



RAYANA DE SÁ MARTINS

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO EFEITO DO
CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO E DO
CHOQUE TÉRMICO EM SEMENTES DE
*Eucalyptus urophylla***

**LAVRAS - MG
2015**

RAYANA DE SÁ MARTINS

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO EFEITO DO CONDICIONAMENTO
FISIOLÓGICO E DO CHOQUE TÉRMICO EM SEMENTES DE
*Eucalyptus urophylla***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Anderson Cleiton José

**LAVRAS – MG
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Martins, Rayana de Sá.

Análise proteômica do efeito do condicionamento fisiológico e do choque térmico em sementes de *Eucalyptus urophylla* / Rayana de Sá Martins. – Lavras : UFLA, 2015.

79 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Anderson Cleiton José.

Bibliografia.

1. Condicionamento osmótico. 2. Eucalipto. 3. Estresse. 4. Proteínas. 5. Sementes florestais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

RAYANA DE SÁ MARTINS

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO EFEITO DO CONDICIONAMENTO
FISIOLÓGICO E DO CHOQUE TÉRMICO NO DESEMPENHO DE
SEMENTES DE *EUCALYPTUS UROPHYLLA***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2015.

Dr. José Marcio Rocha Faria UFLA

Dr. Julio Maia de Oliveira UNESP

Dr. Anderson Cleiton José
Orientador

**LAVRAS – MG
2015**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de compartilhar esta experiência, proporcionando-me força e determinação.

À minha família, pelo amor incondicional, paciência, dedicação, apoio e incentivo de sempre.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade concedida e suporte para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Dr. Anderson Cleiton José, pelo incentivo, presteza, ensinamentos e auxílio nas atividades e discussões, em todas as etapas deste trabalho.

Ao Dr. José Marcio Rocha Faria, pelas sugestões e contribuições proporcionadas durante a elaboração deste trabalho.

À Dra. Olívia Alvina Oliveira Tonetti pelos ensinamentos e instruções na condução dos trabalhos.

Ao Dr. Júlio Maia de Oliveira pela disponibilidade de participação na banca.

Aos colegas do Laboratório de Sementes Florestais (LSF) da UFLA pelos momentos vivenciados de distração, amizade, contribuições, incentivo e muitas risadas.

Aos companheiros de mestrado da Biotecnologia, Naty e Jaire, e meu amigo Bruneca, pela amizade, apoio e ajuda de sempre.

Aos Laboratórios de Sementes Florestais e Biotecnologia Florestal da UFLA, por fornecerem as instalações para a realização deste experimento.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) pelo sequenciamento das proteínas, em especial à Kalynka e ao Fabrício pela disponibilidade e ajuda durante esta etapa do experimento.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa (UFV) por disponibilizar equipamentos necessários para esta pesquisa.

RESUMO

O condicionamento fisiológico é um tratamento pré-germinativo aplicado em sementes com o objetivo principal de acelerar e uniformizar a germinação das mesmas, além de aumentar a tolerância a estresses. Assim, o condicionamento de sementes pode ser considerado um fator de estresse inicial, podendo ativar genes que serão expressos de uma maneira mais rápida e intensa em reposta a um estresse posterior. O objetivo neste trabalho foi avaliar o efeito do condicionamento fisiológico e do choque térmico (CT) no desempenho de sementes de *Eucalyptus urophylla* sob diferentes temperaturas e estudar o efeito destes tratamentos na alteração da quantidade de proteínas através da análise proteômica. Para isto, foram utilizadas sementes secas (controle) e condicionadas em tubos falcon contendo soluções de polietilenoglicol (PEG) no potencial de -1,0 MPa por 3 dias à 20°C no escuro, seguidas ou não de CT. Posteriormente as sementes foram colocadas para germinar durante 14 dias, sob luz constante, em mesa termogradiante em 5 temperaturas variando entre 9 a 31°C. Como o condicionamento (PEG/PEG + CT) aumentou significativamente a germinação de sementes de *Eucalyptus urophylla* à 9°C e apresentou o maior índice de velocidade de germinação (IVG) à 31°C, os tratamentos escolhidos para análise proteômica foram as três condições das sementes (sementes secas, PEG e PEG + CT) nas temperaturas extremas (9 e 31°C) e como controle as sementes secas. Proteínas totais foram extraídas de cada tratamento pelo método uréia/tiuréia e separadas por eletroforese bidimensional. Através da proteômica comparativa, foi possível analisar a alteração na abundância de proteínas e relacionar suas funções com os resultados obtidos neste trabalho.

Palavras-chave: Condicionamento osmótico. Eucalipto. Estresse. Proteínas. Sementes florestais.

ABSTRACT

Priming is a pre-germinative treatment applied to seeds aiming to accelerate and synchronize germination, but also to increase stress tolerance. Thus, seed priming is thought to be an initial stress signal that could activate genes to facilitate quicker and more potent responses to subsequent stresses. The aim of this study was to evaluate priming and heat shock effects on *Eucalyptus urophylla* seeds under different temperatures and the effects of these treatments on protein abundance by proteomic analysis. In this study, dry seeds (control) were employed and treated in polyethylene glycol (PEG) at the potential of -1.0 MPa at 20°C in the dark for 3 days, followed or not by heat shock. Seeds were subsequently germinated for 14 days under constant light in a thermogradient table ranging from 9 to 31°C. Priming followed or not by heat shock significantly increased *Eucalyptus urophylla* seed germination at 9°C and induced the highest germination rate index at 31°C. Therefore, treatments chosen for proteomic analysis were the three conditions of seeds at extreme temperatures (9 and 31°C) and dry seeds for control. Total proteins were extracted from each sample using urea/thiourea method and were analyzed by two-dimensional electrophoresis. By comparative proteomics, we identified changes in protein abundance and related those changes to their function and the results obtained in the physiological experiments.

Keywords: Priming. *Eucalyptus*. Stress. Proteins. Forest seeds.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	O gênero <i>Eucalyptus</i> e sua importância no Brasil	11
2.2	Condicionamento Fisiológico de Sementes	13
2.3	Tolerância a estresse	16
2.4	Estresse térmico	18
2.5	Proteômica	20
2.6	Eletroforese Bidimensional	21
2.7	Espectrometria de massas	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Obtenção e beneficiamento das sementes	25
3.2	Condicionamento osmótico	25
3.3	Choque térmico	26
3.4	Germinação em mesa termogradiante	26
3.5	Delineamento experimental e análise estatística	27
3.6	Material vegetal para análise proteômica	27
3.7	Extração de proteínas totais	28
3.8	Determinação da concentração de proteínas	29
3.9	Focalização Isoelétrica	29
3.10	Segunda Dimensão	30
3.11	Coloração dos géis	31
3.12	Captura das imagens e análise dos géis bidimensionais	32
3.13	Excisão dos <i>spots</i> diferencialmente expressos	32
3.14	Obtenção dos peptídeos tripsinolisados	33
3.15	Espectrometria de massas	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Germinação em mesa termogradiante	35
4.2	Avaliação da separação das proteínas	41
4.3	Análise das imagens dos géis	42
4.4	Identificação de proteínas por espectrometria de massas	49
4.5	Classificação funcional das proteínas	51
4.5.1	Globulina 11S (subunidade beta)	52
4.5.2	Citocromo <i>c</i> oxidase (subunidade III)	54
4.5.3	Transportador plastídico de glicose	56
4.5.4	Proteína relacionada ao retinoblastoma	57
4.5.5	Enzima málica dependente de NAD (isoforma 65 KDa)	59
4.5.6	Proteína de resistência a requeima	60
4.5.7	Proteína hipotética EUGRSUZ_J00903	61
5	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui cerca de 5,1 milhões de hectares em áreas plantadas com eucalipto (ABRAF, 2013). O gênero *Eucalyptus* oferece vantagens quando comparado a outras espécies florestais, como o rápido crescimento, a alta capacidade de rebrota após a colheita, grande incremento de matéria seca, alta capacidade de produção de celulose, cobertura de solo, produção de óleos essenciais e ainda conta com um eficiente modo de propagação clonal (SBS, 2009). Devido a tantas qualidades, o eucalipto é amplamente empregado e o seu plantio e uso vem crescendo pelo mundo.

Uma das principais restrições à sobrevivência e produtividade de algumas espécies de eucalipto tem sido o seu plantio em áreas com características desfavoráveis ao seu cultivo, como a deficiência hídrica, no solo, juntamente com alta temperatura. Estresses abióticos limitam a produtividade das plantas e têm um papel importante na determinação de como ocorre a distribuição das espécies vegetais ao longo dos diferentes tipos de ambientes encontrados no mundo. Seus efeitos têm recebido muita atenção de pesquisadores devido aos impactos potenciais que as mudanças climáticas podem causar em todas as formas de vida no planeta (ALLEY; BERNTSEN; BINDOFF, 2007).

O condicionamento fisiológico de sementes é uma técnica utilizada como modelo para estímulo de genes que conferem tolerância a estresse. A descoberta destes genes, a determinação de seus padrões de expressão em resposta ao estresse abiótico e o melhor entendimento de seu papel na adaptação ao estresse (CUSHMAN e BOHNERT, 2000), juntamente com o conhecimento sobre a transdução dos sinais para desenvolvimento continuado de seleção e táticas transgênicas (XIONG e ZHU, 2002), fornecerão a base de novas

estratégias para melhorar a tolerância das culturas ao estresse. Dessa forma, o entendimento dos efeitos da deficiência hídrica nas plantas é vital para a melhoria de práticas de manejo e melhoramento do eucalipto (RAMPINO et al., 2006) e uma das alternativas para amenizar seus efeitos é a seleção e uso de genótipos com características de tolerância a estresse para sua introdução em programas de melhoramento genético (SILVA et al., 2007).

Muitas alterações fisiológicas e morfológicas podem acontecer na planta para que essa se adapte ao estresse e sobreviva. Estas alterações podem ser sinalizadas por meio da presença de determinadas proteínas. A grande quantidade de informações obtidas através do avanço de pesquisas nas áreas da genômica e pós-genômica têm ajudado na compreensão da expressão de genes e proteínas. Neste contexto, a análise do proteoma de espécies de *Eucalyptus*, no que se refere ao desempenho de suas sementes em condições de estresse hídrico e térmico, poderá levar à identificação de proteínas com alteração na sua abundância e, conseqüentemente, uma maior compreensão do efeito do condicionamento fisiológico para o entendimento das respostas das plantas a estresses abióticos. Estudos sobre proteômica em sementes de *Eucalyptus urophylla* submetidas ao estresse hídrico ainda são escassos na literatura, o que torna este trabalho de grande importância para pesquisas na área de biotecnologia florestal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Eucalyptus* e sua importância no Brasil

O gênero *Eucalyptus* L'Herit pertence à família Myrtaceae, sendo composto por mais de 700 espécies. São descritos dentro do gênero *Eucalyptus*

10 subgêneros, sendo o principal o *Symphyomyrtus*, com mais de 470 espécies, dentre as quais estão as mais plantadas para fins comerciais *E. grandis*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. calmadulensis*, *E. saligna* e *E. tereticornis* (GRATTAPAGLIA et al., 2012). O *Eucalyptus* é endêmico da Austrália, com a exceção de *E. deglupta*, *E. orophila*, *E. urophylla* e *E. wetarensis* que são naturais da Indonésia, Filipinas e Papua Nova Guiné. Espécies do gênero *Eucalyptus* adaptaram-se muito bem à imensa diversidade de habitats resultantes das grandes diferenças climáticas (GRATTAPAGLIA et al., 2012). Assim, este gênero é conhecido por sua ampla variedade genética, o que fornece a base para programas de melhoramento de espécies adaptadas a um amplo espectro de ambientes.

Espécies de *Eucalyptus* são reconhecidas pelo seu rápido crescimento, boa qualidade de madeira, grande adaptabilidade aos mais diversos climas e solos e facilidade de manejo por plantio direto e rebrota (POTTS, 2004). Atualmente o eucalipto é plantado em mais de 90 países, onde são utilizados para diversos produtos florestais tais como madeira sólida, postes, energia, celulose, carvão vegetal, óleos essenciais e tanino (GRATTAPAGLIA et al., 2012). Sendo assim, o plantio de eucalipto constitui uma das melhores alternativas para atender às diversas demandas da sociedade em bases sustentáveis podendo ser a solução para diminuir a pressão sobre as florestas nativas (MORAES, 2011).

As florestas plantadas possuem importância comercial, social e ambiental, despertando interesse quanto à produção de madeira, uma vez que representam importante fonte de biomassa capaz de atender a demanda e a necessidade global de recursos renováveis, bem como produção de celulose. O plantio do *Eucalyptus*, devido ao uso múltiplo de sua madeira, tem estimulado não somente o desenvolvimento da cultura no país, mas também do setor

florestal como um todo (SBS, 2009). Em 2012, a área ocupada por plantios florestais de *Eucalyptus* e *Pinus* no Brasil totalizou 6,66 milhões de hectares, sendo 76,6% correspondente à área de plantios de *Eucalyptus*, ou seja, 5,1 milhões de ha, representando crescimento de 4,5% em relação a 2011. O principal fator que desencadeou esse crescimento foi o estabelecimento de novos plantios frente à demanda futura dos projetos industriais do segmento de papel e celulose (ABRAF, 2013). Atualmente, os plantios de eucalipto estão espalhados pelo território nacional, principalmente, nos estados de Minas Gerais (28,2%), São Paulo (20,4%), Bahia (3,9%), Mato Grosso do Sul (11,9%), Rio Grande do Sul (2,1%), Espírito Santo (5,6%) e Paraná (11,5%) (ABRAF, 2013).

Os programas de melhoramento genético e de silvicultura clonal foram os responsáveis pelos ganhos significativos em produção e de qualidade da madeira (GOLLE et al., 2009). Assim, a busca por maior produtividade e melhor qualidade no setor florestal tem demandado a procura por materiais genéticos que se adaptem a essa situação. A existência da variabilidade genética é importante para a continuidade das espécies, e também, para que, por meio do melhoramento genético, sejam obtidas novas combinações de maior interesse para o homem. Além disso, mudanças climáticas podem ocorrer tornando-se necessária a obtenção de novas cultivares de plantas mais adaptadas a essas condições.

2.2 Condicionamento Fisiológico de Sementes

Diversos fatores podem afetar a germinação das sementes, entre eles pode-se citar a temperatura, luz e conteúdo de água no solo. Sabe-se que o estresse pode gerar perdas, mas também pode acarretar respostas de prevenção e reparo (KRANNER et al., 2010) fazendo com que as sementes se aclimatem,

passando a tolerá-lo (PEREIRA et al., 2009). Em sementes, o condicionamento fisiológico tem sido estudado com a finalidade de se conhecer os efeitos gerados pela deficiência hídrica durante o processo germinativo e estabelecimento de plântulas.

O condicionamento fisiológico ou *priming* é um tratamento pré-germinativo aplicado em sementes que está relacionado ao controle da absorção de água pelas sementes, promovendo a iniciação de algumas atividades metabólicas inerentes ao processo germinativo, porém, prevenindo a protrusão radicular. Em seguida as sementes são secas, até atingirem seu conteúdo de água inicial. Em geral, após a aplicação do *priming*, os principais resultados observados são: melhoria da emergência em campo, aumento da velocidade e uniformidade de germinação, quebra de dormência, além do aumento da tolerância a estresses (bióticos e abióticos) (CHEN, FESSEHAIE, ARORA, 2012; VARIER, VARI, DADLANI, 2010).

O controle da embebição pode ser feito através de diferentes métodos, como o osmocondicionamento, no qual as sementes são colocadas em soluções de potencial osmótico conhecido; o matricondicionamento, em que o controle da embebição pela semente é feito por uma matriz sólida; o hidrocondicionamento, que utiliza a água para iniciar alguns eventos germinativos (GHASSEMI-GOLEZANI et al., 2008). Durante o condicionamento as sementes absorvem água na fase I e II promovendo processos de reparo no DNA e mitocôndrias, bem como a síntese de novos RNAs e proteínas. A grande diferença é que, com o condicionamento, a taxa de absorção de água é muito mais lenta e controlada (VARIER; VARI; DADLANI, 2010), possibilitando a semente se aclimatar a posteriores condições adversas.

No condicionamento osmótico, geralmente utilizam-se substâncias como polietilenoglicol (PEG), manitol e sais orgânicos. O PEG é muito utilizado por

ser inerte, atóxico e de fácil manuseio. Já foram relatados trabalhos em que, as sementes, após serem condicionadas em soluções de PEG tiveram um aumento na porcentagem e/ou velocidade de germinação (LIMA e MARCOS FILHO, 2009; SANTOS, SILVA-MANN, FERREIRA, 2011). Nesse tipo de condicionamento, os efeitos positivos são também evidentes nas sementes sob condições de estresse, em que não só a taxa de germinação aumenta como também o percentual final de germinação e o crescimento de plântulas. Pereira et al. (2009) demonstraram que o condicionamento osmótico de sementes de cenoura em soluções de PEG aumentou a emergência de plântulas em campo e o seu desempenho sob temperatura sub e supra-ótima. Resultados semelhantes foram observados em sementes de espinafre condicionadas em PEG (CHEN; FESSEHAIE; ARORA, 2012).

A identificação dos genes induzidos em resposta ao estresse hídrico ocasionado pelo condicionamento fisiológico é de grande importância, uma vez que os genes que conferem tolerância podem ser identificados e manipulados para se estabelecer a importância das proteínas por eles codificadas. Na literatura é possível encontrar trabalhos evidenciando alguns eventos específicos da condição de *priming*. Gallardo et al. (2001) por exemplo, demonstraram algumas proteínas que apareciam somente quando sementes de *Arabidopsis thaliana* passavam pelo condicionamento. Yacoubi et al. (2011) identificaram proteínas com alteração diferencial de seus níveis em condições de *priming* em *Medicago sativa*. Weitbrecht, Muller, Leubner-Metzger (2011) propuseram que a ativação da respiração e a rápida produção de ATP parecem ser eventos metabólicos primários induzidos pelo condicionamento fisiológico de sementes.

Desta maneira, o condicionamento fisiológico pode ser usado para conferir às sementes tolerância ao estresse, melhorando seu desempenho sob condições adversas como, por exemplo, a baixa disponibilidade de água e

temperaturas extremas (BRADFORD, 1990) e pode servir como um modelo de estudo para a busca de proteínas funcionais associadas à tolerância a estresses.

2.3 Tolerância a estresse

Durante a germinação em condições naturais, as sementes estão expostas a diferentes variáveis ambientais, como alterações na temperatura, umidade, salinidade, etc. Estas alterações podem ser sentidas pelas sementes na forma de um distúrbio ou estresse. Nem sempre o estresse traz resultados deletérios para as sementes. Caso a intensidade e a duração do estresse sejam moderados, as sementes podem responder a uma situação de risco mais rapidamente, preparando-as para enfrentar uma condição desfavorável durante a germinação e estabelecimento das plântulas (KRANNER et al., 2010).

A exposição de sementes a determinados agentes osmóticos que promovem o osmocondicionamento (como o polietilenoglicol), ou mesmo o processo de secagem posterior ao processo de osmocondicionamento, pode ser considerada um fator de estresse inicial que podem ativar uma série de genes, criando uma espécie de “memória” vegetal àquele dado estresse. Numa possível nova exposição, a resposta a este mesmo estresse será mais rápida e potencializada (CHEN; FESSEHAIE; ARORA, 2012).

Devido à grande variação na morfologia e fisiologia das sementes existem estímulos que podem ser entendidos de maneiras diferentes. Um exemplo disso é a secagem durante a maturação que é sentida como um fator positivo pelas sementes ortodoxas, induzindo vários mecanismos que as prepararão para sobreviverem em estado seco, como a síntese de osmoprotetores, proteínas LEA, carboidratos, antioxidantes, etc (BUITINK e LEPRINCE, 2004; HOEKSTRA, GOLOVINA, BUITINK, 2001).

Segundo Roveda Hoyos e Fonseca Moreno (2011), as plantas respondem ao déficit hídrico através de alterações em uma série de processos ao nível fisiológico, celular e molecular, e estas alterações podem levar à tolerância ao estresse. O efeito do estresse hídrico em termos fisiológicos tem sido amplamente pesquisado, e englobam, por exemplo, fechamento estomático, redução no crescimento celular, diminuição da atividade fotossintética e aumento da respiração (CARVALHO et al., 2009).

Ao nível celular, as plantas respondem e adaptam-se ao déficit hídrico acumulando osmólitos e sintetizando proteínas específicas. Soeda et al. (2005) identificaram a expressão de genes relacionados à tolerância a estresse durante o condicionamento de sementes de *Brassica oleracea*, como SOD (*superoxide dismutase*), HSP (*heat shock proteins*) e LEA (*late embryogenesis abundant*). Em outro estudo, a análise comparativa dos genes induzidos pelo estresse hídrico em *Arabidopsis* e *Oriza sativa*, auxiliada por *microarrays*, revelou um elevado grau de semelhança entre os dois genomas ao nível molecular sendo identificados 73 genes como resultado da indução de estresse hídrico (RABBANI et al., 2003). Em uma outra pesquisa (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SEKI, 2003), 51 genes foram relatados com funções semelhantes em *Arabidopsis*. Estes resultados confirmam que há genes comuns que são induzidos pelo estresse em espécies que evoluíram separadamente por mais de um milhão de anos, como *Arabidopsis* e *O. sativa* (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

A cascata gênica ativada durante a exposição a um determinado estresse envolve genes que também são responsivos a outros tipos de estresses (JISHA et al., 2013). Portanto, há um sistema comum de sinais que promove defesa e proteção contra diferentes tipos de estresses. Esse fenômeno é conhecido como tolerância cruzada (CUSTÓDIO et al., 2009; COLMAN et al., 2014).

Estudos em soja demonstraram que sementes submetidas a um tratamento osmótico tornaram-se mais tolerantes a baixas temperaturas (ZHUO et al., 2009). Já nos trabalhos de Custódio et al. (2009) e Colman et al. (2014), houve melhor desempenho das sementes de feijão à restrição hídrica, nos tratamentos que passaram por choque térmico logo após o condicionamento. Sendo assim, estudos visando entender e comparar os mecanismos do osmocondicionamento a outros estresses também podem servir na elucidação do fenômeno da tolerância cruzada, revelando assim, sobreposições nas redes gênicas envolvidas nestes processos.

Raramente na natureza, a planta está sujeita a um fator de estresse único e sem a influência de outros fenômenos. Assim, a tolerância adquirida ao estresse é resultado de vários mecanismos que agem de maneira coordenada na tentativa de restabelecer a homeostase celular (WANG et al., 2004). Sendo assim, torna-se de grande importância compreender os processos fisiológicos e os mecanismos pelos quais as plantas percebem os sinais ambientais e transmitem à maquinaria celular para ativar resposta de adaptação e aclimação de plantas aos estresses ambientais que conferem tolerância e asseguram a sobrevivência das plantas (XIONG e ZHU, 2002).

Assim, a transferência de genes que supostamente conferem tolerância ao estresse da planta, poderá fornecer novas informações científicas no estudo de genes envolvidos na tolerância ao estresse.

2.4 Estresse térmico

Mudanças na temperatura ambiental são acontecimentos altamente variáveis aos quais as funções celulares das plantas necessitam se ajustar constantemente. Como formas de vida sésseis, as plantas precisam desenvolver

mecanismos que possam sentir e responder às variações na temperatura de uma forma muito rápida e flexível para assegurar a continuidade e funcionalidade das atividades celulares (SCHOFFL; PRANDL; REINDL, 1998).

De acordo com Arndt et.al. (2012) e IPCC (2014), a maioria dos cenários das alterações climáticas aponta para um aumento da aridez em muitas áreas do globo terrestre, tornando os estudos de respostas das plantas ao estresse hídrico cada vez mais importante. A resposta da planta à seca começa com alguns sinais de estresse que causam várias mudanças fisiológicas (KUZNETSOV; RAKITIN; ZHOLKEVICH, 1999), como supressão da fotossíntese, aumento da respiração, indução de grande número de genes de defesa e mudanças nos genes envolvidos no metabolismo de açúcares, bem como alterações na expressão de HSPs (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SEKI, 2003). Rizhsky, Hongjian, Mittler (2002) demonstraram que a combinação de deficiência hídrica e choque térmico resultam na ativação de um programa genético único que é diferente daquele ativado durante o estresse hídrico ou térmico separadamente.

Nas sementes, a germinação também é afetada já que a disponibilidade de água é considerada de grande importância por influenciar no progresso de muitas reações metabólicas (SOUZA e CARDOSO, 2000). Potenciais muito negativos do substrato durante a germinação podem diminuir a absorção de água afetando a germinação das sementes. Pesquisas têm demonstrado que o estresse hídrico reduz a germinação e a probabilidade de estabelecimento de plântulas (FAROOQ et al., 2009; YANG, DONG, HUANG, 2010). Dessa forma, tratamentos preliminares utilizando o condicionamento fisiológico de sementes podem aumentar a tolerância a um subsequente estresse térmico, e através desses estudos torna-se possível a identificação das proteínas que estão relacionadas a essa resposta por meio de técnicas biotecnológicas, como a análise proteômica.

2.5 Proteômica

Proteoma é o conjunto de todas as proteínas codificadas pelo genoma de um organismo e é considerado muito complexo por ser constituído de um grande número de proteínas que variam de acordo com o evento metabólico ao qual o organismo é submetido (WASINGER et al., 1995; WILKINS et al., 1995).

Proteômica é a ciência da área de biotecnologia que estuda o conjunto de proteínas e suas isoformas contidas em uma amostra biológica em uma dada célula, tecido ou organismo (KORMUTAK; SALAJ; VOOKOVA, 2006). Essa técnica envolve a identificação, quantificação e o estudo de modificações pós-traducionais de proteínas sob uma dada condição fisiológica (KORMUTAK, SALAJ, VOOKOVA, 2006; BALBUENA et al., 2011a). Devido ao dinamismo da expressão gênica das células, a proteômica consiste então, em uma ferramenta importante para entender o funcionamento dos genes, contribuindo para um melhor entendimento de seus sistemas biológicos, através da disponibilização de informações importantes sobre proteínas, que são os principais determinantes estruturais e funcionais das células (BAGINSKY, 2009).

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, o que não pode ser detectado pela genômica e transcriptômica (BALBUENA et al., 2011a). Assim, a proteômica se destaca por agir diretamente na resposta da planta ao estresse (KOSOVÁ et al., 2011).

O primeiro passo para realizar um estudo proteômico, é a obtenção do extrato protéico, sendo uma etapa crítica na produção dos resultados finais da análise. A qualidade do extrato depende da quantidade de proteínas obtidas,

ausência de contaminantes como pigmentos, carboidratos e compostos fenólicos e variedade de proteínas extraídas para resolução de qualidade e boa separação das mesmas no gel (NEBRICH et al., 2009). Após a extração de proteínas ocorre a separação da mistura protéica e, segundo Carrette et al. (2006), a eletroforese bidimensional tem sido a estratégia mais utilizada para análise do proteoma em plantas. Apesar de ser uma técnica bastante antiga, desenvolvida em 1975 por O'Farrel e Klose (ROCHA et al., 2005), a eletroforese bidimensional (2D-E) acoplada à espectrometria de massas (MS) constitui ainda na principal plataforma utilizada para estudos de proteômica em plantas em função do desenvolvimento de novos métodos e equipamentos nos últimos anos.

Atualmente, a proteômica é considerada uma das áreas centrais da genômica funcional e utiliza-se de programas da bioinformática para a análise de dados, correlação das informações e disponibilização das mesmas em bancos de dados de domínio público (BISCH, 2004). Normalmente, o procedimento adotado é a caracterização geral do proteoma com identificação do maior número possível de proteínas ou de proteínas com abundância diferencial entre duas amostras contrastantes. A separação das proteínas ocorre em eletroforese bidimensional e sua identificação é feita através da espectrometria de massas.

2.6 Eletroforese Bidimensional

A eletroforese bidimensional é uma técnica de separação largamente usada para a análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas. Essa técnica tem por fundamento a separação das proteínas por seu ponto isoelétrico (pI) através da focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão, e pela massa molecular (MM), na segunda dimensão da eletroforese. Por combinar duas técnicas distintas de

separação ela pode ser utilizada para separar uma grande quantidade de proteínas ao mesmo tempo (ROCHA et al., 2005).

Durante a primeira dimensão, as proteínas, que são moléculas anfóteras, ou seja, podem apresentar carga líquida positiva, negativa ou neutra, são separadas em um gel de poliacrilamida com gradiente de pH de acordo com sua carga elétrica. Nesse caso, quando submetidas a um campo elétrico, as proteínas migram sob uma tira de gel (Immobilized pH Gel –IPG), até que atinjam seu ponto isoelétrico, ponto onde suas cargas ficam neutras, interrompendo a migração (SILVA; CORRÊA; REIS, 2007). Após a IEF, as proteínas são transferidas para a segunda dimensão, onde são separadas de acordo com suas massas moleculares relativas submetidas a uma eletroforese em um gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) (SILVA; CORRÊA; REIS, 2007).

O SDS é um tensoativo aniônico que tem a função de desnaturar as proteínas evitando interferências nas separações devido às formas das proteínas, isto é, converter a proteína em uma estrutura linear e conferir-lhe densidade de carga uniforme. As proteínas desnaturadas são então, submetidas a um campo elétrico. Como a taxa de migração depende de fatores como a carga da proteína, tamanho e forma as proteínas que possuem maiores MM irão migrar mais lentamente no gel, enquanto que as de menores MM migrarão mais rápido. (HOEHN e SUFFERDINI, 2005). O SDS interage com as proteínas formando um complexo proteína-SDS com carga líquida altamente negativa (a incorporação do SDS ocorre em taxa aproximada de 1,4 g de SDS por grama de proteína). Desta forma, apenas a carga negativa proveniente do SDS influencia de forma significativa para a migração das proteínas, ou seja, a carga da proteína influencia muito pouco já que o SDS está presente em todo o sistema (LEFKOVITS, 2003).

A separação de proteínas por eletroforese bidimensional possibilita a construção de mapas estruturais utilizados no estudo de proteínas presentes em diferentes tecidos e organismos, em diferentes condições e estágios, fornecendo informações acerca do crescimento e desenvolvimento da planta, permitindo a caracterização química da mesma. Em uma segunda etapa, estas proteínas devem ser identificadas, e esta identificação é realizada através de análises de espectrometria de massas e de bioinformática (NATERA; GUERREIRO; DJORDJEVIC, 2000).

2.7 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica utilizada desde o início do século XX que permite avaliar a massa molecular dos compostos e quantificá-los, identificar compostos desconhecidos, revelar a estrutura de suas moléculas e determinar as modificações pós-traducionais (CUNHA; FONTES; CASTRO, 2006). Essa ferramenta mede rapidamente, com grande precisão e sensibilidade, a massa molecular de átomos ou moléculas em Dalton (Da), a partir da razão entre a massa e a carga de moléculas ionizadas (m/z) (DASS, 2001).

O uso da espectrometria de massas por muito tempo ficou restrito a um pequeno número de moléculas capazes de resistir ao método de ionização e ao processo de análise que envolve a sua transferência para um sistema de alto vácuo e altas temperaturas, sendo um obstáculo no estudo de biomoléculas. No final da década de 80 com o desenvolvimento de dois novos métodos de ionização branda o MALDI “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization” e o ESI “Electrospray Ionization”, ocorreu uma revolução na análise de biomoléculas (HILLENKAMP; KARAS; BEAVIS, 1991). A espectrometria de

massas é, então, uma ferramenta usada em estudos de proteômica para a identificação de proteínas.

O espectrômetro de massa é um instrumento sofisticado constituído de três partes: (1) fonte de ionização, muitas vezes denominada de interface, (2) analisador de massas e (3) detector de íons com aquisição/processamento de dados. As fontes de íons consistem na parte do espectrômetro responsável pelo processo de ionização das moléculas, ou seja, transformação de moléculas neutras em íons; os analisadores de massas são a parte do espectrômetro responsável pela separação dos íons de acordo com a razão entre a massa e a carga de moléculas ionizadas (m/z), realizado através de aplicações de campos elétricos e magnéticos; e os detectores são parte final de um espectrômetro de massas, sendo responsável pela detecção e amplificação dos íons (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Na identificação das proteínas, alguns programas, interpretam os dados da fragmentação dos espectros e convertem esta informação em massas de peptídeos (*fingerprinting*) e/ou seqüências de aminoácidos, dependendo dos recursos do equipamento (SHEVCHENKO et al., 2001). Os projetos de sequenciamento de genomas ou de geração de bancos de ESTs (*Expressed Sequences Tags*) depositados em bancos de dados públicos ou privados têm gerado, cada vez mais, dados para a identificação dos resultados obtidos pela espectrometria de massas. Esta análise é realizada através de *softwares* que realizam digestões teóricas em proteínas depositadas em bancos de dados e comparam estes valores com os dados experimentais. As informações teóricas e experimentais são comparadas e os resultados desta comparação são apresentados através da área de cobertura da seqüência da proteína depositada no banco pela massa calculada dos aminoácidos presentes no peptídeo, e do *score* que determinarão à similaridade da possível proteína.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes Florestais e Laboratório de Biotecnologia Florestal do Departamento de Ciências Florestais, no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e no Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) durante os anos de 2013 e 2014.

3.1 Obtenção e beneficiamento das sementes

Foram utilizadas sementes de *Eucalyptus urophylla* adquiridas do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF). As sementes ficaram armazenadas em recipientes plásticos e condicionadas em câmara fria a ($5^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) até o início dos experimentos. Para realização dos testes, as sementes foram inicialmente beneficiadas em soprador e, em seguida, selecionadas manualmente em laboratório com auxílio de pinça, separando completamente a semente da palha.

3.2 Condicionamento osmótico

As sementes foram condicionadas em tubos Falcon® de 15 mL contendo 3,5 mL de solução de polietilenoglicol (PEG 6000) no potencial osmótico de -1,0 MPa e incubadas em germinador do tipo BOD na temperatura de 20°C no escuro. O preparo das soluções de PEG 6000 foi baseado nos cálculos e recomendações de Sun (2002). Para manter a aeração das soluções, foi feito um pequeno orifício na tampa dos tubos, e em seguida, foram colocados em agitador tipo roller, modelo MR-II, Multifunctional Mixer (Biomixer®). O

condicionamento osmótico foi realizado por 3 dias. Após o tratamento, as sementes foram lavadas rapidamente em água corrente por 30 segundos e colocadas sobre papel germitest para a retirada do excesso de água. Após o condicionamento, parte das sementes passou por secagem em condições ambientais parcialmente controladas (aproximadamente 20°C e 50% de UR) por 24h, tempo suficiente para garantir o retorno à umidade inicial, em sala climatizada, e, a outra parte passou por um tratamento de choque térmico antes da secagem.

3.3 Choque térmico

Parte das sementes foi exposta a um tratamento de choque térmico, realizado em germinador tipo BOD. Essas sementes foram depositadas em microtubos de 1,5 mL logo após saírem do condicionamento e lavagem e colocadas a uma temperatura de 45°C, durante uma hora. Em seguida, passaram por secagem nas mesmas condições citadas acima.

3.4 Germinação em mesa termogradiante

Após os tratamentos e secagem, as sementes foram colocadas para germinar em diferentes temperaturas, nas seguintes condições: sementes não tratadas (controle), sementes condicionadas (-1,0 MPa) e sementes condicionadas seguidas de choque térmico (-1,0 MPa + CT). O teste foi conduzido em placas de Petri de 9 cm sobre duas folhas de papel de germinação umedecido com água e incubadas em mesa termogradiante. O teste de germinação foi realizado em 5 intervalos de temperatura: 9, 16, 22, 24, 31°C, sob luz constante. A germinação em mesa termogradiante teve duração de 14

dias e as avaliações de contagem de protrusão radicular e plântulas normais foram feitas diariamente.

3.5 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições de 25 sementes por tratamento em esquema fatorial (3x5), constituído por três condições das sementes (sementes não tratadas = controle; sementes osmocondicionadas = PEG -1 MPa; e sementes osmocondicionadas seguidas de choque térmico = PEG -1 MPa + CT) e cinco temperaturas (9; 16; 22; 24; 31°C).

Os dados foram processados no programa estatístico SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011) através da análise de variância e quando constatada diferença entre os tratamentos pelo teste F, foi realizado o teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade para dados qualitativos ou análise de regressão para dados quantitativos. Os gráficos foram plotados no programa *SigmaPlot* versão 11.0.

3.6 Material vegetal para análise proteômica

Os tratamentos basearam-se em testes prévios que indicaram os melhores tratamentos para a realização da análise proteômica diferencial em sementes de *E. urophylla*. Foram selecionados: sementes secas (T1); sementes em processo de germinação em água por 24h à 9°C (T2); sementes em processo de germinação em água por 6h à 31°C (T3); sementes osmocondicionadas (T4); sementes osmocondicionadas em processo de germinação em água por 24h à 9°C (T5); sementes osmocondicionadas em processo de germinação em água

por 6h à 31°C (T6); sementes osmocondicionadas seguidas de choque térmico (T7); sementes osmocondicionadas seguidas de choque térmico em processo de germinação em água por 24h à 9°C (T8) e sementes osmocondicionadas seguidas de choque térmico em processo de germinação em água por 6h à 31°C (T9) (TABELA 1).

Tabela 1 – Tratamentos selecionados para a análise proteômica.

Tratamentos	Descrição
T1	Sementes secas (controle)
T2	Sementes em processo de germinação à 9°C/24h
T3	Sementes em processo de germinação à 31°C/6h
T4	Sementes osmocondicionadas (secas)
T5	Sementes osmocondicionadas em processo de germinação à 9°C/24h
T6	Sementes osmocondicionadas em processo de germinação à 31°C/6h
T7	Sementes osmocondicionadas + CT (secas)
T8	Sementes osmocondicionadas + CT em processo de germinação à 9°C/24h
T9	Sementes osmocondicionadas + CT em processo de germinação à 31°C/6h

3.7 Extração de proteínas totais

Extratos de proteínas totais foram preparados a partir de sementes inteiras de *E. urophylla*. Nove amostras de 300 mg de sementes foram maceradas em nitrogênio líquido, usando um almofariz e pilão. Para cada amostra foram realizadas três repetições. A extração foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Gallardo et al. (2003), com modificações propostas por José et al. (2011). Após a maceração, o pó foi homogeneizado em gelo com 800µL de tampão de extração uréia/tiouréia (uréia 7M, tiouréia 2M, Trizma HCl 18 mM, Trizma base 14 mM, coquetel de inibidores de protease, 12 unidades de

DNase I, 20µL de RNase A (20mg/mL), 0,2% (v/v) de Triton X-100, CHAPS 60 mM e DTT 17,5 mM). A mistura foi agitada em vórtex e os tubos foram mantidos em repouso em gelo por 20 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 foi coletado com micropipeta e armazenado a -20°C em alíquotas de 100 µL.

3.8 Determinação da concentração de proteínas

Alíquotas foram retiradas dos extratos de cada tratamento e a determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina (BSA) como padrão. Utilizou-se de um espectrofotômetro com leitura a 595 nm, onde primeiramente foi realizada a calibração do aparelho utilizando BSA como padrão em diluições para construção de uma curva de calibração. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 3 min a 14000 rpm a 4°C e foram pipetados 20 µL em cada tubo, adicionando-se 1mL do reagente de Bradford e fazendo-se a leitura com o aparelho. Tanto a curva de calibração como a leitura das amostras foram feitas em duplicatas. Através da equação gerada na calibração ($R^2 = 0,99$) pôde-se obter a concentração de proteínas totais em cada tratamento.

3.9 Focalização Isoelétrica

As proteínas foram separadas por Focalização Isoelétrica (IEF) usando gel em fita de 13 cm de comprimento com pH imobilizado entre 4 e 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 em sala climatizada à 20°C, em tampão de reidratação composto por tiuréia/uréia, contendo uréia 7M, tiuréia 2M, 1% (v/v) de IPG Buffer (Amersham Bioscience), 2,2% (v/v) de reagente Destreak, 2% CHAPS (p/v), DDT (2,8 mg/ml) e traços de azul de bromofenol. O volume final de 250 µL de tampão contendo 200 µg de proteína foi aplicado nas canaletas e após reidratação por 15 horas, as fitas foram levadas ao focalizador isoeletrico Ettan IPGphor3 (GE Healthcare), posicionadas nas canaletas e imersas em óleo mineral para eletroforese (Amersham Biosciences).

A Focalização Isoelétrica foi realizada em 4 fases: a 500V por 1 hora, 1000V por 1 hora, 8000V por 2,5 horas e 8000V por 40 minutos. 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 foram equilibradas em três etapas em solução contendo uréia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), trizma base 75 mM em pH 8,8. Na primeira etapa as fitas foram colocadas em tubos contendo 5 mL da solução de equilíbrio acrescida de DTT para concentração final de 65 mM e mantidas em agitador oscilante por 15 minutos. Na segunda etapa, as fitas foram colocadas em tubos contendo 5 mL da solução de equilíbrio e mantidas em agitador oscilante por 10 minutos. Na terceira etapa as fitas foram colocadas em tubo contendo solução de equilíbrio acrescida de iodoacetamida para concentração final de 0,2M e mantidas em agitador oscilante por 10 minutos.

3.10 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 25 mM, glicina 192 mM e traços de azul de bromofenol. Os géis permaneceram em repouso por 5 minutos para a solidificação da agarose. A eletroforese foi realizada a 20°C em tampão contendo 0,1% (p/v) de SDS, glicina 192 mM e trizma-base 25 mM, por 20 minutos inicialmente a 15 mA (por gel) e 80V e posteriormente por 4 horas a 25 mA (por gel) e 250V, numa cuba SE600 (Hoefer). Para cada tratamento foram corridos três géis carregados com proteínas de extrações independentes.

3.11 Coloração dos géis

Os géis foram inicialmente colocados por no mínimo 30 minutos em 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 0,1% (p/v) de Commassie Brilliant Blue G-250, 1,6% (v/v) ácido fosfórico, 12% (p/v) de sulfato de amônio e 20 % (v/v) de metanol. Os géis foram mantidos na solução de coloração por 72 horas. Ao fim desse período, os géis foram neutralizados por 3 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 deixados em água por mais 72 horas. Por fim, os géis foram armazenados em solução contendo 5% (v/v) de ácido acético e mantidos em câmara fria à 5°C, até que suas imagens fossem digitalizadas e os *spots* excisados.

3.12 Captura das imagens e análise dos géis bidimensionais

Os géis bidimensionais foram digitalizados utilizando densitômetro ImageScan III (GE Healthcare) com auxílio do programa LabScan 6.0 (GE Healthcare) no Laboratório de Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa. As imagens foram analisadas no programa Image Master 2D Platinum 7.0 (Amersham Bioscience) no Laboratório de Biotecnologia Florestal da Universidade Federal de Lavras. 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) gerada pelo próprio programa. Pontos de proteína com uma diferença de pelo menos 1,5 vezes e um resultado significativo na ANOVA ($p < 0,05$) foram considerados como diferencialmente expressos.

Para a obtenção da quantidade de proteína presente em cada *spot*, utilizou-se o volume normalizado dos *spots* em um gel, calculado a partir da fórmula:

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{s=1}^n (Vol_s)} \times 100, \text{ onde } Vol_s \text{ é o volume do } spot \text{ } S \text{ em um gel contendo}$$

n *spots*.

3.13 Excisão dos *spots* diferencialmente expressos

Os *spots* diferencialmente expressos foram retirados dos géis com o auxílio de um bisturi, transferidos para tubos *ependorf* e enviados ao Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da UFLA para a obtenção de peptídeos tripsinolisados do gel, realização da espectrometria de massas e posterior identificação das proteínas.

3.14 Obtenção dos peptídeos tripsinolisados

Os *spots* enviados foram desidratados com acetonitrila 100%, secos em speed vac e, posteriormente, tratados com a enzima tripsina (Promega®), a 58°C, por 30 minutos. Os peptídeos resultantes da tripsinólise da amostra foram ressuspensos em solução contendo acetonitrila 5% com ácido fórmico 0,1% e, posteriormente, analisados por espectrometria de massa.

3.15 Espectrometria de massas

Foi utilizado um espectrômetro de massa (microTOF Q-II, Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), equipado com uma interface de ionização por eletrospray, e acoplado a um sistema UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por duas bombas, (LC-20AD) e um degaseificador (DGU-20A3). As injeções foram realizadas por um injetor automático (SIL-20A HT) equipado com um loop de 100 µL, dos quais foram injetados apenas 40 µL. O sistema foi operado através do software Hystar (Bruker Daltonik, v. 3.2.44.0). Uma pré-coluna de 5 mm e uma coluna analítica de 150 mm×75 µm preenchida com fase estacionária C18, 2.7 µm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, Estados Unidos) foi utilizada para a separação dos peptídeos. As amostras foram injetadas através de um fluxo de 200 µL.min⁻¹ em uma solução a 5 % (v/v) acetonitrila e 0.1 % (v/v) AF em água (Fluka, Buchs, Suíça). A fase móvel (A) utilizada para separação foi um gradiente entre água, contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv-Fluka e acetonitrila contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv-Fluka (B). O programa utilizado para a eluição foi composto pelas seguintes proporções: 0-5 min isocrático 5% B; 5-60 min gradiente linear até 40% B; 60-70 gradiente linear até 50 % B; 70-75 gradiente linear até 90%B; 75-80 min isocrático 90%B; 80-

80.1 min alteração para 5% B; 80.1–90 min isocrático 5% B. O fluxo para separação dos peptídeos foi de 200 μLmin^{-1} . As configurações utilizadas na espectrometria de massa foram: intervalo de massa: 50–2500m/z; voltagem do spray: 2000 V; gás de secagem (N_2) temperatura: 180°C; fluxo: 9 Lmin^{-1} ; funnel 1 RF 300.0 Vpp; funnel 2 RF 400.0 Vpp; Hexapolo RF 400.0 Vpp; energia do quadrupolo 5.0 eV; menor massa do quadrupolo 322.00 m/z; energia de colisão 10.0 eV; RF da colisão 800.0 Vpp; tempo de transferência 150us; armazenamento pré-pulso 5.0 us. As configurações para o MS/MS foram: número de íons precursores: 3; limite mínimo absoluto: 2×10^3 ; limite mínimo absoluto: 0.1 %; smart exclusion após 4x; active exclusion após três espectros e por 1 min; modo de busca de peptídeos ativado, estado de carga preferido 2-4. Os dados cromatográficos obtidos via LC–MS–MS foram analisados com o software Bruker Data Analysis, version 4.0 (Build 253). O espectro de MS/MS que foi obtido no intervalo de 5-30 min foi exportado como um arquivo xml, após a deconvolução do estado de carga e utilizado para busca em banco de dados, utilizando o software Biotools Version 3.2 (Bruker Daltonik) nas seguintes condições: enzima: tripsina; modificações fixas: carbamidometilação da cisteína; modificações variáveis: oxidação da metionina; tolerância do íon precursor: 0.2 Da; foi aceita na busca uma não clivagem pela tripsina.

O perfil de massa molecular da amostra obtida por MS e MS/MS foi submetido à análise comparativa, utilizando-se o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), para a comparação das massas de peptídeos observados com bancos de dados e para a identificação das proteínas mais prováveis. Os bancos de dados utilizados nas análises foram o EUCAWOOD (<http://www.polebio.scsv.ups-tlse.fr/eucalyptus/eucawood>) e Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org>).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Germinação em mesa termograde

Na Tabela 2 são apresentadas as médias percentuais de germinação de sementes de *E. urophylla* em diferentes temperaturas nas três condições (controle, condicionadas e condicionadas seguidas de choque térmico). Apenas na germinação a 9°C foi verificada diferença significativa entre os tratamentos. Nesta temperatura as sementes condicionadas (PEG -1,0 MPa) tiveram o melhor desempenho, seguidas daquelas condicionadas que passaram por choque térmico (PEG -1,0 MPa + CT), sendo que, sementes do grupo controle apresentaram o menor percentual germinativo. Estudos em *Spinacia oleracea* (CHEN, ARORA, ARORA, 2010; CHEN, FESSEHAIE, ARORA, 2012) também sugeriram que o condicionamento fisiológico melhorou a germinação das sementes em temperatura subótima em relação ao controle.

Tabela 2 – Médias de porcentagem de germinação de sementes de *E. urophylla* sob diferentes temperaturas (°C) após os tratamentos das sementes. (Controle = sementes não condicionadas; Cond. = sementes condicionadas, Cond. + CT = sementes condicionadas seguidas de choque térmico).

Condições das sementes	Temperatura (°C)				
	9	16	22	24	31
Controle	15,00 C	87,50 A	87,50 A	98,75 A	87,50 A
Cond.	47,50 A	87,50 A	100,00 A	96,25 A	91,25 A
Cond. + CT	35,00 B	85,00 A	96,25 A	93,75 A	91,25 A
CV(%)	9,57				

Letras iguais na coluna indicam que não houve diferenças significativas pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$) entre os tratamentos das sementes dentro de cada nível de temperatura.

Para as demais temperaturas não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos das sementes de *Eucalyptus urophylla*, sendo a temperatura de 24°C a que apresentou a maior média do percentual germinativo.

Na Figura 1 encontra-se a análise de regressão dos resultados de germinação no gradiente de temperatura para cada uma das condições das sementes. Pode-se observar que todos os tratamentos proporcionaram o mesmo comportamento quanto à porcentagem final de germinação em relação às condições das sementes. Na temperatura mais baixa, todos os tratamentos apresentaram o menor percentual germinativo. Isso também foi observado no trabalho de Nascimento (2005) com hortaliças, em que baixas temperaturas diminuiriam a velocidade e a porcentagem de germinação das sementes estudadas.

Sendo assim, a temperatura em que ocorre a germinação tem grande influência sobre esse processo, pois a mesma influencia na velocidade de absorção de água e na velocidade das reações bioquímicas (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Sementes do grupo controle apresentaram um aumento do percentual germinativo com o aumento da temperatura até 24°C, na qual se observou o melhor desempenho destas sementes, seguido de um decréscimo da porcentagem final de germinação a 31°C. Este fato está de acordo com a temperatura ótima da espécie *E. urophylla* ser 25°C (BRASIL, 2013). López et al. (2000) também observaram um aumento da taxa de germinação de *E. globulus* até a temperatura ótima da espécie, seguido de uma queda em temperatura superior.

Já as sementes que passaram pelo condicionamento (seguidas ou não de choque térmico) apresentaram um aumento no percentual de germinação

juntamente com o aumento da temperatura até atingirem 22°C. Nas temperaturas superiores houve um decréscimo desse percentual germinativo.

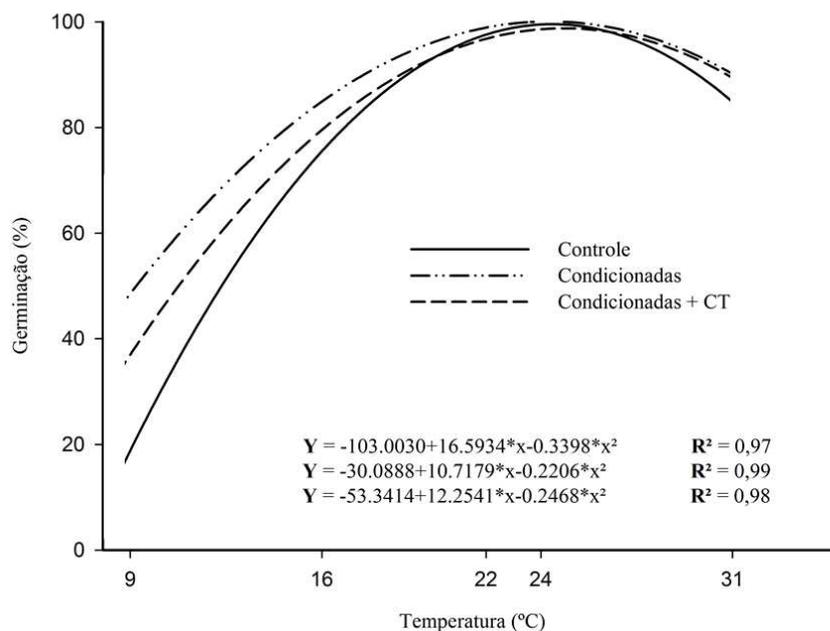


Figura 1 – Médias percentuais de germinação de sementes de *E. urophylla* em diferentes temperaturas em função do tratamento da semente.

Valores do índice de velocidade de germinação (IVG) encontram-se na Tabela 3 e a análise de regressão está representada na Figura 2. Os dados de IVG para todos os tratamentos da semente apresentaram um aumento gradativo com o aumento da temperatura. Nas temperaturas mais baixas (9 e 16°C) o IVG não diferiu estatisticamente entre os tratamentos. Nas demais temperaturas as sementes condicionadas tiveram um IVG superior, sendo que a 31°C, as sementes do grupo controle apresentaram a menor velocidade de germinação quando comparadas às sementes condicionadas seguidas ou não de choque térmico.

Tabela 3 - Médias do índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *E. urophylla* sob diferentes temperaturas (°C) após os tratamentos das sementes. (Controle = sementes não condicionadas; Cond. = sementes condicionadas, Cond. + CT = sementes condicionadas seguidas de choque térmico).

Condições das sementes	Temperatura (°C)				
	9	16	22	24	31
Controle	0,24 A	2,68 A	4,75 B	6,18 B	7,13 C
Cond.	0,89 A	3,38 A	6,52 A	8,85 A	10,87 A
Cond. + CT	0,63 A	2,85 A	5,54 B	7,01 B	8,83 B
CV(%)	15,63				

Letras iguais na coluna indicam que não houve diferenças significativas pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$) entre os tratamentos das sementes dentro de cada nível de temperatura.

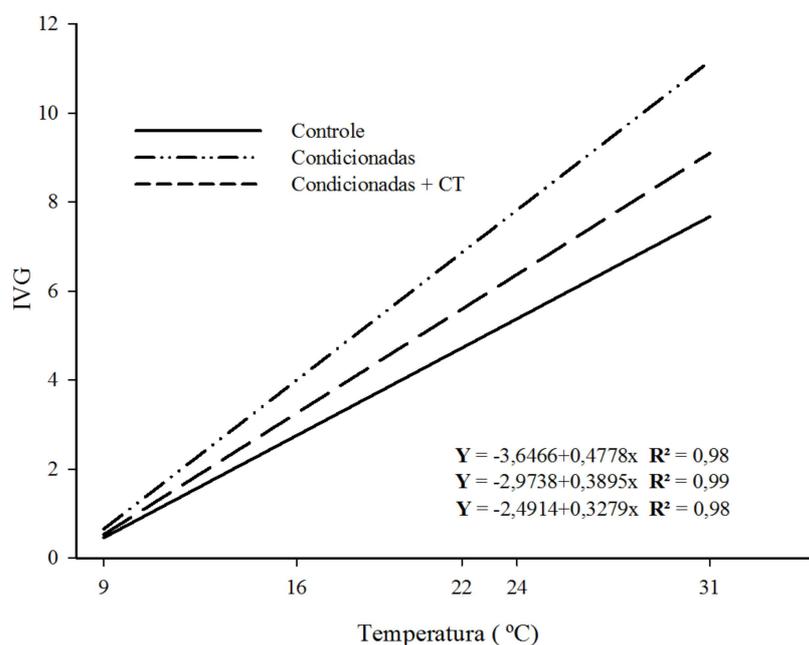


Figura 2 – Médias do índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *E. urophylla* germinadas em diferentes temperaturas em função do tratamento da semente.

A partir da análise dos dados observa-se que o condicionamento osmótico foi efetivo em reduzir o tempo de germinação nas temperaturas de 22, 24 e 31°C. Segundo Larcher (2000), esse mecanismo de superação de condições adversas, desencadeado pelo condicionamento fisiológico, evitando o estresse, é conhecido como escape. De acordo com esse autor, índices superiores de IVG de sementes condicionadas, em relação as não condicionadas significam redução do tempo entre a semeadura e a protrusão da radícula, levando a maiores chances de escape a possíveis intempéries ambientais. Esta característica pode ser uma vantagem ecológica no estabelecimento da planta em áreas com condições subtóxicas, pois acarreta menor período de exposição das sementes a fatores adversos do ambiente (BEWLEY e BLACK, 1994).

Chen e Arora (2011) explicam que, durante o condicionamento, as sementes sentem o baixo potencial hídrico das soluções osmóticas como sendo um estresse moderado que causa a indução de mecanismos de proteção e reparo, resultando em uma "memória" de estresse que permite a semente tolerar um estresse posterior.

Esta aceleração na taxa de germinação após o condicionamento osmótico pode ser explicada pelo estímulo de muitos eventos metabólicos que ocorrem nas fases iniciais de germinação (BRADFORD, 1986). Vários estudos já demonstraram que o condicionamento osmótico envolve acúmulo de mRNA e de proteínas inativas (GALLARDO et al., 2001), reparo e síntese de novas moléculas de DNA e RNA (KAUSAR et al., 2009), aumento da síntese de antioxidantes (SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010), expressão de genes relacionados a fatores de transcrição (SANI et al., 2013) e com o aumento da tolerância ao estresse (VENTURA et al., 2012).

O estresse causado por temperatura pode gerar injúrias nas sementes, prejudicando a embebição das mesmas. Provavelmente isso está relacionado a

danos causados no sistema de membranas (POSMYK e JANAS, 2007), que prejudicam a germinação das sementes e o estabelecimento das plântulas. Pesquisas indicam que o osmocondicionamento induz modificações nas membranas, como aumento no conteúdo de ácidos graxos insaturados, que auxiliam na manutenção da membrana em estado líquido cristalino (ZHUO et al., 2009).

Assim, a porcentagem final de germinação e o índice de velocidade de germinação de sementes de *E. urophylla* foram significativamente afetados pelos tratamentos aplicados (osmocondicionamento seguido ou não de choque térmico) em sementes, submetidas à germinação em água sob estresse térmico. Como foi possível observar, na temperatura de 9°C as sementes condicionadas (seguidas ou não de choque térmico) apresentaram um maior percentual germinativo do que as sementes do grupo controle, demonstrando que houve efeito do condicionamento em resposta ao estresse térmico. Nas temperaturas de 22, 24 e 31°C, observou-se o maior IVG em sementes condicionadas (PEG -1,0 MPa), sendo que a 31°C as sementes condicionadas seguidas de choque térmico também tiveram um IVG maior que o controle, mostrando que o condicionamento de sementes é uma técnica capaz de reduzir o tempo de germinação.

Tendo em vista estes resultados, os tratamentos escolhidos para a realização da análise proteômica diferencial foram as três condições das sementes nas temperaturas extremas (9 e 31°C) e como controle as sementes secas.

4.2 Avaliação da separação das proteínas

O perfil das proteínas presentes em sementes de *Eucalyptus urophylla* foi primeiramente caracterizado em gel de pH 3-10 para se ter uma visão geral da separação e distribuição das proteínas. Observou-se que a maior parte das proteínas está concentrada na região de pH 5-7 e massa molecular entre 15 – 93 kDa (Figura 3).

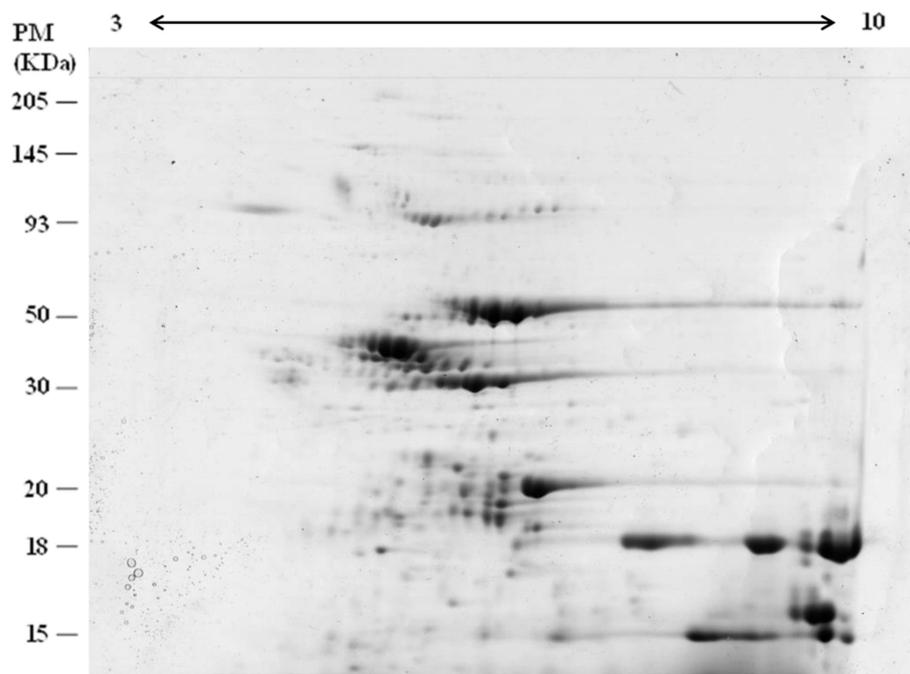


Figura 3 – Separação das proteínas de sementes de *Eucalyptus urophylla* (T4) por eletroforese bidimensional. Focalização isoelétrica realizada em gradiente de pH linear de 3 -10. Coloração com coomassie brilhante blue G250.

Devido ao padrão de distribuição observado nas análises a separação das proteínas de sementes de *Eucalyptus urophylla* foi realizada em fitas IPG com gradiente de pH linear de 4-7. Esse comportamento de distribuição das proteínas

já foi relatado na literatura por outros autores (GOMES et al., 2014; NATARAJAN, 2014; YANG et al., 2014). A comparação entre as duas diferentes faixas de pH pode ser observada na Figura 4.

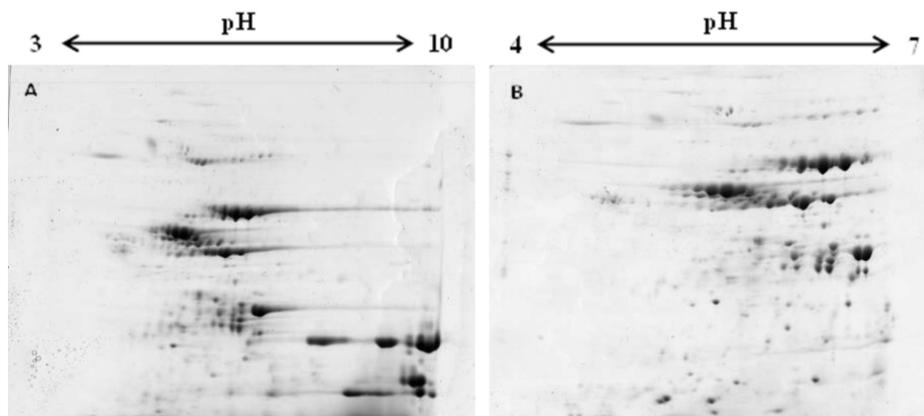


Figura 4 – Avaliação por eletroforese bidimensional da distribuição das proteínas de sementes de *Eucalyptus urophylla*, em diferentes faixas de pH. Em A (T4) foi usado um gradiente de pH linear de 3-10 e em B (T4) gradiente de pH linear de 4-7. Coloração com coomassie brilhante blue G250.

4.3 Análise das imagens dos géis

Foram detectados em média 302 *spots*, sendo que desses, 258 foram comuns nos 27 géis. Para cada tratamento, houve uma correspondência média de *spots* entre as repetições de 87 (T1), 89 (T2), 90 (T3), 92 (T4), 94 (T5), 87 (T6), 91 (T7), 89 (T8) e 87% (T9).

A reprodutibilidade da triplicata dos géis bidimensionais, para cada tratamento, está representada pelos gráficos de dispersão (*Scatter Plots*) de intensidade dos *spots*, por comparação dois a dois, nas Figuras 5, 6 e 7. Todos os resultados apresentaram um coeficiente de correlação linear acima de 0,9, demonstrando uma alta reprodutibilidade entre as repetições de cada tratamento.

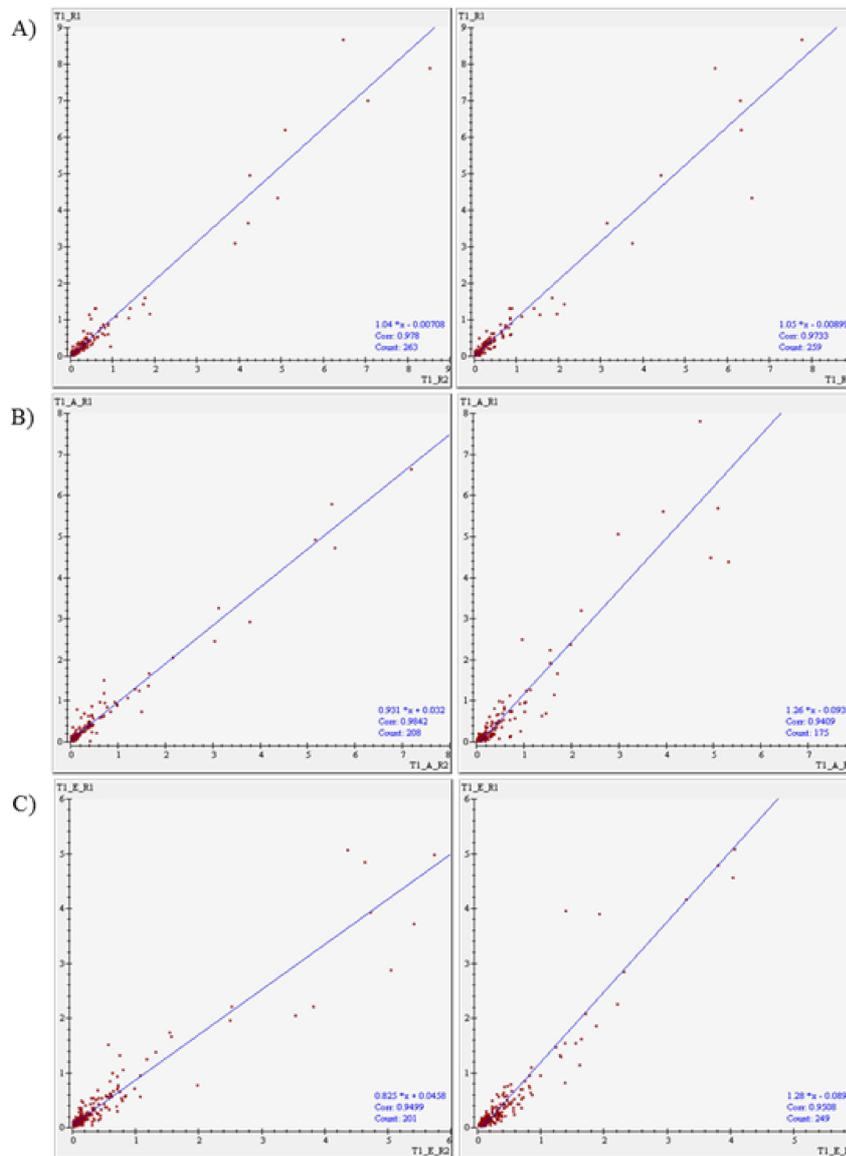


Figura 5 – *Scatter Plot* entre as réplicas dos géis bidimensionais de proteínas de sementes de *E. urophylla* indicando reprodutibilidade entre as repetições e correlação > 0,9. A) sementes secas (T1); B) sementes em processo de germinação por 24h a 9°C (T2); C) sementes em processo de germinação por 6h a 31°C (T3).

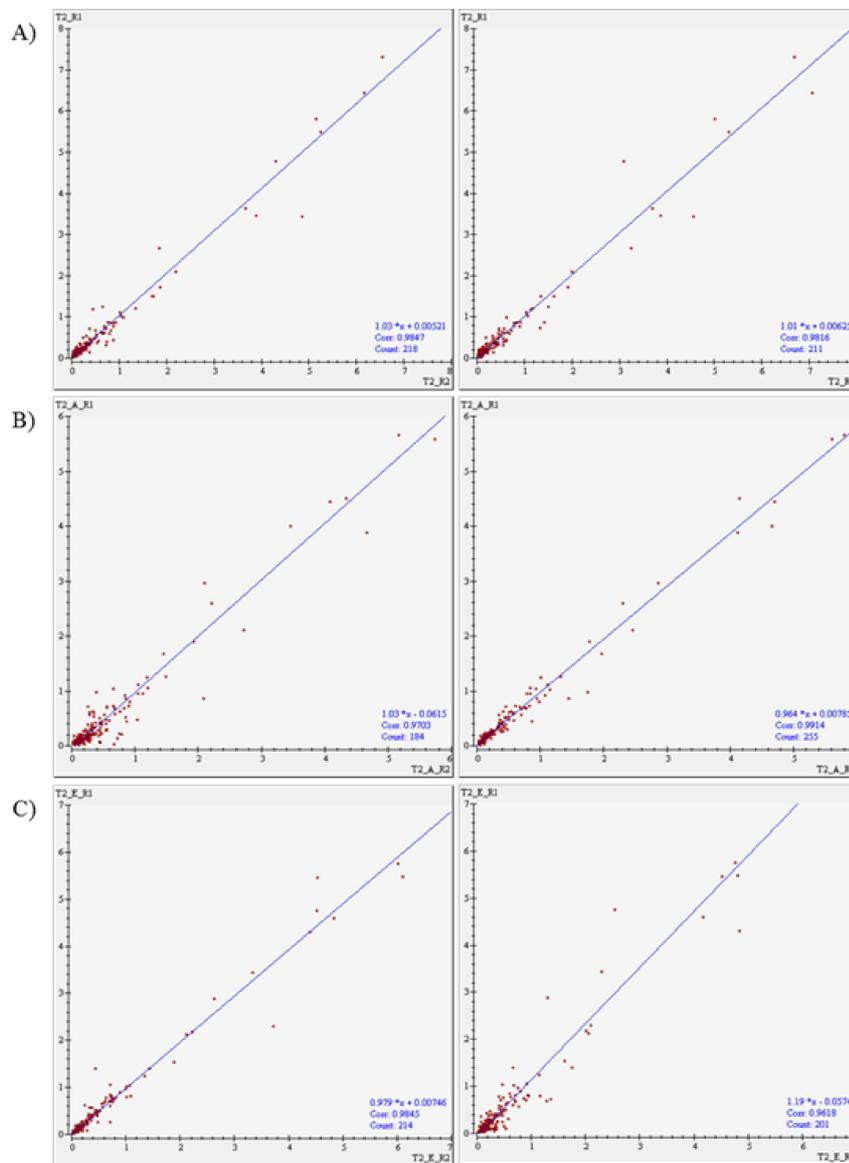


Figura 6 – *Scatter Plot* entre as réplicas dos géis 2D-PAGE de proteínas de sementes de *E. urophylla* indicando reprodutibilidade entre as repetições e correlação > 0,9. A) sementes osmocondicionadas (T4); B) sementes osmocondicionadas em processo de germinação por 24h a 9°C (T5); C) sementes osmocondicionadas em processo de germinação por 6h a 31°C (T6).

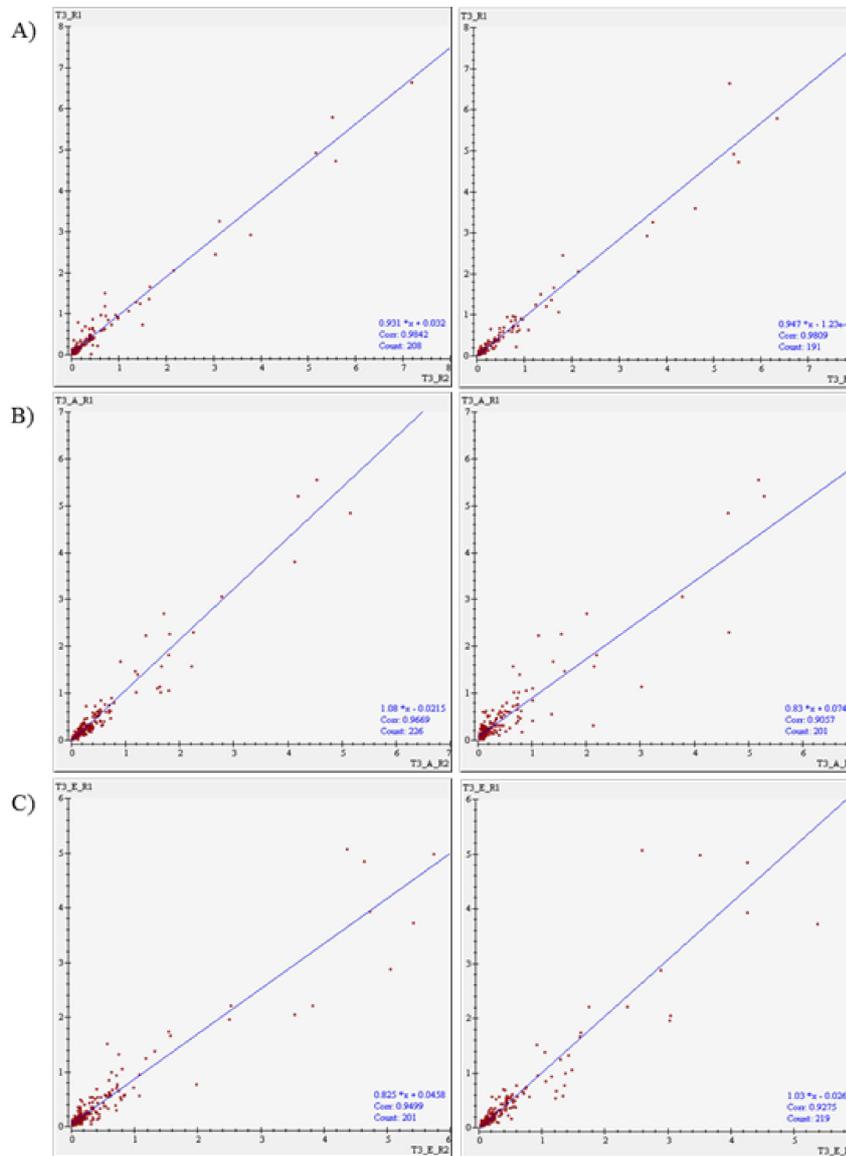


Figura 7 – *Scatter Plot* entre as réplicas dos géis 2D-PAGE de proteínas de sementes de *E. urophylla* indicando reprodutibilidade entre as repetições e correlação > 0,9. A) sementes osmocondicionadas seguidas de choque térmico (T7); B) sementes osmocondicionadas seguidas de choque térmico em processo de germinação por 24h a 9°C (T8); C) sementes osmocondicionadas seguidas de choque térmico em processo de germinação por 6h a 31°C (T9).

Após a análise pelo software, autenticação por inspeção visual e normalização dos volumes dos *spots*, foi realizada a análise estatística da expressão diferencial através da análise de variância ($p < 0,05$). Esta revelou um total de 94 *spots* com alterações de abundância entre os grupos experimentais. Dentre os 94 *spots* protéicos, 29 foram considerados de interesse para a identificação, após seleção de *spots* com alteração na abundância maior ou igual a 1,5 vezes.

Na Figura 8 é apresentado um gel bidimensional de proteínas totais extraídas de sementes de *E. urophylla* e os respectivos *spots* que foram selecionados para a espectrometria de massas, após as análises e seleção.

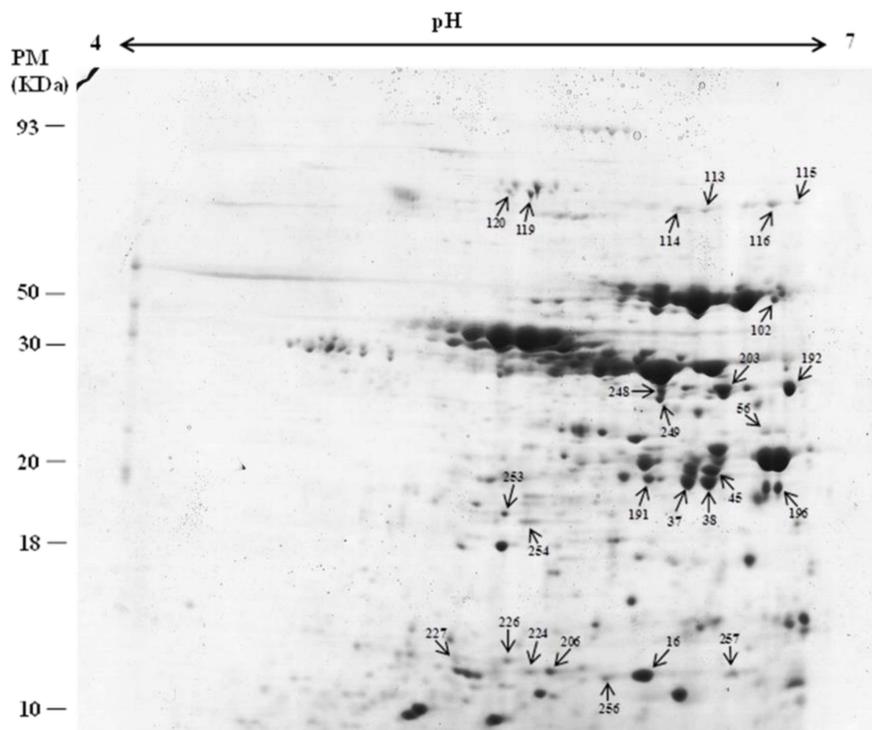


Figura 8 - Separação das proteínas de sementes de *Eucalyptus urophylla* (T5) por eletroforese bidimensional. Os números indicados pelas setas referem-se aos *spots* excisados para análise de espectrometria de massas.

Após excisão e análise por espectrometria de massas, dos 29 *spots* selecionados, a busca em bancos de dados utilizando o software Mascot, permitiu identificar 22 proteínas. A alteração da quantidade de cada proteína identificada em função dos tratamentos pode ser avaliada nas Figuras 9 e 10.

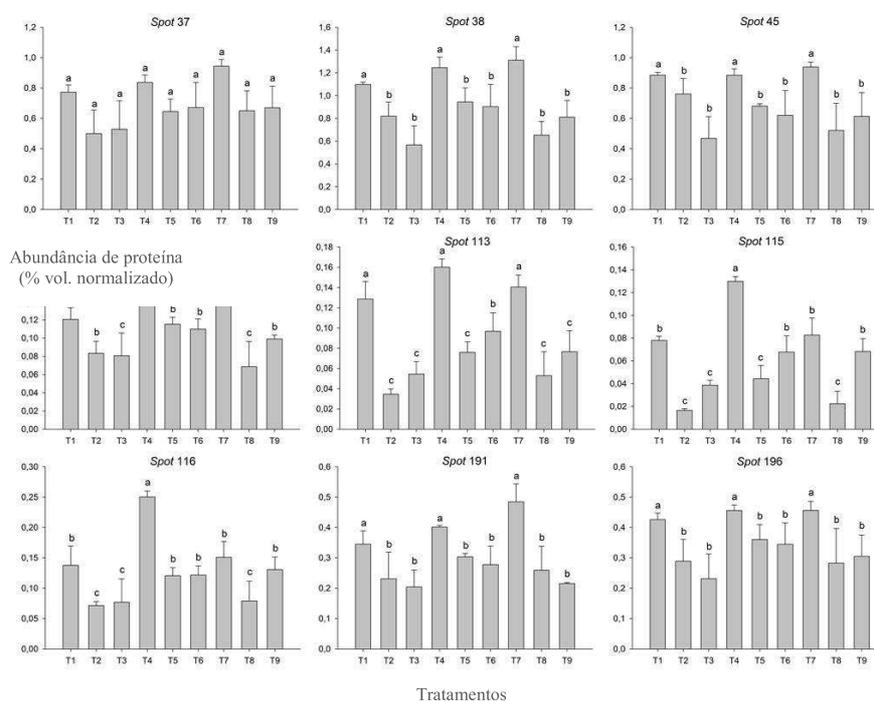


Figura 9 – Alteração na abundância de proteínas dos *spots* 37, 38, 45, 56, 113, 115, 116, 191, 196. Quantidade de proteínas de sementes de *E.urophylla*, em % de volume, que diferiram estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados. Maior abundância nos tratamentos T1, T4 e T7. Menor abundância nos tratamentos T2, T3, T5, T6, T8 e T9.

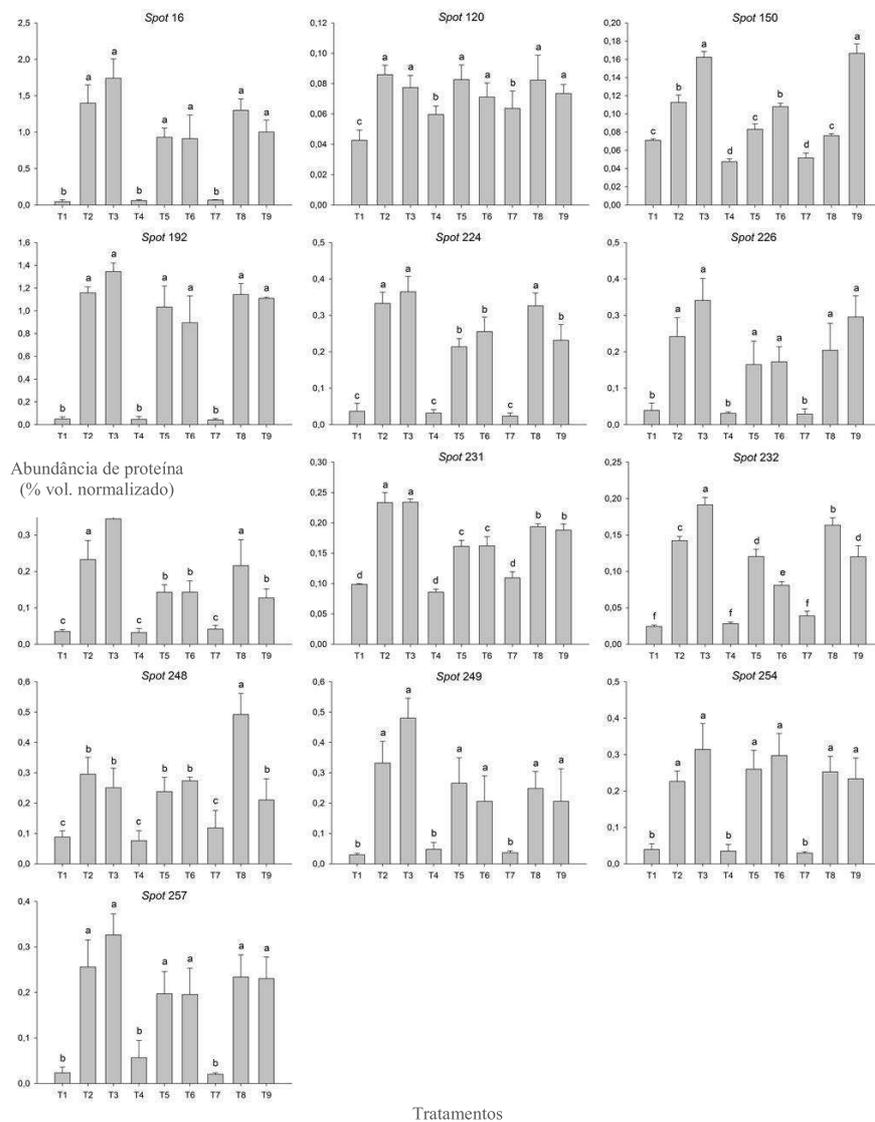


Figura 10 – Alteração na abundância de proteínas dos *spots* 16, 120, 150, 192, 224, 226, 227, 231, 232, 248, 249, 254, 257. Quantidade de proteínas de sementes de *E.urophylla*, em % de volume, que diferiram estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados. Menor abundância nos tratamentos T1, T4 e T7. Maior abundância nos tratamentos T2, T3, T5, T6, T8 e T9.

4.4 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Dos *spots* selecionados e enviados para análise por espectrometria de massas, 22 apresentaram identificação significativa (*score* maior que o limite de significância) com proteínas depositadas em banco de dados (TABELA 4).

Tabela 4 - Lista de proteínas identificadas por espectrometria de massas em sementes de *Eucalyptus urohylla*.

<i>Spot</i>	Identidade provável da proteína	Organismo	Nº de acesso	Score	MM exp (KDa)	pI exp	Banco
16	hypothetical protein EUGRSUZ_J00903	<i>Eucalyptus grandis</i>	CT985370	34	12	6,0	EW
37	11S globulin subunit beta	<i>Cucurbita maxima</i>	P13744	55	21	6,2	SP
38	11S globulin subunit beta	<i>Cucurbita maxima</i>	P13744	53	21	6,3	SP
45	11S globulin subunit beta	<i>Cucurbita maxima</i>	P13744	35	22	6,3	SP
56	cytochrome c oxidase subunit 3	<i>Brassica juncea</i>	CT986104	35	25	6,5	EW
113	cytochrome c oxidase subunit 3	<i>Brassica juncea</i>	CT986104	31	65	6,5	EW
115	plastidic glucose transporter 4	<i>Eucalyptus grandis</i>	CT983640	41	67	6,8	EW
116	plastidic glucose transporter 4	<i>Eucalyptus grandis</i>	CT983640	31	67	6,7	EW
120	cytochrome c oxidase subunit 3	<i>Brassica juncea</i>	CT986104	38	66	5,4	EW
150	Retinoblastoma-related protein	<i>Camellia sinensis</i>	Q2ABE5	28	15	6,1	SP

191	11S globulin subunit beta	<i>Cucurbita maxima</i>	P13744	40	21	6,1	SP
192	cytochrome c oxidase subunit 3	<i>Brassica juncea</i>	CT986104	31	30	6,7	EW
196	11S globulin subunit beta	<i>Cucurbita maxima</i>	P13744	27	21	6,6	SP
224	11S globulin subunit beta	<i>Cucurbita maxima</i>	P13744	52	13	5,6	SP
226	Retinoblastoma-related protein	<i>Camellia sinensis</i>	Q2ABE5	29	13	5,4	SP
227	Pis v 2.0101 allergen 11S globulin precursor	<i>Pistacia vera</i>	B7P073	51	13	5,2	SP
231	11S globulin subunit beta	<i>Cucurbita maxima</i>	P13744	51	21	6,5	SP
232	11S globulin subunit beta	<i>Cucurbita maxima</i>	P13744	38	21	6,4	SP
248	NAD-dependent malic enzyme 65 kDa isoform	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	P37224	33	29	6,2	SP
249	11S globulin subunit beta	<i>Cucurbita maxima</i>	P13744	46	28	6,2	SP
254	Unknown protein 12	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	P85912	26	20	5,6	SP
257	Late blight resistance protein	<i>Solanum demissum</i>	Q8W1E0	31	13	6,5	SP

EW: Eucaewood

SP: Swiss-Prot

Como se pode observar (Tabela 4), vários *spots* apresentaram similaridade com a mesma proteína apresentando diferenças de pI e/ou PM. Sua presença pode ser consequência da existência de diferentes isoformas, derivadas de um único gene ou de modificações pós-traducionais (MPTs) (LIPPERT et al., 2007).

MPTs são processos covalentes que alteram as propriedades das proteínas por clivagem proteolítica ou por adição de um grupo químico a um ou mais aminoácidos (SEO e LEE, 2004). As modificações químicas na cadeia protéica conhecidas incluem: fosforilação, acetilação, alquilação, metilação, sulfatação, isoprenilação, glicosilação, sumoilação, ubiquitilação e formação de pontes dissulfeto. Estas modificações podem determinar a atividade, a localização e interações com outras proteínas (KWON et al., 2006).

4.5 Classificação funcional das proteínas

As 22 proteínas identificadas neste trabalho foram classificadas de acordo com sua função biológica. Para tanto, foi utilizada a classificação proposta pela ferramenta *Mercator*, disponível no sítio <http://mapman.gabipd.org/web/guest/mercator>. Assim, as proteínas foram classificadas em 7 categorias (Figura 11).

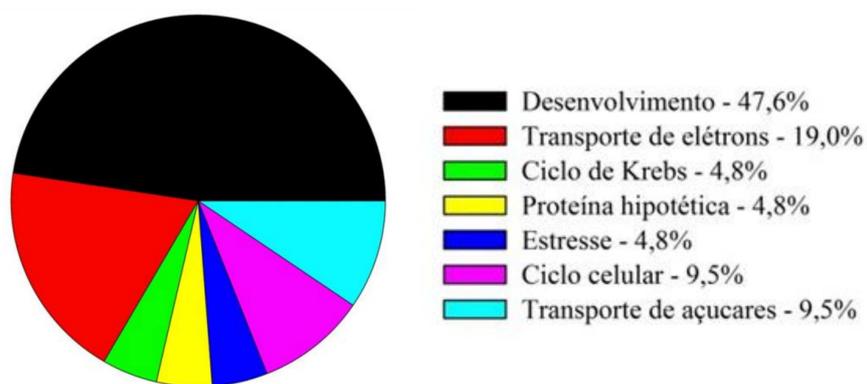


Figura 11 - Classificação funcional dos *spots* identificados em sementes de *Eucalyptus urophylla*.

Como pode ser observado na figura 11, o grupo mais representativo das proteínas identificadas foi pertencente à categoria de desenvolvimento de sementes (47,6%). Este resultado é esperado, uma vez que as sementes possuem proteínas de reserva que serão posteriormente mobilizadas durante a germinação e crescimento das plântulas.

Em segundo lugar observam-se proteínas relacionadas ao metabolismo (33,3%) que incluem as categorias de transporte de elétrons e de açúcares e ciclo de Krebs. Este resultado também está de acordo, pois durante a germinação ocorre a reativação de organelas e macromoléculas preexistentes na semente, formadas durante a maturação, e a quebra de reservas, gerando ATP como fonte de energia e esqueletos de carbono para o crescimento da plântula.

Neste estudo também foram identificadas proteínas relacionadas ao ciclo celular (9,5%), estresse (4,8%) e uma proteína hipotética (4,8%).

A ferramenta *Mercator* não incluiu a proteína desconhecida (*spot 258 – unknown protein 12*) que foi identificada pela espectrometria de massas nesta classificação.

4.5.1 Globulina 11S (subunidade beta)

A superfamília Cupin inclui uma grande variedade de enzimas e proteínas de reserva (DUNWELL; PURVIS; KHURI, 2004). As globulinas são proteínas de reserva de sementes, pertencentes a essa superfamília, cuja função principal parece ser a maior fonte de nitrogênio para o desenvolvimento da planta. Estas proteínas de reserva apresentam duas frações protéicas distintas, uma do tipo legumina (11S) e outra do tipo vicilina (7S) que são classificadas de acordo com seus coeficientes de sedimentação. (LIU et al., 2007). 11S são proteínas que formam estruturas hexaméricas compostas de 6 subunidades não

idênticas, sintetizadas sob a forma de um polipeptídeo precursor. Cada subunidade contém um polipeptídeo ácido (~40KDa) e um polipeptídeo básico (~20KDa) que são ligados por pontes dissulfeto (TANDANG-SILVAS et al., 2010).

No presente trabalho, 9 *spots* (37, 38, 45, 191, 196, 224, 231, 232, 249) processados nos géis de proteínas de sementes inteiras, foram identificados como a subunidade β derivada de um precursor 11S de *Cucurbita maxima*. A presença de múltiplos *spots* para a mesma proteína já foi relatada em vários trabalhos que utilizam a eletroforese bidimensional para o sequenciamento de proteínas. Sheoran et al. (2005) identificaram 11 *spots* de proteínas do tipo legumina, Gallardo et al. (2003) encontraram 2 *spots* identificados como formas precursoras do grupo legumina e José et al., (2011) também encontraram 3 *spots* identificados como proteínas precursoras do tipo legumina em sementes de *Magnolia ovata*.

Uma explicação para esse comportamento seria a ocorrência de MPTs, uma vez que essas podem alterar as propriedades físicas e químicas, distribuição de conformação, dobra, estabilidade, atividade e, conseqüentemente, a função das proteínas (ZARETSKY e WRESCHNER, 2008). No trabalho de Balbuena et al. (2011b), proteínas de reserva do tipo vicilina (7S) foram identificadas em diferentes *spots*. O autor sugere que esse fenômeno pode ser resultado da digestão enzimática dessas proteínas de reserva, gerando peptídeos de diferentes tamanhos e pIs.

Os *spots* de número 38, 45, 191 e 196 tiveram uma quantidade superior da proteína 11S nos tratamentos que não passaram por processo germinativo (T1, T4 e T7) quando comparados aos demais tratamentos.

Um comportamento oposto foi observado nos *spots* de número 224, 231, 232 e 249, que apresentaram maior abundância nos tratamentos que

passaram por processo germinativo (T2, T3, T5, T6, T8, T9), indicando, possivelmente, o início da mobilização destas proteínas de reserva. Esse resultado corrobora o trabalho de Yacoubi et al., (2011), em que, 10 *spots* provenientes de proteínas de reserva (globulinas) de sementes de *Medicago sativa* apresentaram o mesmo comportamento durante a germinação *sensu stricto*.

As proteínas da superfamília Cupin são funcionalmente diversas e incluem as globulinas, que são proteínas de reserva de sementes. Essas proteínas são alérgenos potenciais encontrados em algumas espécies de plantas (BREITENEDER e RADAUER, 2004). O *spot* 227 foi identificado como uma proteína alergênica precursora da globulina 11S de *Pistacia vera*, apresentando abundância superior nos tratamentos que passaram por processo germinativo em condições de estresse térmico (9 e 31°C). Alérgenos de plantas em geral, são proteínas de defesa da planta, que permitem a ela resistir aos estresses bióticos e abióticos. (BREITENEDER e RADAUER, 2004). Assim, a maior quantidade desta proteína sob condições de estresse pode ser uma forma preventiva que a semente encontra de se defender a posteriores condições adversas.

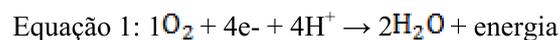
4.5.2 Citocromo *c* oxidase (subunidade III)

Citocromo *c* oxidase (COX) é uma enzima chave da cadeia respiratória, localizada na membrana interna das mitocôndrias e envolve a síntese de ATP. (NAMSLAUER e BRZEZINSKI, 2004). Esta enzima possui 3 subunidades (I, II e III) e faz parte do complexo IV da cadeia respiratória, sendo o componente terminal da cadeia transportadora de elétrons. Este complexo é responsável por oxidar o citocromo *c* e reduzir o O₂ em H₂O (BELEVICH; VERKHOVSKY; WIKSTRÖM, 2006).

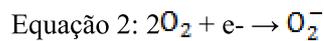
Alguns *spots* (56, 113, 120 e 192) apresentaram similaridade com a subunidade III da enzima citocromo *c* oxidase. A representação da mesma proteína em diferentes *spots* pode ser atribuída à presença de modificações pós-traducionais. Os *spots* de número 120 e 192 apresentaram uma alta quantidade destas proteínas nos tratamentos que passaram por processo germinativo sob condições de estresse (T2, T3, T5, T6, T8 e T9), a qual pode ser atribuída à ativação de enzimas mitocondriais envolvidas na cadeia transportadora de elétrons, como a enzima citocromo *c* oxidase. Segundo Shin et al. (2011), provavelmente, a abundância destas proteínas foi para facilitar a geração de energia através da cadeia respiratória sob condições de estresse, assim como foi observado em seu trabalho.

Entretanto, para os *spots* 56 e 113, ocorreu o comportamento oposto. Houve uma menor quantidade destas proteínas nos tratamentos que passaram por processo germinativo em estresse térmico. Na literatura encontram-se trabalhos estudando outros órgãos como folhas, raízes e flores. No trabalho de Budak et al., (2013) foi observado menor abundância da enzima citocromo *c* oxidase em tratamentos sob condições estressantes, porém em folhas de trigo. Este comportamento da redução da abundância em alguns *spots* ainda não está esclarecido.

No complexo IV da cadeia transportadora de elétrons há a remoção de um elétron de cada uma das moléculas reduzidas de citocromo *c* e os quatro elétrons são adicionados ao O₂ para formar água. Isso ocorrerá com 95 a 98% do oxigênio utilizado na mitocôndria (equação 1).



Aproximadamente 2 a 5% do oxigênio é reduzido univalentemente a ânion superóxido (equação 2), o qual é uma importante espécie reativa de oxigênio.



O ânion superóxido é um radical livre que pode por si só levar a reações que irão causar destruição celular, através da peroxidação lipídica de suas membranas celulares (BARREIROS e DAVID, 2006). Assim, a menor quantidade desta proteína pode ocorrer em consequência do maior dano oxidativo devido à produção de substâncias reativas ao oxigênio.

4.5.3 Transportador plastídico de glicose

Durante a fotossíntese, parte do carbono fixado é armazenada nos cloroplastos na forma de amido transitório durante o dia, servindo como um local de reserva de carbono nos cloroplastos e sendo mobilizado durante a noite. A principal via de hidrólise do amido se dá através de enzimas hidrolíticas e resulta na formação de glicose. Esta via requer um transportador de glicose para mediar a exportação de glicose a partir dos cloroplastos (WEISE; WEBER; SHARKEY, 2004). Assim, os transportadores de glicose tem papel na exportação dos produtos de degradação do amido a partir dos cloroplastos (CHO et al., 2011) para a síntese de sacarose e respiração (ZEEMAN; SMITH; SMITH, 2007).

No presente trabalho, os *spots* de número 115 e 116 apresentaram alta quantidade da proteína transportadora de glicose nos tratamentos T1 (sementes secas), T4 (sementes condicionadas) e T7 (sementes condicionadas + choque

térmico), mostrando que o aparato de translocação dos plastídios foi estabelecido antes do processo germinativo, durante a secagem no desenvolvimento da semente ou durante a secagem após os tratamentos de condicionamento e choque térmico, possivelmente para permitir a construção desse sistema fotossintético para o posterior crescimento da plântula.

Ainda em relação a estes *spots*, o tratamento T4 (sementes osmocondicionadas) apresentou a maior quantidade da proteína transportadora de glicose. Assim, pode-se inferir que o condicionamento de sementes de *E. urophylla* em soluções de PEG pode aumentar a síntese desta proteína e, conseqüentemente, levar a uma metabolismo muito mais eficiente durante a germinação, o que explicaria a vantagem conferida por este tratamento (condicionamento) em relação as sementes controle, podendo ser verificado pelo IVG.

4.5.4 Proteína relacionada ao retinoblastoma

A proteína do retinoblastoma (pRb) foi originalmente especificada sendo exclusiva dos animais com um papel importante na regulação do ciclo celular. Hoje, sabe-se que as plantas também possuem proteínas homólogas chamadas proteínas relacionadas ao retinoblastoma (RBR). Estas participam também de processos celulares como, regulação da transcrição, remodelação da cromatina, crescimento e diferenciação celular (GUTZAT, BORGHI, GRUISSEM, 2012; DESVOYES et al., 2014).

Através da espectrometria de massas, identificou-se 2 *spots* (150 e 226) da proteína relacionada ao retinoblastoma (RBR). Esses apresentaram maior abundância nos tratamentos T2, T3, T5, T6, T8, e T9 (sementes que passaram por processo germinativo sob condições de estresse) quando comparados aos

demais tratamentos (T1, T4 e T7). Proteínas RBR possuem um papel regulatório diverso e muitas de suas funções ainda não foram completamente elucidadas.

Outro aspecto observado no *spot* 150 foi a maior abundância desta proteína nos tratamentos T3 e T9 (sementes em processo germinativo a 31°C), o que pode estar relacionado à atividade desta proteína em altas temperaturas, uma vez que a RBR possui certa relação com as Hsp (*Heat shock proteins*).

As Hsp fazem parte da grande família das proteínas conhecidas como chaperonas moleculares, assim chamadas por possuir a capacidade de interagir de forma reversível com outras proteínas, auxiliando na formação, dobramento e transporte transmembrana (KARP, 2005). Estas proteínas desempenham papel durante a síntese, montagem e degradação de proteínas e também na preservação da sobrevivência celular sob condições adversas (GUPTA et al., 2007). Dentre os genes da família de resposta ao choque térmico, o HSP70 é um dos genes altamente conservados e o primeiro a ser induzido em resposta a diversos fatores estressantes (MUKHOPADHYAY; SAXENA; CHOWDHURI; 2003), como o estresse térmico.

Hsc70 (*Heat shock cognate protein 70*) é uma proteína constitutiva pertencente à família das Hsp70. Esta por sua vez, se liga a uma sequência específica N terminal da RBR não fosforilada bloqueando a fosforilação da mesma e impedindo sua inativação. Essa interação a protege da degradação restringindo sua participação no ciclo celular. Porém, ainda não se sabe como a alta temperatura pode afetar a redistribuição desta proteína entre os compartimentos celulares (NATHAN et al., 2003).

Devido à abundância de RBR encontrada nas condições deste trabalho acredita-se que a mesma tenha função importante na proteção ao estresse causado pela alta temperatura, uma vez que esta proteína apresentou alta abundância em sementes não condicionadas durante a germinação em alta

temperatura e somente o condicionamento seguido de choque térmico foi capaz de restabelecer os níveis desta proteína quando a germinação é realizada nas mesmas condições.

4.5.5 Enzima málica dependente de NAD (isoforma 65 KDa)

Enzimas málicas dependentes de NAD tem papel importante no fluxo metabólico do ciclo de Krebs. A oxidação enzimática do malato à piruvato e CO₂ é catalisada por 2 classes de enzimas málicas (ME): ME dependente de NADP (NADP-ME) e ME dependente de NAD (NAD-ME), dependendo da habilidade de descarboxilar o oxaloacetato. Em plantas, as isoformas NADP-ME funcionam nos cloroplastos e citosol (WHEELER et al., 2005) e as isoformas NAD-ME são encontradas nas mitocôndrias (WINNING; BOURGUIGNON; LEAVER, 1994).

A enzima NAD-ME está envolvida na respiração do malato na mitocôndria e esse, pode ser metabolizado pela ação dessa enzima ou pela malato desidrogenase (MDH). O fator que decide qual enzima irá atuar nesta etapa é o pH. No pH em torno de 6,5 o malato é oxigenado principalmente pela enzima NAD-ME, enquanto que no pH em torno de 7,5, onde NAD-ME é inativa, o malato é oxidado pela MDH mitocondrial (AGIUS; RASMUSSEN; MOLLER, 2001).

No presente trabalho, o *spot* de número 248, referente à enzima málica dependente de NAD (isoforma 65KDa), foi encontrado na faixa de pH equivalente a 6,2, estando de acordo com o pH de ação para esta enzima. NAD-ME foi encontrada em maior quantidade nos tratamentos que passaram por processo germinativo sob condições de estresse.

O processo de germinação de uma semente inicia-se com a embebição de água, seguida pelo desencadeamento de uma série de alterações metabólicas representadas pela hidrólise de compostos armazenados na semente (TAIZ e ZEIGER, 2009). Os produtos de hidrólise destes compostos constituem os principais substratos para a respiração e a síntese de componentes celulares essenciais ao desenvolvimento inicial da plântula. Assim, a alta quantidade desta enzima pode estar relacionada com o início da embebição pela semente ativando seu metabolismo e, conseqüentemente, o aumento da respiração.

Outra observação é que o condicionamento seguido de choque térmico parece ter um efeito positivo quando essas sementes passam por processo germinativo em baixa temperatura. Uma explicação seria o aumento da respiração em consequência do estresse abiótico que a semente sofreu, demandando síntese de ATP. Por exemplo, as plantas exibem diferentes taxas de *turnover* proteico em resposta a diferentes estresses como osmótico e térmico (HUANG et al., 2012), levando a um custo energético significativo, já que o ATP é hidrolisado para abastecer a degradação de proteínas danificadas e também a síntese de reposição de novas proteínas (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007).

4.5.6 Proteína de resistência a requeima

As plantas vivem em ambientes complexos interagindo intimamente com uma vasta gama de agentes patogênicos invasivos bem como estresses abióticos, levando à limitação na produtividade da cultura (PIETERSE et al., 2009). A exposição prévia a um determinado estresse muitas vezes afeta a resposta da planta a outros estresses, indicando a presença de tolerância cruzada entre as vias de sinalização molecular, fazendo com que essa interação ajude a

planta a aperfeiçoar sua resposta a possíveis ameaças (GHANTA et al., 2011; PIETERSE et al., 2009; SHARMA et al., 2013).

O *spot* de número 257 foi identificado como uma proteína que confere resistência a requeima, doença causada pelo patógeno *Phytophthora infestans*, e usualmente encontrada em culturas como a batata e o tomate. Esta proteína apresentou alta abundância nos tratamentos T2, T3, T5, T6, T8, e T9, e uma possível explicação seria que as sementes, ao passarem por processo germinativo sob condições de estresse térmico, ativaram um modo de defesa para que a futura planta ficasse preparada a possíveis condições adversas após a germinação.

4.5.7 Proteína hipotética EUGRSUZ_J00903

O *spot* 16 foi identificado como uma proteína hipotética encontrada em *Eucalyptus grandis*, sendo expressa exclusivamente nos tratamentos que passaram por processo germinativo em condições de estresse térmico (Figura 12).

Esta proteína possui o domínio conservado *OTU-like cysteine protease*. O domínio OTU foi inicialmente identificado no gene de *Drosophila melanogaster* (STEINHAEUER; WALSH; KALFAYAN, 1989) e, subsequentemente observado em sequências de proteínas de vários eucariotos, incluindo plantas e animais, vírus e bactéria (MAKAROVA; ARAVIND; KOONIN, 2000).

Os fatores de transcrição pertencentes ao domínio OTU codificam as proteases (peptidases), essas catalisam a quebra das ligações peptídicas de proteínas e são largamente distribuídas em todas as plantas, animais e micro-

organismos. Em organismos superiores, cerca de 2% dos genes codificam essas enzimas (BADGUJAR e MAHAJAN, 2013). As peptidases são classificadas em endopeptidases, que clivam ligações no interior da cadeia polipeptídica e exopeptidases, que atuam na extremidade da cadeia polipeptídica (VERMELHO et al., 2008).

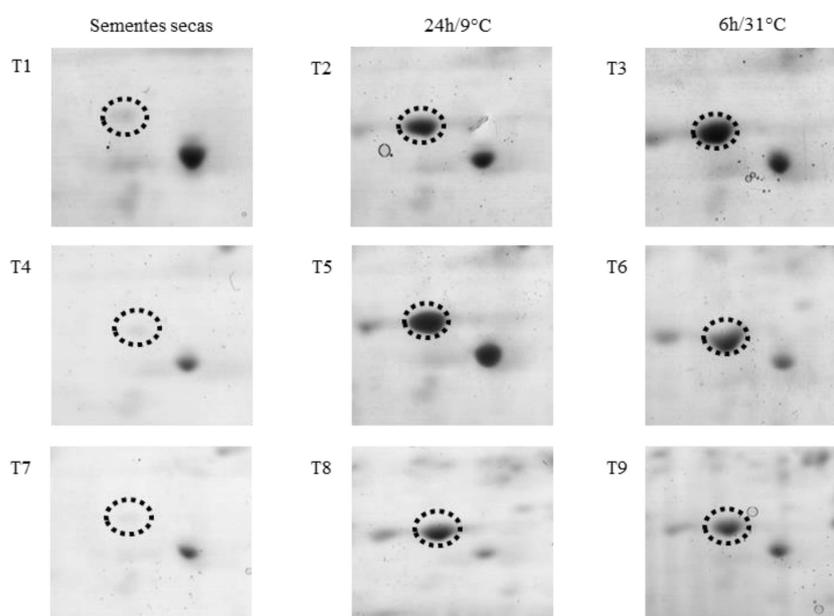


Figura 12 – Representação do *spot* 16 (proteína hipotética EUGRSUZ_J00903) pelo programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0* nos géis de referência de cada tratamento. sementes secas (T1); sementes em processo de germinação em água por 24h à 9°C (T2); sementes em processo de germinação em água por 6h à 31°C (T3); sementes osmocondicionadas (T4); sementes osmocondicionadas em processo de germinação em água por 24h à 9°C (T5); sementes osmocondicionadas em processo de germinação em água por 6h à 31°C (T6); sementes osmocondicionadas seguidas de choque térmico (T7); sementes osmocondicionadas seguidas de choque térmico em processo de germinação em água por 24h à 9°C (T8) e sementes osmocondicionadas seguidas de choque térmico em processo de germinação em água por 6h à 31°C (T9).

As cisteínas proteases têm papel importante nos processos intra e extracelular como desenvolvimento e maturação de frutos, degradação de proteínas de reserva durante o processo germinativo de sementes, ativação de proteínas e degradação de proteínas defeituosas (SEQUEIROS et al., 2005).

O conhecimento sobre os mecanismos pelos quais as proteases executam suas diversas funções ainda é muito limitado, principalmente quando se considera a abundância dos papéis que essas realizam. Em plantas, o mecanismo de morte celular programada (*Programmed Cell Death*, PCD), ocorre em diferentes fases do desenvolvimento da planta bem como em resposta a estresses bióticos e abióticos e tem participação da cisteína protease do tipo caspase (CHICHKOVA et al., 2004). Outra protease já estudada é a VPE (*Vacuolar Processing Enzymes*). Estas enzimas tem um papel na maturação de proteínas armazenadas dentro dos vacúolos das sementes (SHIMADA et al., 2003). A papaína catalisa a remobilização de proteínas durante a germinação de sementes e a senescência de órgãos, e está envolvida em vários eventos de PCD (VAN DER HOORN e JONES, 2004) e também atua na defesa contra patógenos (BEERS; JONES; DICKERMAN, 2004).

As proteases possuem diversos papéis na defesa de plantas, podendo agir em níveis de percepção, sinalização e execução. Em muitos casos, as funções que são propostas para as proteases têm sido deduzidas através de estudos de alteração da quantidade destas enzimas, embora muitas vezes, o seu papel seja impedido devido a sua regulação ocorrer pós-transcricionalmente (VAN DER HOORN e JONES, 2004).

Muitos dos genes previstos em *Eucalyptus* ainda não têm função conhecida e muitas das informações disponíveis sobre a função dos genes anotados em bancos de dados são baseadas apenas em análises *in silico* sem comprovações *in vivo* (ITOH et al., 2007). Assim, um estudo mais aprofundado

desta proteína hipotética poderá proporcionar um conhecimento a respeito de sua função.

5 CONCLUSÕES

O condicionamento osmótico seguido ou não de choque térmico foi eficaz em aumentar significativamente o percentual germinativo de sementes de *Eucalyptus urophylla* a 9°C em relação às sementes do grupo controle, sendo o tratamento em PEG a -1,0 MPa o que apresentou melhor desempenho.

Nas temperaturas de 22, 24 e 31°C, observou-se o maior IVG em sementes condicionadas (PEG -1,0 MPa), sendo que a 31°C as sementes condicionadas seguidas de choque térmico também tiveram um IVG maior que o controle.

As proteínas 11S relacionaram-se apenas com a germinação independente da condição da semente (condicionamento) testada.

Observou-se maior abundância da proteína transportadora de glicose em sementes condicionadas em comparação aos demais tratamentos.

O condicionamento seguido de choque térmico foi capaz de induzir os níveis da proteína relacionada ao retinoblastoma quando a germinação é realizada em alta temperatura.

O condicionamento seguido de choque térmico induziu maior abundância da enzima málica dependente de NAD quando a germinação é realizada em baixa temperatura.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário Estatístico da ABRAF**: ano base 2012. Brasília, 2013.

AGIUS, S. C.; RASMUSSEN, A. G.; MOLLER, I. M. NAD (P) turnover in plant mitochondria. **Journal of Plant Physiology**, Australia, v. 28, p. 461–470, 2001.

ALLEY, R.; BERNTSEN, T.; BINDOFF, N. L. **Climate change the physical science basis**. Contribution of Working Group I to the Fourth Annual Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, 2007.

ARNDT, D.S. et al. State of the Climate in 2011. Special Supplement. **Bulletin of the American Meteorological Society**, v. 93, n. 7, 2012.

BADGUJAR, S. B.; MAHAJAN, R. T. Peptide Mass Fingerprinting and N-Terminal Amino Acid Sequencing of Glycosylated Cysteine Protease of *Euphorbia nivulia* Buch.-Ham. **Journal of Amino Acids**, India, v. 2013, p. 6, 2013.

BAGINSKY, S. Plant proteomics: Concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. **Mass Spectrometry**, Zurich, v. 28, n. 1, p. 93-120, 2009.

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

BALBUENA, T. S. et al. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, São Paulo, v. 72, p. 302-311, 2011b.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, Sao Paulo, v.29, n.1, p.113-126, 2006.

BEERS, E. P.; JONES, A. M.; DICKERMAN, A. W. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. **Phytochemistry**, Blacksburg, v. 65, n. 1, p. 43-58, 2004.

BELEVICH, I.; VERKHOVSKY, M.I.; WIKSTRÖM, M. Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase. **Nature**, Helsinki, v. 440, n. 7085, p. 829-832, 2006.

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

BISCH, P. M. Genômica funcional: Proteômica. In: Luís Mir. (Org.). **Genômica. 1ª edição**. São Paulo, Ed. Atheneu, v.1, p. 139-162. 2004.

BRADFORD, K.J. A water relations analysis of seed germination rates. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 94, n. 3, p. 840-849, 1990.

BRADFORD, K.J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming improve germination under stress conditions. **Horticulture Science**, Alexandria, v. 2, n. 5, p. 1105-1112, 1986.

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

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instruções para análise de sementes de espécies florestais, 17 de janeiro de 2013, Brasília: MAPA, p. 98, 2013.

BREITENEDER, H.; RADAUER, C. A classification of plant food allergens. **Journal Allergy and Clinical Immunology**, Vienna, v. 113, n. 5, p. 821-830, 2004.

BUDAK, H. et al. Proteome changes in wild and modern wheat leaves upon drought stress by two-dimensional electrophoresis and nanoLC-ESI-MS/MS. **Plant Molecular Biology**, Tuzla, Istanbul, v. 83, n. 1-2, p. 89-103, 2013.

BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. **Cryobiology**, San Diego, v. 48, n. 3, p. 215–228, 2004.

CARRETTE, O. et al. Age-related proteome analysis of the mouse brain: a 2-DE study. **Proteomics**, Geneva, v. 6, n. 18, p. 4940–4949, 2006.

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

CARVALHO, C. A. L. et al. **Tópicos em Ciências Agrárias**. Cruz das Almas, BA: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, v.1, p. 296, 2009.

CHEN, K.; ARORA, R.; ARORA, U. Osmopriming of spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Bloomsdale) seeds and germination performance under temperature and water stress. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 38, n. 1, p. 36-48, 2010.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Science**, Shaanxi Province, v. 180, n. 2, p. 212-20, 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**, Ames, v. 183, p. 27-36, 2012.

CHICHKOVA, N. V. et al. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. **The Plant Cell**, Moscow, v. 16, n. 1, p. 157-171, 2004.

CHO, M. H. et al. Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, Yongin, v. 190, n. 1, p. 101-112, 2011.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Editora da UNICAMP, p. 452, 2006.

COLMAN, B. A. et al. Indução de tolerância ao estresse hídrico na germinação de sementes de feijão-caupi. **Comunicata Scientiae**, Dourados, v. 5, n. 4, p. 449-455, 2014.

CUNHA, R.B.; CASTRO, M.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 36, n.9, p. 40-46. 2006.

CUSHMAN, J. C.; BOHNERT, H. J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**, Oklahoma, v. 3, n.2, p. 117-124, 2000.

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

DASS, C. Introduction to mass spectrometry. In: **Principles and practice of biological mass spectrometry**, Amsterdam, cap. 1, p. 1-9, 2001.

DESVOYES, B. et al. Novel roles of plant RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) protein in cell proliferation and asymmetric cell division. **Journal of Experimental Botany**, Madrid, v. 65, n. 10, p. 2657-2666, 2014.

DUNWELL, J. M.; PURVIS, A.; KHURI, S. Cupins: The most functionally diverse protein superfamily?. **Phytochemistry**, Reading, v. 65, n. 1, p. 7-17, 2004.

FAROOQ, M. et al. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 29, n. 2, p. 185-212, 2009.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

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

GALLARDO, K. et al. Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. **Plant Physiology**, Gent, v. 133, n. 2, p. 664-682, 2003.

GHANTA, S. et al. *Nicotiana tabacum* overexpressing γ -ECS exhibits biotic stress tolerance likely through NPR1-dependent salicylic acid-mediated pathway. **Planta**, Kolkata, v. 233, n.5, p. 895-910, 2011.

GHASSEMI-GOLEZANI, K. et al. Effects of Hydro and Osmo-Priming on Seed Germination and Field Emergence of Lentil (*Lens culinaris* Medik.). **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj**, Tabriz, v. 36, n.1, p. 29-33, 2008.

GOLLE, D. P. et al. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p.1606-1613, 2009.

GOMES et al. Proteomic analysis of free-living *Bradyrhizobium diazoefficiens*: highlighting potential determinants of a successful symbiosis. **BioMed Central Genomics**, Brasília, v. 15, p. 643, 2014.

GRATTAPAGLIA, D. et al. Progress in *Myrtaceae* genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, Brasília, v. 8, n. 3, p. 463-508, 2012.

GUPTA, S. C. et al. Induction of Hsp70, alteration in oxidative stress markers and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila melanogaster*: modulation by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, Lucknow, v. 1770, n. 9, p. 1382-1394, 2007.

GUTZAT, R., BORGHI, L., GRUISSEM, W. Emerging roles of retinoblastoma-related proteins in evolution and plant development. **Trends in Plant Science**, Zurich, v. 17, n.3, p.139-148, 2012.

HILLENKAMP, F.; KARAS, R. C.; BEAVIS, B. T. C. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Analytical chemistry**, Münster, v. 63, n. 24, p. 1193-1203, 1991.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 431-438, set. 2001.

HOEHN, G. T.; SUFFERDINI, A. F. Proteomics. **Critical Care Medicine**, v. 33, p. 444-448, 2005.

HUANG, G.T. et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. **Molecular Biology Reports**, Liaoning, v. 39, n.2, p. 969-987, 2012.

IPCC. **Intergovernmental Panel on Climate Change** (2014). Disponível em <http://www.ipcc.ch>. 2014. Acesso em 22 de dezembro de 2014.

ITOH, T. et al. Curated genome annotation of *Oryza sativa* ssp. *japonica* and comparative genome analysis with *Arabidopsis thaliana*. **Genome Research**, tsukuba, v. 17, n.2, p. 175-83, 2007.

JISHA, K. C.; VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. P. et al. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiologiae Plantarum**, Thenjipalam, v. 5, n. 5, p. 1381-1396, 2013.

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

KARP, G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. Ed 3. Editora Manole, São Paulo, p.832, 2005.

KAUSAR M. et al. Invigoration of low vigor sunflower hybrids by seed priming. **Int. J. Agric. Biol.**, v, 11, n. 5, Rawalpindi, p. 521-528, 2009.

KORMUTAK, A.; SALAJ, T.; VOOKOVA, B. Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. **Biologia**, Bratislava, v. 61, p. 479-486, 2006.

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

KUZNETSOV, V.V.; RAKITIN, V.Y.; ZHOLKEVICH, V.N. Effect of preliminary heat-shock treatment on accumulation of osmolytes and drought resistance in cotton plants during water deficiency. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 107, n. 4, p. 399-406, 1999.

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

KWON, S.J. et al. Proteomics studies of post-translational modifications in plants. **Journal of Experimental Botany**, Seoul, v. 57, n. 7, p. 1547-1551, 2006.

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

LEFKOVITS, I. Functional and structural proteomics: a critical appraisal. **Journal of Chromatography B**, Basel, v. 787, n. 1, p. 1-10, 2003.

LIMA, L. B.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento fisiológico de sementes de pepino e relação com desempenho das plantas em campo. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 27-37, 2009.

LIPPERT, D. et al. Conifer defense against insects: proteomic analysis of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) bark induced by mechanical wounding or feeding by white pine weevils (*Pissodes strobi*). **Proteomics**, Vancouver, v. 7, n.2, p. 248-270, 2007.

LIU, C. et al. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein. **Food Chemistry**, Nanjing, v. 102, p. 1310–1316, 2007.

LÓPEZ, M. et al. The effect of temperature and water stress on laboratory germination of *Eucalyptus globulus* Labill. seeds of different sizes. **Annals of Forest Science**, Oviedo, v. 57, n. 3, p. 245-250, 2000.

MAKAROVA, K. S., ARAVIND, L., KOONIN, E. V. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. **Trends in Biochemical Sciences**, Bethesda, v. 25, n. 2, p. 50–52, 2000.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Copenhagen, v. 58, p. 459–481, 2007.

MORAES, G. S. **A produção de eucalipto no Brasil: benefícios para o meio ambiente.** Disponível em: <http://www.administradores.com.br/artigos/economia-e-financas/a-producao-de-eucalipto-no-brasil-beneficios-para-o-meio-ambiente/43169/>. Acesso em: 13 jan. 2015.

MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (Hsp70-lacZ). **Environmental Health Perspectives**, Lucknow, v. 111, n. 16, p. 1926-1932, 2003.

NAMSLAUER, A.; BRZEZINSKI, P. Structural elements involved in electron-coupled proton transfer in cytochrome c oxidase. **FEBS Letters**, Stockholm, v. 567, n.1, p. 103–110, 2004.

NASCIMENTO, W.M. Vegetable seed priming to improve germination at low temperature. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 211-214, 2005.

NATARAJAN, S. S. Analysis of Soybean Seed Proteins Using Proteomics. **J Data Mining Genomics Proteomics**, Beltsville, v. 5, p. 113, 2014.

NATERA, S. H. A.; GUERREIRO, N.; DJORDJEVIC, M. A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Canberra, v. 13, n. 9, p. 995-1009, 2000.

NATHAN, N. et al. Thermotolerant Guard Cell Protoplasts of Tree Tobacco Do Not Require Exogenous Hormones to Survive in Culture and Are Blocked from Reentering the Cell Cycle at the G1-to-S Transition. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 132, n. 4, p. 1925–1940, 2003.

NEBRICH, G. et al. A workflow-optimized laboratory information management system for 2-D electrophoresis-centered proteomics. **Proteomics**, Berlin, v.9, n.7, p.1795-1808, 2009.

PEREIRA, M. D. et al. Primed carrot seeds performance under water and temperature stress. **Scientia Agricola**, Londrina, v. 66, n. 2, p. 174-179, 2009.

PIETERSE, C. M. J. et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, Utrecht, v.5, n. 5, p. 308–316, 2009.

POSMYK, M. M.; JANAS K. M. Effects of seed hydropriming in presence of exogenous proline on chilling injury limitation in *Vigna radiata* L. seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, Lodz, v. 29, n. 6, p. 509–517, 2007.

POTTS, B. M. Genetic improvement of eucalypts. In: (Ed.). **Encyclopedia of forest sciences**. Oxford, UK: Elsevier, p. 1480-1490, 2004.

RABBANI, M. A. et al. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA get-blot analyses. **Plant Physiology**, Tsukuba, v. 133, n. 4, p. 1755–1767, 2003.

RAMPINO, P. et al. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, n. 12, p. 243-252, 2006.

RIZHSKY, L.; HONGJIAN, L.; MITTLER, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant Physiology**, Whashington, v. 130, n. 3, p. 1143-1151, 2002.

ROCHA, T. L. et al. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília: Embrapa. (Comunicado técnico 136). p. 1-12, 2005.

ROVEDA-HOYOS, G.; FONSECA-MORENO, L. P. (2011). Proteomics: a tool for the study of plant response to abiotic stress. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 29, n. 2, p. 221-230, 2011.

SANI, E. et al. Hyperosmotic priming of Arabidopsis seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome. **Genome Biology**, Glasgow, v. 14, n. 6, p. 59, 2013.

SANTOS, A. R. F.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A. Restrição hídrica em sementes de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 213-220, fev. 2011.

SBS – **Sociedade Brasileira de Silvicultura** (2009) – Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>>. Acesso em 15 de maio de 2014.

SCHOFFL, F.; PRANDL, R.; REINDL, A. Regulation of the heat-shock response. **Plant Physiology**, Whashington, v. 117, n. 4, p. 1135-1141, 1998.

SEO J.; LEE, K. J. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Seoul, v. 37, n. 1, p. 35-44, 2004.

SEQUEIROS, M. J. C. et al. Philibertain g I, the most basic cysteine endopeptidase purified from the latex of *Philibertia gilliesii* hook. et Arn. (Apocynaceae). **The Protein Journal**, Puerto Madryn, v. 24, n. 7-8, p. 445-453, 2005.

SHARMA, R. et al. Recent advances in dissecting stress regulatory crosstalk in rice. **Molecular Plant**, Davis, v. 6, n. 2, p. 250-60, 2013.

SHEORAN, I. S. et al. Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. **Proteomics**, Saskatoon, v. 5, n. 14, p. 3752-3764, 2005.

SHEVCHENKO, A. et al. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. **Analytical Chemistry**, Heidelberg, v. 73, n. 9, p. 1917-1926, 2001.

SHIMADA, T. et al. Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, Kyoto, v. 278, n. 34, p.32292-32299, 2003.

SHIN, K. H. et al. Defense proteins are induced in wheat spikes exposed to *Fusarium graminearum*. **Plant Omics Journal**, Cheongju, v. 4, n. 5, p. 270–277, 2011.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, Tsukuba, v. 6, n. 5, p. 410–417, 2003.

SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Yokohama, v. 58, n.2, p. 221–227, 2007.

SILVA, M. A. et al. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, n. 3, p. 193-201, 2007.

SILVA, A. M. S.; CORRÊA, G. C.; REIS, E. M. Proteômica: uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2007.

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**, Wageningen, v. 137, n. 1, p. 354–368, 2005.

SOUZA, G.M.; CARDOSO, V.J.M. Effects of different environmental stresses on seed germination. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 28, n. 3, p. 621–630, 2000.

SRIVASTAVA, J. K.; SHANKAR, E.; GUPTA, S. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. **Molecular Medicine Report**, Cleveland, v. 3, n. 6, p. 895–901, 2010.

STEINHAEUER, W. R.; WALSH, R. C.; KALFAYAN, L. J. Sequence and structure of the *Drosophila melanogaster* ovarian tumor gene and generation of an antibody specific for the ovarian tumor protein. **Molecular and Cellular Biology**, Chapel Hill, v. 9, n. 12, p. 5726–5732, 1989.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 819, 2009.

TANDANG-SILVAS, M. R. G. et al. Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures. **Biochimica et Biophysica Acta**, Kyoto, v. 1804, n. 7, p. 1432–1442, 2010.

VAN DER HOORN, R. A. L.; JONES, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current Opinion in Plant Biology**, Wageningen, v. 7, p. 400–407, 2004.

VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, Montreal, v. 99, n. 4, p. 450–456, 2010.

VENTURA, L. et al. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, Pavia, v. 60, p. 196–206, 2012.

VERMELHO, A. B. et al. **Enzimas proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas**. Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado. Rio de Janeiro: Interciências, Ltda, 2008.

WANG, W. et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, Rehovot, v. 9, n. 5, p. 244–252, 2004.

WASINGER, V. C. et al. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 16, n. 7, p. 1090-1094, 1995.

WEISE, S. E.; WEBER, A. P. M.; SHARKEY, T. D. Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. **Planta**, Madison, v. 218, n. 3, p. 474–482, 2004.

WEITBRECHT, K.; MULLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: early seed germination. **Journal of Experimental Botany**, Freiburg, v. 62, n. 10, p. 3289–3309, 2011.

WHEELER, G. M. C. et al. A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rosario, v. 139, n. 1, p. 39–51, 2005.

WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & genetic engineering reviews**, Newcastle, v. 13, p.19-50, 1995.

WINNING, B.M.; BOURGUIGNON, J.; LEAVER, C.J. Plant mitochondrial NAD⁺-dependent malic enzyme. cDNA cloning, deduced primary structure of the 59- and 62-kDa subunit, import, gene complexity and expression analysis.

The Journal of Biological Chemistry, Oxford, v. 269, n. 7, p. 4780–4786, 1994.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell & Environment**, Tucson, v. 25, n. 2, p. 131–139, 2002.

YACOUBI, R. et al. Toward Characterizing Seed Vigor in Alfalfa Through Proteomic Analysis of Germination and Priming. **Journal of Proteome Research**, Tunis, v. 10, n. 9, p. 3891–3903, 2011.

YANG, X.; DONG, M.; HUANG, Z. Role of mucilage in the germination of *Artemisia sphaerocephala* (Asteraceae) achenes exposed to osmotic stress and salinity. **Plant Physiology and Biochemistry**, Beijing, v. 48, n. 2-3, p. 131–135, 2010.

YANG, Y. et al. Comparative proteomic analysis of *indica* and *japonica* rice varieties. **Genetics and Molecular Biology**, Zhenjiang, v. 37, n. 4, p. 652–661, 2014.

ZARETSKY, J.Z.; WRESCHNER, D.H. Protein multifunctionality: Principles and mechanisms. **Translational Oncogenomics**, Tel-Aviv, v. 3, p. 99-136, 2008.

ZEEMAN, S.C.; SMITH, S.M.; SMITH, A.M. The diurnal metabolism of leaf starch. **Biochemical Journal**, Zurich, v. 401, n. 1, p. 13–28, 2007.

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.