



**NATÁLIA CRISTINA NOGUEIRA SILVA**

**ANÁLISE PROTEÔMICA EM SEMENTES  
CONDICIONADAS DE EUCALIPTO  
SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**NATÁLIA CRISTINA NOGUEIRA SILVA**

**ANÁLISE PROTEÔMICA EM SEMENTES CONDICIONADAS DE  
EUCALIPTO SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa da Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Anderson Cleiton José

Coorientador

Dr. José Marcio Rocha Faria

**LAVRAS – MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Silva, Natália Cristina Nogueira.

Análise proteômica em sementes condicionadas de eucalipto submetidas a estresse salino / Natália Cristina Nogueira Silva. – Lavras : UFLA, 2014.

86 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Anderson Cleiton José.

Bibliografia.

1. Condicionamento fisiológico. 2. Estresse abiótico. 3. Proteínas. 4. Eucalyptus urophylla. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.9562

**NATÁLIA CRISTINA NOGUEIRA SILVA**

**ANÁLISE PROTEÔMICA EM SEMENTES CONDICIONADAS DE  
EUCALIPTO SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa da Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de junho de 2014.

Dr. José Marcio Rocha Faria                      UFLA

Dr. Renato Mendes Guimarães                      UFLA

Dr. Anderson Cleiton José  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2014**

## AGRADECIMENTOS

A pesquisa exige dedicação e persistência. Não é fácil nos depararmos com imprevistos e resultados inesperados. Mas estamos sujeitos a isso se buscamos o novo, o enriquecimento e o conhecimento. Por isto agradeço a Deus, que me fortaleceu em cada dificuldade e me permitiu prosseguir. Agradeço também por Ele colocar pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais não teria conseguido.

Agradeço aos doutores Anderson e José Márcio pela orientação, disponibilidade e exemplos de profissionalismo.

À doutora Olivia pelas instruções e amizade.

Ao Raniere, Wilson e a Rafaela (com carinho, Rafasguela), que me auxiliaram diretamente nos experimentos, com dedicação e responsabilidade, dividindo o trabalho e os sentimentos.

Agradeço imensamente aos meus pais, Lizete e Antônio Claret, pelas orações, torcida, incentivo e força. É bom saber que eles acreditam em mim, mesmo quando, por algum momento, deixo de crer.

Ao meu noivo, Nilziano, pela amizade, companheirismo e carinho. Obrigada pelo incentivo e força em todos os momentos.

Aos colaboradores, Fabrício Silva, Rodrigo Reis e Professor Paulo Bola, que me receberam e me auxiliaram da melhor forma possível, dividindo seus conhecimentos e contribuindo para realização deste trabalho.

À professora Dulce e seus orientados, que recebem e auxiliam os alunos do LSF, e que permitem que seu laboratório seja quase uma extensão do laboratório de biotecnologia florestal.

A todos os colegas de laboratório: Ezequiel, Túlio, Janice, Pauliana, Tati, Luiz, Andreza, Francesca, Cris e Josina. Levarei boas lembranças.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal e à UFLA, pelo apoio e empenho em fazer os alunos crescerem juntamente com o curso.

A todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, com uma palavra de apoio ou gesto, meus sinceros agradecimentos e minhas desculpas se, por uma desatenção, não os citei.

A todos minha gratidão.

## RESUMO

O condicionamento fisiológico é uma importante técnica que induz maior tolerância das sementes a estresses abióticos como o estresse hídrico, salino, oxidativo e aquele causado por temperaturas extremas. Estes estresses possuem, muitas vezes, vias de sinalização e respostas celulares semelhantes. Assim, o condicionamento ao ativar uma dessas vias, favorece uma resposta de defesa e tolerância das sementes a um estresse posterior de forma mais rápida e intensa. Objetiva-se com este trabalho induzir maior tolerância de sementes de *Eucalyptus urophylla* e do híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* ao estresse salino através do condicionamento osmótico realizado com PEG. Para isto, foi testado dois potenciais de condicionamento, -1,0 e -1,5 MPa por dois períodos, 1 ou 3 dias. Posteriormente as sementes foram colocadas para germinar em estresse salino em solução de NaCl nos potenciais 0,0 (controle)-0,5, -0,75 e -1,0 MPa a 25°C com luz constante. Como *E. urophylla* mostrou-se mais tolerante ao estresse salino, apresentando maiores porcentagens de germinação em todos os potenciais testados, e o osmocondicionamento a -1,0 MPa por três dias foi o mais indicado para induzir maior tolerância à germinação sob estresse mais severo (-1MPa), tais tratamentos foram selecionados para avaliação proteômica. Proteínas totais foram extraídas e separadas pelo método de eletroforese em gel bidimensional dos tratamentos compostos por: sementes secas, sementes condicionadas a -1,0 MPa por três dias, sementes em processo de germinação em água por 6h, sementes em processo de germinação em -1,0MPa de NaCl por 6h, sementes em processo de germinação em água por 6h após o condicionamento e sementes em processo de germinação em -1,0MPa de NaCl por 6h após condicionamento. O perfil proteômico revelou a presença de cerca de 415 pontos de proteínas nos géis corados com azul de Coomassie, dos quais foram selecionados 21 pontos diferencialmente expressos. Tais proteínas podem estar relacionadas com as proteínas de reserva ou com a quebra destas, com o reparo ou defesa de danos celulares, envolvidas no ciclo celular, dentre outras.

Palavras-chave: Condicionamento fisiológico. Estresse abiótico. Proteínas. *Eucalyptus urophylla*.

## OVERVIEW

The physiological conditioning is an important technique which induces greater tolerance of seeds to abiotic stresses such as hydric, salt, oxidative, as well as that caused by extreme temperatures. The signalling pathways and cellular responses of these kind of stresses are often similar. Then, when activating one of these pathways, the conditioning favours a defense response and tolerance of seeds to a subsequent stress in a quick and intense way. In this work, we aimed to induce greater tolerance of seeds of *Eucalyptus urophylla* and of the hybrid *E. urophylla* x *E. grandis* to salt stress through osmotic conditioning performed with polyethylene glycol. We tested two osmotic potentials (-1.0 and -1.5 Mpa) for 1 and 3 days. Subsequently, seeds were germinated under salt stress in NaCl solution at potentials of 0.0 (control), -0.5, -0.75 and -1.0 Mpa at 25°C under constant light. The treatment of *E. urophylla* was found to be more tolerant to salt stress, showing higher germination percentages under all tested potentials. In addition, the osmotic conditioning at -1.0 Mpa for three days was found to be the most indicated to induce greater tolerance to germination under the most acute stress. Thus, these treatments were selected for proteomic analysis. Total proteins were isolated and separated by the 2D gel electrophoresis from the following six samples: one of dry seeds, one of seeds conditioned at -1.0 Mpa for three days, and four of seeds in the germination process (in water and at -1.0 Mpa in NaCl, these for 6 hours and for 6 hours after conditioning). The proteomic profile revealed the presence of around 415 protein spots into gels stained using Coomassie brilliant blue, from which 21 spots differentially expressed were selected. Such proteins may be associated with reserve proteins or breaking of these proteins, with the repair or defense of cellular damages, involved in cell cycle, among others.

Key-words: Physiological conditioning. Abiotic stress. Proteins. *Eucalyptus urophylla*.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO ..... 9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA ..... 12</b>
<b>2.1</b>	<b>A cultura do Eucalipto ..... 12</b>
<b>2.2</b>	<b>Fatores que afetam a germinação ..... 13</b>
<b>2.3</b>	<b>Condicionamento fisiológico de sementes ..... 14</b>
<b>2.4</b>	<b>Efeitos do estresse na germinação e no desenvolvimento de plantas ..... 17</b>
<b>2.5</b>	<b>Análise proteômica ..... 18</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Primeira dimensão (focalização isoeletrica) ..... 19</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Segunda dimensão (Eletroforese em gel de poliacrilamida- SDS/PAGE) ..... 21</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Uso da proteômica no estudo de sementes ..... 21</b>
	<b>REFERÊNCIAS ..... 23</b>
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS ..... 29</b>
	<b>ARTIGO 1 Influência do condicionamento osmótico na tolerância ao estresse salino em sementes de eucalipto ..... 29</b>
	<b>ARTIGO 2 Análise proteômica em sementes de eucalipto durante a germinação e condicionamento ..... 53</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

As espécies de eucalipto são as mais plantadas no território brasileiro, responsáveis por 69,6% da área total com florestas plantadas no Brasil (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS -ABRAF, 2012) com sua produção voltada principalmente para a celulose e papel, painéis com madeira reconstituída, geração de energia, biorredutor na siderurgia, serraria e laminados. Esta multiplicidade de usos exige variabilidade genética suficiente para atender as demandas para múltiplos usos, e para tolerarem condições de estresse ambiental, como frio, seca, pragas e doenças. Isto só é possível através de programas de melhoramento que associam o gerenciamento da variabilidade genética (melhoramento clássico) com a biotecnologia (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS, 2011).

Uma técnica amplamente estudada em tecnologia de sementes com o objetivo de melhorar a germinação e induzir a tolerância a estresses é o condicionamento fisiológico. Ela consiste na limitação da embebição das sementes durante a germinação, controlando-se a quantidade de água disponível ou o período de embebição (SOEDA et al., 2005). Esta entrada de água de forma lenta e limitada permite que o metabolismo da germinação seja ativado sem, contudo, permitir a protrusão da radícula. Acredita-se que a semente receba este estímulo como um estresse, e ativa mecanismos de adaptação que permitirão tolerar condições adversas posteriores, tais como salinidade, déficit hídrico, e estresse térmico.

Fatores estressantes podem, em função de sua intensidade e duração, limitar severamente a germinação das sementes e o estabelecimento das plântulas, levando à morte, ou acionar mecanismos de proteção e reparo,

permitindo a aclimação àquele ambiente. A aclimação ao estresse de uma planta se dá por profundas mudanças na expressão gênica, que resultam em mudanças no transcriptoma, proteoma e metaboloma (KOSOVA et al., 2011). As matrizes que apresentam esta característica de aclimação e tolerância são de interesse para seleção de clones, formação de híbridos ou para a biotecnologia e transformação genética.

A biotecnologia integra a genética molecular com a propagação clonal, o melhoramento clássico e a silvicultura. Embora a seleção por características fenotípicas tenha contribuído de forma expressiva para o melhoramento florestal, as técnicas biotecnológicas vieram juntar-se ao melhoramento genético convencional, permitindo a obtenção de genótipos com maior produtividade e qualidade (SARTORETO; SALDANHA; CORDER, 2008).

Os projetos genoma, apesar de grande contribuição, apresentam limitações, sendo imprescindível sua integração com outras técnicas que permitam compreender os processos de regulação gênica tanto na transcrição quanto na tradução em proteínas.

A análise proteômica se destaca em relação a de transcriptoma pois as proteínas são as responsáveis diretas pelas respostas ao estresse da planta, abrangendo não apenas enzimas que catalisam mudanças a níveis de metabólitos, mas componentes de transcrição e da maquinaria de tradução que também regulam a resposta ao estresse de plantas a níveis de transcrição e de proteínas (KOSOVÁ et al., 2011). Diversos trabalhos investigaram mudanças no proteoma em sementes durante o desenvolvimento, maturação, dessecação ou expondo-as a condições ambientais adversas (GALLARDO et al., 2001, 2003; JOSÉ et al., 2011; SOEDA et al., 2005). A análise do proteoma durante o condicionamento fisiológico permite, além de caracterizar o processo de germinação das sementes, conhecer as mudanças proteômicas que acompanham o aumento de sua tolerância a estresses.

A caracterização do proteoma de um organismo tem se tornado cada vez mais fácil de realizar devido à integração de quatro ferramentas: 1) a ampliação das bases de dados, que oferecem um catálogo completo de todas as proteínas expressas em organismos para os quais os bancos de dados são disponíveis; 2) avanços na técnica de espectrometria de massa (MS), fornecendo um instrumento altamente sensível na análise de biomoléculas; 3) desenvolvimento de *softwares* especializados que podem combinar os dados obtidos da MS com sequências de proteínas específicas em bancos de dados e 4) a separação analítica de proteínas, no qual se destaca a SDS-PAGE bidimensional (2D-SDS-PAGE) como a melhor técnica de separação de proteínas e mais amplamente associada à análise proteômica, pois oferece maior resolução (LIEBLER, 2002).

Assim, o estudo do proteoma de um organismo complementarará os dados gerados pela genômica e a transcriptômica, representando uma ponte entre os genes e sua função em várias espécies modelo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura do Eucalipto

As primeiras plantações de eucalipto no Brasil com fins industriais e caráter florestal devem-se ao Dr. Edmundo Navarro de Andrade que, em 1904, instalou os primeiros experimentos de natureza silvicultural, no qual as espécies de eucalipto se sobressaíram em relação às demais espécies testadas (MORA; GARCIA, 2000).

Os reflorestamentos estabelecidos inicialmente no Brasil, não apresentaram boa produtividade, o que segundo Bertola (2011), foi resultado de falhas ocorridas na implantação e manejo e, que em razão do estresse fisiológico a que estavam submetidos, houve grande disseminação de pragas e doenças.

Em seu *habitat* de origem, o eucalipto adaptou-se a solos com baixa fertilidade e a ambientes secos. Para os especialistas, isso ajuda a explicar a resistência, rápido crescimento e capacidade de recuperação dessas espécies mesmo sob condições ambientais desfavoráveis (BERTOLA, 2011).

Por ser uma árvore de rápido crescimento, fácil adaptação às diferentes condições de solo e clima e de múltiplos usos de sua madeira, o plantio do eucalipto é, portanto, uma solução para diminuir a pressão sobre as florestas nativas, viabilizando a produção de madeira para atender às necessidades da sociedade em bases sustentáveis (MORAES, 2011). Além disso, o melhoramento genético e os cruzamentos direcionaram-se para a obtenção de espécies e híbridos mais resistentes às condições ambientais adversas.

Desta forma, o estudo de sementes de espécies florestais geneticamente melhoradas e/ou que se desenvolveram em um ambiente relativamente seco, adaptando-se a condições de estresse hídrico, como o eucalipto, é uma

importante ferramenta para compreensão dos mecanismos relacionados com a tolerância ao déficit hídrico.

## **2.2 Fatores que afetam a germinação**

A germinação pode ser definida como o evento que se inicia com a absorção de água pela semente (embebição) e termina como início do alongamento do eixo embrionário (BEWLEY; BLACK, 1994). Em geral, sementes maduras e secas, e em condições ideais de disponibilidade de água apresentam padrão trifásico de embebição. A fase I consiste em uma rápida absorção de água devido à reidratação das matrizes, um processo puramente físico, que leva a um rápido aumento do peso fresco da semente. Nesta fase há intensa lixiviação de solutos, pois a membrana fosfolipídica transita do estado de gel para o estado hidratado líquido cristalino, que irá reduzir o extravazamento de solutos. Esta reintrodução de água permite uma rápida retomada das atividades metabólicas e das atividades respiratórias, reparo de mitocôndrias, síntese de proteínas (através de mRNA pré-existente), reparo do DNA e início da mobilização das substâncias de reserva. Na fase II há estagnação do ganho de peso sendo que a semente mantém o nível de hidratação atingido no final da fase I. Nesta fase o metabolismo da semente encontra-se ativo, porém, não há expansão nem divisão celular. A fase II é marcada pela síntese de novos mRNAs, em função dos estímulos ambientais, e intensa mobilização de reservas armazenadas durante a maturação das sementes. A fase III é marcada pela retomada na absorção de água, resultando em um pronunciado aumento no peso fresco, expansão celular e crescimento da raiz primária (BEWLEY, 1997).

A germinação das sementes é afetada pelas condições de temperatura, luz e disponibilidade de água (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; YANG et al., 2010), sendo a água um dos principais fatores limitantes para a germinação

de sementes não dormentes, afetando a percentagem, a velocidade e a uniformidade do processo germinativo (MARCOS FILHO, 2005).

As sementes em situação de estresse ambiental podem, em função da intensidade e do tempo de exposição ao estresse, não resistir e morrerem, ou acionar mecanismos de proteção e reparo, levando-as à adaptação àquele ambiente. Assim, uma semente com privação de água pode sofrer danos reversíveis que podem ser reparados, de modo que a função e a viabilidade são mantidas (eustresse) ou danos irreversíveis, resultados da falha dos mecanismos de reparação, podendo levar à sua morte (distresse) (KRANNER et al., 2010). Existem algumas técnicas que induzem a tolerância ao estresse hídrico, no qual se pode destacar o condicionamento fisiológico.

### **2.3 Condicionamento fisiológico de sementes**

Condicionamento fisiológico de sementes ou *priming* é um tratamento pré-germinativo que envolve a limitação do período de embebição ou da quantidade de água disponível para a semente, sob determinada temperatura (SOEDA et al., 2005). Apesar de não atingir um nível mínimo de umidade para possibilitar a germinação, o metabolismo da semente pode ser ativado (BORGES et al., 1991), ou seja, o tratamento não permite a emergência da radícula, o que garante a manutenção da tolerância à dessecação, que será necessária para posterior secagem, armazenamento e comercialização das sementes (GALLARDO et al., 2001; SOEDA et al., 2005).

Dentre as vantagens do condicionamento fisiológico, destacam-se: sincronia e aceleração da germinação (ESKANDARI; KAZEMI, 2011; SADEGHI et al., 2011), redução de injúrias durante a embebição (JAMIL et al., 2009), quebra de dormência (ANESE et al., 2011) e a indução de tolerância a estresses hídrico, salino (ANOSHEH; SADEGHI; EMAM, 2011) e térmico em

sementes (PATANE et al., 2008) e mudas (FAROOQ et al., 2009). Sánchez, Orta e Muñoz (2001) acrescentam ainda como resultado do tratamento de condicionamento, a recuperação do vigor, incremento da longevidade durante o armazenamento e a expressão fenotípica das plantas, resultado das adaptações às condições de estresse ambiental a que foram expostas. Por outro lado, Soeda et al. (2005) alertam que o condicionamento pode reduzir a longevidade de sementes, mas que esta pode ser parcialmente restaurada por uma posterior secagem lenta. Buttler et al. (2009) corroboram tais informações através de estudo com *Digitalis purpurea*, no qual concluem que tratamentos de *priming* seguidos por desidratação têm potencial para a regeneração de sementes mantidas em bancos de sementes.

As técnicas de condicionamento fisiológico podem ser agrupadas em duas categorias, de acordo com a absorção de água: sistema de absorção de água não-controlado (método em que a água está disponível livremente e não restrita pelo ambiente) e sistema controlado (métodos que regulam a umidade das sementes impedindo a conclusão de germinação) (TAYLOR et al., 1998). Para impedir a germinação das sementes no primeiro sistema, o processo deve ser detido em um momento específico para impedir o início da fase 3 (SOEDA et al., 2005; TAYLOR et al., 1998).

Marcos Filho (2005) cita, como métodos de condicionamento fisiológico o hidrocondicionamento, o matricondicionamento, o osmocondicionamento e o método do tambor. Jisha, Vijayakumari e Puthur (2013) descrevem outros métodos além destes, como condicionamento com nutrientes, condicionamento hormonal, condicionamento redox, condicionamento químico, condicionamento com fungicidas e biocondicionamento. Eles relatam ainda que a efetividade dos diferentes métodos podem variar com os estresses em que as sementes são submetidas e entre as espécies.

O condicionamento osmótico ou osmocondicionamento é o método mais comum dentre os métodos de condicionamento fisiológico e consiste no controle da embebição das sementes através do potencial osmótico da solução, permitindo a hidratação até que os potenciais osmóticos das sementes e da solução atinjam o equilíbrio. Isto ativa processos bioquímicos preparatórios para a germinação, mas não permite que a mesma ocorra (MARCOS FILHO, 2005). Soeda et al. (2005) observaram que alguns genes regulados durante a germinação em água são também ativados durante o osmocondicionamento, confirmando a hipótese de que osmocondicionamento inicia alguns processos relacionados com a germinação.

Alguns fatores influenciam o efeito do condicionamento osmótico, dentre os quais se pode citar a temperatura, a concentração da solução (potencial osmótico), duração do tratamento, a intensidade de luz e o método e período de secagem após o tratamento (SANTOS et al., 2008). A duração do tratamento é importante, devendo impedir a conclusão da germinação em um período que garanta o máximo efeito do condicionamento fisiológico (JOSÉ; VIEIRA; GUIMARÃES, 2000).

Sais inorgânicos, manitol, glicerol ou polietilenoglicol (PEG) podem ser usados para diminuir o potencial osmótico da solução, e com isto, realizar a hidratação controlada das sementes (MARCOS FILHO, 2005; TAYLOR et al., 1998). Como o polietilenoglicol (PEG) é um polímero de elevado peso molecular, inerte, não tóxico e não penetra nas células das sementes (MARCOS FILHO, 2005), a maioria dos estudos tem utilizado esse composto para simular e promover condições controladas de disponibilidade de água para a germinação (HARDEGREE; EMMERICH, 1990).

Chen e Arora (2011) explicam que o baixo potencial hídrico das soluções osmóticas durante o condicionamento são percebidos pelas sementes como um estresse moderado que induz mecanismos de proteção e reparo,

resultando em uma “memória de estresse” que permite à semente tolerar um estresse posterior. Os mecanismos de resposta induzidos durante o condicionamento osmótico foram discutidos em diversos trabalhos e incluem: eventos bioquímicos e moleculares, como a síntese de proteínas (CHEN; FESSEHAIE; ARORA, 2012; GALLARDO et al., 2001; KAUSAR et al., 2009) aumento da síntese de antioxidantes (CHEN; ARORA, 2011), expressão de genes e aumento da síntese de novos RNAs, relacionados com o aumento da tolerância ao estresse (SCHWEMBER; BRADFORD, 2010; SOEDA et al., 2005).

#### **2.4 Efeitos do estresse na germinação e no desenvolvimento de plantas**

As plantas, ao se aclimatarem a um determinado estresse, desencadeiam uma cascata ou rede de eventos que começam com a percepção do estresse e terminam com a expressão de diversos genes específicos (PASTORI; FOYER, 2002). Estes genes ativados durante a exposição a determinado estresse também são responsivos a outros tipos de estresse (FOOLAD et al., 2003; JISHA; VIJAYAKUMARI; PUTHUR, 2013). Como as plantas fazem uso de vias e compostos comuns na relação estresse-resposta, essas são capazes de se adaptarem ou aclimatarem a uma gama de diferentes estresses após exposição a um estresse específico, fenômeno este definido por Pastori e Foyer (2002) como “Tolerância Cruzada”. Neste contexto Zhu (2001) descreve que as respostas da planta às condições de estresse hídrico e salino são intimamente relacionadas e seus mecanismos se sobrepõem, ativando vias de homeostase iônica e osmótica e de controle de danos e reparos. Em diversos trabalhos foram demonstrados os efeitos da tolerância cruzada, como o apresentado por Custódio et al. (2009), no qual sementes de feijão que passaram por tratamentos de choque térmico apresentaram maior tolerância ao estresse hídrico durante a germinação. Neste

contexto, Zhuo et al. (2009) verificaram que o condicionamento osmótico reduziu a sensibilidade de sementes de soja ao frio e promoveu mudanças na função da membrana plasmática, através de melhoras nas atividades de ATPase e da enzima tirosina fosfatase.

O melhoramento de plantas tem demonstrado consistentemente que a tolerância ao estresse tem natureza multigênica, isto é, o vigor de uma planta ao longo de um intervalo de condições ambientais é governada por múltiplos loci (PASTORI; FOYER, 2002). Os mesmos autores constataram que em *Arabidopsis*, elementos cis e proteínas de ligação correspondentes estão relacionadas tanto com a tolerância à seca quanto a baixas temperaturas.

Diversos trabalhos investigam a expressão gênica em sementes submetidas ao condicionamento fisiológico, como uma forma de estudo dos genes e proteínas relacionados com os benefícios do tratamento, como a tolerância à deficiência hídrica e estresse salino e incremento do vigor. Yacoubi et al. (2011) analisaram as mudanças do proteoma em sementes de *Medicago sativa* L. para caracterizar as alterações das proteínas durante a germinação e o osmocondicionamento destas sementes. A análise comparativa do proteoma revelou que a germinação foi acompanhada por mudanças dinâmicas de 79 proteínas, envolvidas principalmente na estrutura celular, metabolismo e defesa. Sementes em processo germinativo, que haviam passado por condicionamento, apresentaram uma maior expressão de proteínas da família das HSPs, tiorredoxinas, peroxirredoxinas, lipoxigenase e manganês superóxido-dismutase.

## **2.5 Análise proteômica**

Uma técnica poderosa e de alto rendimento que permite analisar a expressão de muitos genes é a análise proteômica (SOEDA et al., 2005). A proteômica é o estudo do conjunto de proteínas presentes em uma célula em uma

determinada situação (BALBUENA et al., 2011). Os estudos do proteoma, juntamente com os estudos do transcriptoma, são partes da análise genômica funcional, que consistem em sondagem das sequências genômicas quanto à identificação de genes, reconhecimento de sua organização e compreensão de sua função (PIERCE, 2004). Os principais objetivos da análise proteômica são o estudo funcional de proteínas e seu envolvimento em vias celulares, geração de conhecimento sobre as vias de sinalização celular e o de proteínas regulatórias, identificação, quantificação e estudo de modificações pós-traducionais de proteínas na célula, tecidos ou organismo sob uma dada condição fisiológica e geração de informações sobre estados fisiológicos e fisiopatológicos de células ou organismos (BALBUENA et al., 2011).

Dentre os principais métodos para a separação do complexo de proteína, cita-se os métodos baseados em gel 2D-SDS/PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em duas dimensões), em que a primeira dimensão geralmente é realizada por focalização isoelétrica e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida na presença de SDS, e os métodos que não utilizam gel, em que a separação pode ser feita diretamente pela ligação em série de um HPLC ao espectrômetro de massa (BAGGERMAN et al., 2005).

### **2.5.1 Primeira dimensão (focalização isoelétrica)**

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em duas dimensões foi descrita pela primeira vez por O'Farrell (1975). A individualização de proteínas através desta técnica baseia-se na separação em duas dimensões, sendo a primeira dimensão geralmente realizada pela separação das proteínas pela carga, pelo método de Focalização Isoelétrica (IEF), e, na segunda dimensão, através de suas massas moleculares (SDS-PAGE) (AGRAWAL et al., 2005).

Para compreender o princípio do método da Focalização Isoelétrica, é necessário entender as características das proteínas.

As proteínas são compostas de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, para formar cadeias polipeptídicas, sendo que uma proteína pode consistir de uma ou mais cadeias polipeptídicas (PIERCE, 2004). Os aminoácidos são substâncias orgânicas com moléculas compostas por um grupo amina ( $\text{NH}_2$ ), que confere propriedades básicas aos aminoácidos, e um grupo carboxila ( $\text{COOH}$ ), que confere propriedades ácidas. O que diferencia os 20 aminoácidos conhecidos é o radical associado ao carbono do grupo amina. A ligação peptídica se dá através da ligação entre um carbono do grupo ácido de um aminoácido com o nitrogênio de outro aminoácido. Em meio ácido, os aminoácidos tendem a aceitar prótons, comportando-se como base e adquirindo carga positiva - ionizam em seus radicais amina, enquanto que em meio básico, os aminoácidos tendem a doar prótons, comportando-se como ácidos e adquirindo carga negativa - ionizam-se em seus radicais carboxila. Assim, o valor de pH em que as cargas elétricas do aminoácido se igualam e se anulam chama-se ponto isoelétrico ou pH isoelétrico (CAMPBELL, 2000).

Atualmente a primeira dimensão de separação de proteínas é realizada em tiras com gradiente de pH imobilizado (IPG), garantindo maior eficiência à técnica (THELEN, 2007). Os peptídeos fora do alcance movimentam-se pela tira, até encontrar o equilíbrio através de seu ponto isoelétrico (pI). Uma vantagem importante da utilização de tecnologia de IPG em géis de focalização isoelétrica é que o gradiente de pH nas tiras fabricadas é conhecido e altamente reprodutível, tornando os intervalo de pI muito precisos (CARGILE et al., 2005).

### **2.5.2 Segunda dimensão (Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS/PAGE)**

Esta consiste em separar as proteínas de acordo com o tamanho (THELEN, 2007). O método de separação baseia-se na ligação do detergente SDS (dodecil sulfato de sódio) à proteína, conferindo-lhe carga negativa (a partir do grupo sulfato do SDS) numa proporção aproximadamente constante ao peso molecular. Quando o gel é submetido à alta tensão, os complexos de proteína-SDS migram através do gel de poliacrilamida em taxas com base na sua capacidade de penetrar a matriz de poros do gel. As proteínas são assim individualizadas em bandas (pontos) em função do seu peso molecular (LIEBLER, 2002).

Para visualização das proteínas no gel, os corantes mais comumente usados em estudos de proteômica de plantas são o Coomassie Brilliant Blue (CBB), CBB coloidal ou nitrato de prata (AGRAWAL et al., 2005).

### **2.5.3 Uso da proteômica no estudo de sementes**

A análise proteômica pode ser usada para estudos de eventos fisiológicos tais como a maturação, germinação ou durante o condicionamento de sementes (SOEDA et al., 2005).

As melhorias nas técnicas de eletroforese de gel bidimensional (2D-PAGE) e avanços na espectrometria de massa permitem melhor análise e quantificação das proteínas nos géis (GALLARDO et al., 2001). Além disso, o sequenciamento do genoma de espécies florestais, como o ocorrido para *Eucalyptus grandis*, faz da proteômica uma técnica muito promissora, permitindo aliar os conhecimentos gerados pela genômica estrutural com a genômica funcional. Os avanços nos estudos genômicos para a espécie permitem

então um alinhamento destas informações com aquelas geradas pela espectrometria de massa.

Diversos trabalhos usaram desta técnica para avaliar e quantificar a presença de proteínas durante o desenvolvimento, maturação e dessecação de sementes, ou expondo-as a condições ambientais adversas. Gallardo et al. (2001) procederam a análise proteômica em sementes de *Arabidopsis* durante tratamentos de condicionamento fisiológico e verificaram um aumento contínuo de subunidades de tubulina e de proteínas isoforma de catalase (que podem ter a função de minimizar danos celulares causados por um possível estresse oxidativo). Rafika et al. (2011) também usaram a análise proteômica para caracterizar as alterações protéicas durante o osmocondicionamento e concluíram que o tratamento em sementes de alfafa, além de melhorar a germinação, possibilitou montagem de mecanismos de defesa que permitem às sementes superarem ambiente de estresse que possa ocorrer durante a germinação. De modo análogo, Xu e Huang (2010) analisaram as respostas proteômicas para estresse hídrico induzido por polietilenoglicol (PEG) em mudas de *Agrostis stolonifera* L., e descreveram que proteínas envolvidas na síntese de membrana, afrouxamento da parede celular, manutenção de turgescência celular e defesa antioxidante estão associadas com a tolerância ao estresse hídrico.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2011. Brasília, 2012. 150p.

AGRAWAL, G. K. et al. System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants: part I, technologies in proteome establishment. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 815, n. 1/2, p. 109-123, Feb. 2005.

ANESE, S. et al. Seed priming improves endosperm weakening, germination, and subsequent seedling development of *Solanum lycocarpum* St. Hil. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 39, n. 1, p. 125-139, 2011.

ANOSHEH, H. P.; SADEGHI, H.; EMAM, Y. Chemical priming with urea and KNO<sub>3</sub> enhances maize hybrids (*Zea mays* L.) seed viability under abiotic stress. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, London, v. 14, n. 4, p. 289-295, 2011.

BAGGERMAN, B. et al. Gel-based versus gel-free proteomics: a review. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, Beijing, v. 8, n. 8, p. 669-677, Dec. 2005.

BALBUENA, T. S. et al. Challenges in proteome analyses of tropical plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 23, n. 2, p. 91-104, 2011.

BERTOLA, A. **Eucalipto 100 anos de Brasil**: “falem mal, mas continuem falando de mim!”. Disponível em:  
<[http://www.celsofoelkel.com.br/artigos/outros/Eucalipto\\_100%20anos%20de%20Brasil\\_Alexandre\\_Bertola.pdf](http://www.celsofoelkel.com.br/artigos/outros/Eucalipto_100%20anos%20de%20Brasil_Alexandre_Bertola.pdf)>. Acesso em: 12 nov. 2011.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Rockville, v.9, n. 7, p.1055-1066, 1997.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994.455p.

BORGES, E. E.L. et al. Estudos preliminares sobre o efeito do estresse hídrico na germinação de sementes de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*) e cedro-rosa (*Cedrela fissilis*). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.13, n. 2, p.115-118, 1991.

BUTLER, L. H. et al. Priming and re-drying improve the survival of mature seeds of *digitalis purpurea* during storage. **Annals of Botany**, Oxford, v.103, n. 8, p. 1261-1270, 2009.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000.752 p.

CARGILE, B. J. et al. Immobilized pH gradient isoelectric focusing as a first-dimension separation in shotgun proteomics. **Journal of Biomolecular Techniques**, Bethesda, v. 16, n. 3, p. 181-189, Sept. 2005.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 429p.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Science**, Shannon, v. 180, n. 2, p. 212-220, 2011.

CHEN, K.; FESSEHAIE, A.; ARORA, R. Dehydrin metabolism is altered during seed osmopriming and subsequent germination under chilling and desiccation in *Spinacia oleracea* L. cv. Bloomsdale: possible role in stress tolerance. **Plant Science**, Shannon, v. 183, n. 2, p. 27-36, Feb. 2012.

CUSTÓDIO, C. C. et al. Tolerância cruzada induzida por choque térmico na germinação de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 131-143, 2009.

ESKANDARI, H.; KAZEMI, K. Effect of seed priming on germination properties and seedling establishment of cowpea (*Vigna sinensis*). **Notulae Scientia Biologicae**, Recife, v.3, n.4, p.113-116, 2011.

FAROOQ, M. et al. Enhancing the performance of transplanted coarse rice by seed priming. **Paddy and Water Environment**, Berlin, v. 7, n.1, p. 55-63, 2009.

FOOLAD, M. R. et al. Genetic relationships among cold, salt and drought tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. **Euphytica**, Wageningen, v.130, n. 2, p.199-206, 2003.

GALLARDO, K. et al. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, n. 2, p. 835-848, Oct. 2001.

GALLARDO, K. et al. Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic process related to reserve accumulation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, p. 664-682, Oct. 2003.

HARDEGREE, S.P.; EMMERICH, W.E. Effect of polyethylene glycol exclusion on the water potential of solution saturated filter paper. **Plant Physiology**, Bethesda, v.92, n. 2, p. 462-466, Feb. 1990.

JAMIL, M. et al. Cell membrane stability (C.M.S): a simple technique to check salt stress alleviation through seed priming with GA3 in canola. In: ASHRAF, M.; OZTURK, M.; ATHER, H. R. (Ed.). **Salinity and water stress**. Dordrecht: Springer, 2009. p. 117-121.

JISHA, K. C.; VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. T. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 35, n. 5, p. 1381-1396, May 2013.

JOSÉ, A. C. et al. Protein expression upon desiccation and imbibition of *Magnolia ovata* seeds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 3, p. 465-476, May/June 2011.

JOSÉ, S. C. B. R.; VIEIRA, M. das G. G. C.; GUIMARÃES, R. M. Efeito da temperatura e do período de condicionamento osmótico na germinação e no vigor de sementes de pimentão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 2, p.176-184, 2000.

KAUSAR, M. et al. Invigoration of low vigor sunflower hybrids by seed priming. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 11, n. 5, p.521-528, 2009.

KOSOVA, K. et al. Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal Proteomics**, Weinheim, v. 74, n. 8, p. 1301-1322, Aug. 2011.

KRANNER, I. et al. What is stress?:concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, Cambridge, v. 188, n. 3, p. 655-673, Nov. 2010.

LIEBER,D.C. **Introduction to proteomics: tools for the new biology**. Totowa: Humana, 2002. 208p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005.495p.

MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000. 112p.

MORAES, G. S. de. **A produção de eucalipto no Brasil: benefícios para o meio ambiente**. Disponível em: <http://www.administradores.com.br/informe-se/artigos/a-producao-de-eucalipto-no-brasil-beneficios-para-o-meio-ambiente/43169/>>. Acesso em: 12 nov. 2011.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. **Programa de melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas: resultados e perspectivas.** Colombo: EMBRAPA Florestas, 2011. 68 p.

PASTORI, G.M.; FOYER, C.H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress: the central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, Bethesda, v.129, n. 2, p.460-468, June 2002.

PATANE, C. et al Plant emergence of PEG-osmoprimed seeds under suboptimal temperatures in two cultivars of sweet sorghum differing in seed tannin content. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 194, n. 4, p. 304-309, 2008.

PIERCE, B. A. **Genética: um enfoque conceitual.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 758p.

RAFIKA, Y. et al. Toward characterizing seed vigor in alfalfa through proteomic analysis of germination and priming. **Journal of Proteome Research**, Washington, v.10, n. 9, p. 3891-3903,2011.

SADEGHI, H. et al. Effect of seed osmopriming on seed germination behavior and vigor of soybean (*Glycine max* L.).**ARP Journal of Agricultural and Biological Science**, Islamabad, v. 6, n. 1, p. 39-43, Jan. 2011.

SÁNCHEZ, J. A.; ORTA, R.; MUÑOZ, B.C. Tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de lãs semillas y SUS efectos em plantas de interes agrícola. **Agronomía Costarricense**, San José, v.25, n. 1, p.67-91, ene./jun. 2001.

SANTOS, M. C. A. et al. Condicionamento osmótico de sementes. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 2, p. 1-6, 2008.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p.861-871, 2008.

SCHWEMBER, A. R.; BRADFORD, K. J. A genetic locus and gene expression patterns associated with the priming effect on lettuce seed germination at elevated temperatures. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 73, n. 1/2, p. 105-118, May 2010.

SOEDA, Y. et al. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 137, n. 1, p. 354-368, 2005.

TAYLOR, A. G. et al. Seed enhancements. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 2, p. 245-256, June 1998.

THELEN, J. J. Introduction to Proteomics: a brief historical perspective on contemporary approaches. In: SAMAJ, J.; THELEN, J. J. (Ed.). **Plant Proteomics**. Berlin: Springer-Verlag, 2007. p. 1-13.

XU, C.; HUANG, B. Differential proteomic responses to water stress induced by PEG in two creeping bentgrass cultivars differing in stress tolerance. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, n. 17, p.1477-1485, 2010.

YACOUBI, R. et al. Toward characterizing seed vigor in alfalfa through proteomic analysis of germination and priming. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 10, n. 9, p. 3891-3903, 2011.

YANG, Y. et al. Germination, osmotic adjustment, and antioxidant enzyme activities of gibberellin-pretreated *Picea asperata* seeds under water stress. **New Forests**, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 231-243, 2010.

ZHU, J. K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 401-406, Oct. 2001.

ZHUO, J. et al. Osmopriming-regulated changes of plasma membrane composition and function were inhibited by phenylarsine oxide in soybean seeds. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 51, n. 9, p. 858-867, 2009.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

**ARTIGO 1   Influência do condicionamento osmótico na tolerância ao estresse salino em sementes de eucalipto**

Natália Cristina Nogueira Silva; Anderson Cleiton José, José Marcio Rocha Faria, Raniere José Andrade; Wilson Vicente Souza Pereira

**Influência do condicionamento osmótico na tolerância ao estresse  
salino em sementes de eucalipto**

**Influence of osmotic conditioning of eucalyptus seeds in the tolerance  
to salt stress**

**Natália Cristina Nogueira Silva<sup>1</sup> Anderson Cleiton José, José Marcio  
Rocha Faria, Raniere José Andrade, Wilson Vicente Souza Pereira**

**RESUMO**

Neste trabalho, teve-se como objetivo avaliar o efeito do condicionamento fisiológico na germinabilidade de sementes de *Eucalyptus urophylla* e do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* em condições de estresse salino. Foram testados dois potenciais de condicionamento induzidos por polietilenoglicol (PEG6000), -1,0 e -1,5 Mpa, e duas durações, 1 ou 3 dias. Após o condicionamento osmótico, as sementes foram colocadas para germinar sob estresse salino em solução de NaCl nos potenciais 0,0 (controle) -0,5, -0,75 e -1,0 Mpa a 25 °C com luz constante. Os parâmetros avaliados foram a germinabilidade das

---

Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa-postal: 3037, Lavras, MG, CEP 37200-000

<sup>1</sup> E-mail: natalia\_cns@hotmail.com. Autor para correspondência.

sementes e o índice de velocidade de germinação (IVG). Houve diminuição da germinabilidade e do IVG à medida que o potencial hídrico do meio germinativo tornou-se mais negativo, tanto para *E. urophylla* quanto para o híbrido. O osmocondicionamento no potencial de -1,0 Mpa por 3 dias foi o mais indicado tanto para *E. urophylla* quanto para *eucalipto urograndis*, quando submetidos à germinação em solução salina a -1,0 Mpa, demonstrando que o osmocondicionamento foi eficiente em favorecer a tolerância ao estresse salino,

**Palavras-chave:** *Eucalyptus urophylla*, *E. grandis* x *E. urophylla*, estresse abiótico, condicionamento fisiológico

## ABSTRACT

In this work, we aimed to assess the effect of physiological conditioning in the seed germination of *Eucalyptus urophylla* and of the hybrid *E. urophylla* × *E. grandis* under salt stress. We tested two osmotic potentials (-1.0 and -1.5 Mpa) performed with polyethylene glycol (PEG 6000) for 1 and 3 days. After conditioning, seeds were germinated under salt stress in NaCl solution at potentials of 0.0 (control), -0.5, -0.75 and -1.0 Mpa at 25°C under constant light. We assessed the seed germination, and germination speed index (GSI). The seed germination and the GSI

decreased as the hydric potential of germination medium decreased, both for *Eucalyptus urophylla* as well as for the hybrid. *Eucalyptus urophylla*, however, was found to be more tolerant to salt stress by showing higher germination percentage under all tested potentials, when compared to *Eucalyptus urograndis*. The osmotic conditioning was found to be efficient by favouring tolerance to salt stress, once germination was higher for seed under osmotic conditioning, and under the most acute stress (-1.0 Mpa in NaCl). Besides, the osmotic conditioning under -1.0 Mpa for three days was found to be the most indicated, both for *Eucalyptus urophylla* as well as for *Eucalyptus urograndis*, when in salt solution.

**Key-words:** *Eucalyptus urophylla*. *E. urophylla* × *E. grandis*. Abiotic stress. Physiological conditioning.

## INTRODUÇÃO

O estresse abiótico limita severamente o crescimento e desenvolvimento das plantas (KOSOVÁ, 2011), sendo a salinidade e o déficit hídrico os principais fatores que afetam a produtividade e o rendimento das culturas ao redor do mundo, especialmente nas regiões áridas e semiáridas (JISHA et al., 2013). Um método bastante utilizado

para se determinar a tolerância de uma planta, é avaliando-se a capacidade germinativa de suas sementes sob estresses (LARCHER, 2000).

A salinidade no meio de germinação age não apenas restringindo a embebição da semente, ou levando ao estresse por falta de água, mas também causa toxicidade devido aos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , causando um desequilíbrio iônico no citoplasma celular, o que pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam peroxidação lipídica das membranas celulares, danos ao DNA, desnaturação de proteínas, oxidação de hidratos de carbono, e diminuição da atividade enzimática (SHABALA & MUNNS, 2012).

O condicionamento fisiológico é uma técnica que vem sendo amplamente utilizada nos estudos em sementes para induzir a tolerância a diversos estresses, dentre eles o salino. Ele consiste em um tratamento pré-germinativo que envolve a limitação do período de embebição ou da quantidade de água disponível para a semente, permitindo ativar o metabolismo da semente sem possibilitar a protrusão da radícula ou a perda da tolerância à dessecação (SHABALA & MUNNS, 2012).

O osmocondicionamento realizado com polietilenoglicol (PEG) é a técnica mais utilizada dentre as técnicas de condicionamento fisiológico de sementes, pois este composto inorgânico reduz o potencial osmótico da solução, e com isto, realiza a hidratação controlada sem causar toxidez (TAYLOR et al., 1998). Esta embebição controlada pode induzir mecanismos de proteção e reparo nas sementes, resultando em uma possível aclimação que permitiria à semente tolerar um estresse posterior.

Muitos estudos sobre a sinalização de estresse hídrico utilizam também o estresse salino, pois as respostas da planta à seca e à salinidade estão intimamente relacionadas e os mecanismos se sobrepõem, sugerindo que ambos os estresses são percebidos pelas células como um evento de privação de água (JISHA et al., 2013). Assim, este mecanismo que permite às plantas se aclimatarem a diferentes estresses após a exposição a um estresse específico é denominado tolerância cruzada (PASTORI & FOYER, 2002).

O objetivo nesta pesquisa foi avaliar o efeito de soluções salinas de NaCl na germinação de sementes de *Eucalyptus urophylla* e do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* bem como avaliar os

efeitos da tolerância cruzada induzida pelo osmocondicionamento sobre a germinação de sementes nestas condições salinas.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas sementes provenientes de pomar de sementes adquiridas do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais – IPEF, da espécie *Eucalyptus urophylla* (lote PI0077N01) e do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (lote AN0289N01). As sementes foram beneficiadas em soprador, armazenadas em recipientes plásticos e acondicionadas em câmara fria ( $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) até o uso.

Para a realização do condicionamento osmótico, as sementes foram colocadas em tubos Falcon® contendo solução de polietilenoglicol (PEG 6000) nos potenciais de -1,0 e -1,5 MPa e mantidas em incubadora tipo BOD na temperatura de 20 °C e escuro. O preparo das soluções de PEG 6.000 foi baseado nos cálculos e recomendações de SUN (2002). Para manter a oxigenação das soluções, os tubos foram perfurados na

tampa e colocados em agitador tipo *roller*, modelo MR-II, Multifunctional Mixer (Biomixer®).

O condicionamento osmótico teve duração de 1 ou 3 dias. Após o tratamento, as sementes foram lavadas rapidamente em água corrente e colocadas para secar em sala climatizada (aproximadamente 20 °C e 50% de UR) por 24h, tempo suficiente para garantir o retorno à umidade inicial.

Após o condicionamento osmótico e secagem, as sementes foram colocadas para germinar em condições de estresse salino induzido por NaCl nos potenciais de 0,0 (controle), -0,5, -0,75 e -1,0 MPa. O teste foi conduzido em placas de Petri sobre duas folhas de papel de germinação, em germinadores tipo BOD na temperatura de 25 °C e luz contínua. A solução salina utilizada para umedecer o substrato de germinação foi trocada ao terceiro, sétimo e décimo primeiro dias, para manutenção dos potenciais osmóticos. A germinação foi avaliada diariamente por 15 dias a fim de se obter a velocidade (IVG) e a porcentagem final da germinação. Como tratamento controle, as sementes foram colocadas para germinar nas mesmas condições salinas sem passar por nenhum tratamento prévio.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, usando quatro repetições de 25 sementes por tratamento em esquema fatorial (2 x 2 x 4) + 4 para cada espécie, constituído por dois potenciais de osmocondicionamento (-1,0 ou -1,5 MPa), dois tempos de condicionamento (1 ou 3 dias), quatro potenciais de germinação induzidos por NaCl (0,0, -0,5, -0,75 e -1,0 MPa) e quatro fatores adicionais, que consistem nos tratamentos controle.

A análise estatística consistiu de uma análise de variância, por espécie, para avaliar a existência de interações entre os fatoriais envolvidos no condicionamento (potenciais de condicionamento, duração e potenciais de germinação), seguida pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. A comparação das médias dos fatores adicionais com seus respectivos tratamentos foi realizado por uma ANAVA seguida pelo teste de Dunnet.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As sementes das duas espécies de eucalipto estudadas tiveram melhor desempenho na germinação quando colocadas em substrato umedecido com água, ou seja, sem estresse salino (Figura 1), em que a porcentagem média de germinação foi de 100% (*E. urophylla*) e 97% (*E.*

*urophylla* x *E. grandis*). Sob estresse salino, a germinação decresce continuamente, atingindo, em -1,0 MPa, 39 e 13% para *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis*, respectivamente. Para *E. urophylla*, observa-se uma tendência de se manter a porcentagem final de germinação mais elevada, até estresse salino de -0,75 MPa, ponto em que a germinação é 90%. Já para o híbrido, este potencial da solução de germinação provoca uma queda acentuada da porcentagem final de germinação, passando de 77%, em -0,5 MPa, para 35% em -0,75 MPa.

MARTINS et al. (2014) avaliaram os efeitos dos estresses hídrico, induzido por polietilenoglicol, e salino, induzido por NaCl, na germinação de sementes de cinco espécies de eucalipto, dentre as quais *E. grandis* e *E. urophylla*, e verificaram que o potencial -0,8 MPa já inibe a germinação de praticamente todas as espécies, reduzindo a germinação a valores nulos ou próximos a zero, tanto no estresse hídrico como no salino.

FEIKEMA & BAKER (2011) ao estudarem o crescimento de árvores de três espécies de eucalipto irrigados com solução salina, verificaram que *E. grandis* é adequado apenas para solos pouco salinos, pois a espécie apresentou alta taxa de mortalidade e baixo incremento em

volume ao longo dos anos quando submetidos à alta salinidade do solo. Resultados semelhantes foram encontrados por DUNN et al. (1994), que ao estudarem 12 espécies australianas dentro dos gêneros *Eucalyptus*, *Casuarina*, *Melaleuca* e *Tipuana* em sítios com diferentes níveis de salinidade do solo, também concluíram que *E. grandis* é uma espécie moderadamente tolerante à salinidade do solo.

Variações genéticas interespecíficas para a tolerância à salinidade têm sido bem relatadas para o gênero *Eucalyptus* (NIKMAN & McCOMB, 1999), demonstrando que são necessários mais estudos para explorar o potencial de tolerância para suas espécies, pois muitos genes estão envolvidos na tolerância à salinidade (ASHRAF, 2004)

#### ***Eucalyptus urophylla*:**

Para *E. urophylla*, verifica-se que a interação entre o fatorial (condicionamento x tempo x estresse) e os fatores adicionais foi significativa sobre a germinação, bem como a interação entre potenciais de condicionamento, duração e níveis de estresse.

Como é possível observar, alguns tratamentos de condicionamento não foram eficientes, pois a porcentagem final de germinação de sementes que não passaram por nenhum tratamento de condicionamento manteve-

se elevada, mesmo em um potencial salino de germinação de -0,75 MPa (90%) (Figura 2C).

A germinação de sementes de *E. urophylla* reduziu drasticamente apenas quando as sementes foram colocadas sob estresse salino de -1,0 MPa. Neste caso, a germinação foi reduzida de 90%, em -0,75 MPa, para 39%, em -1,0 MPa (Figura 1). O condicionamento osmótico a -1,0 MPa por três dias em PEG foi eficiente para elevar a germinação neste estresse salino para 66%, diferindo-se estatisticamente do controle (Figura 2D). As sementes condicionadas em PEG a -1,5 MPa por três dias e colocadas para germinarem em potenciais salinos maiores que -0,75 MPa tiveram uma porcentagem final de germinação inferior à do controle. Assim, o condicionamento em potencial hídrico de -1,5 MPa por três dias prejudicou a germinação das sementes de *E. urophylla* (Figura 2D).

Dentre as combinações de potencial de condicionamento, potenciais salinos de germinação e tempo testados (Tabela 1) observou-se que sementes condicionadas a -1,0 MPa por três dias possibilitaram os maiores ganhos na germinação quando submetidas a estresse salino mais severo (-1,0 MPa). Além de possibilitar maior porcentagem final de

germinação, foi visualmente perceptível, durante as avaliações, que o condicionamento também permitiu melhor desenvolvimento das plântulas.

***Eucalyptus urophylla x Eucalyptus grandis:***

Para o híbrido eucalipto urograndis, a interação entre o fatorial (condicionamento x tempo x estresse) e os fatores adicionais foi significativa para germinação. Também houve interação entre potenciais de condicionamento e níveis de estresse, e entre duração do condicionamento e níveis de estresse.

Observou-se que houve uma redução progressiva da germinação à medida que se reduziu o potencial do substrato de germinação (Figura 1). Assim, foi possível observar a influência do condicionamento osmótico desde os potenciais menos negativos até os mais negativos. Para os estresses de -0,5 e de -0,75 MPa o condicionamento a -1,5 MPa por três dias elevou a germinação de 77% para 90% e de 35% para 63%, respectivamente (Figura 2F e 3G). No estresse salino mais severo, de -1,0 MPa, a germinação das sementes foi elevada de 13% (controle) para 28% após serem condicionadas por três dias a -1,0 MPa (Figura 2H).

Dentre os tratamentos de condicionamento testados, observou-se que a resposta das sementes ao potencial de condicionamento e sua duração foi influenciada pelos níveis de estresse salino durante a germinação. O potencial de condicionamento de -1,5 MPa foi mais eficiente que o de -1,0 MPa para indução da tolerância das sementes à germinação em condições de estresse moderado (-0,75 MPa) (Tabela 2). Em relação à duração do condicionamento, observa-se que a manutenção das sementes por três dias em solução de PEG resulta em uma porcentagem final de germinação superior ao tratamento por um dia somente, quando as sementes de *eucalipto urograndis* são submetidas ao estresse salino de -1,0 MPa (Tabela 2).

Os condicionamentos citados, além de possibilitarem maior porcentagem final de germinação e aumento na velocidade de germinação, foi possível verificar visualmente durante as avaliações que também permitiram melhor desenvolvimento das plântulas.

FREDJ et al. (2013), ao estudarem cinco níveis de condicionamento em cultivares de coentro (0, 2, 4, 6 e 9 g L<sup>-1</sup> de NaCl) por três períodos de duração (12, 24 e 36h), verificaram que, quanto maior a duração, menor os benefícios do condicionamento e que solução

salina de condicionamento na concentração de  $4 \text{ gL}^{-1}$  proporcionou os melhores resultados de germinação, decrescendo acentuadamente em maiores concentrações.

Isto demonstra que um efetivo condicionamento é altamente dependente tanto do potencial osmótico da solução quanto da duração do tratamento, e que cada espécie ou cultivar responde a este condicionamento de forma diferente. Se por um lado baixos potenciais da solução de condicionamento ou curtos períodos podem não fornecer todos os benefícios do condicionamento, por outro lado altos potenciais, longa duração ou a secagem após o condicionamento podem levar ao “overpriming”, que causa danos à semente, redução da germinação e da longevidade (REIS et al., 2013).

A resposta a um estresse é um processo dinâmico, que depende da intensidade e da duração do estresse (KOSOVÁ, 2011). Um evento estressante menos intenso e de curto prazo pode ser parcialmente compensado pela aclimatação, adaptação e reparo da planta. Por outro lado, eventos de estresse intensos e de maior duração podem causar danos irreversíveis, levando até mesmo a morte da planta (KRANNER, 2010).

## CONCLUSÃO

O estresse salino reduziu a porcentagem e a velocidade de germinação de sementes de *Eucalyptus urophylla x Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*.

O condicionamento fisiológico induzido por PEG possibilitou aumento na velocidade e na porcentagem final de germinação em estresse salino para ambas as espécies. Para o híbrido, o condicionamento a -1,5 MPa por três dias foi mais eficiente para o estresse salino moderado (-0,5 e -0,75MPa), enquanto que para estresse mais severo (-1,0), o condicionamento por três dias a -1,0 MPa foi o mais indicado para ambas as espécies.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

ASHRAF, M. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. **Flora**, v.199, p.361–376, 2004. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/>

[article/pii/S0367253005701262#](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367253005701262#)>. Acesso em: 8 nov. 2013.

DUNN, G.M. et al. Performance of twelve selected Australian tree species on a saline site in southeast Queensland. **Forest Ecology and Management**, v.70, p.255-264, 1994. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378112794900914>>.

Acesso em: 12 de nov. 2013. doi: 10.1016/0378-1127(94)90091-4.

FEIKEMA, P.M.; BAKER, T.G. Effect of soil salinity on growth of irrigated plantation Eucalyptus in south-eastern Australia. **Agricultural Water Management**, v.98, p.1180–1188, 2011. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378377411000552>>. Acesso em: 16 de out. 2024.

FREDJ, M.B. et al. Effect of NaCl priming on seed germination of four coriander cultivars (*Coriandrum sativum*). **Journal of Bio Sciences**, v.7, p.21-29, 2013.

JISHA, K.C. et al. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiol Plant**, v.35, p.1381–1396, 2013. Disponível em:

<<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11738-012-1186-5>>.

Acesso em: 02 de nov. 2013.

KOSOVÁ, K. et al. Plant proteome changes under abiotic stress- contribution of proteomics studies to understanding plant stress response.

**Journal of Proteomics**, v.74, p.1301-1322, 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21329772>>. Acesso em: 02 nov.

2013. doi: 10.1016/j.jprot.2011.02.006.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and

applications in seed science. **New Phytologist**, v.188, p.655–673, 2010.

Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x/pdf)

[8137.2010.03461.x/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x/pdf)>. Acesso em: 16 nov. 2013.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531p.

MARTINS, C.C. et al. Germinação de sementes de eucalipto sob estresse hídrico e salino. **Bioscience Journal**, v.30, n.1, p.318-329, 2014.

Disponível em: <[http://www.seer.ufu.br/](http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/18058/14543)

[index.php/biosciencejournal/article/view/18058/14543](http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/18058/14543)>. Acesso em: 14

nov. 2013.

NIKNAM, S.R; McCOMB, J. Salt tolerance screening of selected

Australian woody species - a review. **Forest Ecology and Management**,

v.139, n.1-3, p.1-19, 2000. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378112799003345>>.

Acesso em: 3 nov. 2013. doi: 10.1016/S0378-1127(99)00334-5.

PASTORI, G.M.; FOYER, C.H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, v.129, p.460-468, 2002. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/129/2/460>>.

Acesso em: 16 nov. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.011021>.

REIS, R.G.E. et al. Physiological quality of osmoprimed gherkin seeds.

**Journal of Seed Science**, v.35, n.3, p.368-373, 2013. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2317-](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2317-15372013000300014&script=sci_arttext)

[15372013000300014&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2317-15372013000300014&script=sci_arttext)>. Acesso em: 24 out. 2013.

SHABALA, S.; MUNNS, R. Salinity Stress: Physiological constraints and adaptive mechanisms. In: SHABALA, S. **Plant Stress Physiology**.

Oxford: United Kingdom & USA, 2012. p.59-93.

SUN, W.Q. Methods for the Study of Water Relations Under Desiccation

Stress. In: Black, M.; Pritchard, H.W. **Desiccation and survival in**

**plants**: Drying without dying. Wallingford: Cabi Publishing, UK, 2002.

p.47-92.

TAYLOR, A.G. et al. Seed enhancements. **Seed Science Research**, v.8,  
p.245-256, 1998.

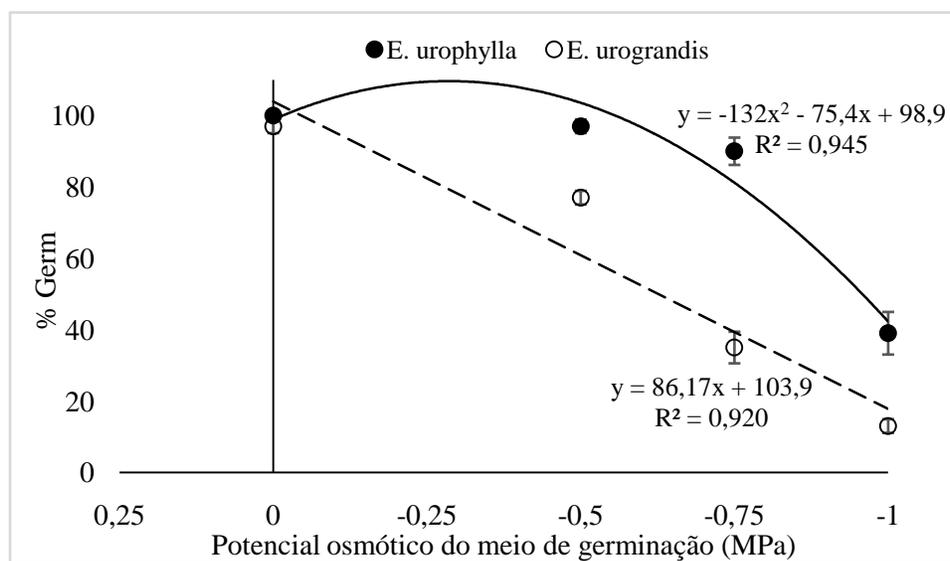


Figura1- Porcentagem final de germinação de sementes de *E. urophylla* e *E. urograndis*, sem condicionamento, submetidos a diferentes potenciais salinos de germinação. As barras em cada ponto representam o desvio padrão.

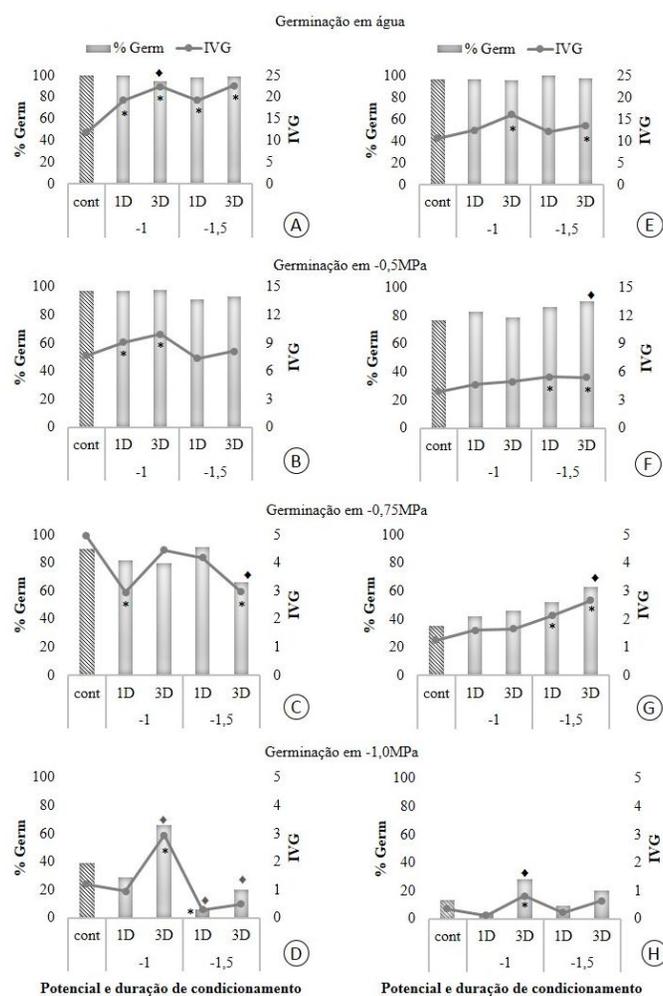


Figura 2 - Análise estatística baseada no contraste entre o tratamento controle e os demais tratamentos de condicionamento (-1,0 MPa ou -1,5MPa por 1 ou 3 dias) para *E. urophylla* (esquerda) e para *E. urophylla* x *E. grandis* (direita). A e E refere-se a sementes colocadas para germinar em substrato umedecido com água; B e F substrato umedecido com solução de NaCl a -0,5MPa; C e G substrato umedecido com solução a -0,75MPa e D e H substrato umedecido com solução a -1,0MPa. \* simboliza os tratamentos cujo IVG diferiu-se estatisticamente do IVG do tratamento controle. ♦ simboliza os tratamentos cuja porcentagem de germinação diferiu-se estatisticamente da porcentagem de germinação do tratamento controle.

Tabela 1 - Porcentagem final de germinação de sementes de *E. urophylla* para cada combinação de potencial de condicionamento (-1,0 e -1,5MPa), duração do condicionamento (1 ou 3 dias) e nível de estresse (0, -0,5, -0,75 e -1,0MPa).

Condicionamento	Estresse / tempo							
	0		-0,5		-0,75		-1,0	
	1d	3d	1d	3d	1d	3d	1d	3d
-1,0	100	95	97	98	82	80	29	66
	Aa	Aa	Aa	Aa	Ba	Aa	Ab	Aa
-1,5	98	99	91	93	91	66	6	20
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Bb	Bb	Ba

Letras diferentes (maiúsculas) nas colunas representam a diferença estatística entre os condicionamentos em cada condição de tempo e estresse.

Letras diferentes (minúsculas) nas linhas representam a diferença estatística entre os tempos em cada interação condicionamento e estresse.

As médias foram comparadas pelo teste de *Skott-Knott* a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Porcentagem final de germinação de sementes de *E. urograndis* para cada combinação de potencial de condicionamento e nível de estresse, e para combinação duração de condicionamento e nível de estresse.

		<b>ESTRESSE</b>			
		<b>0,0</b>	<b>-0,5</b>	<b>-0,75</b>	<b>-1,0</b>
<b>Condicionamento</b>	<b>-1,0</b>	97 Aa	81 Ab	44 Bc	16 Ad
	<b>-1,5</b>	99 Aa	88 Ab	58 Ac	15 Ad
<b>Duração (dias)</b>	<b>1</b>	98 Aa	85 Ab	47 Ac	6 Bd
	<b>3</b>	97 Aa	85 Ab	55 Ac	24 Ad

Letras diferentes (maiúsculas) nas colunas representam a diferença estatística, pelo teste de *Skott-Knott* a 5% de probabilidade para cada variável (potenciais de condicionamento e duração). Letras diferentes (minúsculas) nas linhas representam a diferença estatística, pelo teste de *Skott-Knott* a 5% de probabilidade, para cada variável (potenciais de condicionamento e duração).

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

**ARTIGO 2 Análise proteômica em sementes de eucalipto durante a germinação e condicionamento**

Natália Cristina Nogueira Silva<sup>1</sup>

Anderson Cleiton José<sup>2</sup>

José Marcio Rocha Faria<sup>3</sup>

Wilson Vicente Souza Pereira<sup>4</sup>

**Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003), conforme  
instrução do MANUAL DE NORMALIZAÇÃO DA UFLA.**

---

<sup>1</sup> Eng. Florestal, pós-graduanda do Departamento de Ciências Florestais, UFLA, [natalia.cns@gmail.com](mailto:natalia.cns@gmail.com)

<sup>2</sup> Eng. Florestal, Dr., Prof. Adjunto, Departamento de Ciências Florestais; UFLA, [acjose@dcf.ufla.br](mailto:acjose@dcf.ufla.br),

<sup>3</sup> Prof. Adjunto, Departamento de Ciências Florestais; UFLA, [jmfaria@dcf.ufla.br](mailto:jmfaria@dcf.ufla.br)

<sup>4</sup> Biólogo, pós-graduando do Departamento de Ciências Florestais, UFLA, [wvicentesp@gmail.com](mailto:wvicentesp@gmail.com)

## RESUMO

Neste trabalho, avaliou-se o efeito do condicionamento fisiológico e da germinação sob estresse salino em sementes de *Eucalyptus urophylla* através do estudo da expressão diferencial de proteínas utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de acrilamida bidimensional. Estudos prévios indicaram os melhores tratamentos fisiológico para induzir maior tolerância de sementes à salinidade do meio germinativo. O condicionamento não influenciou a porcentagem final de germinação de sementes colocadas em substrato umedecido com água, mas induziu maior tolerância e conseqüentemente possibilitou maior percentual de germinação final para aquelas colocadas para germinar em solução salina. Assim, proteínas totais foram extraídas e separadas pelo método de eletroforese em gel bidimensional dos tratamentos compostos por: sementes secas, sementes condicionadas a -1,0MPa por três dias, sementes em processo de germinação em água por 6h, sementes em processo de germinação em -1,0MPa de NaCl por 6h, sementes em processo de germinação em água por 6h após o condicionamento e sementes em processo de germinação em -1,0MPa de NaCl por 6h após condicionamento. O perfil proteômico revelou, em média, a presença de cerca de 415 pontos de proteínas nos géis corados com *Azul* de Comassie, dos quais foram selecionados 21 pontos diferencialmente expressos, que podem estar relacionados com proteínas de reserva ou com a quebra destas durante a germinação ou condicionamento, com o reparo ou defesa de danos celulares, podem estar envolvidas no ciclo celular e principalmente, espera-se identificar proteínas relacionadas com a tolerância à baixa disponibilidade de água ou a tolerância a condições salinas.

Palavras-chave: Sementes florestais. Proteínas. Estresse salino. Tolerância. *Eucalyptus urophylla*.

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de formação das sementes inicia-se com a histodiferenciação, na qual a divisão celular forma os tecidos, seguido pela expansão celular, devido à intensa deposição de reservas e efluxo de água, e finalmente, no caso de sementes ortodoxas, a secagem de maturação. Esta perda de água é essencial às sementes ortodoxas pois lhes permite passar para um estado metabolicamente inativo ou quiescente, mantendo assim a viabilidade por mais tempo (BEWLEY et al., 2013).

Sementes ortodoxas passam por mudanças ao final da maturação que lhes permitem tolerar esta perda de água. Pode-se citar por exemplo, o aumento na síntese de proteínas, como as pertencentes à família LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) e proteínas de choque térmico (HSP's). Elas têm um importante papel protetor durante a perda de água, não apenas durante a secagem de maturação de sementes, mas também em tecidos de plantas submetidas a estresse hídrico. Com a germinação e a retomada da hidratação dos tecidos, verifica-se então um rápido declínio destas proteínas (BEWLEY et al., 2013; KERMODE; FINCH-SAVAGE, 2002).

Para a germinação iniciar-se, as sementes precisam de condições ideais de temperatura, luz, oxigênio e água (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; YANG et al., 2010), sendo a água um dos principais fatores limitantes para a germinação de sementes não dormentes, afetando a percentagem, a velocidade e a uniformidade do processo germinativo (MARCOS FILHO, 2005).

O déficit hídrico e a salinidade são os principais estresses abióticos que afetam o rendimento das culturas ao redor do mundo (DIAS; BLANCO, 2010; ESTEVES; SUZUKI, 2008; JISHA; VIJAYAKUMARI; PUTHUR, 2013) sendo que o sal, além do estresse hídrico, pode ainda causar um distúrbio da homeostase celular e toxicidade devido aos íons como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , e  $\text{SO}_4^{2-}$  (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005; SHABALA; MUNNS, 2012; SOBHANIAN; AGHAEI; KOMATSU, 2011). O citosol necessita de uma relação adequada de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  para a manutenção do ajuste osmótico, para reações enzimáticas e para o funcionamento celular normal, mas as altas concentrações de  $\text{Na}^+$  nas soluções salinas levam à substituição de  $\text{K}^+$  por  $\text{Na}^+$  nas reações bioquímicas, levando à citotoxicidade pela perda de função e mudanças na conformação de proteínas (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005). Além disso, a salinidade pode estimular a síntese de ABA, conhecido como hormônio do estresse, e causar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (MITTLER, 2002; XIONG; ZHU, 2003).

Uma técnica muito utilizada em estudos de estresses em sementes é o condicionamento fisiológico, pois este limita a entrada de água nas células. Ele consiste na limitação da embebição das sementes durante a germinação, controlando-se a quantidade de água disponível ou o período de embebição (SOEDA et al., 2005). Esta entrada de água de forma lenta e limitada permite que o metabolismo da germinação seja ativado sem, contudo, permitir a protrusão da radícula, o que garante a manutenção da tolerância à dessecação (GALLARDO et al., 2001; SOEDA et al., 2005). Além de permitir avanços no processo de germinação e com isto melhorar a velocidade e a uniformidade da germinação, o condicionamento

fisiológico também é capaz de induzir a tolerância a estresses posteriores, como hídrico, salino e térmico, mesmo após as sementes terem sido secas à umidade inicial. Isto é possível pois o baixo potencial hídrico das soluções osmóticas durante o condicionamento são percebidos pelas sementes como um estresse moderado que induz uma “memória de estresse”, permitindo à semente tolerar um estresse posterior (CHEN; ARORA, 2011), ou seja, permite a aclimação.

As plantas, ao se aclimatarem a um estresse, desencadeiam uma sequência de eventos, como estímulo, sinais e reguladores de transcrição, que levam à expressão de genes específicos (PASTORI; FOYER, 2002). Estes genes ativados durante a exposição a determinado estresse também são responsivos a outros tipos de estresse (FOOLAD et al., 2003). Como as plantas fazem uso de vias e compostos comuns na relação estresse-resposta, essas são capazes de se adaptarem ou aclimatarem a uma gama de diferentes estresses após exposição a um estresse específico, fenômeno este definido por Pastori e Foyer (2002) como “Tolerância Cruzada”. Assim, a maior tolerância a estresses verificada nas sementes pode ser resultado da tolerância cruzada induzida pelo condicionamento fisiológico (CHEN; ARORA, 2011).

As sementes são um modelo bastante utilizado para estudar as respostas adaptativa de uma planta às condições de estresse, como a seca, uma vez que os processos inerentes à dessecação e desenvolvimento do embrião são similares às respostas ao déficit hídrico nos tecidos vegetais (LANCHER, 2000; VALDÉS et al., 2013). Porém, os mecanismos envolvidos na germinação e em sua regulação são complexos, pois envolvem vários processos regulados espaço-temporalmente (BOVE;

JULLIEN; GRAPPIN, 2001). As informações genômicas, apesar de grande contribuição, não são suficientes para revelar funções dos genes, atividades bioquímicas das células ou mecanismos em resposta a estresses. Para isto, é necessário integrar estudos em nível de transcriptoma, proteoma e metaboloma (TIMPERIO; EGIDI; ZOLLA, 2008). O estudo do proteoma ainda se destaca pois as proteínas agem diretamente na resposta da planta ao estresse, não apenas como enzimas, mas também como reguladores de transcrição e de tradução (KOSOVÁ et al., 2011). Assim, durante a síntese de proteínas pode haver mudanças pós-transcricionais e pós-traducionais que as alteram bioquímica e estruturalmente, refletindo no seu papel biológico e modificando a composição do proteoma, mudanças estas que a genômica e a transcriptômica não podem detectar (BALBUENA et al., 2011).

Muitos estudos avaliaram a resposta proteômica de sementes em eventos envolvidos com o desenvolvimento, maturação, germinação, condicionamento fisiológico e em resposta a estresse (GALLARDO et al., 2001, 2003; JOSÉ et al., 2011; SOEDA et al., 2005). Estes estudos fornecem uma visão global da expressão gênica e dinâmica de proteínas durante a exposição das sementes a estes estímulos (YACOUBI et al., 2011). Neste contexto, no presente trabalho objetivou-se caracterizar o perfil proteômico de sementes de *Eucalyptus urophylla* submetidas a um tratamento fisiológico que lhes possibilitou maior tolerância à salinidade do meio germinativo induzida por NaCl.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

O trabalho foi realizado no Laboratório de Sementes Florestais e Laboratório de Biotecnologia Florestal do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As sementes foram provenientes de pomar de sementes adquiridas do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais – IPEF, da espécie *Eucalyptus urophylla* (lote PI0077N01). As sementes foram beneficiadas em soprador, armazenadas em recipientes plásticos e acondicionadas em câmara fria ( $5^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) até o uso.

Os tratamentos basearam-se em testes prévios que indicaram as melhores condições para o condicionamento fisiológico e o nível de estresse hídrico que teve maiores benefícios com este condicionamento. Assim, as amostras consistiram em: sementes secas (T1); sementes condicionadas a -1,0 MPa por três dias (T2); sementes em processo de germinação em água por 6h (T3); sementes em processo de germinação em -1,0MPa de NaCl por 6h (T4); sementes em processo de germinação em água por 6h após o condicionamento (T5) e sementes em processo de germinação em -1,0MPa de NaCl por 6h após condicionamento (T6).

Para a realização do condicionamento osmótico, as sementes foram colocadas em tubos Falcon® contendo solução de polietilenoglicol (PEG 6000) a -1,0 MPa por três dias e mantidas em incubadora tipo BOD na temperatura de 20°C e escuro. O preparo das soluções de PEG 6000 foi baseado nos cálculos e recomendações de Sun (2002). Após o

tratamento, as sementes foram lavadas rapidamente em água corrente e colocadas para secar em sala climatizada (aproximadamente 20°C e 50% de UR) por 24h. Estas condições foram suficientes para garantir que o teor de água das sementes retornasse aos valores iniciais.

O teste de germinação foi conduzido em placas de Petri sobre duas folhas de papel de germinação, em germinadores tipo BOD na temperatura de 25°C e luz contínua. As sementes foram colocadas para germinar em água ou em condições de estresse salino induzido por NaCl no potencial de -1,0MPa, após passarem ou não por condicionamento e secagem prévia.

A análise estatística consistiu de uma análise de variância seguida pelo teste de *Skott-Knott* a 5% de significância.

Após cada tratamento, três amostras de 250mg foram imersas em nitrogênio líquido para congelamento rápido e imediatamente armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até extração.

## **2.2 Extração de proteínas totais**

Extratos de proteínas totais de *Eucalyptus urophylla* foram preparados a partir de três amostras de 250 mg de sementes. As sementes foram maceradas em nitrogênio líquido, usando um almofariz e pilão. A extração foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Gallardo et al. (2003), com modificações propostas por José et al. (2011). O macerado foi homogeneizado em gelo com 800µL de tampão de extração ureia/tiourea, ureia 7M, tiourea 2M, Trizma HCl 18mM, Trizma base 14mM, coquetel de inibidores de protease, 0,2% (v/v) de Triton X-100,

CHAPS 60mM e DTT 17,5mM. A mistura foi agitada em vórtex e os tubos mantidos em repouso em gelo por 15 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o extrato protéico foi submetido a uma segunda centrifugação e o sobrenadante coletado foi separado em alíquotas e armazenado a -80°C.

A concentração de proteína nos diferentes extratos foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina (BSA) como padrão.

### **2.3 Focalização isoeletrica**

As proteínas foram separadas por Focalização Isoeletrica (IEF), usando gel em fita com 13cm de comprimento com pH imobilizado, entre 4-7 (*Immobiline Drystrips – Amersham Biosciences*). As fitas para IEF foram reidratadas no suporte de reidratação individual em canaletas (*Reswelling Tray Amersham Bioscience*) por 15 horas à temperatura ambiente, em tampão de reidratação composto por Tiureia/Ureia, contendo ureia 7M, Tiureia 2M, 1% (v/v) de IPG Buffer (*Amersham Bioscience*), 2,2% (v/v) de reagente Destreak, 2% CHAPS (p/v), DDT (2,8mg/mL) e traços de azul de bromofenol. O volume final de 250µL de tampão contendo 100µg de proteína foram aplicados nas canaletas e, após o período de reidratação, as fitas foram levadas ao focalizador isoeletrico Ettan IPGphor3 (GE Healthcare), posicionadas nas canaletas e imersas em óleo mineral para eletroforese (*Amersham Bioscience*).

A Focalização Isoelétrica foi realizada em quatro fases: a 500V por 1 hora, em *step*, 1.000V por 1 hora e 8.000V por 2h30min, ambos em gradiente, e 8.000V por 40 minutos, em *step*. Ao final da Focalização Isoelétrica, as fitas foram armazenadas em tubos a -80°C até o início da eletroforese na segunda dimensão. Imediatamente antes da eletroforese na segunda dimensão, as fitas contendo as proteínas focalizadas foram colocadas em soluções de equilíbrio (base de ureia 6M, Glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), Trizma base 75mM em pH 8.8) através de três passos: numa primeira etapa, as tiras foram mantidas sob leve agitação, em solução base de equilíbrio (10 mL/tira) adicionada de DTT 65mM, por 15 minutos. Em seguida, incubadas por mais 10 minutos com a solução base de equilíbrio e finalmente por mais 15 minutos em solução de equilíbrio contendo iodo acetamida 0,2M, sempre sob movimentos oscilatórios constantes.

#### **2.4 Segunda dimensão**

As fitas de gel equilibradas foram colocadas no topo de um gel de poliacrilamida vertical de 12% (v/v) de solução acrilamida/bisacrilamida, 0,3M de Trizma-base pH 8,8, 0,08% (v/v) de persulfato de amônio e 0,04% (v/v) TEMED. As tiras de gel foram seladas com agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (p/v) contendo 0,1% (p/v) de SDS, Trizma base 25mM, glicina 192mM e traços de azul de bromofenol. Os géis permaneceram em repouso por cinco minutos para a solidificação da agarose, antes da adição do tampão de corrida. A eletroforese foi realizada a 20°C em tampão contendo 0,1% (p/v) de SDS, glicina 192

mM e Trizma-base 25mM, por 15 minutos inicialmente a 200 mA e 80V e posteriormente por 4 horas a 200 mA e 200V, numa cuba SE600, de acordo com as instruções do fabricante. Para cada condição, foram corridos três géis carregados com proteínas de extrações independentes.

## 2.5 Coloração dos géis

Os géis foram inicialmente colocados por 30 minutos em uma solução de fixação contendo 7% (v/v) de ácido acético, 40% (v/v) de metanol. Em seguida os géis foram transferidos para a solução de coloração contendo quatro partes da solução com 0,1% (p/v) de Comassie Brilliant Blue G-250, 1,6% (v/v) ácido fosfórico e 12% (p/v) de sulfato de amônio e 20 % (v/v) de Metanol. Os géis foram mantidos na solução de coloração por três dias. Ao fim desse período, os géis foram neutralizados por três minutos em solução de descoloração contendo 1,2% (p/v) de Tris-Base, pH 6,5 aferido com ácido ortofosfórico. Posteriormente, foram lavados em solução contendo 40% (v/v) de metanol por 1 minuto e armazenados em solução contendo 20% (p/v) de sulfato de amônio.

## 2.6 Análise dos géis

Os géis corados tiveram suas imagens digitalizadas em escâner de alta resolução (*Image Scanner, Amersham Bioscience*), equipado com o programa Ulmax Magic Scam 4.6 em modo transmissivo com 400dpi. As análises das imagens foram feitas no programa Image Master 2D

Platinum 7.0 (Amersham Bioscience). Os géis foram alinhados e agrupados por tratamento e os pontos de proteínas comparados em função da média do seu volume normalizado (% Vol) entre as repetições. Após esse procedimento, os grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) gerados pelo programa citado. Pontos de proteína com uma diferença de pelo menos 2,5x, avaliados em *excell*, e um resultado significativo na ANOVA ( $p < 0,05$ ) foram considerados como diferencialmente expressos.

$$\% \text{ Vol} = \frac{\text{Vol}}{\sum_{S=1}^n (\text{Vol}_S)} \times 100$$

Em que:  $\text{Vol}_S$  é o volume do *spot S* no gel contendo  $n$  *spots*.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

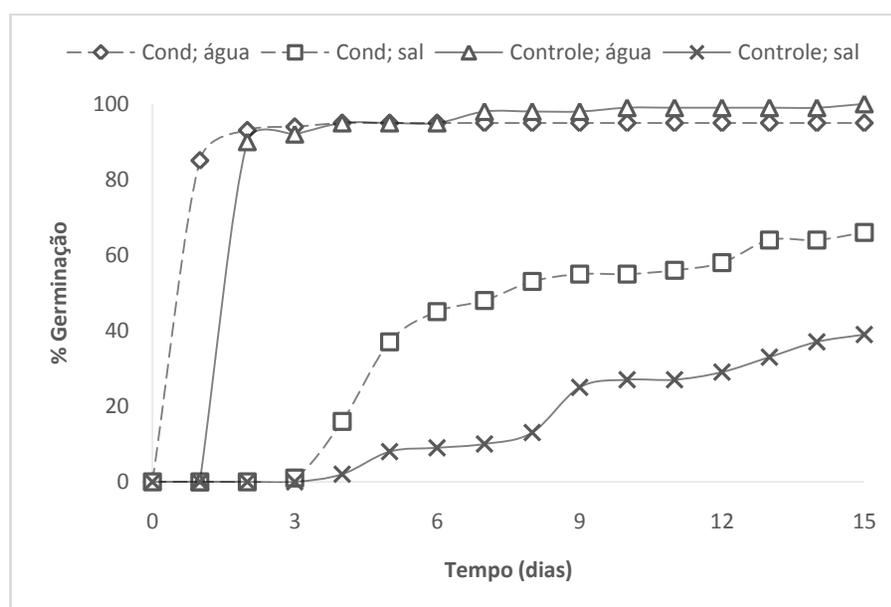
A porcentagem final de germinação e o índice de velocidade de germinação de sementes de *E. urophylla* foram significativamente afetados pelos tratamentos aplicados (condicionamento em PEG) em sementes submetidas à germinação em água e NaCl (Anexo 1). As maiores porcentagens de germinação foram verificadas em sementes colocadas para germinar em água, submetidas ou não ao condicionamento, não se diferindo estatisticamente entre si. No entanto, o IVG praticamente dobrou para as sementes condicionadas (Tabela 1).

A salinidade afetou consideravelmente a germinação das sementes de *E. urophylla* reduzindo o percentual final de germinação de 100% para 39%, para sementes não condicionadas, e de 95% para 66% para as sementes que passaram pelo condicionamento previamente. Na Figura 1, é possível observar que o condicionamento possibilitou uma porcentagem final de germinação superior a de sementes não tratadas (66% e 39% respectivamente), mostrando-se eficiente em induzir tolerância a estresse salino imposto por NaCl em sementes de *E. urophylla*.

**Tabela 1** - Porcentagem final de germinação e índice de velocidade de germinação para sementes de *E. urophylla* condicionadas ou não em solução de PEG a -1,0 MPa e colocadas para germinar em substrato umedecido com solução de NaCl a -1,0 MPa ou água.

Tratamentos	Potencial da solução de germinação (MPa)	% Germinação	IVG
<b>Não condicionadas</b>	0,0	100 a	11,7 b
<b>Condicionadas</b>	-1,0	39 c	1,2 d
<b>Condicionadas</b>	0,0	95 a	22,4 a
	-1,0	66 b	2,9 c

Letras diferentes nas colunas representam diferença estatística entre os tratamentos para a germinação e IVG, pelo teste de *Skott-Knott* a 5% de probabilidade.

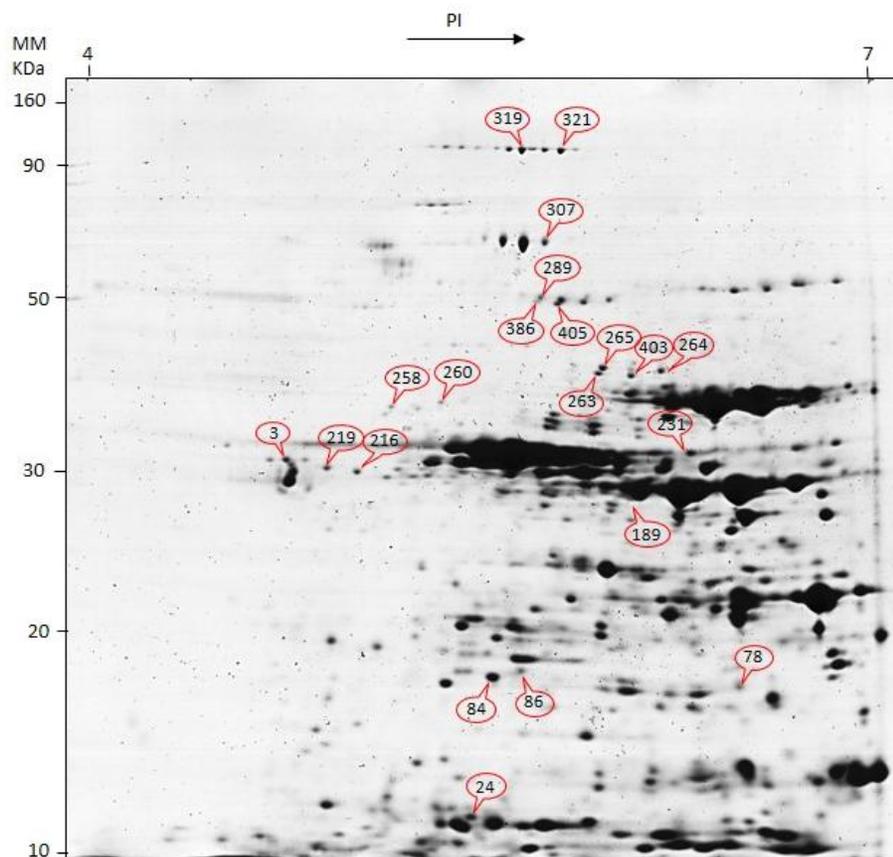


**Figura 1** - Porcentagem de germinação em função do tempo para sementes de *E. urophylla* condicionadas em PEG a -1,0 MPa e controle, colocadas para germinar em substrato umedecido com solução salina (-1,0 MPa) ou água.

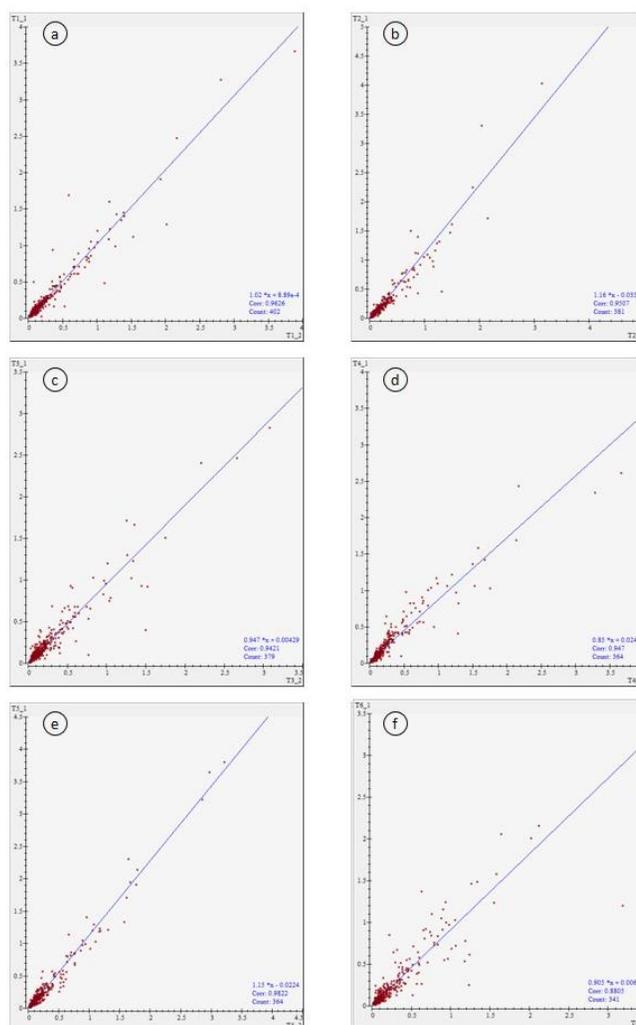
Baseado nos resultados de germinação e indução de tolerância a estresse salino, seis tratamentos foram selecionados para estudo

proteômico: sementes secas (T1); sementes após condicionamento a -1,0 MPa por três dias e secagem (T2); sementes em processo de germinação em água por 6h (T3); sementes em processo de germinação em -1,0 MPa de NaCl por 6h (T4); sementes em processo de germinação em água por 6h após o condicionamento e secagem (T5) e sementes em processo de germinação em -1,0 MPa de NaCl por 6h após condicionamento e secagem (T6).

O perfil proteômico de sementes de *E. urophylla* revelou a presença de  $415 \pm 30,3$  pontos de proteína em cada gel corados com azul de Commassie, sendo que a maioria das proteínas se concentrou entre os pontos isoelétricos (pI) 5-7 (Figura 2). Para cada tratamento, houve uma correspondência média de *spots* entre as repetições de 96, 95, 94, 95, 98 e 88% para os respectivos tratamentos. A reprodutibilidade dos géis pode ser vista pelos gráficos na Figura 3. Valdéz et al. (2013), ao avaliarem o perfil proteômico também em sementes de eucalipto utilizando técnica semelhante à desenvolvida neste trabalho, com gel de poliacrilamida na mesma concentração da utilizada, detectaram 473 *spots* nos géis de proteínas provenientes de genótipos sensíveis à seca e 370 *spots* nos géis de proteínas provenientes de genótipos tolerantes à seca, e um coeficiente de correlação (r) entre as repetições biológicas de 0,81 e 0,87, respectivamente.

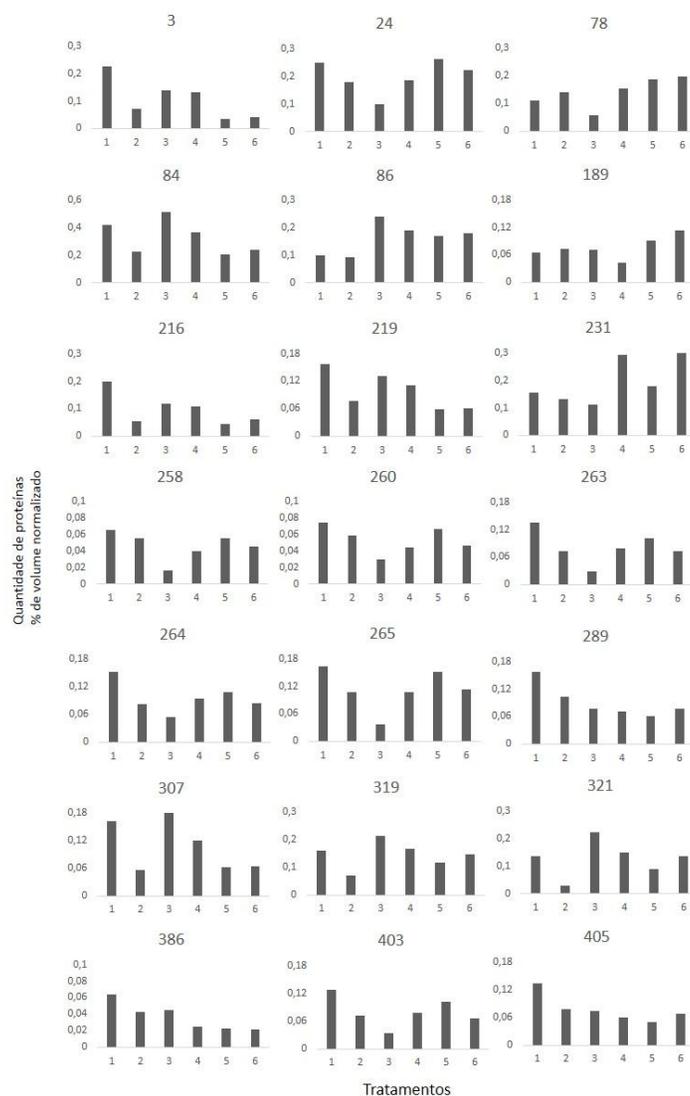


**Figura 2** - Representação de gel bidimensional de proteínas totais extraídas de sementes de *E. urophylla* em processo de germinação em -1,0 MPa de NaCl por 6h (T4) e corado com azul de Coomassie. Spots destacados correspondem a proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos.



**Figura 3** - Reprodutibilidade dos géis de proteômica de sementes de *E. urophylla* para os tratamentos: a) sementes secas (T1); b) sementes condicionadas a -1,0 MPa por três dias (T2); c) sementes em processo de germinação em água por 6h (T3); d) sementes em processo de germinação em -1,0 MPa de NaCl por 6h (T4); e) sementes em processo de germinação em água por 6h após o condicionamento (T5) e sementes em processo de germinação em -1,0 MPa de NaCl por 6h após condicionamento (T6).

A análise de variância sobre o volume normalizado dos *spots* (%Vol) indicou 106 spots potencialmente de interesse, mas considerando-se também uma expressão mínima do percentual de volume de 2,5 vezes entre tratamentos, e desconsiderando-se *spots* muito próximos que pudessem inviabilizar sua excisão, 21 pontos de proteínas foram consideradas de interesse para identificação em espectrômetro de massa. A expressão diferencial de cada proteína em função dos tratamentos pode ser avaliada na Figura 4.



**Figura 4** - Expressão de proteínas de géis 2D-PAGE de sementes de *E.urophylla*, em % de volume, que diferiram estatisticamente entre os tratamentos aplicados. Tratamento 1: sementes secas; 2: sementes condicionadas a -1,0 MPa por três dias; 3: sementes em processo de germinação em água por 6h; 4: sementes em processo de germinação em -1,0 MPa de NaCl por 6h; 5: sementes em processo de germinação em água por 6h após o condicionamento; 6: sementes em processo de germinação em -1,0 MPa de NaCl por 6h após condicionamento.

Muitas mudanças ocorrem nas sementes durante a germinação, pois com a embebição, o metabolismo é direcionado para permitir a reparação dos danos causados pela secagem de maturação paralelamente ao restabelecimento das atividades celulares basais (BEWLEY et al., 2013). Assim, o embrião muda seu metabolismo, passando do estado quiescente para um estado metabolicamente ativo.

No presente estudo, iniciou-se uma análise proteômica do processo de germinação tanto sob plena disponibilidade de água quanto sob estresse salino, e também após um tratamento com a finalidade de induzir a tolerância a este estresse.

Nota-se que as proteínas 3, 216, 307 e 321 foram menos expressas nos tratamentos 2, 5 e 6, ou seja, tratamentos em que as sementes foram submetidas ao condicionamento fisiológico.

As proteínas 3, 216, 219, 258, 260, 263, 264, 265, 289, 286, 403 e 405 apresentaram padrão de expressão entre os tratamentos semelhantes. Essas proteínas foram encontradas em maiores quantidades no tratamento 1, ou seja, em sementes secas, reduzindo sua expressão durante a germinação ou condicionamento. Espera-se que tais proteínas estejam relacionadas com substâncias de reserva em sementes ou com proteínas expressas durante a maturação. Gallardo et al. (2001), em trabalho no qual avaliaram o proteoma durante a germinação e condicionamento em sementes de *arabidopsis*, verificaram que proteínas de choque térmico (HSPs) e proteínas abundantes da embriogênese tardia (proteínas LEA) reduziram sua expressão com a germinação. Genes relacionados com a síntese destas proteínas aumentam sua expressão durante a maturação, antes da perda de água pelas sementes, o que demonstra sua importância

para a aquisição de tolerância à dessecação, tornando-se abundantes em sementes secas maduras e desaparecem durante a germinação (BEWLEY et al., 2013). Além disso, perfis proteômicos de sementes geralmente revelam uma abundância de proteínas de reserva, e variações nos pesos moleculares destas podem ser resultados de eventos de *splicing* alternativo (VALDÉS et al., 2013).

As proteínas 84, 86, 307, 319 e 321 foram mais expressas durante a germinação em água (T3). Espera-se que nesses casos haja um aumento na expressão de proteínas relacionadas com a quebra de substâncias de reserva. Gallardo et al. (2001) encontraram diversas enzimas responsáveis por catabolizar triglicerídeos (como fosfoenol piruvato carboxiquinase, catalase, aconitase, isocitrato liase, malato desidrogenase, fosfoglicerato quinase e citrato sintase), relacionadas com a mobilização de proteínas e com a retomada do ciclo celular, como actina, subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina, aconitase, fosfoenol piruvato carboxiquinase e catalase. Yacoubi et al. (2011) verificaram também aumento na abundância da proteína dissulfeto isomerase durante a germinação de sementes de *Medicago sativa*. Esta enzima catalisa a formação de pontes dissulfeto durante a montagem e dobramento de proteínas.

Proteínas 78 e 189 foram mais expressas no tratamento 6, que corresponde à germinação sob estresse salino após condicionamento fisiológico. Em pesquisa realizada com sementes de soja sob estresse salino induzido por NaCl, Xu et al. (2011) identificaram aumento na expressão de proteínas como ferritina, uma subunidade do proteossoma 26S, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GPD) e glutathione transferase (GST).

A ferritina é uma proteína encontrada em todos os organismos vivos que, ao ligar-se ao ferro, tem função de desintoxicar as células ou, no caso de necessidade de ferro, pode liberá-lo para sua utilização (LAULHERE; LESCURE; BRIATS, 1988). Além desta sua função, Ravet et al. (2009) descrevem também que esta proteína desempenha um papel essencial na prevenção do estresse oxidativo, pois a ausência deste composto em sementes levou a uma maior sensibilidade das sementes aos compostos oxidantes. Além disso, ABA possivelmente estaria envolvido na regulação dos genes da ferritina (XU et al., 2011).

O proteossoma 26S é um complexo proteico que tem a função de catalisar proteínas ubiquitinadas, ou seja, proteínas anormais ou que tenham sido danificadas devido ao estresse salino (XU et al., 2011).

Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GPD) é uma enzima que atua no início da via glicolítica e também foi descrita em análise proteômica em plântulas de soja sob estresse salino. A queda na expressão destas proteínas resulta numa menor produção de ATP. Assim, os autores sugerem que esta proteína pode ser uma estratégia importante para aumentar a tolerância ao estresse (SOBHANIAN; AGHAEI; KOMATSU, 2011; SOBHANIAN et al., 2010).

Valdés et al. (2013) também relata que proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos podem fornecer proteção estrutural em resposta ao estresse hídrico, e que maiores níveis de fatores de iniciação da tradução podem facilitar a tradução seletiva de mRNA expressas sob estresse.

A proteína 231 foi observada em maiores quantidades nos tratamentos 4 e 6, ou seja, em processo de germinação após condicionamento fisiológico.

Em análise proteômica de sementes de *Arabidopsis* submetidas a condicionamento fisiológico seguido de secagem, Gallardo et al. (2001) verificaram aumento na abundância de proteínas como: produtos de degradação de  $\beta$ -subunidades de 12S-cruciferina, o que reforça a teoria de que durante o condicionamento há mobilização de reservas; subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina, que estão relacionadas com a reativação da atividade do ciclo celular, catalase, uma peroxidase que age de forma a minimizar danos à célula resultados do estresse oxidativo; e também proteínas HSPs, que por terem atividade de chaperonas moleculares, têm a função de manter a conformação adequada de outras proteínas durante um evento de estresse hídrico.

Yacoubi et al. (2011) encontraram resultado semelhante em análise proteômica em sementes de alfafa após condicionamento fisiológico induzido por PEG. Proteínas pertencentes à categoria HSP70, tiorredoxina, peroxirredoxinas lipoxigenase, superóxido dismutase de manganês e glutathione S dismutase estiveram mais abundantes em sementes após o condicionamento. Tais proteínas são relacionadas com respostas a estresses, o que sugere que o condicionamento agiu como um estresse osmótico. Chen e Arora (2011) explicam que o condicionamento pode constituir um estresse, não apenas devido à restrição hídrica moderada que impõem, mas também devido à secagem em que as sementes são submetidas após o tratamento.

A germinação após o condicionamento pode manter a expressão de algumas proteínas que já haviam sido identificadas após tal tratamento. Foi o caso de proteínas como HSP, superóxido dismutase, glutathione S-transferase, peroxiredoxina e lipoxigenase em sementes de alfafa (YACOUBI et al., 2011), no qual tais proteínas já haviam sido observadas com maior expressão durante o condicionamento e mantiveram-se altas também durante a posterior germinação. Algumas destas proteínas são comuns também em condições de estresses. Isto reforça a teoria de que o *priming* é um estresse pré-germinativo que imprime nas sementes uma memória ao estresse, permitindo maior tolerância a estresses germinativos posteriores em consequência da manifestação de tolerância cruzada induzida pelo *priming* (CHEN; ARORA, 2011).

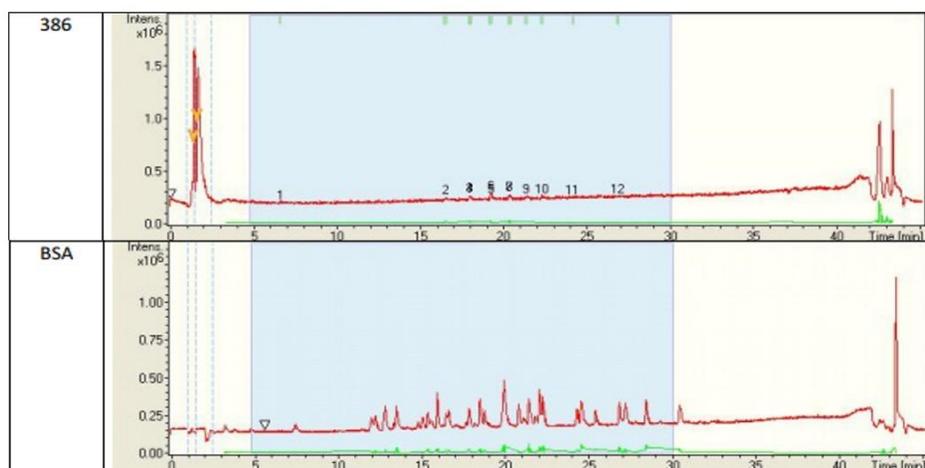
#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os pontos de proteínas foram excisados de 1, 2 ou 3 géis. Pontos de proteínas maiores foram excisados de apenas 1 gel, enquanto que pontos menores foram excisados de até 3 géis. Estes foram enviados para identificação no Laboratório Central de Biologia Molecular do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

Os fragmentos de gel de poliacrilamida foram lavados, descorados e secos em água e acetonitrila e posteriormente reidratados em uma solução de tripsina. Após a digestão, os peptídeos tripticos foram eluídos e concentrados, para injeção no sistema HPLC/MS. A mistura de peptídeos foi separada em uma coluna C-18 e analisada em um espectrômetro de massa, sendo os espectros gerados comparados com os bancos de dados EUCAWOOD, Swissprot e NCBI, visando identificação das proteínas.

Não foi obtido sucesso na identificação de nenhuma das amostras enviadas, e a provável razão para este insucesso foi a baixa quantidade de proteína nos excisados. Neste caso, o problema poderia ser contornado aumentando-se a área do excisado e/ou excisando *spots* de mais géis. Na figura 5 são apresentados os cromatogramas referentes a uma das amostras enviadas para a identificação (proteína 386) em comparação com BSA, padrão utilizado para verificar as condições de funcionamento do equipamento.

Novas análises serão realizadas contemplando-se uma maior amostragem.



**Figura 5:** Cromatogramas gerados após análise de amostras de proteínas em espectrômetro de massa, referente ao spot 386 do gel bidimensional de proteínas totais extraídas de sementes de *E. urophylla*, e padrão BSA

## 5 CONCLUSÃO

O condicionamento fisiológico induzido por polietilenoglicol a - 1,0 MPa, por três dias, possibilitou o aumento na porcentagem e velocidade de germinação em sementes de *Eucalyptus urophylla* submetidas à germinação sob estresse salino, demonstrando ser eficiente para induzir resistência a este estresse.

A análise proteômica permitiu identificar 21 proteínas com diferença significativa entre os tratamentos, possivelmente relacionadas ao processo de germinação e tolerância a estresses.

## PROTEOMIC ANALYSIS OF EUCALYPTUS SEEDS DURING GERMINATION AND CONDITIONING

### ABSTRACT

In this work, we assessed the effect of physiological conditioning, and of seed germination under salt stress, using seeds of *Eucalyptus urophylla*, by studying the differential proteins expression using the technique of 2D polyacrylamide gel electrophoresis. Previous studies showed the best physiological treatments for inducing greater seed tolerance to salinity of the germination medium. The conditioning method did not affect the final percentage of seeds in the germination process in water, but led to high tolerance and resulted in greater final germination percentage for those seeds in the germination process in salt solution. Thus, total proteins were isolated and separated by the 2D gel electrophoresis from the following six samples: one of dry seeds, one of seeds conditioned at -1.0 Mpa for three days, and four of seeds in the germination process (in water and at -1.0 Mpa in NaCl, these for 6 hours and for 6 hours after conditioning). The proteomic profile revealed the presence of around 415 protein spots into gels stained using Coomassie brilliant blue, from which 21 spots differentially expressed were selected. Such proteins may be associated with reserve proteins or breaking of these proteins during germination or conditioning processes. Therefore, with the repair or defense of cellular damages, these spots may be involved in cell cycle and, mainly, we hope identifying proteins associated with tolerance to low water availability or with tolerance to salt conditions.

Key-words: Forestry seeds. Proteins. Salt stress. Tolerance. *Eucalyptus urophylla*.

## REFERÊNCIAS

BALBUENA, T. S. et al. Challenges in proteome analyses of tropical plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 23, n. 2, p. 91-104, 2011.

BEWLEY, J. D. et al. **Developmente and maturation in seeds:** physiology of development, germination and dormancy. Berlin: Springer Science, 2013. 392p.

BOVE, J.; JULLIEN, M.; GRAPPIN, P. Functional genomics in the study of seed germination. **Genome Biology**, Ottawa, v. 3,n. 1,p.1002.1-1002.5, Dec. 2001.

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

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes:** ciência, tecnologia e produção. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 429 p.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Science**, Shannon, v. 180, n. 2, p. 212-220, 2011.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J. K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 2, p. 437-448, 2005.

DIAS, N. D.; BLANCO, F. F. Efeitos dos sais no solo e na planta. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (Ed.). **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, 2010. p. 129-140.

ESTEVES, B. S.; SUZUKI, M. S. Efeitos da salinidade em plantas. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p.662-679, 2008.

FOOLAD, M. R. et al. Genetic relationships among cold, salt and drought tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. **Euphytica**, Wageningen, v. 130, n. 2, p. 199-206, 2003.

GALLARDO, K. et al. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, n. 2, p. 835-848, Oct. 2001.

GALLARDO, K. et al. Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic process related to reserve accumulation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, p. 664-682, Oct. 2003.

JISHA, K. C.; VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. T. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 35, n. 5, p. 1381-1396, May 2013.

JOSÉ, A. C. et al. Protein expression upon desiccation and imbibition of *Magnolia ovata* seeds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 3, p. 465-476, May/June 2011.

KERMODE, A. R.; FINCH-SAVAGE, B. E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In:BLACK, M.;PRITCHARD, H.W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants**. Wallingford: CAB International, 2002. p. 149-184.

KOSOVA, K. et al. Plant proteome changes under abiotic stress- contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal Proteomics**, Weinheim, v. 74, n. 8, p. 1301-1322, Aug. 2011.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531p.

LAULHERE, J. P.; LESCURE, A. M.; BRIATS, J. F. Purification and characterization of ferritins from maize, pea, and soyabean seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 263, n.21, p. 10289-10234,1988.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005.495p.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, n.9, p. 405-410, 2002.

PASTORI, G. M.; FOYER, C. H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress: the central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, n. 2, p. 460-468, 2002.

RAVET, K.et al. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 400-412, Feb. 2009.

SHABALA, S.; MUNNS, R. Salinity stress: physiological constraints and adaptive mechanisms. In: SHABALA, S. (Ed.). **Plant stress physiology**. Oxford: CAB International, 2012. p. 59-93.

SOBHANIAN, H.; AGHAEI, H.; KOMATSU, S. Changes in the plant proteome resulting from salt stress: toward the creation of salt-tolerant crops? **Journal of Proteomics**, New York, v.74, n. 8, p.1323-1337, Aug. 2011.

SOBHANIAN, H. et al. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. **Proteome Science**, London, v. 8, n. 19, p.1-15, Mar. 2010.

SOEDA, Y. et al. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 137, n. 1, p. 354-368, 2005.

TIMPERIO, A.M.; EGIDI, M. G.; ZOLLA, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). **Journal of Proteomics**, New York, v.71, n. 4, p.391-411, Oct. 2008.

SUN, W. Q. Methods for the study of water relations under desiccation stress. In: BLACK, M.;PRITCHARD, H. W.(Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. p.47-92.

VALDÉS, A. E. et al. Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): a research on plant morphology, physiology and proteomics. **Journal of Proteomics**, New York, v.79, n. 21, p. 263-276, Feb. 2013.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Regulation of abscisic acid biosynthesis. **Plant Physiology**, Bethesda, v.133, n. 1, p.29-36, Sept. 2003.

XU, X. et al. Proteomic analysis of seed germination under salt stress in soybeans. **Journal of Zhejiang**, Hangzhou, v. 12, n. 7, p.507-517, 2011.

YACOUBI, R. et al. Toward characterizing seed vigor in alfalfa through proteomic analysis of germination and priming. **Journal Proteome Research**, Washington, v. 10, n. 9, p. 3891-3903, 2011.

YANG, Y. et al. Germination, osmotic adjustment, and antioxidant enzyme activities of gibberellin-pretreated *Picea asperata* seeds under water stress. **New Forests**, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 231-243, 2010.

**ANEXOS**

ANEXO A: Saída do quadro de Análise de Variância (significância dos valores de F) para as variáveis porcentagem de germinação e IVG para sementes de *E. urophylla*.

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>% Germ</b>	<b>IVG</b>
<b>Trat</b>	3	0,0000 *	0,0000 *
<b>Resíduo</b>	12		
<b>TOTAL</b>	15		
<b>CV (%)</b>		<b>11,37</b>	<b>7,33</b>

\*: significativo a  $p < 0,05$

ns: não significativo