

DOUGLAS BARDUCHE

CONTROLE DA MOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO ABA E GA₃ EM SEMENTES DE
ANGICO VERMELHO [*Anadenanthera peregrina* (L.) Speg.] DURANTE A
GERMINAÇÃO.

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das exigências do
Curso de Mestrado em Agronomia, área de
concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de "Mestre".

Orientador

Prof. RENATO PAIVA, Ph. D.

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1996

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA

Barduche, Douglas

Controle da mobilização de proteínas pelo ABA e GA₃ em sementes de angico
vermelho [*Anadenanthera peregrina* (L.) Spæg.] durante a germinação /
Douglas Barduche. -- Lavras : UFLA, 1996.

55 p. : il.

Orientador: Renato Paiva.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Angico vermelho - Semente - Germinação. 2. Proteína de reserva. 3.
Protease. 4. Enzima hidrolítica. 5. Regulador de crescimento. 6. Ácido abscísico.
7. Ácido giberélico. 8. SDS-PAGE. 9. Eletroforese. 10. Fisiologia vegetal.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 583.321043

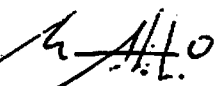
634.973321043

DOUGLAS BARDUCHE


CONTROLE DA MOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO ABA E GA₃ EM SEMENTES DE
ANGICO VERMELHO [*Anadenanthera peregrina* (L.) Speg.] DURANTE A
GERMINAÇÃO.

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das exigências do
Curso de Mestrado em Agronomia, área de
concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de "Mestre".

APROVADA em 21 de dezembro de 1995


Pesq. Mauricio Antônio Lopes, Ph. D.
(EMBRAPA - CNPMS)


Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos
(UFLA)


Prof. Renato Paiva
(Orientador)

DEDICATÓRIA

À minha querida esposa Kátia,
Aos meus pequenos Amanda, Raphael e Arthur,
Aos meus inesquecíveis pais Mário e Guiomar,
Dedico.

E a todos que compreendem que a vida,
mesmo em suas menores manifestações,
encerra a arquitetura de Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, às pessoas por quem me movo,
minha esposa, que me alenta com a graciosidade e dignidade de sua companhia,
e meus pequenos filhos, por me desviarem a atenção em momentos muitas vezes oportunos.

Agradeço àqueles que, com seu apoio, este trabalho pôde ser realizado,
meu pai, pelo apoio sempre incondicional,
minha mãe, pelo estímulo orgulhoso que só as mães sabem dar,
minha querida irmã Deise, que tem um coração que não lhe cabe,
meu irmão "passarinho" e a minha querida e preocupada avó.

Agradeço aos excelentes profissionais, com quem aprendi além da técnica,
meu orientador Renato Paiva, pela visão profissional e oportunidades que me proporcionou,
meu co-orientador Maurício A. Lopes, pela capacidade e humildade que só os grandes têm,
Dr. Edilson Paiva, pela acolhida no NBA, por seu profissionalismo e entusiasmo pela Ciência,
"Grande" Miguel, pela prestatividade e maestria técnica com que dirige um laboratório,
e Dr. Custódio D. Santos, pelo apoio e estímulo a este trabalho.

Agradeço aos amigos que, às vezes sem perceber, nos animam em momentos difíceis,
Neno, Fábio, Marco, César e Bia, Rogério e Socorro, Serginho, Beth, Izonel, Marise, Gidelma e
às minhas queridas amigas Giovana e Vanessa, ainda pelo apoio constante...e pelas boas risadas.
Àqueles, com quem pude contar,
Walter e Moemy, Néelson, Rogerinho, Solange, Tanham, Eustáquio e os prestativos técnicos do
CNPMS, Tônico, Marília, Nath e Edna.

Agradeço ao Dr. Everaldo E. Barros (UFV), por ceder seu trabalho ainda não publicado; à
acolhida e apoio do funcionalíssimo Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia
Aplicada (NBA) do CNPMS-EMBRAPA; ao apoio do CNPq; à UFPA; aos Professores Donizeti
Alves e Amauri A. Alvarenga e a todos do Curso de Fisiologia Vegetal e do Departamento de
Biologia da UFPA.

BIOGRAFIA

Douglas Barduche nasceu em julho de 1963 em São Paulo, Capital. Estudou durante a infância e adolescência em colégio dos Padres Claretianos. Movido por ideais, optou pela profissão de Biólogo após uma boa e conturbada fase de vida. Casado e com filhos, graduou-se em Biologia pela Universidade de Guarulhos-SP em 1989 ao mesmo tempo que trabalhava pela família. Realizou algumas atividades ligadas à Biologia durante e após este período, como cursos, estágios e docência. Iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras em 1993 e o concluiu em 1995. Foi representante discente no colégio, na graduação e na pós-graduação. Até aqui, foi levado pelo seu ideal e por Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS DA ESPÉCIE	4
2.2 GERMINAÇÃO	5
2.3 REGULADORES DE CRESCIMENTO	6
2.3.1 Ácido giberélico	6
2.3.2 Ácido abscísico	8
2.4 MOBILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE RESERVA	9
2.4.1 Considerações gerais	9
2.4.2 Mecanismos de mobilização	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 MATERIAL VEGETAL	13
3.2 REAGENTES E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	14
3.3 ENSAIOS	14
3.3.1 Desinfestação x não-desinfestação	14
3.3.2 Concentrações de ABA e períodos extremos de incubação	15
3.3.3 Mobilização de proteínas em embriões durante a germinação	15
3.3.4 Síntese de proteínas em embriões após início da germinação	15
3.3.5 Classificação das proteínas de embriões	16
3.3.6 Mobilização de proteínas e atividade de proteases em cotilédones	17
3.4 ANÁLISE ELETROFORÉTICA	17
3.4.1 SISTEMA DE GÉIS DESNATURANTES (SDS-PAGE)	17
3.4.1.1 Aspectos gerais da técnica	17
3.4.1.2 Otimização da extração de proteínas totais	18
3.4.1.3 Extração de proteínas totais de embriões	18
3.4.1.4 Extração de proteínas totais de cotilédones	19
3.4.1.5 Eletroforese	19

3.4.2 SISTEMA DE GÉIS NATIVOS (PAGE) / GÉIS DE ATIVIDADE PARA PROTEASES	
3.4.2.1 Aspectos gerais da técnica	20
3.4.2.2 Extração de Proteases	20
3.4.2.3 Determinação do pH ótimo de atividade	21
3.4.2.4 Extração com SDS	21
3.4.2.5 Eletroforese	22
4 RESULTADOS	
4.1 Testes de germinação, emergência e análise de composição química	24
4.2 Otimização da extração de proteínas totais de embriões	24
4.3 Desinfestação x não-desinfestação	26
4.4 Concentrações de ABA e períodos extremos de incubação	27
4.5 Mobilização de proteínas em embriões durante a germinação	28
4.6 Síntese de proteínas em embriões após o início da germinação	30
4.7 Classificação das proteínas de embriões	33
4.8 Mobilização das proteínas de reserva em cotilédones	34
4.9 "pH" de máxima atividade de proteases	35
4.10 Atividade de proteases em cotilédones	36
5 DISCUSSÃO	
5.1 Desinfestação	39
5.2 Classificação protéica	39
5.3 Atividade de proteases em cotilédones	40
5.4 ABA, mobilização de proteínas e germinação	40
5.5 Balanço entre ABA e GA ₃	42
5.6 Controle da síntese de proteínas pelo ABA	44
6 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Germinação e desenvolvimento do eixo embrionário de *A. peregrina*. 25
- FIGURA 2 Perfil de polipeptídeos de embriões secos de *A. peregrina*, extraídos em tampão de Laemmli na presença de PVPP, PMSF e β -ME ou apenas β -ME, e diluídos em duas proporções com tampão de Davis ou de Laemmli. 26
- FIGURA 3 Perfil protéico de embriões de *A. peregrina* isolados de sementes desinfestadas ou não antes da embebição e incubados em solução de sacarose durante 6 horas. 27
- FIGURA 4 Perfil protéico de embriões de *A. peregrina* incubados durante 6 ou 30 horas em soluções de sacarose acrescidas ou não de ABA e/ou GA₃. 29
- FIGURA 5 Perfil protéico de embriões de *A. peregrina* incubados durante 6, 12, 24 ou 48 horas em soluções de sacarose acrescidas ou não de ABA e/ou GA₃. 32
- FIGURA 6 Perfil protéico de embriões de *A. peregrina* incubados em solução de sacarose durante 6 horas e transferidos para soluções de sacarose acrescidas de ABA e/ou GA₃ durante mais 6, 18 e 24 horas. 33
- FIGURA 7 Perfil protéico das frações aquosa, salina e alcalina de embriões de *A. peregrina*. 34
- FIGURA 8 Perfil protéico de cotilédones de *A. peregrina* isolados de sementes incubadas na presença ou não de ABA e/ou GA₃ durante 0, 2, 4, 6, e 8 dias. 35
- FIGURA 9 Géis de atividade, em diferentes valores de pH, de proteases extraídas de cotilédones de *A. peregrina*. 36
- FIGURA 10 Géis de atividade de proteases extraídas de cotilédones de *A. peregrina*, isolados de sementes incubadas na presença ou não de ABA e/ou GA₃ durante 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias. 38

RESUMO

BARDUCHE, Douglas. **Controle da Mobilização de Proteínas pelo ABA e GA₃ em Sementes de Angico vermelho** [*Anadenanthera peregrina* (L.) Speg.] **durante a Germinação.** Lavras, UFLA, 1996. 55 p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).

Estudou-se a germinação de uma espécie lenhosa selvagem para observar, ao nível bioquímico, o comportamento germinativo sob a influência do ABA e GA₃. Embriões isolados, incubados em soluções de sacarose contendo ABA e/ou GA₃, foram analisados eletroforéticamente em SDS-PAGE para observar o perfil da mobilização de proteínas de reserva durante o início da germinação. Cotilédones de sementes incubadas em soluções aquosas de ABA e/ou GA₃ foram analisados em SDS-PAGE e PAGE/GÉIS DE ATIVIDADE (géis de poliacrilamida copolimerizados com substrato para enzimas) para observar o perfil da mobilização de proteínas de reserva e a atividade de proteases, respectivamente, após o início da germinação. Os resultados indicam que ABA bloqueia a mobilização protéica através da inibição da atividade enzimática em cotilédones, mas não impede totalmente a germinação, parecendo afetar germinação e atividade enzimática independentemente. Em embriões, houve bloqueio da mobilização, mas a relação com a inibição da atividade enzimática não foi claramente demonstrada. ABA induziu a síntese de proteínas em cotilédones, mas não em embriões. Um polipeptídeo com 17 kD é degradado em 6 horas nos embriões-controle, mas surpreendentemente a degradação é bloqueada por ABA e/ou GA₃. Para mesmas concentrações de ABA e GA₃, o efeito do ABA não foi inibido por GA₃ em embriões, mas foi inibido em cotilédones. Há indícios que as proteases pertençam ao grupo dos Proteossomas (complexos multicatalíticos). Embora os efeitos do ABA e GA₃ não tenham diferido sensivelmente dos dados correntes, o comportamento do polipeptídeo-17kD é contraditório e sugere estudos específicos.

Orientador: Prof. Renato Paiva, PhD. Membros da Banca: Pesq. Maurício A. Lopes, PhD e Prof. Dr. Custódio D. dos Santos

SUMMARY

CONTROL OF PROTEIN MOBILIZATION BY ABA AND GA₃ IN SEEDS OF ANGICO VERMELHO [*Anadenanthera peregrina* (L.) Speg.] DURING GERMINATION.

In this work, a woody specie was studied in order to observe the effect of ABA and GA₃ at the biochemical level during the process of germination. Embryos incubated in sucrose solution containing ABA and/or GA₃ were analyzed through SDS-PAGE to observe the mobilization pattern of storage proteins during the beginning of germination. Cotyledons which were isolated from seeds incubated in aqueous solutions containing ABA and/or GA₃, were analyzed through SDS-PAGE and PAGE/ACTIVITY GELS (polyacrylamide gels copolymerized with substrate for enzymes) to observe the mobilization pattern of storage proteins and proteinase activity after the beginning of germination. Results of these experiments show that ABA blocks protein mobilization by inhibiting enzyme activity in cotyledons. This inhibition is not sufficient to prevent germination showing that the effect of ABA on germination is not dependent on enzyme activity. The blockage of protein mobilization was also observed in embryos, but no enzyme activity inhibition was clearly detected. ABA was able to induce the synthesis of proteins in cotyledons but not in embryos. A polypeptide with approximately molecular weight of 17 kD, is degraded within 6 hours in control embryos, but this degradation is blocked by ABA and GA₃. Using the same concentrations of ABA and GA₃, the effect of ABA was counteracted by GA₃ in embryos, but not in cotyledons. The results also indicate that the proteinase detected belongs to the Proteosome group (multicatalytic complexes). Although the effects of ABA and GA₃ were not so different from those shown in the literature, the behavior of 17 kD-polypeptide contradicts these reports suggesting that specific studies should be performed.

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos estudos sobre os mecanismos bioquímicos do processo germinativo tem sido realizada com espécies cultivadas, principalmente cereais. O motivo reside no valor intrínseco destas espécies para a economia e alimentação humanas. Assim, estas espécies são utilizadas como modelos experimentais para estudos da mobilização de reservas (Fincher, 1989); síntese de proteínas de reserva (Shotwell e Larkins, 1989); mobilização de proteínas de reserva (Ryan, 1973; Shutov e Vaintraub, 1987 e Fincher, 1989); caracterização de proteínas de reserva (Larkins, 1981 e Barros e Larkins, 1990) ou controle hormonal da síntese de hidrolases pela camada de aleurona (Higgins, Zwar e Jacobsen, 1976; Jacobsen e Beach, 1985 e Nolan e Ho, 1988).

A utilização das espécies cultivadas como modelos experimentais tem o conveniente das mesmas serem geneticamente uniformes numa mesma população de sementes. Isto implica numa germinação geralmente mais uniforme. No entanto, justamente por esta uniformidade, Mayer e Shain (1974) ponderam que estas espécies não são modelos ideais para a compreensão dos mecanismos que “controlam” a germinação.

Espécies selvagens não apresentam esta uniformidade. Sementes destas espécies que apresentam dormência, estão sob um complexo mecanismo de controle da germinação. Este mecanismo é determinado por uma integração, que pode ser extremamente específica, entre fatores ambientais e intrínsecos à semente. Os fatores inerentes à semente variam não somente de espécie para espécie, mas dentro de uma mesma espécie. Espécies polimórficas apresentam sementes de diferentes tamanhos, formas, massa e podem ser lançadas ao solo em diferentes

estágios de desenvolvimento (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989). Deste modo, a dormência ocorre de forma variada e em diferentes graus de profundidade, até numa mesma espécie. Esta variabilidade da dormência implica em comportamentos germinativos distintos, que permitem a dispersão da germinação ao longo do tempo e espaço. Isto impede que ocorra o desenvolvimento em massa de plântulas sob possíveis condições ambientais desfavoráveis após a germinação (Mayer e Shain, 1974 e Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989).

Embora seja compreendida subjetivamente a importância biológica destes mecanismos para a sobrevivência das espécies em seus sistemas naturais, poucos estudos controlados têm sido realizados. Estudos através de modelos matemáticos mostram que são desejáveis tais comportamentos germinativos para a otimização da reprodução destas espécies a longo prazo (Mayer e Shain, 1974 e Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989).

Nas espécies cultivadas, estes mecanismos foram erradicados através do melhoramento genético, já que germinação rápida e uniforme são desejáveis para uma cultura. Deste modo as espécies selvagens, por apresentarem maior variedade de respostas ao processo germinativo, poderiam ser uma fonte de dados mais diversificada do mecanismo regulatório deste processo.

Nesse contexto adotou-se para a realização deste trabalho uma espécie lenhosa, devido a importância das lenhosas na sucessão e clímax ecológicos da maioria dos ecossistemas terrestres. Trabalhos de quebra de dormência e propagação destas espécies, ao nível de manejo florestal, têm sido realizados devido a crescente preocupação na preservação e recuperação dos ecossistemas ameaçados ou degradados. No entanto, são poucos os trabalhos realizados ao nível de caracterização bioquímica dos mecanismos de controle da germinação, principalmente das espécies nativas brasileiras. Os estudos são concentrados na embriogênese somática e micropropagação de espécies exóticas de valor comercial (Merkle e Wiecke, 1989; Kurten et al., 1990; Lambardi, Sharma e Thorpe, 1991; El-Hadrami, Carron e D'Auzac, 1991; Merkle, Wiecko e Watson-Pauley, 1991 e Warrag, Lesney e Rockwood, 1991). Dentre os fatores que controlam a germinação, optou-se neste estudo, pelos efeitos dos reguladores de crescimento sobre a mobilização de proteínas de reserva da semente.

A espécie escolhida, *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. (Angico vermelho), é uma dicotiledônea leguminosa, que apresenta sementes quiescentes e alta porcentagem de germinação. Quiescência e altas taxas de germinação, fornecem condições necessárias para estudar o controle da germinação pelo ácido abscísico, no que diz respeito à capacidade deste regulador de crescimento em inibir a germinação de sementes não dormentes, e contrastar seus efeitos em relação ao ácido giberélico, tido como promotor da germinação. Por outro lado, o acúmulo de até 40% de proteínas de reserva nas sementes das leguminosas (Shewry, Napier e Tatham, 1995), a separação anatômica entre embriões e cotilédones nas dicotilôneas e a facilidade de isolamento dos embriões de *A. peregrina*, acrescem, ao estudo do controle da germinação pelo ácido abscísico, condições para caracterizar, através de análise eletroforética, os mecanismos deste controle ao nível da mobilização de proteínas de reserva, em embriões e cotilédones isoladamente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS DA ESPÉCIE

Anadenanthera peregrina (L.) Speg. (Angico vermelho), é uma dicotiledônea, família Mimosaceae [ex Leguminosae - Mimosoideae (Cronquist, 1981)]. O gênero Anadenanthera, juntamente com os gêneros Newtonia, Parapiptadenia e Piptadeniastrum, foram segregados do gênero Piptadenia. Devido a isto, Anadenanthera peregrina pode ser encontrada com a sinonímia Piptadenia peregrina. Além disso, todas as espécies de todos estes gêneros são conhecidas como "Angico" devido a excelente qualidade da madeira que, por apresentar densidade média de 945 kg/m³, é usada em construções pesadas ou submersas, bem como em mobiliário de alta qualidade. O gênero Anadenanthera comporta duas espécies: A. peregrina e A. colubrina, e é distribuído nas regiões tropicais do globo, juntamente com os gêneros acima, onde alcançam até 40 m de altura. Newtonia e Piptadeniastrum são mais restritos à África e os demais à América, sendo que Parapiptadenia é restrito ao Brasil. De muitas espécies, mas principalmente de Piptadenia macrocarpa e Piptadenia rigida, extrai-se goma arábica de qualidade intermediária entre as extraídas no Sudão e Senegal. Índios africanos usam a casca de N. ambrevillei como afrodisíaco e índios centro-americanos inalam a fumaça da queima de sementes de ambas espécies de Anadenanthera e P. macrocarpa em rituais cerimoniais observados desde as viagens de Colombo. Os alcalóides encontrados nas sementes destas espécies, bufotenina e outros de base indol derivados do triptofano, têm possíveis efeitos alucinógenos. Entre todas estas leguminosas, nodulação rizobial foi observada apenas em Piptadenia obliqua, Piptadenia rigida e Anadenanthera peregrina (Allen e Allen, 1981).

2.2 GERMINAÇÃO

A germinação é um processo primeiramente controlado por uma integração de sinais ambientais e endógenos (sementes dormentes) ou absorção de água (sementes quiescentes), a partir dos quais ocorrem alterações do estado fisiológico da semente, mediadas hormonalmente, que resultam na retomada do desenvolvimento do embrião. Essas alterações são complexas e convergem para ativação e síntese *de novo* de enzimas que quebram as macromoléculas de reserva. Os produtos das hidrólises são então utilizados para o crescimento do eixo embrionário (Fincher, 1989).

Ao nível ultraestrutural, o processo é regulado geneticamente pelo embrião. Neste nível, os fitormônios desempenham um papel chave na síntese enzimática, agindo tanto na transcrição diferencial como na ativação de mRNAs pré-existentes (Khan, 1977).

O desenvolvimento do eixo embrionário até a ruptura do tegumento se dá por divisão e alongamento celulares, mediados por auxinas e citocininas (Liu et al., 1991 e Singh e Sawhney, 1992). A ocorrência primeira de um evento ou outro varia entre as espécies e os fatores que os controlam são distintos, tornando arbitraria a separação entre germinação e desenvolvimento (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989). No entanto, qualquer que seja a ocorrência para o aumento do número e tamanho celulares, ela é decorrente da síntese protéica pelo embrião.

A síntese protéica tem início logo após a hidratação do embrião e se dá primeiramente pela tradução dos mRNAs pré-existentes, estocados juntamente com ribossomas funcionais nos últimos estágios da embriogênese (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989; Raghavan, 1991; Whitmore, 1991 e Bernhardt, Kopke e Voigt, 1993).

A ativação dos polissomas recém formados requer energia proveniente da glicólise que ocorre na fase "lag" da embebição. Os produtos destes mRNAs são enzimas hidrolíticas que juntamente com as pré-existentes, fornecerão aminoácidos e outros monômeros para o crescimento do eixo embrionário e para a síntese de outros mRNAs para novas enzimas proteolíticas, como proteinases, carboxi-, di- e aminopeptidases (Shutov e Vaintraub, 1987 e Fincher, 1989). Estas recém sintetizadas proteases incrementarão o fornecimento de aminoácidos para o eixo embrionário. Nesta fase, ocorre aumento da respiração aeróbica no embrião e

conseqüentemente, um aumento na atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Khan, 1977 e Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989). Com o crescente acúmulo de aminoácidos e ATP, há um aumento da transcrição e tradução no embrião que prepara a célula para a duplicação de DNA e divisão celular.

A síntese protéica ao longo desta sequência apresenta padrões distintos no decurso dos eventos (Oishi e Bewley, 1992), desde a fase de embebição até o desenvolvimento do eixo embrionário. Neste processo, os fitormônios exercem um papel chave na indução ou repressão da síntese de proteínas específicas, sendo que os estudos têm dado maior ênfase à influência das giberelinas e do ácido abscísico, devido ao antagonismo entre ambos em relação aos efeitos promotores e inibidores da germinação, respectivamente (Jacobsen e Varner, 1967; Harvey e Oaks, 1974; Higgins, Zwar e Jacobsen, 1976; Jacobsen e Beach, 1985; Nolan e Ho, 1988; Koehler e Ho, 1990; Qi, Wilson e Tan-Wilson, 1992 e Van Beckum, Libbenga e Wang, 1993).

2.3 REGULADORES DE CRESCIMENTO

Define-se como reguladores de crescimento as substâncias sintéticas que, aplicadas exógenamente, exercem os efeitos "hormonais" das substâncias naturais das plantas, os fitormônios. No entanto, há a tendência de definir indistintamente as substâncias, sintéticas ou naturais, como reguladores de crescimento, uma vez que as últimas são distintamente diferentes dos hormônios de mamíferos, termo do qual originou-se "fitormônio".

2.3.1 ÁCIDO GIBERÉLICO

O ácido giberélico, ou giberelinas (GAs), é um composto diterpênico cíclico que apresenta uma estrutura ent-kaureano, sendo sintetizado a partir do mevalonato (MVA) a ent-kaureano, pela ent-kaureano sintetase, e posteriormente a GA_{12} , por monoxigenases. As demais GAs derivam da GA_{12} por β -hidroxilação, diferindo entre si na posição e sequência das hidroxilas que apresentam (Graebe, 1987 e Roberts e Hooley, 1988). A biossíntese de GAs é

complexa, sendo ativada e desativada ao longo do ciclo da planta, de modo diverso entre as espécies e entre órgãos da mesma espécie (Graebe, 1987).

Às GAs têm sido relegado um papel de promotoras da germinação, sendo capazes de substituir o efeito da luz na indução à germinação de sementes fotossensíveis (Khan e Andreoli, 1992). Supõem-se que as GAs sejam os fatores difusivos, do embrião para a camada de aleurona em cereais, promotores da síntese de hidrolases por esta camada durante a germinação. Estas hidrolases mobilizam as reservas do endosperma, fornecendo monômeros para o embrião em desenvolvimento. Esta suposição (Fincher, 1989) deriva da observação que aleuronas de cevada secretam GAs e que a síntese de α -amilase é induzida por GA_3 exógeno, em camadas de aleurona isolada de cevada do cultivar Himalaia. No entanto, Fincher (1989) aponta que outros cereais, incluindo outras variedades de cevada, são relativamente insensíveis à GA_3 , e que não foi demonstrado inequivocadamente que as GAs sejam os fatores difusivos em grãos intactos para todos os casos. Segundo este pesquisador, o padrão de sensibilidade ao GA_3 , tem sido a camada de aleurona, isolada do cultivar Himalaia, onde na ausência do regulador, pouca ou nenhuma α -amilase é sintetizada, e que esta resposta não é típica. No entanto, o que se sabe sobre a síntese protéica induzida por GA_3 durante a germinação, deriva dos estudos com estas camadas. Nestas camadas, GA_3 induz a expressão de genes específicos que codificam para enzimas hidrolíticas. Por exemplo, GA_3 é capaz de induzir a síntese de mRNAs para α -amilase (Jacobsen e Beach, 1985 e Nolan e Ho, 1988), para proteases (Nolan e Ho, 1988 e Koehler e Ho, 1990), nucleases, β -glucanases e outras hidrolases (Fincher, 1989). Além da indução à síntese *de novo*, GA_3 ativa a secreção de proteases (Jacobsen e Varner, 1967 e Hammerton e Ho, 1986).

Pouco se sabe sobre o mecanismo de ação das GAs e Fincher (1989) sugere, por analogia a outros reguladores, o modelo da “transdução de sinais”, onde receptores de membrana, nas quais os reguladores se ligam, são ativados e desencadeiam respostas intracelulares em “cascata”. Estas respostas, que envolvem proteínas e alterações na concentração de íons, alcançam o DNA genômico e elicitam a expressão gênica (Romanov, 1989). Fincher (1989) discute esta possibilidade devido a observação de que GAs formam um complexo com fosfatidil colina, aumentando a fluidez da membrana celular. Isto poderia alterar a permeabilidade a íons e a atividade de enzimas de membrana, que por sua vez, alteraria a resposta genômica. Hetherington e Laidman (1991) discutem a possibilidade do metabolismo da fosfatidil colina em membranas

plasmáticas de aleurona de trigo, influenciado por GA_3 , ser parte integrante do mecanismo de transdução de sinais deste regulador. Um outro aspecto que reforça esta possibilidade, é o envolvimento de íons Ca^{++} e GAs na secreção de α -amilase. Parece que GAs promovem um influxo de íons Ca^{++} para o meio intracelular (Hepler e Wayne, 1985). Este íon exerce um papel fundamental no mecanismo da transdução de sinais devido a sua ligação com a Calmodulina. As variações nas concentrações intracelulares do complexo Ca^{++} /Calmodulina modulam a intensidade da resposta em cascata (Cheung, 1980 e Hepler e Wayne, 1985).

2.3.2 ÁCIDO ABCÍSCICO

O ácido abscísico (ABA) é um sesquiterpeno composto de três resíduos isoprenos. São encontrados em plantas isômeros nas configurações *trans* e *cis*, sendo a forma *cis* opticamente ativa. Ambas formas são encontradas em plantas, mas a configuração *cis* é a que apresenta atividade biológica (Roberts e Hooley, 1988). Devido a sua estrutura, duas rotas biossintéticas têm sido propostas. A chamada direta, sugere como precursor imediato o farnesil pirofosfato (FPP), que é precursor também do geranilgeranil pirofosfato (GGPP) da biossíntese de GAs. A rota indireta sugere que o ABA é sintetizado a partir da quebra da violoxantina, um carotenóide derivado de duas moléculas de GGPP. O uso de inibidores da síntese de carotenóides como a fluridona por exemplo, dá evidências mais convincentes para a rota indireta do que o uso de MVA marcado, precursor do FPP, que é incorporado ao ABA (rota direta), porém em baixas quantidades (Creelman, 1989).

No que se refere a germinação, sabe-se que o regulador de crescimento ABA controla a maturação do embrião e impede a germinação precoce através da regulação da expressão gênica. Seu efeito é duplo. Primeiro por impedir a expressão de genes específicos para a germinação, principalmente aqueles que codificam para hidrolases na presença de GA_3 (Jacobsen e Beach, 1985; Hammerton e Ho, 1986 e Fincher, 1989). Segundo, por induzir a expressão de genes embriogênicos que codificam para proteínas de reserva e para inibidores de hidrolases (Higgins, 1984; Bray e Beachy, 1985; Finkelstein et al, 1985; Nolan e Ho, 1988; Williamson e Quatrano, 1988; Fincher, 1989; Hetherington e Quatrano, 1991; Rivin e Grudt, 1991; Holbrook et al., 1991 e Paiva e Kriz, 1994). A sensibilidade do embrião ao ABA varia

entre as espécies e é proporcional à maturidade do embrião. Quanto mais imaturo for o embrião, mais sensível ele é ao ABA e quanto mais maduro for, doses cada vez mais elevadas são necessárias para inibir a germinação (Finkelstein et al, 1985 e Xu e Bewley, 1991).

Muitas das proteínas embrionárias codificadas por indução do ABA exercem função osmo-protetora (Skriver e Mundy, 1990) e têm sido encontradas em células-guarda de mutantes de *Pisum sativum* L. sob estresse hídrico ou exposição ao ABA (Neill et al., 1995 e Wang et al., 1995). Esta função osmo-protetora pode permitir a tolerância da semente à desidratação durante a maturação (Hetherington e Quatrano, 1991) e reduzir o turgor de células do mesófilo sob déficit hídrico (Walton, 1980; Williams, Bulman e Neill, 1994 e Williams et al., 1994). Anticorpos monoclonais obtidos contra protoplastos de células-guarda de *Pisum sativum* L., modulam a expressão de genes que respondem ao ABA (*Rab*) em protoplastos de aleurona de cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Wang et al., 1995). Isto implica que o mecanismo de ação do ABA é similar nos dois tipos celulares. ABA altera a concentração intracelular de íons Ca^{++} em ambos tipos celulares (McAinsh, Brownlee e Hetherington et al., 1990; Hetherington e Quatrano, 1991; McAinsh, Brownlee e Hetherington et al., 1992 e Van der Veen, Heimovaara-Dijkstra e Wang, 1992). Embora as respostas celulares ao ABA sejam tecido e desenvolvimentalmente específicas, o mecanismo de transdução de sinais deve seguir um padrão único em resposta ao ABA. Hetherington e Quatrano (1991) sugerem que a função geral do ABA deve ser de preparar a célula/tecido para um novo e diferente estado fisiológico, talvez alterando a direção do metabolismo celular.

2.4 MOBILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE RESERVA

2.4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As proteínas de reserva são classificadas de acordo com a solubilidade em água (albuminas), soluções salinas (globulinas), alcoólicas (prolaminas) e ácidas ou alcalinas (glutelinas). As albuminas e globulinas são as principais proteínas de reserva em dicotiledôneas (Shewry, Napier e Tatham, 1995). A estrutura das albuminas tem sido estudada em Cruciferae, sendo definidas como albuminas 2S, devido ao seu coeficiente de sedimentação. Estas proteínas consistem de dois polipeptídeos ligados por pontes dissulfídicas e apresentam homologia estrutural com as prolaminas. As globulinas são também encontradas em monocotiledôneas e

esporos de samambaia, mas têm sido estudadas principalmente em leguminosas. São divididas em dois grupos: globulinas do tipo vicilina-7S e leguminina-11S. As globulinas 11S são compostas de 6 pares de subunidades. Cada par consiste de um polipeptídeo ácido com massa molecular aproximada de 40 kD, e um alcalino com 20 kD aproximadamente, ligados por uma simples ponte dissulfídrica. São proteoliticamente modificadas após a formação da ponte dissulfídrica e não são glicosadas como as 7S. As globulinas 7S são compostos triméricos com massa molecular entre 150 e 190 kD, nos quais não há resíduos de cisteína e portanto não são ligados por pontes dissulfídricas. A composição das subunidades varia muito devido à modificações proteolíticas e glicosilação pós-traducionais (Shewry, Napier e Tatham, 1995). Embora as globulinas 7S e 11S sejam estruturalmente diferentes, há similaridades entre suas propriedades e homologias entre estruturas terciárias que sugerem co-evolução a partir de uma proteína ancestral. Todas estas proteínas são secretadas com peptídeo-sinal que é removido quando as mesmas são translocadas para o retículo endoplasmático (RE), onde assumem sua conformação quaternária auxiliadas por enzimas existentes nesta organela celular (chaperonas, sulfidril isomerases e ciclofilinas). Após o estabelecimento da estrutura final, as proteínas de reserva são acumuladas em corpos protéicos, originados do RE e/ou do vacúolo em cereais, e do vacúolo, via Complexo de Golgi, nas dicotiledôneas. Nestas últimas, modificações proteolíticas ainda ocorrem no vacúolo por tiol- ou aspartato-proteases (Millerd, 1975; Larkins, 1981; Higgins, 1984; Casey e Domoney, 1987; Shutov e Vaintraub, 1987; Shotwell e Larkins, 1989 e Shewry, Napier e Tatham, 1995).

2.4.2 MECANISMOS DE MOBILIZAÇÃO

A mobilização das proteínas de reserva durante a germinação fornece suprimento adequado de nitrogênio, enxofre e esqueletos de carbono para o embrião em desenvolvimento. Este processo é coordenado temporalmente por diferentes tipos de proteases que agem de modo sequencial e sobreposto, à medida que são sintetizadas.

Shutov e Vaintraub (1987) propõem um modelo para o mecanismo de hidrólise das proteínas de reserva em sementes durante a germinação. Este modelo foi baseado principalmente na degradação das globulinas 11S. De acordo com estes pesquisadores, endopeptidases, denominadas Proteinases A, são sintetizadas *de novo* durante o início da germinação e hidrolisam parcialmente as proteínas nativas. Proteinases A são cisteíno-proteinases com massa molecular em torno de 25 kD, possuem pH ótimo em torno de 5, que é o pH interno

dos corpos protéicos. As menores alterações no substrato nativo causadas pelas Proteinases A geram sítios para a ação de outras endopeptidases, denominadas Proteinases B, também sintetizadas *de novo* durante a germinação e que são inativas contra as proteínas nativas. Também são cisteíno-proteinases com massa aproximada de 38 kD e pH ótimo de 5,6. O aumento da atividade desta protease é paralelo ao aumento da atividade da proteinase A. A ação conjunta destas proteases expõe terminais carboxila que podem ser atacados por carboxipeptidases, sintetizadas *de novo* ou presentes na semente seca. Estas carboxipeptidases são serino-proteinases com grande amplitude de massa molecular (43 - 170 kD), pouca especificidade e pH ótimo entre 4 e 6. A atividade destas proteases, em conjunto com as proteinases A e B, geram di- e tripeptídeos que são finalmente degradados a aminoácidos por amino- e dipeptidases. Em dicotiledôneas, estas últimas são encontradas no citoplasma, enquanto que Proteinases A e B e carboxipeptidases são encontradas nos corpos protéicos. Devido a isto, Shutov e Vaintraub (1987) concluem que há uma separação física entre os estágios da mobilização protéica. E. G. Barros (comunicação pessoal) pondera que este modelo é atrativo em suas implicações evolucionárias. Elementos deste modelo são reconhecidos em monocotiledôneas, dicotiledôneas e gimnospermas, descrevendo acuradamente o processo proteolítico para algumas das dicotiledôneas mais estudadas. No entanto, segundo este pesquisador, este modelo não deve ser considerado definitivo devido a possibilidade de tornar-se um obstáculo para futuras pesquisas, e aponta que apenas algumas espécies de valor comercial têm sido estudadas intensivamente.

As endopeptidases são classificadas com base no resíduo aminoacídico do sítio ativo da enzima e não no seu substrato, como na maioria das outras enzimas. São divididas em quatro grupos através do efeito de inibidores específicos do sítio ativo e requerimento de íons metálicos ou agentes redutores para ativação da enzima. Deste modo, serino-proteinases são inibidas por PMSF, cisteíno-proteinases são inibidas por iodo acetato e ativadas por β -mercaptoetanol, aspartato-proteinases são inibidas por pepstatina e metalo-proteinases são inibidas por EDTA e requerem zinco para ativação (Callis, 1995).

Um grupo de proteases que tem sido estudado de 1980 para cá, não pode ser incluído em nenhum grupo acima. São complexos proteolíticos que apresentam pelo menos três sítios catalíticos. Estes sítios catalíticos estão relacionados com atividades proteolíticas do tipo tripsina, quimotripsina e peptidil-glutamil hidrolase, catalizando hidrólises de ligações peptídicas

que apresentam nos terminais carboxila, resíduos básicos, hidrofóbicos e acídicos, respectivamente (Rivett, 1993). Devido a isto, são inibidos incomumente em relação às outras proteases.

Estes complexos possuem peso molecular entre 600 e 900 kD, coeficiente de sedimentação = 20 S e apresentam forma tubular. Migram como uma única banda de proteína através do campo eletroforético em condições não desnaturantes e são compostos de 15 a 24 polipeptídeos com massa molecular de 20 a 35 kD. São encontrados em arqueobactérias, em levedura e em citoplasma e núcleo celulares de eucariotos. Apresentam similaridade aminoacídica entre estes organismos, que indica ancestralidade genética em comum, mas não apresentam similaridade com as outras proteases (Orłowski, 1990; Zwickl et al., 1992; Rechsteiner, Hoffman e Dubiel, 1993; Rivett, 1993 e Callis, 1995). Devido a todas estas características, estes complexos têm sido referidos como um novo grupo de proteases e são denominados Proteossomas, Proteases 20 S, Complexos Proteolíticos Multicatalíticos ou Proteases 26 S, devido ainda à associação com possíveis controladores de suas funções.

Não se sabe a função dos proteossomas na célula, mas devido a concentração em extratos de tecido de até 1% das proteínas solúveis, a posição nuclear e citoplasmática, a multiplicidade proteolítica em pH neutro e a observação de genes que codificam para algumas de suas subunidades polipeptídicas são essenciais para o crescimento de levedura, tem sido sugerido que os proteossomas exercem uma função principal nas rotas não lisossômicas do metabolismo intracelular de proteínas (Orłowski, 1990 e Rivett, 1993). Os proteossomas podem degradar uma grande variedade de substratos protéicos sem gerar polipeptídeos intermediários detectáveis em SDS-PAGE (Rivett, 1993) e esta degradação é dependente do sistema da ubiquitina (Orłowski, 1990; Rechsteiner, Hoffman e Dubiel, 1993; Rivett, 1993 e Callis, 1995).

Em plantas superiores, os proteossomas foram isolados de folhas de espinafre. Estes proteossomas migram como uma única banda em condições eletroforéticas não desnaturantes e apresentam pelo menos 10 bandas polipeptídicas com massa molecular entre 21 e 32 kD em condições desnaturantes (Ozaki et al., 1992) e mostram atividade dependente de ATP para degradar proteínas ubiquitinadas (Fujinami et al., 1994). Ambos os grupos de pesquisadores concluem que estes proteossomas mostram características similares com os proteossomas isolados de vários outros eucariotas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Sementes maduras de *A. peregrina* utilizadas nos experimentos foram obtidas do Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Lavras - UFLA, a partir de um lote coletado em setembro de 1993 e armazenado a 10°C. As sementes foram submetidas a testes de germinação, de emergência e análise de composição química.

O teste de germinação foi realizado com sementes não desinfestadas. As sementes foram embebidas durante 5 horas em água destilada e colocadas para germinar em rolos de papel de filtro num incubador tipo B.O.D., regulado para 30°C constantes com períodos de 10 horas de luz e 14 horas de escuro. O teste foi conduzido em quatro repetições de 50 sementes e concluído após 3 dias. O indicador utilizado para germinação foi protusão de radícula.

O teste de emergência foi realizado em setembro de 1994 sob condições de campo e telado que permitia passagem de 50% de luminosidade. Não houve desinfestação das sementes e o plantio foi feito diretamente em bandejas de isopor com mistura de areia/vermiculita autoclavada (proporção 5:3, v/v). O teste foi conduzido em quatro repetições de 200 sementes e concluído após 21 dias. O indicador utilizado foi a emergência completa da parte aérea.

Na análise de composição química, determinou-se as porcentagens de proteínas, carboidratos, lipídeos, resíduo mineral e umidade. As análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS - EMBRAPA). A porcentagem de proteínas foi determinada através da quantificação do Nitrogênio total pelo método semi-micro Kjeldahl, utilizando-se o fator de correção 6,25. Lipídeos foram quantificados após extração com éter etílico pelo método de Soxhlet. Teor de umidade foi obtido através de

secagem a 105°C durante 24 horas e resíduo mineral através de carbonização a 550°C. Estas determinações foram realizadas segundo A.O.A.C. (1984). A determinação de carboidratos totais foi realizada segundo Silva (1981).

3.2 REAGENTES E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Os reagentes utilizados e listados a seguir foram adquiridos da Sigma Chemical Company (ST. Louis, MO, EUA). Ácido abscísico [mistura de isômeros], (ABA); ácido tricloroacético (TCA); acrilamida; azul de bromofenol, [Tetrabromofenolsulfonafetaleína] (ABF); azul de Coomassie R-250; dodecil sulfato de sódio (SDS); fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF); gelatina (Tipo A, densidade ~ 300); glicina; marcadores de peso molecular; 2-mercaptoetanol (β -Me); octil-fenoxi-polietoxietanol (Triton X-100); persulfato de amônio (APS); polivinil-polipirrolidona (PVPP); sacarose; TEMED [N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina]; Tris(hidroximetil)aminometano (Tris-base) e Tris(hidroximetil)aminometano-hidrocloreto (Tris-HCl). Ácido acético; acetona; etanol e glicerol foram adquiridos da Reagem Indústrias Químicas, S/A (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido giberélico (GA_3) e bis-acrilamida [N,N'-metileno-bis-acrilamida] foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os equipamentos utilizados foram: microcentrífuga, modelo 5415 C e microcentrífuga refrigerada, modelo 5402, ambas com rotor padrão [Eppendorf (Alemanha)]; fonte eletroforética, modelo 200/2.0 e aparato eletroforético, modelo "mini protean II" [BIO-RAD Laboratories, Inc (Hercules, California, EUA)].

3.3 ENSAIOS

3.3.1 DESINFESTAÇÃO X NÃO-DESINFESTAÇÃO

Um lote com 30 sementes maduras, sem qualquer tratamento de desinfestação, foi embebido em água destilada e autoclavada (dH_2O), durante 5 horas sob temperatura ambiente. Outro lote de sementes foi desinfestado em duas lavagens sequenciais com 1% de hipoclorito de sódio (água sanitária diluída 50%) e álcool comercial diluído a 70%, durante 5 minutos cada. Na câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas de 4 a 5 vezes com dH_2O e logo em seguida colocadas para embeber, por 5 horas em temperatura ambiente, com o frasco tampado por papel alumínio. Após a embebição, os embriões de 10 sementes de cada lote foram removidos e em

seguida armazenados em congelador a -85°C até a utilização. Outros 10 embriões de cada lote foram removidos, transferidos para placas de Petri contendo dois papéis de filtro umedecidos com 6 mL de solução 3% (p/v) de sacarose autoclavada e incubados durante 6 horas no escuro a 25°C . Para os embriões do lote desinfestado, todo o processo acima descrito foi realizado em condições assépticas. Após o período de incubação, os embriões foram armazenados a -85°C até a utilização.

3.3.2 CONCENTRAÇÕES DE ABA E PERÍODOS EXTREMOS DE INCUBAÇÃO

Embriões maduros isolados de sementes não desinfestadas, embebidas em dH_2O sob temperatura ambiente durante 5 horas, foram incubados no escuro a 25°C durante 6 e 30 horas. As incubações foram realizadas em placas de Petri (10 embriões em cada) contendo dois papéis de filtro umedecidos com 6 mL de soluções 3% de sacarose apenas, ou acrescidas de $10\ \mu\text{M}$ de ABA; $100\ \mu\text{M}$ de ABA; $1\ \mu\text{M}$ de GA_3 ; $1\ \mu\text{M}$ de GA_3 + $10\ \mu\text{M}$ de ABA ou $1\ \mu\text{M}$ de GA_3 + $100\ \mu\text{M}$ de ABA. Após incubação os embriões foram armazenados a -85°C até a utilização.

3.3.3 MOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS EM EMBRIÕES DURANTE A GERMINAÇÃO

Embriões maduros isolados de sementes não desinfestadas, embebidas em dH_2O sob temperatura ambiente durante 5 horas, foram incubados no escuro a 25°C durante 6, 12, 24 e 48 horas. As incubações foram realizadas em placas de Petri (10 embriões em cada) contendo dois papéis de filtro umedecidos com 6 mL de soluções 3% de sacarose apenas, ou acrescidas de $100\ \mu\text{M}$ de ABA; $1\ \mu\text{M}$ de GA_3 ou $1\ \mu\text{M}$ de GA_3 + $100\ \mu\text{M}$ de ABA. Após incubação os embriões foram armazenados a -85°C até a utilização.

3.3.4 SÍNTESE DE PROTEÍNAS EM EMBRIÕES APÓS INÍCIO DA GERMINAÇÃO

Embriões maduros isolados de sementes não desinfestadas, embebidas em dH_2O sob temperatura ambiente durante 5 horas, foram incubados durante 6 horas no escuro a 25°C , em placas de Petri (10 embriões em cada) contendo dois papéis de filtro umedecidos com 6 mL de solução 3% de sacarose sem reguladores. Após este período os embriões foram transferidos para soluções 3% de sacarose acrescidas de $100\ \mu\text{M}$ de ABA; $1\ \mu\text{M}$ de GA_3 ou $1\ \mu\text{M}$ de GA_3 + $100\ \mu\text{M}$ de ABA e incubados, nas mesmas condições, durante mais 6, 18 e 42 horas. Após incubação os embriões foram armazenados a -85°C até a utilização.

3.3.5 CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE EMBRIÕES

Embriões maduros isolados de sementes não desinfestadas, embebidas em dH_2O sob temperatura ambiente durante 5 horas, foram incubados durante 6 horas no escuro a 25°C , em placas de Petri contendo dois papéis de filtro umedecidos com 6 mL de solução 3% de sacarose. Embriões isolados de sementes embebidas e embriões incubados foram utilizados para comparação. Dez embriões foram macerados em almofariz sob baixa temperatura (banho de gelo) com 1 mL de dH_2O gelada, utilizando-se areia lavada em ácido nítrico para facilitar a maceração. Após a maceração, o homogenato foi coletado em microtubos e agitado sob baixa temperatura durante 20 minutos para a extração de proteínas solúveis em água. Após a extração, o homogenato foi centrifugado a $16000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi coletado e acrescido até a concentração de 1% de SDS (v/v de solução-estoque 10%) e 2% (v/v) de $\beta\text{-Me}$, em seguida foi armazenado a 4°C . O precipitado resultante foi ressuscitado com 1 mL de 0,5 M de NaCl gelado. O novo homogenato foi extraído e centrifugado nas condições acima e o sobrenadante, ídem. O precipitado desta fração foi ressuscitado com 1 mL de dH_2O gelada, vortexado e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido. Este procedimento foi usado para remoção do excesso de NaCl. O precipitado então lavado, foi ressuscitado com 1 mL de tampão borato pH 10, 1% de SDS e 2% de $\beta\text{-Me}$ para extração das proteínas totais remanescentes. Este terceiro homogenato foi extraído e centrifugado nas condições já descritas; o sobrenadante armazenado a 4°C e o precipitado descartado. Às frações aquosa, salina e alcalina foi acrescentado TCA até a concentração de 17% (v/v de solução-estoque 70%). As frações solúveis foram incubadas durante 1 hora no gelo para a total precipitação das proteínas. Após a incubação, as frações foram centrifugadas a $16000 \times g$ durante 15 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado protéico resultante foi ressuscitado com acetona a -20°C , vortexado, centrifugado do modo anterior e o sobrenadante descartado. Este processo foi repetido 2 vezes, sendo que na última, o precipitado protéico ficou incubado com acetona durante uma noite no congelador a -15°C antes da centrifugação. Este procedimento de lavagem com acetona foi usado para remoção do TCA e conseqüente elevação do pH. Após o descarte do sobrenadante da última lavagem, o precipitado protéico foi deixado à temperatura ambiente para que a acetona evaporasse. Finalmente, o precipitado foi ressuscitado com 100 μL de tampão da amostra [Tris-HCl 62,5 mM (v/v de solução-estoque 1 M) pH 6,8;

2,3% de SDS; 10% (v/v) de glicerol; 5% (v/v) de β -Me e 0,05% de ABF (v/v de solução-estoque 0,5%); baseado em Laemmli (1970)], aquecido em água fervente durante 4 minutos e centrifugado a 16000 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado. O procedimento de lavagem com acetona não foi suficiente para remover todo o TCA do precipitado da fração aquosa, que era o mais volumoso. Isto foi observado pela coloração amarelada do ABF presente no tampão da amostra. O acréscimo de 4 μ L de NaOH 3M (colocados um a um) foi suficiente para o ponto de viragem do ABF. Alíquotas do último sobrenadante coletado de cada fração solúvel, sem diluição, foram aplicadas em volume de 20 μ L nas cavidades dos géis para separação eletroforética em SDS-PAGE.

3.3.6 MOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E ATIVIDADE DE PROTEASES EM COTILÉDONES

Sementes maduras não desinfestadas foram colocadas para embeber durante 5 horas sob temperatura ambiente em dH_2O (controle) ou soluções aquosas de 100 μ M de ABA; 1 μ M de GA_3 ou 1 μ M de GA_3 + 100 μ M de ABA. Após a embebição, as sementes foram colocadas para germinar em rolos de papel de filtro (20 sementes em cada), umedecidos continuamente com as mesmas soluções de embebição, durante 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias. As condições de germinação foram: escuro com períodos de 8 horas a 30°C e 16 horas a 20°C. Após cada coleta, os cotilédones foram isolados e macerados inteiros com nitrogênio líquido ($N_2 L$), de modo a garantir homogeneidade de material. O macerado resultante foi armazenado a -85°C até a utilização. Este material foi analisado eletroforéticamente no sistema SDS-PAGE, para visualização das bandas de proteína e no sistema PAGE, para visualização da atividade de proteases.

3.4 ANÁLISE ELETROFORÉTICA

3.4.1 SISTEMA DE GÉIS DESNATURANTES (SDS-PAGE)

3.4.1.1 ASPECTOS GERAIS DA TÉCNICA

A maioria dos estudos com proteínas que empregam a eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE), usa um sistema desnaturante que dissocia as proteínas em suas subunidades polipeptídicas. O agente dissociador mais usado é o detergente iônico SDS. As

proteínas são geralmente solubilizadas e dissociadas pela ligação de seus polipeptídeos ao SDS, sob fervura, na presença de um agente redutor que rompe as ligações dissulfídicas. O SDS liga-se aos polipeptídeos numa razão de massa constante, sendo que as cargas líquidas de polipeptídeos ácidos ou básicos tornam-se insignificantes frente às cargas negativas do SDS. Assim, os complexos SDS-polipeptídeo têm essencialmente as mesmas densidades de carga e migram através do gel de poliacrilamida, para o ânodo do campo elétrico, estritamente de acordo com a relação entre suas massas moleculares e a porosidade do gel. Isto permite, além da análise polipeptídica desejada, estimar a massa molecular de polipeptídeos através da co-migração de outros com massa conhecida, relacionando suas respectivas mobilidades no gel.

3.4.1.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Embriões maduros, isolados de sementes secas, foram macerados sob baixa temperatura na proporção de 5 unidades para 1 mL de tampão de extração Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; 2,3% de SDS; 10% (v/v) de glicerol e acrescido de 10% (p/v) de PVPP; 1 mM de PMSF; 5% de β -Me ou apenas 5% de β -Me. Os homogenatos foram coletados em microtubos e centrifugados a 16000 x g durante 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes (extratos) foram coletados e alíquotas foram diluídas em tampão de amostra Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; 2,3% de SDS; 10% de glicerol e 0,05% de ABF (Laemmli, 1970) ou tampão de amostra Tris-base 50 mM pH 8,5; 50% de glicerol e 0,05% de ABF (Davis, 1964; citado por Hames, 1990). As amostras foram aquecidas em água fervente durante 4 minutos e aplicadas nos géis em volume de 30 μ L, diluídas (v/v) na proporção de 1:2 ou 2:1 (extrato : tampão de amostra).

3.4.1.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE EMBRIÕES

Para extração de proteínas totais foram utilizados 5 embriões (peso fresco médio = 50 mg) por mL de tampão de extração Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; 2,3% de SDS; 10% de glicerol e 5% de β -Me. A maceração dos embriões foi realizada em almofariz, sob baixa temperatura e com auxílio de pequenas quantidades de areia lavada em ácido nítrico para facilitar a maceração completa do tecido. O homogenato foi coletado em microtubos e centrifugado a 16000 x g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -15°C até o uso. Para separação eletroforética em géis de cavidades com capacidade de até 100 μ L, os extratos foram diluídos 2:1 em tampão da amostra Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; 2,3% de SDS;

10% de glicerol; 5% de β -Me e 0,05% de ABF; aquecidos em água fervente durante 4 minutos e aplicados em volume de 30 μ L por cavidade. Em géis de cavidades menores, os extratos foram diluídos 1:1 no mesmo tampão da amostra, aquecidos durante 4 minutos e aplicados em volume de 20 μ L por cavidade.

3.4.1.4 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE COTILÉDONES

Proteínas totais de cotilédones foram extraídas a partir de 50 mg do material macerado em N_2 L. para 1 mL de tampão de extração Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; 2,3% de SDS; 10% de glicerol e 5% de β -Me. A extração foi realizada em microtubos durante 20 minutos sob agitação e temperatura ambiente. Os extratos foram centrifugados a 16000 x g durante 15 minutos. Os sobrenadantes coletados, foram acrescidos de 2 μ L de ABF, aquecidos em água fervente durante 4 minutos e 20 μ L de amostra, destes extratos sem diluição, foram aplicados nos géis para separação eletroforética.

3.4.1.5 ELETROFORESE

O sistema descontínuo de SDS-PAGE foi utilizado para observação do perfil de proteínas totais em embriões e cotilédones, segundo Laemmli (1970) com algumas modificações abaixo indicadas.

A - Confecção dos géis

Os géis foram confeccionados em cuba construída no próprio laboratório. As placas de vidro foram montadas com os espaçadores posicionados e com vaselina vedando todas as áreas de contato. As soluções de acrilamida dos géis separador e concentrador foram preparadas, inicialmente sem adição dos catalisadores APS e TEMED. Adicionou-se então os catalisadores apenas na solução do gel separador, sem prévia deaeração à vácuo do mesmo. A concentração de acrilamida total (T%) do gel separador foi 12,5% e consistia de 6,6 mL de dH_2O ; 8,3 mL de solução-estoque de acrilamida/bis-acrilamida a 30% [concentração de bis-acrilamida na solução-estoque (C%) = 2,6%]; 5,0 mL de tampão Tris-base 1,5 M pH 8,8; 0,4% de SDS e foi polimerizado com 100 μ L de 10% (p/v) de APS e 16 μ L de TEMED. A solução foi despejada vagarosamente entre as placas de vidro até alcançar 1 cm antes da base do pente formador das cavidades do gel. A solução foi coberta com dH_2O e deixada polimerizando durante

1 hora. Após este período a água foi retirada e o excesso enxugado. O pente foi inserido e a solução do gel concentrador acrescida dos catalisadores, também sem prévia deaeração. O gel concentrador (T% = 6) consistia de 3,9 mL de dH₂O; 1,4 mL da mesma solução-estoque de acrilamida/bis-acrilamida; 1,7 mL de tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 0,4% de SDS e polimerizado com 20 μL de APS e 15 μL de TEMED. A solução foi colocada com auxílio de uma pipeta, inclinando as placas de vidro para evitar que bolhas de ar ficassem retidas na base do pente. A solução foi deixada polimerizando durante 30 minutos no mínimo. Os géis foram utilizados imediatamente ou armazenados em geladeira, cobertos com uma lâmina d'água e parafilme, por até 2 dias. Os volumes indicados foram suficientes para confeccionar um gel descontínuo com 160 x 110 x 1 mm.

B - Separação eletroforética

Em ambos eletrodos da cuba eletroforética foi utilizado tampão Tris-glicina [25 mM de Tris-base; 192 mM de glicina] acrescido de 0,1% de SDS, pH próximo de 8,3. As separações eletroforéticas foram realizadas sob temperatura ambiente, voltagem constante (60 V) e amperagem livre, durante aproximadamente 5 horas, quando o marcador ABF alcançava a base do gel.

C - Coloração e descoloração

Após as separações eletroforéticas, os géis foram corados sob agitação durante períodos mínimos de 10 horas numa solução de 25 % de etanol + 10% de ácido acético, acrescida de 0,1% (p/v) de azul de Coomassie R-250; e descorados também sob agitação em solução de 5% de etanol + 10% de ácido acético, até a remoção do corante retido nos poros da matriz de poliacrilamida.

D - Modificações

Visando melhor resolução das bandas de proteína, eventualmente as concentrações de Tris dos géis e do tampão de corrida foram duplicadas, de acordo com Wallace et al. (1990).

3.4.2 SISTEMA DE GÉIS NATIVOS (PAGE) / GÉIS DE ATIVIDADE PARA PROTEASES

3.4.2.1 ASPECTOS GERAIS DA TÉCNICA

Acoplado ao sistema nativo de eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE), utiliza-se a técnica de copolimerizar acrilamida e gelatina para a detectar atividade de proteases em

extratos nativos (não desnaturados). Extratos nativos contendo enzimas ativas são inicialmente separados nesta matriz mista. Após separação eletroforética, os géis são incubados em tampão com pH ajustado para um limite que permita máxima atividade enzimática. Desta maneira, as proteases ativas degradam a gelatina presente na região do gel para a qual foram carregadas por ação do campo elétrico. Assim, a gelatina é removida apenas das regiões contendo bandas protéicas correspondentes a proteases. Esta técnica permite, através de coloração com azul de Coomassie, seguida de descoloração com álcool/ácido acético, identificar atividade enzimática presente nas regiões descoloradas do gel. As regiões do gel intensamente coradas de azul, correspondem a áreas contendo gelatina não degradada.

O protocolo de extração; eletroforese e atividade, obtido para proteases em cotilédones de *A. peregrina*, foi baseado em Asahi et al. (1985) e Barros e Larkins (1990).

3.4.2.2 EXTRAÇÃO DE PROTEASES

Proteases de cotilédones foram extraídas a partir de 100 mg do material macerado em N₂ L. para 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 (NaP). As proteases foram extraídas durante 2 horas a 4°C sob agitação ocasional. Após período de extração, o homogenato foi centrifugado a 16000 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado; acrescido de glicerol e ABF até a concentração de 10% e 0,05%, respectivamente; e armazenado a -20°C, por períodos máximos de uma semana, até o uso.

3.4.2.3 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DE ATIVIDADE

Proteases de uma amostra do macerado de cotilédones-controle coletados aos 6 dias, foram extraídas do modo descrito em 3.4.2.2. O extrato obtido, acrescido de glicerol e ABF até a concentração de 10% e 0,05%, respectivamente, não acrescido de agente redutor, nem aquecido em água fervente, foi aplicado em volumes de 5, 10 e 20 µL nas cavidades de 4 géis. Após separação em PAGE/GÉIS DE ATIVIDADE, os géis foram incubados, durante 2 horas a 37°C sob agitação, em 100 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, preparado em pHs de 3,9; 4,5; 5,1 e 5,7.

3.4.2.4 EXTRAÇÃO COM SDS

Proteases de uma amostra do macerado de cotilédones-controle coletados aos 6 dias, foram extraídas nas condições descritas em 3.4.2.2., a partir de 100 mg do material para 1 mL de NaP acrescido de 2,3% de SDS. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e acrescido de glicerol e ABF até a concentração de 10% e 0,05%, respectivamente. A amostra foi aplicada em volume de 10 μ L em mini-gel (neste caso, acrescido de 0,4% de SDS), sem prévia adição de agente redutor, nem aquecimento em água fervente. Após separação em SDS-PAGE, o mini-gel foi lavado durante 2 horas sob agitação e baixa temperatura, com 200 mL de 2,5% de Triton X-100 para a remoção do SDS e concomitante recuperação da conformação nativa das enzimas. Após remoção do SDS, o mini-gel foi incubado, durante 2 horas a 37°C sob agitação, em 100 mL de tampão acetato de sódio, 50 mM pH 5,7.

3.4.2.5 ELETROFORESE

A - Confecção dos géis (mini-géis)

Os géis foram confeccionados num aparato eletroforético modelo “mini-protean II” de modo análogo ao descrito para o sistema SDS-PAGE, porém sem adição de SDS, com acréscimo de 0,5% de gelatina, e concentração de Tris sempre duplicada, tanto nos géis como no tampão de corrida.

Na confecção dos géis, o gel concentrador (T% = 6) consistia de 1,6 mL de dH₂O; 0,7 mL da solução-estoque de acrilamida/bis-acrilamida; 0,85 mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 6,8; 0,35 mL de solução 5% (p/v) de gelatina e foi polimerizado com 10 μ L de APS e 7 μ L de TEMED. O gel separador (T% = 7,5) consistia de 4,0 mL de dH₂O; 2,5 mL da solução de acrilamida/bis-acrilamida; 2,5 mL de Tris-base 3 M pH 8,8; 1,0 mL de solução 5% de gelatina e polimerizado com 50 μ L de APS e 8 μ L de TEMED. Em ambos eletrodos do aparato eletroforético foi utilizado tampão Tris-glicina [50 mM de Tris-base e 192 mM de glicina], sem ajuste de pH.

Na confecção do gel com 0,4% de SDS para o ensaio de proteases (ítem 3.4.2.4), o procedimento foi o mesmo acima, exceto pela adição de 0,14 e 0,4 mL de solução 10% de SDS em substituição de iguais volumes de dH₂O, nos géis concentrador e separador, respectivamente. Ao mesmo tampão Tris-glicina, foi acrescentado 0,1% de SDS em peso/volume.

B - Separação eletroforética

Antes da separação eletroforética os géis foram pré-corridos a 100 V por 30 minutos a 3°C. Na separação eletroforética a voltagem foi ajustada ao máximo (200 V) e a amperagem limitada a 40 mA. Os tempos de separação foram de 3,5 e 2,5 horas a 3° C para PAGE e SDS-PAGE, respectivamente. Esses tempos de separação excediam a saída do marcador ABF pela base do gel; a qual ocorria em torno de 1 hora para ambos os casos.

C - Coloração e descoloração

Após período de incubação para desenvolvimento da atividade em pH 5,7, os géis foram corados sob agitação durante períodos mínimos de 10 horas, numa solução de 25% de etanol + 10% de ácido acético, acrescida de 0,1% de azul de Coomassie R-250 e descorados, também sob agitação, em solução de 5% de etanol + 10% de ácido acético, até o surgimento de bandas incolores. Alternativamente, os géis foram corados em forno de microondas durante 5 minutos em potência média, com 40% de etanol + 10% de ácido acético + 0,1% de azul de Coomassie R-250 e descorados do modo anterior, em solução de 40% de etanol + 10% de ácido acético. Esta técnica de coloração em microondas (PROMEGA, 1993) funcionou muito bem para mini-géis de atividade, com ótima intensidade de coloração e pode ser otimizada para géis grandes de proteínas totais, inclusive para descorá-los, reduzindo o tempo de coloração e descoloração para 40-50 minutos.

4 RESULTADOS

4.1 TESTES DE GERMINAÇÃO, EMERGÊNCIA E ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Para verificar a viabilidade das sementes utilizadas nos ensaios e para conhecer suas características químicas, foram realizados testes de germinação, de emergência e análise da composição química das mesmas. Os lotes amostrados apresentaram 85,7% de germinação aos 3 dias e 71,4% de plântulas estabelecidas aos 21 dias. A análise química revelou 8,5% de umidade; 36,5% de proteínas; 11,2% de carboidratos; 17,4% de lipídios; e 3,3% de resíduo mineral. A figura 1 mostra um panorama geral da germinação das sementes e do desenvolvimento do eixo embrionário.

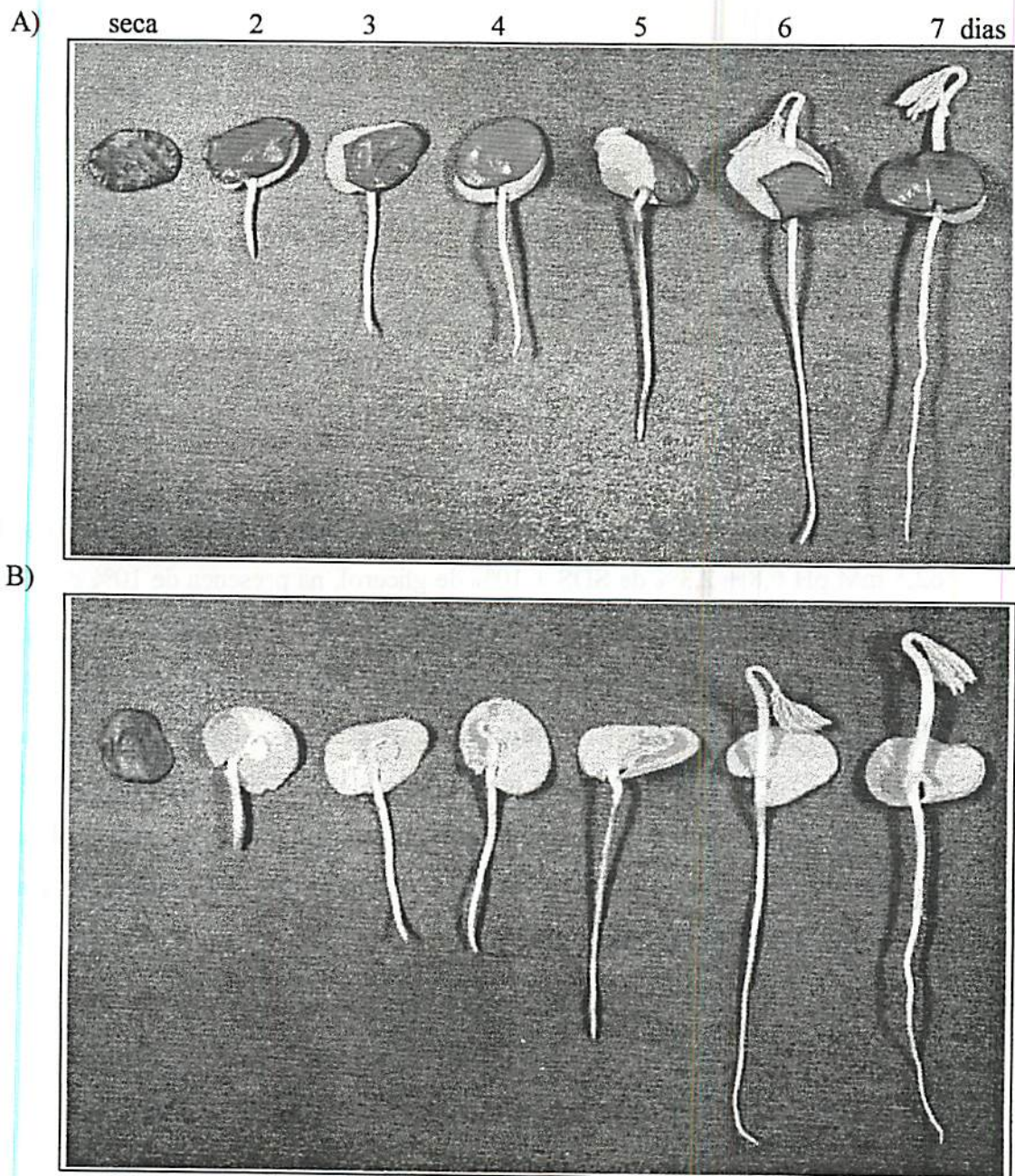


FIGURA 1 - Germinação e desenvolvimento do eixo embrionário de *A. peregrina*. Semente seca e eixos em desenvolvimento (2 a 7 dias). A) sementes intactas; e B) sementes sem um dos cotilédones.

FIGURA 2 - Perfil protéico de embriões secos de *A. peregrina*, extraídos em tampão Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 + 2,3% de SDS + 10% de glicerol, na presença de 10% de PVPP, 5% de β -Me e 1mM de PMSF (colunas 1 a 4) ou apenas 5% de β -Me (colunas 6 a 9), diluídos em tampão de Davis [Tris 50 mM pH 8,8; 50% de glicerol e 0,05% de ABF] (colunas 1, 2, 6 e 7) ou diluídos em tampão de Laemmli [Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; 2,3% de SDS; 10% de glicerol e 0,05% de ABF] (colunas 3, 4, 8 e 9) nas proporções de amostra e tampão 1 : 2 (colunas 1, 3, 6 e 8) ou 2 : 1 (colunas 2, 4, 7 e 9). Coluna 5 = marcador molecular; massas em kD, indicadas à esquerda.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE EMBRIÕES

Com o objetivo de obter um bom bandejamento protéico, foi determinado; 1- se haveria necessidade da adição de PVPP, β -Me, PMSF ou apenas β -Me ao extrato; 2- a composição do tampão de diluição da amostra; e 3- a concentração de amostra a ser aplicada nos géis. A figura 2 mostra duas amostras de embriões isolados de sementes secas, extraídas na presença de PVPP, β -Me e PMSF ou apenas β -Me; e ambas diluídas na proporção de 1:2 ou 2:1 em tampão de Davis ou tampão de Laemmli. Não foram observadas diferenças no perfil protéico de ambas amostras em relação a presença de PVPP, β -Me e PMSF ou β -Me apenas; no entanto, em maior proporção de tampão de Laemmli do que de amostra, foi observado espalhamento lateral das bandas de proteína no decorrer da separação eletroforética. Em relação à composição do tampão de diluição da amostra, foi observado que em tampão de Davis formaram-se “rastros”, prejudicando parcialmente a visualização das bandas de proteína, principalmente na maior proporção de amostra, extraída apenas com β -Me, em relação ao tampão.

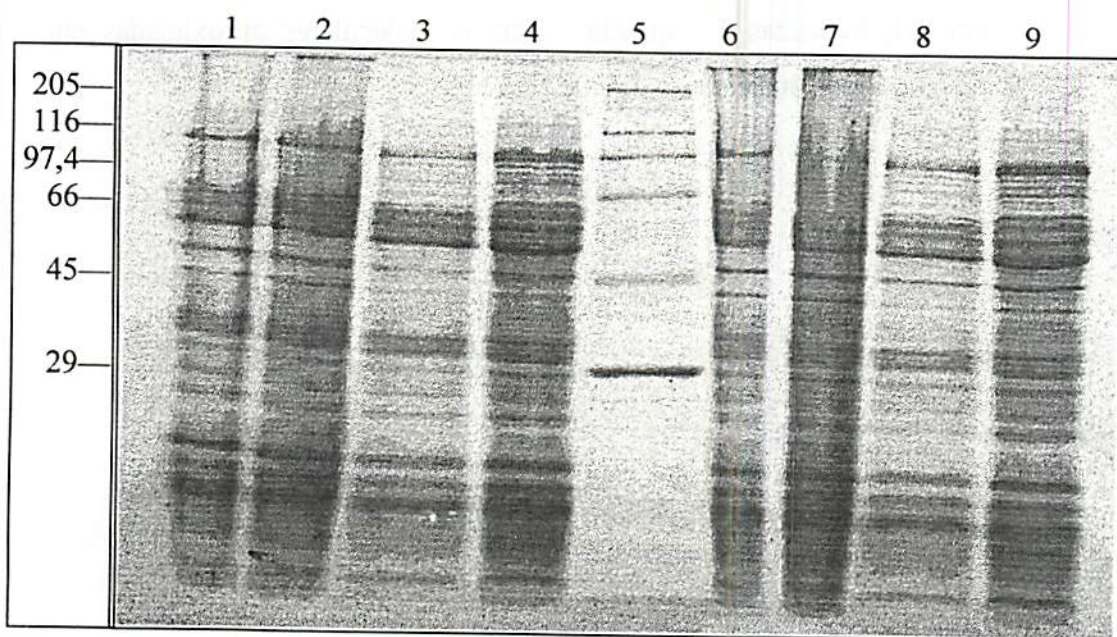
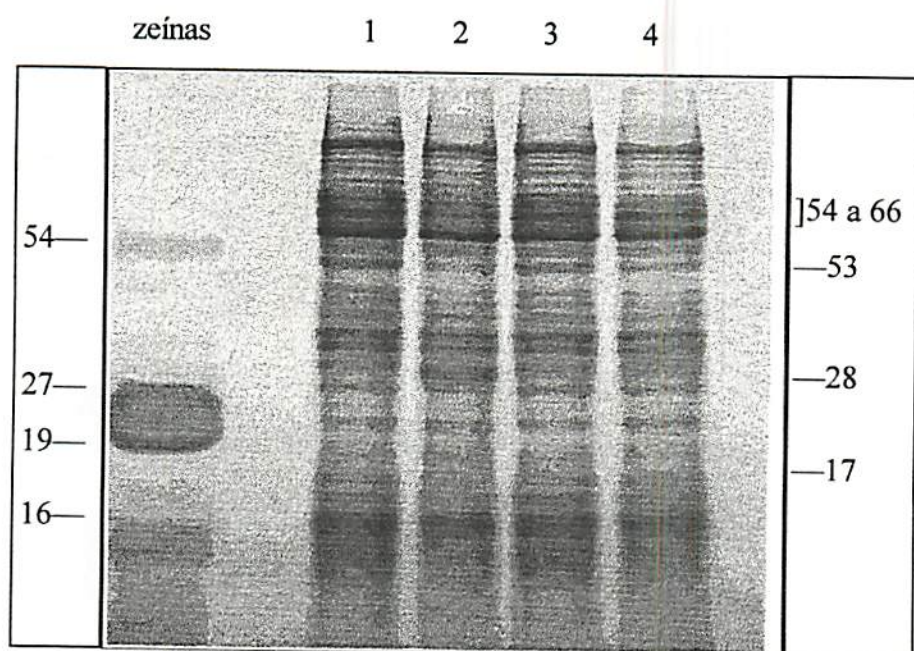


FIGURA 3 - Perfil protéico de embriões de *A. peregrina*, provenientes de sementes não desinfestadas, embebidas em dH₂O durante 5 horas e incubados em 3% de sacarose durante 6 horas (colunas 1 e 2, respectivamente); ou provenientes de sementes desinfestadas com 70% de álcool comercial e 1% de hipoclorito de sódio, embebidas em dH₂O durante 5 horas e incubados em 3% de sacarose durante 6 horas (colunas 3 e 4, respectivamente). Massas moleculares de zeínas em kD, indicadas à esquerda. Massas moleculares aproximadas em kD dos polipeptídeos, indicadas à direita.

4.3 DESINFESTAÇÃO X NÃO-DESINFESTAÇÃO

Com objetivo de determinar se os reagentes, que normalmente são utilizados para desinfestação superficial dos materiais vegetais, interferem na mobilização protéica de embriões durante o início da germinação, foi analisado o perfil protéico de embriões isolados de sementes embebidas durante 5 horas e de embriões incubados por mais 6 horas além do período de embebição. As sementes foram desinfestadas ou não antes da embebição (fig. 3). Não foram observadas diferenças entre embriões apenas embebidos (colunas 1 e 3). Nos embriões incubados provenientes de sementes não-desinfestadas (coluna 2), foi observado, em relação aos embebidos, a diminuição de intensidade de bandas protéicas com massas moleculares aproximadas de 17 e 53 kD; e de 3 ou 4 bandas protéicas entre 54 e 66 kD. Foi observado também a presença de uma banda protéica com 28 kD aproximadamente. Nos embriões incubados provenientes de sementes desinfestadas (coluna 4), foi observado apenas uma pequena diminuição de intensidade das bandas protéicas com 53 e entre 54 e 66 kD; bem como a presença da banda protéica com 17 kD e um pequeno aumento de intensidade da banda protéica com 28 kD.



4.4 CONCENTRAÇÕES DE ABA E PERÍODOS EXTREMOS DE INCUBAÇÃO

Com o objetivo de delimitar os períodos de incubação e especificamente, verificar se ocorrem diferenças no perfil protéico de embriões submetidos a diferentes concentrações de ABA em relação a períodos extremos de incubação, foi analisado o perfil protéico de embriões isolados de sementes não desinfestadas, embebidas durante 5 horas (controle-5 horas), e incubados durante 6 ou 30 horas, na ausência ou presença de ABA e/ou GA_3 (fig. 4). Nos embriões incubados durante 6 horas na ausência dos reguladores, foi observado, em relação ao controle-5 horas, a ausência das bandas protéicas com 17 e 53 kD; a diminuição de intensidade das várias entre 54 e 66 kD, bem como a presença da banda protéica com 28 kD. Nas incubações durante 6 horas na presença dos reguladores, não foi observado diferenças significativas no perfil protéico dos embriões em relação ao controle-5 horas, exceto por um pequeno aumento de intensidade na região de 28 kD. Em 30 horas, foram observadas alterações significativas na intensidade das bandas protéicas com massas moleculares entre 54 e 66 kD entre os tratamentos. Os tratamentos $1 \mu M$ de GA_3 e $1 \mu M$ de GA_3 + $10 \mu M$ de ABA foram semelhantes ao tratamento sem reguladores, no entanto $1 \mu M$ de GA_3 + $100 \mu M$ de ABA foi semelhante ao tratamento $10 \mu M$ de ABA. O tratamento $100 \mu M$ de ABA foi o que mostrou menores alterações em relação a 6 horas para as mesmas bandas protéicas. Em 30 horas, foi observada a ausência da banda protéica com 17 kD em todos tratamentos.

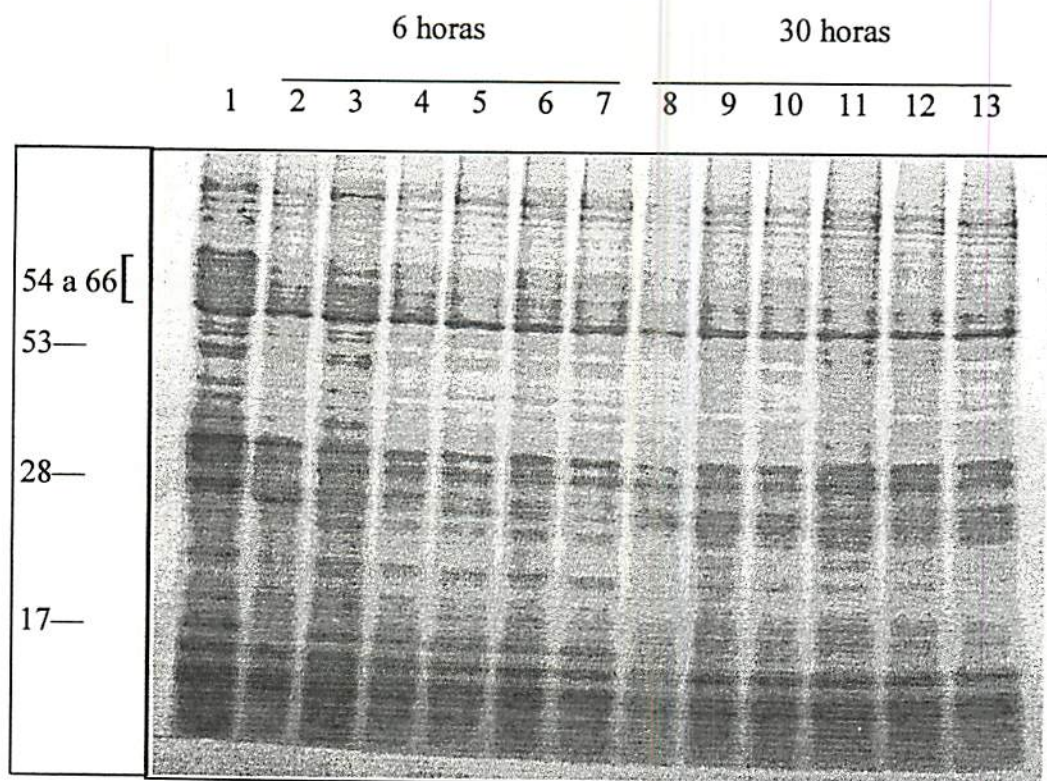


FIGURA 4 - Perfil protéico de embriões de *A. peregrina* incubados em soluções 3% de sacarose acrescidas ou não de ABA, GA ou ABA + GA, durante 6 ou 30 horas. Massas moleculares aproximadas em kD dos polipeptídeos, indicadas à esquerda. Colunas: 1) embriões de sementes embebidas 5 horas; 2) sem reguladores; 3) 10 μ M de ABA; 4) 100 μ M de ABA; 5) 1 μ M de GA₃; 6) 1 μ M de GA₃ + 10 μ M de ABA; 7) 1 μ M de GA₃ + 100 μ M de ABA; 8) sem reguladores; 9) 10 μ M de ABA; 10) 100 μ M de ABA; 11) 1 μ M de GA₃; 12) 1 μ M de GA₃ + 10 μ M de ABA; 13) 1 μ M de GA₃ + 100 μ M de ABA.

4.5 MOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS EM EMBRIÕES DURANTE A GERMINAÇÃO

Com o objetivo de observar a sequência de variações nas proteínas (degradação e/ou síntese) de embriões, durante as primeiras 48 horas de germinação na presença de ABA, foi analisado o perfil protéico de embriões incubados na ausência (controle) ou na presença de ABA e/ou GA₃ durante 6, 12, 24 e 48 horas (fig 5). Além das observações já descritas entre controle-5 horas e embriões incubados durante 6 horas na ausência dos reguladores (fig. 4), foi observado o acúmulo e desaparecimento sequenciais, nas horas procedentes, da banda protéica com 28 kD. Esta banda está ausente no controle-5 horas e é acumulada de forma razoavelmente compacta em 6 horas. Aparentemente, este acúmulo é produto, em grande parte, da degradação das bandas protéicas entre 54 e 66 kD. Em 12 horas este acúmulo torna-se difuso, possivelmente pela continuada degradação de proteínas com maiores massas moleculares e pela degradação da própria banda protéica com 28 kD, que está acumulada de forma compacta em 6 horas. De 24 a 48 horas, esta banda protéica com 28 kD está praticamente degradada (controle, fig. 5). Nos embriões incubados em ABA (fig. 5 - A), foi observado um retardamento do processo descrito para o controle. A degradação das bandas protéicas com 17 e entre 54 e 66 kD, tende a estar completa em 24 horas, enquanto no controle, entre 6 e 12 horas. A banda protéica com 53 kD foi degradada menos intensamente e a com 28 kD é acumulada gradativamente, alcançando o máximo em 24 horas. De modo geral, o perfil protéico em 24 horas nestes embriões foi semelhante ao perfil em 12 horas no controle, ídem em 48 horas em relação às 24 horas do controle. Foi observado que o tratamento 1 μ M de GA₃ (fig. 5 - B) não diferiu significativamente do controle, exceto pela banda protéica com 17 kD, que é degradada em 6 horas no controle e em 12 horas em GA₃. Foi observado que 1 μ M de GA₃ não inibiu o efeito de 100 μ M de ABA neste sistema, já que o perfil protéico no tratamento 100 μ M de ABA + 1 μ M de GA₃ (fig. 5 - C) praticamente não diferiu do tratamento com ABA.

C)

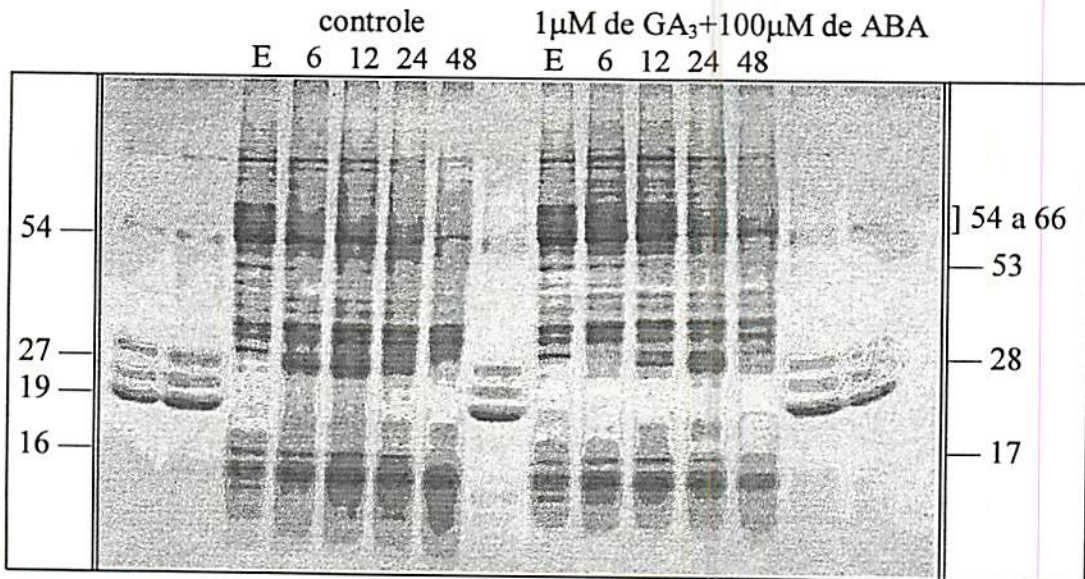


FIGURA 5 - Perfil protéico de embriões de *A. peregrina* isolados de sementes embebidas durante 5 horas (E) e incubados durante 6, 12, 24 ou 48 horas em soluções 3% de sacarose acrescidas ou não de ABA, GA₃ ou ABA + GA₃, nas concentrações indicadas. A) controle e ABA; B) controle e GA₃; e C) controle e ABA + GA₃. Massas moleculares de zeínas em kD, indicadas à esquerda. Massas moleculares aproximadas em kD dos polipeptídeos, indicadas à direita.

4.6 SÍNTESE DE PROTEÍNAS EM EMBRIÕES APÓS INÍCIO DA GERMINAÇÃO

Com o objetivo de verificar se a adição de ABA após o início da germinação interfere no perfil protéico de embriões isolados, os embriões foram incubados inicialmente em solução de sacarose durante 6 horas, depois transferidos para soluções de sacarose contendo ABA e/ou GA₃, e incubados durante mais 6, 18 e 42 horas (fig. 6). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos, sendo que a sequência de degradação ocorre do mesmo modo da descrita para os embriões incubados sem os reguladores durante 12, 24 e 48 horas (fig. 5).

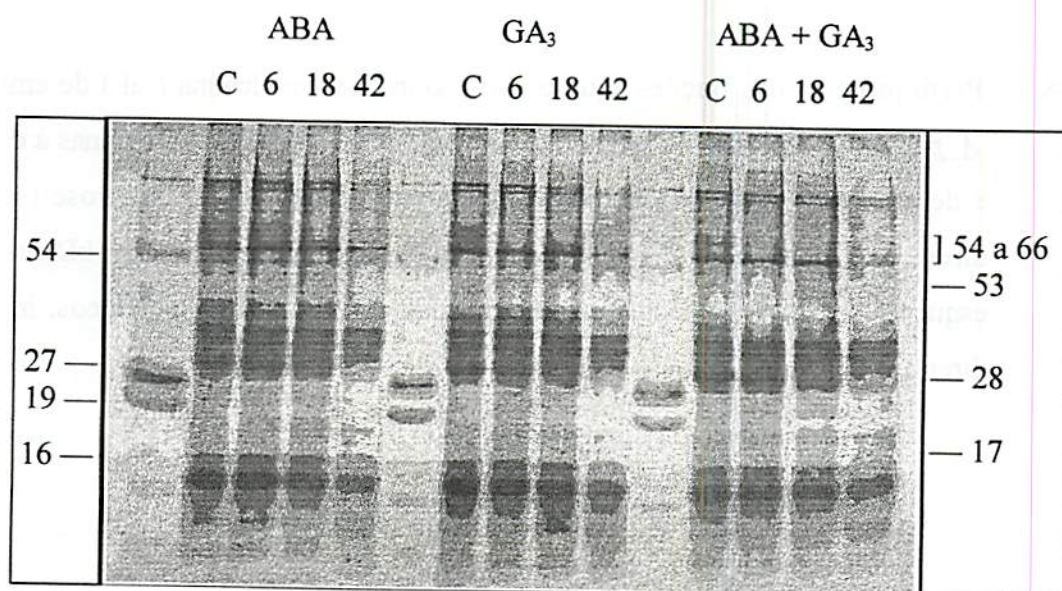


FIGURA 6 - Perfil protéico de embriões de *A. peregrina*, isolados de sementes embebidas durante 5 horas e incubados em solução 3% de sacarose durante 6 horas (C); depois transferidos e incubados durante mais 6, 18, e 42 horas em soluções 3% de sacarose acrescidas de 100 μ M de ABA, 1 μ M de GA₃ ou 100 μ M de ABA + 1 μ M de GA₃, GA₃. Massas moleculares de zeínas em kD, indicadas à esquerda. Massas moleculares aproximadas em kD dos polipeptídeos, indicadas à direita.

FIGURA 7 - Perfil protéico das frações aquosa (a), salina (s) e alcalina (al) de embriões de A. peregrina isolados de sementes embebidas durante 5 horas (colunas à esquerda) e de embriões incubados durante 6 horas em solução 3% de sacarose (colunas à direita). Coluna central - zeínas com suas massas moleculares em kD, indicadas à esquerda. Massas moleculares aproximadas em kD dos polipeptídeos, indicadas à direita.

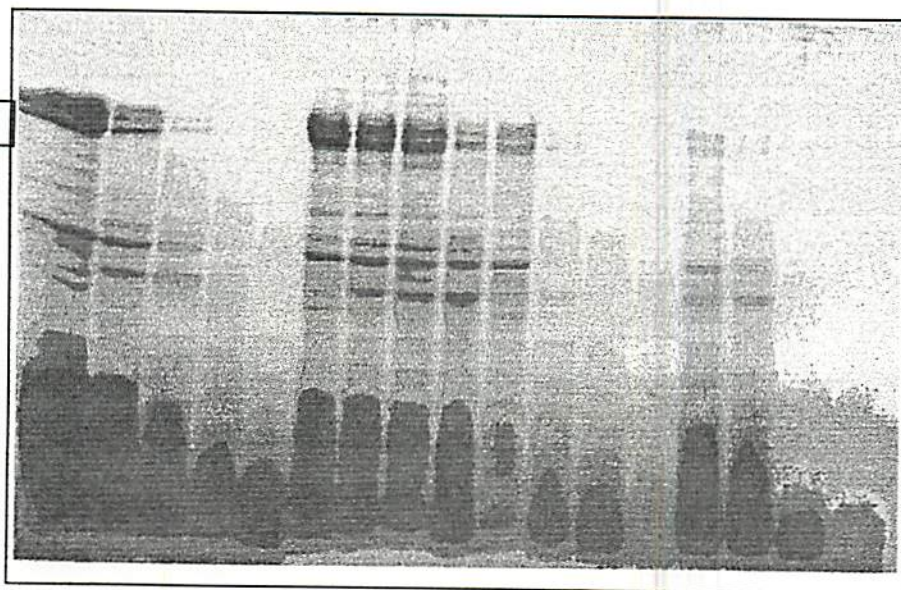
FIGURA 8 - Perfil protéico de cotilédones de *A. peregrina*, isolados de sementes incubadas em dH₂O (controle), 100 μM de ABA, 1 μM de GA₃ ou 100 μM de ABA + 1 μM de GA₃, durante 0 (semente seca), 2, 4, 6 e 8 dias. À esquerda estão indicados os polipeptídeos, com massas moleculares aproximadas entre 54 e 66 kD, encontrados também em embriões.

4.8 MOBILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE RESERVA EM COTILÉDONES

Com o objetivo de observar o efeito do ABA na sequência de degradação de proteínas de reserva cotiledonares, foi analisado o perfil protéico de cotilédones isolados de sementes germinadas na ausência (controle) ou na presença de ABA e/ou GA₃ durante 8 dias (fig. 8). Foi observado em cotilédones as mesmas bandas protéicas entre 54 e 66 kD observadas em embriões. No controle foi observado que a degradação protéica como um todo ocorre dos 4 aos 6 dias praticamente. No tratamento com ABA, foi observada a presença de polipeptídeos com massa molecular acima de 66 kD que foram degradados aos 8 dias. Em ABA o perfil protéico permanece inalterado até o 6° dia, sendo que no 8° dia, as bandas protéicas entre 54 e 66 kD começam a ser degradadas. Os tratamentos 1 μM de GA₃ e 1 μM de GA₃ + 100 μM de ABA não diferiram do controle, em cotilédones. Em embriões, o tratamento 1 μM de GA₃ + 100 μM de ABA (fig.5 - C) não diferiu do tratamento 100 μM de ABA (fig. 5 - A).

	controle					ABA					GA ₃					ABA + GA ₃				
	0	2	4	6	8		2	4	6	8		2	4	6	8		2	4	6	8

54 a 66 [



4.9 "pH" DE MÁXIMA ATIVIDADE DE PROTEASES

Com o objetivo de determinar a faixa de pH ideal para a máxima atividade enzimática das proteases em cotilédones (controle/6 dias), os géis de poliacrilamida contendo as mesmas, foram incubados em tampão acetato com diferentes valores de pH (fig. 9). Foi observado que a atividade aumenta na medida que aumenta o pH, sendo que nos valores entre 5,1 e 5,7 a atividade é máxima dentro da escala testada (3,9 a 5,7). Observa-se que muita atividade fica retida no gel concentrador e isto repetiu-se em todos géis de atividade.

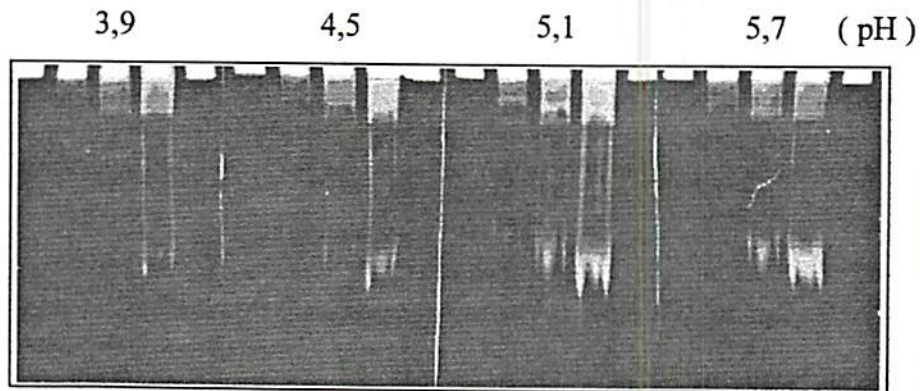


FIGURA 9 - Géis de atividade de proteases extraídas de cotilédones de *A. peregrina*, isolados de sementes incubadas em dH₂O durante 6 dias. Atividade em valores de pH: 3,9 ; 4,5 ; 5,1 e 5,7. Volumes de amostras aplicadas nos géis : 5, 10 e 20 µL, da esquerda para direita.

4.10 ATIVIDADE DE PROTEASES EM COTILÉDONES

Com o objetivo de observar o efeito do ABA sobre a atividade de proteases durante a mobilização das proteínas de reserva em cotilédones, foi realizado o ensaio da atividade em cotilédones isolados de sementes incubadas durante 12 dias, na ausência (controle) ou presença de ABA e/ou GA_3 (fig. 10). Não foi observado atividade em cotilédones de sementes secas (dia 0). No controle, foi observado bandas de proteases com atividade e mobilidade diferentes. Foi observado mínima atividade de uma banda de protease com menor mobilidade aos 2 dias; e máxima atividade de uma outra com maior mobilidade a partir dos 4 dias (fig. 10 - A). O mesmo foi observado no tratamento com GA_3 , exceto no 4º dia, no qual foi observado atividade, ainda baixa, de uma outra banda de protease com mobilidade intermediária (fig. 10 - C). No tratamento com ABA foi observado que a atividade da protease com maior mobilidade tem início somente no 8º dia e o máximo de atividade é alcançado somente no 12º dia (fig. 10 - B). No tratamento com ABA + GA_3 foi observado que a atividade começa aos 4 dias (fig. 10 - D) e de modo tardio em relação ao tratamento com GA_3 , ou seja, a atividade nos dias 4 e 6 é semelhante à atividade nos dias 2 e 4 do tratamento com GA_3 .

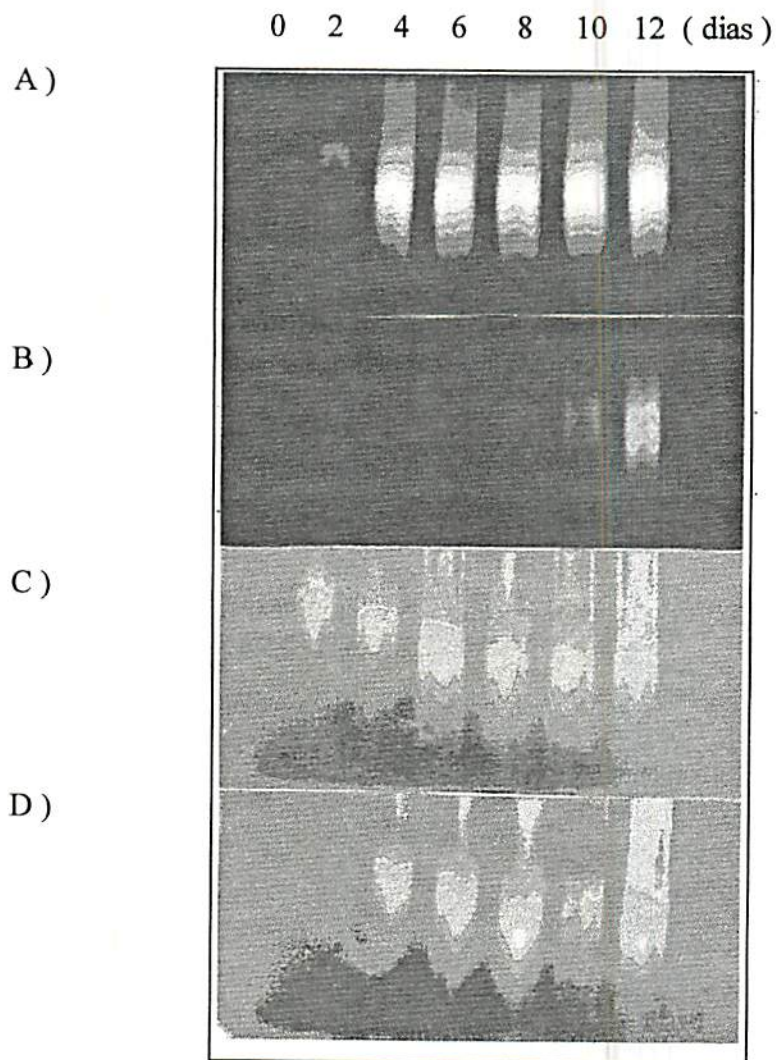


FIGURA 10 - Géis de atividade de proteases extraídas de cotilédones de *A. peregrina*, isolados de sementes incubadas durante 0 (sementes secas), 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias na ausência (A) ou presença de 100 μM de ABA (B); 1 μM de GA_3 (C) ou 100 μM de ABA + 1 μM de GA_3 (D). Atividade em pH 5,7.

5 DISCUSSÃO

5.1 DESINFESTAÇÃO

Na micropropagação *in vitro*, ou cultura de tecidos, os materiais vegetais (explantes) utilizados para gerar novos indivíduos, devem ser desinfestados de fungos e/ou bactérias associados ao tecido, para que estes não se desenvolvam no meio de cultivo, rico em nutrientes, e impeçam o desenvolvimento do explante. A desinfestação consiste na remoção superficial destes microrganismos e é uma das etapas limitantes para o sucesso da micropropagação de uma dada espécie. Várias formulações químicas podem ser utilizadas com este propósito. A escolha do agente desinfestante e a duração do tratamento varia com o grau de contaminação e a sensibilidade do tecido (Yeoman e MacLeod, 1977; Reinert e Yeoman, 1982).

De acordo com nossos resultados, o perfil protéico de embriões provenientes de sementes desinfestadas, incubados durante 6 horas, foi pouco alterado em relação ao controle-5 horas (fig. 3); isto não significa que os agentes desinfestantes utilizados tenham danificado os tecidos embrionários. Estes embriões, quando incubados em meio nutritivo, desenvolveram-se normalmente durante 4 dias (dados não mostrados). No entanto, no período de 6 horas, a desinfestação pode mascarar os tratamentos com reguladores, visto que o perfil protéico dos embriões tratados com reguladores também foi pouco alterado em relação ao controle-5 horas (fig. 4). Isto poderia sugerir que os reguladores não exercem nenhum efeito ao nível protéico dos embriões durante este período; porém, nossos resultados com embriões isolados de sementes não desinfestadas mostram que os reguladores interferem no perfil protéico durante este período (fig. 4), já que no tratamento sem reguladores, o perfil é alterado significativamente. No entanto,

não foi encontrado embasamento teórico para explicar as causas que levam a estas diferenças entre perfil protéico de embriões isolados em relação a desinfestação ou não desinfestação das sementes.

5.2 CLASSIFICAÇÃO PROTÉICA

Baseado nos resultados obtidos com o perfil protéico das frações aquosa, salina e alcalina, podemos caracterizar parcialmente os polipeptídeos classificando-os como integrantes de albuminas, globulinas e glutelinas, respectivamente (Osborne, 1895; citado por Larkins, 1981). Pelo fato de se extrair as frações solúveis sequencialmente neste método, é possível que uma fração seja contaminada pela fração anterior. Por este motivo, em nossos resultados, foi observado um mesmo polipeptídeo em frações subsequentes (fig. 7). Larkins (1981), cita que muitos problemas têm sido associados com o método de Osborne, tais como múltipla solubilidade das proteínas; associação das proteínas com carboidratos e lipídios; e solubilidade alterada devido ao processo de extração. No entanto, este método é largamente utilizado para caracterizar proteínas de acordo com suas solubilidades.

Os resultados de nossa extração indicam como integrantes das albuminas, os polipeptídeos com 17 e 53 kD e das globulinas, os polipeptídeos com 28 e entre 54 e 66 kD. A partir desta classificação, pode-se deduzir que estes polipeptídeos sejam integrantes de proteínas de reserva devido: 1- ao fato das globulinas e, em menor extensão, albuminas serem as principais proteínas de reserva em leguminosas (Larkins, 1981); 2 - a degradação destes polipeptídeos no início da germinação (fig. 4 e 5); 3 - a presença dos polipeptídeos entre 54 e 66 kD também em cotilédones, já que em dicotiledôneas, a estocagem de globulinas ocorre em embriões e cotilédones (Higgins, 1984); e 4 - a possível correlação entre o acúmulo e desaparecimento do polipeptídeo com 28 kD e a atividade sequencial de diferentes proteases durante o início da germinação (Shutov e Vaintraub, 1987). Em relação aos polipeptídeos integrantes das glutelinas, pode-se deduzir que fazem parte de proteínas constitutivas, uma vez que não são mobilizados.

5.3 ATIVIDADE DE PROTEASES EM COTILÉDONES

Shutov e Vaintraub (1987) propõem um modelo para o mecanismo de hidrólise das proteínas de reserva em sementes. De acordo com estes pesquisadores, endopeptidases, denominadas Proteinases A, são sintetizadas *de novo* durante o início da germinação e hidrolisam parcialmente as proteínas de reserva, gerando sítios para ação de outras endopeptidases;

denominadas Proteinases B, também sintetizadas *de novo* durante a germinação e que são inativas contra as proteínas nativas. O aumento da atividade desta protease é paralelo ao aumento da atividade da proteinase A. A ação conjunta destas proteases expõe terminais carboxila que podem ser atacados por carboxipeptidases, sintetizadas *de novo* ou presentes na semente seca. A atividade desta protease, em conjunto com as proteinases A e B, geram di- e tripeptídios que são finalmente degradados a aminoácidos por amino- e dipeptidases, presentes na semente seca.

Limitado às análises realizadas, não foi possível determinar os tipos de proteases envolvidas na hidrólise das proteínas de reserva em cotilédones de *A. peregrina*. No entanto, nossos resultados indicam que o acúmulo e a degradação do polipeptídeo com 28 kD pode estar relacionado à atividade de diferentes proteases. Foram detectadas bandas de atividade que correspondem, de acordo com a mobilidade, aparentemente a diferentes proteases; porém, não foi observado aumento do número destas bandas de atividade ao longo do processo proteolítico (fig. 10). Estes resultados não sugerem um padrão de atividade temporal completo. Barros e Larkins (1990) encontraram, em endosperma de milho, várias proteinases que surgem ao longo de 10 dias após a germinação, algumas com mínimas diferenças de mobilidade entre si, possivelmente isoenzimas. Estas proteases foram identificadas, de acordo com a ativação e/ou inibição do sítio ativo, como cisteíno-proteinases devido ao aumento da atividade na presença de β -Me e ao não bloqueio por PMSF (inibidor de serino-proteinases); e também à massa molecular (26 a 33 kD) e à alta mobilidade eletroforética em condições não desnaturantes, indicando natureza ácida. Wrobel e Jones (1992) encontraram resultados semelhantes em cevada, onde observaram um padrão temporal na atividade de 7 endoproteinases; 4 cisteíno- e 3 aspartato-proteinases (inibidas por pepstatina). Estas características estão de acordo com o modelo proposto por Shutov e Vaintraub (1987), onde as endoproteinases A e B são cisteíno-proteinases de pouca massa molecular, que seguidas das carboxi-, di- e tripeptidases têm suas atividades reguladas temporalmente. Em nossos ensaios, não foi analisada a atividade na presença de ativadores ou inibidores para determinar o sítio ativo das proteases envolvidas. No entanto, as proteases, que migraram aparentemente como uma única banda de atividade, apresentaram baixa mobilidade eletroforética, como observado pelo excessivo período de migração no campo elétrico (3,5 horas). A adição de SDS não alterou muito a mobilidade, indicando que a baixa mobilidade pode ser devido a alta massa molecular. A indicação de alto peso molecular e a aparente migração como uma única banda de atividade são indícios que remetem estas proteases ao grupo dos

Proteossomas. Estes proteossomas são complexos proteolíticos multicalcíficos com massa molecular entre 600 e 900 kD (Callis, 1995) e migram em PAGE como uma única banda de proteína (Orłowski, 1990 e Ozaki et al., 1992). No entanto, os proteossomas são encontrados no citoplasma e núcleo celulares, mostram atividade máxima em pH neutro a alcalino e sua atividade é dependente de ATP (Orłowski, 1990; Rechsteiner, Hoffman e Dubiel, 1993; Rivett, 1993; Fujinami et al., 1994 e Callis, 1995). O estudo com proteossomas é recente e têm sido isolados de arqueobactérias, levedura e eucariotos. Em plantas superiores, foram isolados de folhas de espinafre (Ozaki et al., 1992 e Fujinami et al., 1994), mas não há referências à presença em sementes.

5.4 ABA, MOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E GERMINAÇÃO

O regulador de crescimento ABA exerce um papel fundamental no controle da maturação do embrião e no impedimento da germinação precoce. Seu efeito é duplo. Primeiro por impedir a expressão de genes específicos para a germinação, notadamente aqueles que codificam para hidrolases na presença de GA_3 (Fincher, 1989). Por exemplo, em aleurona de cevada, ABA inibe o acúmulo de todos mRNA induzidos por GA_3 , principalmente para α -amilase (Jacobsen e Beach, 1985) e inibe inclusive a atividade e secreção de proteases (Hamerton e Ho, 1986). Segundo, por induzir a expressão de genes embriogênicos que codificam para proteínas de reserva e para proteínas bloqueadoras de hidrolases (Fincher, 1989; Hetherington e Quatrano, 1991). ABA induz a síntese de globulinas em embriões de milho (Rivin e Grudt, 1991; Paiva e Kriz, 1994); de trigo (Williamson e Quatrano, 1988); de *Brassica napus* (Higgins, 1984; Finkelstein et al, 1985); e em sementes de feijão (Higgins, 1984). Além destes, segundo Nolan e Ho (1988), ABA induz a síntese de um possível inibidor de proteases em aleurona de cevada, a qual é suprimida por GA_3 . Em resumo, ABA pode modular a maturação dos embriões e o processo germinativo, regulando a transcrição e atividade enzimáticas, e induzindo a síntese de proteínas de reserva.

Nossos resultados indicam um bloqueio na degradação das proteínas de reserva em cotilédones pelo ABA (fig. 8), provavelmente através da inibição da atividade de proteases (fig. 10 - b). O início da degradação coincide com o início da atividade aos 8 dias. Barros e Larkins (1990) atribuem ao início da atividade de um grupo de proteases, o início da degradação de zeínas. No entanto, limitado às análises realizadas, não foi possível determinar em qual nível

regulatório ocorre a inibição da atividade de proteases em *A. peregrina*. De nossos resultados, infere-se que esta atividade, e conseqüentemente, a proteólise das reservas, não foram fundamentais para o início da germinação em sementes inteiras. A presença de ABA retardou a germinação por 2 dias em relação ao controle e GA₃. 100% das sementes viáveis germinaram aos 4 e 2 dias, em ABA e no controle ou GA₃, respectivamente; GA₃ não aumentou a germinação (dados não mostrados). No controle e na presença de GA₃, o início da atividade enzimática e o início da degradação protéica coincidem aos 100% de germinação em 2 dias, mas na presença de ABA, 100% de germinação ocorre aos 4 dias, enquanto o início da atividade enzimática e o início da degradação protéica ocorrem aos 8 dias. É possível que os aminoácidos translocados para a síntese protéica, necessária para o desenvolvimento inicial do eixo embrionário, sejam provenientes do estoque de aminoácidos presente na semente seca (Callis, 1995). Este resultado sugere que o ABA exerce um efeito duplo nesta espécie, afetando a germinação e atividade enzimática independentemente. Este regulador pode ter afetado a germinação diminuindo a extensibilidade da parede celulósica e conseqüentemente, aumentando o turgor necessário para a divisão celular (Hetherington e Quatrano, 1991). A liberação da germinação após 2 dias pode estar relacionada a uma fase "lag", sugerida por Van Beckum, Libbenga e Wang (1993), na qual o embrião se reprograma para germinar após "liberação" do ABA endógeno; no entanto, os embriões de cevada com os quais trabalham, "liberados" para germinar após 2 dias, ficaram continuamente na presença de ABA, como no nosso ensaio. Porém, o ABA é metabolizado pela célula vegetal e um estado-contínuo de sua concentração endógena pode ter sido estabelecido (Zeevaart e Creelman, 1988) e suprimido por uma provável síntese de giberelinas pelo embrião (Fincher, 1989). Deste modo, parece que a atividade das proteases foi afetada diretamente pelo ABA, em qualquer que seja o nível regulatório, e não pelo atraso da germinação.

Em embriões, nossos resultados indicam um bloqueio da degradação das proteínas de reserva pelo ABA (fig. 5 -a). A atividade de proteases em embriões foi detectada em 24 horas apenas no controle (dados não mostrados); porém, a degradação das proteínas de reserva foi bloqueada em 6 horas pelo ABA. É possível que a não-deteção de atividade nas horas iniciais, esteja relacionada com a menor quantidade de proteínas nos embriões em comparação aos cotilédones. Em relativo desacordo com nossos dados, Borges, Novais e Borges (1990) não encontraram nenhuma diferença no perfil protéico de embriões de *A. peregrina* sob tratamento de ABA em várias concentrações, durante até 12 horas; e observaram um aumento na porcentagem

de germinação de sementes sob tratamento de ABA. No entanto, estes pesquisadores isolaram os embriões após o período de incubação das sementes na presença de ABA e segundo Mayer e Shain (1974), a resposta dos embriões aos reguladores pode ser diversa entre sementes inteiras e embriões isolados. O aumento na porcentagem de germinação observada por Borges, Novais e Borges (1990), pode estar relacionado a baixa concentração de ABA utilizada (1 μ M). Zeevaart e Creelman (1988) citam dados relativos ao estímulo de crescimento de raiz por baixas concentrações de ABA; como também inibição por altas concentrações. No entanto, estes efeitos estimulatórios são dependentes de outros fatores e os últimos autores os relacionam à adaptação de plantas, possibilitada pelo ABA, à deficiência hídrica.

5.5 BALANÇO ENTRE ABA E GA₃

A maioria dos dados disponíveis sobre os efeitos entre ABA e giberelinas ao nível bioquímico, são provenientes do sistema da síntese de α -amilase pelo aleurona de cevada. Em aleurona de cevada, o ABA é relatado como completo antagonizador da ação do GA₃, não só na síntese de α -amilase como também na expressão gênica total (Jacobsen e Beach, 1985; Nolan e Ho, 1988). Este antagonismo é dependente das concentrações de ambos reguladores, tanto no aleurona como em embriões isolados. A síntese de α -amilase, assim como seus níveis de mRNA, decresce de acordo com o aumento na concentração de ABA (Nolan e Ho, 1988), bem como a porcentagem de germinação de embriões isolados varia de acordo com as concentrações de ABA e GA₃ (Van Beckum, Libbenga e Wang, 1993). Apesar do estabelecimento destes dados na literatura, Fincher (1989) pondera que o padrão de sensibilidade para giberelinas tem sido a camada de aleurona de cevada do cultivar Himalaia, usualmente de grãos provenientes de colheitas selecionadas, cultivadas em locais específicos. Nestes aleuronas, grande quantidade de α -amilase é secretada apenas com adição de GA₃ e pouca ou nenhuma na sua ausência. No entanto esta resposta não é típica. Aleuronas de outros cereais, e mesmo de outros cultivares de cevada, são relativamente insensíveis à aplicação exógena de GA₃ (Fincher, 1989).

De acordo com nossos resultados, GA₃ não inibe o efeito do ABA em embriões, como observado no perfil protéico entre embriões sob tratamento de ABA e ABA + GA₃ (fig. 5 - a e c), onde observou-se o bloqueio da degradação das proteínas de reserva em ambos os tratamentos. No entanto, nossos resultados mostram que a degradação de um polipeptídeo com massa molecular aproximada de 17 kD foi bloqueada por GA₃ (figs. 4 e 5 - b). Este

polipeptídeo, uma albumina em nossa classificação, foi degradado em 6 horas nos embriões-controle e na presença de ABA e/ou GA_3 esta degradação foi bloqueada (fig. 4). Se este polipeptídeo é um possível integrante de uma proteína de reserva, GA_3 não deveria suprimir sua degradação como ocorre na presença de ABA. Nolan e Ho (1988), trabalhando com aleurona de cevada, encontraram mRNAs que têm sua transcrição suprimida por GA_3 e induzida por ABA, e sugerem que a supressão de certos genes por Giberelinas, faz parte do mecanismo de ação deste regulador na indução à germinação. Van Beckum, Libbenga e Wang (1993) observaram que um gene que responde ao ABA (*Rab*) não é suprimido por GA_3 , e sugerem que este gene não faz parte do processo germinativo. No entanto, parece contraditório que a não-degradação induzida por GA_3 , do polipeptídeo com 17 kD, esteja relacionada com a supressão de alguma protease, já que GA_3 aparentemente não afetou a atividade de proteases em cotilédones; ou com a não-supressão de algum *Rab*, já que o polipeptídeo está presente no embrião seco, é degradado na ausência de ABA, e possivelmente não é sintetizado através da indução por ABA (fig. 6).

Em cotilédones, houve um efeito inverso ao observado em embriões. Para as mesmas concentrações de ABA e GA_3 , GA_3 inibiu o efeito do ABA, ou seja, a degradação das proteínas de reserva ocorreu de modo semelhante ao controle, tanto em GA_3 como em ABA + GA_3 (fig. 8). Novamente, a degradação parece estar relacionada à atividade de proteases, onde a atividade foi inibida por ABA, não inibida por GA_3 e parcialmente inibida por ABA + GA_3 (fig. 10). Resultados similares foram obtidos por Hammerton e Ho (1986) que observaram atividade de proteases em aleurona de cevada, sob tratamento de $1\mu M$ de GA_3 ou $1\mu M$ de GA_3 + $100\mu M$ de ABA, no entanto, na ausência de ABA e/ou GA_3 , a atividade não foi detectada e sugerem uma síntese *de novo* por GA_3 . Não há dados específicos na literatura que expliquem esta inversão em *A. peregrina*; no entanto, Torrent, Gelli e Ludevid (1989) observaram que ocorre degradação protéica em endosperma de milho sem o embrião e argumentaram sobre a possibilidade do endosperma da semente madura ter um acúmulo de giberelinas capaz de induzir a síntese de proteases. Segundo Graebe (1987), sementes imaturas geralmente contém níveis de giberelinas não encontrados em nenhum outro órgão. Harvey e Oaks (1974) analisaram a quantidade de nitrogênio liberada durante a germinação de diferentes híbridos de milho e em milho-anão (deficiente em giberelinas endógenas) e concluíram que o endosperma responde ao GA_3 , mas concentrações endógenas são suficientes para máxima atividade hidrolítica. No nosso caso, supõe-se que a adição de GA_3 tenha elevado a concentração de giberelinas endógenas de modo

que a concentração total alcançada tenha suprimido a ação do ABA. Jacobsen e Beach (1985) relatam que um excesso de ABA 25 vezes maior que GA₃ inibe o acúmulo de α -amilase durante até 48 horas, sendo que após este período, cessa esta inibição pelo ABA.

5.6 CONTROLE DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS PELO ABA

De acordo com nossos resultados em SDS-PAGE com embriões, todos polipeptídeos estudados estiveram sob processo proteolítico e nenhum sob processo de síntese, tanto na presença como na ausência de ABA e/ou GA₃. A adição de ABA após o início da germinação não impede o processo proteolítico em andamento, bem como não é capaz de induzir síntese protéica (fig. 6). Isto sugere que ABA não pode induzir a dormência (Khan e Andreoli, 1992). No entanto, é possível que a análise em géis bi-dimensionais revele algum polipeptídeo, possivelmente integrante das globulinas (Paiva e Kriz, 1994); como também é possível que o tecido embrionário das sementes maduras e não-dormentes de *A. peregrina* tenha reduzida sensibilidade ao ABA após o início do processo germinativo. Embriões maduros de alfafa (Xu e Bewley, 1991) e de *B. napus* (Finkelstein et al, 1985), têm completa insensibilidade ao ABA, medida em relação a doses de ABA cada vez maiores para inibir a germinação, bem como em relação à síntese de proteínas específicas. Em milho, ABA inibe a germinação de embriões maduros (Rivin e Grudt, 1991), mas mRNAs para globulinas foram detectados em embriões incubados em ABA após o início da germinação (Paiva e Kriz, 1994). O fato de *A. peregrina* possuir sementes não-dormentes, também pode estar relacionado à insensibilidade ao ABA. Van Beckum, Libbenga e Wang (1993) estudaram a germinação de embriões isogênicos provenientes de sementes dormentes e não-dormentes de cevada, ambas adquiridas através da maturação de sementes de uma mesma linhagem, sob condições de dia-curto e dia-longo, respectivamente. Seus estudos mostram que a inibição da germinação pelo ABA é dependente da concentração de ABA exógeno, e que embriões de sementes dormentes são mais sensíveis ao ABA, quanto a inibição da germinação, do que os embriões de sementes não-dormentes.

No entanto, em cotilédones sob tratamento de ABA, foi observado a presença de polipeptídeos com massa molecular acima de 66 kD até o 6º dia de incubação (fig. 8), a partir do qual estes polipeptídeos desaparecem coincidentemente ao início da atividade de proteases. Nossos resultados mostram que alguns destes polipeptídeos estão presentes, com pouca intensidade, na semente seca. Porém, na presença de ABA, observa-se um aumento na intensidade

destes polipeptídeos, bem como o surgimento de novos polipeptídeos. Este resultado está de acordo com a literatura em relação a capacidade do ABA em induzir a síntese de proteínas, já discutida neste estudo. No entanto, não foi determinada a natureza destes polipeptídeos; se integrantes de globulinas de reserva como em outras dicotiledôneas ou integrantes de inibidores de proteases.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com *A. peregrina* revelam a importância de aprofundar os estudos com espécies selvagens, pelo menos no que se refere ao antagonismo entre ABA e GA₃ no controle da germinação. O comportamento contraditório do polipeptídeo-17 kD em relação a estes reguladores, demonstra que os efeitos destes reguladores podem divergir do que é relatado para espécies cultivadas. No entanto, este é um resultado isolado, e análises mais específicas devem ser realizadas para confirmar se esta relação é direta. Em relação à mobilização protéica como um todo, os dados obtidos não divergem significativamente dos dados disponíveis na literatura, porém, não foi demonstrado claramente em embriões, que o bloqueio da atividade proteolítica esteja relacionado ao bloqueio da atividade enzimática, como foi demonstrado em cotilédones.

Em relação às proteases encontradas nos cotilédones, novamente revela-se a importância de estudos com estas espécies. Nossos resultados apontam indícios destas proteases pertencerem ao grupo dos Proteossomas, que fogem ao modelo Shutov-Vaintraub. No entanto, novas análises devem ser realizadas para confirmar se estes indícios são positivos, como exemplo, determinar a massa molecular destas proteases, testar a atividade sob inibidores e confirmar se realmente trata-se de uma única banda de atividade sem regulação temporal. Mesmo que estes indícios sejam confirmados, análises mais específicas devem ser continuadas para incluir ou não estas proteases no grupo dos Proteossomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. The Leguminosae - A source book of characteristics, uses and nodulation. U.S.A: Wisconsin Press, 1981. 813 p.
- ASAHI, M.; LINDQUIST, R.; FUKUYAMA, K.; APODACA, G.; EPSTEIN, W. L.; McKERROW, H. Purification and characterization of major extracellular proteinases from Tricophytum rubrum. Biochemistry Journal, Washington, v. 232, p. 139-144, 1985.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. "Official Methods of Analysis". 15° ed. Washington, 1984. 1094p.
- BARROS, E. G.; LARKINS, B. A. Purification and characterization of zein-degrading proteases from endosperm of germinating maize seeds. Plant Physiology, Rockville, v. 94, p. 297-303, 1990.
- BERNHARDT, D.; KOPKE, T.; VOIGT, B. Differences in patterns of newly synthesized proteins in imbibing embryos of after-ripened and aged seeds of Agrostemma githago and comparison of protein synthesis in vivo and in vitro. Journal of Experimental Botany, London, v. 44, n. 259, p. 415-418, Feb.1993.
- BORGES, E. E. L.; NOVAIS, A. B.; BORGES, R. C. G. Controle da germinação de sementes de Angico vermelho (Piptadenia peregrina) pelo ácido abscísico. Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v.12, n. 2, p. 9-16, 1990.
- BRAY, E. A.; BEACHY, R. N. Regulation by ABA of β -conglycinin expression in cultured developing soybean cotyledons. Plant Physiology, Rockville, v. 79, p. 746-750, 1985.
- CALLIS, J. Regulation of Protein Degradation. The Plant Cell, Rockville, v. 7, p. 845-857, July 1995.

- CASEY, R.; DOMONEY, C. The Structure of Plant Storage Protein Genes. Plant Molecular Biology Reporter, The Hague, v. 5, n. 2, p.261-281, 1987.
- CHEUNG, W. Y. Calmodulin Plays a Pivotal Role in Cellular Regulation. Science, Washington, v. 207, p. 19-27, 1980.
- CREELMAN, R. A. Abscisic Acid Physiology and Biosynthesis in Higher Plants. Physiologia Plantarum, Copenhage, v. 75, p. 131-136, 1989.
- CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York: Columbia Univ. Press, 1981. 1262 p.
- EL-HADRAMI, L.; CARRON, M. P.; D'AUZAC, J. Influence of exogenous hormones on somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. Annals of Botany, New York, v. 67, n. 6, p. 511-515, 1991.
- FINCHER, G. B. Molecular and Cellular Biology Associated with Endosperm Mobilization in Germinating Cereal Grains. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, Palo Alto., v. 40, p. 305-346, 1989.
- FINKELSTEIN, R.; TENBARGE, K. M.; SHUMWAY, J.E.; CROUCH, M. L. Role of ABA in maturation of rapessed embryos. Plant Physiology, Rockville, v. 78, p. 630-636, 1985.
- FUJINAMI, K. et al. Purification and characterization of the 26 S Proteasome from spinach leaves. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 269, n. 41, p. 25905-25910, Oct. 1994.
- GRAEBE, J. E. Gibberellin Biosynthesis and Control. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, v. 38, p. 419-465, 1987.
- HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. (ed.). Gel Electrophoresis of Proteins - A Practical Approach. 2° ed. U.K.: Oxford Univ. Press, 1990. 383 p.
- HAMMERTON, R. W.; HO, T-H. D. Hormonal regulation of the development of protease and carboxipeptidase activities in barley aleurone layers. Plant Physiology, Rockville, v. 80, p. 692-697, 1986.
- HARVEY, B. M. R.; OAKS, A. The role of gibberellic acid in the hydrolysis of endosperm reserves in *Zea mays*. Planta, New York, v. 121, p. 67-74, 1974.
- HEPLER, P. K.; WAYNE, R. O. Calcium and Plant Development. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, v. 36, p. 397-439, 1985.
- HETHERINGTON, P. R.; LAIDMAN, D. L. Influence of gibberellic acid and *Rht3* gene on choline and phospholipid metabolism in wheat aleurone tissue. Journal of Experimental Botany, London, v. 42, n. 244, p. 1357-1362, Nov. 1991.

- HETHERINGTON, A. M.; QUATRANO, R. S. Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. New Phytologist, Cambridge, v. 119, p. 9-32, 1991.
- HOLBROOK, L. A.; van ROOIJEN, G.J.H.; WILLEN, R.W.; MOLONEY, M. M. Oilbody proteins in microspore-derived embryos of *Brassica napus*. Plant Physiology, Rockville, v. 97, p. 1051-1058, 1991.
- HIGGINS, T.J. Synthesis and Regulation of Major Proteins in Seeds. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, v. 35, p.191-221, 1984.
- HIGGINS, T.J.; ZWAR, J.A.; JACOBSEN, J. V. Gibberillic acid enhances the level of translatable mRNA for α -amylase in barley aleurone layers. Nature, U.S.A., v.260, p. 166-168, Mar. 1976.
- JACOBSEN, J. V.; BEACH, L. R. Control of transcription of α -amylase and rRNA genes in barley aleurone protoplasts by gibberellin and abscisic acid. Nature, London, v. 316, p. 276-277, July 1985.
- JACOBSEN, J.V.; VARNER, J. E. Gibberellic acid - induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley. Plant Physiology, Rockville, v. 42, p. 1596-1600, 1967.
- KHAN, A. A. (ed.) The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. Amsterdam: Elsevier, 1977. 435p.
- KHAN, A. A.; ANDREOLI, C. Hormonal Control of Seed Dormancy and Germination under Stressful and Nonsstressful Conditions. In: International Workshop on Seeds, 4, France, 1992. Fourth...France, 1992. v. 2, p. 625-632.
- KOHLER, S. M.; HO, T-H. D. Hormonal Regulation, Processing, and Secretion of Cysteine Proteinases in Barley Aleurone Layers. The Plant Cell, Rockville, v. 2, p. 769-783, Aug. 1990.
- KURTEN, U.; NUUTILA, A. M. ; KAUPPINEN, V.; ROUSI, M. Somatic embryogenesis in cell culture of birch (*Betula pendula*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, The Hague, v.23, n. 2, p. 101-105, 1990.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAMBARDI, M.; SHARMA, K. K.; THORPE, T. A. In vivo regeneration of shoot buds and planted formation from mature embryos of *Pinus halepensis*. Acta Horticulturae, La Plata, v. 289, p. 123-124, 1991.
- LARKINS, B. A. Seed Storage Proteins: Characterization and Biosynthesis. In: The Biochemistry of Plants, v. 6, 1981, p. 449-489.
- LIU, W.; HILDEBRAND, D. F.; GRAYBURN, W. S.; PHILLIPS, G. C.; COLLINS, G. B. Effects of exogenous auxins on expression of lipooxygenases in cultured soybean embryos. Plant Physiology, Rockville, v. 97, p. 969-976, 1991.

- MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. The Germination of Seeds. 4. ed. U.K.: Pergamon Press, 1989. 270p.
- MAYER, A. M.; SHAIN, Y. Control of Seed Germination. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, v. 25, p. 167-193, 1974.
- McAINSH, M.R.; BROWNLEE, C.; HETHERINGTON, A. M. Abscisic acid-induced elevation guard cell cytosolic Ca^{++} preceds stomatal closure. Nature, London, v.343, p.186-187, Jan.1990
- McAINSH, M.R.; BROWNLEE, C.; HETHERINGTON, A. M. Visualising changes in cytosolic-free- Ca^{++} during the response of stomatal guard cells to abscisic acid. The Plant Cell, Rockville, v. 4, p. 1113-1122, 1992.
- MERKLE, S. A.; WIECKE, A. T. Regeneration of *Robinia pseudocacia* via somatic embryogenesis. Canadian Journal of Forest Research, Ottawa, v. 19, n. 2, p. 285-288, 1989.
- MERKLE, S. A., WIECKO, A. T.; WATSON-PAULEY, B. A. Somatic embryogenesis in american chestnut. Canadian Journal of Forest Research, Ottawa, v. 21, n. 11, p. 1698-1701, 1991.
- MILLERD, A. Biochemistry of Legume Seed Proteins. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, v. 26, p. 53-72, 1975.
- NEILL, S. J.; BURNETT, E.; HEY, S.; KNOX, J. P.; WANG, M. The Molecular and Cell Biology of Abscisic Acid Action in Stomatal Guard Cells. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 5, Lavras, 1995. Anais...Lavras: UFLA, 1995. p.119-133
- NOLAN, R. C.; HO, T-H. D. Hormonal regulation of gene expression in barley aleurone layers. Planta, New York, v. 192, p. 332-339, 1988.
- OISHI, M. Y.; BEWLEY, J. D. Premature drying, fluridone-treatment, and embryo isolation during development of maize kernels (*Zea mays* L.) induce germination but the protein synthetic responses are different. Potential regulation of germination and protein synthesis by abscisic acid. Journal of Experimental Botany, London, v. 43, n. 251, p. 759-767, June 1992.
- ORLOWSKI, M. The Multicatalytic Proteinase Complex, a Major Extralysosomal Proteolytic System. Biochemistry, Washington, v. 29, n. 45, p. 10289-10297, Nov. 1990.
- OZAKI, M.; FUJINAMI, K.; TANAKA, K.; AMEMIYA, Y.; SATO, T.; OGURA, N.; NAKAGAWA, H. Purification and initial characterization of the Proteasome from the higher plant *Spinacia oleracea*. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 267, n. 30, p. 21678-21684, Oct. 1992.
- PAIVA, R.; KRIZ, A. L. Effect of abscisic acid on embryo-specific gene expression during normal and precocious germination in normal and viviparous maize (*Zea mays*) embryos. Planta, New York, v. 192, p. 332-339, 1994.
- PROMEGA. Protein guide - Tips and Techniques. U.S.A.: Promega Corp., 1993. 87p.

- QI, X.; Wilson, K. A.; TAN-WILSON, A. L. Characterization of the major protease involved in the soybean β -conglycinin storage protein mobilization. Plant Physiology, Rockville, v. 99, p. 725-733, 1992.
- RAGHAVAN, V. Gene activity during germination of spores of the fern, *Onoclea sensibilis*: RNA and protein synthesis and the role of stored mRNA. Journal of Experimental Botany, London, v. 42, n. 235, p. 251-260, 1991.
- RECHSTEINER, M.; HOFFMAN, L.; DUBIEL, W. The Multicatalytic and 26 S Proteases. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 268, n. 9, p. 6065-6068, Mar. 1993.
- REYNERT, J.; YEOMAN, M. M. Plant Cell and Tissue Culture- A laboratory Manual. Berlin: Springer-Verlag, 1982. 83p.
- RIVETT, A. J. Proteasomes: Multicatalytic Proteinase Complexes. Biochemistry Journal, London, v. 291, p. 1-10, 1993.
- RIVIN, C. J.; GRUDT, T. Abscisic acid and the developmental regulation of embryo storage proteins in maize. Plant Physiology, Rockville, v. 95, p. 358-365, 1991.
- ROBERTS, J. A.; HOOLEY, R. Plant Growth Regulators. U.K.: Blackie, 1988. 190 p.
- ROMANOV, G. A. Hormone-binding Proteins of Plants and the Problem of Reception of Phytohormones. Fiziologiya Rastenij, URSS, v. 36, n. 1, p. 166-177, 1989.
- RYAN, C. A. Proteolytic Enzymes and their Inhibitors in Plants. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, v. 24, p. 173-196, 1973.
- SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. The Plant Cell, Rockville, v. 7, p. 945-956, July 1995.
- SHOTWELL, M. A.; LARKINS, B. A. The Biochemistry and Molecular Biology of Seed Storage Proteins. In: The Biochemistry of Plants, v. 15, 1989, p. 297-345.
- SHUTOV, A. D.; VAINTRAUB, I.A. Degradation of Storage Proteins in Germinating Seeds. Phytochemistry, Elmsford, v. 26, n. 6, p. 1557-1566, 1987.
- SILVA, D.J. Análise de alimentos (Métodos Químicos e Biológicos). Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1981. 166p.
- SINGH, S.; SAWHNEY, V. K. Endogenous hormones in seeds germination behavior and early seedling characteristics in a normal and *ogura* cytoplasmic male sterile line of rapeseed (*Brassica napus* L.). Journal of Experimental Botany, London, v. 43, n. 256, p. 1497-1505, 1992.
- SKRIVER, K.; MUNDY, J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. The Plant Cell, Rockville, v. 2, p. 503-512, 1990.

- TORRENT, M.; GELLI, M. I.; LUDEVID, M. D. Storage-proteins hidrolisis and protein-body breakdown in germinated *Zea mays* L. seeds. Planta, New York, v. 180, p. 90-95, 1989.
- Van BECKUM, J. M. M.; LIBBENGA, K. R.; WANG, M. Abscisic acid and gibberellic acid-regulated responses of embryos and aleurone layers isolated from dormant and nondormant barley grains. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 89, p. 483-489, 1993.
- Van der VEEN, R. HEIMOVAARA-DIJKSTRA, S.; WANG, M. Cytosolic alkalinisation mediated by abscisic acid is necessary, but not sufficient, for abscisic acid-induced gene expression in barley aleurone protoplasts. Plant Physiology, Rockville, v. 100, p. 699-705, 1992.
- WALLACE, J. C.; LOPES, M. A.; PAIVA, E.; LARKINS, B. A. New methods for quantification of zeins reveal a high content of γ -zein in modified *opaque-2* maize. Plant Physiology, Rockville, v. 92, p. 191-196, 1990.
- WALTON, D. C. Biochemistry and Physiology of Abscisic Acid. Annual Review of Plant Physiology, Rockville, v. 31, p. 453-489, 1980.
- WANG, M.; HEIMOVAARA-DIJKSTRA, S.; Van der MEULEN, R. M.; KNOX, J. P.; NEILL, S. J. The monoclonal antibody JIM19 modulates abscisic acid action in barley aleurone protoplasts. Planta, New York, v. 196, p. 271-276, 1995.
- WARRAG, E.; LESNEY, M.S.; ROCKWOOD, D. J. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. Plant Cell Reports, Rockville, v. 9, n. 10, p. 586-589, 1991.
- WHITMORE, F. W. Stored messenger RNA and stratification in eastern white pine (*Pinus strobus* L.). Seed Science and Technology, New Delhi, v. 19, p. 341-346, 1991.
- WILLIAMS, J.; BULMAN, M. P.; HUTTLY, A.; PHILLIPS, A.; NEILL, S. Characterization of a cDNA from *Arabidopsis thaliana* encoding a potential thiol protease whose expression is induced independently by wilting and abscisic acid. Plant Molecular Biology, Belgium, v. 25, p. 259-270, 1994.
- WILLIAMS, J.; BULMAN, M. P.; NEILL, S. Wilt-induced ABA biosynthesis, gene expression and down-regulation of *rbcS* mRNA levels in *Arabidopsis thaliana*. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 91, p. 177-182, 1994.
- WILLIAMSON, J. D.; QUATRANO, R. ABA-regulation of Embryo-specific sequences in mature wheat embryos. Plant Physiology, Rockville, v. 86, p. 208-215, 1988.
- WROBEL, R.; JONES, B. L. Appearance of endoproteolytic enzymes during the germination of barley. Plant Physiology, Rockville, v. 100, p. 1508-1516, 1992.
- XU, N.; BEWLEY, J. D. Sensitivity to abscisic acid and osmoticum changes during embryogenesis of alfafa (*Medicago Sativa*). Journal of Experimental Botany, London, v. 42, n. 239, p. 821-826, June 1991.

- YEOMAN, M. M.; MacLEOD, A. J. Tissue (callus) culture-techniques. In: STREET, H. E. (ed.). Plant tissue and cell culture. Berkeley: Univ. of California Press, 1977. p. 31-59.
- ZEEVAART, J. A. D. Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 39. v. 439-473, 1988.
- ZWICKL, P.; GRZIWA, A.; PÜHLER, G.; DAHLMANN, B.; LOTTSPREICH, F.; BAUMEISTER, W. Primary structure of the *Thermoplasma* Proteasome and its implications for the structure, function and evolution of the Multicatalytic Proteinase. Biochemistry, Washington, v. 31, p. 964-972, 1992.