

**INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA NA
GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE SEMENTES DE
FEIJOEIRO**

EDNA ANTÔNIA TORQUATO DE AGOSTINI

**INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA NA
GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE SEMENTES DE
FEIJOEIRO**

EDNA ANTÔNIA TORQUATO DE AGOSTINI

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

Área de Concentração: Produção Vegetal

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Ceci Castilho Custódio

631.521
A275i

Agostini, Edna Antônia Torquato.

Indução de tolerância à deficiência hídrica na germinação e crescimento inicial de sementes de feijoeiro/ Edna Antônia Torquato de Agostini. – Presidente Prudente, 2010.

44 : il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) –
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE:
Presidente Prudente – SP, 2010.

Bibliografia

1. Germinação -- Testes. 2. Tratamento de sementes – Testes. 3. Sementes -- Elicitor. 4. Sementes – Choque frio. 5. Sementes – Ácido salicílico I. Título.

EDNA ANTÔNIA TORQUATO DE AGOSTINI

Indução de tolerância à deficiência hídrica na germinação e crescimento inicial de sementes de feijoeiro

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

Presidente Prudente, 17 de março 2011

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Carlos Henrique dos Santos
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE,
Presidente Prudente - SP.

Prof. Dr. Marco Eustáquio de Sá
Universidade Estadual Paulista Julio de
Mesquita Filho – UNESP,
Ilha Solteira - SP.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho deve muito a algumas pessoas, por diferentes razões, e eu gostaria de agradecer especialmente:

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Ceci Castilho Custódio pela amizade, humildade e também pelo companheirismo nos momentos mais difíceis desta jornada.

Ao amigo Prof^º. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto que me incentivou e acreditou na realização deste trabalho a quem eu confio e admiro.

À Francislaine Anelize Garcia Santos, Lindaura Helena da Silva, Marcia Guaberto e Luciana Machado Guaberto por quem tenho muito carinho e gratidão infinda pela ajuda prestada no decorrer da minha pesquisa.

À Keid Ribeiro Kruger que com carinho me recebia e me ajudava conforme a necessidade.

À Jóice Carvalho na qual minhas idas e vindas presenciou minha luta e me deu forças até o presente momento.

À Catariny Cabral Aleman, a quem tenho muito carinho, pois não mediu esforços em me ajudar.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sempre senti a presença em minha vida.

A minha família (Ademilson e Rafaela) pelo amor e carinho recebido na minha luta diária até a completa realização deste trabalho.

Aos meus pais, irmãos, cunhados e sobrinhos pela alegria da existência.

Aos professores Ceci e Nelson pela realização deste trabalho, a quem eu desejo que se cumpram todas as bênçãos, pois sem eles não teria se cumprido.

*Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

RESUMO

Indução de tolerância à deficiência hídrica na germinação e crescimento inicial de sementes de feijoeiro

As condições ambientais desfavoráveis fazem com que os vegetais passem por adaptações e a forma como se protegem é essencial, podendo aumentar a produção e qualidade dos alimentos. O feijão (*Phaseolus vulgaris* L) é de grande valor econômico e de relevante interesse agrônomo. Tratando-se de uma cultura de sensibilidade à temperatura e deficiência hídrica, podem ocorrer aclimações e alterações no metabolismo celular, entre elas a síntese de proteínas de defesa. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do ácido salicílico e do choque frio aplicados às sementes para a possível tolerância à restrição hídrica, durante o início do processo de germinação, por meio de variáveis fisiológicas e expressão de proteínas solúveis. As sementes foram embebidas em substrato papel a temperatura constante de 25°C em água ou solução aquosa correspondente a 2,5 vezes o peso do substrato seco, sendo parte das sementes em água e parte em solução de ácido salicílico à concentração de 0,01 Mm, pelas primeiras 24 horas. Metade das sementes embebidas em água como as embebidas em ácido salicílico foram transferidas para o choque frio, por 24 horas, à temperatura de 7°C. A seguir todas as sementes foram transferidas para um substrato simulando diferentes potenciais osmóticos: 0,0; -0,3; -0,6; -1,2 MPa induzidos por manitol, sendo considerado potencial zero o substrato umedecido com água, compondo quatro combinações sem choque sem ácido salicílico (SCHSAS), com choque sem ácido salicílico (CCHSAS), sem choque com ácido salicílico (SCHCAS) e com choque com ácido salicílico (CCHCAS). Os tratamentos foram avaliados por germinação, classificação de vigor, comprimento de parte aérea e raiz, massa seca da parte aérea e raiz e relação raiz/parte aérea. Após a avaliação da germinação, duas amostras de cinco plântulas normais, por repetição, foram utilizadas para determinação de prolina (plântula toda) e extração de proteínas totais e análise por eletroforese SDS – PAGE de parte aérea e raiz. Os resultados foram analisados considerando o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 4x4 (combinação dos tratamentos com ácido salicílico e choque frio e níveis de deficiência de água no substrato), empregando-se Tukey (5% de probabilidade) para comparação de médias dos tratamentos qualitativos e análise de regressão polinomial para os níveis de deficiência. As análises de eletroforese foram avaliadas por imagem detectando-se presença e ausência de bandas. A germinação não foi influenciada pelos tratamentos com ácido salicílico e choque, mas diminuiu com a progressão da deficiência de água. O vigor foi alterado pelos tratamentos de ácido salicílico e choque, sendo que o tratamento com ácido salicílico influiu positivamente enquanto o choque negativamente. O tratamento com ácido salicílico proporcionou maiores comprimentos e massas secas de parte aérea e total das plântulas, principalmente nos níveis intermediários de deficiência de água. A expressão de proteínas dos tratamentos CCHCAS e SCHCAS revelou o mesmo padrão eletroforético tanto para parte aérea quanto para raiz com maior intensidade de expressão nos potenciais osmóticos menores. O perfil de bandas dos tratamentos CCHSAS e SCHSAS apresentou alteração revelando algumas bandas diferenciadoras.

Palavras Chave: Choque térmico. Choque frio. Ácido orgânico. Ácido salicílico. Estresse hídrico.

ABSTRACT

The induced tolerance to water stress in the germination and early growth of bean seeds

Plants are always exposed to aggression of biotic and abiotic agents. Their protection pathway is essential, and it would increase the food production. Navy beans (*Phaseolus vulgaris* L) are of high economic importance and of agronomic value. It is a susceptible crop to temperature and to water stress, what could lead to metabolic alterations as the synthesis of protein defences. The objective of this work was to study the effect of salicylic acid and the cold shock applied to germinating seeds over the water deficit tolerance, during the beginning of the germination process by means of physiological variables and soluble protein expression. Seeds were embedded in moistened paper substrate, half of the sample in water and half in the salicylic acid (0.01mM) in the first 24 hours. Part of both treatments was then subjected to cold shock 24 hours at 7°C. After that all seeds, from both treatments were subjected to different mannitol induced water potentials: 0;-0.3; -0.6 and -1.2 MPa. Water was considered the zero potential. Four combinations were considered: without shock and salicylic acid (SCHSAS), with shock and without salicylic acid (CCHSAS), without shock with salicylic acid (SCHCAS) and with shock and salicylic acid (CCHCAS). Treatments were evaluated by germination, vigour classification, shoot and root dry weight and length, as by the rate shoot/root. After germination evaluation, five normal seedlings were used to protein and another five to proline extraction. Proline was determined in the whole seedling and protein in shoot and in the root, being compared by SDS-PAGE. Results were analyzed as a completely random design in a factorial design (4x4 – as a combination of salicylic acid cold shock with the water restriction) by the Tukey's test ($P < 5\%$) for average comparisons and with polynomial regression for water deficit. Electrophoretic patterns were analyzed by absence presence of bands. Germination was not affected by salicylic acid or by the cold shock treatments, but by the increase in the water deficit. Vigour was altered by salicylic acid and by the shock, being the last one affecting positively and the cold shock negatively. Salicylic acid increased length and weight, especially in the intermediary levels of water deficit. Protein expression of the treatments CCHCAS and SCHCAS showed the same electrophoretical patterns for shoot and root, with an increase in the expression for the lower potentials. The pattern of CCHSAS and SCHSAS treatments exhibited some different bands.

keywords: Thermal shock. Cold shock. Organic Acid. Salicylic acid. Water deficit.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
3 OBJETIVO	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos principais alimentos da população brasileira especialmente a de baixa renda. Na maioria das regiões predomina a exploração do feijoeiro por pequenos agricultores, com uso reduzido de insumos e baixas produtividades. O Brasil produz cerca de 3,3 milhões de toneladas de feijão comum com produtividade média de 882,6 kg ha⁻¹ (CONAB, 2010); em áreas irrigadas a produtividade alcança 3.000 kg ha⁻¹, sendo o segundo maior produtor mundial de feijão.

O ambiente está em constante modificação climática em virtude do uso desenfreado dos recursos naturais pelo homem, gerando a necessidade de estudos que detectem as possibilidades da produção vegetal em ambientes com limitações hídricas e nutricionais. A planta de feijão é sensível ao estresse hídrico após a semeadura; valores, no solo, de -0,15 MPa induzem os primeiros sintomas de deficiência na folha primária e -0,35 MPa podem reduzir drasticamente a germinação e a alongação de células (DOURADO NETO; FANCELLI, 2000).

Dentre os fatores externos, em ambientes tropicais, a água é um dos principais, atuando na ativação de diferentes processos metabólicos, que culmina com a germinação de sementes.

A germinação de sementes é o desenvolvimento do embrião e a formação de uma plântula normal. Carvalho e Nakagawa (2000) ressaltam que a germinação das sementes pode sofrer alterações por fatores internos, relacionados à longevidade e vigor e também fatores externos como água, temperatura e oxigênio.

Algumas substâncias podem colaborar melhorando a eficiência de processos metabólicos, os elicitores, ou atuando diretamente em rotas metabólicas de resposta ao ambiente desfavorável permitindo adaptações às mudanças ambientais. Uma dessas substâncias é o ácido salicílico. Por outro lado, alguns procedimentos também podem colaborar nas reações das plantas ao estresse. Assim, choque térmico, ou seja, um curto período de temperatura desfavorável pode induzir a aclimação da planta a outro fator desfavorável, abiótico como deficiência de água ou temperatura baixa, ou mesmo biótico como patógenos. Essas respostas,

caracterizadas como de um estresse produzindo defesas ativas na planta a uma gama de outros estresses são conhecidas como tolerância cruzada.

A investigação destas substâncias e possíveis respostas cruzadas é importante para a agricultura, principalmente tendo em vistas as perspectivas futuras de alterações ambientais decorrentes da crescente utilização de combustíveis fósseis e os aumentos na concentração de gases na atmosfera gerando o efeito estufa e o aquecimento global.

Além disso, a emergência e o estabelecimento inicial são consideradas as fases mais críticas de uma cultura devido à sensibilidade aos fatores externos adversos e pelo menor aparato de respostas que dispõe a plântula, sendo assim a agricultura necessita de estudos nestas áreas, mesmo considerando que as condições atuais de clima não sejam modificadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pertence à família Fabaceae, originária do continente americano. O ciclo do feijão varia de 61 a 110 dias, o que o torna uma cultura apropriada para compor sistemas agrícolas de intensivos a tecnificados. O produto final da cultura é o grão, um dos alimentos básicos para a população brasileira (FARIAS, 2009). O desenvolvimento do feijoeiro compreende duas fases distintas básicas, sendo elas denominadas de fase vegetativa e fase reprodutiva. A fase vegetativa é caracterizada pelo desdobramento das folhas primárias até o primeiro botão floral. A fase reprodutiva transcorre da emissão do primeiro botão floral até o pleno preenchimento das vagens com posterior maturação dos grãos (DOURADO NETO; FANCELLI, 2000).

O feijoeiro é pouco tolerante a deficiência hídrica, o que pode aumentar ou reduzir seu ciclo com mudanças em algumas fases de seu desenvolvimento. Assim como a disponibilidade hídrica implica em seu desenvolvimento, a fertilidade do solo é importante para favorecer o potencial produtivo da espécie (DOURADO NETO; FANCELLI, 2000). A melhoria do desempenho do feijão comum está associada à obtenção de novos cultivares com características agrônômicas desejáveis, aumentando o desempenho em diversos locais, nos anos agrícolas e épocas de semeadura (LEMOS et al., 2004).

O feijão é cultivado praticamente em todas as regiões do Brasil, em grande diversidade de condições ambientais. Todos os cultivares, alguns em maior outros em menor grau, são sensíveis a condições climáticas adversas. As sementes, durante a germinação, são particularmente sensíveis aos fatores ambientais estressantes como falta de água e temperatura baixa ou muito alta. Estresses ambientais estão ligados diretamente com alterações no padrão de síntese de proteínas específicas, em função do tipo de estresse (ARAÚJO; PINHEIRO; RUMJANEK, 1998).

A falta de água pode afetar significativamente as etapas de seu desenvolvimento, reduzindo seu ciclo biológico. A temperatura próxima de 25°C favorece a germinação das sementes e a emergência das plântulas, e abaixo de 12°C pode comprometer a taxa e a velocidade da germinação e contribui para um aumento de plântulas anormais. (DOURADO NETO; FANCELLI, 2000).

De acordo com Santos et al. (1992) o potencial osmótico de soluções salinas pode apresentar valores negativos em relação às células embrionárias, dificultando a absorção de água que a semente necessita para germinar. A salinização é um fator limitante ao desenvolvimento e a produtividade das plantas, por afetar principalmente a disponibilização de recursos hídricos e estar diretamente relacionada ao potencial osmótico por torná-lo mais negativo, resultando no aumento da pressão de turgor da célula (ESTEVES; SUZUKI, 2008). Durante a escassez hídrica, podem ocorrer grandes mudanças na planta. Essas mudanças dependem da severidade, duração e natureza do estresse, do genótipo e fase do desenvolvimento da planta. (KRAMER, 1974). A redução da germinação causada por estresse hídrico é atribuída à redução das atividades enzimáticas. Isso ocorre não só por dificultar o movimento de absorção, mas também por facilitar a entrada de íons em quantidades tóxicas no período de absorção de água. Em condições totais de água disponível, as sementes podem absorver rapidamente a água, causando rupturas em seus tecidos e sérios danos à germinação (BRAGA et al., 1999).

A água constitui a matriz onde ocorre grande parte dos processos bioquímicos e fisiológicos ativando processos importantes no desenvolvimento da plântula, tendo importante influência nas propriedades e estrutura das membranas, proteínas, ácidos nucléicos e outros componentes celulares (BRAY, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2004). Machado Neto (2006a) e Ávila et al. (2007) citam que a solução osmótica de manitol pode se destacar dentre outras soluções que tem sido usadas para simular um ambiente com baixa umidade, caracterizando a deficiência hídrica.

Sementes de feijão com potenciais fisiológicos diferentes, submetidos ao estresse hídrico induzido por manitol, apresentam diminuição na germinação, isso ocorrendo na primeira contagem, velocidade de germinação, massa seca de plântulas, comprimento de raízes e parte aérea e um aumento de anormalidade nas plântulas em potenciais de $-0,4$ a $-0,6$ (BRAGA et al., 1999), porém após seis dias sob deficiência a $-1,2\text{MPa}$ havia germinação, em laboratório, em cultivares de feijoeiro (MACHADO NETO et al., 2006a). Em feijão a média de temperatura ideal seria entre 18 e 31°C , a mínima entre 8 e 13°C , a máxima entre 35 e 39°C ; acima inibiram drasticamente a germinação (MACHADO NETO et al., 2006b).

A deficiência hídrica induz a síntese de HSPs (Heat Shock Protein) específicas e /ou o aumento de determinados grupos em vegetais mais tolerantes,

assim como o estresse térmico (ARAÚJO; PINHEIRO; RUMJANEK, 1998). De forma semelhante, a resistência aos choques de calor e frio podem ser aumentados por elevada concentração de compostos fenólicos (RIVERO et al., 2001) ou envolvimento por alguns aminoácidos (MACHADO NETO et al., 2004b). A expressão elicitor biológico refere-se a macromoléculas, oriundas tanto das plantas, como dos patógenos. Uma série de compostos incluindo oligossacarídeos, glicoproteínas e peptídeos mediam a indução das reações de defesa (JUNG et al., 2000; KÚC, 2000; BENHAMOU; NICOLE, 1999).

Diversas podem ser as respostas de tolerância dos organismos aos estresses como a resposta diferencial de cultivares Custódio et al. (2002); Machado Neto et al. (2004a) ; Teixeira et al. (2008), via ativação Nepomuceno et al. (2001); Verdoy et al. (2004) ou desativação Nepomuceno et al. (2000) de genes que codificam proteínas específicas, finalizando com diversas respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento. Entre estas respostas ao estresse podemos encontrar fatores de transcrição Zhu (2001), proteínas de diversas classes, como as BiP Binding Protein, Kalinski et al. (1995), peroxidases Siegel (1993), proteínas LEA (Late embryogenesis abundant protein - Verdoy et al. (2004)), proteínas ricas em prolina (PRPs) - Verdoy et al. (2004) e proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein - (HSPs)), as quais deveriam ser específicas ao estresse de calor, porém, também são sintetizadas na presença de estresse hídrico ou como resposta universal ao estresse sendo encontradas desde procariotos até em eucariotos (VIERLING, 1991).

Não existem estudos que comprovem completamente as funções fisiológicas das HSPs, entretanto, existem evidências consideráveis demonstrando que a termotolerância está correlacionada com a síntese e acúmulo de HSPs (JINN et al., 1993; SCHIRMER; LINDIQUIST; VIERLING, 1994; PARK et al., 1996; PRANDL et al., 1998; RISTIC et al., 1998; KUK et al., 2000; ARAÚJO; RUMJANEK; PINHEIRO 2003). Quando ocorre a termotolerância, para conter os efeitos do estresse, a planta sofre aclimatação por meio de mudanças no fluxo metabólico por meio da supressão de rotas metabólicas, envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio e induzindo a síntese de proteínas de choque térmico (HSPs) (CUSTÓDIO et al, 2009). Segundo Mc Cue et al. (2000), várias formas de combate ao estresse são citadas, entre elas a aplicação exógena ou estímulo à síntese

endógena dos ácidos orgânicos, salicílico, ascórbico e cítrico, sendo que destes o primeiro pode agir como indutor de proteínas de tolerância ao estresse.

O ácido salicílico (AS) é um composto pertencente ao grupo dos compostos fenólicos e que está presente em grande parte das plantas (MAIA et al, 2000). Apresenta inúmeras funções, destacando-se inibição da germinação e do crescimento; interferência na absorção de raízes, redução da transpiração e causa a abscisão foliar (KERBAUY, 2008). Porém, Carvalho et al. (2007) concluíram que a aplicação de ácido salicílico em sementes de calêndula, planta medicinal pertencente à família *Asteraceae*, contribuiu positivamente na germinação e no índice de velocidade de germinação considerando níveis de estresse hídrico e térmico a 35°C. Maia et al. (2000) estudaram que o ácido salicílico promoveu aumento da percentagem de germinação em plântulas de soja, além de estimular o comprimento de raízes e incrementar o peso da matéria verde. O ácido salicílico tem mostrado capacidade de ativar peroxidases tendo um importante papel no processo bioquímico com a biossíntese de suberina e lignina que estão envolvidas no reforço das paredes das células, e essas substâncias são de grande importância para a proteção da planta (SAKHABUTDINOVA, FATKHUTDINOVA; SHAKIROVA, 2004).

Durante períodos de deficiência hídrica, muitas mudanças ocorrem na planta. Uma das respostas ao estresse hídrico nas células das plantas é o acúmulo de prolina. Durante a seca as plantas superiores ativamente acumulam açúcares, ácidos orgânicos e íons no citosol para diminuir o potencial osmótico e conseqüentemente manter o potencial hídrico e o turgor das células. O acúmulo de prolina nas plantas ocorre quando estas estão submetidas a condições de estresse hídrico, térmico ou salino (MAIA et al., 2007). O resultado deste aminoácido acumulado é resposta do aumento no fluxo de glutamato, que é metabolizado pela Pirrolina-5-Carbixilato Sintetase (P5CS), sendo esta a enzima que regula o taxa de biossíntese de prolina (HARE; CRESS, 1997). Com a diminuição no potencial osmótico da célula ocorre um aumento na síntese de P5CS e assim sendo um aumento na acumulação de prolina, e isso tem sido proposto como ajuste osmótico.

Muitas plantas acumulam solutos orgânicos ou osmóticos compatíveis que interferem nas funções das enzimas que são constituídos de aminoácidos, particularmente a prolina em resposta a diferentes tipos de estresse (TAIZ; ZEIGER, 2004). De acordo com Maia et al. (2007), ocorreu um acréscimo de prolina nos tecidos foliares a partir da diminuição do conteúdo relativo de água destes tecidos e

este acúmulo ocorreu em virtude do aumento das atividades das enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos ou da inibição da oxidação da prolina.

Como se verifica, na literatura, ainda são poucos os estudos sobre os compostos que conferem resistência ao feijoeiro em condições de estresse hídrico nesta fase tão crítica que é a germinação das sementes e emergência das plântulas. Dessa forma, se fazem necessários, estudos que busquem estas informações, além de se também buscar conhecimentos sobre os produtos que possam ser utilizados para estimular a formação destes compostos.

3 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito do ácido salicílico, do choque frio e da combinação dos dois na indução de tolerância à deficiência de água em sementes de feijoeiro durante a germinação e no crescimento inicial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido nos laboratórios de Sementes e Genética da Universidade do Oeste Paulista -UNOESTE- localizado em Presidente Prudente-SP. Foram utilizadas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do cultivar Carioca 80 SH com procedência de Santo Anastácio/SP. As sementes foram divididas em duas porções, sendo parte embebida em água e parte em solução aquosa de ácido salicílico 0,01mM (CARVALHO et al., 2007) em papel toalha para germinação. Utilizou-se a proporção de 2,5 vezes o peso do substrato seco em água ou solução aquosa e as sementes foram mantidas a temperatura constante de 25°C, nas primeiras 24 horas. Tanto as sementes embebidas em água como as embebidas em ácido salicílico foram transferidas para o choque frio, por 24 horas, à temperatura de 7°C (CUSTÓDIO et al., 2009). Assim obtiveram-se quatro combinações de choque frio e ácido salicílico como segue: SCHSAS, sem choque e sem ácido salicílico ou tratamento testemunha; SCHCAS, sem choque com ácido salicílico; CCHSAS, com choque sem ácido salicílico e CCHCAS com choque e com ácido salicílico.

A seguir todas as sementes foram transferidas para um substrato simulando diferentes potenciais hídricos: 0; -0,3; -0,6; -1,2 MPa induzidos por manitol, sendo considerado potencial zero o substrato umedecido com água. Os potenciais foram obtidos dissolvendo-se 0; 22,29; 44,58 e 89,17g de manitol por litro de água, estabelecidos pela equação de Van't Hoff (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Cada parcela, para avaliação da germinação, foi formada de 50 sementes com 4 repetições. As sementes foram dispostas em 3 folhas de papel toalha, sendo duas como base e uma como cobertura, enroladas e colocadas em saco plástico. Realizou-se uma única contagem no sétimo dia após o início da embebição. As plântulas foram classificadas em plântulas normais fortes, normais fracas, anormais e mortas. A germinação foi considerada a soma das porcentagens de plântulas normais fortes e fracas. Para classificação de vigor foi considerada a porcentagem de plântulas normais fortes (NAKAGAWA, 1999).

Para avaliação dos comprimentos e massas secas foram instaladas 4 repetições de 10 sementes colocadas para germinar nas mesmas condições da germinação que, aos sete dias, foram medidas quanto ao comprimento da parte

aérea (considerou-se o hipocótilo), comprimento de raiz, massa seca de parte aérea e raiz. A avaliação da matéria seca foi separadamente, da raiz e parte aérea (sem os cotilédones), submetidas à secagem sob temperatura de 60°C por 72 horas, resfriada em dessecador e pesada para obtenção das massas. A relação raiz/parte aérea foi calculada dividindo-se a massa da raiz pela massa da parte aérea (NAKAGAWA, 1999).

Duas amostras de cinco plântulas normais, por repetição, obtidas da avaliação da germinação, ao sétimo dia, foram separadas para determinação de prolina (plântula toda) e extração de proteínas totais (individualizadas em raiz e parte aérea). Cada fração de tecido, por repetição, foi macerado com nitrogênio líquido e colocado em tubos de ensaio com tampão de extração Tris-HCL (0,625 mM) pH 6,8, contendo, 2% duodecil sulfato de sódio (SDS); 20% glicerol e 5% 2-mercaptoetanol na proporção de 1:10 (p:v) de amostra de tecido vegetal para o tampão de extração. Os tubos foram agitados e mantidos por, no mínimo, uma hora em temperatura ambiente e depois aquecido de três a cinco minutos até atingir ebulição. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 9500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi congelado em tubos Eppendorf. As proteínas foram quantificadas de acordo com Bradford (1976), sendo os valores plotados contra uma curva de calibração construída com albumina bovina a 0,5 g mL⁻¹ na faixa de zero a 100µg.

A eletroforese, seguindo método de SDS-PAGE, foi conduzida de acordo com Laemli (1970) em um sistema composto por um gel de corrida contendo 12,5% de acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), Tris Glicina SDS pH 8,8, e um gel de empilhamento com 2,5% de acrilamida-bisacrilamida, Tris HCl pH 6,8. A corrida de eletroforese SDS-PAGE foi realizada em cuba vertical ligada à fonte elétrica por 30 minutos a 50V e 20mA por 4 horas em condições refrigeradas. O tampão de corrida foi composto de Tris (25mM) - Glicina (38mM) - SDS (0,7mM), pH8,8. Alíquotas, contendo a mesma quantidade de proteína por tratamento (20µg), foram colocadas por poço. Os géis foram fixados com isopropanol:ácido acético:água (4:1:5) por 30 minutos e permaneceram em solução contendo 2% Coomassie Blue R250 até aparecerem as bandas de proteína. Quando a coloração mostrou-se muito escura o gel foi descorado com 10% de ácido acético. Posteriormente, foi realizada a foto documentação digital em transluminador permitindo a captura, visualização e o processamento de imagens de bandas protéicas reveladas nos géis.

A análise do padrão eletroforético de cada tratamento foi feita através de comparação visual e detecção diferencial da presença/ausência de bandas e o peso das bandas calculado por interpolação harmônica.

Para se determinar a quantidade de prolina utilizou-se o método descrito por Bates, Waldren e Teare (1973) modificado por Machado Neto et al. (2004b), macerando-se 200 a 300 mg de material fresco (plântula toda) em 5 a 10 mL de ácido sulfosalicílico a 3%. Realizando a filtragem do material adquirido. Retirou-se 2 mL do material obtido em um tubo de ensaio com 2 mL de ácido acético glacial. As amostras foram mantidas em banho maria fervente por uma hora. Após este período resfriou-se em banho de gelo e em seguida fez-se a leitura em espectrofotômetro a 520nm, em triplicatas.

O experimento foi conduzido seguindo o delineamento estatístico inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 4x4, sendo quatro combinações de choque frio e ácido salicílico e 4 potenciais osmóticos produzidos por concentrações de manitol. Os dados foram analisados quanto à variância pelo teste F com 5% de significância, a comparação de médias entre as combinações de choque frio e ácido salicílico pelo teste Tukey ($P < 0,05$) e análise de regressão polinomial para os níveis de potencial osmótico. Foram consideradas as equações significativas com maiores coeficientes de determinação (R^2). Os dados em porcentagem foram transformados em arco seno ($x \cdot 100^{-1}$)^{1/2} enquanto os demais não sofreram transformação. Para a análise utilizou-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas diversas avaliações estão contidos nas figuras de 1 a 7. Quanto à germinação, as sementes submetidas aos tratamentos, de choque frio e ácido salicílico, e aos potenciais osmóticos (Figura 1A) não diferiram em nenhum dos potenciais estudados. No entanto, a germinação foi decrescente com o aumento da deficiência de água. A média inicial (potencial zero) foi de 96,6% decrescendo 6,8% para cada MPa de diminuição no potencial osmótico.

A diminuição da germinação em função do aumento da restrição hídrica é bastante relatada na literatura. No entanto, dentro de um mesmo potencial pode ocorrer respostas diferentes de germinação e vigor como observaram Machado Neto et al. (2006a) e Custódio, Salomão e Machado Neto (2009). Moraes; Menezes e Pasqualli (2005) observaram, em sementes de feijão com o uso de NaCl e PEG 6000, que a porcentagem de germinação manteve-se acima de 90% até -0,2 MPa, após houve redução drástica sendo maior em PEG 6000. Por outro lado existem estudos indicando que ocorreu melhor desempenho na germinação das sementes de feijão que passaram por choque térmico, principalmente a 7°C, antes da restrição hídrica no início do desenvolvimento, como estudaram Custódio et al. (2009).

Quanto ao vigor (Figura 1B), considerando o tratamento SCHSAS foi possível identificar um ajuste quadrático. O potencial relacionado ao maior vigor foi calculado em -0,26 MPa. Neste mesmo tratamento foi possível avaliar que a partir de -0,26 MPa, a restrição hídrica resultou em diminuição do desempenho das sementes, demonstrando fisiologicamente a necessidade hídrica que a semente tem para o seu desenvolvimento posterior. No tratamento sem SCHCAS (Figura 1B) ocorreu um ajuste linear que caracterizou redução no vigor da semente com o aumento da restrição hídrica, ou seja, quando fornecido a maior quantidade de água à semente, observou-se um vigor calculado de 77,4% e à medida que se elevou a restrição hídrica ocorreu decréscimo linearizado no vigor. Braccini et al. (1998), Moraes e Menezes (2003) e Custódio, Salomão e Machado Neto (2009) estudaram que, em sementes, o vigor é mais afetado do que a germinação em condições de deficiência hídrica por soluções osmóticas.

Na análise dos efeitos do tratamento CCHSAS (Figura 1B) não houve diferença significativa, ou seja, não ocorreu diferença entre as médias considerando o aumento do potencial osmótico. No entanto, foi possível observar, para o tratamento CCHCAS, o ajuste quadrático, onde o maior vigor das sementes foi observado no potencial de -0,50 MPa.

Enquanto no potencial zero o tratamento CCHCAS (Figura 1B) apresentou a menor média, diferindo dos demais tratamentos, no potencial mais restritivo, -1,2 MPa, a testemunha, ou seja, as sementes não tratadas é que apresentaram médias inferiores aos tratamentos CCHSAS e SCHCAS. Nos níveis intermediários de restrição de água as diferenças entre os tratamentos foram menos expressivas. No nível -0,3 MPa não houve diferença, e, no nível -0,6 MPa, o tratamento testemunha foi superior, embora não diferindo do tratamento CCHSAS. O ácido salicílico aplicado às sementes de arroz cv. EMBRAPA 7 TAIM, apresentou efeito inibitório na porcentagem de germinação, segundo Silveira, Moraes e Lopes (2000). Esses resultados corroboram aos de Kerbauy (2008) que considera o ácido salicílico um composto fenólico que apresenta inúmeras funções destacando-se a inibição da germinação.

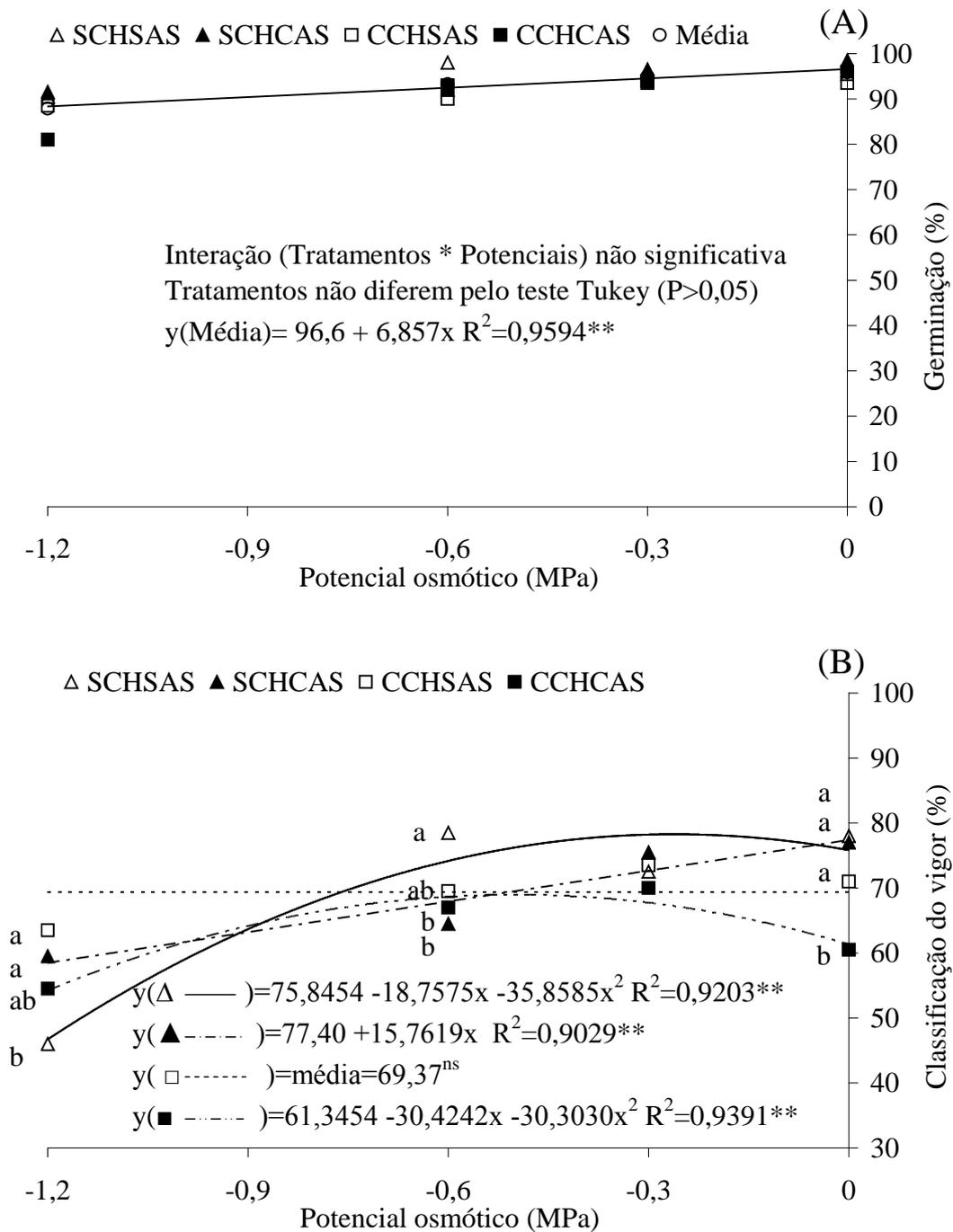


FIGURA 1 - Germinação (A) e classificação de vigor (B) de sementes de feijão tratadas com choque frio (7°C 24h) e ácido salicílico (0,01 mM 48h) e submetidas à níveis de potencial osmótico do substrato obtidos com soluções de manitol. Dentro de um mesmo potencial, letras iguais indicam diferenças não significativas pelo teste Tukey (P>0,05)

Não houve significância na interação tratamento da semente x potencial da água para o crescimento da parte aérea (Figura 2A) que apresentou um decréscimo acentuado até -1,2 MPa, seguindo ajuste linear decrescente, com comprimento, no potencial zero, de 10,7 cm e decréscimo de 7,05 cm para cada MPa de aumento na restrição de água. No entanto, analisando os tratamentos utilizados, houve diferença significativa para o comprimento da parte aérea, ocorrendo um crescimento maior para as plantas testemunha, seguidas das tratadas com ácido salicílico (SCHCAS), das tratadas com choque (CCHSAS) e por fim das tratadas com choque e com ácido salicílico (CCHCAS). Nunes et al. (2009) concluíram que ocorreu um decréscimo no tamanho das plântulas de *Crotalaria juncea*, à medida que os potenciais osmóticos ficaram negativos, considerando uma faixa de -0,4 a -2,0 MPa. Conus et al. (2009) a partir da análise de variância, detectou que ocorreu uma diminuição da parte aérea do milho tratados com soluções osmóticas de KCl e CaCl₂, no potencial osmótico de -0,2 MPa.

Para o comprimento da raiz (Figura 2B), analisando o tratamento SCHSAS, observou-se que ocorreu um ajuste linear significativo. Com o aumento da restrição hídrica ocorreu um decréscimo no comprimento da raiz fato igualmente observado por Queiroz, Almeida e Fernandes (1998). Ao inserir o choque térmico e não empregar o ácido salicílico ocorreu ajuste quadrático com menor crescimento de raiz, calculado em -0,89 MPa o ponto de mínimo crescimento, demonstrando que apenas o choque frio não foi suficiente para atenuar os efeitos da diminuição da água para o crescimento da raiz. Os tratamentos SCHCAS e CCHCAS apresentaram ajuste quadrático com maior crescimento de raiz calculado para -0,35 e -0,39 MPa.

Com maior disponibilidade de água, o tratamento SCHCAS foi superior, CCHCAS intermediário e os outros dois inferiores. Na maior restrição de água, -1,2 MPa, o tratamento sem choque com ácido salicílico continuou sendo superior embora não tenha diferido do com choque com ácido salicílico (CCHCAS).

Quando é analisado o comprimento total (Figura 2C), os tratamentos SCHCAS, SCHSAS, e CCHCAS apresentaram ajuste linear com comprimentos, no potencial zero, calculados de 25,59, 22,38 e 16,81 cm, com decréscimos de 14,81, 14,29 e 5,05 cm para cada MPa de aumento na restrição de água. O tratamento CCHCAS apresentou ajuste quadrático com ponto de máximo de 0,21 MPa.

No comprimento total foi possível verificar que o ácido salicílico foi determinante, pois quando não empregado junto com o choque frio, ocorreu maior comprimento total da plântula; sendo verificado o inverso quando se empregou ácido salicílico. No potencial zero o tratamento superior em relação aos demais foi com uso do ácido salicílico (SCHCAS), embora não tenha diferido da testemunha. O resultado deste trabalho foi contrário ao afirmado na literatura por Kerbauy (2008) que constatou que o ácido salicílico tendeu a inibir o crescimento das plantas. No potencial de água mais drástico não houve diferença entre os tratamentos, enquanto no potencial -0,6 MPa também houve destaque para o uso de ácido salicílico (SCHCAS) que foi superior aos demais tratamentos e à testemunha. Sakhabutidinova et al. (2003) concluíram que o uso do ácido salicílico em plântulas de trigo reduziu a deficiência hídrica e a ação prejudicial da salinidade e acelerou a restauração dos processos de crescimento.

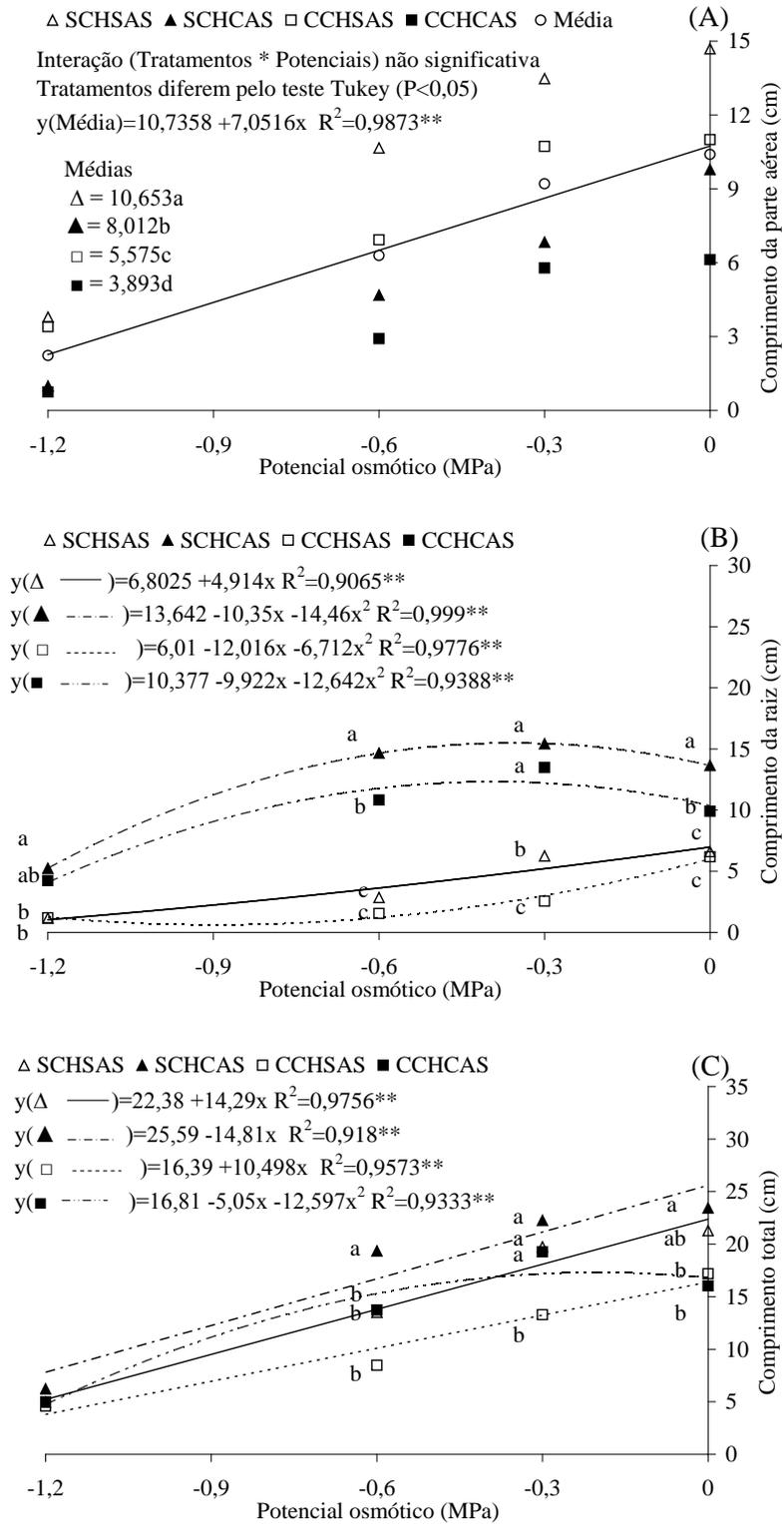


FIGURA 2 - Comprimento da parte aérea (A), da raiz (B) e comprimento total (C) de sementes de feijão tratadas com choque frio (7°C 24h) e ácido salicílico (0,01 mM 48h) e submetidas à níveis de potencial osmótico do substrato obtidos com soluções de manitol. Dentro de um mesmo potencial, letras iguais indicam diferenças não significativas pelo teste Tukey ($P > 0,05$)

Para massa seca de parte aérea (Figura 3A) foi possível verificar para todos os tratamentos que ocorreu redução da massa com a diminuição do potencial osmótico, denotando que a redução da disponibilidade hídrica promoveu menor desenvolvimento de parte aérea com menor translocação das reservas cotiledonares para a parte aérea. Todos os tratamentos apresentaram ajustes lineares sendo maior a massa de parte aérea em total disponibilidade hídrica (0,547g) para o tratamento SCHCAS, com redução da massa a uma taxa de 0,362g para cada um MPa de redução do potencial osmótico.

O tratamento CCHSAS apresentou a menor massa inicial calculada em 0,299g com decréscimo de 0,192g para cada um MPa de redução no potencial. Houve diferença significativa entre os tratamentos nos potenciais 0; -0,3 e -0,6 MPa, enquanto no máximo de restrição hídrica não houve diferença entre os tratamentos. Os tratamentos SCHCAS e SCHSAS apresentaram maior massa seca do que nos tratamentos em que foi utilizado choque frio, CCHSAS e CCHCAS. Didonet (2002) verificou que ocorreu aumento da massa seca de parte aérea do feijão comum cv. Pérola em 50%, em virtude do choque térmico empregado às sementes. Custódio et al. (2009) também constataram melhor desempenho, das sementes de feijão cv. IAPAR 81, que passaram por choque, de 7°C por 24 horas ou 33°C por 24 horas, à restrição hídrica no início do desenvolvimento.

Não houve significância na interação entre os tratamentos e os potenciais para massa seca da raiz (Figura 3B), assim os resultados foram avaliados separadamente. Com relação à restrição de água, todos os tratamentos apresentaram redução da massa de raiz (Figura 3B). Coelho et al. (2010) estudaram que as sementes de feijão sob estresse hídrico e tratamentos osmóticos com manitol, CaCl₂, NaCl e MgCl₂ apresentaram redução nas massas secas de parte aérea e de raiz, demonstrando que sofreram interferência da diminuição da água, como foi possível verificar na Figura 3 A e Figura 3 B.

O ajuste, considerando a média, foi linear decrescente com massa inicial de 0,159g e redução da massa de raiz de 0,066g para cada MPa de redução no potencial osmótico. Considerando apenas os tratamentos empregados nas sementes, o superior foi a testemunha com média de 0,1425g diferindo-se dos tratamentos com choque, com e sem ácido salicílico. O tratamento SCHCAS ficou em posição intermediária não diferindo dos superiores e dos inferiores.

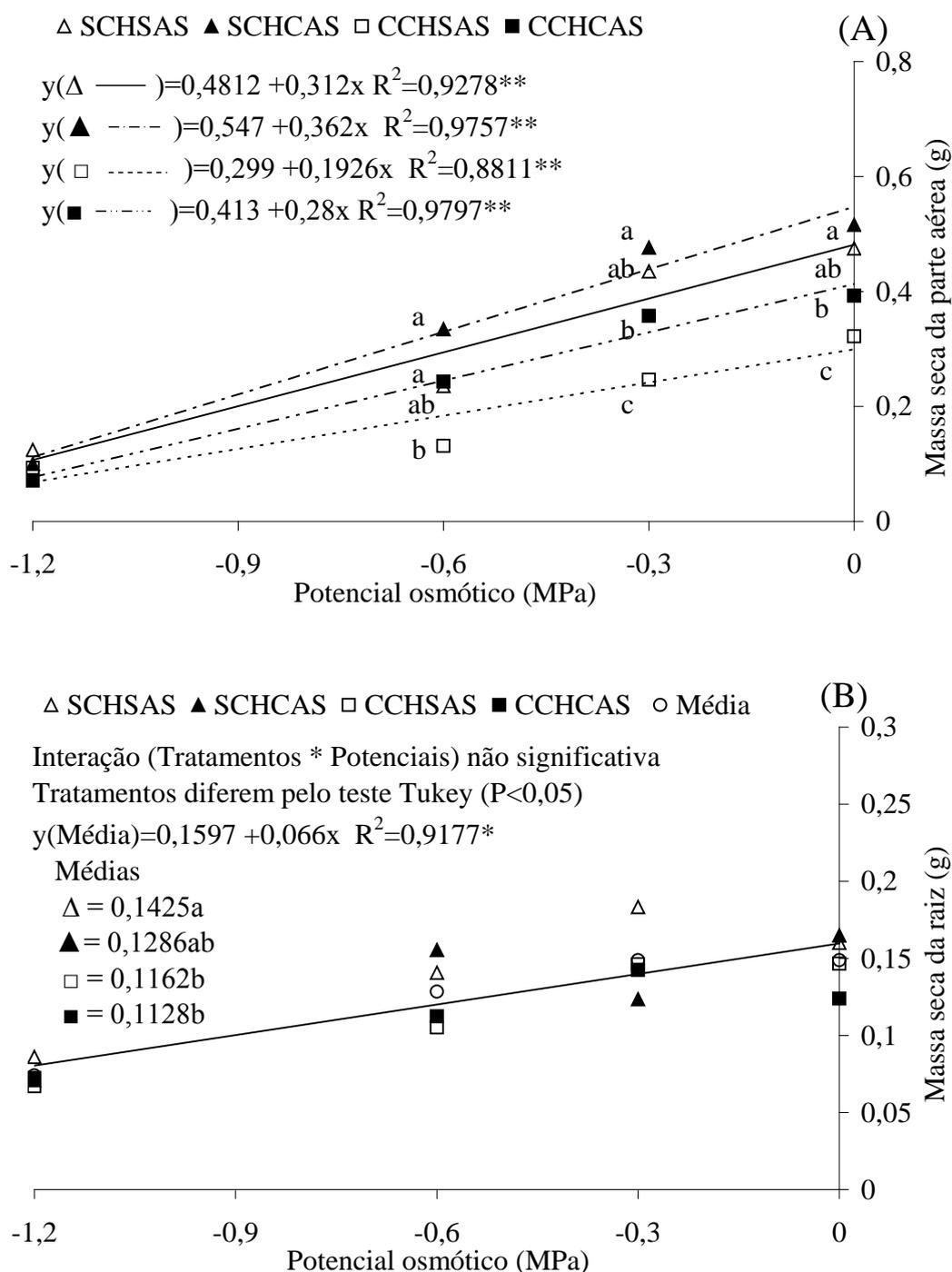


FIGURA 3 - Massa seca da parte aérea (A) e da raiz (B) de sementes de feijão tratadas com choque frio (7°C 24h) e ácido salicílico (0,01 mM 48h) e submetidas à níveis de potencial osmótico do substrato obtidos com soluções de manitol. Dentro de um mesmo potencial, letras iguais indicam diferenças não significativas pelo teste Tukey ($P > 0,05$)

Para massa seca total (Figura 4A) não ocorreu significância da interação entre o potencial osmótico e os tratamentos. Quanto à redução da disponibilidade de água, a massa seca total sofreu redução representada por ajuste linear com massa seca de 0,595g no potencial zero e redução de 0,353g para cada MPa de redução no potencial osmótico. Quanto aos tratamentos, a testemunha e o tratamento SCHCAS foram superiores aos tratamentos com choque, com e sem ácido salicílico. Ou seja, quando não foi utilizado o choque térmico e foi utilizado o ácido salicílico ocorreu maior acúmulo de massa seca total. Singh e Usha (2003) observaram em trigo um aumento na matéria seca significativamente maior no tratamento com ácido salicílico, essa capacidade de eliminar efeito adverso do estresse hídrico, podem ter implicações de melhoria significativa para superar barreira de rendimento decorrentes à limitações de água.

Na relação raiz/parte aérea (Figura 4B) constatou-se que para os tratamentos SCHSAS e SCHCAS e CCHCAS ocorreu incremento na relação raiz/parte aérea considerando-se o ajuste linear, ou seja, ocorreu maior crescimento de raízes quando houve menor disponibilidade hídrica, em detrimento da parte aérea, estando relacionado a uma medida de sobrevivência da planta à restrição hídrica. No caso do tratamento com CCHSAS, onde não ocorreu uso do ácido salicílico, houve ajuste exponencial o que demonstrou que com potencial osmótico de -0,89 MPa resultou em uma relação raiz/parte aérea máxima. Nos potenciais zero e -1,2MPa não houve diferença entre os tratamentos. Nos potenciais -0,3 e -0,6MPa as maiores relações foram encontradas no tratamento CCHSAS e as menores no tratamento SCHCAS. Os demais ficaram em posição intermediária. Coelho et al. (2010) verificaram que para relação raiz/parte aérea ocorreu decréscimo apenas para a solução osmótica com CaCl_2 , sendo que para as soluções de manitol, KCl e MgCl_2 os resultados não foram significativos para a relação raiz/parte aérea.

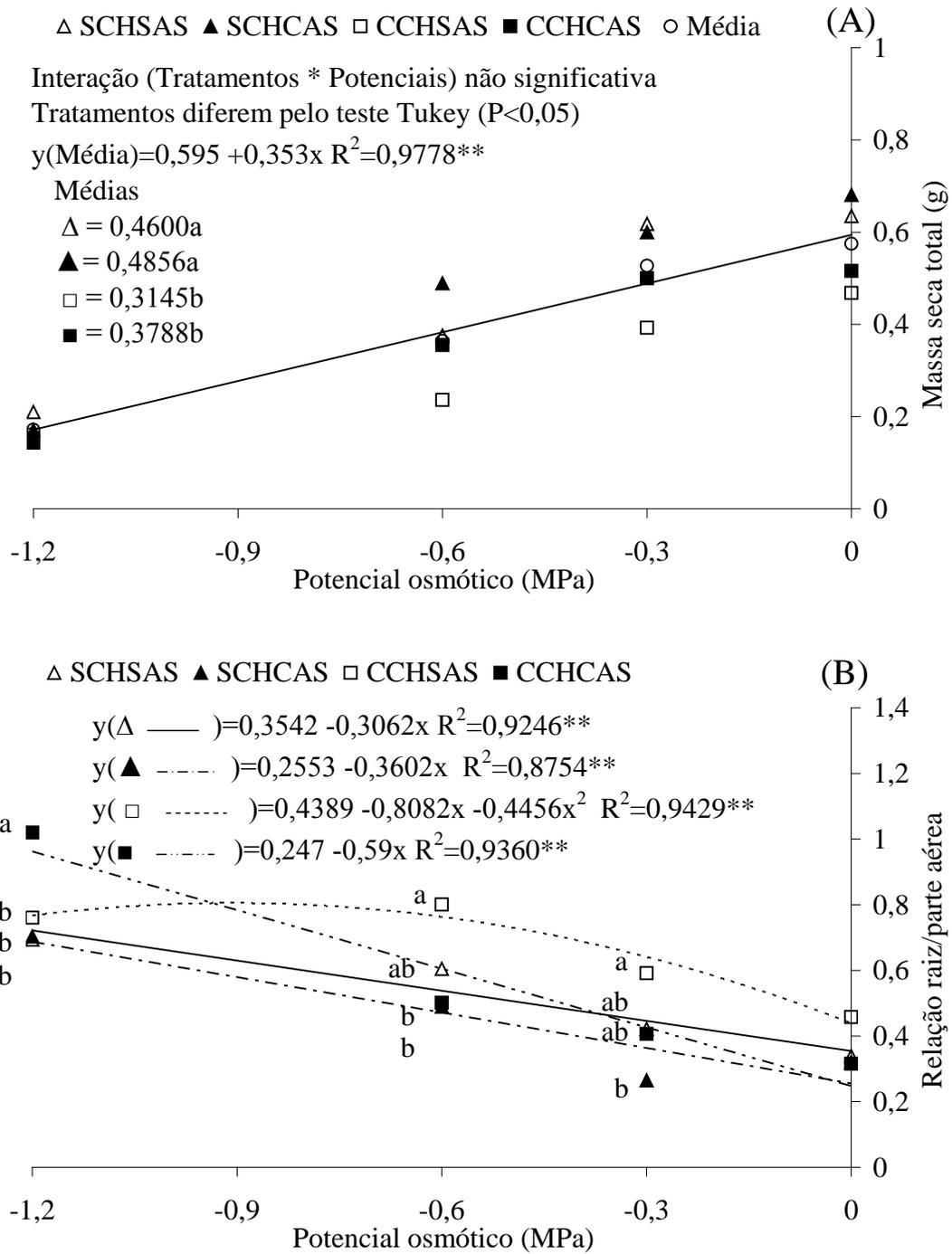


FIGURA 4 - Massa seca total (A) e relação raiz/parte aérea (B) e de sementes de feijão tratadas com choque frio (7°C 24h) e ácido salicílico (0,01 mM 48h) e submetidas à níveis de potencial osmótico do substrato obtidos com soluções de manitol. Dentro de um mesmo potencial, letras iguais indicam diferenças não significativas pelo teste Tukey ($P > 0,05$)

Em todos os tratamentos ocorreu aumento do acúmulo de prolina (Figura 5) em relação ao aumento da restrição hídrica com ajustes lineares crescentes, permitindo inferir que a prolina foi um elemento do metabolismo que favoreceu o ajustamento da plântula às condições de estresse hídrico. A utilização do ácido salicílico, do choque frio ou de ambos acarretou maior acúmulo de prolina, no maior potencial osmótico, demonstrando a possibilidade dos tratamentos aplicados às sementes terem atuado como sinalizadores atenuando os efeitos do estresse hídrico. Nos tratamentos sem estresse hídrico e com estresse moderado, -0,3 e -0,6MPa, não houve diferença no acúmulo de prolina nas plântulas. Machado Neto et al. (2004b) verificaram que o acúmulo da prolina não foi linear e não foi dependente da temperatura. Hussein, Balbaa e Gaballah (2007) observaram em plantas de milho que todas as concentrações de aminoácidos foram reduzidos pelo estresse salino, com exceção da prolina e da glicina. Paxedes, Ferreira e Gomes Filho (2009) constataram que as folhas de feijão caupí, quando túrgidas, mantiveram o teor de prolina constante. Porém, as submetidas à deficiência de água, acumularam prolina objetivando um ajuste osmótico e defesa contra a desidratação. A prolina tem propriedades de ajuste osmótico sem causar danos aos tecidos, quando comparado aos ajustes efetuados por íons (LIMA et al., 2004). Sakhabutdinova et al. (2003) relatam que pode se esperar que o tratamento prévio com uso do ácido salicílico contribui para o acúmulo de prolina sob estresse, como foi verificado neste trabalho.

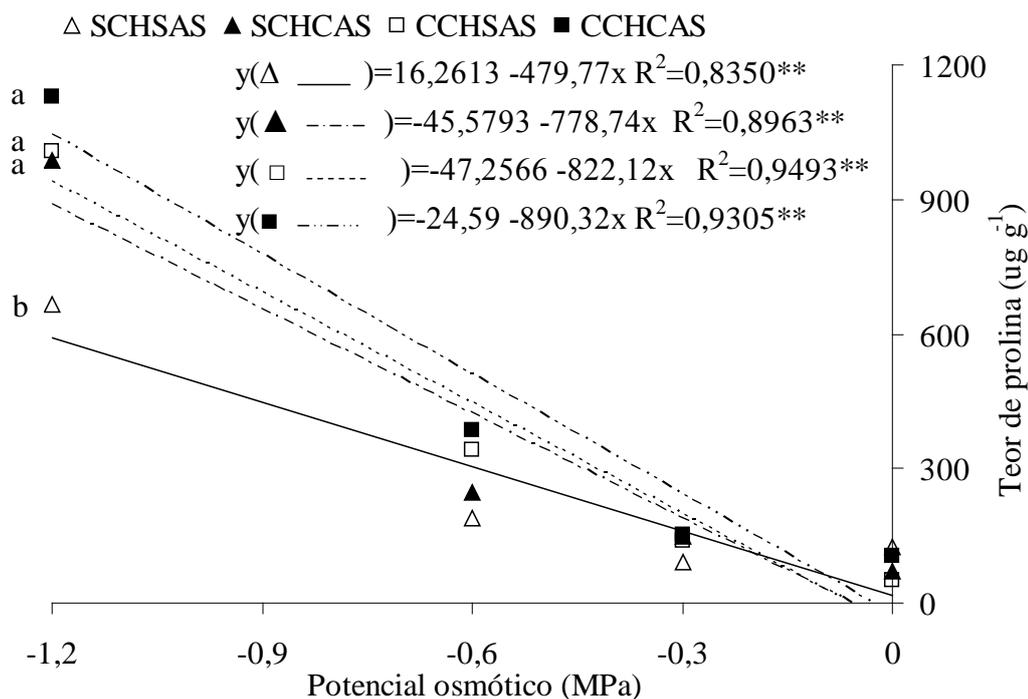


FIGURA 5 - Determinação do teor de prolina em plântulas obtidas de sementes de feijão tratadas com choque frio (7°C 24h) e ácido salicílico (0,01 mM 48h) e submetidas à níveis de potencial osmótico do substrato obtidos com soluções de manitol. Dentro de um mesmo potencial, letras iguais indicam diferenças não significativas pelo teste Tukey ($P>0,05$)

As proteínas de choque térmico ou estresse (HSPs) são proteínas que estão em toda parte da planta e altamente conservadas. A resposta e expressão são induzidas por uma grande variedade de acontecimentos tanto fisiológicos como ambientais permitindo que as células possam sobreviver à condições onde normalmente morreriam (PARCELLIER et al., 2003). Sendo assim, o bandejamento de proteínas pode variar para cada material, espécie, potencial osmótico e estresse. Chu-Yung, Roberts e Key (1984) relatam que o papel para HSPs é de proteger as funções vitais e estruturais durante o estresse térmico, permitindo assim voltarem as funções normais rapidamente quando as temperaturas favoráveis são estabelecidas.

A disfunção de uma proteína pode ser causada por estresses abióticos. Manter proteínas em sua conformação funcional são aspectos importantes para a sobrevivência da célula sob estresse. As proteínas de choque térmico (HSPs) são responsáveis pelo enrolamento, montagem, translocação, degradação e também podem ajudar na renaturação de proteínas e membranas sob condições de estresse.

As proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) estão ligadas ao estresse hídrico pela dessecação ou resfriamento, no entanto destacaram que as proteínas LEA foram capazes de suprimir a agregação da proteína e a inativação sob estresse hídrico e que podem manter sua atividade enzimática na desidratação (GOYAL; WALTON; TUNNACLIFFE, 2005).

A expressão das proteínas da parte aérea das plântulas de feijão cujas sementes não foram tratadas com ácido salicílico nem com choque frio e ainda não foram submetidas à restrição de água foi apresentada na coluna 7B da Figura 6B e C, apresentando bandas com 106, 102, 67, 55, 40, 30, 22, 19 e 17kDa representativas do metabolismo normal da parte aérea das plântulas. O perfil eletroforético da aplicação da deficiência de água nas sementes não tratadas (SCHSAS) foi apresentado nas colunas 8, 9 e 10B (Figuras 6B e C) onde se pode verificar a expressão adicional das bandas de 76 e 45kDa na coluna 9B (-0,6MPa) além da adição da expressão das bandas 90 e 85kDa na coluna 10B (-1,2MPa) que podem ser interpretadas como resultado da resposta metabólica aos tratamentos de restrição hídrica aplicados. A menor restrição hídrica, -0,3MPa, coluna 8B não apresentou perfil diferente da testemunha, coluna 7B.

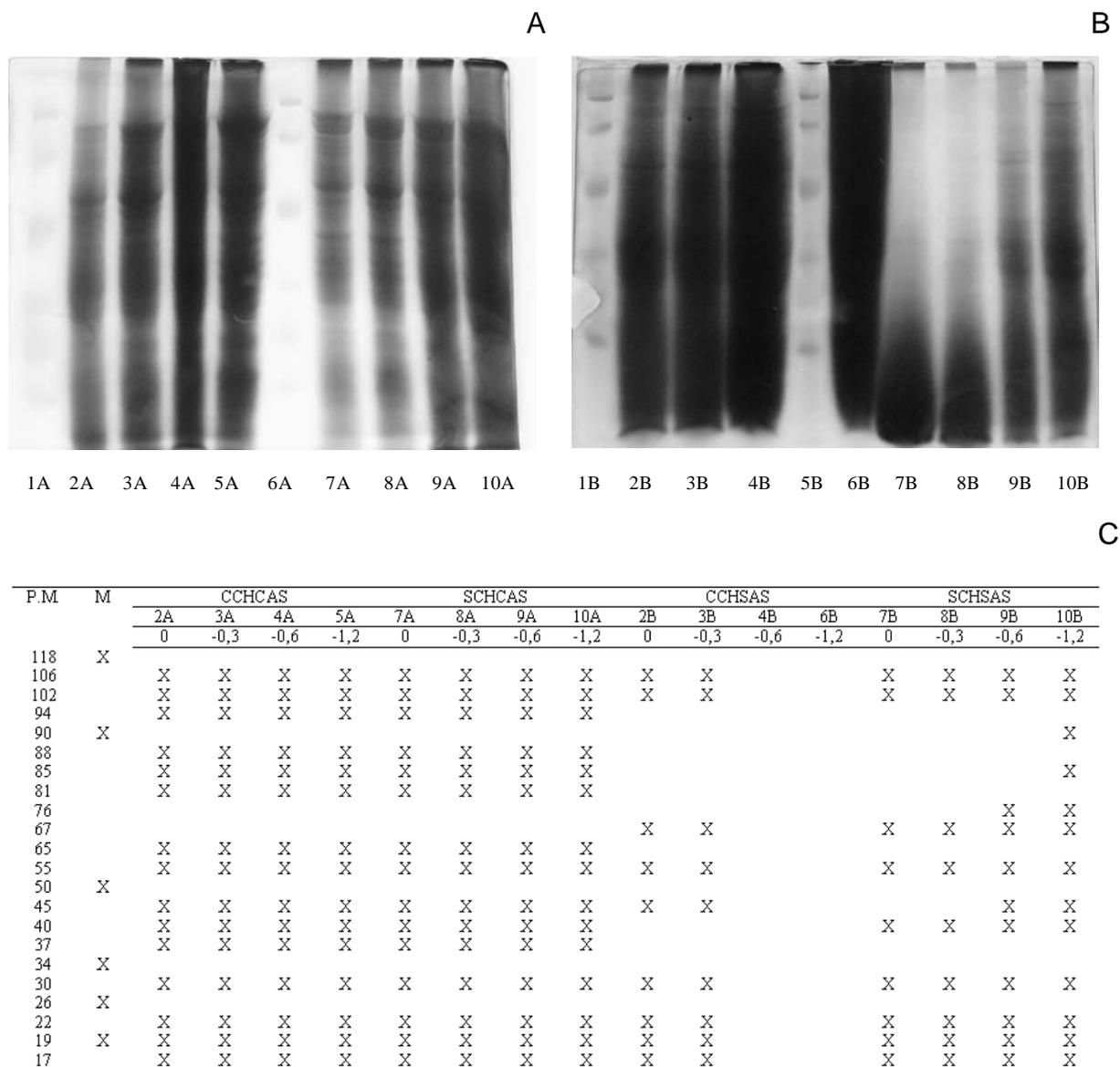
As sementes tratadas apenas com choque frio (CCHSAS) apresentaram uma banda diferenciadora, em relação à testemunha (coluna 7B), de 45kDa nos potenciais zero e -0,3MPa (Figura 6B e C - colunas 2 e 3B). Nos potenciais mais baixos ocorreu a perda completa do padrão protéico (Figura 6B e C - colunas 4 e 6B).

Nos tratamentos com ácido salicílico, com choque (CCHCAS) ou sem choque frio (SCHCAS), notou-se a expressão adicional, em relação à coluna 7B, das bandas 94, 88, 85, 81, 65, 45 e 37kDa e a ausência da banda de 67kDa em todos os níveis de potencial osmótico, colunas 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 e 10A (Figura 6A e C). A expressão dessas proteínas, pode ter efeitos na melhor reposição fisiológica, como na massa seca com melhor desempenho com ácido salicílico. Singh e Usha (2003) relatam que a massa seca das plantas de trigo com estresse hídrico e aplicação do ácido salicílico foi significativamente maior que sem aplicação do ácido salicílico. Radwan et al. (2010) pesquisando folhas de feijão infectados com vírus mosaico e tratadas com ácido salicílico, relatam que o ácido salicílico induziu a formação de novas bandas de 36 e 68kDa, indicando que o ácido salicílico desempenha um papel importante na indução de resistência.

A expressão das proteínas da raiz das plântulas de feijão cujas sementes não foram tratadas com ácido salicílico nem com choque frio e ainda não foram submetidas à restrição de água foi apresentada na coluna 7B da Figura 7B e C apresentando bandas com 63, 50, 45, 43, 40,30, 26, 22, 19 e 17kDa representativas do metabolismo normal da raiz das plântulas. O perfil eletroforético da aplicação da deficiência de água nas sementes não tratadas (SCHSAS) foi apresentado nas colunas 8, 9 e 10B (Figura 7B e C) onde se pode verificar a expressão adicional das bandas de 102 e 88kDa nas colunas 9 e 10B (-0,6 e -1,2MPa) que podem ser interpretadas como resultado da resposta metabólica aos tratamentos de restrição hídrica aplicados. A menor restrição hídrica, -0,3MPa, coluna 8B não apresentou perfil diferente da testemunha, coluna 7B.

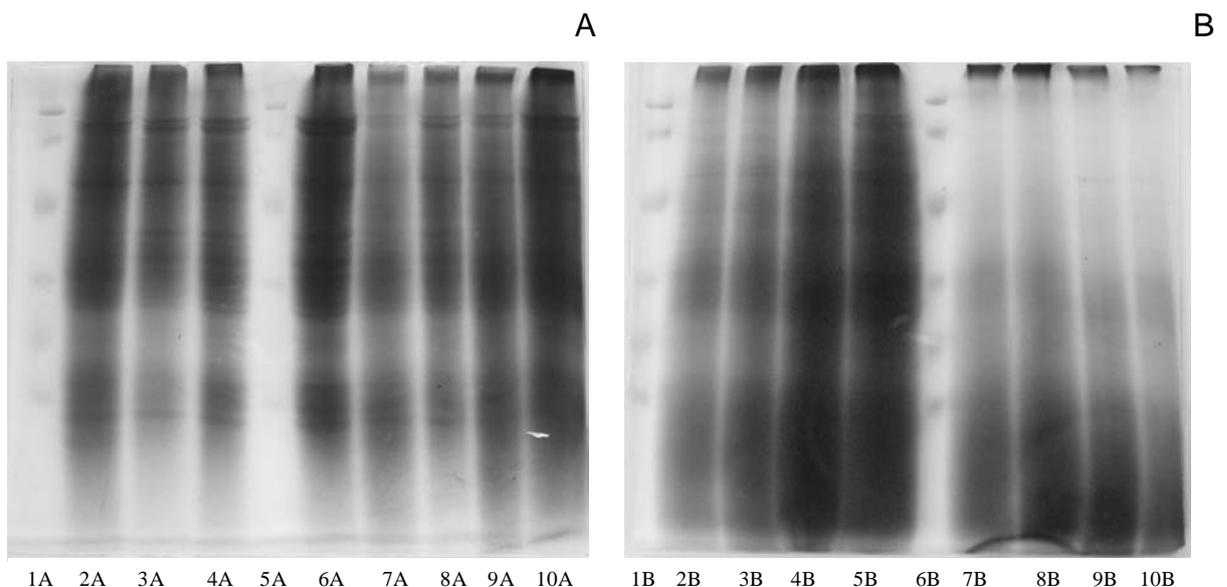
As sementes tratadas apenas com choque frio (CCHSAS) apresentaram quatro bandas diferenciadoras, em relação à testemunha (coluna 7B), de 116, 106, 102 e 90kDa em todos os potenciais (Figura 7B e C - colunas 2, 3, 4 e 5B).

Nos tratamentos com ácido salicílico, com (CCHCAS) ou sem choque frio (SCHCAS), notou-se a expressão adicional, em relação à coluna 7B, das bandas 106, 102kDa e a ausência das bandas de 50 e 26kDa em todos os níveis de potencial osmótico, colunas 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10A (Figura 7A e C).



P.M=Peso molecular (kDa) ; M= Perfil eletroforético do marcador molecular Fermentas (Faixa de 118 a 19kDa); X= indicação da presença de banda; 2A até 10B= correspondência às colunas da parte A e B da Figura.

FIGURA 6 - Padrão de bandas de proteínas solúveis de parte aérea de plântulas obtidas de sementes de feijão tratadas com choque frio (7°C 24h) e ácido salicílico (0,01 mM 48h) e submetidas à níveis de potencial osmótico do substrato obtidos com soluções de manitol. A Esquerda CCHCAS; 1A padrão molecular; 2A 0MPa; 3A -0,3MPa; 4A -0,6MPa; 5A padrão molecular; 6A -1,2MPa; A Direita SCHCAS 7A 0MPa; 8A -0,3MPa; 9A -0,6MPa; 10A -1,2MPa; B Esquerda CCHSAS; 1B padrão molecular; 2B 0MPa; 3B -0,3MPa; 4B -0,6MPa; 5B -1,2MPa; B Direita SCHSAS; 6B padrão molecular; 7B 0MPa; 8B -0,3MPa; 9B -0,6MPa; 10B -1,2MPa. C Esquema do perfil eletroforético de proteínas apresentado na parte A e B desta figura



C

P.M.	M	CCHCAS				SCHCAS				CCHSAS				SCHSAS			
		2A	3A	4A	6A	7A	8A	9A	10A	2B	3B	4B	5B	7B	8B	9B	10B
		0	-0,3	-0,6	-1,2	0	-0,3	-0,6	-1,2	0	-0,3	-0,6	-1,2	0	-0,3	-0,6	-1,2
118	X									X	X	X	X				
116																	
106		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
102		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X
90	X																
88										X	X	X	X			X	X
72																	
67																	
63		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
50	X									X	X	X	X	X	X	X	X
45		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
43		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
40		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
34	X																
30		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
26	X									X	X	X	X	X	X	X	X
22		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
17		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

P.M.=Peso molecular (kDa); M= Perfil eletroforético do marcador molecular Fermentas (Faixa de 118 a 19kDa); X= indicação da presença de banda; 2A até 10B= correspondência às colunas da parte A e B da Figura.

FIGURA 7 - Padrão de bandas de proteínas solúveis de raiz de plântulas obtidas de sementes de feijão tratadas com choque frio (7°C 24h) e ácido salicílico (0,01 mM 48h) e submetidas à níveis de potencial osmótico do substrato obtidos com soluções de manitol. A Esquerda CCHCAS; 1A padrão molecular; 2A 0MPa; 3A -0,3MPa; 4A -0,6MPa; 5A -1,2MPa; A Direita SCHCAS; 6A padrão molecular; 7A 0MPa; 8A -0,3MPa; 9A -0,6MPa; 10A -1,2MPa; B Esquerda CCHSAS; 1B padrão molecular; 2B 0MPa; 3B -0,3MPa; 4B -0,6MPa; 5B padrão molecular; 6B -1,2MPa; B Direita SCHSAS; 7B 0MPa; 8B -0,3MPa; 9B -0,6MPa; 10B -1,2MPa. C Esquema do perfil eletroforético de proteínas apresentado na parte A e B desta figura

6 CONCLUSÃO

O tratamento das sementes com ácido salicílico, 0,01 mM por 48 horas, mostrou-se promissor por atenuar parcialmente a deficiência de água durante o crescimento inicial de plântulas de feijão.

BIBLIOGRAFIA

ARAÚJO, J. L. S.; PINHEIRO, M. M.; RUMJANEK, N. G. **Proteínas de choque térmico e tolerância a altas temperaturas em plantas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 27 p. (Embrapa CNPAB. Documentos, 80).

ARAÚJO, J. L.; RUMJANEK, N. G.; PINHEIRO, M. M. Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 15, n. 1, p. 33-41, 2003.

ÁVILA, M. R. et al. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 98-106, 2007.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BENHAMOU, N.; NICOLE, M. Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 703-719, 1999.

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

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

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

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

CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. (Ed.). **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

COELHO, D. L. M et al. Estresse hídrico com diferentes osmóticos em sementes de feijão e expressão diferencial de proteínas durante a germinação. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 491-499, 2010.

CHU-YUNG, L.; ROBERTS, J. K.; KEY, J. L. Acquisition Of Thermotolerance In Soybean Seedlings. **Plant Physiology**, v. 74, p. 152-160, 1984.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: Grãos. Safra 2009/2010. Oitavo Levantamento.** Maio de 2010. Brasília: Conab, 2010. 45 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/08_levantamento_MAI2010.pdf>. Acesso em: 16 jul 2010

CONUS, L. A. et al. Germinação de sementes e vigor de plântulas de milho submetidas ao estresse salino induzido por diferentes sais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, p. 067-074, 2009.

CUSTÓDIO, C. C. et al. Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. **Scientia Agrícola**, v. 59, p. 145-153, 2002.

CUSTÓDIO, C. C.; SALOMÃO, G. R.; MACHADO NETO, N. B. Estresse hídrico na germinação e vigor de sementes de feijão submetidas a diferentes soluções osmóticas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 4, p. 617-623, 2009.

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

DIDONET, A. D. **Respostas da cultivar de feijoeiro comum pérola ao choque térmico com altas temperaturas.** Comunicado Técnico, n. 39, 2002.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L. **Produção de Feijão.** Guaíba: Agropecuária, 2000. 385 p.

ESTEVES, B. S.; SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 663-679, 2008.

FARIAS, F. F. **Cultura de tecidos em *Phaseolus vulgaris* visando a regeneração e androgênese *in vitro*.** 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico Campinas, Campinas.

FERREIRA, D. F. SISVAR: programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

GOYAL, K.; WALTON, L. J.; TUNNACLIFFE, A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. **Biochemical Journal**, v.15; n. 388, p. 151-157, 2005.

HUSSEIN, M. M.; BALBAA, L. K.; GABALLAH, M. S. Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 3, n. 4, p. 321-328, 2007.

JINN, T. L. et al. Immunological kinship of class I low Molecular Weight Heat Shock Proteins and Thermostabilization of Soluble Proteins *in Vitro* Among plants. **Plant Cell Physiology**, v.34, n. 7, p. 1055-1062, 1993.

JUNG, S et al. Antioxidant responses of cucumber to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PFDs. **Plant Science**, v. 153, p. 145-154, 2000.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79-102, 1997.

KALINSKI, A. et al. Binding-protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differentiated soybean organs. **Planta**, v. 195, p. 611-621, 1995.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 431p.

KRAMER, P. J. Fifty years of progress in water relations research. **Plant Physiology**, v, 54, n. 4, p. 463-471, 1974.

KUC, J. Development and future direction of induced systemic resistance in plants. **Crop Production**, v, 19, p. 859–861, 2000.

KUK, J. M. et al. High temperature stress resistance of *Escherichia coli* induced by a tobacco class I low molecular weight heat-shock protein. **Molecules and Cells**, v. 10, n. 5, p. 519-524, 2000.

LEMOS, L. B., et al. Características agronômicas e tecnológicas de genótipos de feijão do grupo comercial carioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 4, p. 319-326, 2004.

LIMA, M. G. S., et al. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. **Bragantia**, v. 63, n. 3. p. 335-340, 2004.

MACHADO, A. Q. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 408-414, 2007.

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

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

MACHADO NETO, N. B. et al. Temperature affects on seed germination in races of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 2, p. 155-164, 2006b.

MACHADO NETO, N. B. et al. Proline: use as an indicator of temperature stress in bean seeds. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 330-337, 2004b.

MAIA, F. C. et al. Ácido salicílico: efeito na qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 1, p. 264-270, 2000.

MAIA, P. S. P. et al. Conteúdo relativo de água, teor de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de milho submetidas a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 918-920, 2007.

MC CUE, P. et al. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. **Processes Biochemistry**, v. 35, p. 603-613, 2000.

MORAES, G. A. F.; MENEZES, N. L.; PASQUALLI, L. L. Comportamento de sementes de feijão sob diferentes potenciais osmóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 776-780, 2005.

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

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados nos desempenhos das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C. et al. **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: Abrates, 1999. p. 21-24.

NEPOMUCENO, A. L. et al. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência Desenvolvimento**, Brasília, v. 23, p. 12-18, 2001.

NEPOMUCENO, A. L. et al. Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 1407-1416, 2000.

NUNES, A. S. et al. Fontes e níveis de salinidade na germinação de sementes de *Crotalaria juncea* L. **Ciências Agrotecnológica**, v. 33, n. 3, p. 753-757, 2009.

PARCELLIER, A. et al. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, p. 505–512, 2003.

PAXEDES, S. C.; FERREIRA, T. M.; GOMES FILHO, E. Acúmulo de prolina e aminoácidos em cultivares de feijão caupi com tolerância diferencial a salinidade. **Caatinga**, v. 22, n. 3, p. 211-214, 2009.

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

POPINIGIS, F. **Fisiologia da Semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.

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

QUEIROZ, M. F.; ALMEIDA, F. A. C.; FERNANDES, P. D. Efeito do condicionamento osmótico no vigor de plântulas de feijão. **Revista Brasileira de Engenharia e Ambiental**, v. 2, n. 2, p. 148-152, 1998.

RADWAN, D. E. M. et al. Modifications of antioxidant activity and protein composition of bean leaf due to bean yellow mosaic virus infection and salicylic acid treatments. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n. 5, p. 891-904, 2010.

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

RIVERO, R. M. et al. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, v. 160, p. 315–321, 2001.

SAKHABUTDINOVA, A. R. et al. Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. **Bulgarian Journal Plant Physiology**, Special Issue, p. 314-319, 2003.

SAKHABUTDINOVA, A. R.; FATKHUTDINOVA, D. R.; SHAKIROVA, F. M. Effect of salicylic acid on the activity of antioxidant enzymes in wheat under conditions of salination. **Applied Biochemistry Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 501-505, 2004.

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

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

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases: an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, v. 12, p. 303-312, 1993.

SILVEIRA, M. A. M.; MORAES, D. M.; LOPES, F. N. Germinação e alterações bioquímicas em sementes de arroz tratadas com ácido salicílico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 200-205, 2000.

SINGH, B.; USHA, K. Salicylic acid induced physiological and biochemical in wheat seedlings under water stress. **Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 137-141, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TEIXEIRA, L. R. et al. Avaliação de cultivares de soja quanto à tolerância ao estresse em substrato contendo polietileno glicol. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 30, p. 217-223, 2008.

VERDOY, D. et al. Differential organ-specific response to salt stress and water deficit in nodulated bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 757-767, 2004.

VIERLING, E. The role of heat shock proteins in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 579-620, 1991.

ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 66–71, 2001.