

**ESTRESSE HÍDRICO COM DIFERENTES OSMÓTICOS EM SEMENTES
DE FEIJÃO E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DURANTE
A GERMINAÇÃO**

DANIELLE LETÍCIA MARTINS COELHO

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ESTRESSE HÍDRICO COM DIFERENTES OSMÓTICOS EM SEMENTES
DE FEIJÃO E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DURANTE
A GERMINAÇÃO**

DANIELLE LETÍCIA MARTINS COELHO

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.
Área de Concentração: Produção Vegetal

Orientador: Ceci Castilho Custódio

633.372 5
C672e

Coelho, D. L. M.

Estresse hídrico com diferentes osmóticos em sementes de feijão e expressão diferencial de proteínas durante a germinação. Danielle Letícia Martins Coelho - Presidente Prudente: [s.n.], 2008.

39 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2008.

Bibliografia

1. *Phaseolus vulgaris* L. 2. Deficiência de água, HSPs. I. Título.

DANIELLE LETÍCIA MARTINS COELHO

Estresse hídrico com diferentes osmóticos em sementes de feijão e expressão diferencial de proteínas durante a germinação

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Presidente Prudente, 21 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ceci Castilho Custódio
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof^a. Dra. Gisele Herbst Vazquez
Universidade Camilo Castelo Branco - Unicastelo
Fernandópolis - SP

Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pacheco Santos
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, que sempre me deram amor incondicional, apoio, carinho, orientando-me para lutar pelos meus sonhos, não medindo esforços para que tivesse uma boa formação educacional e profissional;

Aos meus amigos maravilhosos que me deram ânimo para enfrentar as dificuldades, não medindo esforços para que este ideal se realizasse, sempre de forma muito carinhosa, esperançosos e confiantes no meu bom desempenho e,

Aos meus professores, pois sem eles não conseguiria finalizar uma etapa tão importante em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me deu o dom da vida, força, saúde e capacitação para realizar este trabalho.

Agradecimentos também aos meus queridos professores, Prof^a Dr^a Ceci Castilho Custódio e Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto, que, na rigidez de seus ensinamentos, na dedicação e atenção a mim prestadas no desenvolver do trabalho, fizeram com que meus conhecimentos se aprimorassem.

À Keid Ribeiro Kruger, por sua atenção e eficiência com todos os alunos do mestrado enquanto secretária do Programa.

Às amigas queridas, Edna Antônia Torquato de Agostini, Luciana Machado Guaberto e Márcia Guaberto, que tanto me ajudaram no processo laboratorial, pelo companheirismo e os muitos momentos de alegria compartilhados.

Aos demais funcionários da UNOESTE pela dedicação ao atendimento aos alunos.

RESUMO

Estresse hídrico com diferentes osmóticos em sementes de feijão e expressão diferencial de proteínas durante a germinação

O feijão (*Phaseolus vulgaris L*) é uma cultura de grande expressão alimentícia. A emergência da cultura é dependente de água, sendo considerada a fase mais crítica. O objetivo deste foi simular deficiência de água no início da germinação em laboratório, em sementes de feijão 'Pérola', utilizando-se: manitol, CaCl_2 , MgCl_2 e NaCl em potenciais de 0; -0,3; -0,6; -0,9 e -1,2MPa estabelecidos pela equação de Van't Hoff e avaliar o perfil eletroforético de proteínas totais solúveis através de SDS-PAGE. Foram avaliados: germinação, classificação de vigor, massa seca de raiz e de parte aérea e resposta diferencial de expressão de proteínas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados foram analisados através da aplicação do teste F, para análise de variância, regressão polinomial para os níveis de potencial osmóticos para cada uma das variáveis fisiológicas estudadas. O bandeamento eletroforético foi avaliado visualmente através da imagem dos géis. A simulação do estresse permitiu avaliar a drasticidade do NaCl em todos os parâmetros avaliados e a ausência de proteínas de baixo peso molecular neste osmótico. As proteínas de 110 e 30kDa foram indicativas de estresse hídrico, mas não do salino.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris L*; Deficiência de água, HSPs

ABSTRACT

Water deficit with different osmotic in snap-beans and differential protein expression during germination

Snap Beans (*Phaseolus vulgaris* L) are highly valuable nutritionally, and it is cultivated by small, medium and big farmers. It represents a significant parcel of Brazilian economy concerning to the society. Culture emergency is a critical point in the production process and it is affected mainly by the water deficiency at this phase. The objective of this work was to simulate water deficiency in the germination beginning at the laboratory on seeds of snap beans 'Pérola', using mannitol, CaCl₂, MgCl₂ and NaCl as osmotic in the potential of 0; -0.3; -0.6; -0.9 and -1.2MPa calculated with the aim of Van't Hoff's equation and to evaluate the electrophoretical protein patterns of total soluble proteins by SDS-PAGE. Germination, vigour classification, roots and shoot dry weight and differential protein expression response was evaluated as parameters. The experimental design was completely randomized. Data was analysed by F test (ANOVA) and polynomial regression for the osmotic potential for each parameter evaluated. Banding pattern was evaluated by gel image. Simulation of deficiency, in laboratory, allowed the perception of the stress originated by NaCl in all parameter evaluated, validating the harsh of the NaCl and the lack of expression of low molecular weight proteins in this osmotic. 110 and 30kDa proteins were indicative of water stress, but not of salinity

Key words: *Phaseolus vulgaris* L; Water deficiency, HSPs

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3 OBJETIVO.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L) é um vegetal da família Fabaceae e sua cultura apresenta grande destaque, pois é considerada uma planta de grande importância para a alimentação humana, por exibir uma significativa fonte protéica, além de apresentar carboidratos e minerais (EMBRAPA, 2005). No Brasil, o cultivo do feijoeiro é assíduo, sendo cultivado por pequenos, médios e grandes agricultores, com produção anual total de aproximadamente 3,4 milhões de toneladas (IBGE, 2007).

Além de ser responsável pelo suprimento de pessoas com alto e baixo poder aquisitivo, essa cultura apresenta possibilidades de plantio em várias épocas do ano e em quase todos os estados brasileiros. O clima tropical residente submete as plantas a estresses ambientais freqüentes, como, por exemplo, as altas temperaturas, estresse salino e deficiência de água o que provoca efeitos deletérios em processos vitais para o desenvolvimento vegetal e conseqüentemente diminuição dos níveis de produtividade.

As condições que o campo proporciona às sementes nem sempre são ótimas para a germinação, podendo ocorrer extremos de temperatura paralelamente ao déficit hídrico resultando em solos mais concentrados em sais. A emergência da cultura de feijão é um dos pontos críticos do processo de produção e é afetada principalmente por deficiência de água, pois a germinação das sementes é extremamente dependente da mesma.

Solos ou substratos concentrados em sais não fornecem meios adequados para semeadura, pois o potencial de água no substrato é menor, provocando deficiência hídrica na semente e efeitos danosos na fisiologia e no metabolismo da planta em desenvolvimento.

São considerados mais nocivos os sais que apresentam maior solubilidade, pelo fato que as plantas, ao absorverem água do substrato, absorvem solução e conseqüentemente excessos de sais, provocando toxidez e distúrbios fisiológicos às sementes, acarretando diminuição no potencial de germinação (TORRES et al., 2000; FONSECA; PEREZ, 1999). Durante a embebição, esse excesso de sais,

agora íons, tem sua entrada facilitada em quantidades tóxicas, além da dificuldade da cinética de absorção de água pela semente no processo de germinação provocado pela salinidade (SANTOS et al., 1992). Assim, sais contendo cálcio geralmente são menos drásticos que sais de sódio (MACHADO NETO et al., 2006). Sabe-se que o magnésio também atua como cofator enzimático em rotas associadas com tolerância ao estresse podendo mudar a resposta da plântula em potenciais isosmóticos, assim como já foi observado para o cálcio.

O movimento de íons de um lugar para outro é denominado transporte. As células do embrião trocam água e solutos com seu ambiente, e entre seus tecidos e órgãos, por meio de membranas que contêm proteínas especializadas – canais, carregadores e bombas – que facilitam o transporte de solutos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Na membrana existem hormônios, os quais interagem com proteínas específicas, denominados receptores. Os hormônios constituem-se em mensageiros químicos que funcionam como mediadores na comunicação intercelular, sendo responsáveis pelo reconhecimento do estresse e os transmitindo até o núcleo da célula, onde ocorre a ativação ou inativação da expressão gênica. Alterando-se portanto o metabolismo celular, com reflexos fisiológicos e no desenvolvimento da plântula, a qual pode não ter um pool de enzimas antioxidantes suficiente para lidar com o estresse, pelo fato de ainda não apresentar maturidade e especificidade de proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As proteínas expressas em resposta aos estresses são específicas, dentre elas as chamadas HSPs (Heat-Shock Proteins) são sintetizadas por influência da deficiência hídrica e estresse de calor. Proteínas de choque térmico (HSPs) são consideradas um grupo especial, porque podem ser encontradas em diversos eucariotos submetidos ao estresse, além de acompanhar a escala evolutiva (ARAÚJO et al., 1998). Todos os estresses ambientais que plantas sofrem durante seu desenvolvimento, refletem mudanças na sua fisiologia. A deficiência de água é uma grande vilã nesse processo, agindo como fator limitante de emergência da cultura, crescimento da plântula, desenvolvimento da planta, reprodução e conseqüentemente redução no nível de produção.

O conhecimento da resposta fisiológica traduzida em capacidade de germinação e desenvolvimento inicial, acompanhado da expressão diferencial de proteínas em condição de deficiência de água e concentração de sais pode lançar perspectivas de seleção de plantas com maior tolerância ou de um possível tratamento de sementes, muito úteis diante do cenário atual de necessidade de aumento da produção de alimentos em um ambiente em aquecimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil é um país que apresenta clima tropical, sendo propício ao manejo de plantas como o feijão que, por sua vez, é uma cultura com ampla adaptação climática. Esse conjunto de características faz com que o Brasil seja um grande produtor dessa cultura (EMBRAPA, 2005).

O cultivo do feijão nos estados brasileiros é significativo, pois além do consumo como fonte nutricional da população, ele também é fonte de renda dos pequenos, médios e grandes produtores (EMBRAPA, 2005).

Entende-se que o ponto mais crítico da cultura do feijoeiro seja a emergência, por ser esse processo totalmente dependente da água. A hidratação da semente logo após a semeadura é o gatilho para o desenvolvimento. A água constitui a matriz onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos e fisiológicos, ativando o desenvolvimento da plântula essenciais à vida, apresentando profunda influência na estrutura e nas propriedades das proteínas, das membranas, dos ácidos nucleicos e de outros constituintes celulares (BRAY, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2004).

O reflexo da fragilidade agrônômica do feijão é visto quando essa cultura é submetida a escassez de água, quando é encontrado no solo elevada concentração de sais, causando diminuição do turgor das células das raízes, comprometimento do metabolismo e redução no crescimento. Em contrapartida, o excesso de água, pode acarretar danos por embebição e diminuição da capacidade de estabelecimento de plantas.

O metabolismo da planta é prejudicado pelo acúmulo de sal nos solos, que, quando examinados os seus efeitos, estabelece-se a distinção entre altas concentrações de Na^+ , identificadas como solos sódicos, e altas concentrações de sais totais, referidas como solos salinos. No campo, o conteúdo de água do solo entre a capacidade de campo (CC) e o ponto de murcha permanente (PMP), foi definido como água disponível (AD) para plantas (TORMENA et al., 1999), sendo considerado para a CC valores entre $-0,01$ a $-0,2\text{MPa}$ e para o PMP valores próximos de $-1,5\text{MPa}$ (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Em soja, a baixa germinação das sementes, é uma conseqüência da baixa disponibilidade hídrica encontrada nos períodos de estiagem, logo após a semeadura. A emergência da cultura e o desenvolvimento de plântulas são dependentes do regime hídrico e do potencial fisiológico da semente (MIAN; NAFZIGER, 1994; ROSSETO et al., 1997).

O solo nem sempre apresenta ambiente ótimo para a germinação das sementes, porque quando existe a deficiência hídrica, subentende-se que o solo apresenta potenciais hídricos mais negativos do que as células do embrião, dificultando a absorção da água necessária para a germinação (MACHADO NETO et al., 2004). Para a germinação, as sementes são dependentes do fluxo d'água, da sua velocidade e intensidade, processos estes, que estão diretamente ligados ao potencial mátrico do solo ou substrato, textura e condutividade hidráulica do mesmo, gradiente de potencial de água entre o solo e a semente, o tamanho e a estrutura do tegumento das sementes e a temperatura (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; BEWLEY; BLACK, 1994; PESKE; DELOUCHE, 1985).

Portanto, são encontrados no solo diversos potenciais osmóticos, agindo diretamente na emergência da cultura. O fluxo d'água é dependente do gradiente de concentração, por isso, o embrião necessita encontrar no solo maior potencial, comparado com os de suas células. Em função da deficiência hídrica gradativa e progressiva gera-se reduções na velocidade da germinação, na porcentagem final de germinação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000), e no desenvolvimento inicial de plântulas (SÁ, 1987; SILVA; MARCOS FILHO, 1990).

A solução encontrada no solo para proporcionar a germinação das sementes tem a negatividade dependente do tipo de soluto ali encontrado e do potencial osmótico. Os íons dessa solução tem sua penetração facilitada nas células devido ao efeito osmótico e/ou iônico, e dificultam a entrada da água (VAN DER MOEZEL; BELL, 1987). Os estresses causados por NaCl, CaCl₂, Na₂SO₄ exercem efeitos negativos na germinação e vigor de sementes de soja (SANTOS et al., 1992; BRACCINI et al., 1998). A baixa disponibilidade de água também reduz o acúmulo de matéria seca em plântulas de soja (SÁ, 1987).

Em sementes de feijão, o vigor é mais afetado do que a germinação quando essa cultura é submetida ao tratamento com NaCl; e a porcentagem de plântulas anormais aumentam na presença do sal (PAULA et al., 1994). Em pepino (*Cucumis sativus* L.), o NaCl, em diversas concentrações, proporcionou a redução da germinação e do desenvolvimento de plântulas e o aumento de plântulas anormais (TORRES et al., 2000). Esses efeitos negativos também ocorreram com soja, quando estas foram sujeitas ao estresse induzido por NaCl (SANTOS et al., 1996).

Nos estudos de Machado Neto et al. (2006) com sementes de feijão, foram obtidos 15% de germinação no tratamento com solução contendo NaCl, no potencial osmótico $-0,9$ MPa, revelando uma drástica interferência. Moraes e Menezes (2003), com sementes de soja, verificaram que nas concentrações de $-0,20$ e $-0,10$ MPa, a germinação manteve-se acima de 80 %. A massa seca da parte aérea, no potencial $-1,2$ MPa no tratamento com NaCl, foi inferior a da obtida em solução de manitol, em contrapartida, a massa seca de raiz no potencial $-0,6$ MPa teve resultado superior à solução de KCl (MACHADO NETO et al., 2006).

O osmótico manitol causou reduções na germinação (primeira contagem), na velocidade da germinação, no comprimento e massa seca de parte aérea e de raízes, e de plântulas normais de feijão em potenciais de $-0,4$ a $-0,6$ MPa (BRAGA et al., 1999). No potencial $-0,9$ MPa esse mesmo osmótico proporcionou germinação superior a 65% (MACHADO NETO et al., 2006). Em 1999, Braga et al., submeteram sementes de feijão de três lotes à germinação em rolos de papel toalha, simulando deficiência hídrica, e a medida que a disponibilidade de água foi reduzida, houve aumento na ocorrência de plântulas anormais, porém, entre os potenciais hídricos de $-0,001$; $-0,01$ e $-0,2$ MPa não foram constatadas diferenças na normalidade destas plântulas.

Pereira et al. (1981), citados por Braga et al. (1999), relatam que as anormalidades podem estar diretamente relacionadas com a hidratação retardatária que deixam as sementes mais expostas ao ataque de patógenos, graças a exsudação de íons, açúcares e ácidos graxos pelas sementes, do que pelo retardamento da germinação em função do potencial osmótico, essas sementes acabam ficando mais tempo no solo expostas à ação dos patógenos.

Em relação aos resultados da matéria seca das plântulas obtidos por Braga et al. (1999), os potenciais $-0,001$ e $-0,01$ MPa de solução manitol, apresentaram os maiores valores, ficando claro que os níveis de água afetam significativamente o desenvolvimento das plântulas. Para a massa seca da parte aérea, no potencial hídrico $-1,2$ MPa, a solução de manitol proporcionou peso superior às soluções de NaCl, e para o peso seco de raízes, o mesmo potencial, superou os obtidos nas soluções de NaCl, CaCl_2 e KCl (MACHADO et al., 2006).

O tratamento a base de CaCl_2 foi o menos drástico para a germinação em relação às soluções de NaCl, KCl e manitol, com sementes de feijão, onde encontrou-se germinação até o potencial de $-1,2$ MPa (MACHADO et al., 2006). O CaCl_2 , tem como limite máximo de tolerância os potenciais de $-1,2$ MPa e $-1,8$ MPa para a germinação, já nas soluções de NaCl, KCl e manitol, com esses mesmos potenciais, não há germinação, comprovando que essas soluções apresentam limite máximo menor que o CaCl_2 (MACHADO et al., 2006). Em sementes de olho-de-dragão (*Anadenanthera pavonina*) estudadas por Fonseca e Peres (1999) tratadas com KCl e CaCl_2 verificou-se que houve germinação com êxito até $-1,2$ MPa, com tolerância máxima entre os potenciais de $-1,2$ MPa a $-1,4$ MPa.

As sementes submetidas a solução de CaCl_2 apresentaram resultados superiores aos das com tratamentos de NaCl, KCl e manitol em relação à massa seca da parte aérea, até o potencial de $-0,92$ MPa (MACHADO et al., 2006). Para a variável massa seca de raiz os valores se igualaram, com exceção do KCl nos potenciais de $-0,6$ MPa (MACHADO et al., 2006).

Moraes e Menezes (2003), nos seus estudos com soja, observaram que o índice de germinação diminuiu à medida que os potenciais de água decresceram na solução contendo o MgCl_2 , o mesmo ocorreu com o vigor das sementes, fato também observado para massa seca total; no potencial a $-0,80$ MPa houve menor acúmulo de massa seca de plântulas, comparado com os demais sais, utilizados para induzir o estresse salino.

Estresses ambientais, como alta temperatura, deficiência hídrica, estresses salinos e até mesmo infecção por patógenos, estão diretamente e

intimamente ligados com alterações no padrão de síntese de proteínas específicas (ARAÚJO et al., 1998).

Eventos moleculares ocorrem a partir da percepção do estresse hídrico induzindo a diversas respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (BRAY, 1993). O crescimento celular é o mais afetado pela deficiência de água e quando esse estresse é mais severo conduz a inibição da divisão celular, à inibição da síntese de proteína e de parede, ao acúmulo de solutos, ao fechamento estomático e à inibição da fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2004). Segundo Dell'Aquila (1992) a redução da síntese de proteína no embrião reflete diminuição no crescimento e mudanças na turgescência celular.

Proteínas de choque térmico (HSPs - Heat Shock Proteins) são específicas ao estresse de calor, porém, também são sintetizadas na presença de estresse hídrico. Esse grupo especial de proteínas é encontrado em diversos eucariotos, como: arqueobactérias, eubactérias (LINDQUIST; GRAIG, 1988), micróbios (HARBORNE, 1997), fungos, plantas (VIERLING, 1991), animais (HARBORNE, 1997; VIERLING, 1991) e seres humanos (RIZZO et al., 1998). Nos humanos, esse grupo protéico peculiar pode estar diretamente ligado ao sistema imune (ARAÚJO et al., 1998).

Todos os organismos vivos que são ou que foram expostos a condições de estresses como por exemplo a altas temperaturas, contaminação por metal pesado, deficiência de água e presença de microorganismos patógenos, são induzidos à produção de proteínas HSPs (ARAÚJO et al., 2003). A síntese desse grupo de proteínas parece ser uma resposta universal em função do estresse de temperatura, nos diversos organismos vivos (procariotos e eucariotos) (VIERLING, 1991; PARSELL; LINDQUIST, 1993). Os mecanismos moleculares que promovem a produção das HSPs por genes são muito similares nos mais diversos eucariotos (VIERLING, 1991).

Dentro de uma mesma espécie como trigo (WENG; NGYUEN, 1992), tomate (FEDER; O'CONNELL, 1990) e sorgo (JORGENSEN et al., 1992), foram observadas diferenças no padrão de síntese de HSPs. A deficiência hídrica assim como o estresse térmico induzem a síntese de HSPs específicas e /ou o aumento de determinados grupos em vegetais mais tolerantes (ARAÚJO et al., 1998).

Como proteção das estruturas celulares contra perdas de água, acredita-se que genes codifiquem proteínas específicas (BOYER, 1996; ALVIN et al., 2001); porém, não é sempre que os produtos desses genes possam garantir a sobrevivência dessa planta ao estresse ambiental (BRAY, 1993). Eles são ativados quando a planta passa por períodos de estresse resultando em fermento ou dano de células (NEPOMUCENO et al., 2001) como resposta adaptativa (BRAY, 1993; BRAY, 1997). Nepomuceno et al., em 2000, afirmaram que determinadas expressões gênicas podem ser desativadas quando as plantas são submetidas ao estresse. Sabe-se que todas as HSPs de plantas são codificadas por seis famílias nucleares de genes e que cada família corresponde às proteínas encontradas em compartimentos celulares distintos, como, citosol (classe I e II), mitocôndria, retículo endoplasmático, cloroplasto e membranas (WATERS et al., 1996).

A localização celular da síntese de HSPs é um fator importante para a termotolerância (LIN et al., 1984; CHOU et al., 1989; HECKATHORN et al., 1998; KOROTAEVA et al., 2001). Para Parsell e Lindquist (1993), existem três observações que comprovam essa afirmação: 1) a rapidez e a intensidade que as HSP são sintetizadas; 2) a sintetização da HSP é dependente de fatores de estresses que o organismo foi submetido e 3) as HSPs são induzidas por estresse de temperatura nas células de diversos organismos vivos.

As HSPs apresentam pesos moleculares distintos em eucariotos e são classificadas como proteínas de baixo peso molecular (Low Molecular Weight – LMW HSPs) (BOSTON et al., 1996; WATERS et al., 1996), e alto peso molecular (High Molecular Weight – HMW HSPs) (ARAÚJO et al., 1998). As proteínas HSPs de baixo peso molecular normalmente não são detectadas na ausência de estresse térmico (BOSTON et al., 1996; WATERS et al., 1996), já as de alto peso molecular, como HSPs de 60, 70 e 90 kDa, são indispensáveis, e tem síntese progressiva durante o período de estresse (ARAÚJO et al., 1998).

Jinn et al., (1993) e Vierling (1991), citados por Araújo et al. (1998), relataram que as proteínas HSPs de alto peso molecular são predominantes em leveduras, insetos e animais, com valores de 60 a 110 kDa, já as de baixo peso (LMW – HSPs) são encontradas em plantas em maior abundância.

O milho foi estudado por Ristic et al. (1991), os quais relataram a presença de uma HSP de 40 kDa apenas em linhagens tolerantes. Jorgensen et al., (1992), usando tradução *in vitro* do RNAm, observaram grande variedade de LMW – HSPs, em plantas de milho tolerantes ao estresse.

Nos eucariotos, as HSPs de 60 kDa são proteínas mitocôndriais e cloroplásticas codificadas pelo núcleo, encontradas em praticamente todas as espécies de plantas; e poucas foram as proteínas homólogas encontradas em outros compartimentos das células dos eucariontes (VIERLING, 1991).

As HSPs de 70 kDa são encontradas em vários compartimentos celulares, como citoplasma e retículo endoplasmático (ARAÚJO et al., 1998). Essas proteínas são consideradas as mais conservadas durante o período evolutivo (CRAIG et al., 1993; VIERLING, 1991), apresentando 65% de similaridade entre si (ARAÚJO et al., 1998).

Outro grupo especial em relação à conservação evolutiva, é o das HSPs de 90 kDa, sendo encontradas em diversos seres, localizado em abundância no citoplasma (CRAIG et al., 1993). Esse grupo normalmente é encontrado em condições normais, mas sua síntese é aumentada na presença de estresses (VIERLING, 1991). O grupo entre 100 a 110 kDa, é o das HSPs sintetizadas por plantas submetidas ao estresse. Nota-se que essa síntese é exclusiva nas primeiras horas de estresse, não sendo encontradas em condições normais de desenvolvimento (VIERLING, 1991).

Em plântulas de arroz, Pareek et al. (1995) constataram que as bandas de 104 e 90kDa não são encontradas em condições normais, porém, foram sintetizadas à partir dos estresses salino, hídrico, baixa temperatura e aplicação de ácido abscísico.

Não existem estudos que comprovem completamente com sucesso as funções fisiológicas das HSPs, entretanto existem evidências consideráveis demonstrando que a termotolerância está correlacionada com a síntese e acúmulo dessas proteínas (LIN et al., 1984; WENG; NGUYEN, 1992; JINN et al., 1993; SCHIRMER et al., 1994; PARK et al., 1996; PRANDL et al., 1998; RISTIC et al., 1998; JOE et al., 2000). Inclusive, Ristic et al. (1991) e Wood et al. (1998) citam em seus trabalhos que existe uma variação considerável nos testes padrões realizados em função das HSPs entre indivíduos da mesma espécie e espécies diferentes.

Diante dos estudos das HSPs, nota-se que, dentro deste grupo especial de proteínas, ainda existe um determinado grupo que se destina a recuperação de proteínas lesadas, chamadas de moléculas “chaperonas” que possuem atividade voltada para interagir com proteínas desnaturadas, designadas à prevenção de agregação ou desnaturação protéica, promovendo a renaturação (ARAÚJO et al., 1998), em células que foram submetidas a estresses térmicos (BOSTON et al., 1996).

Algumas outras funções são sugeridas para as moléculas “chaperonas”, como facilitar a conformação correta de proteínas recém sintetizadas e promover a formação e manutenção de conformações protéicas específicas (ARAÚJO et al., 1998).

A expressão de “chaperonas” é estimulada por condições de estresses, portanto, quando as plantas passam por momentos de deficiência hídrica, essa moléculas tem sua síntese aumentada por influência da agressão, atuando na correção do dobramento – enovelamento incorreto e a agressão de proteínas.

Vierling (1991) e Wu et al. (1993), afirmaram que as HSPs de 60, 70 e 90 kDa tem funções essenciais facilitando processos importantes como: correta conformação protéica e transporte através de membranas, assimilação de proteínas oligoméricas e modulação de atividades receptoras. Essas bandas foram as primeiras a receberem o nome de “chaperonas” (SCHMITZ et al., 1996; CRAIG et al., 1993; GETTING; SAMBROOK, 1992).

Diante das condições de estresse hídrico a que as sementes são expostas devido às diferentes concentrações das soluções usadas para determinar a germinação, sendo em condições de campo ou em laboratório, espera-se manifestações de grupos peculiares de proteínas como resposta a tolerância a esse fator ambiental.

3 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo simular estresse hídrico em sementes de feijão, do cultivar 'Pérola', durante o início da germinação em laboratório, utilizando diferentes osmóticos: manitol, CaCl_2 , NaCl e MgCl_2 em potenciais de 0; -0,3; -0,6; -0,9 e -1,2 MPa. Serão avaliados parâmetros relacionados à germinação, classificação de vigor, massa seca de raiz e de parte aérea, massa seca total, relação raiz/parte aérea, além da expressão diferencial de proteínas totais solúveis através de eletroforese (SDS-PAGE).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre maio e outubro de 2007, no Laboratório de Sementes e Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE - localizado em Presidente Prudente - SP. Foram utilizadas para o experimento sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do cultivar 'Pérola', submetidas à germinação em diferentes potenciais osmóticos, simulando situações de estresse hídrico. Foram utilizados: manitol, CaCl_2 , MgCl_2 e NaCl em potenciais de 0; -0,3; -0,6; -0,9 e -1,2MPa estabelecidos pela equação de Van't Hoff, citado por Salisbury e Ross (1991), ou seja: $\psi_{os} = -RTC$, em que: ψ_{os} = potencial osmótico (atm); R= constante geral dos gases perfeitos ($0,082 \text{atm} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{K}$); T= temperatura (K); C= concentração ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e $T \text{ (K)} = 273 + T \text{ (}^\circ\text{C)}$. As concentrações de NaCl foram corrigidas de acordo com a curva de calibração estabelecida por Braccini et al. (1996), ou seja: $\psi_{os} = 0,194699 + 0,750394C$ $R^2 = 0,9999$, em que: ψ_{os} = potencial osmótico (bar); C=concentração ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) (Tabela 1).

TABELA 1: Concentrações ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) de Manitol, CaCl_2 , NaCl e MgCl_2 para obter diferentes níveis de potencial osmótico da solução de embebição

Níveis de potencial osmótico (MPa)	Manitol	CaCl_2	NaCl	MgCl_2
	(g.L ⁻¹)			
0	0	0	0	0
-0,3	22,29	7,98	4,20	6,85
-0,6	44,58	15,95	8,40	13,71
-0,9	66,87	23,94	12,60	20,56
-1,2	89,17	31,93	16,81	27,42

O teste de germinação consistiu em separar quatro repetições de cinquenta sementes, envolvidas entre três folhas de papel toalha para germinação (Germitest), sendo duas como base e uma para cobrir, umedecidas com 2,25 vezes a sua massa com as soluções já mencionadas. Em seguida, os rolos foram envolvidos

em sacos plásticos de polietileno e mantidos em germinador à temperatura constante de 25°C. A contagem foi realizada no sexto dia, computando-se as plântulas normais 'fortes' e normais 'fracas', anormais e as sementes mortas (BRASIL, 1992; NAKAGAWA, 1999), sendo expressos em porcentagem. Foram consideradas plântulas normais 'fortes' as que não apresentaram pequenas irregularidades em algumas de suas estruturas essenciais, como sistema radicular; hipocótilo (rachaduras, lesões, necroses ou rachaduras cicatrizantes); epicótilo (pouco desenvolvido ou sem uma folha primária); cotilédones (faltando um ou sem uma folha primária) e aspecto geral da plântula (afilada, pouco desenvolvida ou curta e fraca) (VIEIRA; CARVALHO, 1994). Para o resultado de germinação considerou-se a porcentagem de plântulas normais (somatório de fortes e fracas) e para a classificação do vigor apenas as normais fortes.

O desempenho das plântulas foi avaliado por quatro repetições de 10 sementes, distribuídas em toalhas de papel para a germinação, formando linha única a 10cm da borda superior da folha. As condições foram as mesmas do teste de germinação. Deste material foram analisadas a parte aérea (sem os cotilédones) e a raiz primária, que foram acondicionados e seccionados separadamente em sacos de papel fino e levados para secagem em estufa a 60°C por 48 horas. Posteriormente os materiais foram resfriados em dessecador e pesados em balança analítica com precisão de 0,001g (NAKAGAWA, 1999).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um arranjo fatorial de 4x5 (agentes osmóticos x potenciais hídricos), com quatro repetições. O software SANEST (ZONTA et al., 1984) auxiliou na análise dos dados que consistiu em aplicação do teste F, para a análise de variância regressão polinomial para os níveis de potencial osmótico para cada uma das variáveis fisiológicas estudadas (porcentagem de germinação, classificação de vigor, massa seca da parte aérea e da raiz, massa seca total e relação raiz/ parte aérea).

Para determinar a resposta molecular aos tratamentos foi utilizado o método de extração de proteína e eletroforese. Uma fração de tecido, contituidas de cinco hipocótilos, por repetição, de plântulas normais obtidas no teste de germinação no sexto dia, foram macerados com nitrogênio líquido e colocados em tubos de ensaio com tampão de extração Tris-HCL (0,625 mM) pH 6,8, contendo, 2% duodecil sulfato de

sódio SDS; 20% glicerol e 5% 2-mercaptoethanol na proporção de 1:10 (p:v) de amostra de tecido vegetal para 1 ml de tampão de extração. Os tubos foram agitados e mantidos por, no mínimo, 1 hora em temperatura ambiente e depois aquecidos de 3 a 5 minutos após atingir ebulição. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 9500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi congelado em tubos Eppendorf. As proteínas foram quantificadas de acordo com Bradford (1976), sendo os valores plotados contra uma curva de calibração constituída com albumina bovina a 0,5 g/mL.

A eletroforese foi conduzida de acordo com Laemli (1970) em um sistema composto por um gel de corrida contendo 12,5% de acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), pH 8,8, e um gel de empilhamento com 2,5% de acrilamida-bisacrilamida, pH 6,8 . A corrida de eletroforese SDS-PAGE foi realizada em cuba vertical ligada à fonte elétrica por 30 minutos a 50V e 20mA por 4 horas em condições refrigeradas. O tampão de corrida foi composto de Tris (25 mM) - Glicina (38mM) - SDS (0,7mM), pH8,8. Alíquotas contendo a mesma quantidade de proteína por tratamento foram colocadas por poço. Os géis foram fixados com isopropanol:ácido acético:água (4:1:5) por 30 minutos e permaneceram em solução contendo 2% Coomassie Blue R250 até aparecerem as bandas de proteína. Quando a coloração mostrou-se muito escura o gel foi descolorido com 10% de ácido acético. Posteriormente foi realizado a foto documentação digital feita no transluminador permitindo a captura, visualização e o processamento de imagens de bandas protéicas reveladas nos géis.

A análise do padrão eletroforético de cada tratamento foi feita através de comparação visual e detecção diferencial da presença/ausência de bandas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes concentrações das soluções, nesse estudo, foram empregadas em analogia às condições de campo, e a partir dessa simulação observou-se que a germinação reagiu de maneira diferencial, dependente da concentração de cada soluto (Figura 1A).

Pode-se observar que o manitol manteve a germinação independente do potencial utilizado, assim como em Machado Neto et al. (2006) que, no entanto, observaram aumento de plântulas anormais, fato também ocorrido com Braga et al. (1999). O $MgCl_2$ e o $CaCl_2$ apresentaram ponto de máximo próximos (-0,35 e -0,36MPa respectivamente), todavia, o $MgCl_2$ manteve a germinação no potencial de -1,2MPa, enquanto que neste nível a germinação foi drasticamente menor para o $CaCl_2$ e o NaCl.

O NaCl apresentou um ponto de máxima germinação calculado em -0,25MPa. A partir daí houve redução na germinação, apresentando o menor resultado em -1,2MPa (Figura 1A). Santos et al. (1992) e Braccini et al. (1998) relatam que, em sementes de soja, os estresses causados por NaCl, $CaCl_2$ e Na_2SO_4 , influenciaram negativamente a germinação e o vigor de sementes.

À medida que a restrição hídrica aumentou, o vigor, avaliado por meio da classificação de vigor, foi reduzido (Figura 1B), sendo este mais afetado nos potenciais -0,9 e -1,2MPa, principalmente no osmótico NaCl, corroborando Moraes e Meneses (2003) e Machado Neto et al. (2004). O vigor de plântulas é sempre mais afetado do que a germinação, nesse osmótico, em várias espécies como feijão (Paula et al., 1994), soja (Santos et al., 1996; Machado Neto et al., 2004) e pepino (Torres et al., 2000).

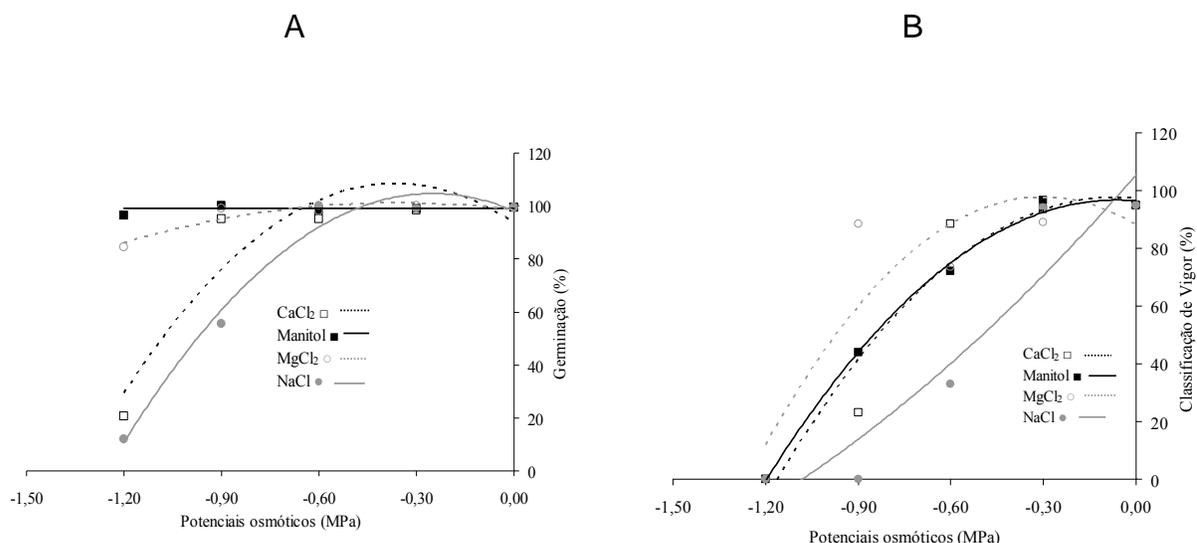


FIGURA 1 - Germinação (A) e classificação de vigor (B) de sementes de feijão em diferentes potenciais osmóticos obtidos através de soluções de manitol, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e cloreto de sódio. Presidente Prudente SP, 2007. Equações obtidas pela análise de regressão: (A) $y(\text{CaCl}_2) = -113,49x^2 - 82,52x + 93,52$ $R^2=0,8682^{**}$; $y(\text{Manitol}) = 99(\text{ns})$; $y(\text{MgCl}_2) = -21,42x^2 - 15,38x + 98,54$ $R^2=0,8550^{**}$; $y(\text{NaCl}) = -104,36x^2 - 52,40x + 98,11$ $R^2=0,9796^{**}$; (B) $y(\text{CaCl}_2) = -82,14x^2 - 11,73x + 97,31$ $R^2=0,9290^{**}$; $y(\text{Manitol}) = -75,0x^2 - 9,16x + 96,5$ $R^2=0,9958^{**}$; $y(\text{MgCl}_2) = -106,74x^2 - 64,59x + 88,08$ $R^2=0,789^{**}$; $y(\text{NaCl}) = 23,8x^2 + 123,23x + 105,48$ $R^2=0,8941^*$

*ou ** desdobramento significativo pelo teste F, sendo * significativo com 5% e ** com 1% de significância; R^2 = coeficiente de determinação de cada equação significativa

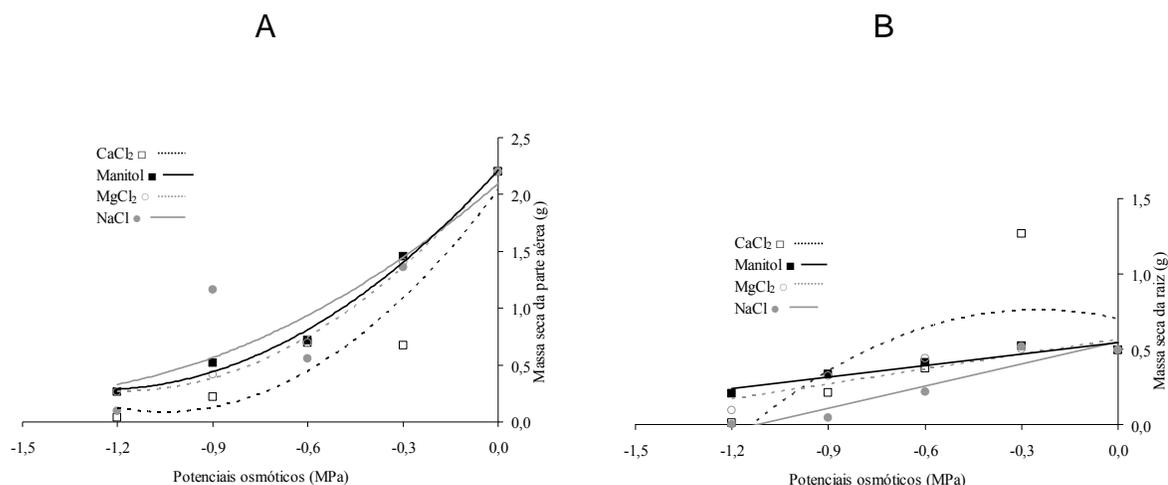


FIGURA 2 - Massa seca da parte aérea (A) e da raiz (B) de feijão em diferentes potenciais osmóticos obtidos através de soluções de manitol, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e cloreto de sódio. Presidente Prudente SP, 2007. (A) $y(\text{CaCl}_2) = 1,7556x^2 + 3,6990x + 2,036$ $R^2=0,9056^{**}$; $y(\text{Manitol}) = 1,21x^2 + 3,061x + 2,2125$ $R^2=0,9925^*$; $y(\text{MgCl}_2) = 1,3736x^2 + 3,2693x + 2,2163$ $R^2=0,9975^{**}$; $y(\text{NaCl}) = 1,557x^2 + 3,671x + 2,23$ $R^2=0,9966^{**}$; (B) $y(\text{CaCl}_2) = -0,9628x^2 - 0,4801x + 0,7033$ $R^2=0,5562^{**}$; $y(\text{Manitol}) = 0,2570x + 0,5469$ $R^2=0,8910^*$; $y(\text{MgCl}_2) = 0,3252x + 0,5653$ $R^2=0,8291^{**}$; $y(\text{NaCl}) = 0,4880x + 0,5476$ $R^2=0,9013^{**}$

*ou ** desdobramento significativo pelo teste F, sendo * significativo com 5% e ** com 1% de significância; (ns) desdobramento não significativo; R^2 = coeficiente de determinação de cada equação significativa

As massas secas de parte aérea e de raiz das plântulas sofreram interferência da diminuição de água. Ambas reduziram-se na presença dos osmóticos, como em Sá (1987), Braccini et al. (1996), Moraes e Menezes (2003), Machado Neto et al. (2004), Costa et al. (2004) e Machado Neto et al. (2006). Em relação à parte aérea, a solução de CaCl₂ no potencial de -0,3MPa, encontraram-se valores menores, quando comparada aos outros osmóticos e potenciais (Figura 2A), ocorrendo o contrário com a massa de raiz no mesmo potencial (Figura 2B), fato relacionado com a concentração de mitoses nas células da raiz, as quais poderiam estar sendo estimuladas pelo cálcio, pois as outras soluções mostraram resultados análogos entre si (Figuras 2A e 2B). Assim, ocorreu uma relação raiz/parte aérea máxima no osmótico CaCl₂, enquanto os demais apresentaram relação estável com o aumento da deficiência de água (Figura 3B). O maior crescimento da raiz em detrimento da parte aérea foi observado

principalmente no potencial -0,3MPa na presença de cálcio. Este íon (Ca^{2+}) pode promover a modulação de processos celulares por meio de proteínas (calmodulinas), as quais por sua vez regulam uma cascata de eventos relacionados com as respostas das plantas a estresse biótico e abiótico (YANG; POOVAIAH, 2002), o que poderia ter potencializado a tendência de crescimento das raízes observada neste trabalho, nos maiores potenciais (-0,3 a -0,9MPa, menor restrição de água).

Ocorreu redução na massa seca total (Figura 3A), da mesma forma que para Moraes e Meneses (2003). A solução contendo NaCl apresentou ponto de mínima calculado de -1,34MPa, enquanto que o manitol, o CaCl_2 e o MgCl_2 tiveram pontos de mínima em potenciais menores (-1,54; -2,03 e -1,61MPa, respectivamente) fato este, relacionado com a salinidade do NaCl (SANTOS et al., 1996, TORRES et al., 2000, MACHADO NETO et al., 2006).

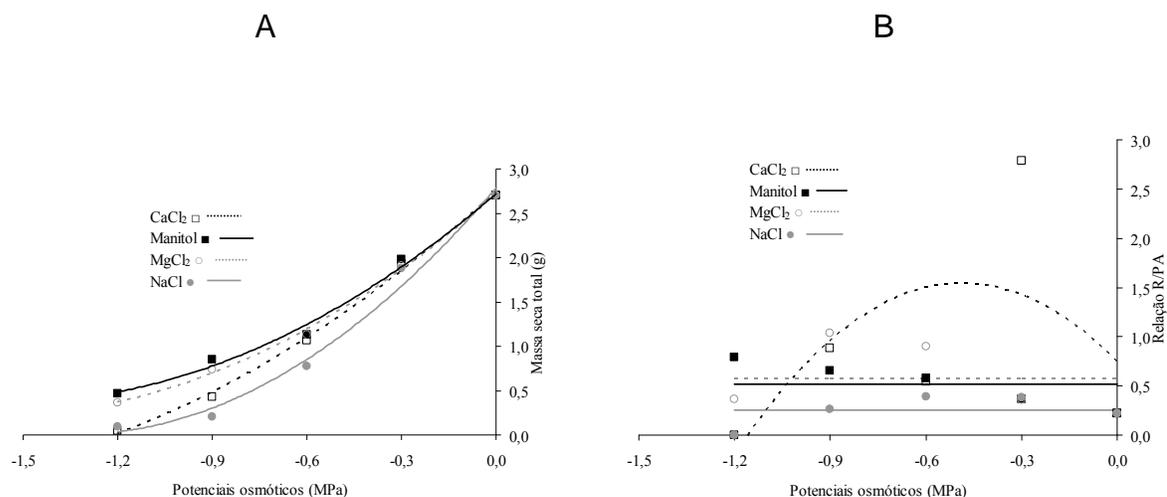


FIGURA 3 - Massa seca total (A) e relação raiz/parte aérea (B) de feijão em diferentes potenciais osmóticos obtidos através de soluções de manitol, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e cloreto de sódio. Presidente Prudente SP, 2007. (A) $y(\text{CaCl}_2) = 0,7928x^2 + 3,2188x + 2,7394$ $R^2=0,9968^{**}$; $y(\text{Manitol}) = 0,9932x^2 + 3,0523x + 2,7195$ $R^2=0,9915^{**}$; $y(\text{MgCl}_2) = 0,9599x^2 + 3,098x + 2,7071$ $R^2=0,9980^{**}$; $y(\text{NaCl}) = 1,5498x^2 + 4,150x + 2,7840$ $R^2=0,9870^{**}$; (B) $y(\text{CaCl}_2) = -3,4285x^2 - 3,3301x + 0,7429$ $R^2=0,3788^{**}$; $y(\text{Manitol}) = 0,5224$ (ns); $y(\text{MgCl}_2) = 0,5766$ (ns); $y(\text{NaCl}) = 0,2517$ (ns) * ou ** desdobramento significativo pelo teste F, sendo * significativo com 5% e ** com 1% de significância; (ns) desdobramento não significativo; R^2 = coeficiente de determinação de cada equação significativa

Padrões de proteínas podem variar no número de bandas apresentadas em cada material ou espécie. Machado Neto et al. (2002) observaram diferentes padrões em espécies de *Brachiaria* variando de 12 bandas em *Brachiaria jubata* para 6 bandas em *B. nigropedata*. Amini et al. (2007) observaram que a mudança no padrão protéico de plântulas de tomate sob estresse salino *in vitro* foi de apenas 5 proteínas pelo SDS-PAGE. Todavia, estes padrões, bem como os presentes no atual trabalho, foram revelados com Coomassie Blue R250, uma técnica que demonstra apenas proteínas em microgramas, o que não significa dizer que apenas estas proteínas estão presentes na amostra (ALFENAS, 1998).

O bandejamento variou de acordo com os osmóticos, mas foi praticamente estável com a diminuição do potencial hídrico. Bandas de proteínas com peso molecular de 120, 100, 70, 50, 20, 15 e 11kDa, extraídas de hipocótilos com seis dias, foram encontradas no potencial 0MPa (água pura, Tabela 2) sendo o padrão protéico de plântulas não estressadas, neste trabalho.

Os tratamentos com manitol e $MgCl_2$ foram iguais nos perfis eletroforéticos, apresentando 16 bandas, as mesmas presentes em plântulas controle (120, 100, 70, 50, 20, 15 e 11kDa) mais as bandas diferenciadoras de 110, 90, 85, 65, 45, 40, 30, 25 e 18kDa (Tabela 2), com correspondência de similaridade no comportamento de germinação (Figura 1A), massa seca de parte aérea e de raiz (Figura 2A e 2B), massa seca total (Figura 3A) e relação raiz/parte aérea (Figura 3B). As proteínas entre 90 e 60 e abaixo de 30kDa parecem ter efeitos tanto de chaperonas como de funções basílares nas células vivas (SCHMITZ et al., 1996; BOSTON et al., 1996; KUMAR et al., 2004). A expressão das proteínas diferenciadoras, algumas descritas como chaperonas, podem ter refletido na melhor resposta fisiológica observada nestes osmóticos, em relação ao $CaCl_2$ e NaCl, como por exemplo, na germinação (Figura 1A) e na massa total de plântulas (Figura 3A) no potencial mais restritivo ao crescimento, -1,2MPa.

As proteínas de 70 e 50kDa foram expressas tanto em água como em condições de estresse. A proteína de 70kDa poderia ser a HSP70 ou a BiP, que funcionaria como chaperona em condições desfavoráveis (KUMAR et al., 2004; KANG et al., 2005).

Houve a detecção de uma banda de 250kDa no tratamento com CaCl_2 , que foi exclusiva dos menores potenciais (-0,9 e -1,2MPa). A banda de 150kDa foi encontrada nos tratamentos contendo CaCl_2 e NaCl (Tabela 2). Bandas de alto peso molecular (HMW – HSP) estão presentes em diversas espécies quando ocorrem estresses (PAREEK et al., 1995; PARK et al., 1996; PRANDL et al., 1998; RISTIC et al., 1998; JOE et al., 2000).

Nas plântulas expostas ao NaCl, não foram encontradas as banda de 110, 30 e 20 kDa e nos tratamentos com CaCl_2 foram suprimidas as bandas de 120, 85, 45 e 40kDa. Para ambos os osmóticos foram suprimidas as bandas de 100, 90, 65, 25, 18, 15 e 11 kDa (Tabela 2).

Como respostas ao estresse, independentemente do osmótico, houve a expressão de 11 bandas sendo elas 250, 150, 110, 90, 85, 65, 45, 40, 30, 25 e 18kDa e a supressão de três bandas do metabolismo normal, em comum, para o CaCl_2 e o NaCl (100, 15 e 11kDa), uma exclusiva para CaCl_2 (120kDa) e outra para o NaCl (20kDa).

Neste trabalho a presença de NaCl inibiu a expressão das bandas de 110, 100, 90, 65 e abaixo de 30kDa, algumas de estresse e outras de metabolismo normal (100, 20 15 e 11kDa) e que poderiam estar relacionadas ao desempenho inferior das sementes em todos os tratamentos contendo este osmótico (Figuras 1, 2 e 3) .

As proteínas de 110 e 30kDa foram expressas em condições de estresse hídrico (manitol, MgCl_2 e CaCl_2), mas não em estresse salino (NaCl) e água, podendo ser consideradas indicadoras de resposta ao estresse hídrico. Em *Cucumis sativus* a expressão de uma proteína de 33,5kDa foi relacionada a tolerância das plântulas ao estresse hídrico e ao frio enquanto a ausência desta foi detectada apenas em plântulas não submetidas aos estresses (KANG et al., 2005). Em arroz, Pareek et al. (1995) detectaram a presença de uma proteína de 104kDa como resposta a diversos estresses, entre estes a salinidade, o que não se verificou neste trabalho. Em plântulas de tomate, cultivado em meio de cultura por 24 dias, em potenciais variando ente -0,17 a -0,67MPa, cinco bandas protéicas foram encontradas, via SDS-PAGE, sendo 30, 62 e 75kDa em raiz e 38 e 46kDa em folhas, em resposta ao aumento de salinidade do meio (AMINI et al., 2007). Neste trabalho foi detectada a expressão de duas proteínas de 45

6 CONCLUSÃO

A simulação de deficiência hídrica, em laboratório, por meio dos osmóticos (manitol, CaCl_2 , MgCl_2 e NaCl), permite a constatação dos efeitos do estresse, em plântulas de feijoeiro, pelo decréscimo dos parâmetros observados, sendo que os tratamentos a base de NaCl foram os mais drásticos.

De acordo com o osmótico empregado, obtiveram-se expressões de proteínas diferentes, tanto de alto e quanto de baixo peso molecular. As bandas de 70 e 50kDa foram sintetizadas em todos os osmóticos empregados nesse trabalho, sugerindo serem proteínas de função celular básica, presentes tanto em estresse hídrico como em condição normal.

A expressão de determinadas bandas é osmótico dependente, mas independente da concentração do mesmo. As proteínas de 110 e 30kDa são indicativas de estresse hídrico, mas não do salino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. 1998.

ALVIN, F. C. et al. Enhanced Accumulation of BiP in Transgenic Plants Confers Tolerance to Waters Stress. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1042-1054, 2001.

AMINI, F. et al. Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 54, p. 464-471, 2007.

ARAÚJO, J. L. S. de; MARGIS-PINHEIRO, M.; RUMJANEK, N. G. **Proteínas de Choque Térmico e Tolerância a Altas Temperaturas em Plantas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 27 p. (Embrapa CNPAB. Documentos, 80).

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

BOSTON. R. S., VIITANEN, V.P.; VIERLING. E. Molecular chaperones and proteins foldins in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 32, p. 191-222, 1996.

BOYER, J. S.. Advances in drought tolerance in plants. **Advances in Agronomy**, v. 56, p. 187-218, 1996.

BRACCINI, A. L. et al. Influência do potencial hídrico induzido por polietilenoglicol na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 9, p. 1451-1459, 1998.

BRACCINI, A. L. et al. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietilenoglicol. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 10-16, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRAGA, L. F. et al. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 95-102, 1999.

BRASIL, Ministério da Agricultura. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 1992. 365 p

BRAY, C. F. Biochemical processes during the osmopriming of seeds. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 767-789.

BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 48-54. 1997.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1035-1040, 1993.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588 p.

CHOU, M.; CHEN, Y. M.; LIN, C. Y. Thermotolerance of isolated mitochondria associated with heat shock proteins. **Plant Physiology**, v. 89, p. 617-21, 1989.

COSTA, P. et al. Estresse hídrico induzido por manitol em sementes de soja de diferentes tamanhos. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 105-113, 2004.

CRAIG, E. A.; GAMBILL, B. D.; NELSON, R. J. Heat Shock Proteins: Molecular Chaperones of Proteins Biogenesis. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p. 402-414, 1993.

DELL'AQUILA, A. Water uptake and protein synthesis in germinating wheat embryos under osmotic stress of polyethylene glycol. **Annals of Botany**, Camberra, v. 69, n. 2, p. 167-171, 1992.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Sistemas de Produção**, Goiânia GO: Embrapa, 2005. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/>>. Acesso em: 02/06/2008.

FEDER, S. E.; O'CONNELL, M. A. Expression of heat shock response in a tomato, interspecific hybrid is not intermediate between the two parental responses. **Plant Physiology**, v. 93, n. 3, p. 1140-1146, 1990.

FONSECA, S. C. L.; PEREZ, S. C. J. G. A. Efeito de sais e da temperatura na germinação de sementes de olho-de-dragão (*Adenanthera pavonina* L. – FABACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 70-77, 1999.

HARBORNE, J. B. Biochemical plant ecology. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (eds.). **Plant Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 501-516

HECKATHORN, S. A. et al. The small, methionine-rich chloroplast heat shock protein protects photosystem II electron transport during heat shock. **Plant Physiology**, v. 116, p. 430-444, 1998.

JINN, T. L. et al. Immunological kinship of Class I low molecular weight heat shock proteins and thermostabilization of soluble proteins in vitro among plants. **Plant Cell Physiology**, v. 34, n. 7, p. 1055-1062, 1993.

JOE, M. K. et al. High temperature stress resistance of *Escherichia coli* induced by a tobacco class I low molecular weight heat-shock protein. **Molecular Cells**, v. 10, p. 519-524, 2000.

JORGENSEN, J. A. et al. Genotypespecific Heat Shock Proteins in two maize inbreds. **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 576-580, 1992.

KANG, H. M.; PARK, K. W.; SALTVEIT, M. E. Chilling tolerance of cucumber (*Cucumis sativus*) seedling radicles is affected by radicle length, seedling vigour and induced osmotic and heat-shock proteins. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 124, p. 485-492, 2005.

KUMAR, V. et al. An alternative agriculture system is defined by a distinct expression profile of select gene transcripts and proteins. **PNAS**, Washington, v. 111, n. 29, p. 10535-10540, 2004.

LAEMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 680-685, 1970.

LIN, C-Y.; ROBERTS, J. K.; KEY, J. L. Acquisition of thermotolerance in soybean seedling, synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. **Plant Physiology**, v. 74, p. 152-160, 1984.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 631-677, 1998.

MACHADO NETO, N. B. Hydric stress induced by mannitol and sodium chloride in soybean cultivars. **Brazilian Archives of biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 4, p. 521-529, 2004.

MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C.; PENICHE, A. G. P. F. *Brachiaria* access germplasm distinction using SDS PAGE. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, p. 1439-1445, 2002.

MACHADO NETO, N. B. et al. Deficiência hídrica induzida por diferentes agentes osmóticos na germinação e vigor de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 142-148, 2006.

MIAN, M. A. R.; NAFZIGER, E. D. S. Seed size and water potential effects on germination and seedling growth of winter wheat. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 1, p. 169-171, 1994.

MORAES, G. A. F.; MENEZES, N. L. Desempenho de sementes de soja sob condições diferentes de potencial osmótico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 219-226, 2003.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados nos desempenhos das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999.

NEPOMUCENO A. L.; STEWART J. M.; OOSTEHUIS D., M.; TURKEY R.; NEUMAIER N.; FARIAS J. R. B.. Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n.7, p. 1407-1416, 2000.

NEPOMUCENO, A. L. Tolerância à Seca em Plantas: Mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia, Ciência e desenvolvimento**. V. 23, p. 12-18, 2001.

PAREEK, A.; SINGLA, S. L.; GROVER A. Immunological evidence for accumulation of two high molecular weight (104 and 90 kDa) HSPs in response to different stress in rice and response to high temperature stress in diverse plant genera. **Plant Molecular Biology**, v. 29, p. 293-301, 1995.

PARK, S-Y. et al. Heat-shock response in heat-tolerance and nontolerant variants of *Agrostis palustris* Huds. **Plant Physiology**, v. 111, p. 515-524, 1996.

PARSELL P. A.; LINDQUIST, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 27, p. 437-496, 1993.

PAULA, S. V. et al. Avaliação de plântulas de feijão como critério para seleção de cultivares tolerantes à salinidade. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 220-224, 1994.

PEREIRA, L. A. G. et al. Efeito da interação de tratamento químico de sementes de soja e níveis de vigor. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 2, p. 159-163, 1981.

PESKE, S. T.; DELOUCHE, J. C. Semeadura de soja em condições de baixa umidade do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 69-85, 1985.

PRANDL, R. et al. HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. **Molecular General Genetics**, v. 258, n. 3, p. 269-278, 1998.

RISTIC, Z.; GIFFORD, D. J.; CASS, D. D. Heat Shock Proteins in two lines of *Zea mays* L. that differ in drought and heat response. **Plant Physiology**, v. 97, p. 1430-1434, 1991.

RISTIC, Z. et al. Evidence of association between specific heat-shock protein(s) and the drought and heat tolerance phenotype in maize. **J. Plant Physiology**, v. 153, p. 497-503, 1998.

RIZZO, M. et al. Increased expression of HDJ-2 (heat shock protein 40) and heat shock protein 70 in biopsy specimens of transplanted human lungs. **Jounal Heart Lung Transplant**, v. 17, n. 3, p. 341-349, 1998.

ROSSETO, C. A. V. et al. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato, da qualidade fisiológica e do teor de água inicial das sementes de soja no processo de germinação. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 1/2, p. 97-105, 1997.

SÁ, M.E. **Relações entre qualidade fisiológica e disponibilidade hídrica e desempenho de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1987. 147 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo - ESALQ/USP, Piracicaba – SP.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4.ed. Belmont: Wadworth, 1991. 682 p.

SANTOS, V .L. M. et al. Efeito do estresse salino e hídrico na germinação e vigor de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 189-194, 1992.

SANTOS, V. L. M. et al. Utilização do estresse salino na qualidade das sementes de genótipos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 83-87, 1996.

SCHIRMER, E. C.; LINDQUIST, S.; VIÉRLING, E. An *Arabidopsis* heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. **The Plant Cell**, v. 6, p. 1899-1909, 1994.

SCHMITZ, G.; SCHMITZ, M.; FEIRABEND, J. Characterization of a plastid-specific HSP90 homologue: identification of a cDNA sequence, phylogenetic descendance and analysis of its mRNA and proteins expression. **Plant Molecular Biology**, v. 30, p. 479-492, 1996.

SILVA, W. R.; MARCOS FILHO, J. Avaliação da embebição e do desenvolvimento inicial das estruturas embrionárias de sementes de milho submetidas a diferentes potenciais hídricos. **Scientia Agricola**, v. 47, p. 335-359, 1990.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719 p.

TORMENA, C. A. et al. Intervalo ótimo de potencial da água no solo: um conceito para avaliação da qualidade física do solo e manejo da água na agricultura irrigada. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 3, n. 3, p. 286-292, 1999.

TORRES, S. B.; VIEIRA, E. L.; MARCOS-FILHO, J. Efeitos da salinidade na germinação e no desenvolvimento de plântulas de pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 39-44, 2000.

Van DER MOEZEL, P. G.; BELL, D. T. The effect of salinity on the germination of some Western Australian *Eucalyptus* and *Melaleuca* species. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 15, n. 1, p. 239-246, 1987.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. de. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994, 164 p.

VIERLING, E. The role of Heat Shock Proteins in Plants. **Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology**, v. 42 p. 579-620, 1991.

WATERS, E. R., LEE, G. J.; VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 47, p. 325-338, 1996.

WENG, J. NGUYEN, H. T. Differences in the heat-shock response between thermotolerant and thermosusceptible cultivars of hexaploid wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 84, p. 941-946, 1992.

WOOD, C. K.; PRATT, J. R.; MOORE, A. L. Identification and characterisation of cultivar-specific 22 kDa heat shock proteins from mitochondria of *Pisum sativum*. **Physiology Plant**, v. 103, p. 369-376, 1998.

Wu, D. H., Laidman, D. L.; Smith, C. J. Heat Shock Protein 70 Levels in Temperature Stressed Mung Bean Shoots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford v, 44, n. 259, p. 457-461, 1993.

YANG, T.; POOVAIAH, B. W. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalases by calcium/calmodulin. **PNAS**, Washington, v. 99, n. 6, p. 4097-4102, 2002.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. D.; SILVEIRA Jr., P. **Sistemas de análise estatística para microcomputadores** - SANEST. Pelotas: UFPel, 1984. (Registro SEI no06606-0, Categoria AO).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)