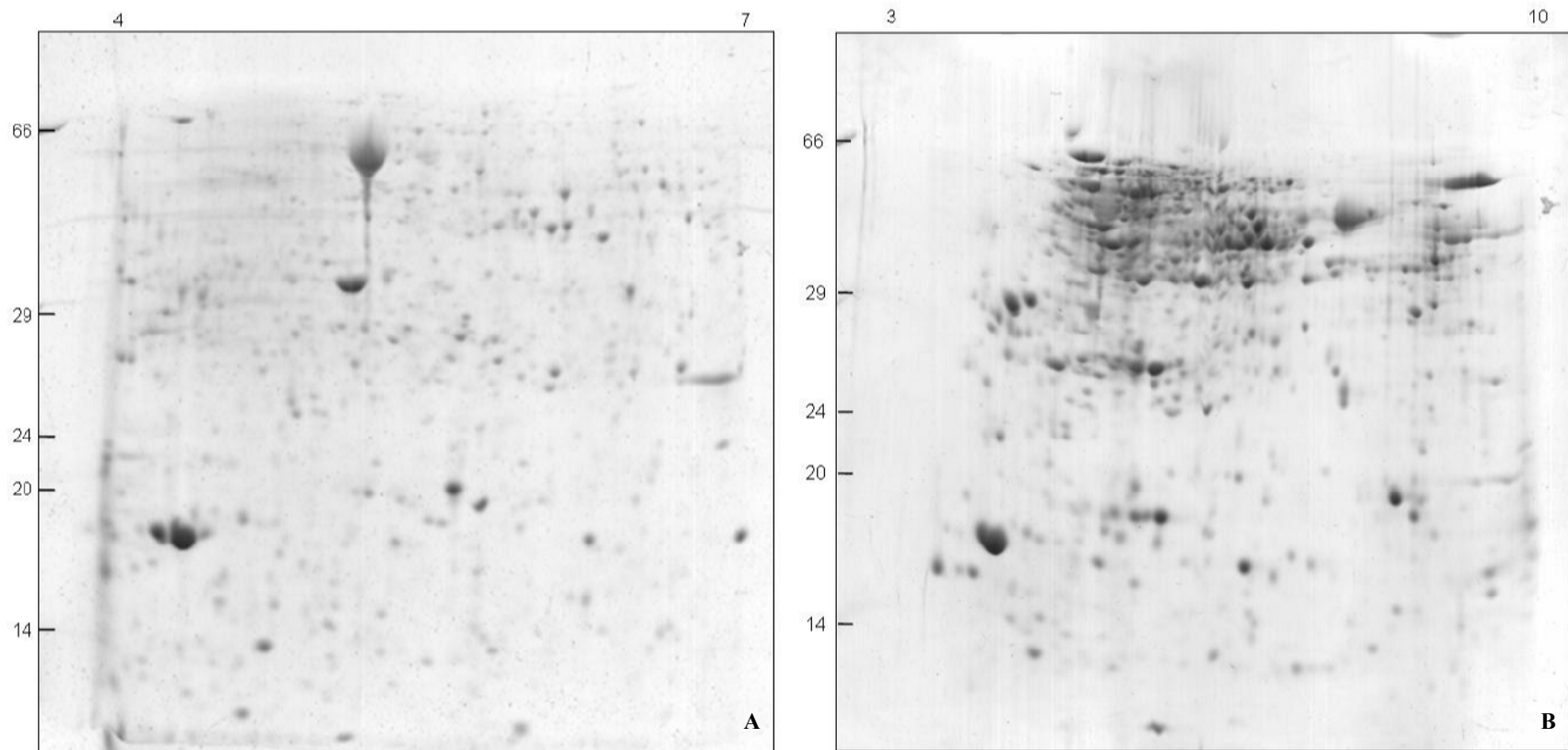


Figura 2. Mapas de referência de suspensões celulares embriogênicas (SCE) de feijão-de-corda (*V. unguiculata*). As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 4-7 (A) e 3-10 (B). A quantidade de proteína aplicada foi de 700 μg ; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com coomassie brillante blue. As imagens apresentadas não foram sujeitas a nenhum processamento.

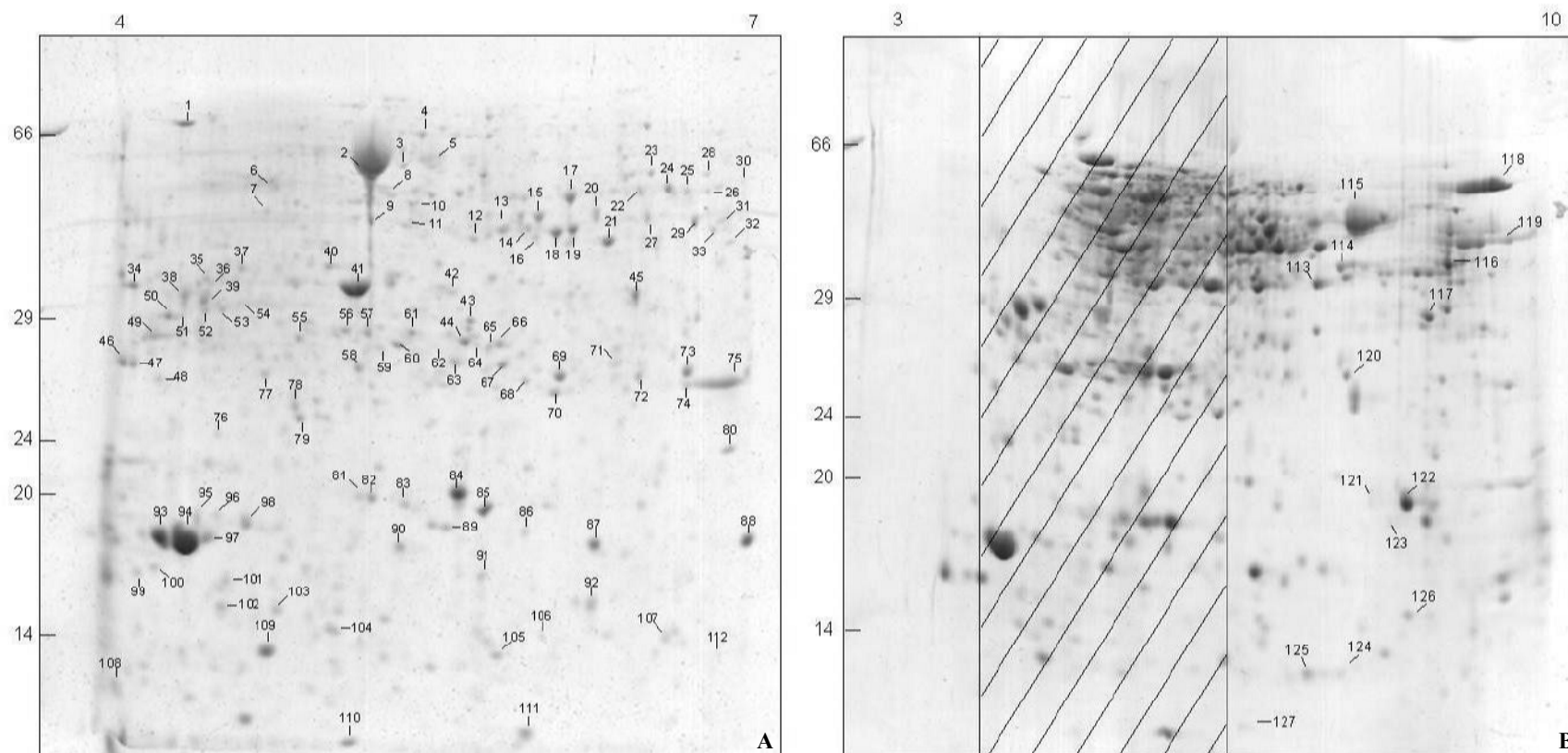


Figura 3. Mapas de referência de suspensões celulares embriogênicas (SCE) de feijão-de-corda (*V. unguiculata*). As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 4-7 (A) e 3-10 (B). A quantidade de proteína aplicada foi de 700 µg; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com coomassie brillante blue. Os “spots” analisados por espectrometria de massa estão numerados.

Tabela 1. Lista das proteínas de suspensões celulares embriogênicas de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) identificadas por MS e MS/MS. As identificações foram organizadas de acordo com sua classificação funcional.

Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/ Ion Score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.				
Metabolismo						
3	59,1/5,4	47,5/5,2	154/116	AYLFPESPAR YVILGGGVAAGYAAR LPGFHVCVGSGGER	gi 452165	Monodehydro ascorbate reductase
5	59,8/5,6	47,5/5,2	115/38	AYLFPESPAR	gi 452165	Monodehydro ascorbate reductase
4	63,8/5,5	47,9/5,3	383/315	VNQIGSVTESIEAVR AAVPSGASTGIYEALRL IEEELGAEAVYAGANFR LAMQEFMVLPGVASSFK	gi 42521309	enolase
121	19,9/8,5	48,0/5,6	127/105	AAVPSGASTGIYEALRL	gi 19281	enolase
8	51,4/5,4	39,1/5,4	205/134	EHIAAYGEGNER TLPGPVSDPSELPK HKEHIAAYGEGNER	gi 10946357	cytosolic glutamine synthetase GSbeta1
10	50,4/5,5	37,9/5,1	60/46	VLPYMDVFVGNETEAR	gi 51949802	adenosine kinase isoform 2S
12	45,7/5,7	35,1/5,7	24/24	LFDDGVVKR	gi 13160397	aldose reductase
23	62,6/6,6	44,8/6,0	127/101	TAVANIPYGGAK FIVEAANHPTDPEADEILK	gi 59668638	glutamate dehydrogenase 1
88	21,2/6,9	16,4/6,3	101/88	IIGATNPAQSEPGTIR	gi 1389640	Nucleoside diphosphate kinase
Energia						
7	47,3/4,8	26,2/5,0	205/144	TALAFVTLR LPLWSPSEEAR VFHYGSISLIVEPCR NPSADMLLTPEDLNLELI	gi 20975618	fructokinase-like protein
9	45,2/5,3	26,2/5,0	148/112	TALAFVTLR VFHYGSISLIVEPCR	gi 20975618	fructokinase-like protein
13	47,7/5,9	28,9/5,7	205/160	GILGYTEDDVVSTDFVGDSR LKGILGYTEDDVVSTDFVGDS R	gi 31088230	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
14	48,8/6,0	12,7/8,1	136/58	VPTVDVSVVDLTVR GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 63053710	glyceraldehyde 3-P dehydrogenase
24	58,6/6,6	12,7/8,1	182/129	VPTVDVSVVDLTVR GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 63053710	glyceraldehyde 3-P dehydrogenase
59	28,2/5,4	12,7/8,1	88/55	GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 63053710	glyceraldehyde 3-P dehydrogenase
62	28,3/5,7	12,7/8,1	95/61	VPTVDVSVVDLTVR GILGYTEDDVVSTDFVGDSR DAPMFVVGVNEK	gi 63053710	glyceraldehyde 3-P dehydrogenase
18	48,4/6,2	21,4/7,9	432/362	VPTVDVSVVDLTVR FGIVEGLMTTVHSITATQK GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 34850871	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
26	59,3/6,7	21,4/7,9	294/237	VPTVDVSVVDLTVR FGIVEGLMTTVHSITATQK GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 34850871	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
19	49,2/6,2	14,4/8,1	334/283	VPTVDVSVVDLTVR FGIVEGLMTTVHSITATQK GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 5678801	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
29	53,2/6,7	14,4/8,1	212/152	VPTVDVSVVDLTVR GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 5678801	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
27	52,8/6,5	14,7/8,9	93/40	VPTVDVSVVDLTVR	gi 53139542	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

30	59,9/7,0	36,7/7,0	227/144	VPTVDVSVDLTVR GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 51703306	glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase
63	28,3/5,8	36,7/7,0	179/139	VPTVDVSVDLTVR LVSWYDNEWGYSTR GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 51703306	glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase
15	50,9/6,0	35,8/5,8	97/62	MELVDAAFPLLK	gi 6468487	putative cytosolic malate dehydrogenase
20	52,9/6,3	35,8/6,0	135/97	MELVDAAFPLLK VLVVANPANTNALILK VLVTGAAGQIGYALVPMIAR	gi 1524121	malate dehydrogenase
114	32,2/7,8	36,0/8,8	249/200	LFGVTTLDVVR DDLFINAGIVK ALEGADVVIIPAGVPR FGVNEFVNPK	gi 2827080	malate dehydrogenase precursor
17	55,5/6,2	41,6/5,8	365/282	GTFYGNYPKPR THPVNPLNER FITHTVPFSEINK	gi 452769	alcohol dehydrogenase-1F
28	66,9/6,8	46,3/5,8	115/74	HAFGDQYR YYDLGLPYR	gi 1708401	Isocitrate dehydrogenase
33	52,5/6,8	42,7/8,8	119/62	EPYTATIVSVER	gi 1480347	ferredoxin NADP oxidoreductase
44	29,9/5,8	27,0/5,3	62/41	VAYALAQGLK	gi 11124572	triosephosphat- isomerase
73	28,7/6,7	21,7/6,5	81/45	AFMDATGGLWR GGSPYGAGTYAGDGSR	gi 21068664	putative quinone oxidoreductase
Crescimento/Divisão Celular						
57	28,7/5,3	41,8/5,3	155/96	AEYDESGPSIVHR SYELPDGQVITIGAER	gi 6934188	actin
82	21,0/5,4	14,6/6,2	242/168	AGFAGDDAPR IWHHTFYNELR VAPEEHPVLLTEAPLNPK	gi 57834204	actin
76	24,5/4,5	19,0/4,5	80/46	VVDIVDTFR	gi 16417595	Translat. controlled tumor-like protein
86	20,6/6,1	16,1/6,7	91/63	IFFIAWSPDTSR YAVFDYEFMTEGNVPK	gi 92870533	Actin-binding, cofilin/tropomyosin
Síntese Protéica						
90	18,8/5,5	15,4/5,3	60/42	DFGEEHEAYNVVLQHVK	gi 92884885	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gad d45
Destinação de Proteínas/Proteínas de Reserva						
6	53,2/4,8	23,9/4,7	92/47	LDQLIYIPLDEDSR	gi 30013699	CDC48-like protein
43	3,0/5,8	27,3/5,2	66/31	HITIFSPEGR	gi 3421070	20S proteasome subunit PAA1
58	27,5/5,3	18,9/7,7	103/62	TVIINSEGVTR ITQLTDNVYVCR	gi 41352683	putative proteasome 20S beta1 subunit
61	30,2/5,6	25,6/5,5	82/64	EPIPVTLQVLR	gi 79318062	endopeptidase/ peptidase/ threonine endopeptidase
110	11,9/5,3	15,0/6,1	109/27	EGIPPDQQR	gi 30983942	putative polyubiquitin
112	14,1/6,9	28,1/8,6	237/105	EGIPPDQQR ESTLHLVLR TITLEVESSDTIDNVK	gi 28436483	putative polyubiquitin
111	12,8/6,1	15,0/6,7	121/36	EGIPPDQQR	gi 33327286	polyubiquitin 2
127	11,7/6,7	15,0/6,7	125/35	EGIPPDQQR	gi 33327286	polyubiquitin 2
122	19,5/8,9	18,4/8,9	114/70	IVMELFADTTTPR	gi 29124975	cyclophilin
Transportadores						

1	67,4/4,3	11,5/5,0	152/122	TLVFQFSVK FYAISAEPFESNK AVDSLVPGR VVDALGVPIGR SVHEPMQTGLK ITNFYTNFQVDEIGR VYGLNEIQAGEMVEFASGVK	gi 575359	calreticulin
60	28,8/5,5	34,8/5,6	446/293		gi 22742	pseudo-atpA
Transdução de sinais						
35	35,9/4,6	29,4/4,7	84/19	LAEQAERYEEMVEFMEK	gi 1168196	14-3-3-like protein
36	34,7/4,6	29,1/4,7	177/147	TVEVEELTVEER SAQDIALADLAPTHPIR	gi 3023194	14-3-3-like protein A (SGF14A)
Doença/defesa						
16	48,2/6,1	35,9/5,8	161/86	NVTLGWVDVR ILHDLYPTLQLPQK VVVTSSIAAVSFNDRPK AFPSFGNTGDTATR GFYTYDAFIAAAR EQNPSAYCSPTQFPCASGQ QYYGR	gi 1854445	CPRD14 protein
40	37,0/7,1	32,6/5,7	137/78	AFPSFGNTGDTATR GFYTYDAFIAAAR GCQSQCGGQPAPSDLSALIPR EQNPSAYCSPTQFPCASGQ QYYGR	gi 10863764	class I chitinase
41	33,7/5,3	32,6/5,7	485/410		gi 10863764	class I chitinase
46	38,6/6,5	51,6/4,9	64/40	AVANQPVSVAIEGGGR	gi 46401612	cysteine proteinase
47	26,9/4,2	51,6/4,9	84/67	AVANQPVSVAIEGGGR	gi 46401612	cysteine proteinase
66	30,3/5,9	27,0/5,6	150/97	HPAELAHGANGLDIAVR YAADEDAFFADYAVAHQK	gi 1420938	cytosolic ascorbate peroxidase
95	19,0/4,6	27,0/5,6	65/23	EDKPEPPPEGR	gi 1420938	cytosolic ascorbate peroxidase
72	28,4/6,5	22,1/8,5	96/65	HHQTYITNYNK	gi 3219353	manganese superoxide dismutase
85	21,9/5,9	12,0/5,2	57/45	EHGAPEDENR	gi 6723476	copper/zinc- superoxide dismutase
75	28,6/6,9	25,3/7,8	50/38	DAYSYPQDDPTSTFTCPGGTN YR	gi 14290147	thaumatin-like protein
84	2,4/5,7	11,4/7,8	72/52	IVDQCSNGGLDLVGVFNR	gi 18782	wound-induced protein
94	18,0/4,5	16,3/4,7	255/181	ISFVEDGETK GDAPPNEDELK SVENVEGNGGPGTIK AVFTFEDQTTSPVAPATLYNAL AK QNALLEFGR	gi 1449405	pathogenesis related protein
106	15,2/5,9	10,7/6,0	204/122	VWEKPWLNFK DVAGNQNSLEIDSLAR VVSAAQQVVSGLTYITLEAK GLLQSDQELFSTPGADTIPIVN R	gi 288188	cysteine proteinase inhibitor
118	34,0/9,5	39,1/8,0	141/131		gi 2245683	peroxidase precursor
119	32,2/9,3	36,3/9,3	53/35	LFFHDCFVR	gi 15234648	peroxidase
Metabolismo secundário						
21	48,4/6,3	33,9/6,0	137/120	GDHTNFEIEPSFGVEASELYP DVK	gi 76559896	isoflavone reductase- like protein 6
53	30,1/4,6	1,9/7,9	64/-		gi 17063953	chalcone flavanone isomerase
Outras						
11	45,8/5,5	34,1/5,3	32/32	VVAAAINPVDYKR	gi 1184121	auxin-induced protein

4.1.3. Classificação funcional das proteínas de SCE

Cada uma das proteínas identificadas foi classificada em uma das 15 categorias funcionais estabelecidas para os genes de *Arabidopsis* (Bevan *et al.*, 1998): metabolismo, energia, crescimento/divisão celular, transcrição, síntese protéica, destinação de proteínas e proteínas de reserva, transportadores, tráfego intracelular, estrutura celular, transdução de sinais, doença e defesa, metabolismo secundário, classificações incertas, não classificadas e transposons. Levou-se também em conta, a classificação adotada em outros trabalhos que utilizaram uma abordagem proteômica para identificar proteínas de *Medicago truncatula* (Gallardo *et al.*, 2003; Imin, *et al.* 2004; Lei, *et al.*, 2005), de soja (Hajduch *et al.*, 2005) e de *Arabidopsis* (Chibani *et al.*, 2006). A busca pela principal função de cada proteína foi auxiliada pelo NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e pelo KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - www.genome.jp/kegg/).

As proteínas identificadas em SCE estavam agrupadas principalmente nas categorias energia (32,8%), doença/defesa (22,4%), metabolismo (13,4%), destinação de proteínas/proteínas de reserva (13,4%). Também havia proteínas que participavam do crescimento/divisão celular (6%), do transporte (3%), na transdução de sinais (3%), no metabolismo secundário (3%) e na síntese de proteínas (1,5%). Houve uma proteína classificada no grupo outras, correspondendo a 1,5% do total de proteínas identificadas (Figura 4).

No grupo metabolismo, foram classificadas nove proteínas (13,4%) em SCE e 22 proteínas (32,8%) foram classificadas no grupo energia. A relativa abundância de enzimas envolvidas no metabolismo primário ou energético de SCE de feijão-de-corda também tem sido observada em cultura de células embriogênicas originadas de protoplastos (Imin *et al.*, 2004) e cultura de células em suspensão originadas de raízes de *M. truncatula* (Watson *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2005).

Um dos grupos mais abundantes das proteínas identificadas em SCE, é das proteínas relacionadas com a defesa das plantas contra estresses bióticos e abióticos. Essas proteínas protegem as plantas contra o ataque de fungos, bactérias ou vírus patogênicos e condições ambientais desfavoráveis. Elas podem ser induzidas por uma variedade de estímulos bióticos ou abióticos, como injúrias a tecidos, infecções por patógenos e estresses ambientais (van Loon *et al.*, 2006).

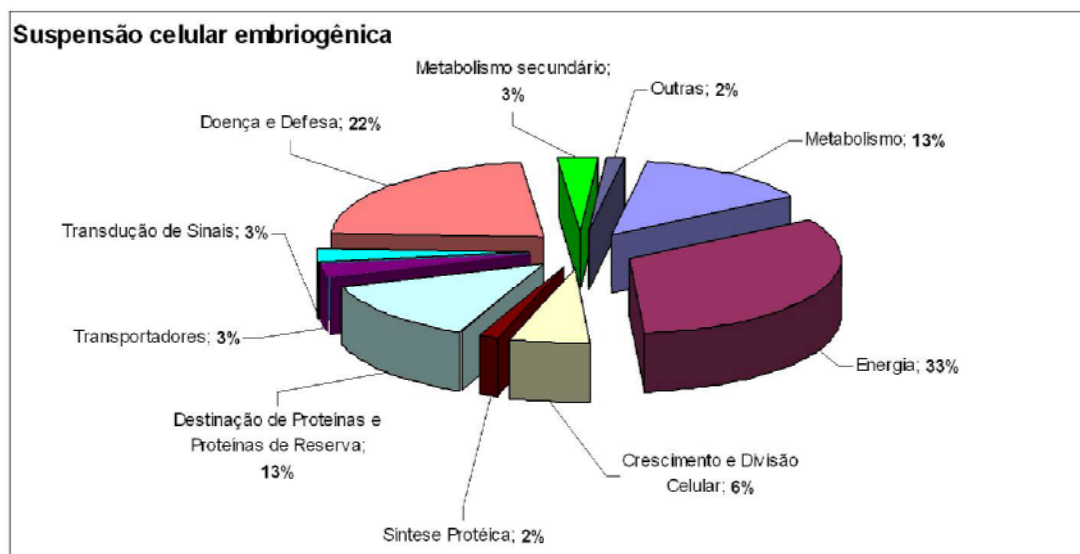


Figura 4. Distribuição funcional relativa das proteínas identificadas em suspensão celular embriônica de feijão-de-corda (*V. unguiculata*). As categorias de classificação foram previamente reportadas por (Bevan *et al.*, 1998).

As proteínas *CPRD14 protein, class I chitinase, cysteine proteinase, cytosolic ascorbate peroxidase, manganese superoxide dismutase, copper/zinc-superoxide dismutase, thaumatin-like protein, wound-induced protein, pathogenesis related protein, cysteine proteinase inhibitor e peroxidase* foram identificadas no grupo doença e defesa, em SCE. O inibidor de proteinase presente em SCE (*spot* 106, ver Figura 2 e Tabela 1) foi previamente isolado de sementes maduras de feijão-de-corda (Fernandes *et al.*, 1991) e um papel de defesa dessa proteína no estresse biótico (Flores *et al.*, 2001) e abiótico (Diop *et al.*, 2004) foi demonstrado.

A preponderância de proteínas relacionadas com a defesa e resposta ao estresse em SCE de feijão-de-corda pode, em parte, ser atribuído ao estresse associado com o crescimento das células em meio de cultura, como demonstrado anteriormente em *Cichorium* (Helleboid *et al.*, 2000), *G. max* (Thibaud-Nissen *et al.*, 2003), *Lupinus luteus* (Przymusinski *et al.*, 2004) e *Arachis hypogaea* (Jain *et al.*, 2006).

Entre as proteínas mais abundantes presentes nas SCE, várias foram identificadas como proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas): *thaumatin-like protein* ou proteína PR-5 (*spot* 75), *wound-induced protein* ou putativa proteína PR-4 (*spot* 84), *class I chitinase* ou proteína PR-4 (*spots* 40 e 41), *peroxidase* ou proteína PR-9 (*spots* 118 e 119) e *pathogenesis related protein* ou proteína PR-10 (*spot* 94) (Figura 2 e Tabela 1). A abundância de proteínas PR (principalmente, proteínas PR-10) também foi encontrada em suspensões celulares (Watson *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2005), suspensões celulares embriogênicas originadas de protoplastos (Imin *et al.*, 2004) e culturas de folhas submetidas à embriogênese somática (Imin *et al.*, 2005) em *M. truncatula*. Numa seção subsequente desta dissertação, será mostrada a presença em sementes maduras de feijão-de-corda de três proteínas PR, uma *defensin* ou proteína PR-12 (*spot* G246), a mesma *chitinase class I* ou proteína PR-4 (*spot* A54), e a mesma *pathogenesis related protein* ou PR-10 (*spot* G159) encontrada em SCE de feijão-de-corda (Figura 16 e 17 e Tabela 3).

A função bioquímica de algumas quitinases de plantas reside na degradação de paredes celulares de fungos, embora a expressão de genes de quitinases tenha sido encontrada na ausência de patógenos (Van Hengel *et al.*, 1998). Além disso, a habilidade de proteínas tipo quitinase em clivar cadeias de açúcar das proteínas arabinogalactanos foi mostrada em linhagens de células embriogênicas de cenoura (Van Hengel *et al.*, 2001). Segundo estes autores, a atividade enzimática das quitinases poderia produzir moléculas

sinais que teriam uma participação na embriogênese (Helleboid *et al.*, 2000; Tchordadjieva e Pantchev, 2006).

As proteínas PR-10 são proteínas reguladas em resposta de plantas a vários fatores bióticos e abióticos e provavelmente também têm um papel chave em muitos programas de desenvolvimento das plantas. Muitos alérgenos de pólen estão incluídos na família PR-10. Embora tenha sido reportado que as proteínas PR-10 possuam atividade ribonucleásica, como em raízes de *Lupinus albus* (Bantignies *et al.*, 2000) e folhas de *Capsicum annuum* (Park *et al.*, 2004), outras funções foram atribuídas para essas proteínas. Alternativamente, as proteínas PR-10 têm um papel na homeostase dos fitormônios, pois foi demonstrada sua ligação específica com citicininas e brassinosteróides e, dessa forma, fornecendo um mecanismo para regular a atividade da citocinina na célula (Fujimoto *et al.*, 1998; Markovic-Housley *et al.*, 2003). Adicionalmente, algumas proteínas PR-10 são induzidas por auxinas, e tanto auxinas quanto citocininas estão envolvidas na ativação da formação do embrião (Immin *et al.*, 2005). Então, possivelmente o papel da proteína PR-10 encontrada em SCE de feijão-de-corda intercede na resposta das células aos reguladores de crescimento do meio de cultura.

Com o propósito de confirmar a presença da proteína PR-10 identificada em SCE do feijão-de-corda (Tabela 1, Figura 5), foram produzidos anticorpos policlonais contra um peptídeo que foi sintetizado com base na sequência de uma proteína identificada a partir do cDNA (gi|1449405) obtido do feijão-de-corda e a partir do qual a proteína do spot 94 foi identificada. A utilização desses anticorpos nos experimentos de western blot mostrou que a proteína PR-10 está presente em SCE, sementes em desenvolvimento, raízes, caules, folhas e em raízes submetidas ao estresse salino (Figura 6). O western blot de géis bidimensionais de SCE mostram a presença de pelo menos cinco isoformas da PR-10 nas SCE (Figura 7). Estes resultados sugerem que (1) a proteína PR-10 é constitutivamente presentes em sementes em desenvolvimento e nos diferentes órgãos do feijão-de-corda, (2) não têm sua expressão influenciada pelo estresse salino e (3) as diferentes isoformas presentes nas SCE podem ser o resultado de modificações pós-traducionais ou, alternativamente, são codificadas por uma família multigênica. Estudos posteriores às pesquisas aqui relatadas, mostraram que a multiplicidade de isoformas da PR-10 pode ser o resultado de modificações pós-traducionais, uma vez que estudos de RT-PCR mostraram a transcrição de apenas um gene nas SCE (dados não mostrados). Park *et al.* (2004)

reportaram que a atividade ribonucleásica de uma proteína PR-10 isoladas de folhas de *Capsicum annuum* é dependente de fosforilações sofridas por essa proteína.

Na primeira parte desse estudo, o padrão de expressão de proteínas em SCE de feijão-de-corda foi investigado utilizando as técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Foram estabelecidos mapas de referência de SCE de alta qualidade, de onde foram excisados 128 “spots” para análise no espectrômetro de massa. Sessenta e sete proteínas foram identificadas e classificadas principalmente nos grupos funcionais energia, doença/defesa, metabolismo e destinação de proteínas/proteínas de reserva. Este alto percentual de identificação de proteínas é notável, especialmente quando se leva em conta o pequeno número de seqüências de genes de feijão-de-corda nas bases de dados utilizadas para a identificação de proteínas. Os “spots” mais abundantes em SCE de feijão-de-corda foram identificados como proteínas PR, pertencendo às famílias PR-4 (quitinase) e PR-10 (ribonuclease). Embora a presença dessas proteínas na histodiferenciação de massas pró-embriogênicas em embriões somáticos já tenha sido previamente citado na literatura, o papel delas no desenvolvimento de embriões somáticos ainda precisa ser bem estabelecido, com o propósito de discriminar entre as SCE capazes de regenerar uma planta completa e as SCE não embriogênicas. Finalmente, os dados aqui apresentados demonstram que a obtenção do proteoma completo de SCE de feijão-de-corda é perfeitamente com a abordagem utilizada aqui.

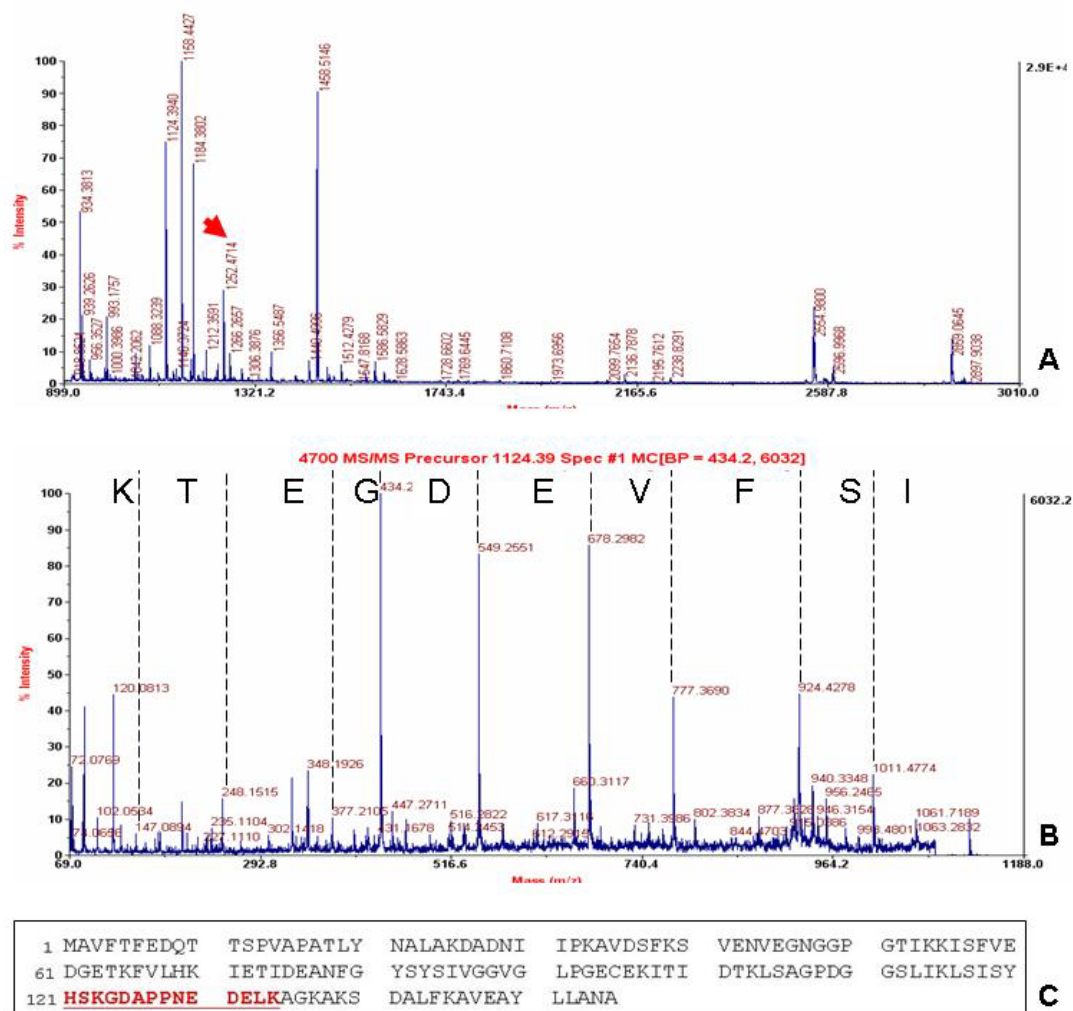


Figura 5. Análise por espectrometria de massa dos peptídeos tripticos eluídos do “spot” 94. (A) Espectro de massa dos peptídeos gerados pela digestão do “spot” 94 com tripsina. A seta indica o íon escolhido (1252.4714) para fragmentação e análise de MS/MS, uma sequência (ISFVEDGETK) foi obtida a partir desse espectro de fragmentação, pela série “y” (B). (C) Sequência de aminoácidos derivada do cDNA para uma proteína PR-10 de feijão-de-corda. A sequência sublinhada indica o peptídeo sintético que foi usado para preparar anticorpos contra a proteína presente no “spot” 94.

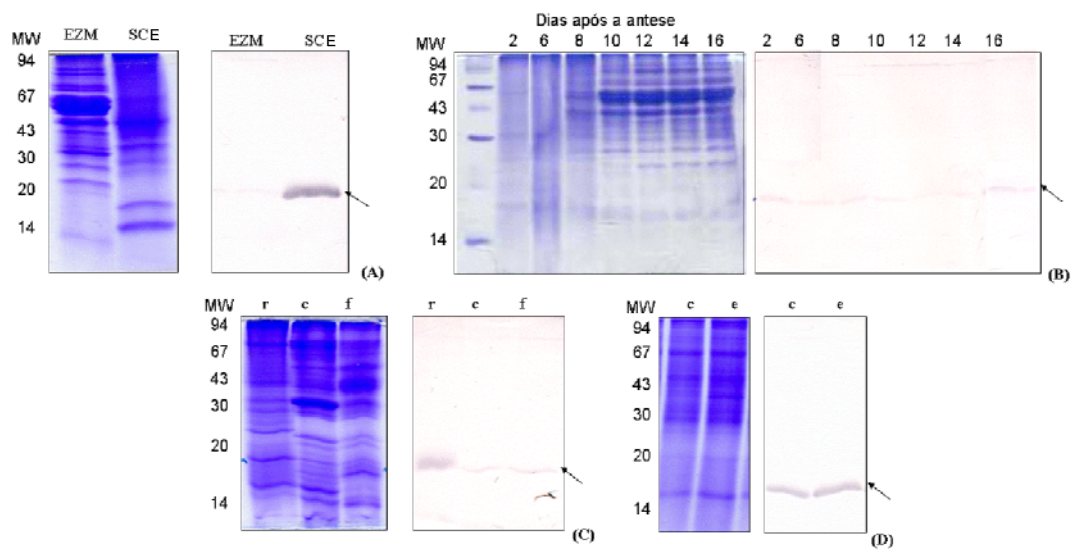


Figura 6. Detecção no feijão-de-corda (*V. unguiculata*) de proteínas que reagem com anticorpos produzidos contra o peptídeo HSKGDAPPNEDELK, correspondente a uma sequência próxima ao C-terminal da proteína PR-10. (A) Detecção em suspensões celulares embriogênicas (SCE) e embriões zigóticos maduros (EZM); (B) detecção em sementes em desenvolvimento (2, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 DAA); (C) detecção em raízes (r), caules (c) e folhas (f); (D) Detecção em raízes submetidas a estresse salino (e) e raízes controle (c).

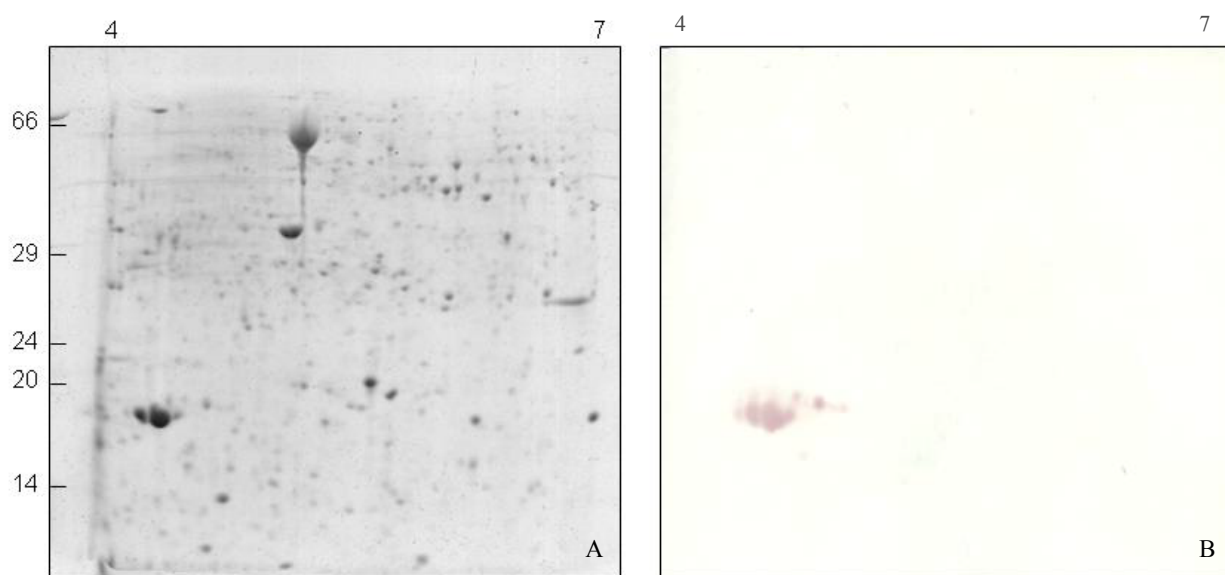


Figura 7. Análise por western blot da expressão da proteína PR-10 em suspensão celular embriogênica de feijão-de-corda (*V. unguiculata*). Após a separação por eletroforese bidimensional utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 4-7, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpos policlonais produzidos contra o peptídeo sintético HSKGDAPPNEDELK, que corresponde à região C-terminal da proteína PR-10. (A) Gel 2D corado com coomassie brilliant blue; (B) membrana de nitrocelulose incubada com os anticorpos policlonais.

4.2. Análise proteômica da deposição de proteínas em sementes do feijão-de-corda (*V. unguiculata*)

Nesse trabalho foram analisadas sementes em desenvolvimento de feijão-de-corda (*V. unguiculata*). Para tanto, o peso fresco das sementes com 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dias após a antese (DAA) e sementes maduras (≥ 18 DAA) foi obtido (Figura 8). Os resultados obtidos coincidem com aqueles descritos por Vasconcelos (2005). Há um pequeno aumento no peso das sementes até o oitavo DAA. Do oitavo ao décimo quarto dia há um aumento pronunciado no peso. No décimo quarto dia inicia-se a fase de desidratação das sementes com conseqüente diminuição e estabilização do peso fresco.

Vasconcelos (2005) constatou que em sementes com 8 e 10 DAA iniciam-se a expansão celular e o acúmulo de reservas, principalmente proteínas, no caso do feijão-de-corda (*V. unguiculata*). Nessa fase a semente tem um grande aumento no seu peso fresco e na quantidade de proteínas totais, atingindo um pico no décimo quarto DAA. As principais proteínas de reserva acumuladas nas sementes de feijão-de-corda são as vicilinas, globulinas 7S (Pedalino *et al.*, 1992). As vicilinas começam a ser expressas em sementes de feijão-de-corda com oito DAA (Nogueira, 2005; Vasconcelos, 2005). Nos estágios tardios de desenvolvimento das sementes, posterior ao décimo quarto DAA, há uma diminuição e posterior estabilização no peso fresco da semente indicando a perda de água e acúmulo de proteínas LEA. Nessa fase o embrião prepara-se para a dormência, as *dehydrin* (proteínas LEA) são expressas nas sementes de feijão-de-corda, indicando que o embrião necessita dessas proteínas para se defender contra a dessecação (Ismail *et al.*, 1999). Vasconcelos (2005) constatou o aparecimento de *dehydrin* no 12 DAA por análise de western blot. Esse resultado entra em desacordo com o que é afirmado por Close (1996), pois essa proteína, característica do período de dessecação, foi detectada dois dias antes do início desse período.

Assim, como as sementes com 10 DAA estão no início do estágio de acúmulo de reservas e bem antes da fase de dessecação, estas foram escolhidas para análise proteômica, para que as proteínas identificadas neste estágio de desenvolvimento pudessem ser comparadas com aquelas identificadas em sementes maduras.

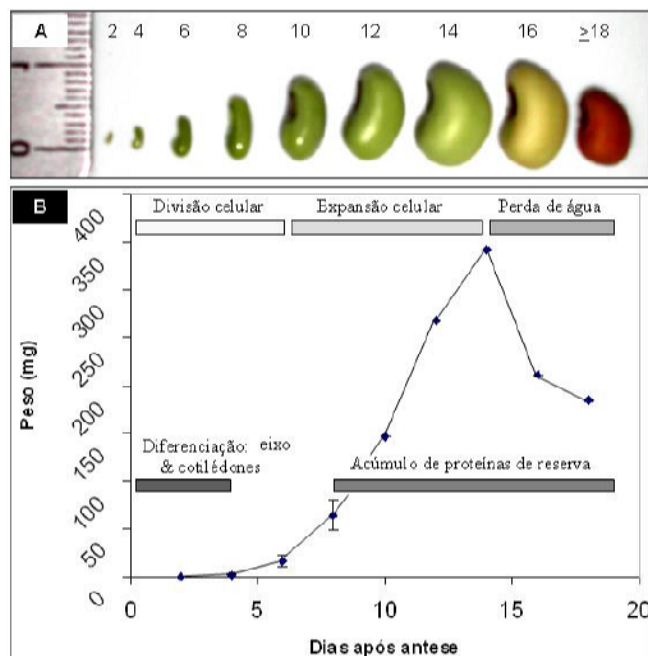


Figura 8. Desenvolvimento das sementes de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) (cv. Pitiúba). (A) Sementes nos diferentes estágios de desenvolvimento. (B) Variação do peso fresco durante o desenvolvimento das sementes. As etapas que caracterizam o desenvolvimento de sementes de angiosperma estão indicadas (Vasconcelos, 2005).

4.2.1. Estabelecimento dos mapas proteômicos de sementes com 10 DAA e sementes maduras

Mapas de referência bidimensionais reprodutíveis de sementes com 10 DAA e sementes maduras foram obtidos (Figura 9). A separação das proteínas por focalização isoeletrica foi realizada utilizando tiras de IPG nas faixas de pH de 3-10 e 4-7. Nos géis de sementes com 10 DAA (10 DAA) e sementes maduras (≥ 18 DAA) foram aplicados 300 μ g de proteínas para ambas as faixas de pH. Após a SDS-PAGE, os géis foram corados com Coomassie R 350 (PhastGel Blue R) e analisados com o auxílio do programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE-Healthcare). Um total de 380 (10 DAA, 3-10), 360 (10 DAA, 4-7), 375 (≥ 18 DAA, 3-10) e 350 (≥ 18 DAA, 4-7) “spots” foram detectados.

Em todos os géis analisados há a predominância de um “spot” numa faixa de pI e peso molecular coincidente com o pI e peso molecular das vicilinas do feijão-de-corda. Sua intensidade é tal que afeta tanto a focalização isoeletrica, quanto a migração na segunda-dimensão das outras proteínas presentes em sementes. Com o propósito de aumentar a resolução do “spot” abundante, novos mapas de referência bidimensionais foram obtidos, aplicando-se desta vez nos géis uma quantidade inferior de proteínas, 30 μ g em tiras de IPG de 4-7, tanto para sementes com 10 DAA quanto para sementes maduras. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 9, onde está comprovada uma separação eficiente desse “spot”.

Dada a predominância do caráter globulínico entre as proteínas do feijão-de-corda (Pedalino *et al.*, 1992), uma outra estratégia para extração e fracionamento das proteínas de sementes do feijão-de-corda foi levada em conta nesse trabalho (descrito no tópico 3.3.3.). Com esse método de separação, frações protéicas ricas em albuminas (FA) (Figura 10) e frações protéicas ricas em globulinas (FG) (Figura 11) foram utilizadas para a obtenção de mapas bidimensionais de sementes com 10 DAA e sementes maduras. Tiras de IPG com variação de pH de 3 a 10 e 4 a 7 foram utilizados para as frações FA e tiras de IPG de 4-7 foram utilizados para FG.

Os géis com as FA, de sementes com 10 DAA e sementes maduras, foram carregados com 500 μ g de proteínas para ambas as faixas de pH. Cerca de 850 (10 DAA, 3-10), 780 (10 DAA, 4-7), 800 (≥ 18 DAA, 3-10) e 750 (≥ 18 DAA, 4-7) “spots” foram detectados pelo Coomassie R 350 (PhastGel Blue R) e analisados através do uso do programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE-Healthcare). Nos géis com as FG um total de

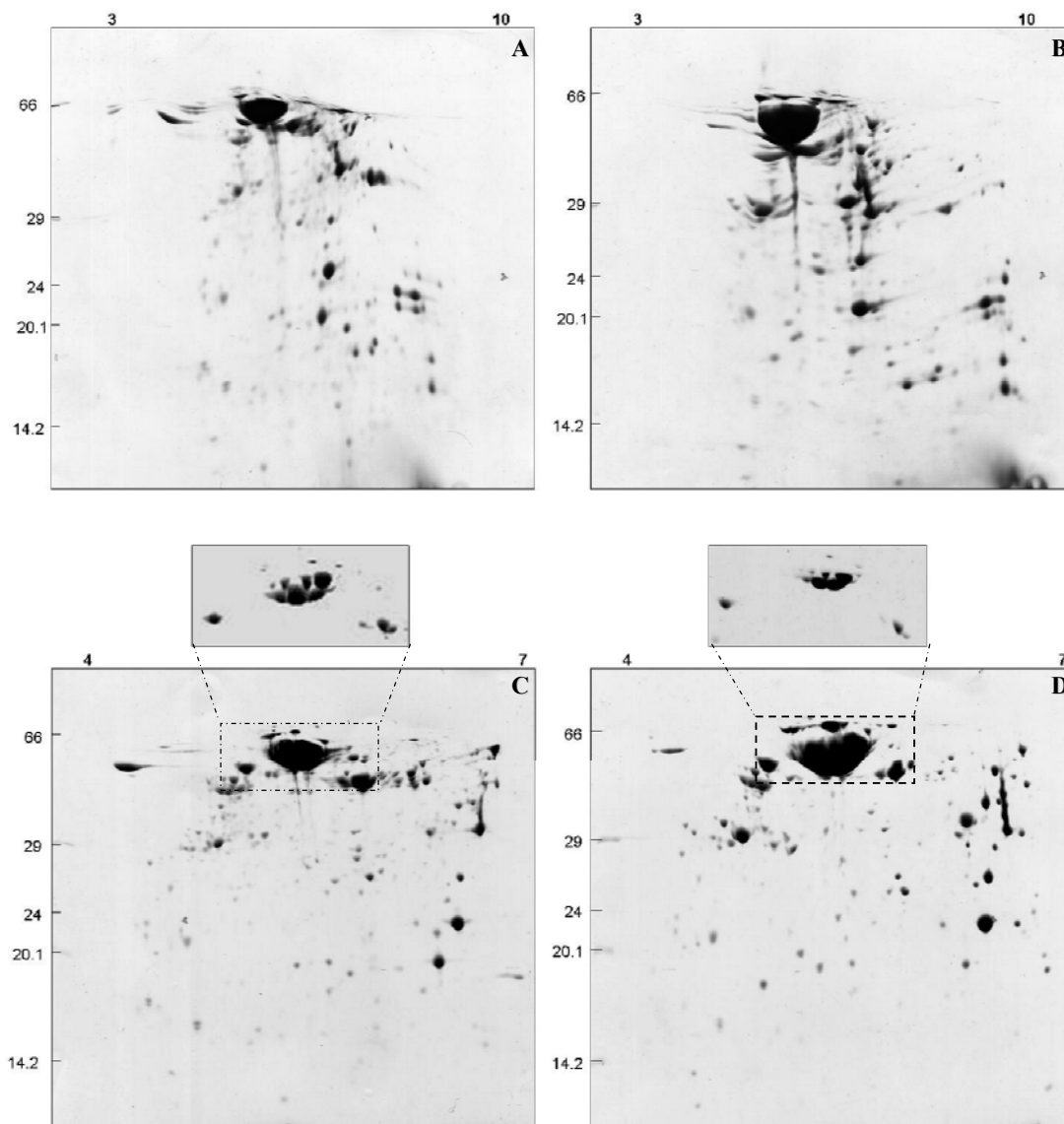


Figura 9. Mapas de referência de sementes com 10 DAA (A e C) e sementes maduras (B e D) de feijão-de-corda (*V. unguiculata*). As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG nas faixas de 3-10 e 4-7. A quantidade de proteína aplicada foi de 300 μ g. Os retângulos tracejados indicam regiões de alta concentração protéica. Estas regiões foram mais bem visualizadas fazendo novas eletroforeses onde uma quantidade bem menor de proteínas (30 μ g) foi aplicada.

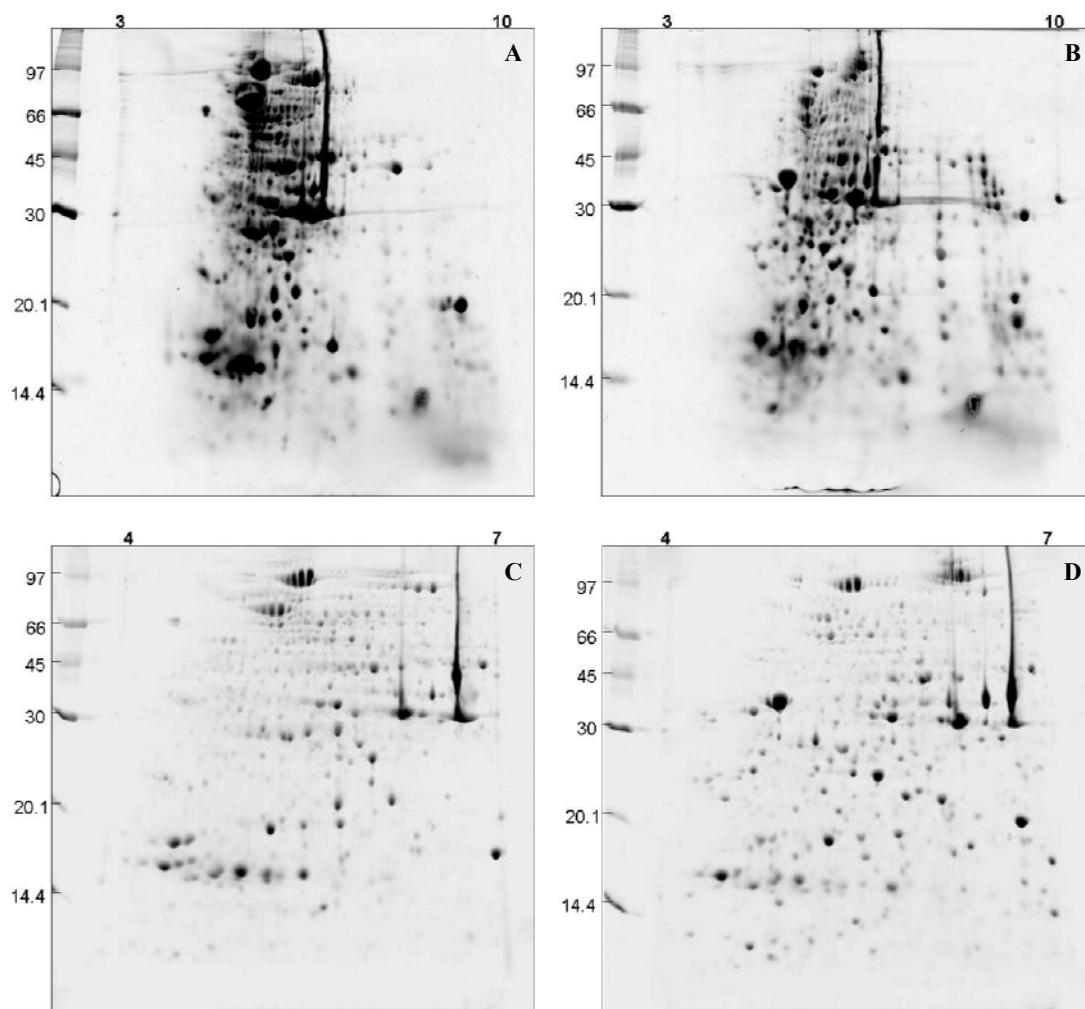


Figura 10. Mapas de referência das frações ricas em albuminas de sementes com 10 DAA (A e C) e sementes maduras (B e D) de feijão-de-corda (*V. unguiculata*). As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG nas faixas de 3-10 e 4-7. A quantidade de proteína aplicada foi de 500 µg.

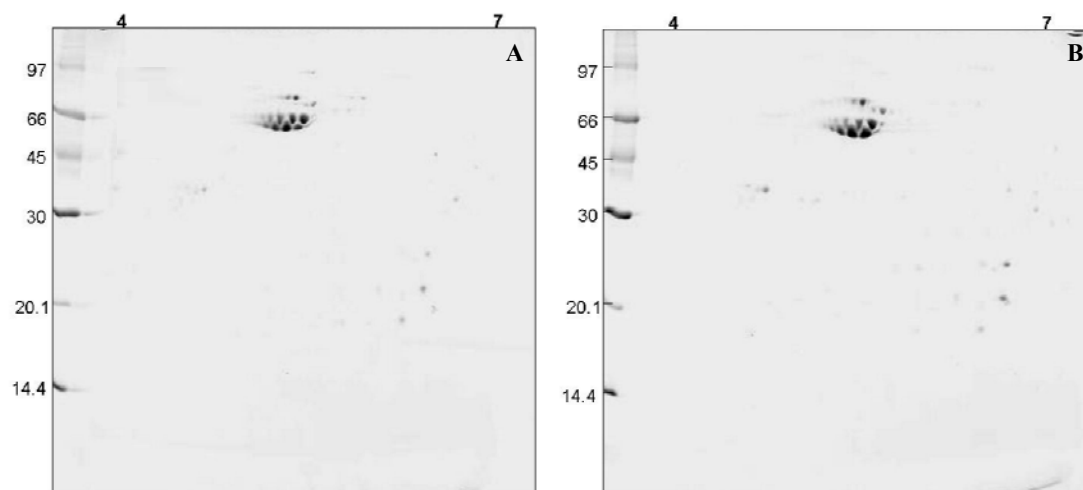


Figura 11. Mapas de referência das frações ricas em globulinas de sementes com 10 DAA (A) e sementes maduras (B) de feijão-de-corda (*V. unguiculata*). As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG nas faixas de 4-7. A quantidade de proteína aplicada foi de 30 µg.

30 µg de proteínas tanto para sementes com 10 DAA quanto para sementes maduras, foram aplicadas nos géis, onde para a focalização isoeétrica, foram utilizadas tiras de IPG na faixa de pH de 4-7. Cerca de 40 “spots” foram detectados pelo Coomassie R 350 (PhastGel Blue R) e analisados através do uso do programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE-Healthcare) tanto para sementes com 10 DAA quanto para sementes maduras.

4.2.2. Identificação de proteínas presentes em sementes com 10 DAA e sementes maduras

Um total de 772 “spots” presentes nos mapas de referência bidimensionais foram selecionados, baseados na sua quantidade ou volume relativo e na sua taxa de expressão (expressão aumentada/diminuída/constante ou que foram específicas para cada um dos estágios de desenvolvimento analisados). Estes “spots” foram excisados dos géis, digeridos com tripsina e analisados em um espectrômetro de massa MALDI-TOF-TOF. A Figura 12 contém dados ilustrativos da análise que foi feita neste trabalho. Nesta figura estão mostrados os dados relacionados com a análise por MS e MS/MS do “spot” A54 (Figura 16, Tabela 3) proveniente de sementes maduras e também o resultado da busca no banco de dados do NCBI utilizando o programa MASCOT.

Para sementes com 10 DAA foram analisados 346 “spots”, assim distribuídos: 34 e 117 “spots” dos géis provenientes da separação das proteínas totais em tiras de IPG com pH de 3-10 e 4-7, respectivamente (Figura 13) e; 10 e 159 “spots” provenientes dos mapas bidimensionais da separação das proteínas presentes na FA, nas faixas de pH de 4-7 e 3-10, respectivamente (Figura 14). Na FG foram analisados 26 “spots” (Figura 15A).

Para sementes maduras 426 “spots” foram analisados e assim distribuídos: 37 e 112 “spots” dos géis provenientes da separação das proteínas totais em tiras de IPG com pH de 3-10 e 4-7, respectivamente (Figura 16); 34 e 216 “spots” provenientes dos mapas bidimensionais da separação das proteínas presentes na FA, nas faixas de pH de 4-7 e 3-10, respectivamente (Figura 17). Na FG foram analisados 27 “spots” (Figura 15B).

Os dados obtidos após o processamento de todos os “spots” foram pesquisados no banco de dados NCBI para Viridiplantae (Green Plants). Dessa forma, 181 (52%) proteínas foram identificadas para sementes com 10 DAA e 193 (45%) para sementes maduras. As proteínas identificadas em sementes com 10 DAA e em sementes maduras, estão listadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Na maioria dos casos, a massa molecular e o pI teóricos, das proteínas identificadas que possuíam a sequência completa depositada no

banco de dados, coincidiram, com pequenos desvios, com a localização das proteínas nos géis 2D. Os desvios encontrados podem ser explicados por erros inerentes a técnica, por modificações ou processamentos pós-traducionais, que não são consideradas para o cálculo teórico das massas. Alguns “spots” obtiveram mais de uma identificação, indicando co-migração de múltiplas proteínas na primeira e segunda dimensão da 2D-PAGE, como, por exemplo, o “spot” G151 (Figura 16, Tabela 3).

Embora o genoma do feijão-de-corda não esteja seqüenciado e a despeito do pequeno número de seqüências de proteínas, cDNAs e ESTs depositadas em bancos de dados públicos (em junho de 2007 havia no NCBI somente 424 ESTs.), os dados apresentados aqui mostram que a espectrometria de massa é um método bem eficiente para a identificação de proteínas do feijão-de-corda obtidas de géis bidimensionais, principalmente quando as buscas dos dados de MS e MS/MS foram conjuntas.

Muitas ESTs são seqüenciadas para plantas como uma alternativa ao seqüenciamento do genoma completo, criando uma excelente fonte que pode ser utilizada por ferramentas de análise de seqüência no campo da proteômica (Rudd, 2003). No caso do feijão-de-corda, um banco de seqüências de ESTs para sementes com 10 DAA foi elaborado num trabalho conjunto entre o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da UFC e o Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP e está em fase final de análise. Quando este banco de dados estiver disponível para servir na identificação das proteínas analisadas por espectrometria de massa em sementes em desenvolvimento e em sementes maduras do feijão-de-corda, o número de proteínas identificadas será seguramente bem mais expressivo.

A abordagem proteômica utilizada nesse trabalho, eletroforese bidimensional aliada ao espectrômetro de massa (*gel based proteomics*), é freqüentemente encontrada na literatura para a identificação de proteínas presentes em sementes de plantas com o genoma seqüenciado, *Arabidopsis* (Gallardo *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 2006; Chibani *et al.*, 2006), ou não, *Hordeum vulgare* (Finnie *et al.*, 2002), *Araucaria angustifolia* (Santos *et al.*, 2006), *Hevea brasiliensis* (Wong e Abubakar, 2005), *Brassica napus* (Hajduch *et al.*, 2006) e, em leguminosas, *Medicago truncatula* (Gallardo *et al.*, 2003; Boudet *et al.*, 2006), ervilha *Pisum sativum* (Schiltz *et al.*, 2004) e soja, *Glycine max* (Mooney e Thelen, 2004; Hajduch *et al.*, 2005; Natarajan *et al.*, 2005).

No trabalho de Gallardo *et al.* (2003), 84 proteínas foram identificadas das 120 que mostraram diferença na cinética de deposição durante o desenvolvimento da semente de *M.*

truncatula. Destas, 23 proteínas eram de reserva de sementes (leguminas, vicilinas e convicilinas). Mooney e Thelen (2004) analisando o proteoma de sementes de soja (*Glycine max*) mostraram que das 44 proteínas identificadas (de 96 analisadas) 60% correspondiam a proteínas de reserva (β -conglícinina e glicinina). Hajduch *et al.* (2005) mostraram que as proteínas de reserva de sementes de soja são os principais contribuintes no conteúdo protéico das sementes no final do seu período de acúmulo de reservas. Os dados estão em concordância com os resultados obtidos para o feijão-de-corda (*V. unguiculata*), pois a maioria dos “spots” identificados também são proteínas de reserva de sementes, principalmente, as globulinas 8S de *Vigna radiata* com suas subunidades.

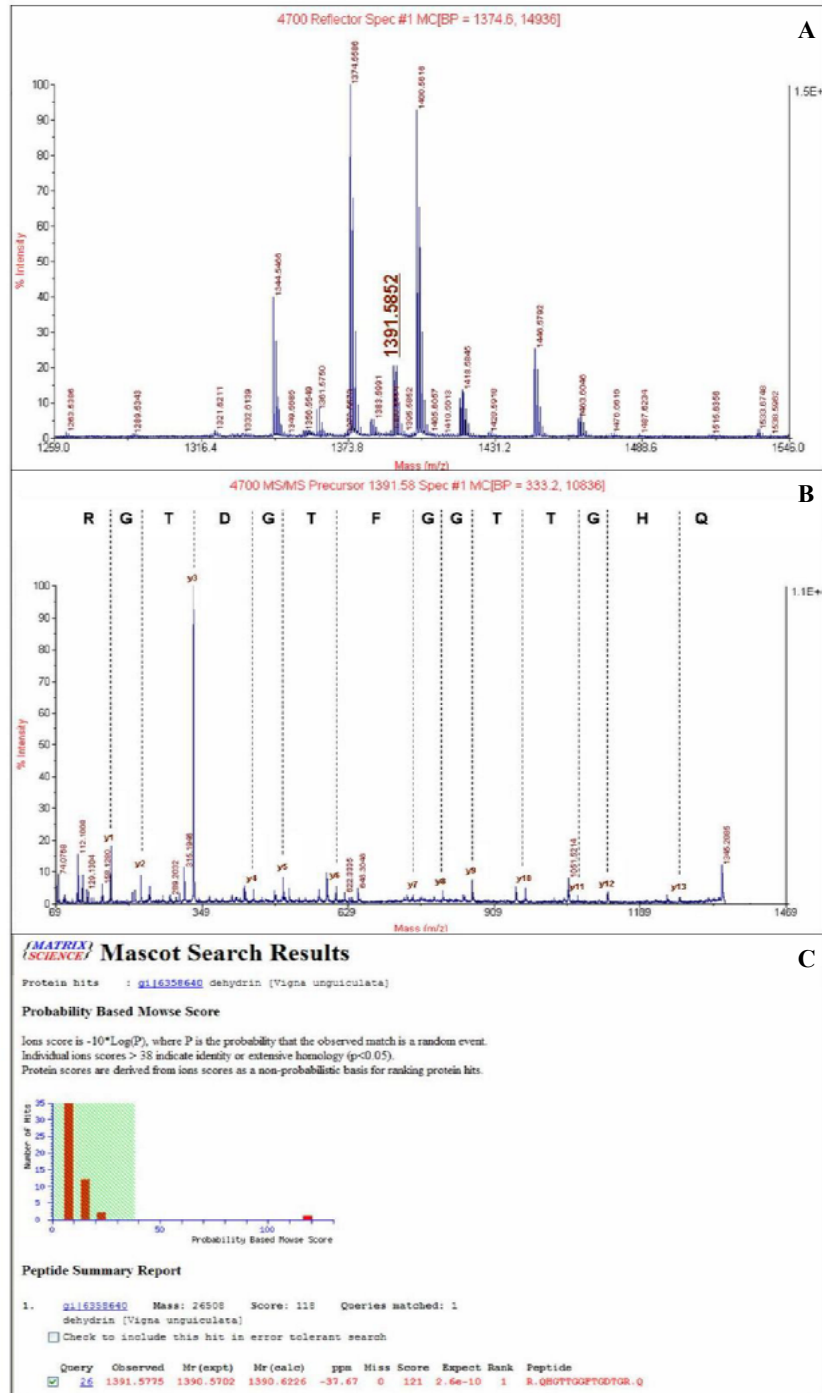


Figura 12. Análise por espectrometria de massa dos peptídeos tripticos eluídos do “spot” A54. (A) Espectro de massa dos peptídeos gerados pela digestão do “spot” A54 com tripsina. O íon em evidência (1391.5852) foi escolhido para fragmentação e análise de MS/MS, uma sequência (QHGTGGFTGDTGR) foi obtida a partir desse espectro de fragmentação, pela série “y” (B). (C) Resultado de busca utilizando o programa Mascot e o banco de dados NCBI.

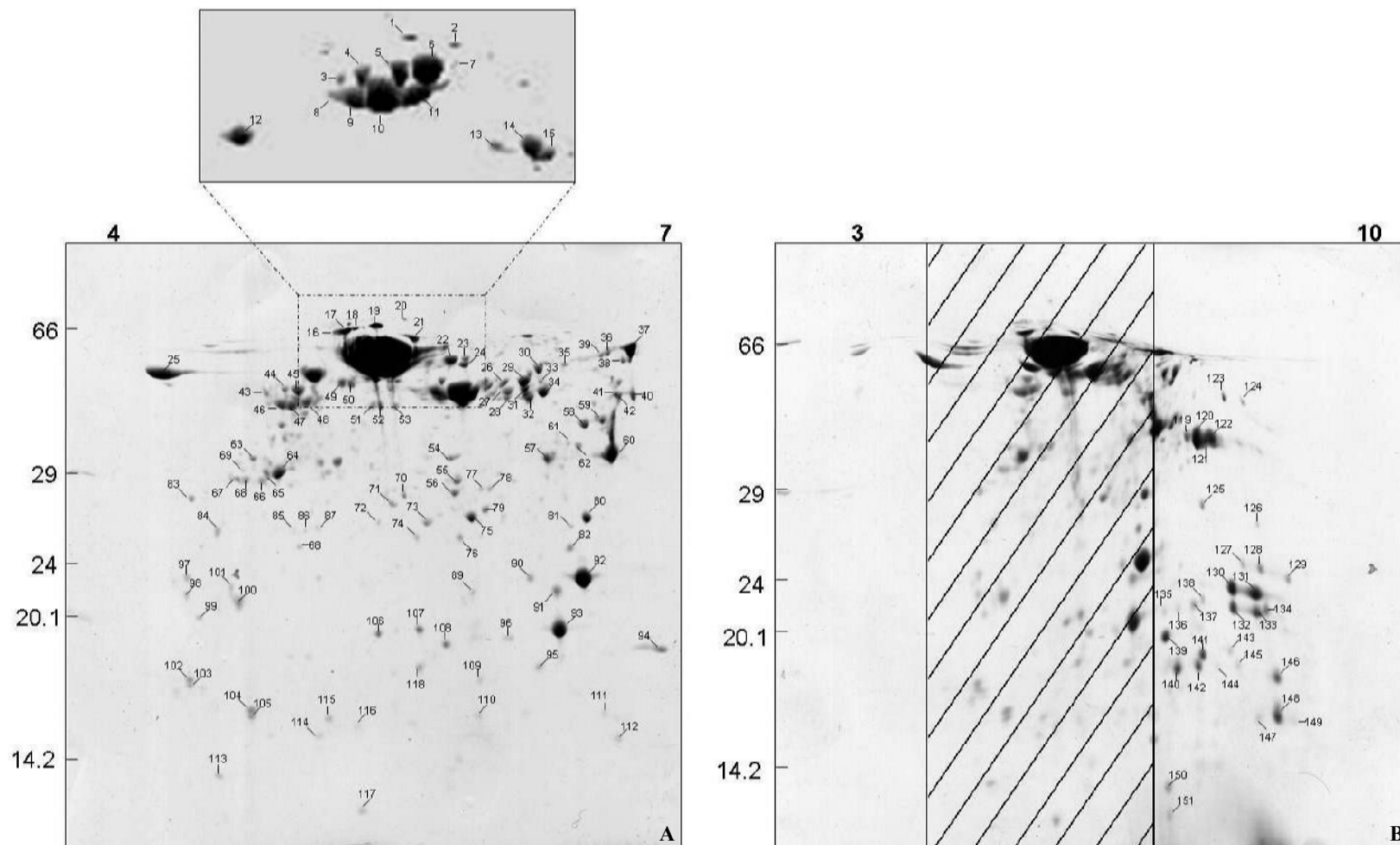


Figura 13. Mapas de referência de sementes com 10 DAA de feijão-de-corda (*V. unguiculata*). As proteínas foram separadas na primeira dimensão em tiras de pH nas faixas de 4-7 (A) e 3-10 (B). A quantidade de proteína aplicada foi de 300 μ g. Os retângulos tracejados indicam regiões de baixa resolução. Estas regiões foram mais bem resolvidas fazendo novas eletroforeses onde uma quantidade bem menor de proteínas (30 μ g) foi aplicada. Os spots analisados por espectrometria de massa estão indicados por números. No texto foi utilizada a letra “B” seguida pelo número do “spot” para designar os “spots” originados destes géis (ver Tabela 2).

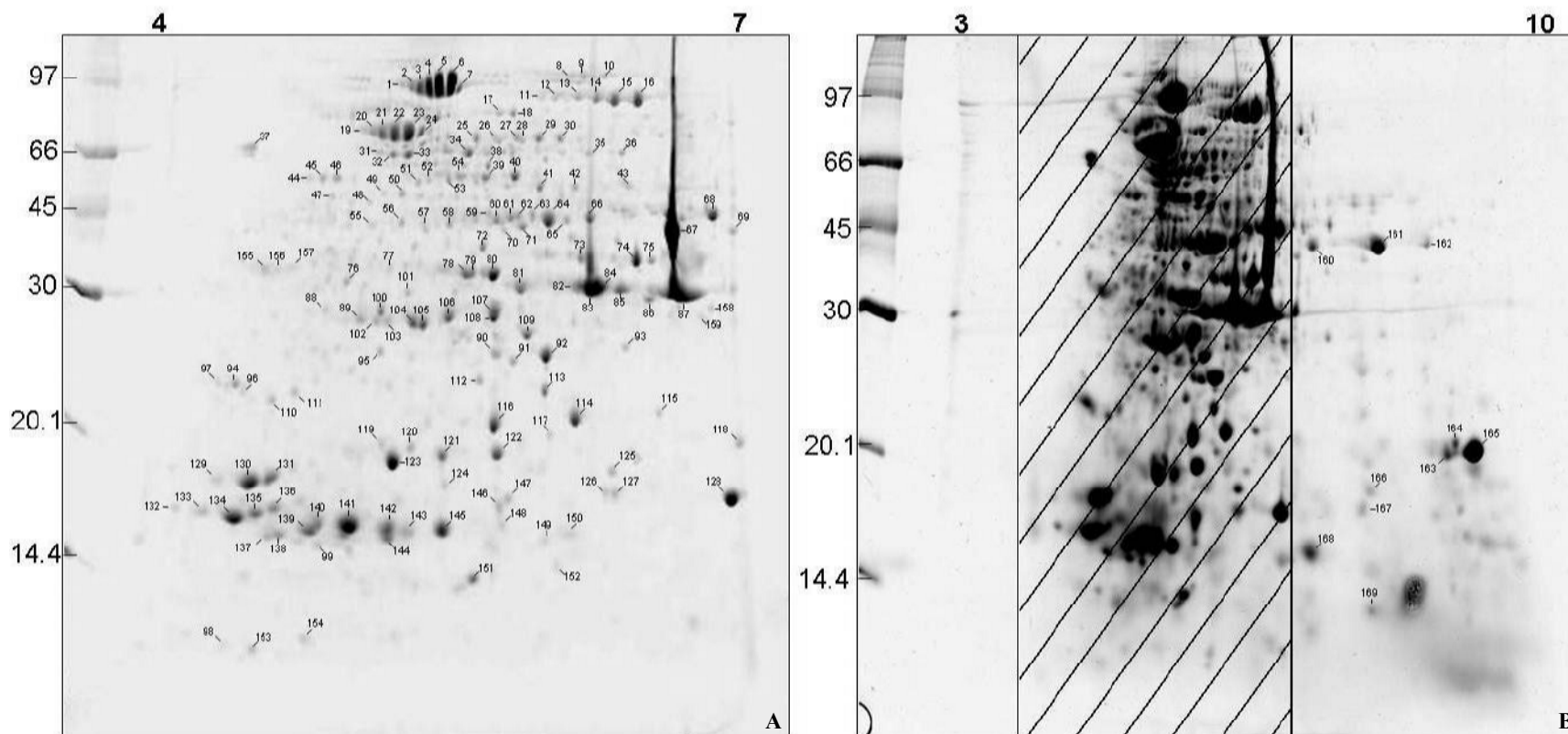


Figura 14. Mapas de referência da fração rica em albumina (FA) de sementes em desenvolvimento (10 DAA) do feijão-de-corda (*V. unguiculata*). As proteínas foram separadas na primeira dimensão em tiras de pH nas faixas de 4-7 (A) e 3-10 (B). A quantidade de proteína aplicada foi de 500 µg. Os “spots” analisados por espectrometria de massa estão indicados por números. No texto foi utilizada a letra “F” seguida pelo número do “spot” para designar os “spots” originados destes géis (ver Tabela 2).

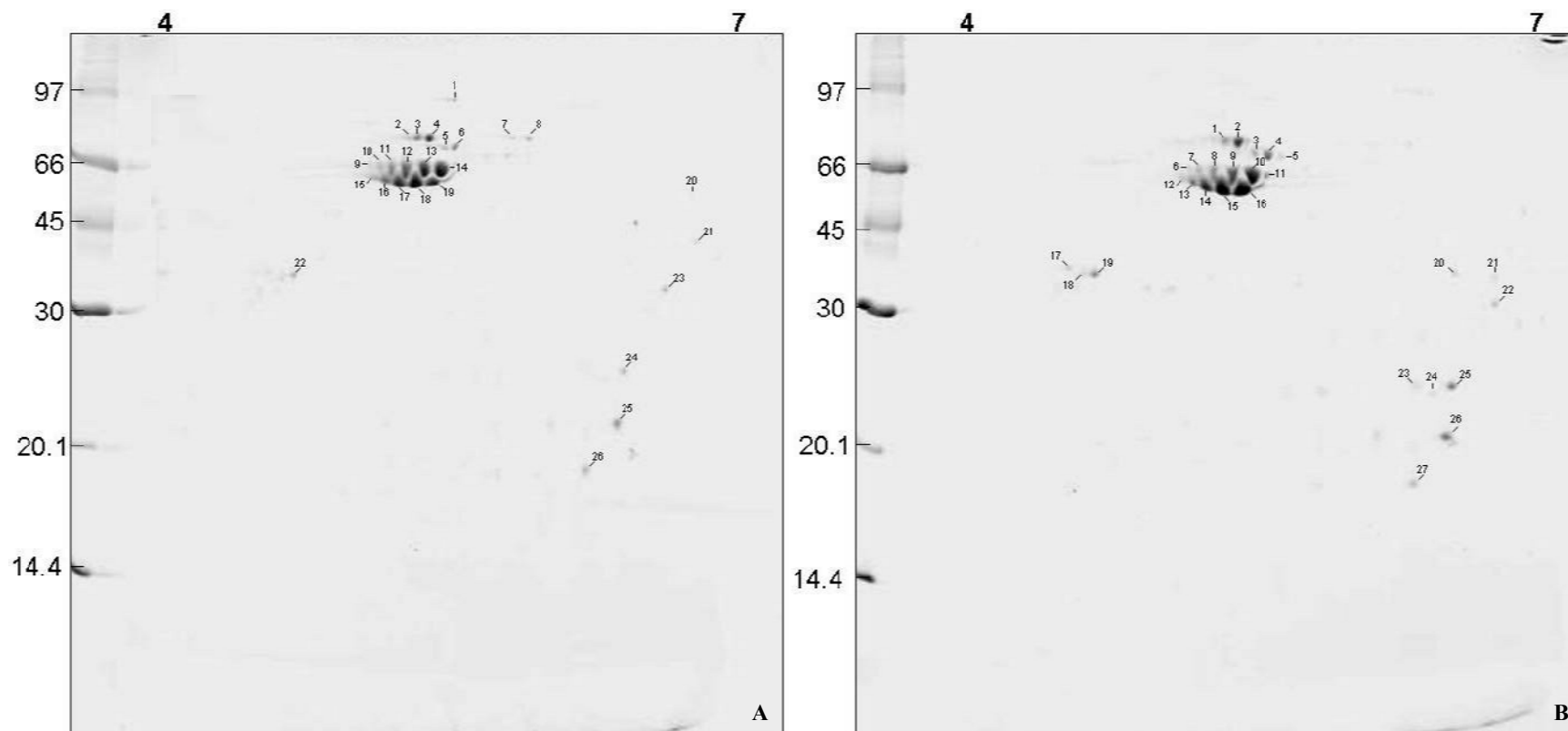


Figura 15. Mapas de referência da fração rica em globulina (FG) de sementes com 10 DAA (A) e sementes maduras (B) do feijão-de-corda (*V. unguiculata*). A separação das proteínas na primeira dimensão foi feita utilizando tiras de IPG na faixa de 4-7. A quantidade de proteína aplicada foi de 30 µg. Os spots analisados por espectrometria de massa estão indicados por números. No texto foi utilizada a letra “H” (sementes 10 DAA) e “I” (sementes maduras) seguida pelo número do “spot” para designar os “spots” originados destes géis (ver Tabelas 2 e 3).

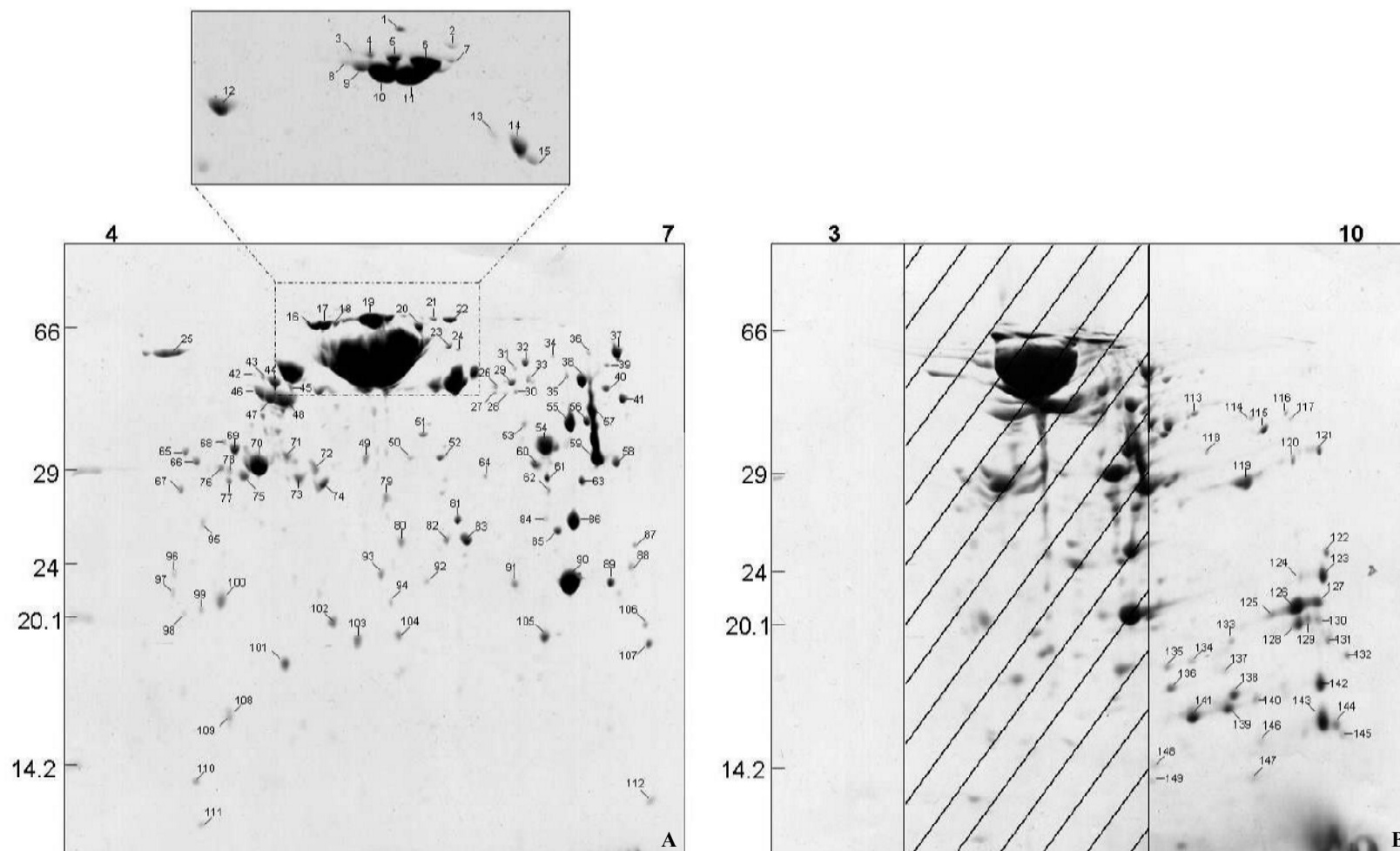


Figura 16. Mapas de referência de sementes maduras de feijão-de-corda (*V. unguiculata*). As proteínas foram separadas na primeira dimensão em tiras de pH nas faixas de 4-7 (A) e 3-10 (B). A quantidade de proteína aplicada foi de 300 μ g. Os retângulos tracejados indicam regiões de baixa resolução. Estas regiões foram mais bem resolvidas fazendo novas eletroforeses onde uma quantidade bem menor de proteínas (30 μ g) foi aplicada. Os spots analisados por espectrometria de massa estão indicados por números. No texto foi utilizada a letra “A” seguida pelo número do “spot” para designar os “spots” originados destes géis (ver Tabela 3).

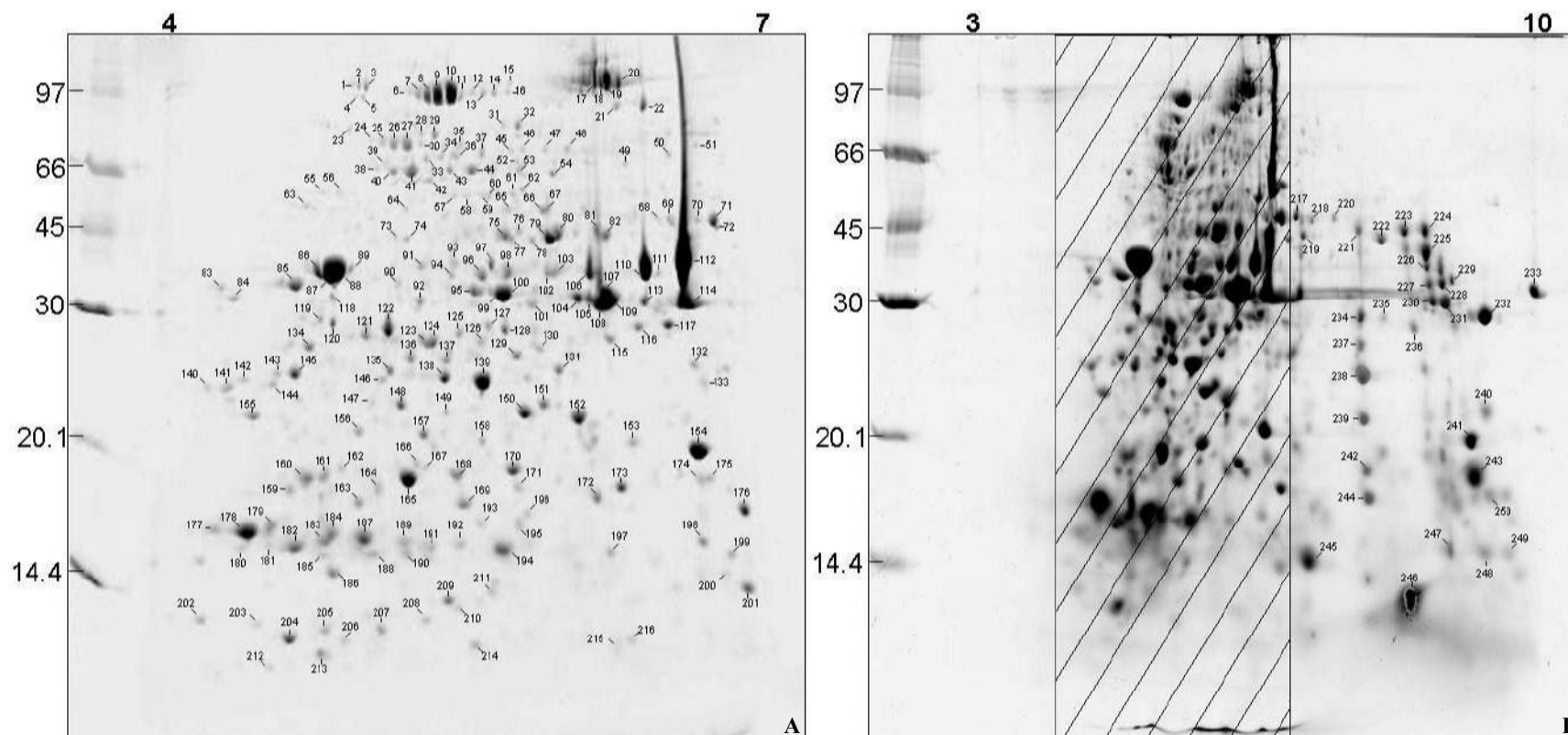


Figura 17. Mapas de referência da fração rica em albumina (FA) de sementes maduras do feijão-de-corda (*V. unguiculata*). As proteínas foram separadas na primeira dimensão em tiras de pH nas faixas de 4-7 (A) e 3-10 (B). A quantidade de proteína aplicada foi de 500 µg. Os “spots” analisados por espectrometria de massa estão indicados por números. No texto foi utilizada a letra “G” seguida pelo número do “spot” para designar os “spots” originados destes géis (ver Tabela 3).

Tabela 2. Lista das proteínas de sementes com 10 DAA de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) identificadas por MS e MS/MS. As identificações foram organizadas de acordo com sua classificação funcional.

Spot n. (*)	MM/pI (kDa) Exp.	Teor.	Protein Score/ Ion Score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
Metabolismo						
B53	37.3/5.5	34.3/5.6	89/50	LIVAVFPSFGER YLSSVLFESVR	gi 18252506	cysteine synthase
B77	29.1/6.0	51.6/5.9	131/95	VLQLETAAGAAIR TNPENPSIELGPEFK	gi 9280626	UDP-glucose pyrophosphorylase
F31	65.6/5.2	51.6/6.0	88/31	VQLLEIAQVPDEHVSEFK	gi 17026394	UDP-glucose pyrophosphorylase
F32	64.6/5.2	51.6/6.0	158/67	VQLLEIAQVPDEHVSEFK	gi 17026394	UDP-glucose pyrophosphorylase
F33	64.4/5.3	51.6/6.0	169/79	VQLLEIAQVPDEHVSEFK ATSDLLLVQSDLYTLEDGFVIR	gi 17026394	UDP-glucose pyrophosphorylase
B85	25.7/5.0	47.9/5.3	64/40	IEEELGAEAVYAGANFR	gi 42521309	enolase
F39	55.8/5.7	47.9/5.3	299/174	VNQIGSVTESIEAVR IEEELGAEAVYAGANFR LAMQEFMVLPGASSFK	gi 42521309	enolase
F40	56.0/5.8	47.9/5.3	230/128	VNQIGSVTESIEAVR IEEELGAEAVYAGANFR SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWE HYAK	gi 42521309	enolase
F54	56.3/5.5	47.9/5.3	71/27	IEEELGAEAVYAGANFR	gi 42521309	enolase
B94	18.1/7.0	16.4/6.3	120/102	IIGATNPAQSEPGTIR KIIGATNPAQSEPGTIR	gi 1389640	PNDKN1
F128	16.4/6.9	16.4/6.3	105/86	IIGATNPAQSEPGTIR	gi 1389640	PNDKN1
B139	19.6/7.1	16.4/5.9	104/74	IIGATNPAQSEPGTIR	gi 296174	nucleoside- diphosphate kinase
F129	17.2/4.4	16.4/5.9	122/102	IIGATNPAQSEPGTIR	gi 296174	nucleoside- diphosphate kinase
B110	14.8/6.0	92.4/6.0	115/53	GILQHHQVIAEFEEIPEES	gi 267057	Sucrose synthase (Sucrose-UDP glucosyltransferase)
F145	15.2/5.4	92.4/6.0	216/187	LTDGAFGEVLR GILQHHQVIAEFEEIPEESR	gi 267057	Sucrose synthase (Sucrose-UDP glucosyltransferase)
F9	99.8/6.2	97.0/6.2	165/100	HASDEVYLGER SAWMTDEEFAR LDSQVYGDHTSQITK	gi 18677	lipoxygenase
F10	99.6/6.3	97.0/6.2	85/-		gi 18677	lipoxygenase
F12	90.0/6.1	84.8/5.9	138/60	YLFAGVVDGR AGITVIQIDEAALR YGAGIGPGVYDIHSPR	gi 8439545	methionine synthase
F13	88.7/6.2	84.4/5.9	165/52	YGAGIGPGVYDIHSPR	gi 33325957	methionine synthase
F14	87.9/6.2	84.4/5.9	226/110	YLFAGVVDGR AGITVIQIDEAALR YGAGIGPGVYDIHSPR	gi 33325957	methionine synthase
F15	86.8/6.3	84.4/5.9	221/96	YLFAGVVDGR YGAGIGPGVYDIHSPR LNLPIPTTTIGSFQTVELR	gi 33325957	methionine synthase
F16	86.8/6.5	84.4/5.9	219/57	YGAGIGPGVYDIHSPR	gi 33325957	methionine synthase
F34	64.9/6.2	34.2/4.9	89/-		gi 6601496	S-adenosyl homocysteine hydrolase

F41	52.4/6.0	50.4/6.9	106/71	LQAGYLFPEIAR THVVTTPGSGFGPGGEGFVR	gi 92882071	Aminotransferases class-I pyridoxal- phosphate-binding
F42	52.6/6.2	50.4/6.9	78/41	LQAGYLFPEIAR	gi 92882071	Aminotransferases class-I pyridoxal- phosphate-binding
F43	52.8/6.4	50.7/7.1	184/65	EYLPiEGLAAFNK FEGIPMAPDPILGVSEAFK	gi 169915	aspartate aminotransferase
F45	55.7/4.9	48.0/5.6	74/31	VTSVASFFVSR	gi 32481059	Transaldolase
F47	47.9/5.0	45.9/6.0	122/81	VFTAESYLICK ISTPSDALFVGLGTHYVPSGK	gi 42565158	3-hydroxyisobutyryl- CoA hydrolase/ catalytic
F52	54.3/5.4	47.5/5.2	108/53	AYLPFESPAR LPGFHVCVGSGGER	gi 50400859	Monodehydroascorbat e reductase. seedling isozyne (MDAR seedling)
F53	55.0/5.5	47.5/5.2	149/86	AYLPFESPAR LPGFHVCVGSGGER	gi 50400859	Monodehydroascorbat e reductase. seedling isozyne (MDAR seedling)
F59	44.5/5.7	43.5/6.7	124/21	NPFAPTLHFNYR	gi 414667	coproporphyrinogen oxidase
F62	44.1/5.9	43.5/6.7	258/94	IESILVSLPLTAR NPFAPTLHFNYR	gi 414667	coproporphyrinogen oxidase
F63	44.4/5.9	37.0/5.9	76/40	GTPFDFTSEK	gi 92890487	Galactose mutarotase- like
F76	31.4/5.0	32.4/6.0	84/62	HFPGLTLAIR EEGEPQTLDYR	gi 92883254	Inorganic pyrophosphatase
F86	29.1/6.5	31.3/9.1	64/58	AEQYLADSGLPYTIIR	gi 50949047	putative 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase
F101	29.8/5.3	31.3/9.1	68/61	AEQYLADSGLPYTIIR	gi 50949047	isomerase protein putative 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/ isomerase protein
F91	24.0/5.8	21.0/5.6	79/29	VSLDFYSR	gi 4127862	glyoxalase I
F127	16.7/6.3	56.4/5.5	182/144	YVPYVGDSK AMDEYTSEIFMGKK ACVGLAPENNMLEYK	gi 3152731	myo-inositol 1- phosphate synthase;
Energia						
B27	38.9/6.1	35.8/6.3	169/90	MELVDAAFPLLK VLVVANPANTNALILK VLVTGAAGQIGYALVPMI	gi 42521311	cytosolic malate dehydrogenase
F64	42.4/6.0	35.8/6.3	169/88	MELVDAAFPLLK VLVTGAAGQIGYALVPMIAR	gi 42521311	cytosolic malate dehydrogenase
B51	37.3/5.4	43.8/6.9	93/47	LFGVTTLDVVR DDLFINAGIVR	gi 3273828	nodule-enhanced malate dehydrogenase
F55	42.1/5.2	43.8/6.9	200/141	ANTFVAQR LFGVTTLDVVR DDLFINAGIVR	gi 3273828	nodule-enhanced malate dehydrogenase
F61	43.5/5.8	35.8/6.1	131/70	MELVDAAFPLLK LSSALSAASAACDHIR	gi 27462762	malate dehydrogenase
F66	43.2/6.2	35.8/6.1	87/25	MELVDAAFPLLK	gi 27462762	malate dehydrogenase
F69	40.6/6.9	36.0/8.8	236/194	LFGVTTLDVVR DDLFINAGIVK ALEGADVVIIPAGVPR	gi 2827080	malate dehydrogenase precursor
F160	48.2/7.1	36.4/8.4	161/133	LFGVTTLDVVR ALEGADVVIIPAGVPR	gi 21388550	putative mitochondrial NAD-dependent malate dehydrogenase
B32	38.1/6.2	14.4/8.1	205/153	VPTVDVSVDLTVR GILGYTEDDVSTDFVGDSR	gi 5678801	glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase
B35	42.2/6.4	40.9/6.0	115/73	TAPINFLNER GTFYGNKPR	gi 3694835	alcohol dehydrogenase 1

B36	43.5/6.7	40.7/6.1	57/30	ILFNSLCR	gi 22597178	alcohol dehydrogenase 1
B37	44.1/6.7	40.7/6.1	112/86	ILFNSLCR SEESNLCELLR	gi 22597178	alcohol dehydrogenase 1
B52	37.3/5.4	34.8/5.0	111/96	APGGAPANVAIAVAR TALAFVTLR	gi 34907582	putative fructokinase I
B56	28.6/5.8	27.4/5.8	153/119	FFVGGNWK VIACIGETLEQR	gi 77540216	triosephosphate isomerase
F106	27.4/5.5	27.4/5.8	105/57	FFVGGNWK	gi 77540216	triosephosphate isomerase
F107	28.1/5.8	27.4/5.8	78/55	FFVGGNWK	gi 48773765	triosephosphate isomerase
F108	27.4/5.8	27.4/5.8	135/98	FFVGGNWK VIACIGETLEQR	gi 77540216	triosephosphate isomerase
B62	32.9/6.5	15.9/6.5	74/59	YHDELIANAAYIGTPGK	gi 4586596	fructose-bisphosphate aldolase
F17	81.4/5.8	64.3/7.0	67/-		gi 170026	malate synthase
F18	81.0/5.8	65.3/8.4	89/36	WDYIFSIVK	gi 18271	malate synthase
F35	64.9/6.2	53.6/5.3	91/22	DLFGAHTYER	gi 15222639	phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)
F38	59.9/5.7	56.8/5.5	167/79	DYFGAHTYER ICSYAQGMNLR GDCIIDGGNEWYENTER	gi 2529229	6-phosphogluconate dehydrogenase
F49	50.6/5.2	45.1/5.8	93/51	LNFDNNAAYR AILVNIFGGIMK	gi 27803873	succinyl CoA ligase beta subunit
F50	50.6/5.3	45.1/5.8	158/124	LNFDNNAAYR GGTSIEDLAKEFPDIIK	gi 27803873	succinyl CoA ligase beta subunit
F65	43.0/6.1	38.6/5.8	157/91	SAAYYQQGAR IVDLIEQNIVPGIK	gi 1781348	homologous to plastidic aldolases
F70	41.0/5.8	34.5/5.4	97/42	EGFDFSAER IAFQSGINFFDTSPYYGGTSL EK	gi 92877826	Aldo/keto reductase
F112	22.6/5.7	27.9/8.2	122/93	SITDYGSPPEFLSK	gi 19317	photosystem II 23 kDa protein
Crescimento e Divisão Celular						
B101	21.7/4.7	19.0/4.5	130/91	VVDIVDTFR MLVYQDLLTGDELLSDSF	gi 16417595	translationally controlled tumor-like protein
F96	21.9/4.5	19.0/4.5	89/66	VVDIVDTFR GAVDDVDIGANPSAEGGGEDE GVDDAAVK	gi 16417595	translationally controlled tumor-like protein
	21.9/4.5	19.2/4.5	70/53	VVDIVDTFR LQEQTPTFDK	gi 92871673	Mss4-like
F99	14.7/4.8	14.2/4.8	54/37	YMQIQEGPGSVIR	gi 556836	Profilin
F110	21.3/4.6	37.5/4.4	182/160	NTALHYAAGYGR TALHFACGYGEVK	gi 29826242	TGB12K interacting protein 2
	21.3/4.6	37.5/4.4	173/160	NTALHYAAGYGR TALHFACGYGEVK	gi 13310811	ankyrin-repeat protein HBP1
F126	16.8/6.3	16.1/6.7	102/80	IFFIAWSPDTSR YAVFDYEFMTEGNVPK	gi 92870533	Actin-binding. cofilin/tropomyosin type
Síntese Protéica						
B118	17.0/5.6	15.4/5.3	152/152	DFGEEHEAYNVVLQHVK	gi 92884885	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd 45
Destinação de Proteínas e Proteínas de Reserva						
B5	61.6/5.5	51.7/5.7	97/59	IPAGTTFFLVNPNNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor

B6	62.0/5.5	51.7/5.7	94/46	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B7	63.7/5.5	51.7/5.7	60/27	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B15	50.0/5.8	51.7/5.7	-/128	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B23	51.5/5.9	51.7/5.7	131/87	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B24	41.3/5.9	51.7/5.7	159/87	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B26	40.1/6.1	51.7/5.7	154/107	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B29	40.1/6.2	51.7/5.7	168/130	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B31	39.2/6.2	51.7/5.7	133/85	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B33	40.1/6.3	51.7/5.7	75/56	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B40	3.4/6.8	51.7/5.7	162/122	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B42	38.4/6.7	51.7/5.7	-/34	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B43	38.7/4.9	51.7/5.7	53/42	LAIPVNNPHR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B66	29.7/4.8	51.7/5.7	-/31	NPQLKDLDFISSVDMK	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B80	26.4/6.6	51.7/5.7	102/71	LAIPVNNPHR AILTLVNPDPGR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B123	47.1/8.2	51.7/5.7	119/71	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B138	22.6/7.9	51.7/5.7	105/78	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
H12	63.3/5.3	51.7/5.7	86/61	LAIPVNNPHR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
H13	61.8/5.7	51.7/5.7	195/161	AILTLVNPDPGR IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
H14	61.7/5.4	51.7/5.7	131/98	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
H21	53.4/6.7	51.7/5.7	-/80	AILTLVNPDPGR IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
H24	24.9/6.3	51.7/5.7	53/50	LAIPVNNPHR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
B8	58.7/5.2	51.9/5.8	101/57	IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B9	57.9/5.3	51.9/5.8	110/62	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B13	51.5/5.6	51.9/5.8	175/139	IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B14	50.8/5.7	51.9/5.8	140/104	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B28	37.7/6.1	51.9/5.8	168/121	LAVPVNNPHR IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B46	37.3/4.9	51.9/5.8	69/56	FQDFFLSSTEAAQSYLQGFS K	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B47	37.3/5.0	51.9/5.8	-/32	LAVPVNNPHR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B48	37.6/5.1	51.9/5.8	51/37	LAVPVNNPHR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B59	35.7/6.3	51.9/5.8	158/114	IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B135	21.7/7.1	51.9/5.8	154/115	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR LAVPVNNPHR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor

B136	22.1/7.6	51.9/5.8	125/98	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B140	17.5/7.4	51.9/5.8	61/45	WFHTLFR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B142	17.7/7.7	51.9/5.8	56/46	WFHTLFR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B152	14.5/9.9	51.9/5.8	146/101	IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
H15	59.8/5.1	51.9/5.8	140/107	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
H18	57.5/5.3	51.9/5.8	-/214	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
H19	57.8/5.4	51.9/5.8	260/266	WFHTLFR LAVPVNNPHR IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
B41	38.4/6.7	26.3/5.1	92/68	GKEVYLK	gi 113570	Albumin-2 (PA2)
B60	32.0/6.7	26.3/5.1	-/39	GKEVYLK	gi 113570	Albumin-2 (PA2)
F83	30.2/6.2	30.4/6.8	79/58	EPEAYLK	gi 1000708	mung bean seed albumin
F87	29.2/6.7	30.4/6.8	97/75	EPEAYLK	gi 1000708	mung bean seed albumin
B72	26.2/5.5	25.2/5.1	82/38	ITQLTDNVYVCR SGSAADSQIVSDYVR YFLHQHTIQLGQPATVK	gi 1743356	proteasome delta subunit
F60	43.0/5.7	97.8/5.1	85/-		gi 92887682	Proteasome/cyclosome regulatory subunit
B151	10.4/7.2	15.0/6.1	181/79	EGIPPDQQR IQDKEGIPPDQQR	gi 30983942	putative polyubiquitin
B127	25.7/8.2	18.4/8.9	122/85	IVFELFADTTTPR	gi 18146786	CYP1
B128	25.3/9.0	18.4/8.7	119/82	IVFELFADTTTPR	gi 18146786	CYP1
B129	22.2/9.7	18.4/8.7	68/26	IVFELFADTTTPR	gi 18146786	CYP1
F115	20.5/6.6	26.7/9.3	80/62	VVIGLYGDDVPQTAENFR	gi 50931055	putative peptidylprolyl isomerase
F117	19.3/6.0	28.8/7.6	99/78	TPWLDNR HVVFGHVIDGMDVVR	gi 92895026	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type
F118	18.9/7.0	18.3/8.3	153/118	FADENFVK VFFDMTIGGQPAGR	gi 829119	Cyclophilin
F165	22.6/9.3	18.3/8.3	-/68	VFFDMTIGGQPAGR	gi 829119	Cyclophilin
F164	23.1/9.1	18.4/8.6	-/56	GIGKSGKPLHYK	gi 167138	Cyclophilin
F20	73.3/5.1	57.2/4.9	98/48	LFKPFDELVDISK	gi 19654	protein disulfide isomerase
F23	72.5/5.3	57.2/4.9	110/59	LFKPFDELVDISK	gi 19654	protein disulfide isomerase
F24	73.3/5.4	57.2/4.9	113/61	LFKPFDELVDISK	gi 19654	protein disulfide isomerase
F21	72.5/5.2	57.2/4.9	109/55	LFKPFDELVDISK	gi 166418	putative endomembrane protein
F22	72.1/5.3	57.2/4.9	124/83	LFKPFDELVDISK	gi 166418	putative endomembrane protein
F95	24.8/5.2	22.2/6.1	119/100	AEYHQQYLEK TEVGYSQGNVHDPNYK	gi 7580480	fruit-ripening gene
	24.8/5.2	21.8/6.3	103/87	AEYHQQYLEK	gi 11342533	methionine sulfoxide reductase

Transportadores

B50	39.8/5.3	56.1/6.3	72/60	HFDSEVVLFFNIK FEEFFGPGGR	gi 6179947	sucrose binding protein homolog S-64
B86	25.7/5.1	56.1/6.3	-/43	HFDSEVVLFFNIK	gi 6179947	sucrose binding protein homolog S-64
B70	28.2/5.6	34.8/5.6	407/226	AVDSLVPPIGR VVDALGVPIIDGR ITNFYTNFQVDEIGR VYGLNEIQAGEMVEFASGVK KGELFVADVNTQLK	gi 22742	pseudo-atpA
B124	46.3/8.7	29.5/8.5	162/142	FSTNENTLTLGTQHALDPLTT LK	gi 36957170	VDAC1.1
Transdução de Sinais						
B69	30.8/4.7	29.1/4.7	185/112	TVEVEELTVEER SAQDIALADLAPTHPIR	gi 3023194	14-3-3-like protein A (SGF14A)
F37	67.4/4.5	48.0/4.5	113/75	FYAISAEYPEFSNK	gi 6682833	calcium-binding protein
Doença e Defesa						
B73	24.4/5.7	24.4/5.8	67/57	LSFLYPATTGR	gi 6466096	1-Cys peroxiredoxin
B75	26.6/5.9	24.4/5.8	87/69	LSFLYPATTGR	gi 6466096	1-Cys peroxiredoxin
F92	24.2/6.0	24.4/5.8	72/66	LSFLYPATTGR	gi 6466096	1-Cys peroxiredoxin
F102	27.2/5.2	24.4/5.8	58/37	LSFLYPATTGR	gi 6466096	1-Cys peroxiredoxin
F103	27.2/5.2	24.4/5.8	67/48	LSFLYPATTGR	gi 6466096	1-Cys peroxiredoxin
F104	27.0/5.3	24.4/5.8	91/63	LSFLYPATTGR	gi 6466096	1-Cys peroxiredoxin
F105	26.8/5.4	24.4/5.8	73/54	LSFLYPATTGR	gi 6466096	1-Cys peroxiredoxin
B87	26.1/5.1	28.3/5.6	69/37	EGVIQHSTINNLAIGR	gi 67904930	2-Cys peroxiredoxin
B107	19.0/5.7	17.5/5.5	102/75	RFALLVDDLK VILFGVPGAFTPTCSLK	gi 19548660	Peroxiredoxin
F122	18.3/5.7	17.5/5.5	78/45	FALLVDDLK	gi 19548660	Peroxiredoxin
	18.3/5.3	17.5/5.5	61/56	HVPGFIER	gi 92896500	Thioredoxin fold
F146	16.1/5.7	12.6/5.6	100/92	FIAPILAEIAK	gi 27466894	thioredoxin h
F148	15.4/5.7	12.6/5.6	82/73	FIAPILAEIAK	gi 27466894	thioredoxin h
F147	16.4/5.8	15.2/6.9	66/37	AYVGDRPTWR	gi 92889376	Thioredoxin-related
B78	29.1/6.0	27.0/5.6	246/160	EDKPEPPPEGR ALLSDPVFRPLVEK HPAELAHGANGLDIIVR YAADEDAFFADYAVAHQR AMGLSDQDIVALS GGHTIGAA HK	gi 1420938	cytosolic ascorbate peroxidase
F94	22.3/4.5	27.0/5.6	186/119	EDKPEPPPEGR YAADEDAFFADYAVAHQK	gi 1420938	cytosolic ascorbate peroxidase
F97	22.5/4.4	27.0/5.6	86/37	EDKPEPPPEGR	gi 1420938	cytosolic ascorbate peroxidase
F93	25.1/6.4	22.9/6.0	130/100	NVRPDYLK HHQTYITNYNK	gi 10862818	IgE-binding protein MnSOD
F120	18.7/5.3	21.5/6.2	56/37	LTHGAPEDEIR	gi 13274148	putative CuZn- superoxide dismutase
F123	17.9/5.2	15.3/5.4	116/64	AVVVHADPDDLK	gi 95100501	superoxide dismutase- 4AP
F130	17.0/4.5	10.4/4.8	79/49	SGDHHEATDEPSESSEACCD R	gi 100121	proteinase inhibitor - cowpea (fragment)

F131	17.3/4.7	10.4/4.8	154/131	SGDHHEATDEPSESSEACCD R	gi 100121	proteinase inhibitor - cowpea (fragment)
F132	16.1/4.2	10.4/4.8	104/67	SGDHHEATDEPSESSEACCD R	gi 100121	proteinase inhibitor - cowpea (fragment)
F134	15.6/4.5	10.4/4.8	60/45	SGDHHEATDEPSESSEACCD R	gi 100121	proteinase inhibitor - cowpea (fragment)
F135	15.8/4.6	10.4/4.8	157/134	SGDHHEATDEPSESSEACCD R	gi 100121	proteinase inhibitor - cowpea (fragment)
F136	16.1/4.7	10.4/4.8	143/106	LNSCHSACK SGDHHEATDEPSESSEACCD R	gi 100121	proteinase inhibitor - cowpea (fragment)
F137	15.0/4.6	10.4/4.8	118/95	SGDHHEATDEPSESSEACCD R	gi 100121	proteinase inhibitor - cowpea (fragment)
F142	15.2/5.2	10.4/4.8	115/74	SIPPQCHCTDIR	gi 100121	proteinase inhibitor - cowpea (fragment)
F111	21.8/4.8	23.0/5.2	96/82	LEGDHAYEIYSFK	gi 54311695	trypsin protein inhibitor 3
F138	15.1/4.7	12.6/5.2	64/37	SIPPQCHCTDIR	gi 90101504	trypsin inhibitor
F139	15.1/4.8	12.6/5.2	87/56	SIPPQCHCTDIR	gi 90101504	trypsin inhibitor
F143	15.2/5.3	12.6/5.2	63/38	SIPPQCHCTDIR	gi 90101504	trypsin inhibitor
F150	15.1/6.1	12.6/5.2	87/56	SIPPQCHCTDIR	gi 90101504	trypsin inhibitor
F140	15.4/4.9	12.5/5.2	62/38	SIPPQCHCTDIR	gi 28569586	trypsin inhibitor
F141	15.3/5.0	12.5/5.2	84/52	SIPPQCHCTDIR	gi 28569586	trypsin inhibitor
F144	14.9/5.2	12.5/5.2	92/62	SIPPQCHCTDIR	gi 28569586	trypsin inhibitor
F145	15.2/5.4	12.5/5.2	103/73	SIPPQCHCTDIR	gi 28569586	trypsin inhibitor
F149	14.8/6.0	12.5/5.2	53/37	SIPPQCHCTDIR	gi 28569586	trypsin inhibitor
F168	15.6/7.0	26.5/5.9	-/78	LPGGHSDNK EKLPGGHSDNK	gi 6358640	Dehydrin
	15.6/7.0	25.9/6.0	-/78	LPGGHSDNK EKLPGGHSDNK	gi 1854447	CPRD22 protein
Outras						
F27	71.1/5.9	119.8/8.7	61/32	AQLEAMLLGLFK	gi 53793728	putative zinc finger protein
F28	69.6/5.9	119.8/8.7	54/41	AQLEAMLLGLFK	gi 53793728	putative zinc finger protein
F29	70.6/6.0	119.8/8.7	50/37	AQLEAMLLGLFK	gi 53793728	putative zinc finger protein
B1	68.2/5.4	125.7/5.8	-/45	REVLIGVLQIVR	gi 2244990	putative protein
F48	47.9/5.1	40.2/5.1	91/65	LYDCVFK GIETNLYAQFK	gi 2262165	unknown protein
F72	41.4/5.8	32.7/5.4	214/172	FLHAVYR DPDGYIFELIQR SAEVNLTQELGK	gi 2213425	hypothetical protein

* As letras “B” (Figura 13), “F” (Figura 14) e “H” (Figura 15) que precedem o número do “spot” indicam o gel de onde foram retirados em sementes com 10 DAA.

Tabela 3. Lista das proteínas de sementes maduras de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) identificadas por MS e MS/MS. As identificações foram organizadas de acordo com sua classificação funcional.

Spot n. (*)	MM/pI (kDa)		Protein Score/ Ion Score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.				
Metabolismo						
A50	34.5/5.7	97.1/6.1	88/42	HASDEVYLGER	gi 1794172	lipoxygenase-3
A143	13.6/9.6	97.1/6.1	121/92	ATFLEGIITSLPTLGAGQSAFK	gi 1794172	lipoxygenase-3
A145	13.0/10	97.1/6.1	84/78	ATFLEGIITSLPTLGAGQSAFK	gi 1794172	lipoxygenase-3
G19	101/6.2	97.1/6.1	151/81	HASDEVYLGER SAWMTDEEFAR	gi 1794172	lipoxygenase-3
G18	99.3/6.2	97.0/6.1	198/111	HASDEVYLGER SAWMTDEEFAR	gi 47168807	Lipoxygenase-3
A140	14.9/8.4	84.2/6.1	43/39	NFMQVEFYLK	gi 21015	lipoxygenase
A146	12.6/8.6	97.0/6.2	49/36	ATFLEGIITSLPTLGAGQSAFK	gi 18677	lipoxygenase
G17	102/6.2	97.0/6.2	208/129	HASDEVYLGER SAWMTDEEFAR	gi 18677	lipoxygenase
G20	99.5/6.3	97.8/5.3	201/155	HASDEVYLGER SAWMTDEEFAR	gi 68161356	13-lipoxygenase
G247	13.5/8.9	97.6/6.0	109/95	IHF EWDDDMGIPGAFYIK ATFLEGIITSLPTLGAGQSAFK	gi 92873016	Plant lipoxygenase
A107	17.3/7.0	16.4/5.9	128/115	IIGATNPAQSEPGTIR	gi 296174	nucleoside- diphosphate kinase
A136	15.4/7.0	16.4/5.9	62/50	IIGATNPAQSEPGTIR	gi 296174	nucleoside- diphosphate kinase
G176	16.8/6.9	16.4/5.9	142/100	IIGATNPAQSEPGTIR	gi 1236951	nucleoside diphosphate kinase
G1	99.3/5.0	98.1/5.2	87/66	INVDQAGFYR	gi 7270256	aminopeptidase-like protein
G2	98.1/5.0	98.1/5.2	66/60	INVDQAGFYR	gi 7270256	aminopeptidase-like protein
G3	97.6/5.1	98.1/5.2	79/62	INVDQAGFYR	gi 7270256	aminopeptidase-like protein
G15	99.5/5.8	48.6/6.5	74/44	SSGNFCTQCEAEGFR	gi 12325009	putative aminopeptidase
G13	95.1/5.6	95.9/5.3	136/94	CIYFPLPTR IDVIHSLEYVCEEYGG R	gi 6634701	galactinol-raffinose galactosyltransferase
G14	95.1/5.7	95.9/5.3	182/147	CIYFPLPTR GGFLGFSHVSPSDR IDVIHSLEYVCEEYGG R YLFAGVVDGR	gi 6634701	galactinol-raffinose galactosyltransferase
G21	89.3/6.3	84.4/5.9	313/219	AGITVIQIDEAALR YGAGIGPGVYDIHSPR YLFAGVVDGR	gi 33325957	methionine synthase
G22	89.3/6.4	84.4/5.9	402/273	AGITVIQIDEAALR YGAGIGPGVYDIHSPR LNLPLPTTTIGSFQTVELR	gi 33325957	methionine synthase
G23	80.1/5.0	50.2/5.4	52/47	AFQNAIFYLNSFADK	gi 108711940	glycoside hydrolase family 28 protein, putative
G38	66.1/5.1	51.6/6.0	283/205	YLSGEAQHVEWSK VQLLEIAQVPDEHVSEFK GGTLISYEGR	gi 17026394	UDP-glucose pyrophosphorylase
G39	67.8/5.2	51.6/6.0	350/265	YLSGEAQHVEWSK VQLLEIAQVPDEHVSEFK	gi 17026394	UDP-glucose pyrophosphorylase

G41	64.3/5.3	51.6/5.9	338/100	GGTLISYEGR YLSGEAQHVESK TNPENPSIELGPEFK VNQIGSVTESIEAVR	gi 9280626	UDP-glucose pyrophosphorylase
G43	65.6/5.4	47.9/5.3	199/133	AAVPSGASTGIYEALRL IEEELGAEAVYAGANFR VNQIGSVTESIEAVR	gi 42521309	enolase
G44	65.2/5.6	47.9/5.3	419/318	AAVPSGASTGIYEALRL IEEELGAEAVYAGANFR VNQIGSVTESIEAVR	gi 42521309	enolase
G62	58.0/5.8	47.9/5.3	163/90	VNLAGHEEYIVR IEEELGAEAVYAGANFR VNQIGSVTESIEAVR	gi 42521309	enolase
G46	72.4/5.9	63.2/6.6	149/131	GVSFMVDNCSTTAR QIGVIGWGSQGPAAQNLR VNQIGSVTESIEAVR	gi 3452497	ketol-acid reductoisomerase
G48	72.7/6.1	64.1/6.3	137/104	GVSFMVDNCSTTAR EGLPAFPMGNIDQTR VNQIGSVTESIEAVR	gi 15231092	ketol-acid reductoisomerase
G50	70.6/6.5	55.0/6.0	133/62	TGFAELIDFNPIR	gi 84468320	putative galactose kinase
G56	57.1/4.9	47.5/5.2	120/74	AYLFPESPAR LPGFHVCGSGGER	gi 50400859	Monodehydroascorba te reductase
G90	34.2/5.2	56.6/5.3	100/72	TEWEGFDTGTR	gi 39653353	allantoinase
G140	23.6/4.3	56.6/5.3	68/46	TEWEGFDTGTR	gi 39653353	allantoinase
G141	23.6/4.4	56.6/5.3	80/51	TEWEGFDTGTR	gi 39653353	allantoinase
G142	24.2/4.5	56.6/5.3	63/52	TEWEGFDTGTR	gi 39653353	allantoinase
G97	37.5/5.7	32.4/5.5	63/45	MLHAVYR	gi 37932483	glyoxalase I
G98	36.0/5.7	39.4/5.6	84/81	TGFTGPLNYYR	gi 2764804	epoxide hydrolase
	36.0/5.7	36.8/5.0	55/54	KPGPIIFPK	gi 92892069	Alpha/beta hydrolase fold
G106	35.7/6.1	32.2/6.0	52/41	VALVTGGDSGIGR	gi 92867569	oxidoreductase
Energia						
A26	44.6/6.1	35.8/6.0	150/114	MELVDAAFPLLK ELVADDAWLNGEFITTQQR LFGVTTLDVVVR	gi 1524121	malate dehydrogenase
G74	43.1/5.3	43.8/6.9	187/149	DDLFINAGIVR GVAADISHCNTPSQVR MELVDAAFPLLK	gi 3273828	nodule-enhanced malate dehydrogenase
G76	44.7/5.8	35.8/5.8	219/161	VLVVANPANTNALILK ELVADDAWLNGEFITTQQR MELVDAAFPLLK	gi 6468487	putative cytosolic malate dehydrogenase
G80	43.6/6.0	35.8/6.1	222/173	LSSALSAASAACDHIR ELVADDAWLNSEFIATVQQR	gi 27462762	malate dehydrogenase
G81	44.6/6.2	35.8/6.1	84/40	LSSALSAASAACDHIR	gi 27462762	malate dehydrogenase
A28	43.7/6.2	36.7/8.3	223/154	VPTVDVSVDLTVR LVSWYDNEWGYSTR GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 120666	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase cytosolic
A30	43.7/6.2	13.1/6.8	157/129	VPTVDVSVDLTVR GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 62631826	glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase
A39	48.1/6.7	36.7/6.3	146/122	LVSWYDNEWGYSSR GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 22094840	glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase
G68	48.4/6.5	12.7/8.1	177/133	VPTVDVSVDLTVR GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 63053710	glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase
G70	48.0/6.7	14.5/6.8	120/61	GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 5678809	glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase
G220	50.5/7.5	14.4/8.1	144/83	VPTVDVSVDLTVR GILGYTEDDVVSTDFVGDSR	gi 5678801	glyceraldehyde 3- phosphate

						dehydrogenase
G217	50.5/7.0	36.5/7.0	168/105	YDTVHGQWK LVSWYDNEWGYSTR	gi 6166167	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. cytosolic 3
A31	48.1/6.2	41.6/5.8	216/121	GTFYGNKYKPR THPVNFLNER FITHTVPFSEINK DHDKPVQEVIAEMTNGGVDR	gi 452769	alcohol dehydrogenase-1F
A34	50.4/6.5	40.9/6.0	107/77	TAPINFLNER GTFYGNKYKPR	gi 3694835	alcohol dehydrogenase Adh-1
A36	50.9/6.6	40.7/6.1	82/57	ILFNLSLCR SEESNLCELLR	gi 22597178	alcohol dehydrogenase 1
A37	50.9/6.8	40.7/6.1	90/51	ILFNLSLCR	gi 22597178	alcohol dehydrogenase 1
G28	78.2/5.3	63.3/5.4	261/190	YLFEDGSR LYIEQYK EDFGGGHPDPNLTYAK FTFCYDALHGVAGAYAK YLFEDGSR	gi 4234941	cytosolic phosphoglucomutase
G29	77.5/5.4	63.6/5.5	225/160	SIFDFESIK EDFGGGHPDPNLTYAK	gi 15223226	phosphotransferases / phosphoglucomutase
G35	74.2/5.6	68.7/5.8	115/58	FVFTDGSR EHWATYGR	gi 6272283	plastidial phosphoglucomutase
G51	73.9/6.7	61.8/6.3	78/41	FLANIDPVDVAR NVVPEVWNVLDK	gi 31879380	cytosolic phosphoglucose isomerase
G54	64.1/6.0	56.8/5.5	301/203	LPANLVQAQR DYFGAHTYER GDCIIDGGNEWYENTER	gi 2529229	6-phosphogluconate dehydrogenase
G31	81.6/5.7	42.2/8.6	113/53	VQNWQWLK	gi 13491886	malate synthase
G32	81.3/5.8	37.8/8.7	68/-		gi 14388711	malate synthase
G33	69.2/5.3	54.9/5.3	289/173	GADWASASGAVR ISDPLEEGCR LGPVVSEGQYK LIVHESIATEFLNR	gi 92893594	Aldehyde dehydrogenase
G34	69.8/5.4	54.9/5.3	102/74	ISDPLEEGCR LGPVVSEGQYK	gi 92893594	Aldehyde dehydrogenase
G37	71.2/5.6	55.3/5.5	70/66	SILFAAVGTAGQR	gi 59860157	aldehyde dehydrogenase family 7 member A1
G45	72.0/5.8	55.4/5.5	150/104	GSDCGIVNANIPTNGAEIGGAF GGEK	gi 29893325	aldehyde dehydrogenase family 7 member A1
G64	51.2/5.3	45.1/5.8	179/130	LNFDDNAAAYR LNIHEYQGAELMSK	gi 27803873	succinyl CoA ligase beta subunit
G69	48.4/6.6	38.9/6.4	67/52	LASINVENVESNR	gi 10800924	fructose-bisphosphate aldolase
G71	47.3/6.8	38.9/6.4	126/98	LASINVENVESNR	gi 10800924	fructose-bisphosphate aldolase
G72	45.7/6.8	38.6/6.7	171/127	YHDELIANAAYIGTPGK	gi 927505	fructose-1,6-bisphosphate aldolase
G125	27.8/5.5	27.4/5.8	86/59	FFVGGNWK VIACIGETLEQR	gi 48773765	triosephosphate isomerase
G128	28.1/5.7	27.4/5.8	157/110	FFVGGNWK VIACIGETLEQR	gi 77540216	triosephosphate isomerase
Destinação de Proteínas e Proteínas de Reserva						
A4	61.6/5.4	51.7/5.7	141/77	IPAGTTFFLVNPNNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
A5	61.6/5.5	51.7/5.7	193/137	AILTLVNPDGR IPAGTTFFLVNPNNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor
A6	6.2/5.5	51.7/5.7	86/48	AILTLVNPDGR IPAGTTFFLVNPNNDNLR	gi 108743976	8S globulin beta isoform precursor

A7	63.7/5.6	51.7/5.7	68/38	AILTLVNP DGR IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A15	50.0/5.8	51.7/5.7	48/21	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A24	51.4/5.9	51.7/5.7	157/111	AILTLVNP DGR IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A40	44.6/6.7	51.7/5.7	173/126	AILTLVNP DGR IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A41	42.9/6.8	51.7/5.7	214/165	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A46	43.7/4.8	51.7/5.7	61/51	LAIPVNNPHR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A58	33.6/6.8	51.7/5.7	229/191	AILTLVNP DGR IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A84	27.5/6.4	51.7/5.7	105/70	QIQNLENYR LAIPVNNPHR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A86	27.2/6.5	51.7/5.7	-/58	LAIPVNNPHR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A111	9.0/4.5	51.7/5.7	72/61	LAIPVNNPHR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A115	40.2/8.6	51.7/5.7	153/111	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A117	42.1/9.0	51.7/5.7	69/34	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A133	18.3/8.0	51.7/5.7	108/66	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A134	17.1/7.3	51.7/5.7	74/21	LAIPVNNPHR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A138	15.1/8.0	51.7/5.7	48/20	AILTLVNP DGR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A142	15.7/9.6	51.7/5.7	86/55	QIQNLENYR AILTLVNP DGR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
I1	74.8/4.9	51.7/5.7	113/80	AILTLVNP DGR IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
I7	64.9/4.7	51.7/5.7	121/78	AILTLVNP DGR IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
I9	63.4/4.9	51.7/5.7	110/81	AILTLVNP DGR IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
I24	23.3/6.2	51.7/5.7	97/82	LAIPVNNPHR AILTLVNP DGR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
I25	23.8/6.3	51.7/5.7	97/72	LAIPVNNPHR	gil108743976	8S globulin beta isoform precursor
A14	50.8/5.7	51.9/5.8	154/125	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gil108743972	8S globulin alpha isoform precursor
A56	39.4/6.6	51.9/5.8	247/220	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gil108743972	8S globulin alpha isoform precursor
A83	25.5/6.0	51.9/5.8	289/253	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR LAVPVNNPHR	gil108743972	8S globulin alpha isoform precursor
A106	18.6/6.9	51.9/5.8	159/133	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR LAVPVNNPHR	gil108743972	8S globulin alpha isoform precursor
A135	16.8/7.0	51.9/5.8	170/134	WFHTLFR LAVPVNNPHR AIVILVINEGK IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gil108743972	8S globulin alpha isoform precursor
A139	14.3/7.9	51.9/5.8	-/61	WFHTLFR	gil108743972	8S globulin alpha isoform precursor
I12	61.0/4.6	51.9/5.8	109/68	IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gil108743972	8S globulin alpha isoform precursor
I13	59.5/4.6	51.9/5.8	166/137	IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gil108743972	8S globulin alpha isoform precursor
I14	57.7/4.7	51.9/5.8	246/210	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gil108743972	8S globulin alpha isoform precursor

I15	56.5/4.9	51.9/5.8	252/219	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
I16	56.0/5.0	51.9/5.8	169/115	WFHTLFR IPAGTTFFLVNPDDNENLR	gi 108743972	8S globulin alpha isoform precursor
A72	32.9/5.1	51.5/5.5	76/47	LAVPVNNPHR	gi 108743974	8S globulin alpha' isoform precursor
A18	50.5/5.2	57.2/4.9	76/60	LFKPFDELFDVDSK	gi 19654	protein disulfide isomerase
G25	74.8/5.1	57.2/4.9	70/53	LFKPFDELFDVDSK	gi 19654	protein disulfide isomerase
G27	73.7/5.3	57.2/4.9	121/77	LFKPFDELFDVDSK	gi 19654	protein disulfide isomerase
G24	76.0/5.1	55.9/5.0	69/55	LFKPFDELFDVDSK	gi 77999357	protein disulfide isomerase
	76.0/5.1	57.2/4.9	104/71	VVVGQTLEDVVFK LFKPFDELFDVDSK	gi 166418	putative endomembrane protein
G26	73.9/5.2	57.2/4.9	123/81	LFKPFDELFDVDSK	gi 166418	putative endomembrane protein
A112	9.8/7.0	15.0/6.7	246/71	EGIPPDQQR ESTLHLVLR IQDKEGIPPDQQR TITLEVESSDTIDNVK	gi 33327286	polyubiquitin 2
G212	11.3/4.6	10.3/6.8	74/33	EGIPPDQQR	gi 14530950	ubiquitin
G213	11.7/4.8	36.4/5.8	130/79	EGIPPDQQR TLADYNIQK	gi 18421671	UBQ9
A123	23.4/9.5	18.4/8.7	139/73	IVFELFADTTTPR	gi 18146786	CYP1
G241	20.6/9.2	18.4/8.7	126/71	IVFELFADTTTPR	gi 18146786	CYP1
G108	30.4/6.2	30.4/6.8	62/58	EPEAYLFK	gi 1000708	mung bean seed albumin
G114	30.9/6.6	30.4/6.8	85/59	EPEAYLFK	gi 1000708	mung bean seed albumin
G234	33.8/7.8	30.4/6.8	89/75	EPEAYLFK	gi 1000708	mung bean seed albumin
G135	24.8/5.2	22.2/6.1	110/109	AEEYHQQYLEK	gi 7580480	fruit-ripening gene
	24.8/5.2	21.8/6.5	94/72	AEEYHQQYLEK	gi 31455408	methionine sulfoxide reductase
Transportadores						
A79	29.7/5.5	34.8/5.6	110/68	ITNFYTNFQVDEIGR	gi 22742	pseudo-atpA
A93	22.5/5.5	19.2/6.9	162/135	GLFDLGHPLLNR ESLQWGVAAAGIYSGITY	gi 87240460	Mitochondrial import inner membrane translocase. subunit Tim17/22
A116	42.9/8.9	29.7/8.5	107/66	VDTDSNLFTTITVNEPAPGLK FSTNENTITLGTQHALDPLTTL K	gi 67848430	mitochondrial voltage-dependent anion-selective
Doença e Defesa						
A49	34.2/5.4	32.6/5.7	63/-		gi 10863764	class I chitinase
A54	35.8/6.4	26.5/5.9	150/105	QHGTGGFTGDTGR	gi 6358640	Dehydrin
	35.8/6.5	25.9/6.0	173/105	QHGTGGFTGDTGR	gi 1854447	CPRD22 protein
G104	31.7/6.1	26.5/5.9	136/101	QHGTGGFTGDTGR	gi 6358640	Dehydrin
	31.7/6.1	25.9/6.0	136/101	QHGTGGFTGDTGR	gi 1854447	CPRD22 protein

G139	23.8/5.6	26.5/5.9	158/113	QHGTGGFTGDTGR	gi 6358640	Dehydrin
	23.8/5.6	25.9/6.0	158/112	QHGTGGFTGDTGR	gi 1854447	CPRD22 protein
G151	22.4/6.0	26.5/5.9	163/120	QHGTGGFTGDTGR	gi 6358640	Dehydrin
	22.4/6.0	25.9/6.0	162/122	QHGTGGFTGDTGR	gi 1854447	CPRD22 protein
G153	20.0/6.4	26.5/5.9	147/92	QHGTGGFTGDTGR	gi 6358640	Dehydrin
	20.0/6.4	25.9/6.0	147/92	QHGTGGFTGDTGR	gi 1854447	CPRD22 protein
G175	18.2/6.8	26.5/5.9	110/82	QHGTGGFTGDTGR	gi 6358640	Dehydrin
	18.2/6.8	25.9/6.0	110/82	QHGTGGFTGDTGR	gi 1854447	CPRD22 protein
G65	51.1/5.8	49.4/7.0	-/49	EASEYASDAAQR	gi 311698	Lea protein
G75	43.6/5.8	49.4/7.0	-/48	EASEYASDAAQR	gi 311698	Lea protein
G79	42.9/6.0	49.4/7.0	125/116	EASEYASDAAQR EAAESWTEWAK	gi 311698	Lea protein
G82	43.7/6.3	49.4/7.0	55/33	EASEYASDAAQR	gi 311698	Lea protein
G88	35.7/4.6	49.4/7.0	60/56	TMDYATDAAQK	gi 311698	Lea protein
G132	25.3/6.7	49.4/7.0	51/36	EAAESWTEWAK	gi 311698	Lea protein
G172	17.3/6.3	10.4/5.3	82/59	SLEAQEHLAEGR	gi 66735602	LEA protein
	17.3/6.3	12.1/8.8	-/130	SLEAQEHLAEGR KQQLGSEGYHEMGTK	gi 1141782	Em protein
G86	36.1/4.8	50.6/6.3	78/72	AGEYTDYASQK	gi 170010	maturation polypeptide
G87	35.7/4.8	50.6/6.3	73/69	AGEYTDYASQK	gi 170010	maturation polypeptide
G88	35.7/4.6	50.6/6.3	60/56	AGEYTDYASQK	gi 170010	maturation polypeptide
G118	32.1/4.9	50.6/6.3	51/46	AGEYTDYASQK	gi 170010	maturation polypeptide
G119	29.1/4.8	50.6/6.3	81/74	AGEYTDYASQK	gi 170010	maturation polypeptide
G134	26.7/4.8	50.6/6.3	-/48	AGEYTDYASQK	gi 170010	maturation polypeptide
G143	24.6/4.6	50.6/6.3	49/45	AGEYTDYASQK	gi 170010	Maturation polypeptide
G145	24.5/4.7	50.6/6.3	74/64	AGEYTDYASQK	gi 170010	maturation polypeptide
G160	18.2/4.8	50.6/6.3	-/39	AGEYTDYASQK	gi 170010	maturation polypeptide
G162	18.7/4.9	50.6/6.3	57/53	AGEYTDYASQK	gi 170010	maturation polypeptide
G194	15.2/5.7	11.9/5.5	/39	KEQIGTEGYQEMGR	gi 18499	late embryogenesis abundant protein
G164	17.8/5.1	16.5/5.1	56/44	EIASGTIPDPGSLK	gi 18252327	putative desiccation protectant protein
G172	17.3/6.3	11.9/5.9	68/59	SLEAQEHLAEGR	gi 444336	water stress-related protein
A81	27.2/5.9	24.4/5.8	87/73	LSFLYPATTGR	gi 6466096	1-Cys peroxiredoxin
G124	27.0/5.4	24.4/5.8	44/37	LSFLYPATTGR	gi 6466096	1-Cys peroxiredoxin

G131	24.8/6.0	24.4/5.8	-/56	LSFLYPATTGR	gi 6466096	1-Cys peroxiredoxin
G52	6.6/5.8	59.8/7.5	255/198	GLTFDSSGGYNIK YAGDVSSGIIFGR LTLADALVYACNQGVK	gi 92895784	leucyl aminopeptidase
G115	27.4/6.3	24.7/5.5	168/135	SQGVELLGR LQPFQVVPVIQDGYTLYESR	gi 21217741	putative glutathione S-transferase
G123	26.9/5.4	25.7/6.2	146/125	FWADYVDK SPLLLQMNPVHK	gi 2920666	2.4-D inducible glutathione S- transferase
G154	19.4/6.7	17.9/5.8	157/153	ETPEAHVFK FRLPENAK KPDVKPVQITG	gi 16930753	small heat shock protein
G165	18.0/5.3	15.6/5.3	65/32	VLQISGER	gi 37704403	Cytosolic class I small heat shock protein 1B
G171	17.8/5.8	17.7/6.4	87/76	EYPNSYVFVIDMPLK	gi 37933812	17.7 kDa heat shock protein
G159	17.7/4.7	16.3/4.7	157/135	GDAPPNEDELK SVENVEGNNGPGTIK LTHGAPEDEIR	gi 1449405	pathogenesis related protein
G167	18.8/5.4	21.5/6.2	255/211	GGHELSTTGNAGGR ALVVHELEDDLK	gi 13274148	putative CuZn- superoxide dismutase
G168	18.4/5.5	15.3/5.4	69/42	EHGAPEDENR	gi 74229677	cytoplasmic Cu/ZnSOD
G169	17.0/5.6	15.4/5.6	143/108	EHGAPEDENR AVVVHADPDDLK	gi 77819931	copper-zinc superoxide dismutase
G170	18.5/5.8	15.2/5.6	-/76	EHGAPEDENR AVVVHADPDDLK	gi 134597	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 4A
G168	18.4/5.5	17.5/5.5	108/100	FALLVDDLK VILFGVPGAFTPTCSLK	gi 19548660	peroxiredoxin
G168	18.4/5.5	17.5/5.5	-/80	HVPGFIER VIIFGVPGAFTPTCSLK	gi 115187464	thioredoxin fold
G195	16.2/5.8	12.6/5.6	70/59	FIAPILAEIAK	gi 27466894	thioredoxin h
G177	16.0/4.3	10.4/4.8	93/70	SGDHHEATDEPSESSEACCD R	gi 100121	proteinase inhibitor - cowpea (fragment)
G178	15.8/4.5	10.4/4.8	148/138	LNSCHSACK SGDHHEATDEPSESSEACCD R	gi 100121	proteinase inhibitor - cowpea (fragment)
G179	16.1/4.6	10.4/4.8	55/41	SGDHHEATDEPSESSEACCD R	gi 100121	proteinase inhibitor - cowpea (fragment)
G182	15.2/4.7	7.0/5.0	72/67	LYVDESNK	gi 124131	Subtilisin inhibitor
G184	15.8/4.9	12.7/5.4	99/60	SIPPQCHCTDIR	gi 28569590	trypsin inhibitor
G187	15.6/5.1	12.7/5.4	104/68	SIPPQCHCTDIR	gi 28569590	trypsin inhibitor
G188	15.0/5.1	12.5/5.2	77/45	SIPPQCHCTDIR	gi 28569586	trypsin inhibitor
G192	15.4/5.5	12.7/5.4	92/67	SIPPQCHCTDIR	gi 28569590	trypsin inhibitor
G246	11.1/8.4	9.0/7.5	157/128	TCENLADTYR GPCFTTGSCDDHCK	gi 62549225	Defensin
Metabolismo Secundário						
A71	34.5/5.0	63.9/5.6	75/-		gi 46254775	gamma-curcumene synthase
Outras						
A44	45.4/4.9	50.2/7.8	-/42	LASSAASASAPARLR	gi 50925953	OSJNBa0067K08.2
A65	35.5/4.4	25.8/4.9	133/124	AVDQSDASAIQAAEVR	gi 6648966	seed maturation protein PM25
A66	34.2/4.5	25.8/4.9	139/131	AVDQSDASAIQAAEVR	gi 6648966	seed maturation protein PM25

G83	33.4/4.3	25.8/4.9	104/97	AVDQSDASAIQAAEVR	gi 6648966	seed maturation protein PM25
G84	31.6/4.4	25.8/4.9	133/126	AVDQSDASAIQAAEVR	gi 6648966	seed maturation protein PM25
G141	23.6/4.4	25.8/4.9	100/92	AVDQSDASAIQAAEVR	gi 6648966	seed maturation protein PM25
G155	21.6/4.5	25.8/4.9	74/61	AVDQSDASAIQAAEVR	gi 6648966	seed maturation protein PM25
G122	28.0/5.2	26.3/5.2	66/33	HPLIISIR	gi 62287132	Seed maturation protein PM36
A120	36.2/9.0	29.5/8.9	228/123	SFAAFGTTGDSNTR ALGVDLINNPDLVAR GPIQLTHNYYNAAGR	gi 27372245	cotyledoneous yieldin-like protein
A121	37.2/9.5	29.5/8.9	302/237	SFAAFGTTGDSNTR GFYSYNAFITAAR ALGVDLINNPDLVAR GPIQLTHNYYNAAGR	gi 27372245	cotyledoneous yieldin-like protein
G232	33.8/9.3	29.5/8.9	263/165	SFAAFGTTGDSNTR ALGVDLINNPDLVAR GPIQLTHNYYNAAGR YCDVFGVSYGPNLNCR	gi 27372245	cotyledoneous yieldin-like protein
G10	94.9/5.5	88.0/5.0	130/93	GQALQFNWLYEK	gi 50915536	MutT/nudix protein-like
G85	33.5/4.7	24.5/4.8	-/47	DFSDGELKDELFCIR	gi 2058284	atranbp1b
G97	37.5/5.7	32.7/5.4	232/190	FLHAVYR DPDGYIFELIQR SAEVNLTQELGGK	gi 2213425	hypothetical protein
I19	35.5/4.0	10.5/9.7	-/45	INSGIEIRLR	gi 92873611	hypothetical protein

* As letras “A” (Figura 16), “G” (Figura 17) e “I” (Figura 15) que precedem o número do “spot” indicam o gel de onde foram retirados em sementes maduras.

4.2.3. Classificação funcional das proteínas de sementes

Cada uma das proteínas identificadas tanto em sementes com 10 DAA quanto em sementes maduras foi classificada com os mesmos critérios utilizados na classificação das proteínas identificadas em SCE de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) (Figura 18). Em sementes com 10 DAA, as proteínas estavam principalmente envolvidas nos seguintes grupos: destinação de proteínas/proteínas de reserva (33,1%), metabolismo (21%), doença/defesa (21%) e energia (14,9%). Algumas proteínas também foram agrupadas nas categorias crescimento/divisão celular (2,8%), transportadores (2,2%), transdução de sinais (1,1%) e síntese protéica (0,6%). Proteínas que tiveram sua classificação incerta ou não apresentavam classificação (grupo outras) estavam presentes em sementes com 10 DAA na frequência de 3,3%. Já as proteínas de sementes maduras pertenciam principalmente aos grupos, doença/defesa (26,9%), destinação de proteínas/proteínas de reserva (25,9%), metabolismo (20,2%) e energia (17,1%). Um menor número de proteínas identificadas foram agrupadas nos grupos outras (7,8%), transportadores (1,6%) e metabolismo secundário (0,5%) (Figura 18).

Os dados da figura 18 mostram que as proteínas identificadas tanto em sementes com 10 DAA quanto em sementes maduras pertencem principalmente aos grupos, metabolismo, energia, destinação de proteínas/proteínas de reserva e doença/defesa. Houve uma considerável diminuição no número de “spots” identificados no grupo destinação de proteínas/proteínas de reserva e um aumento no número de “spots” identificados no grupo doença/defesa, principalmente, devido à deposição das proteínas relacionadas com a tolerância a dessecação. Em sementes maduras nenhum “spot” foi identificado nos grupos crescimento/divisão celular, síntese protéica e transdução de sinais, isso se deve, possivelmente, a diminuição na expressão de proteínas relacionadas com esses processos à medida que a semente entra no período de quiescência.

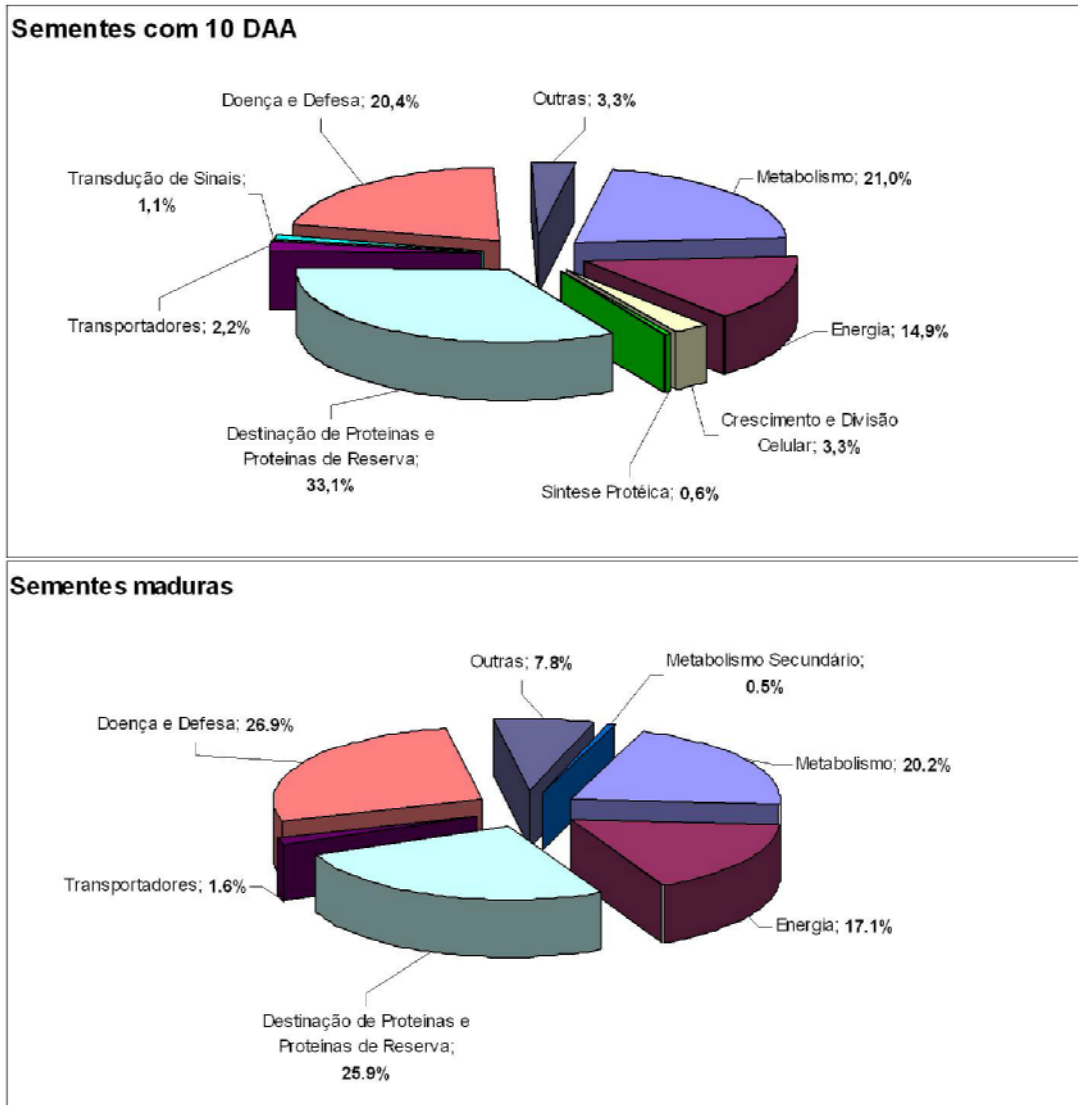


Figura 18. Distribuição funcional relativa das proteínas identificadas em sementes com 10 DAA e sementes maduras de feijão-de-corda (*V. unguiculata*). As categorias de classificação foram previamente reportadas por (Bevan *et al.*, 1998).

4.2.3.1. Proteínas dos grupos metabolismo e energia

No grupo metabolismo, notamos que não houve diferença significativa entre a porcentagem das proteínas identificadas classificadas nesse grupo, em sementes com 10 DAA (21% ou 38 proteínas) e sementes maduras (20,2% ou 39 proteínas). Neste grupo as proteínas identificadas que apareceram em maior número em sementes com 10 DAA em comparação com sementes maduras são as *UDP-glucose pyrophosphorylase*, *enolase*, *methionine synthase* e *monodehydroascorbate reductase*. Enquanto que as proteínas mais frequentes em sementes maduras em relação com sementes com 10 DAA são as *lipoxigenases*. As proteínas identificadas apenas em sementes com 10 DAA são *cysteine synthase*, *sucrose synthase*, *S-adenosyl homocysteine hydrolase*, *aminotransferases class-I*, *aspartate aminotransferase*, *transaldolase*, *3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase*, *coproporphyrinogen oxidase*, *galactose mutarotase-like*, *inorganic pyrophosphatase*, *putative 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase isomerase* e *myo-inositol 1-phosphate synthase*. As proteínas identificadas apenas em sementes são *aminopeptidase*, *galactinol-raffinose galactosyltransferase*, *glycoside hydrolase*, *ketol-acid reductoisomerase*, *putative galactose kinase*, *allantoinase*, *epoxide hydrolase*, *alpha/beta hydrolase fold* e *oxidoreductase*. O mesmo número de “spots” identificados como *glyoxalase I* apareceu em ambas as sementes.

Hajdúch *et al.* (2005) reportaram uma diminuição das proteínas do metabolismo à medida que a semente de soja aproxima-se da maturidade. Um dos motivos de tal diminuição, relatado pelos autores, é uma diminuição das proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos. No caso das sementes de feijão-de-corda houve uma pequena diminuição nas proteínas do metabolismo. Dentre essas proteínas estão duas enzimas chave na biossíntese dos aminoácidos, cisteína (*cysteine synthase*) e metionina (*methionine synthase*), que diminuíram sua expressão em sementes maduras. A *cysteine synthase* (spot B53) (Figura 13, Tabela 2) foi identificada apenas em sementes com 10 DAA. A *methionine synthase* foi identificada tanto em sementes com 10 DAA (spots F12, F13, F14, F15 e F16) (Figura 14, Tabela 2) quanto em sementes maduras (spots G21 e G22) (Figura 17, Tabela 3), embora um maior número de “spots” e uma maior abundância destes “spots” sejam evidenciados em sementes com 10 DAA. Esses resultados também se encontram de acordo com os obtidos na germinação de sementes de *Arabidopsis* por Gallardo *et al.* (2002), a metionina sintase que estava presente em baixos níveis nas

sementes maduras secas, aumentou fortemente sua expressão com um dia de embebição das sementes, antes do aparecimento da radícula.

Neste estudo, 10 “spots” foram identificados como lipoxigenases em sementes maduras (*spots* A50, A140, A143, A145, A146, G17, G18, G19, G20 e G247) (Figuras 16 e 17, Tabela 3), enquanto somente dois foram identificados em sementes com 10 DAA (*spots* F9 e F10) (Figura 14, Tabela 2). Em *M. truncatula*, Gallardo *et al.* (2003) mostraram o acúmulo de lipoxigenases ao longo do desenvolvimento da semente. Hajduch *et al.* (2005) reportou um aumento na expressão de lipoxigenases durante o enchimento das sementes (*seed filling*) de soja (*G. max*). Segundo Porta e Rocha-Sosa (2002) as lipoxigenases encontradas nas sementes participam das respostas de defesa e servem como proteínas de reserva. A indução das lipoxigenases tem um papel direto na sinalização da defesa na planta e nas respostas a injúrias via produção de ácido jasmônico. Muitas proteínas induzidas por jasmonato parecem estar envolvidas na resposta de defesa em plantas (Hajduch *et al.*, 2005; Feussner e Wasternack, 2002).

Nas plantas, a sacarose desempenha funções tanto como açúcar para nutrição e transporte, como uma molécula sinal que ativa os processos associados com o acúmulo de reservas nas sementes. Várias evidências sugerem que o acúmulo de sacarose pode induzir a expressão de genes associados com o acúmulo de reservas, como o caso da sacarose sintase que tem sua expressão aumentada (Weber *et al.*, 2005). Heim *et al.* (1993) reportaram, no desenvolvimento de sementes de *Vicia faba*, que a expressão da sacarose sintase aumenta durante o enchimento da semente e diminui durante sua maturação, e que essa mesma cinética ocorre para a sacarose. Em sementes de feijão-de-corda com 10 DAA foi possível identificar dois “spots” (B110 e F145) (Figuras 13 e 14) como sacarose sintase, enquanto em sementes maduras não foi possível identificar nenhuma sacarose sintase. Estes resultados encontram-se de acordo com os obtidos por Hajduch *et al.* (2005) para sementes de soja.

No grupo energia, 27 (14,9%) proteínas foram identificadas para sementes com 10 DAA e 33 (17,1%) para sementes maduras. As proteínas que apareceram em maior número em 10 DAA em comparação com sementes maduras são *malate dehydrogenase*, *triosephosphate isomerase*, *phosphogluconate dehydrogenase* e *succinyl CoA ligase*. Enquanto que as proteínas mais frequentes em sementes maduras em relação com sementes com 10 DAA são as *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, *alcohol dehydrogenase I* e *fructose-1.6-bisphosphate aldolase*. As proteínas *putative fructokinase I*, *homologous to*

plastidic aldolases, *aldo/keto reductase* e *photosystem II 23 kDa* foram identificadas apenas em sementes com 10 DAA e as proteínas *phosphoglucomutase*, *phosphoglucose isomerase* e *aldehyde dehydrogenase* foram identificadas apenas em sementes maduras. A proteína *malate synthase* apareceu em ambas as sementes na mesma quantidade.

4.2.3.2. Proteínas do grupo destinação de proteínas/proteínas de reserva

No grupo destinação de proteínas/proteínas de reserva, foram identificadas 60 proteínas (33,1%) em sementes com 10 DAA e 50 proteínas (25,9%) em sementes maduras. As proteínas *8S globulin alpha isoform precursor* e *cyclophilin* foram identificadas em maior número nas sementes com 10 DAA em comparação com sementes maduras, enquanto as proteínas *8S globulin beta isoform precursor*, *protein disulfide isomerase*, *ubiquitin/polyubiquitin* e *mung bean seed albumin* foram identificadas em maior número em sementes maduras em relação às sementes com 10 DAA. As proteínas *albumin-2*, *proteasome delta subunit* e *proteasome/cyclosome* e a proteína *8S globulin alpha' isoform precursor* foram identificadas apenas em sementes com 10 DAA e sementes maduras, respectivamente. Foram identificadas na mesma quantidade as proteínas *putative endomembrane protein*, *fruit-ripening gene* e *methionine sulfoxide reductase* em ambas as sementes.

As proteínas mais abundantes em sementes de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) são as proteínas de reserva, principalmente as globulinas 7S (*vicilin-like*) (Pedalino *et al.*, 1992; Freitas *et al.*, 2004). Neste trabalho foi possível identificar 75 “spots” como subunidades (α , α' e β) da globulina 8S de *Vigna radiata*. Segundo Bernardo *et al.* (2004), a homologia em termos de cDNA e seqüências de aminoácidos são de 91-92% entre 8S α e 8S α' , 87% entre 8S α e 8S β e 86-88% entre 8S α' e 8S β . Este mesmo trabalho reporta que uma análise da seqüência de aminoácidos das globulinas 8S de *V. radiata* as classifica na família das proteínas de reserva 7S. A Figura 19 mostra a distribuição dos “spots” identificados como globulinas 8S em géis de sementes com 10 DAA e sementes maduras e também mostra um western blot de semente madura onde os “spots” revelados reagiram contra o anticorpo policlonal anti-vicilina de feijão-de-corda. Há uma coincidência entre com os “spots” revelados com o anticorpo policlonal anti-vicilina e os “spots” identificados como globulinas 8S de *V. radiata*.

As globulinas 7S são sintetizadas com um peptídeo sinal que é clivado quando a proteína é translocada para dentro do lúmen do retículo endoplasmático (RE), onde

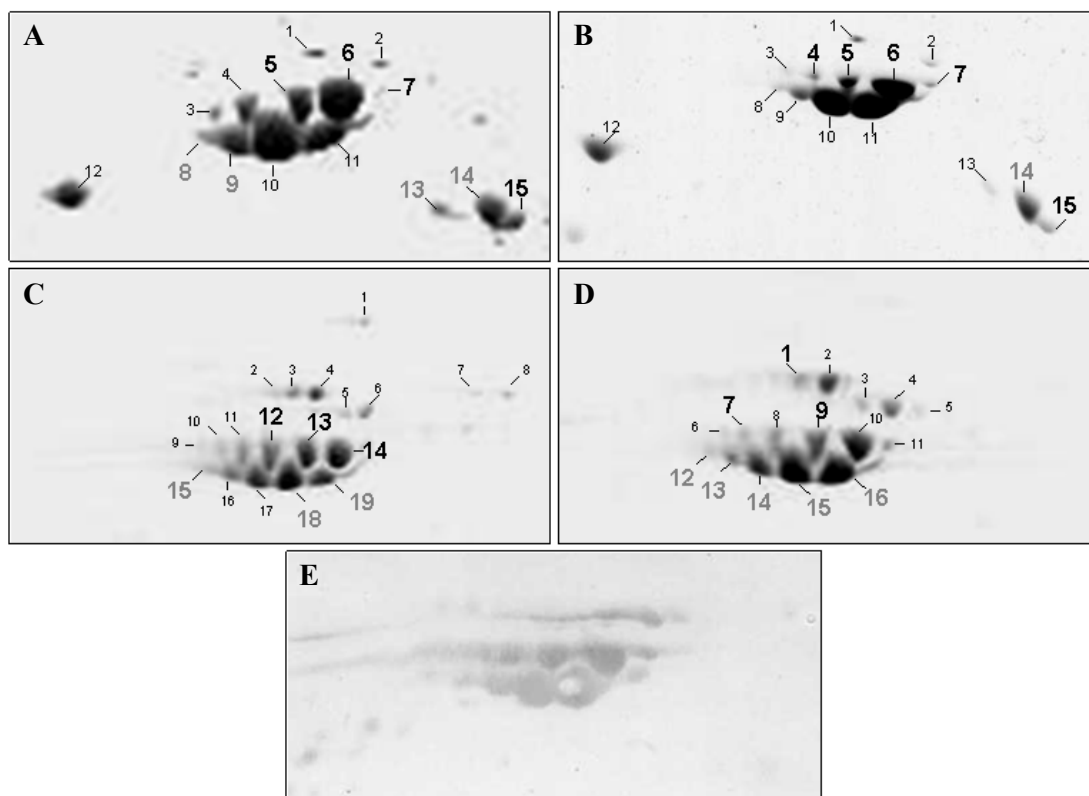


Figura 19. Padrão de deposição de glubulinas 7S/8S em sementes com 10 DAA e sementes maduras de feijão-de-corda (*V. unguiculata*). (A) Detalhe do gel 2D de sementes com 10 DAA onde foram aplicados 30 µg de proteínas (ver Figura 13), (B) detalhe do gel 2D de sementes maduras onde foram aplicados 30 µg de proteínas (ver Figura 16), (C) detalhe do gel 2D das FG de 10 DAA (ver Figura 15) e (D) detalhe do gel 2D das FG de sementes maduras. Os “spots” destacados em negrito foram identificados como *8S globulin beta isoform precursor* (B5, B6, B7, B15, A4, A5, A6, A7, A15, H12, H13, H14, I7 e I9) e os “spots”, destacados em cinza, identificados como *8S globulin alpha isoform precursor* (B8, B9, B13, B14, A14, H15, H18, H19, I12, I13, I14, I15 e I16) (ver Tabelas 2 e 3). (E) Western blot com o anticorpo anti-vicilina mostra que os “spots” identificados como globulinas α e β coincidem com os “spots” reconhecidos pelo anticorpo.

assume suas diferentes conformações. Grupos de proteínas do lúmen do RE auxiliam o processo de dobramento das proteínas de reserva. As *cyclophilins* ou *peptidyl-prolyl cis-trans isomerases* podem auxiliar o dobramento, acelerando a isomerização de ligações Xaa-Pro, que é um passo limitante no dobramento de algumas proteínas. A *protein disulfide isomerase* parece estar envolvida na catálise de pontes de enxofre que podem ocorrer intra e inter cadeia das subunidades das proteínas de reserva (Shewry *et al.*, 1995). Neste trabalho, foi possível identificar oito “spots” (B127, B128, B129, F115, F117, F118, F164 e F165) (Figuras 13 e 14) em sementes com 10 DAA e dois “spots” (A123 e G241) (Figuras 16 e 17) em sementes maduras de feijão-de-corda como *cyclophilin*. Também foi possível identificar sete “spots” como *protein disulfide isomerase*, três em sementes com 10 DAA (F20, F23 e F24) (Figura 14) e quatro em sementes maduras (A18, G24, G25 e G27) (Figuras 16 e 17).

4.2.3.3. Proteínas do grupo doença/defesa

No grupo doença/defesa, 38 proteínas (21%) em sementes com 10 DAA e 52 proteínas (26,9%) em sementes maduras foram identificadas. Nas sementes com 10 DAA as proteínas *1-Cys peroxiredoxin*, *peroxiredoxin*, *thioredoxin*, *proteinase inhibitor – cowpea* e *trypsin inhibitor* tiveram um maior número de “spots” identificados em comparação com sementes maduras, enquanto em sementes maduras tiveram um maior número de “spots” identificados como proteínas *dehydrin/CPRD22 protein* e *CuZn-superoxide dismutase*. As proteínas *2-Cys peroxiredoxin* e *ascorbate peroxidase* foram identificadas apenas em sementes com 10 DAA e as proteínas *class I chitinase*, *lea protein*, *em protein*, *maturation polypeptide*, *leucyl aminopeptidase*, *putative glutathione S-transferase*, *heat shock protein*, *pathogenesis related protein*, *putative desiccation protectant protein*, *water stress-related protein*, *subtilisin inhibitor* e *defensin* estavam presentes somente em sementes maduras.

Proteínas relacionadas com a tolerância à dessecação foram identificadas, incluindo proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*) e proteínas HSPs (*heat shock proteins*). As proteínas LEA acumulam-se nos estágios finais da embriogênese e maturação da semente, coincidindo com a aquisição da tolerância à dessecação das sementes em desenvolvimento. Elas possivelmente estão envolvidas na ligação ou reposição da água, na acumulação de íons ou manutenção da estrutura de proteínas e membranas (Blackman *et al.*, 1991; Close, 1996; Campbell e Close, 1997; Gallardo *et al.*, 2001). Em sementes maduras de feijão-de-

corda foi identificado um grande número de proteínas LEA, dentre elas a *dehydrin* (*spots* A54, G104, G139, G151, G153 e G175) (Figuras 16 e 17). As *dehydrin* acumulam-se durante os estágios tardios da embriogênese, tornando a semente tolerante à dessecação. Os resultados apresentados por este trabalho mostram que nas sementes com 10 DAA (antes do período de dessecação) somente uma proteína foi identificada como proteína LEA (*spot* F168) (Figura 14, Tabela 2), enquanto nas sementes maduras (final do período de dessecação) um grande número de proteínas LEA foi identificado (*spot* A49, A54, G65, G75, G79, G82, G86, G87, G88, G104, G118, G119, G132, G134, G139, G143, G145, G151, G153, G160, G162, G164, G172, G175 e G194) (Figuras 16 e 17, Tabela 3). Os “spots” identificados como *dehydrin/CPRD22 protein* são similares a proteínas codificadas por dois cDNAs presentes em sementes de feijão-de-corda, um envolvido na tolerância ao resfriamento (gi|6358640) e o outro envolvido na tolerância à desidratação (gi|1854447). A presença de *dehydrin* durante o desenvolvimento da semente e na emergência de plântulas de feijão-de-corda foi reportada por Ismail *et al.* (1999). Estudos proteômicos sobre a germinação e dormência da semente em *Arabidopsis* (Gallardo *et al.*, 2001; Chibani *et al.*, 2006) e germinação de *M. truncatula* mostra a importante presença das proteínas LEA, principalmente as *dehydrin*, nesses processos fisiológicos.

Wehmeyer *et al.* (1996) reportaram que HSPs de baixo peso molecular são abundantes em sementes maduras e desaparecem ao longo da germinação de sementes de *Arabidopsis*. A participação dessas HSPs na tolerância à dessecação no desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis* foi mostrada no trabalho de Wehmeyer e Elizabeth (2000). Em concordância com esses trabalhos, três HSPs de baixo peso molecular foram encontradas em sementes maduras de feijão-de-corda (*spots* G154, G165 e G171) (Figura 17), enquanto em sementes com 10 DAA nenhuma HSP foi identificada. Outros trabalhos também relacionaram as HSPs com os processos de germinação (Gallardo *et al.*, 2001) e dormência (Chibani *et al.*, 2006) de sementes de *Arabidopsis* e germinação de sementes de *M. truncatula* (Boudet *et al.*, 2006).

Intensos “spots” de baixo peso molecular (10-18 kDa) aparecem nos géis bidimensionais das frações ricas em albuminas, esses “spots” foram identificados como inibidores de proteinase, presentes tanto em sementes com 10 DAA (18 *spots*), quanto em sementes maduras de feijão-de-corda (8 *spots*). Finnie *et al.* (2002) e Hajdich *et al.* (2005) identificaram vários “spots” como inibidores de proteinase em *Hordeum vulgare* e *G. max*, respectivamente. Podem ser propostas algumas funções sobre o papel dos inibidores de

proteínases em sementes, como: controlar a ação das proteínases endógenas; atuar na defesa contra enzimas proteolíticas de micróbios, insetos, aves ou mamíferos; e servir como proteínas de reserva, fornecendo, principalmente, aminoácidos contendo enxofre (Tan-Wilson *et al.*, 1982; Papatoitsis e Wilson, 1991).

Proteínas envolvidas no estresse oxidativo foram identificadas em sementes de feijão-de-corda, como as proteínas *1-Cys peroxiredoxin*, *2-Cys peroxiredoxin*, *peroxiredoxin*, *thioredoxin*, *glutathione S-transferase*, *cytosolic ascorbate peroxidase*, *Mn superoxide dismutase* e *Cu/Zn superoxide dismutase*. Essas proteínas também foram encontradas em *H. vulgare* (Finnie *et al.*, 2002), *M. truncatula* (Gallardo *et al.*, 2003), *G. max* (Hajduch *et al.*, 2005) e *Arabidopsis* (Job *et al.*, 2005). Em sementes, a importância dessas proteínas é de proteção contra as injúrias causadas pela dissecação, que são ocasionadas pela ativação de espécies reativas de oxigênio durante o desenvolvimento da semente (Noctor e Foyer, 1998; Finnie *et al.*, 2002). Job *et al.* (2005) detectaram altos níveis de modificações oxidativas em proteínas de semente e demonstraram que essas proteínas são sensíveis aos danos oxidativos durante o desenvolvimento e germinação das sementes. Esses autores levantam a seguinte questão, se o papel da oxidação das proteínas de sementes é facilitar sua mobilização durante o estabelecimento da plântula ou se é somente consequência do intenso metabolismo sofrido pelas células que acordaram da quiescência? Nesse caso o papel das proteínas envolvidas no estresse oxidativo estaria ligado ao controle da mobilização de reservas.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nesse estudo, o padrão de deposição de proteínas em sementes com 10 DAA, sementes maduras e SCE foram investigadas utilizando a tecnologia de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. O método de extração foi capaz de gerar mapas de referência proteômicos reprodutíveis e de alta qualidade tanto para as sementes quanto para as SCE estudadas. Dos 772 “spots” selecionados dos géis de sementes e dos 127 “spots” selecionados dos géis de SCE para análise por espectrometria, foram identificadas 374 proteínas e 67 proteínas usando o banco de dados NCBI, respectivamente. Considerando que os dados de sequência de proteínas, nucleotídeos e ESTs para o feijão-de-corda (*V. unguiculata*) são escassos, o resultado de aproximadamente 50% (48% em sementes e 53% em SCE) de identificações é notável.

As proteínas identificadas foram classificadas funcionalmente, principalmente nos grupos: metabolismo primário, energético, destinação de proteínas/proteínas de reserva e relacionadas com doença e defesa. Em sementes foi possível caracterizar o padrão de deposição de proteínas de reserva (globulinas) e de proteínas associadas com a tolerância à dessecação (proteínas LEA). Em SCE as proteínas mais abundantes eram as PRPs, principalmente as PR-4 (quitinase) e PR-10 (ribonuclease). A distribuição constitutiva das proteínas PR-10 nos diferentes órgãos/tecidos de feijão-de-corda foi evidenciada. Embora o papel das proteínas PR já tenham sido previamente relacionado com a defesa contra estresses bióticos e abióticos e com a histodiferenciação de massas pró-embriogênicas no desenvolvimento de embriões somáticos, um estudo mais detalhado do papel dessas proteínas em SCE deve elucidar mecanismos bioquímicos que discriminem entre as suspensões capazes de regenerar uma planta completa e as suspensões não-embriogênicas.

A disponibilidade de banco de dados de ESTs de sementes em desenvolvimento, sementes maduras e SCE do feijão-de-corda, permitirão não só um maior conhecimento sobre o padrão de expressão gênica nestes órgãos/tecidos, como possibilitarão ainda ampliar em muito o número de proteínas identificadas utilizando os dados de espectrometria de massa produzidos neste trabalho.

Este trabalho é pioneiro no estabelecimento de proteomas dos embriões zigóticos e embriões somáticos do feijão-de-corda. As técnicas de extração de proteínas e eletroforese bidimensional mostraram-se compatíveis com a análise das proteínas presentes nos géis por espectrometria de massa. A identificação de mais de 400 proteínas, mesmo na ausência

de bancos de dados de ESTs, indica que proteomas mais abrangentes das SCE e das sementes em desenvolvimento poderão ser estabelecidos em breve.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebersold, R., Mann, M. Mass Spectrometry-Based Proteomics. **Nature**, 422, 198-207 (2003).
- Anand, R. P., Ganapathi, A., Vengadesan, G., Selvaraj, N., Anbazhagan, V. R., Kulothungan, S. Plant Regeneration from Immature Cotyledon-Derived Callus of *Vigna unguiculata* (L.) Walp (cowpea). **Current Science**, 80, 671-674 (2001).
- Aragão, F. J. L., Campos, F. A. P. **Common Bean and Cowpea**. In: Pua, E. C., Davey, M. R., eds. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 59. Transgenic Crops IV. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, p. 263-276 (2007).
- Aragão, T. C. F. R., Souza, P. A. S., Uchôa, A. F., Costa, I. R., Bloch, C., Campos, F. A. P. Characterization of a Methionine-rich Protein from the Seeds of *Cereus jamacaru* Mill. (Cactaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 33, 897-903 (2000).
- Araújo, J. P. P., Watt, E. E. **O Caupi no Brasil**. IITA/EMBRAPA, 722 p. (1988).
- Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L. Developmental Pathways of Somatic Embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69, 233-249 (2002).
- Ashcroft, A. E. Protein and Peptide Identification: the role of mass spectrometry in proteomics. **Natural Product Reports**, 20, 202-215 (2003).
- Azevedo, R., Biserra, J. V. Eficiência Econômica da Produção de Feijão Caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) em Condições de Agricultura Irrigada. **Produção Científica do PDCT-NE no Ceará**, 2, 738-748 (1991).
- Babaoglu, M., Davey, M. R., Power, J. B. Genetic Engineering of Grain Legumes: key transformation events. **AgBiotechNet**, 2, 1-8 (2000).
- Bantignies, B., Séguin, J., Muzac, I., Dédaldéchamp, F., Gulick, P., Ibrahim, H. Direct Evidence for Ribonucleolytic Activity of a PR-10-Like Protein From White Lupin Roots. **Plant Molecular Biology**, 42, 871-881 (2000).
- Bernardo, A. E. N., Garcia, R. N., Adachi, M., Angeles, J. G. C., Kaga, A., Ishimoto, M., Utsumi, S., Tecson-Mendoza, E. M. 8S Globulin of Mungbean [*Vigna radiate* (L.) Wilczek]: Cloning and Characterization of its cDNA Isoforms, Expression in *Escherichia coli*, Purification, and Crystallization of the Major Recombinant 8S Isoform. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 2552-2560 (2004).

- Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., Dean, C., Bergkamp, R., Dirkse, W., Van Staveren, M., Stiekema, W., *et al.* Analysis of 1.9 Mb of Contiguous Sequence from Chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, 391, 485-488 (1998).
- Blackman, S. A., Wettlaufer, S. H., Obendorf, R. L., Leopold, A. C. Maturation Proteins Associated with Dissection Tolerance in Soybean. **Plant Physiology**, 96, 868-874 (1991).
- Boudet, J. Buitink, J., Hoekstra, F. A., Rogniaux, H., Larré, C., Satour, P., Leprince, O. Comparative Analysis of the Heat Stable Proteome of Radicles of *Medicago truncatula* Seeds During Germination Identifies Late Embryogenesis Abundant Proteins Associated with Desiccation Tolerance. **Plant Physiology**, 140, 1418-1436 (2006).
- Borisjuk, L., Weber, H., Panitz, R., Manteuffel, R., Wobus, U. Embryogenesis of *Vicia faba* L.: Histodifferentiation in relation to starch and protein synthesis. **Journal of Plant Physiology**, 147, 203-218 (1995).
- Bradford, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254 (1976).
- Campalans, A., Pagès, M., Messeguer, R. Protein Analysis During Almond Embryo Development: Identification and characterization of a late embryogenesis abundant protein. **Plant Physiology and Biochemistry**, 38, 449-457 (2000).
- Campbell, S. A., Close, T. J. Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytology*, 137, 61-74 (1997).
- Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., Panis, B. Preparation of Protein Extracts from Recalcitrant Plant Tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, 5, 2497-2507 (2005).
- Chaudhury, A. M., Koltunow, A., Payne, T., Luo, M., Tucker, M. R., Dennis, E. S., Peacock, W. J. Control of Early Seed Development. **Annual Review of Cell Development**, 17, 677-699 (2001).
- 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).
- Chugh, A., Khurana, P. Gene Expression During Somatic Embryogenesis – Recent Advances. **Current Science**, 83(06), 715-730 (2002).
- Close, T. J. Dehydrins: Emergence of a Biochemical Role of a Family of Plant Dehydration Proteins. *Physiologia Plantarum*, 97, 795-803 (1996).

- Delseny, M., Bies-Etheve, N., Carles, C., Hull, G., Vicient, C., Raynal, M., Grellet, F., Aspart, L. Late Embryogenesis Abundant (LEA) Protein Gene Regulation During *Arabidopsis* Seed Maturation. **Journal of Plant Physiology**, 158, 419-427 (2001).
- Diop, N. N., Kidric, M., Repellin, A., Gareil, M., d'Arcy-Lamede, A., Thi, A. T. P., Zuily-Fodil, Y. A Multicystatin is Induced by Drought-Stress in Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Leaves. **FEBS Letter**, 577, 545-550 (2004).
- Dodeman, V. L., Ducreux, G., Kreis, M. Zygotic Embryogenesis *Versus* Somatic Embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, 48(313), 1493-1509 (1997).
- Duranti, M., Gius, C. Legume Seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, 53, 31-45 (1997).
- Ehlers, J. D., Hall, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Fields Crop Research**, 53, 187-204 (1997).
- Fecht-Christoffers, M. M., Braum, H-P., Lemaitre-Guillier, C., VanDorselaer, A., Horst, W. J. Effect of Manganese Toxicity on the Proteome of the Leaf Apoplast in Cowpea. **Plant Physiology**, 133, 1935-1946 (2003).
- Fernandes, K. V. S., Campos, F. A. P., Doval, R. R., Xavier-Filho, J. The Expression of Papain Inhibitors During Development of Cowpea Seeds. **Plant Science**, 74, 179-184 (1991).
- Feussner, I., Wasternack, C. The Lipoxygenase Pathway. **Annual Review of Plant Biology**, 53, 275-297 (2002).
- Finnie, C., Melchior, S., Roepstorff, P., Svensson, B. Proteome Analysis of Grain Filling and Seed Maturation in Barley. **Plant Physiology**, 129, 1308-1319 (2002).
- Flengsrud, R., Kobro, G. A Method for Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins from Green Plant Tissues. **Analytical Biochemistry**, 177, 33-36 (1989).
- Flores, V. Q. M., Louro, R. P., Xavier-Filho, J., Barratt, D. H. P., Shewry, P. R., Fernandes, K. V. S. Temporal and Tissue Localization of a Cowpea (*Vigna unguiculata*) Cystatin. **Physiology Plantarum**, 111, 195-199 (2001).
- Freire-Filho, F. R. **Origem, Evolução e Domesticação do Caupi**. In: Araújo, J. P. P., Watt, E. E., eds. O Caupi no Brasil. Brasília: IITA/EMBRAPA, p. 27-46 (1988).
- Freitas, R. L., Teixeira, A. R., Ferreira, R. B. Characterization of the Proteins from *Vigna unguiculata* Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 1682-1687 (2004).

- Fujimoto, Y., Nagata, R., Fukasawa, H., Yano, K., Azuma, M., Iida, A., Sugimoto, S., Shudo, K., Hashimoto, Y. Purification and cDNA Cloning of Cytokinin-Specific Binding Protein from Mung Bean (*Vigna radiata*). **European Journal of Biochemistry**, 258, 794-802 (1998).
- 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 Physiology**, 126, 835-848 (2001).
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., Job, D. Proteomics of *Arabidopsis* Seed Germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. **Plant Physiology**, 129, 823-873 (2002).
- Gallardo, K., Le Signor, C., Vanderkerckhove, J., Thompson, R. D., Burstin, J. Proteomics of *Medicago truncatula* Seed Development Establishes the Time Frame of Diverse Metabolic Processes to Reverse Accumulation. **Plant Physiology**, 133, 664-682 (2003).
- Giavalisco, P., Nordhoff, E., Lehrach, H., Gobom, J., Klose, J. Extraction of Proteins from Plant Tissues for Two-Dimensional Electrophoresis Analysis. **Electrophoresis**, 24, 207-216 (2003).
- Glinski, M., Weckwerth, W. The Role of Mass Spectrometry in Plant Systems Biology. **Mass Spectrometry Reviews**, 25, 173-214 (2006).
- Goldberg, R. B., Barker, S. J., Perez-Grau, L. Regulation of Gene Expression during Plant Embryogenesis. **Cell**, 56, 149-160 (1989).
- Gomes, F. L. A. F., Heredia, F. F., Silva, P. B., Faço, O., Campos, F. A. P. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). **Scientia Horticulturae**, 108, 15-21 (2006).
- Goldberg, R. B., Barker, S. J., Perez-Grau, L. Regulation of Gene Expression During Plant Embryogenesis. **Cell**, 56, 149-160 (1989).
- Gonçalves, E. F. **Estudos Sobre a Indução de Embriogênese Somática do Feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] Variedade Pitiúba**. Dissertação. UFC. 100p.: il. (2004).
- Görg, A., Postel, W., Günther, S. The Current State of Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients. **Electrophoresis**, 9, 531-546 (1988).
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Weiss, W. Recent Developments in Two-Dimensional Gel Electrophoresis with Immobilized pH Gradients: wide pH gradients

- up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. **Electrophoresis**, 20, 712-717 (1999).
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weis, W. The Current State of Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients. **Electrophoresis**, 21, 1037-1053 (2000).
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M. J. Current Two-dimensional Electrophoresis Technology for Proteomics. **Electrophoresis**, 4, 3665-3685 (2004).
- Habermann, B., Oegemas, J., Sunyaev, S., Shevchenko, A. The Power and the Limitations of Cross-Species Protein Identification by Mass Spectrometry-driven Sequence Similarity Searches. **Molecular and Cellular Proteomics**, 3, 238-249 (2004).
- Hajduch, M., Ganapathy, A., Stein, J. W., Thelen, J. J. A Systematic Proteomic Study of Seed Filling in Soybean. Establishment of High-Resolution Two-Dimensional Reference Maps, Expression Profiles, and an Interactive Proteome Database. **Plant Physiology**, 137, 1397-1419 (2005).
- Hajduch, M., Casteel, J. E., Hurrelmeyer, 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 Physiology**, 141, 32-46 (2006).
- Harlow, E., Lane, D. **Antibodies: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1988).
- Heim, U., Weber, H., Bäumlein, H., Wobus, U. A Sucrose-Synthase Gene of *V. faba* L.: Expression Pattern in Developing Seeds in Relation to Starch Synthesis and Metabolic Regulation. **Planta**, 191, 394-401 (1993).
- Helleboid, S., Hendriks, T., Bauw, G., Inzé, D., Vasseur, J., Hilbert, J-L. Three Major Somatic Embryogenesis Related Proteins in *Cichorium* Identified as PR Proteins. **Journal of Experimental Botany**, 51, 1189-1200 (2000).
- Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, J., Heldin, C. H. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. **Analytical Biochemistry**, 224(1), 451-455 (1995).
- Henzel, W. J., Watanabe, C. Protein Identification: the origins of peptide mass fingerprinting. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, 14, 931-942 (2003).

- Higashi, Y., Hirai, M. Y., Fujiwara, T., Naito, S., Noji, M., Saito, K. Proteomic and Transcriptomic Analysis of Arabidopsis Seeds: molecular evidence for successive processing of seed proteins and its implication in the stress response to sulfur nutrition. **The Plant Journal**, 48, 557-571 (2006).
- Hochholdinger, F., Sauer, M., Dembinsky, D., Hoecker, N., Muthreich, N., Saleem, M., Liu, Y. Proteomic dissection of plant development. **Proteomics**, 6, 4076-4083 (2006).
- Humphery-Smith, I., Cordwell, S. J., Blackstock, W. P. Proteome Research: Complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. **Electrophoresis**, 18, 1217-1242 (1997).
- Hurkman, W. J., Tanaka, C. K. Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. **Plant Physiology**, 81, 802-806 (1986).
- Imin, N., Jong, F. de, Mathesius, U., van Noorden, G., Saeed, N. A., Wang, X-D., Rose, R. J., Rolfe, B. G. Proteome Reference Maps of *Medicago truncatula* Embryogenic Cell Cultures Generated from Single Protoplasts. **Proteomics**, 4, 1883-1896 (2004).
- Imin, N., Nizamidin, M., Daniher, D., Nolan, K. E., Rose, R. J., Rolfe, B. G. Proteomic Analysis of Somatic Embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant cultures grown under 6-benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. **Plant Physiology**, 137, 1250-1260 (2005).
- Isaacson, T., Damasceno, C. M. B., Saravanan, R. S., He, Y., Catalá, C., Saladié, M., Rose, J. K. C. Sample Extraction Techniques for Enhanced Proteomic Analysis of Plant Tissues. **Nature Protocols**, 1 (2), 769-774 (2006).
- Ismail, A. M., Hall, A. E., Close, T. J. Purification and Partial Characterization of a Dehydrin Involved in Chilling Tolerance During Seedling Emergence of Cowpea. **Plant Physiology**, 120, 237-244 (1999).
- Jain, S., Srivastava, S., Sarin, N. B., Kav, N. N. V. Proteomics Reveals Elevated Levels of PR 10 Proteins in Saline-Tolerant Peanut (*Arachis hypogaea*) calli. **Plant Physiology and Biochemistry**, 44, 253-259 (2006).
- 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).
- Junqueira, M. R. **Aplicação de Técnicas Proteômicas na Caracterização do Veneno da Serpente *Bothrops insularis* (Viperidae)**. Dissertação. Instituto Oswaldo Cruz. 63p.: il. (2005).

- Lakshmanan, P., Taji, A. Somatic Embryogenesis in Leguminous Plants. **Plant biology**, 2, 136-148 (2000).
- Lambert, J-P., Ethier, M., Smith, J. C., Figeys, D. Proteomics: from gel based to gel free. **Analytical Chemistry**, 77, 3771-3788 (2005).
- Lei, Z., Elmer, A. M., Watson, B. S., Dixon, R. A., Mendes, P. J., Sumner, L. W. A Two-dimensional Electrophoresis Proteomic Reference Map and Systematic Identification of 1367 Proteins from a Cell Suspension Culture of the Model Legume *Medicago truncatula*. **Molecular and Cell Proteomics**, 4, 1812-1825 (2005).
- Mann, M., Hendrickson, R. C., Pandey, A. Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, 70, 437-473 (2001).
- Mann, M., Jensen, O. N. Proteomic Analysis of Post-Translational Modifications. **Nature Biotechnology**, 21, 255-267 (2003).
- Markovic-Housley, Z., Degano, M., Lamba, D., von Roepenack-Lahave, E., Clemens, S., Susani, M., Ferreira, F., Schneider, O., Breiteneder, H. Crystal Structure of a Hypoallergenic Isoform of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 and Its Likely Biological Function as a Plant Steroid Carrier. **Journal of Molecular Biology**, 325, 123-133 (2003).
- Maruyama, N., Fukuda, T., Saka, S., Inui, N., Kotoh, J., Miyagawa, M., Hayashi, M., Sawada, M., Moriyama, T., Utsumi, S. Molecular and Structural Analysis of Electrophoretic Variants of Soybean Seed Storage Proteins. **Phytochemistry**, 64, 701-708 (2003).
- Michaud, D., Asselin, A., J. Application to Plant Proteins of Gel Electrophoretic Methods. **Journal of Chromatography A**, 689, 263-279 (1995).
- Mooney, B. P., Thelen, J. J. High-Throughput Peptide Mass Fingerprinting of Soybean Seeds Proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. **Phytochemistry**, 64, 1733-1744 (2004).
- Muthukumar, B., Mariamma, M., Gnanam, A. Regeneration of Plants from Primary Leaves of Cowpea. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 42, 153-155 (1995).
- Natarajan, S., Xu, C., Caperna, T. J., Garrett, W. M. Comparison of Protein Solubilization Methods Suitable for Proteomic Analysis of Soybean Seed Proteins. **Analytical Biochemistry**, 342, 214-220 (2005).

- Newton, R. P., Brenton, A.G., Smith, C. J., Dudley, E. Plant Proteome Analysis by Mass Spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. **Phytochemistry**, 65, 1449-1485 (2004).
- Noctor, G., Foyer, C. H. Ascorbate and Glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49, 249-279 (1998).
- Nogueira, F. C. S. **Deposição de Proteínas Durante o Desenvolvimento de Embriões Zigóticos de Feijão-de-Corda [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)]**. Monografia. UECE. 53p.: il. (2005).
- Pandey, A., Mann, M. Proteomics to Study Genes and Genomes. **Nature**, 405, 837-846 (2000).
- Papatoitsis, G., Wilson, K. A. Initiation of the Degradation of the Soybean Kunitz and Bowman-Birk Trypsin Inhibitors by a Cysteine Protease. **Plant Physiology**, 96, 1086-1092 (1991).
- Park, C-J., Kim, K-J., Shin, R., Park, J. M., Shin, Y-C., Paek, K-H. Pathogenesis-Related Protein 10 Isolated from Hot Pepper Functions as a Ribonuclease in an Antiviral Pathway. **The Plant Journal**, 37, 186-198 (2004).
- Pedalino, M., Durzo, M. P., Donne, G. D., Grillo, S., Rao, R. The Structure of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Seed Storage Proteins. **Seed Science and Technology**, 20, 223-231 (1992).
- Phillips, R. D., Mcwatters, K. H., Chinnan, M. S., Hung, Y., Beuchat, L. R., Sefa-Dedeh, S., Sakyi-Dawson, E., Ngoddy, P., Nnanyelugo, D., Enwere, J., Komey, N. S., Liu, K., Mensa-Wilmot, Y., Nnanna, I. A., Okeke, C., Prinyawiwatkul, W., Saalia, F. K. Utilization of Cowpea for Human Food. **Field Crops Research**, 82, 193-213 (2003).
- Popelka, J. C., Terryn, N., Higgins, T. J. V. Gene Technology for Grain Legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? **Plant Science**, 167, 195-206 (2004).
- Popelka, J. C., Gollasch, S., Moore, A., Molvig, L., Higgins, T. J. V. Genetic Transformation of Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and Stable Transmission of the Transgenes to Progeny. **Plant Cell Reports**, 25, 304-312 (2006).
- Porta, H., Rocha-Sosa, M. Plant Lipxygenases. Physiological and molecular features. **Plant Physiology**, 130, 15-21 (2002).

- Przymusiński, R., Rucińska, R., Gwozdz, E. A. Increased Accumulation of Pathogenesis-Related Proteins in Response of Lupine Roots to Various Abiotic Stresses. **Environmental and Experimental Botany**, 52, 53-61 (2004).
- Ramakrishnan, K., Gnanam, R., Sivakumar, P., Manicham, A. Developmental Pattern Formation of Somatic Embryos Induced in Cell Suspension Cultures of Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Plant Cell Reports**, 24, 501-506 (2005a).
- Ramakrishnan, K., Gnanam, R., Sivakumar, P., Manicham, A. In Vitro Somatic Embryogenesis from Cell Suspension Cultures of Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Plant Cell Reports**, 24, 449-461 (2005b).
- Rossignol, M., Peltier, J-B., Mock, H-P., Matros, A., Maldonado, A. M., Jorrín, J. V. Plant proteome analysis: A 2004–2006 update. **Proteomics**, 6, 5529-5548 (2006).
- Rudd, S. Expressed Sequence Tags: alternative or complement to whole genome sequences? **TRENDS in Plant Science**, 8 (7), 321-329 (2003).
- Santos, A. L. W., Wiethölter, N., Gueddari, N. E. E, Moerschbacher, B. M. Protein Expression During Seed Development in *Aracauria angutifolia*: transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. **Physiologia Plantarum**, 127, 138-148 (2006).
- Saravanan, R. S., Rose, J. K. C. A Critical Evaluation of Sample Techniques for Enhanced Proteomic Analysis of Recalcitrant Plant Tissues. **Proteomics**, 4, 2522-2532 (2004).
- Schiltz, S., Gallardo, K., Huart, M., Negroni, L., Sommerer, N., Burstin, J. Proteome Reference Maps of Vegetative Tissues in Pea. An Investigation of Nitrogen Mobilization from Leaves During Seed Filling. **Plant Physiology**, 135, 2241-2260 (2004).
- Shevchenko, A., Sunyaev, S., Loboda, A., Shevchenko, A., Bork, P., Ens, W., Standing, K. G. Charting the Proteomes of Organisms with Unsequenced Genomes by MALDI-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and BLAST Homology Searching. **Analytical Chemistry**, 73, 1917-1926 (2001).
- Shewry, P. R., Napier, J. A., Tatham, A. S. Seed Storage Proteins: Structures and biosynthesis. **The Plant Cell**, 7, 945-956 (1995).
- Singh, B. B., Ajeigbe, H. A., Tarawali, S. A., Fernandez-Rivera, S., Abubakar, M. Improving the Production and Utilization of Cowpea as Food and Fodder. **Field Crops Research**, 84, 169-177 (2003).
- Siuzdak, G. **Mass Spectrometry for Biotechnology**. Academic Press, 161 p. (1996).

- Somers, D. A., Samac, D. A., Olhoft, P. M. Recent Advances in Legume Transformation. **Plant Physiology**, 131, 892-899 (2003).
- Sperling, K. From Proteomics to Genomics. **Electrophoresis**, 22, 2835-2837 (2001).
- Steen, H., Mann, M. The ABC's (and XYZ's) of Peptide Sequencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 5, 699-711 (2004).
- Tan-Wilson, A. L., Rightmire, B. R., Wilson, K. A. Different Rates of Metabolism of Soybean Proteinase Inhibitors during Germination. **Plant Physiology**, 70, 493-497 (1982).
- Tchorbadjieva, M. I., Pantchev, I. Y. Secretion of a Chitinase-Like Proteins in Embryogenic Suspension Cultures of *Dactylis glomerata* L.. **Biologia Plantarum**, 50, 142-145 (2006).
- Thibaud-Nissen, F., Shealy, R. T., Khanna, A., Vodkin, L. O. Clustering of Microarray Data Reveals Transcripts Patterns Associated with Somatic Embryogenesis in Soybean. **Plant Physiology**, 132, 118-136 (2003).
- Thiede, B., Höhenwarter, W., Krah, A., Mattow, J., Schmid, M., Schmidt, F., Jungblut, P. R. Peptide Mass Fingerprinting. **Methods**, 35, 237-247 (2005).
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets: Procedure and some applications. **PNAS**, 76, 4350-4354 (1979).
- Van Hengel, A., Guzzo, F., Van Kammen, A., De Vries, S. Expresión Pattern of the Carrot *EP3* Endochitinase Genes in Suspension Cultures and Developing Seeds. **Plant Physiology**, 117, 43-53 (1998).
- Van Hengel, A., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., Van Kammen, A., De Vries, S. N-Acetylglucosamine and Glucosamine-Containing Arabinogalactan Proteins Control Somatic Embryogenesis. **Plant Physiology**, 125, 1880-1890 (2001).
- van Loon, L. C., van Strien, E. A. The Families of Pathogenesis-Related Proteins, Their Activities, and Comparative Analysis of PR-1 Type Proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 55, 85-97 (1999).
- van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**, 44, 135-162 (2006).
- Vasconcelos, É. A. R. **Análise da Deposição de Proteínas Durante o Desenvolvimento de Embriões de Feijão-de-Corda [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)]**. Dissertação. UFC. 78p.: il. (2005).

- Vasconcelos, É. A. R., Nogueira, F. C. S., Abreu, E. F. M., Gonçalves, E. F., Souza, P. A. S., Campos, F. A. P. Protein Extraction from Cowpea Tissues for 2-D Gel Electrophoresis and Ms Analysis. **Chromatographia**, 62, 447-450 (2005).
- Wang, T. L., Domoney, C., Hedley, C. L., Casey, R., Grusak, M. A. Can We Improve the Nutritional Quality of Legume Seeds? **Plant Physiology**, 131, 886-891 (2003).
- Watson, B. S., Asirvatham, V. S., Wang, L., Sumner, L. W. Mapping Proteome of Barrel Medic (*Medicago truncatula*). **Plant Physiology**, 131, 1104-1123 (2003).
- Weber, H., Borisjuk, L., Wobus, U. Molecular Physiology of Legume Seed Development. **Annual Review of Plant Biology**, 56, 253-279 (2005).
- Wehmeyer, N., Hernandez, L. D., Finkelstein, R. R., Vierling, E. Synthesis of Small Heat-Shock Proteins is Part of the Developmental Program of Late Seed Maturation. **Plant Physiology**, 112, 747-757 (1996).
- Wehmeyer, N., Vierling, E. The Expression of Small Heat Shock Proteins in Seeds Responds to Discrete Developmental Signals and Suggests a General Protective Role in Desiccation Tolerance. **Plant Physiology**, 122, 1099-1108 (2000).
- Westermeier, R., Naven, T. **Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis**. Wiley-VHC. 316 p. (2002).
- Williams, K. L. Genomes and Proteomes: Towards a Multidimensional View of Biology. **Electrophoresis**, 20, 678-688 (1999).
- Wise, M. J. LEAPing to Conclusions: A computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. **BMC Bioinformatics**, 4, 52-71 (2003).
- Wong, P. F., Abubakar, S. Post-Germination Changes in *Hevea brasiliensis* Seeds Proteome. **Plant Science**, 169, 303-311 (2005).
- Yates III, J. R., Speicher, S., Griffin, P. R., Hunkapiller, T. Peptide Mass Maps: A highly informative approach to protein identification. **Analytical Chemistry**, 214, 397-408 (1993).
- Yates III, J. R. Mass Spectral Analysis in Proteomics. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structures**, 33, 297-316 (2004).

7. ANEXOS

Anexo I. Soluções e Tampões.

I.I. Tampão de Corrida

Tris	0,25M
Glicina	1,92M
SDS	1%
Água (dest.) p/	1000ml

I.IV. Sol. Corante PhastGel Blue R-350

Estoque:
1 tablete em 80 ml de água (agito por 10 minutos) + 120 ml de metanol (agito até completa dissolução, filtração).

Corante 0,02%:
100 ml de corante estoque + 900 ml de metanol:ácido acético:água (3:1:6).

I.II. Stacking Gel (5%)

Bis-Acrilamida 29%T; 3,4%C	2,49 ml
H ₂ O	10,2 ml
Tris/HCl 1M pH 6,8	1,89 ml
SDS 10%	150 µl
PSA 10%	150 µl
TEMED	15 µl

I.V. Tampão de Transferência

Tris	2,5 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20%
SDS	0,1%
pH 8,3	

I.III. Main Gel (15%)

Bis-Acrilamida 29%T; 3,4%C	15 ml
H ₂ O	6,9 ml
Tris/HCl 1,5M pH 8,8	7,5 ml
SDS 10%	300 µl
PSA 10%	300 µl
TEMED	30 µl

I.VI. Solução Ponceau

Ponceau	2g
TCA	30g
Ác. Sulfosalicílico	30g
Água (dest.) p/	100ml

Anexo II. Catálogo funcional dos genes de plantas (Bevan *et al.*, 1998).

01 Metabolism	02 Energy	03 Cell growth / division	04 Transcription
01.01 Amino acid 01.02 Nitrogen and sulphur 01.03 Nucleotides 01.04 Phosphate 01.05 Sugars and polysaccharides 01.06 Lipid and sterol 01.07 Cofactors	02.01 Glycolysis 02.02 Gluconeogenesis 02.07 Pentose phosphate 2.10 TCA pathway 2.13 Respiration 2.16 Fermentation 2.20 E-transport 2.30 Photosynthesis	03.01 Cell growth 03.13 Meiosis 03.16 DNA synth/replication 03.19 Recombination/repair 0.322 Cell cycle 03.25 Cytokinesis 03.26 Growth regulators 03.99 Other	04.01 rRNA synthesis 04.10 tRNA synthesis 04.19 mRNA synthesis 04.1901 General TFs 0.41904 Specific TFs 04.1907 Chromatin modification 04.22 mRNA processing 04.31 RNA transport
05 Protein synthesis	06 Protein destination and storage	07 Transporters	08 Intracellular traffic
05.01 Ribosomal proteins 05.04 Translation factors 05.07 Translation control 05.10 tRNA synthases 05.99 Others	06.01 Folding and stability 06.04 Targetting 06.07 Modification 06.10 Complex assembly 06.13 Proteolysis 06.20 Storage proteins	07.01 Ions 07.07 Sugars 07.10 Amino acids 07.13 Lipids 07.16 Purine/pyrimidines 07.22 Transport ATPases 07.25 ABC-type 07.99 Others	08.01 Nuclear 08.02 Chloroplast 08.04 Mitochondrial 08.07 Vesicular 08.10 Peroxisomal 08.13 Vacuolar 08.16 Extracellular 08.19 Import 08.99 Others
09 Cell structure	10 Signal transduction	11 Disease / defence	20 Secondary metabolism
09.01 Cell wall 09.04 Cytoskeleton 09.07 ER/Golgi 09.10 Nucleus 09.13 Chromosomes 09.16 Mitochondria 09.19 Peroxisome 09.25 Vacuole 09.26 Chloroplast 09.99 Others	10.01 Receptors 10.04 Mediators 10.0404 Kinases 10.0407 Phosphatases 10.0410 G proteins 10.99 Others	11.01 Resistance genes 11.02 Defence-reglated 11.03 Cell death 11.04 Cell rescue 11.05 Stress responses 11.06 Detoxification 11.99 Others	20.1 Phenylpropanoids/ phenolics 20.2 Terpenoids 20.3 Alkaloids 20.4 Non-protein amino acids 20.5 Amines 20.6 Glucosinolates 20.99 Others
12 Unclear classification		13 Unclassified	Transposons
			14.01 LTR retroelements 14.02 Non-LTR retroelements 14.99 Other
Fifteen putative cellular roles for genes in plants are shown that are broadly based on the yeast functional catalogue ⁹ . New categories, adapted for plant-specific roles, have been made for secondary product metabolism and disease, defence and stress responses, and several new subcategories of genes involved in photosynthesis, chloroplast structure, storage processes and polysaccharide metabolism have been established. Categories between 14–19 have been reserved for gene categories in other organisms.			

Anexo III. Relação de publicações científicas originadas da presente Dissertação de Mestrado.

• Trabalhos completos

Nogueira, F. C. S., Gonçalves, E. F., Jereissati, E. S., Santos, M., Costa, J. H., Oliveira-Neto, O. B., Soares, A. A., Domont, G. B., Campos, F. A. P. Proteome Analysis of Embryogenic Cell Suspension of Cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant Cell Reports**, 26, 1333-1343 (2007).

Vasconcelos, É. A. R., Nogueira, F. C. S., Abreu, E. F. M., Gonçalves, E. F., Souza, P. A. S., Campos, F. A. P. Protein Extraction from Cowpea Tissues for 2-D Gel Electrophoresis and Ms Analysis. **Chromatographia**, 62, 447-450 (2005).

• Prêmios e Títulos

Menção Honrosa pelo trabalho, Proteomic Analysis of Embryogenic Cell Suspension Cultures of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Reveals Pathogenesis-Related Proteins, apresentado no I Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas

PRÊMIO SBBq 2006 (aprovado para a segunda fase) pelo trabalho, Protein Deposition Patterns in Developing Zygotic Embryos of Cowpea (*Vigna unguiculata*), apresentado na XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.

• Comunicações em Congressos

NOGUEIRA, F. C. S., GONCALVES, E. F., JEREISSATI, E. S., JUCA, T. L., COSTA, J. H., SANTOS, M. F., SOARES, A. A., DOMONT, G. B., CAMPOS, F. A. P. Proteomic Analysis of Embryogenic Cell Suspension Cultures of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Reveal Pathogenesis-Related Proteins **In: I Simpósio de Genética Molecular de Plantas, 2007**, Natal. Programa e Resumos, 2007.

NOGUEIRA, F. C. S., JUCA, T. L., SANTOS, M. F., DOMONT, G. B., CAMPOS, F. A. P. Proteomic Analysis of Protein Deposition in the Developing Zygotic Embryo of Cowpea (*Vigna unguiculata*) **In: I Simpósio de Genética Molecular de Plantas,**

2007, Natal. Programa e Resumos, 2007.

NOGUEIRA, F. C. S., GONCALVES, E. F., JEREISSATI, E. S., SOARES, A. A., JUCA, T. L., COSTA, J. H., OLIVEIRA-NETO, O. B., SANTOS, M. F., DOMONT, G. B., CAMPOS, F. A. P. Padrão de Deposição de Proteínas em Suspensões celulares Embriogênicas do Feijão-de-Corda (*Vigna unguiculata*) **In: 57º Congresso Nacional de Botânica, 2006**, Gramado - RS. Programas e Resumos, 2006.

NOGUEIRA, F. C. S., GONCALVES, E. F., SOARES, A., CAMPOS, F. A. P., OLIVEIRA-NETO, O. B. Pathogenesis-Related Proteins in Embryogenic Cell Suspensions of Cowpea (*Vigna unguiculata*) **In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2006**, Águas de Lindóia - SP. XXXV Reunião Anual da SBBq Programas e Resumos. Adaltech Soluções para Eventos, 2006.

NOGUEIRA, F. C. S., Vasconcelos, E. A. R., CAMPOS, F. A. P. Protein Deposition Patterns in Developing Zygotic Embryos of Cowpea (*Vigna unguiculata*) **In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2006**, Águas de Lindóia - SP. XXXV Reunião Anual da SBBq Programas e Resumos. Adaltech Soluções para Eventos, 2006.

Vasconcelos, E. A. R., NOGUEIRA, F. C. S., GONCALVES, E. F., ABREU, E. F. M., CAMPOS, F. A. P. Análise da Deposição de Proteínas Durante o Desenvolvimento de Embriões Zigóticos de Feijão-de-Corda **In: X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XII Congresso Latino Americano de Fisiologia Vegetal, 2005**, Recife - PE. Programas e Resumos, 2005.

NOGUEIRA, F. C. S., Vasconcelos, E. A. R., GONCALVES, E. F., ABREU, E. F. M., JUCA, T. L., SOARES, A. A., CAMPOS, F. A. P. Proteínas Relacionadas à Patogênese em Suspensões Celulares Embriogênicas do Feijão-de-Corda (*Vigna unguiculata*) **In: X Congresso Brasileiro de Fisiologia vegetal e XII Congresso Latino Americano de Fisiologia Vegetal, 2005**, Recife. Programas e Resumos, 2005.

JUCA, T. L., NOGUEIRA, F. C. S., CAMPOS, F. A. P. Estudos Imunoquímicos de uma Proteína Relacionada à Patogênese de Suspensões Celulares Embriogênicas de Feijão-de-Corda (*Vigna unguiculata*) **In: XXIV Encontro Universitário de Iniciação à Pesquisa, 2005**, Fortaleza. Programas e Resumos, 2005.