



**Universidade de Brasília –UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Botânica**

**Efeitos de diferentes métodos de quebra da dormência no
perfil protéico de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.)**

Janayna Dantas Pinheiro

**Brasília -DF
Maio 2006**

Efeitos de diferentes métodos de quebra da dormência no perfil protéico de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.)

Janayna Dantas Pinheiro

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Botânica .

Aluna: Janayna Dantas Pinheiro

Orientador: Prof. Dr. Fabian Borghetti

Brasília -DF
Maio 2006

P654 Pinheiro, Janayna Dantas.

Efeitos de diferentes métodos de quebra da dormência no perfil protéico de embriões de girassol (*Helianthus annuus L.*) / Janayna Dantas Pinheiro ; Fabian Borghetti (orientador). – Brasília, 2006. vi, 57 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica.

1. Quebra dormência. 2. embriões de girassol. 3. *Helianthus annuus L.* 4. germinação.

I. Borghetti, Fabian. II. Título.

CDU 581.142:633.854.78

Dedico a todos e especialmente aos meus pais, **Pedro Ataíde e Maria de Jesus** por terem acreditado nos meus sonhos, e ainda mais por ter me ajudado a transforma-los em realidade.

“Quando você muda seu modo de pensar,
mudam suas crenças;
Quando você muda suas crenças,
mudam as suas expectativas, muda a sua atitude;
Quando você muda a sua atitude,
muda seu comportamento;
Quando você muda seu comportamento,
muda seu desempenho;
Quando você muda seu desempenho,
VOCÊ MUDA SUA VIDA.”
(Autor não identificado apud Luz, 2002, p. 34)

Efeitos de diferentes métodos de quebra da dormência no perfil protéico de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.)

Janayna Dantas Pinheiro

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Botânica, e aprovada em sua forma final pelo programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr.º Fabian Borghetti
Departamento de Botânica, UnB
(Orientador)

Dr.º César Martins de Sá
Departamento de Biologia Celular, UnB
(membro titular)

Dr^a Mirian Therezinha Souza da Eira
EMBRAPA / CENARGEM
(membro externo)

Dr.º Augusto César Franco
Departamento de Botânica, UnB
(Suplente)

Índice de Assuntos

Banca Examinadora	i
Índices de assuntos.....	ii
Índices de tabelas	iv
Índice de figuras.....	v
Agradecimentos	01
Resumo	04
Abstract.....	05
1 Introdução	07
2 Objetivos	08
3 Revisão bibliográfica	08
3.1 Dormência e Germinação.....	08
3.2 Fitormônios e o controle da germinação.....	09
3.3 Interação entre as vias de transdução de sinais dos fitormônios.....	11
3.4 Participação de proteínas no controle da dormência por fitormônios.....	12
3.5 Temperatura, Dormência e Síntese de proteínas.....	13
3.6 Girassol (<i>Helianthus annuus</i>): modelo para estudos de quebra da dormência.....	14
4 Material e Métodos	15
4.1 Seleção e caracterização das sementes.....	15
4.2 Estudos de quebra de dormência.....	15
4.3 Incubação dos embriões a 30°C por diferentes tempos e posterior transferência para 10°C	16
4.4 Transferência para 30°C dos embriões não germinados a 10°C.....	16
4.5 Parâmetros de germinação	17
4.6 Análise estatística.....	18
4.7 Extração de proteínas e incorporação isotópica em embriões incubados a 10°C e 30°C.....	18
4.8 Síntese protéica nos embriões transferidos de 30°C para 10°C, e de 10°C para 30°C.....	19
4.9 Procedimentos para extração de proteínas e eletroforeses.....	20
5 Resultados e Discussão	22
5.1 Conteúdo de água dos embriões de girassol.....	22
5.2 Perfis de embebição de embriões dormentes e germinantes sob as temperaturas de 10°C e 30°C	22
5.3 Etileno e alta temperatura quebram a dormência em embriões de girassol	24
5.4 Quanto maior o tempo de incubação a 30°C, maior a germinabilidade dos embriões após transferência para 10°C	26
5.5 Germinabilidade após retorno de embriões de girassol a temperatura inicial de incubação.....	29
5.6 Perfis eletroforéticos de embriões de girassol dormentes, germinantes e germinados	32

5.6.1 Perfis eletroforéticos de embriões dormentes e germinantes	32
5.6.2 Perfil eletroforético de embriões germinados e não germinados após transferências entre temperaturas	36
6 Conclusões	44
7 Bibliografia	45
8 Anexo	50

Índice de Tabelas

Tabela 1 Conteúdo de água das amostras de embriões de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.).....	22
Tabela 2 Parâmetros médios de germinação de embriões de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.), dos lotes 2004 e 2005. Tempo médio de germinação, velocidade média de germinação, variância do tempo médio, desvio padrão da variância do tempo médio e variância da velocidade média. Dados expressos em horas. N=90 sementes por tratamento.	24
Tabela 3 Germinação de embriões de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) após transferência de 30°C para 10°C, lote 2005.....	28
Tabela 4 Parâmetros de germinação de embriões de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) após a transferência de 30°C para 10°C, lote 2005. Tempo médio de germinação, velocidade média de germinação, variância do tempo médio, desvio padrão da variância do tempo médio e variância da velocidade média. Dados expressos em horas. N=30 sementes por tratamento (controle, após 2, 4 e 6 horas) N=28 (após 8 horas) e N=22 (após 10 horas).....	31
Tabela 5 Parâmetros de germinação de embriões de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) a 30°C após 24 horas de incubação a 10°C, lote 2005. Os tratamentos se referem aos períodos de incubação a 30°C, depois da transferência a 10° C.	31
Tabela 6 Proteínas apontadas para comparações nos géis e fluorogramas das figuras 7, 8 e 9.....	35
Tabela 7 Proteínas apontadas para comparações nos géis e fluorogramas das figuras 10, 11 e 12.....	39
Tabela 8 Proteínas apontadas para comparações nos géis e fluorogramas das figuras 13, 14 e 15.....	42

Índice de Figuras

Figura 1 Embebição de água (em miligramas) de embriões de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) do lote 2004 a 10°C e 30°C. N=30 por tratamento.	23
Figura 2 Germinabilidade de embriões de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) lotes 2004 e 2005.	25
Figura 3 Distribuição da germinação de embriões de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) ao longo do tempo de incubação. Lotes 2004 e 2005 (n=90 / lote).....	26
Figura 4 Germinação de embriões de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) a 10°C após diferentes tempos de incubação a 30°C (2; 4; 6; 8 e 10 horas), e germinação de embriões de girassol a 30°C e 10°C sem mudança de temperatura. (n=90 / tratamento).....	27
Figura 5 Germinabilidade de embriões de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) a 10°C após incubação por diferentes períodos de tempo a 30°C, e germinação de embriões mantidos continuamente a 10°C e 30°C. Lote 2005.	28
Figura 6 Germinabilidade de embriões de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) após transferência de 30°C para 10°C (em verde); após esta transferência, os embriões que não germinaram a 10°C foram novamente transferidos para 30°C (em roxo). Germinabilidade dos embriões mantidos continuamente a 30°C (n=30 / tratamento).	30
Figura 7 Gel (7A) e fluorograma (7B) de amostra de embriões de girassol (65 µg), incubados por 36 horas a 10°C. Os embriões foram marcados com ³⁵ S-met 12 horas antes da extração das proteínas (embriões dormentes).	34
Figura 8 Gel (8A) e fluorograma (8B) de amostra de embriões de girassol (65 µg), incubados por 12 horas a 10°C com etileno. Os embriões foram marcados com ³⁵ S-met 6 horas antes da extração das proteínas (embriões germinantes).....	34
Figura 9 Gel (9A) e fluorograma (9B) de amostra de embriões de girassol (65 µg), incubados por 8 horas a 30°C. Os embriões foram marcados com ³⁵ S-met 6 horas antes da extração das proteínas (embriões germinantes).....	34
Figura 10 Gel (10A) e fluorograma (10B) de amostra de embriões de girassol (65 µg), incubados por 16 horas a 10°C. Os embriões foram marcados com ³⁵ S-met 8 horas antes da extração das proteínas (embriões não germinantes).....	38
Figura 11 Gel (11A) e fluorograma (11B) de amostra de embriões de girassol (65 µg) incubados a 30°C por 8 horas, e transferidos para 10°C. Após 16 horas sem germinar, foi aplicado etileno (50 µL/L) e ³⁵ S-met por 8 h antes da extração das proteínas (embriões germinados).	38
Figura 12 Gel (12A) e fluorograma (12B) de amostra de embriões de girassol (65 µg) incubados a 30°C por 8 horas, e transferidos para 10°C. Após 16 horas sem germinar,	

foi aplicado etileno e ³⁵S-met por 8 h antes da extração das proteínas (embriões não germinados).	38
Figura 13 Gel (13A) e fluorograma (13B) de amostra de embriões de girassol (65 µg) incubados a 30°C por 16 horas. Foi aplicado ³⁵ S-met 8 h antes da extração das proteínas (embriões germinados).	41
Figura 14 Gel (14A) e fluorograma (14B) de amostra de embriões de girassol (65 µg) incubados a 30° C por 8 horas, e transferidos para 10°C. Após 16 horas sem germinar, os embriões foram transferidos novamente para 30°C e aplicado ³⁵ S-met por 8 h antes da extração das proteínas (embriões germinados).	41
Figura 15 Gel (15A) e fluorograma (15B) de amostra de embriões de girassol (65 µg) incubados a 30° C por 8 horas, e transferidos para 10°C. Após 16 horas sem germinar, os embriões foram transferidos novamente para 30°C e aplicado ³⁵ S-met por 8 h antes da extração das proteínas (embriões ainda não germinados).	41

AGRADECIMENTOS

Não é simplesmente agradecer que quero. Quero trazer para dentro do meu texto aqueles que já o percorrem nas entrelinhas. E não só aos que me ajudaram efetivamente na construção dessa dissertação, pois não é tarefa fácil, mas aos meus amigos que de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão àqueles que me ajudaram, de alguma forma, no meu percurso nesses quase três anos.

Em especial, a Camila, por ter sido e por ser, antes de tudo, amiga, além de ser muitíssima interessada, crítica, sincera, parceira de bancada, de sala, de computador, e por que não também de baladas, churrascos, sushis, chops....., enfim um anjo da guarda que surgiu na minha vida quando a conheci pouco antes de passar no mestrado. Pois tenho certeza que sem o incentivo dela não teria chegado ao fim dessa (mais uma) batalha.

Ao professor e orientador Fabian Borghetti por tudo, simplesmente por tudo. Ao compromisso assumido, o empenho que colocou neste trabalho, os níveis de exigência dos desafios que me lançou e os suportes, formais e informais, que disponibilizou. A tranquilidade, cumplicidade, paciência e a sabedoria, nos momentos sérios e porque não os também de distração, pois eram neles que mais surgiam idéias e discussões sobre os experimentos. Enfim, para agradecer a aliança, a confiança e a amizade às palavras serão sempre poucas. Suas sugestões ao manuscrito levaram a sucessivas revisões do texto, cujas eventuais falhas, inteiramente responsabilidade da autora, teriam sido mais numerosas não fosse por sua crítica constante e incisiva. Finalmente, por ter aberto a minha visão no mundo profissional da Botânica de forma sutil e crítica.

Ao meu namorado Breno (o Xeroso!), por tudo, pelas madrugadas de companhia nas idas ao Laboratório para “cheirar as filhinas” (entenda-se aqui fazer os controles dos experimentos). Pela paciência e compreensão nos momentos de nervosismo e falta de atenção, afinal foram inúmeros finais de semana e feriados renunciados. Pela confiança e por toda a força e apoio ao longo deste período, e pelos importantíssimos "boa sorte!".

Aos professores do departamento de Botânica (pela convivência nestes anos, pelos ensinamentos e pela amizade) que sempre incentivaram a continuidade dos trabalhos e a superar os obstáculos das disciplinas. Em especial ao professor e amigo

Paulo Eduardo Câmara (Padu) por ser o responsável, ou melhor, incentivador da minha escolha tanto do curso de graduação em Biologia como também no mestrado pela área de Botânica e, além disso, tudo, por ter me apresentado ao meu orientador Fabian Borghetti.

Ao professor, podemos dizer co-orientador, César Marins de Sá pelas críticas, sugestões, apoio e também pelo laboratório e equipamentos cedidos. Muito obrigada.

Aos meus pais, Pedro Ataíde e Maria de Jesus, agradeço pela paciência que tiveram nos momentos difíceis e pelo carinho e disposição em auxiliar no que fosse possível. Pelo encorajamento e o apoio incondicional, sem os quais nada disso teria sido possível. Afinal eles são os meus verdadeiros mestres, que me ensinaram com amor, coragem e perseverança conquistar meus objetivos, tornando-me melhor a cada dia, ensinando a arte de viver e de ser feliz. Mas cada um da sua forma, contribuíram para meu desenvolvimento e acompanharam a conclusão de mais uma fase na minha carreira profissional e no meu crescimento pessoal.

A minha irmã, Aline, que apesar de me achar exagerada no tempo que dedico ao estudo, me apóia com seu jeito espirituoso e inteligente, com suas engraçadas, porém proveitosas sugestões.

A minha irmã, de consideração, Roxane, que logo no início presenciou a investida no mestrado com todas as dificuldades e lágrimas derramadas. Além de estar sempre por perto também nas alegrias, sempre me incentivou a realizar os meus desejos. Pela sua amizade incondicional e suas sábias palavras de conforto.

A toda minha família e, em especial, a Tia Zélia, que é uma grande pesquisadora do Instituto Pasteur/SP, pois sei que mesmo distante torceu por mim durante todo esse tempo do mestrado, além de me sempre incentivar para os rumos da pesquisa.

Ao César Utida que acredito ser também um dos maiores torcedores por essa conquista, pela compreensão e infinita paciência com meu pouco tempo dedicado a Escola de Paisagismo (que foi pouquíssimo, em relação ao que deveria ser), pela sua solidariedade em sempre buscar solucionar os problemas técnicos de computador e impressoras que, principalmente no final, dão seus “piripagues” e por que não também pela paciência com os meus “piripagues”.

O muitíssimo obrigado, a Lucila, uma amiga, que infelizmente não está mais entre nós, pelo incentivo no início de tudo, antes mesmo de passar na prova do mestrado. Pois sei que de alguma forma me iluminou para chegar até aqui.

A todos os amigos da PósBot: Stefano, Vanessa (mãezona de todos), Bia, Luciano, Simone, Eduardo, Baiano, João, Murilo, Regina, Paulo, Floriano, Andriele, Andreza e Denise.

Aos técnicos, Fábio Nakamura e Lílian, pelos conhecimentos ensinados sobre como utilizar inúmeras coisas do laboratório, principalmente como diz a minha amiga Camila, como se usa “*o nosso carro*” (a cuba de eletrofoferese), um dos principais equipamentos para realização deste trabalho.

A Deus pela grande oportunidade que é trilhar este caminho cheio de surpresas, mas que com certeza, também cheio de beleza e fantasia, permeado de obstáculos transponíveis e de rico aprendizado.

À CAPES pelo apoio financeiro com a bolsa de mestrado concedida.

Aqueles que não foram citados diretamente os meus sinceros agradecimentos que de alguma forma contribuíram para o êxito deste trabalho.

Muito obrigada!

Resumo

Dormência e germinação são eventos associados determinados pela ação antagônica entre o potencial de crescimento do embrião e a restrição gerada pelos tecidos que o circundam ou pelos inibidores presentes na semente. Tais eventos são influenciados por um grande número de genes e fatores ambientais. A dormência pode ser considerada como um bloqueio à germinação em uma semente viável intacta sob condições favoráveis. Contudo, sabe-se que a quebra da dormência pode envolver vários aspectos como o balanço hormonal, a variação de temperatura e a síntese de proteínas. Sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) apresentam dormência fisiológica quando recém-colhidas. Incubação com etileno, e tratamentos com temperaturas próximas a 30°C promovem a germinação. Com base nestas considerações o presente estudo teve o objetivo de: 1) estudar a cinética de germinação das sementes de girassol por meio de medidas de tempo médio e variância da germinação; 2) investigar a síntese de proteínas em embriões dormentes e germinantes através de géis e fluorogramas; 3) identificar nos géis e fluorogramas proteínas cuja síntese ou remoção tenha sido afetada pelos tratamentos de quebra da dormência. Para tanto, embriões de girassol foram incubados em câmaras de germinação com temperaturas de 10°C (na presença e ausência de etileno) e 30°C, e fotoperíodo de 12 h. A síntese e remoção de proteínas em embriões dormentes e germinantes foram analisadas por meio de géis bidimensionais e fluorogramas. Constatou-se que embriões de girassol quando recém-colhidos apresentam baixa germinação se incubadas a 10°C; a quebra da dormência ocorre quando estes são incubados a 10°C na presença de etileno e/ou quando incubados a 30°C. Tempos crescentes de incubação a 30°C aumentam progressivamente a germinabilidade dos embriões dormentes quando estes são transferidos para 10°C. Isto mostra que a quebra da dormência é um processo gradativo. A germinação é mais rápida e uniforme quando os embriões de girassol são incubados a 30°C, em comparação aos embriões incubados a 10°C na presença do etileno. A comparação entre os géis e fluorogramas obtidos de embriões dormentes e germinantes mostraram que estes são bastante similares. Em particular, proteínas de baixo peso molecular foram encontradas nos perfis protéicos de embriões dormentes, germinantes e germinados, sugerindo que estas podem tanto resultar do estresse térmico a que os embriões foram submetidos, como podem estar relacionadas com o controle da dormência.

Abstract

Dormancy may be regarded as a failure of an intact viable seed to complete germination under favorable conditions. The seeds of some species are prevented of completing germination because sometimes the embryo is constrained by its surrounding structures. It is named coat-imposed dormancy. In other species the embryos themselves are dormant (embryo- or physiological dormancy). Inhibitors present in the seed tissues as well as metabolic constraints within the embryo can block root elongation and germination. Light, temperature, and phytohormones are some treatments among others that are usually applied to dormant seeds in order to provoke their germination. Recent studies have involved the protein turnover in the embryos as a part of the dormancy removal system in many seeds. Soon-harvested seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.) present physiological dormancy located in the embryonic axis. The embryos present a low germinability when incubated at low temperatures (around 10°C). However, this dormancy can be overcome by ethylene treatment, or by incubating the embryos at higher temperatures (around 30°C). In view of these facts, the main objectives of this study were: 1) to investigate the kinetics of germination of sunflower embryos incubated at these two different dormancy-breaking treatments; 2) to investigate the protein turnover in dormant and germinating embryos through 2-D electrophoresis and fluorograms; 3) to identify in such gels and fluorograms differences in the protein patterns of dormant and germinating embryos. Dormant embryos of sunflower were incubated at 10°C (in the absence and presence of 50 $\mu\text{L.L}^{-1}$ ethylene) and at 30°C, under a photoperiod of 12 h. Protein homogenates were obtained from both germinating and non-germinating embryos at different times after imbibition. Before the protein extraction, ^{35}S -methionine was applied to the embryonic axis. The samples were run in a 2D-gel electrophoresis apparatus, the gels were comassie-blue stained, dried and exposed to kodak T-mat films. Sunflower embryos showed a low germinability when incubated at 10°C (less than 10%). At this temperature, ethylene treatment increased the germinability to around 70%. On the other hand, embryos incubated at 30°C germinated about 95%. The embryos germinated faster and more uniformly at 30°C than at 10°C. The incubation of dormant embryos at 30°C for different times before incubating them at 10°C increased the germinability at this temperature in a dose-dependent manner. The comparisons of the gels and fluorograms

obtained from germinating and non-germinating embryos showed few differences. In particular, some polypeptides of low molecular weight were synthesized in dormant embryos, as well as in those embryos incubated at 10°C. Overall, the results suggest that the dormancy removal by 30°C is a gradual process, the protein patterns of germinating and non-germinating embryos are very similar, and the low molecular weight proteins may be involved both in stress responses as well as in the control of dormancy in sunflower embryos.

1. Introdução

Dormência e germinação são eventos associados determinados pela ação antagônica entre o potencial de crescimento do embrião, tais eventos são influenciados por um grande número de genes e fatores ambientais (Koorneef et al., 2002). A dormência em sementes refere-se a um bloqueio físico ou fisiológico ao alongamento do eixo embrionário de uma semente viável, esta pode ser considerada como uma restrição gerada pelos tecidos que o circundam ou inibidores presentes na semente. O bloqueio fisiológico está relacionado a uma restrição metabólica nas estruturas do embrião e é considerado como dormência embrionária (Bewley, 1997). Já o bloqueio físico é imposto pelos tegumentos impedindo a embebição, trocas gasosas e/ou expansão dos embriões (Baskin & Baskin, 2000). No entanto a embebição pode ocorrer tanto em sementes quiescentes quanto dormentes, pois a absorção de água é um simples processo físico na qual a hidratação é dirigida pelo potencial hídrico entre a semente e o ambiente (Castro & Hilhorst, 2004).

Estudos mostram que as interações entre fitormônios dentro da célula ocorrem por vias de transdução de sinais, atuam no controle da dormência e germinação de várias espécies como girassol (*Helianthus annuus* L.), maçã (*Pirus malus*) e aveia (*Avena sativa*) (Garello et al., 1991; Bewley & Black, 1994; Corbineau et al 2000). Os principais fitormônios envolvidos nesta interação são o etileno, o ácido abscísico e as giberelinas. O ABA e as GAs, por exemplo, exercem seus efeitos na dormência da semente em diferentes períodos, de modo que os seus efeitos antagônicos na dormência não refletem uma interação direta (Taiz & Zeiger, 2004). No momento da protusão da radícula as GAs agem tanto na promoção da síntese de enzimas envolvidas no enfraquecimento do tegumentos e/ou mobilização de reservas; o ABA apresenta elevados níveis na fase intermediária da embriogênese afetando a translocação de aminoácidos e/ou a expressão de genes de proteínas de reserva. Em estudos com cariopses de sorgo, a germinação, sob uma ampla escala térmica, é mediada pelo balanço entre os efeitos opostos de ABA e GA (Benech-Arnold et al., 2003).

A interação destes fitormônios tem sido relacionada com mobilização de proteínas devido às observações realizadas em perfis eletroforéticos, por exemplo, de sementes de aveia (Courbineau et al., 1991) e angico (*Anadenanthera peregrina*) (Barduche et al., 1999) que mostram a síntese e remoção de proteínas devido à presença e/ou ausência de fitormônios com ácido abscísico e etileno.

Este trabalho foi desenvolvido para ampliar os conhecimentos da fisiologia e do comportamento da germinação e dormência em sementes de girassol, além do objetivo de conhecer melhor os mecanismos moleculares de controle da dormência. O presente trabalho visa investigar os perfis protéicos de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.) utilizando diferentes agentes de quebra de dormência como alta temperatura e etileno.

2. Objetivos

Avaliar por meio de medidas de tempo médio e variância do tempo médio efeitos da quebra da dormência na cinética de germinação das sementes.

Comparar os perfis eletroforéticos de embriões cuja dormência tenha sido quebrada pelo fitohormônio etileno e por incubação a 30°C.

Identificar proteínas nos géis cuja síntese ou remoção tenha sido afetada pelos tratamentos de quebra da dormência para posterior estudo de sua identidade e funções.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 - Dormência e Germinação

Segundo o critério botânico ou morfológico, a germinação é um processo fisiológico pelo qual se inicia com a entrada de água na semente, promovendo o alongamento do eixo embrionário, seguido da curvatura geotrópica da raiz (Labouriau, 1983; Borghetti & Ferreira, 2004).

Associada à germinação está a dormência das sementes, mecanismo que pode ser considerado como um bloqueio à germinação em uma semente viável intacta sob condições favoráveis para completar tal processo (Bewley, 1997; Castro & Hilhost, 2000). Estas condições, consideradas essenciais para o sucesso da germinação, são a disponibilidade de água, oxigênio e temperatura adequada (Castro & Hilhost, 2004; Cardoso, 2004) A semente, quando exposta às condições essenciais, e de fato germina, considera-se que ela está quiescente; caso não germine, considera-se que ela se encontra dormente (Borghetti, 2004). Vale ressaltar ainda, segundo Kumar & Bhatla (2006), que a temperatura e o grau de embebição são as duas principais condições que influenciam na germinação das sementes.

Em algumas espécies as sementes são impedidas de germinar porque o embrião é restringido pelas estruturas circundantes e em outras os próprios embriões apresentam algum metabolismo de restrição (Bewley, 1997).

A dormência em sementes pode também ser diferenciada entre absoluta e relativa. A dormência é absoluta quando a semente viável não germina sob nenhuma condição experimental. Dormência é relativa quando a semente germina sob condições experimentais específicas, como baixas (ou altas) temperaturas, ou sob presença (ou ausência) de luz (Cardoso, 2004). Por exemplo, sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) recém-colhidas não germinam a baixas temperaturas, mas atingem germinabilidade próxima a 100% em temperaturas acima de 25° C (Borghetti et al., 2002).

Quando em algumas espécies as sementes são impedidas de completar a germinação devido à restrição imposta pelos tegumentos, é denominada como dormência mecânica ou física, aparentemente requer um enfraquecimento destas estruturas para permitir a protusão da radícula (Bewley & Black, 1994). Em outras espécies quando o próprio embrião apresenta algum metabolismo de restrição, normalmente induzido por hormônios inibidores da germinação, é denominada dormência fisiológica ou embrionária, pelo fato de o bloqueio à germinação se localizar nas estruturas do embrião. Esta característica é imposta principalmente pelo ABA durante o desenvolvimento do embrião (Bewley, 1997). Neste caso, a dormência manifesta-se durante a embebição da semente, quando a reidratação dos tecidos promove a reativação do metabolismo celular, não resultando, contudo, no alongamento embrionário (Borghetti, 2004). Em resposta a condições desfavoráveis a semente pode permanecer embebida por longos períodos sem perda da viabilidade (Bewley & Black, 1994).

3.2 - Fitormônios e o controle da germinação

Estudos têm mostrado que o fitormônio ácido abscísico (ABA) é um importante regulador do desenvolvimento e do estabelecimento da dormência embrionária durante a maturação das sementes (Bewley, 1997; Koorneef et al., 2002). Principalmente porque este fitormônio é encontrado tanto em sementes em desenvolvimento quanto em maduras e dormentes, além de inibir a germinação quando aplicado exogenamente (Corbineau et al., 1991). Garello e colaboradores (2000) mostraram que em sementes de

girassol o ABA participa no estabelecimento da dormência durante a embriogênese e, além disto, durante a embebição a síntese desse fitormônio é necessária para a manutenção da dormência no embrião. Também em sementes de *Pirus malus* (maçã) o ABA tem sido considerado o principal responsável pela inibição do desenvolvimento embrionário (Bewley & Black, 1994). Outros resultados, como em cariópses de *Sorghum bicolor* (sorgo), sugerem que a imposição de padrões de quebra de dormência resulta do balanço de ação entre ABA e GAs, devido ao conteúdo nos tecidos de cada um desses hormônios (Benech-Arnold et al., 2003).

O ABA, além disso, está relacionado a vários outros processos do desenvolvimento, incluindo a síntese de proteínas de armazenamento, indução de proteínas LEA (*Late-Embryogenesis Abundant*) e à tolerância a dessecação (Corbineau, et al., 1991).

Em contrapartida, as giberelinas (GAs) e o gás etileno promovem a germinação em sementes maduras e dormentes (Bewley, 1997), sendo o etileno um dos agentes mais eficazes na remoção da dormência em sementes (Kepzinski & Kepzinska, 1997). As giberelinas, segundo Bewley & Black (1994), têm grande importância na promoção e manutenção da germinação, pois a resposta à sinalização de fatores externos (que quebram a dormência) promove o aumento da sua concentração e inibe a atuação de ABA. Foram identificados, por Russel et al. (2000) genes ativados pelas GAs que atuam na promoção da germinação e na repressão da dormência embrionária. As GAs promovem a síntese de enzimas envolvidas no enfraquecimento dos tegumentos e/ou a hidrólise de reservas, eventos relacionados principalmente à protusão da radícula (Bewley & Black, 1994). Recentemente foi mostrado por Perez-Flores et al. (2003) que a biossíntese de giberelinas é reprimida durante a embebição em grãos de sorgo dormentes quando comparado a grãos não dormentes, e este controle ao nível de expressão de uma enzima chave na codificação de gene da via biossintética de GA. As giberelinas representam uma classe de fitormônios envolvidos tanto na promoção da germinação quando aplicadas em sementes dormentes, quanto na iniciação do crescimento de plantas (Castro & Hilhorst, 2004). São encontradas em grandes concentrações nos tecidos de sementes germinantes (Karszen, 1995).

O hormônio vegetal etileno é usualmente associado à maturação de frutos, senescência de flores e folhas (Brady & McCourt, 2003) e também à quebra de dormência em *Arachis hipogea* L., *Pirus malus*, *Amaranthus retroflexus* e *Helianthus annuus* L. (Ketring & Morgan, 1969; Kepczynski et al., 1977; Kepczynski et al., 2003;

Corbineau et al., 1989). Ghassemian e colaboradores (2000) mostraram que o etileno influencia nas respostas fisiológicas mediadas pelo ABA em *Arabidopsis* e também que é um regulador negativo de ação do ABA durante a germinação da semente e o crescimento da raiz desta espécie. Foi verificado por Corbineau & Come (1990) que a dormência em sementes recém-colhidas de girassol (*Helianthus annuus* L.) em temperaturas próximas a 10°C, é estabelecida pelo ABA durante a maturação. Nestas condições, o etileno é eficaz na quebra da dormência destas sementes (Corbineau & Côme, 1995).

3.3 - Interação entre as vias de transdução de sinais dos fitormônios

A ação dos fitormônios é modulada através de cascatas de transdução de sinais (Beaudoin et al., 2000; Ghassemian et al., 2000), porém, o processo pelo qual o ABA inibe a germinação, ou como as GAs e o etileno promovem a germinação, ainda não foi completamente elucidado (Nambara & Marion-Poll, 2003). Estudos de características da germinação de insensibilidade ao etileno e deficiência em brassinoesteróides em plantas mutantes têm realçado o papel destes hormônios no controle da dormência, provavelmente pela interação com as vias de transdução de ABA e GAs (Beaudoin et al., 2000; Steber & McCourt, 2001). Brassinoesteróides são uma classe de agentes de quebra de dormência, sendo também reguladores de respostas múltiplas nas plantas como, alongamento e a divisão celular, o desenvolvimento do tubo polínico e o crescimento no escuro (Steber & McCourt, 2001).

As vias de transdução de sinais do etileno e ABA interagem extensivamente dentro da célula. Beaudoin e colaboradores (2000) verificaram que o etileno regula negativamente o grau de dormência em *Arabidopsis thaliana* por suprimir a expressão de genes envolvidos na sinalização do ABA. Foi verificado que ABA pode agir através da via de transdução de sinal do etileno para inibir o alongamento da raiz, e que a competição entre o etileno e ABA pela ativação da via, reflete nos níveis de sensibilidade do ABA que podem ser reduzidos pelo etileno (Ross et al., 2001).

3.4 - Participação de proteínas no controle da dormência por fitohormônios

Diversos genes e proteínas, os quais são afetados tanto pelo estágio de desenvolvimento como por fatores ambientais, estão envolvidos nos complexos eventos de dormência e germinação (Koorneef et al., 2002). Alguns estudos de genética da regulação da dormência em sementes têm concluído que a dormência é um traço quantitativo controlado por loci múltiplos que afetam diferentes tecidos da semente e freqüentemente diferentes aspectos de sua fisiologia (Foley & Fennimore, 1998).

Corbineau e colaboradores (1991) verificaram que ABA induz a dormência em embriões de sementes de aveia (*Avena sativa*), e este efeito é dependente da temperatura. Além disto, na análise de perfil da síntese protéica, eles verificaram a síntese de determinadas proteínas apenas na presença deste fitormônio, e a síntese de uma proteína que só foi observada na ausência de ABA, sugerindo que esta pode estar relacionada com a germinação. Garello e colaboradores (2000) demonstraram que a intensidade das bandas de determinadas proteínas mudam durante o início da embebição de embriões de girassol dormentes e não-dormentes, indicando que estas mudanças podem estar associadas com a expressão diferencial de genes responsáveis para a manutenção da dormência.

Barduche e colaboradores (1999) analisaram o perfil da mobilização de proteínas de reserva e atividade de proteases, respectivamente, após o início da germinação de sementes de angico (*Anadenanthera peregrina*), e verificaram que o ABA bloqueia a mobilização protéica através da inibição da atividade enzimática nos cotilédones, mas não impede totalmente a germinação, concluindo que este hormônio afeta a germinação e atividade enzimática independentemente. Os autores sugerem que para a quebra da dormência ocorre o silenciamento de genes, cuja síntese é promovida pelo ácido giberélico e também a remoção ativa de proteínas inibidoras da germinação (Barduche et al., 1999). Em conjunto, estes trabalhos mostram que a dormência em sementes pode ser investigada através de técnicas moleculares como síntese e degradação de proteínas, que por sua vez são reflexo do comportamento metabólico de uma semente dormente ou germinante.

3.5 Temperatura, Dormência e Síntese de proteínas:

Como já mencionado por Kumar & Bhatla (2006), a temperatura é umas das importantes condições que influenciam a germinação das sementes. Foi verificado por Borghetti et al. (2002) que a dormência em sementes recém-colhidas de girassol manifesta-se somente sob incubação a baixas temperaturas (10°C), mas não em altas temperaturas (25°C). Segundo Corbineau & Côme (1990) a principal responsável pela sensibilidade da semente a baixas temperaturas é a dormência embrionária.

O estresse promovido por temperaturas elevadas pode ocasionar alterações bioquímicas e metabólicas à célula como a inativação enzimática e interferência em vias metabólicas. No entanto o impacto provocado por altas temperaturas em processos complexos como a fotossíntese e respiração, é dependente do genótipo da planta e condições de adaptação das plantas a diferentes regiões com regimes de temperatura diferentes (Chaisompongpan et al., 1990).

Estas condições apresentam consideráveis alterações na fluidez das membranas, resposta estomatal e síntese de proteínas diante das alterações do regime térmico (Heuss-Larosa et al., 1987). A resposta celular frente a estresses ambientais está intimamente relacionada com alterações no padrão de expressão e síntese de proteínas específicas (Araújo et al., 1998).

Um grupo particular de proteínas denominado de proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins – HSPs) estabelecem uma resposta comum e conservada ao longo de toda escala evolutiva nos mais diversos distintos organismos (Lindquist & Craig, 1988). Há ainda dentro deste grupo diferenças entre os grupos sintetizados como as HSPs de 60 a 100KDa, consideradas de alto peso molecular, cujos resultados sugerem que possuem uma função celular básica, e as proteínas de baixo peso molecular (Low Molecular Weight – LMW HSPs) que estão diretamente relacionadas com a sobrevivência e recuperação de estresses térmicos, assim como processos específicos do desenvolvimento em condições normais (Waters et al., 1996). Por exemplo, foi observada a expressão dessas proteínas durante fases específicas do desenvolvimento reprodutivo e vegetativo de girassol (Almoguera & Jordano, 1992; Coca et al., 1994). As análises genéticas indicam que em plantas as LMW HSPs apresentam considerável heterogeneidade em ponto isoelétrico, peso molecular, estabilidade e nível de expressão

(Lee et al., 1994). Pelo exposto, temperaturas extremas podem induzir a síntese de uma categoria específica de proteínas envolvidas provavelmente com a tolerância dos tecidos ao tratamento térmico, e/ou adaptações metabólicas das células a estas condições extremas. No caso de sementes, há a hipótese que temperaturas extremas, quebradoras da dormência, poderiam estar atuando nas células através da indução de proteínas de estresse, que por sua vez poderiam fazer parte do processo de promoção da germinação (Labouriau & Agudo, 1987).

3.6 - Girassol (*Helianthus annuus* L.): modelo para estudos de quebra da dormência

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma oleaginosa da Família *Asteraceae*, originada no continente norte americano (Raven et al., 1996). Atualmente cultivada em todos os continentes destacando-se como a quarta cultura em produção de grãos e a quinta em área cultivada no mundo, além do que o mercado de produção é promissor e está em expansão em todas as regiões produtoras (Castro et al., 1997).

O óleo obtido de suas sementes (aquênios) destaca-se aqueles que por suas excelentes características físico-químicas, nutricionais e organoléptica, são os de melhor qualidade (Balla *et al.*, 1997). As sementes podem ser utilizadas como fonte de proteínas, pois fornecem 45% de proteína bruta após extração do óleo (Balla et al., 1997; Castro et al., 1997).

As sementes de girassol apresentam dormência relativa que se manifesta sob incubação em baixas temperaturas (10°C), mas não em altas temperaturas (25°C) (Borghetti et al., 2002). Este bloqueio à germinação está localizado especificamente no eixo embrionário, sugerindo a existência de mecanismos de controle da germinação que podem ser ativados e mantidos tanto por sinais provenientes de outras partes da semente como por sinais provenientes do próprio eixo embrionário (Bewley & Black, 1994).

A aplicação do etileno nos embriões de girassol e a pós-maturação por até seis meses a 10°C também são tratamentos eficazes de quebra da dormência. Após tais tratamentos, as sementes passam a germinar quando incubadas em baixas temperaturas (Borghetti et al., 2002). Constata-se, pois, que existem diferentes tratamentos para quebra da dormência: pós-maturação, aplicação de etileno, ou mesmo incubando-se as sementes a 25°C.

4. Material e Métodos

4.1 Seleção e caracterização das sementes

Sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) utilizadas nos experimentos foram colhidas e fornecidas pela EMBRAPA em dois lotes em diferentes períodos, um em julho de 2004 e outro em julho de 2005, sendo este último um híbrido, no município de Dourados – MT. Estas sementes foram armazenadas em freezer (-15°C) para mantê-las em estado dormente durante a fase experimental, pois esta espécie apresenta dormência nas sementes quando recém colhidas. Para cada experimento realizado foram selecionadas sementes uniformes em relação ao tamanho e coloração, e descartadas aquelas que apresentavam alguma injúria no tegumento ou nos tecidos embrionários.

O conteúdo de água das sementes foi obtido pesando-se, em balança analítica *Metler Toledo* (modelo College B154), 100 sementes antes e após da secagem em estufa a 50°C por 96 horas. O conteúdo de água foi obtido utilizando a expressão:

$$CA = (PMF - PMS) \times 100 / PMF$$

onde, CA é o conteúdo de água da semente, PMF é o peso fresco PMS é o peso seco.

4.2 Estudos de quebra de dormência

Para investigar a quebra da dormência de embriões de girassol utilizando alta temperatura e etileno como agentes, realizou-se o seguinte bioensaio (1).

Das sementes selecionadas foram retirados os tegumentos, com auxílio de bisturi, ficando somente o embrião. Estes embriões foram acondicionados em tampas de plástico eppendorff, embebidas em 100µL de água destilada, colocados em câmara de germinação (Marconi MA 403) com fotoperíodo de 12 horas, e submetidos aos seguintes tratamentos:

- a) incubação a 10°C.
- b) incubação a 10°C com 50 µL/L de etileno. Para a aplicação do gás, os embriões foram dispostos dentro de kitassatos de 250ml (10 embriões / kitassato), fechado na boca com parafilme, e uma mangueira de borracha na abertura lateral que permite a aplicação do etileno por meio de uma seringa graduada.
- c) incubação a 30°C.

Para cada tratamento foram utilizados três replicatas de 10 embriões. Foram conduzidas três repetições deste bioensaio.

4.3 Irreversibilidade da quebra da dormência.

Considerando-se que embriões dormentes incubados a 30°C germinam rapidamente, buscou-se investigar quanto tempo de incubação a 30°C é necessário para que a germinação seja induzida irreversivelmente, de maneira que a transferência para 10°C não mais bloqueie a germinação. Para isto, embriões foram acondicionados em tampas de plástico eppendorff, embebidas em 150µL de água destilada e incubados a 30°C (fotoperíodo 12 horas) por 2, 4, 6, 8 e 10 horas, e então transferidas para 10°C.

Os controles foram os seguintes: incubação sob temperaturas constantes de 10°C e 30°C. Foram utilizados 30 embriões por tratamento, e foram realizadas três repetições deste experimento (n=90).

As observações foram realizadas a cada 4 horas, e os embriões germinados foram retirados das câmaras.

4.4 Transferência para 30°C dos embriões não germinados a 10°C.

Como no experimento 4.3 diversos embriões incubados a 30°C não germinaram após transferidos para 10°C (ver resultados), perguntou-se se os mesmos haviam perdido a viabilidade ou entrado em dormência novamente. Para tal, o experimento anterior foi repetido, mas desta vez os embriões não germinados a 10°C foram transferidos novamente para 30°C após 24 horas do início deste experimento. De mesma maneira que o anterior, as observações foram realizadas a cada 4 horas até o fim do experimento (n=30).

4.5 Parâmetros de germinação

Para calcular os parâmetros de germinação nos experimentos 4.2, 4.3 e 4.4, foram utilizadas as seguintes expressões abaixo, conforme Labouriau (1983).

Germinabilidade:

$$\%G = (\sum n_i \cdot N^{-1}) \cdot 100 \quad \text{onde,}$$

$\sum n_i$ - número total de sementes germinadas

N - número de sementes dispostas para germinar

Os dados são expressos em porcentagem

Tempo médio de germinação:

$$t = \sum n_i \cdot t_i / \sum n_i \quad \text{onde,}$$

t_i - tempo entre o início do experimento e a i -ésima observação (dia ou hora)

n_i - número de sementes germinadas no tempo t_i

Os dados são expressos em horas

Variância do tempo médio:

$${}_tS^2 = [\sum n_i \cdot (t_i - t)^2] / (\sum n_i - 1) \quad \text{onde,}$$

t_i - tempo entre o início do experimento e a i -ésima observação (dia ou hora)

n_i - número de sementes germinadas no tempo t_i

Os dados são expressos em horas-1

Desvio padrão do tempo médio:

$$S_t = \sqrt{{}_tS^2} \quad \text{onde,}$$

${}_tS^2$ - variância do tempo médio

Velocidade média de germinação:

$$v = 1 / t \quad \text{onde,}$$

t - tempo médio de germinação

Variância da velocidade média de germinação:

$$\sqrt{{}_vS^2} = (v)^4 \cdot {}_tS^2 \quad \text{onde,}$$

${}_tS^2$ - variância do tempo médio de germinação

v = velocidade média de germinação

4.6 Análise estatística

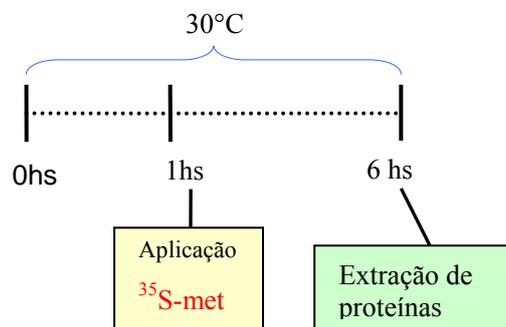
As germinabilidades obtidas nos experimentos 4.2 e 4.3 foram comparadas entre si através dos intervalos de confiança de proporções (Tablas Científicas, Documenta Geigy 1965). Os tempos médios de germinação foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. Todas as comparações foram realizadas a 5% de probabilidade.

4.7 Extração de proteínas e incorporação isotópica em embriões incubados a 10° C e 30° C.

A fim de comparar a síntese e degradação de proteínas em embriões dormentes e germinantes por efeito do etileno e temperatura (30°C) foi utilizada ³⁵S-metionina, um aminoácido que contém o isótopo radioativo do enxofre, e que ao ser absorvido pelos embriões marcam as proteínas que foram sintetizadas *de novo*. Este é o primeiro aminoácido incorporado na cadeia de polipeptídeos durante a síntese protéica em eucariotos (Mateus & Van Holde, 1990).

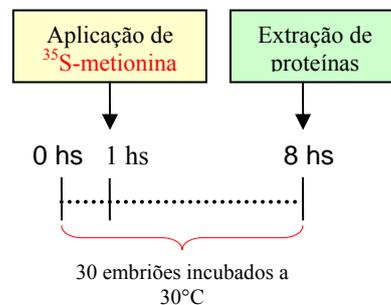
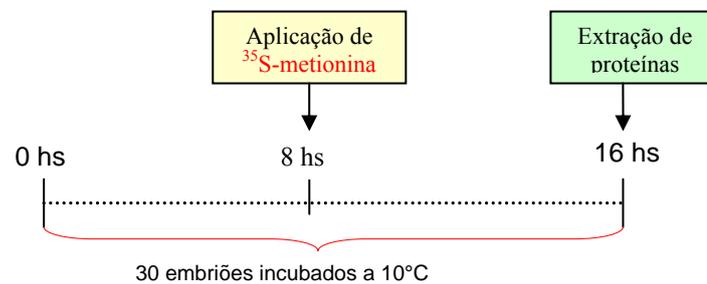
O momento para aplicar nos embriões a ³⁵S-metionina foi escolhido segundo os resultados do experimento 4.2. Então, para os tratamentos a 10°C (com ou sem etileno) e a 30°C os embriões foram marcados, respectivamente, 12 e 6 horas antes da extração. Aplicou-se 1µL (14µCi/µL) de ³⁵S-metionina na ponta da radícula de cada embrião, sendo marcados 6 embriões por tratamento. A incorporação do isótopo radioativo foi mensurada em cintilador (ver anexo).

Delineamento deste experimento para extração de proteínas:



embriões germinaram, mas nenhum deles havia sido marcado com ^{35}S -metionina. No tempo 24 h decidiu-se transferir parte dos embriões para 30°C ($n=28$), sendo 15 deles marcados com $1\mu\text{L}$ de ^{35}S -metionina. O restante ($n=28$) foi mantido a 10°C , sendo nestes aplicado $1\mu\text{L}$ de ^{35}S -metionina e $50\mu\text{L/L}$ de etileno (segundo protocolo descrito anteriormente). Após 8 horas de incubação nestas condições, foram extraídas as proteínas separadamente dos embriões germinados e não germinados.

Os controles deste experimento seguiram os seguintes delineamentos:



4.9 Procedimentos para extração de proteínas e eletroforeses

Para a extração das proteínas, os eixos embrionários marcados com $1\mu\text{L}$ de ^{35}S -metionina foram destacados com auxílio de um bisturi, e macerados em um endorff com $3\mu\text{L}$ de coquetel de inibidores de proteinases e tampão O'Farrel (1975) (uréia $9,0\text{M}$; NP-40 10% ; β -mercaptoetanol $0,4\%$; anfólitos pH 5-7 $1,6\%$; anfólitos pH 3,5-10 $0,4\%$; água deionizada) obedecendo à proporção de 40mg de matéria fresca para $500\mu\text{L}$

de tampão (anexo). Após a maceração, as amostras permaneceram em repouso acondicionadas em isopor com gelo por aproximadamente 30 minutos para que houvesse a solubilização das proteínas. Após este período, foi centrifugado a 10000rpm por 15 minutos e em seguida o sobrenadante retirado e armazenado em freezer a -20°C até o momento do uso.

A separação eletroforética em primeira dimensão foi realizada segundo a metodologia de O'Farrel (1975). Neste procedimento foram aplicadas $60\mu\text{g}$ de proteína em cada capilar, e a corrida foi mantida em 400 volts até o momento em que a amperagem atingisse valor constante. A quantidade de proteína aplicada nos capilares foi determinada pela dosagem utilizando o método descrito por Ramagli & Rodrigues (1985).

A segunda dimensão foi realizada por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) em géis de poliacrilamida 12,5% e conduzidas em cuba Biorad sob alimentação constante de fonte Biorad com 60 mA, e regulada a máxima de 996 volts e 80 watts de potência. Marcadores moleculares entre 14,4 a 97,4 KDa foram utilizadas como padrões de massa molecular.

Os géis foram corados com Comassie blue G e secos em secadora Biorad (Model 543 Gel Dryer) a 70°C por 3 horas. Após a secagem os géis foram expostos aos filmes de raio-x para obter os fluorogramas, estes obtidos com materiais de revelação e fixação Kodak. O tempo de exposição dos géis foi determinado segundo a incorporação radioativa (anexo 3). Em anexo estão citados os protocolos com reagentes e procedimentos para os experimentos de síntese protéica, dosagem de proteína, incorporação de isótopos radioativos e revelação de fluorogramas.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Termobiologia L.G. Labouriau, do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília (UnB) e nos Laboratórios de Biologia do Gene e de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

5. Resultados e Discussão

5.1 Conteúdo de água dos embriões de girassol

A porcentagem do conteúdo de água obtido para cada um dos lotes (2004 e 2005) está apresentado na tabela 1. O baixo conteúdo de água, em torno de 5 a 10% de seu peso fresco, quando dispersas da planta-mãe é característico das sementes ortodoxas (Bewley & Black, 1994). Os dados mostram que a semente atingiu um estado de maturidade fisiológica permitindo que fossem armazenadas em temperaturas negativas sem que houvesse prejuízos aos tecidos. Desta maneira, se preserva a condição de dormência das sementes, evitando o processo de pós-maturação que normalmente acontece quando armazenadas em temperaturas acima de zero.

Tabela 1 – Conteúdo de água das amostras de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.).

Lote	N	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	conteúdo água (%)
2004	100	6,68	6,23	7,17
2005	100	5,37	5,17	3,66

5.2 Perfis de embebição de embriões dormentes e germinantes sob as temperaturas de 10°C e 30°C.

Com objetivo de verificar o perfil de absorção antes de iniciar o alongamento embrionário, embriões de girassol foram embebidos em água sob as temperaturas de 10°C e 30°C.

Os resultados apresentados (figura 1) mostram que o processo de embebição ocorreu tanto em sementes dormentes incubadas a 10°C quanto em sementes incubadas a 30°C. No entanto, o processo de embebição a 10°C foi mais lento que a 30°C, pois os embriões incubados a 10°C levaram mais tempo para beber o mesmo volume de água que os embriões incubados a 30°C, alcançando um equilíbrio de embebição/tempo aproximadamente após 11 horas de incubação.

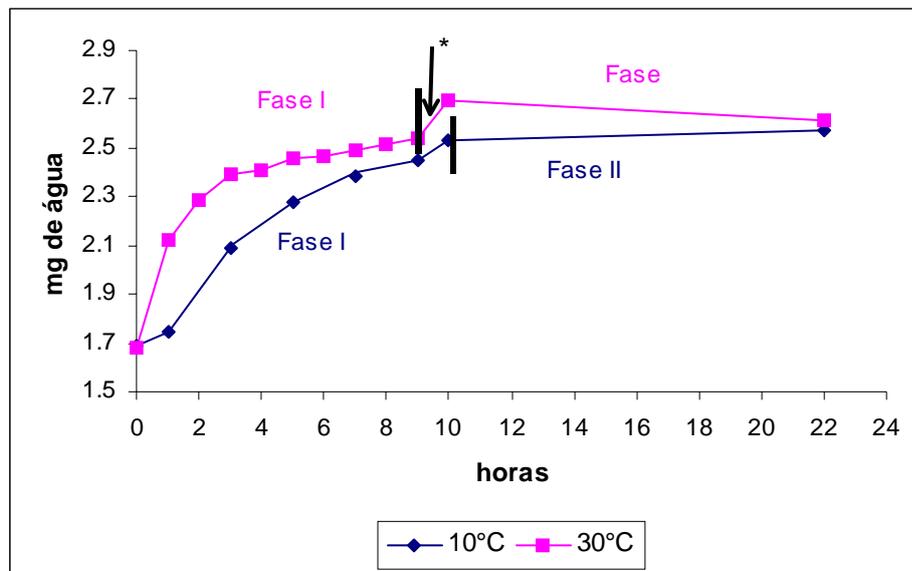


Figura 1. Embebição de água (em miligramas) de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.) do lote 2004 a 10°C e 30°C. N=30 por tratamento.

*A seta aponta no gráfico o momento em que há início de germinação na temperatura 30°C.

A absorção de água em sementes normalmente apresenta um padrão típico trifásico de hidratação. A fase I é rápida e dirigida pelo potencial matricial da semente seca, sendo este um processo físico, a fase II é normalmente caracterizada por um platô na embebição, e a fase III da embebição é marcada pelo aumento no conteúdo água e protusão da radícula (Bewley, 1997). O comportamento de absorção de água apresentado pelos embriões de girassol na figura 1 mostrou que houve um aumento progressivo do conteúdo de água e mais rápido quando incubados a 30°C que a 10°C, no entanto o processo trifásico de absorção neste caso não está evidente, quando refere-se a fase II a 30°C, pois esta é mais rápida que a fase I e em seguida já germina (como indicado pela seta na figura). Já os embriões incubados a 10°C apresentaram a fase I mais lenta em relação aos incubados a 30°C e um platô na embebição (fase II), momento este, em que a dormência embrionária manifesta-se, não resultando, contudo no alongamento embrionário.

Desta forma, fica demonstrado que a absorção de água em embriões de girassol apresenta comportamentos diferentes quando incubados em diferentes temperaturas.

5.3 Etileno e alta temperatura quebram a dormência em embriões de girassol

Com o propósito de se estabelecer os parâmetros cinéticos da germinação de embriões de girassol sob duas diferentes condições de temperatura, embriões dormentes foram incubados a 10°C na ausência e presença de etileno, ou a 30°C (tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros médios de germinação de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.), dos lotes 2004 e 2005. Tempo médio de germinação, velocidade média de germinação, variância do tempo médio, desvio padrão da variância do tempo médio e variância da velocidade média. Dados expressos em horas. N=90 sementes por tratamento. ¹

Parâmetro	10°C		10°C+etileno		30°C	
	2004	2005	2004	2005	2004	2005
Tempo médio (horas)	93.5	92	56.59 a*	64.52 b	12.67 c	12.67 cd
Germinabilidade	8,89%	2,22%	78,89%	68,89%	95,56%	92,22%
Velocidade Média (horas ⁻¹)	1,07. 10 ⁻²	1,09. 10 ⁻²	1,77. 10 ⁻²	1,55. 10 ⁻²	7,89. 10 ⁻²	7,89. 10 ⁻²
Variância do tempo médio (horas ²)	7.71	0	290.79	408.52	53.52	47.34
Desvio Padrão do Tempo Médio (horas)	2.78	0	17.05	20.21	7.32	6.88
Variância da Velocidade Média (horas ⁻²)	1,01. 10 ⁻⁷	0	2,84. 10 ⁻⁵	2,36. 10 ⁻⁵	2,07. 10 ⁻³	1,83. 10 ⁻³

* letras diferentes dentro da mesma coluna indicam diferença estatística entre os tempos médios, conforme o teste do Mann-Whitney (P<0,05). Biostat 2.0.

Os parâmetros de germinação apresentados na tabela 2 mostraram que a incubação a 30°C e aplicação do etileno agiu na quebra de dormência e influenciaram de forma a acelerar a germinação. Quando incubados a 30°C, há uma diminuição no tempo médio de germinação em torno de 7x e 4x em relação aos embriões incubados a 10°C sem e com etileno respectivamente. Isto mostra que em temperaturas mais altas há tendência de maiores velocidades de germinação (Labouriau, 1970; Labouriau & Pacheco, 1979).

Os resultados apresentados nas figuras 2 e 3 mostram que a dormência em sementes de girassol pode ser removida por aplicação de etileno e incubação em alta temperatura. As germinabilidades apresentadas na figura 2 são: a 10°C - 8,89% (lote 2004) e 2,22% (lote 2005), a 10°C+etileno - 78,89% (lote 2004) e 68,89% (lote 2005) e a 30°C 95,56% (lote 2004) e 92,22% (lote 2005).

¹ As medidas por repetição, utilizadas nas análises estatísticas, se encontram no anexo (6).

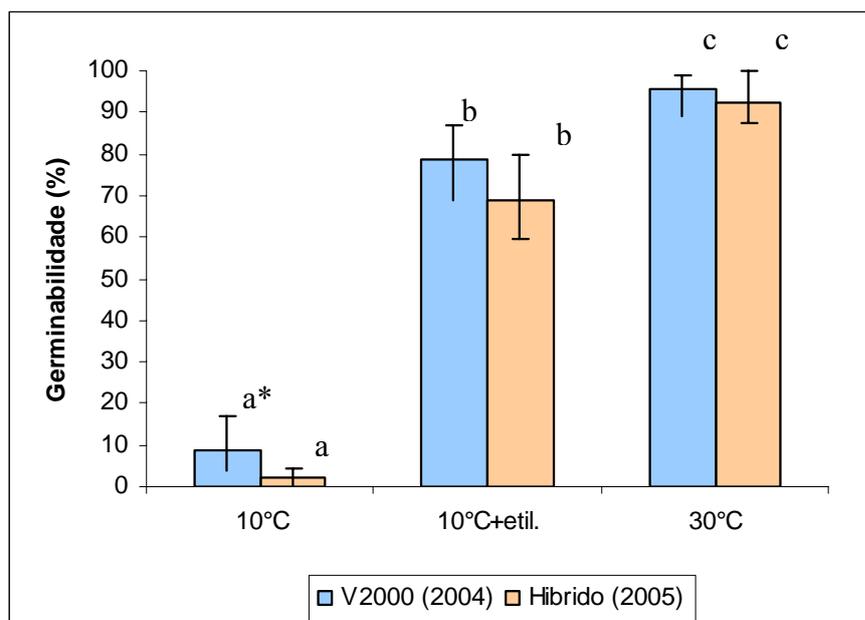


Figura 2 - Germinabilidade de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.) lotes 2004 e 2005. *Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelos intervalos de confiança das germinabilidades (n=90). Tablas Científicas, Documenta Geigy 1965. Concentração de etileno é 50 μ L/L.

Quando se considera o parâmetro germinabilidade, o agente de quebra de dormência que melhor atua nos embriões é a alta temperatura. O alto grau de dormência a 10° C e sua quebra por etileno concorda com resultados obtidos por Corbineau e Côme (1988) e Borghetti et. al (2002), ou seja, sementes de girassol recém-colhidas apresentam baixa germinabilidade a baixas temperaturas. No entanto, a germinabilidade de 2,22% e 8,8%, nos lotes 2005 e 2004, respectivamente (figura 2), dos embriões incubados a 10°C é estatisticamente igual a zero (intervalo de confiança de 0 - 4,02). A baixa germinabilidade, no caso do lote 2005, não permite calcular a variância e desvio padrão do tempo médio e a variância da velocidade média (tabela 2).

Entretanto, a alta germinabilidade apresentada pelos embriões incubados a 10°C+etileno a 50 μ L/L mantém o mérito de que esta é uma forma de quebra de dormência eficiente, condizendo com outros trabalhos que mostram que concentrações de 0,1 a 200 μ l l⁻¹ de etileno são suficientes para remover a dormência primária em girassol e outras espécies, como a maçã (Corbineau et. al,1988; Kepczynski et al, 1977).

Na figura 3 verificou-se que a quebra da dormência dos embriões incubados a 30°C torna o início da germinação mais rápido e uniforme.

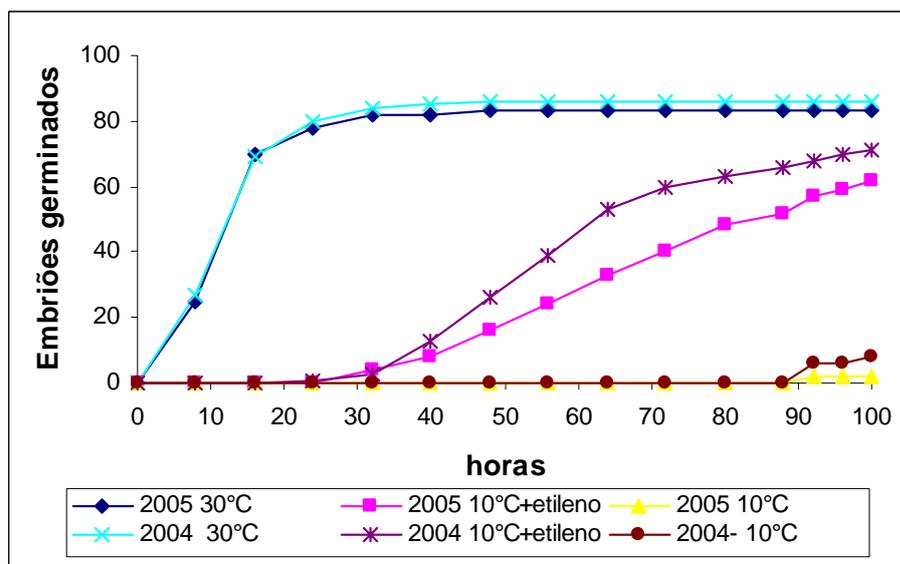


Figura 3 – Distribuição da germinação de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.) ao longo do tempo de incubação. Lotes 2004 e 2005 (n=90 / lote).

Os perfis de germinação de embriões apresentados nesta figura realçam a eficácia da quebra da dormência por alta temperatura, em relação aos embriões incubados a 10°C+etileno, pois atingiram maior quantidade de embriões germinados em menor tempo, além de ter apresentado essa quantidade concentrada entre 10 e 15 horas de germinação. Já os embriões incubados a 10°C+etileno, apesar de grande número de embriões germinados, observa-se uma germinação mais distribuída ao longo do tempo, entre 30 e 95 horas de incubação, e iniciou quando praticamente todos os embriões incubados a 30°C já haviam germinado. Porém, em relação aos embriões incubados a 10°C, considera-se eficiente à aplicação de etileno para a quebra da dormência.

Conclui-se, então, que a dormência manifestada em temperaturas baixas pode ser superada tanto por tratamento com o fitohormônio etileno, como por temperatura mais alta. No entanto o tratamento com alta temperatura é mais barato, mais fácil de ser aplicado, independe do fornecimento do hormônio. E além disto resultou em maior porcentagem de germinação.

5.4 Quanto maior o tempo de incubação a 30°C, maior a germinabilidade dos embriões após transferência para 10°C.

Com objetivo de investigar a quebra de dormência a 30°C, embriões de girassol foram incubados por tempos crescentes nesta temperatura, e posteriormente transferidos para 10°C. Verificou-se que, quanto maior a duração do tratamento a 30°C, maior foi à velocidade de germinação e a germinabilidade dos embriões após a transferência para

10°C (figura 4). Isto mostra que a remoção da dormência a 30°C é gradativa. Embriões incubados por mais de 8 horas nesta temperatura iniciaram a germinação antes da transferência.

Mesmo incubando os embriões a 30°C por 10 horas, a posterior transferência para 10°C não assegurou alta germinabilidade e velocidade de germinação, quando comparado aos embriões que permaneceram continuamente a 30°C.

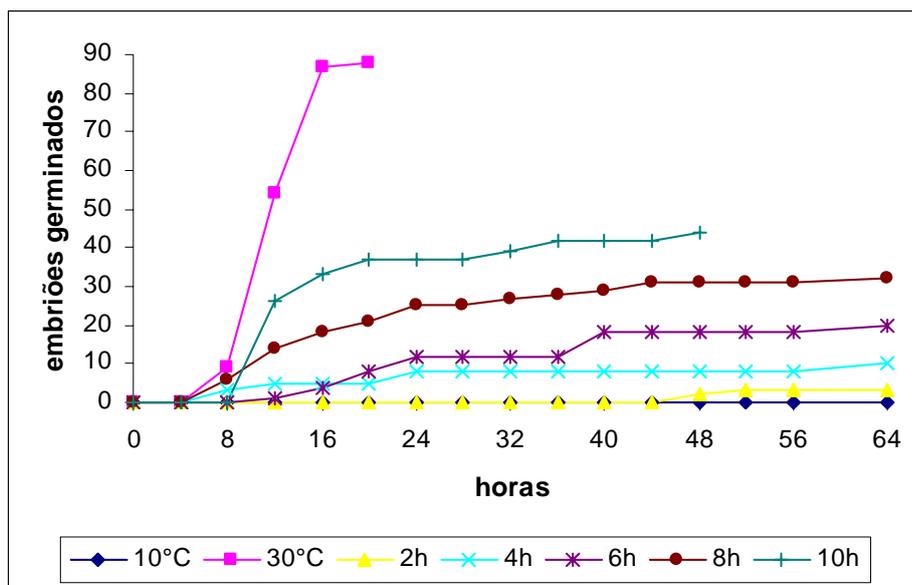


Figura 4 – Germinação de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.) a 10°C após diferentes tempos de incubação a 30°C (2; 4; 6; 8 e 10 horas), e germinação de embriões de girassol a 30°C e 10°C sem mudança de temperatura. (n=90 / tratamento)

Vale ressaltar que o tempo zero de contagem de embriões germinados ao final do experimento foi a partir do momento de transferência, ou seja, embriões que germinaram antes da transferência foram retirados da contagem, como no caso da transferência a 8 e 10 horas que havia 22,22% e 26,66% de germinabilidade, respectivamente, no momento da transferência.

Comparando-se as germinabilidades entre os tratamentos, podemos considerar que, em relação ao controle a 30°C (G=97,78%), menores tempos de incubação nesta temperatura resultaram em menores germinabilidades (figura 5). Após as transferências para 10°C as germinabilidades foram: 2 horas – 3,33%; 4 horas – 11,11%; 6 horas – 22,22%; 8 horas – 32,50% e 10 horas 46,97%. Isto mostra que a quebra da dormência por efeito da temperatura de 30°C é gradativa.

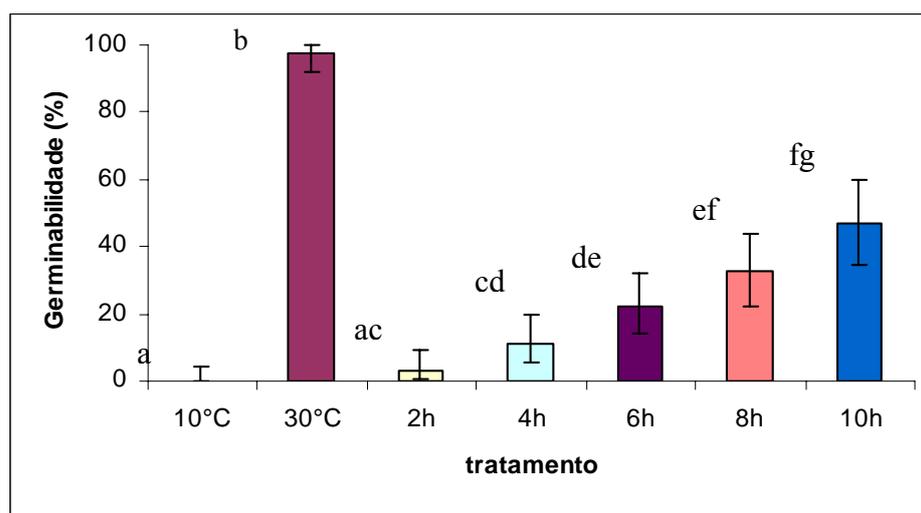


Figura 5 – Germinabilidade de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.) a 10°C após incubação por diferentes períodos de tempo a 30°C, e germinação de embriões mantidos continuamente a 10°C e 30°C. Lote 2005

* Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelos intervalos de confiança das germinabilidades (n=90 / tratamento) Tablas Científicas, Documenta Geigy 1965.

Os parâmetros de germinação indicados na tabela 3 mostram que os tempos médios de germinação não são diferentes estatisticamente, exceto o tratamento após 2 horas.

Tabela 3 – Germinação de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.) após transferência de 30°C para 10°C, lote 2005.

Tratamento	N	Tempo Médio Germinação (horas)	Velocidade Média (horas ⁻¹)	Variância da Velocidade Média (horas ⁻²)	Variância do Tempo Médio (horas ²)	Desvio Padrão Tempo Médio
30°C	90	12,82 a	7,80.10 ⁻²	3,22.10 ⁻⁴	8,70	2,94
Após 2h	90	53,00 b	1,89.10 ⁻²	7,27.10 ⁻⁶	57,33	7,57
Após 4h	90	20,40 a	4,09.10 ⁻²	2,80.10 ⁻³	484,27	22,00
Após 6h	90	21,40 a	4,67.10 ⁻²	8,53.10 ⁻⁴	178,99	13,37
Após 8h	80	15,15 a	6,60.10 ⁻²	3,27.10 ⁻³	172,54	13,13
Após 10h	66	9,29 a	10,8.10 ⁻²	1,28.10 ⁻²	95,61	9,77

* letras iguais dentro da mesma coluna indicam que não há diferença estatística entre os tempos médios, conforme o teste do Mann-Whitney (P<0,05). Biostat 2.0.

Observa-se também que períodos crescentes de incubação a 30°C aumentam a uniformidade na germinação, conforme pode se constatar na redução dos desvios padrões (tabela 3).

Em relação à pequena germinação após 2 horas de incubação a 30°C, pode-se inferir que não houve tempo suficiente de embebição para que fossem realizados os processos metabólicos que ativassem a germinação nos embriões (figura 1), como nos

embriões que ficaram mais tempo incubados a 30°C. O tempo médio e a velocidade de germinação deste tratamento mostraram-se semelhantes ao apresentado pelos embriões incubados a 10°C+etileno (tabela 2). Porém, ao contrário dos embriões incubados a 10°C+etileno, os embriões transferidos após 2 horas de incubação a 30°C germinaram quantitativamente semelhantes aos incubados continuamente a 10°C, sem etileno (figura 2).

Nos demais tempos de transferências (4, 6, 8, e 10 horas) as velocidades médias aumentaram gradativamente com o aumento do tempo de incubação a 30°C, reafirmando os resultados já observados anteriormente que a quebra da dormência é um processo progressivo.

Os resultados apresentados sugerem que houve quebra de dormência nos embriões de forma gradual, mas, no entanto, quando transferidas para 10°C houve um aparente recuo no processo, não permitindo atingir alta germinabilidade como nos embriões incubados continuamente a 30°C (figura 4).

5.5 Germinabilidade após retorno de embriões de girassol a temperatura inicial de incubação.

Após os resultados apresentados no qual a temperatura influenciou na cinética da germinação o seguinte experimento tem o objetivo de verificar se o perfil da germinação dos embriões que ao retornarem para incubação na temperatura inicial (30°C) retomam a velocidade de germinação.

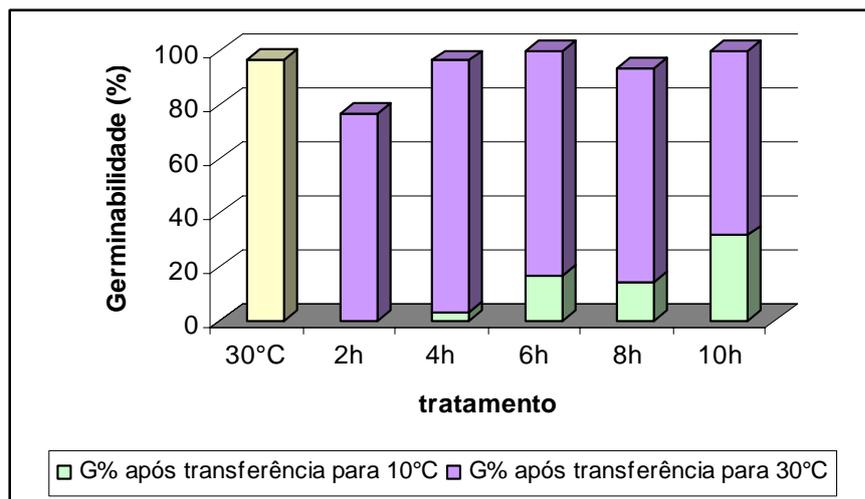


Figura 6: Germinabilidade de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.) após transferência de 30°C para 10°C (em verde); após esta transferência, os embriões que não germinaram a 10°C foram novamente transferidos para 30°C (em roxo). Germinabilidade dos embriões mantidos continuamente a 30°C (n=30 / tratamento).

Os resultados apresentados na figura 6 mostram que os embriões de girassol ao serem transferidos de 30°C para 10°C apresentam um gradativo aumento na germinabilidade, corroborando com os dados anteriormente mostrados. As germinabilidades alcançadas pelos embriões após transferência de 30°C para 10°C: 2 horas (0), 4 horas (3,33%), 6 horas (16,66%), 8 horas (14,28%) e 10 horas (31,81%). No entanto, devido à baixa germinação em relação aos embriões incubados continuamente a 30°C, a questão foi verificar se os embriões que não germinaram a 10°C haviam entrado novamente em dormência, ou perdido a viabilidade. Para isto, os embriões que após 24 horas não haviam ainda germinado a 10°C, foram novamente transferidos para 30°C. Com a transferência, estes apresentaram uma retomada na germinação, atingindo um aumento significativo na germinabilidade (figura 6 – em roxo). As germinabilidades após o retorno a 30°C foram: 2 horas (76,67%), 4 horas (93,10%), 6 horas (88%), 8 horas (79,16%) e 10 horas (77,77%) e do controle contínuo a 30°C (96,67%).

Os resultados mostram que os embriões transferidos para 10°C não perderam viabilidade, pois sua transferência de volta a 30°C resultou em alta germinabilidade. Então, isto permite concluir que os embriões, ao serem transferidos para a temperatura mais baixa, expressaram novamente a dormência.

Os parâmetros de germinação apresentados na tabela 4 mostram que os tempos médios não se apresentaram similares ao controle (contínuo a 30°C), provavelmente pelo variado número de embriões que germinaram. Entretanto, a

uniformidade de germinação foi similar, a julgar pelos desvios padrões dos tempos médios (tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros de germinação de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.) após a transferência de 30°C para 10°C, lote 2005. Tempo médio de germinação, velocidade média de germinação, variância do tempo médio, desvio padrão da variância do tempo médio e variância da velocidade média. Dados expressos em horas. N=30 sementes por tratamento (controle, após 2, 4 e 6 horas) N=28 (após 8 horas) e N=22 (após 10 horas).

Tratamento	N	Nº embriões germinados	Tempo Médio (horas)	Variância do Tempo Médio (horas ²)	Desvio Padrão Tempo Médio	Velocidade Média (horas ⁻¹)	Variância da Velocidade Média (horas ⁻²)
30° (controle)	30	29	12.97	4.18	2.04	7,71.10 ⁻²	1,48.10 ⁻⁴
Após 2h	30	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0,00
Após 4h	30	1	8.00	0.00	0.00	1,25.10 ⁻¹	0,00
Após 6h	30	5	20.00	8.00	2.82	5.10 ⁻²	5,00.10 ⁻⁵
Após 8h	28	4	15.00	4.00	2.00	6,67.10 ⁻²	7,90.10 ⁻⁵
Após 10h	22	7	5.71	4.57	2.13	1,75.10 ⁻¹	4,29.10 ⁻³

Os parâmetros de germinação dos embriões não germinados a 10°C, e transferidos de volta a 30°C, estão apresentados na tabela 5. Observa-se certa heterogeneidade entre os parâmetros de germinação, provavelmente devido ao baixo número de embriões germinados. Entretanto, corrobora que os embriões estavam viáveis a 10°C, mas não germinaram.

Tabela 5 - Parâmetros de germinação de embriões de girassol (*Helianthus annuus* L.) a 30°C após 24 horas de incubação a 10°C, lote 2005. Os tratamentos se referem aos períodos de incubação a 30°C, antes da transferência a 10° C.

Tratamento	N	Nº embriões germinados	Tempo Médio (horas)	Variância do Tempo Médio (horas ²)	Desvio Padrão Tempo Médio	Velocidade Média (horas ⁻¹)	Variância da Velocidade Média (horas ⁻²)
30° (controle)	30	29	12.97	4.18	2.04	7,71.10 ⁻²	1,48.10 ⁻⁴
Após 2h	30	23	22.61	80.89	8.99	4,42.10 ⁻²	3,10.10 ⁻⁴
Após 4h	29	27	19.11	84.10	9.17	5,3.10 ⁻²	6,30.10 ⁻⁴
Após 6h	25	22	8.40	9.94	3.15	1,9.10 ⁻¹	2,0.10 ⁻³
Após 8h	24	19	18.10	82.59	9.08	5,53.10 ⁻²	7,70.10 ⁻⁴
Após 10h	15	14	9.14	18.29	4.27	1,09.10 ⁻¹	2,62.10 ⁻³

De maneira geral, os resultados permitem concluir que a dormência em girassol é uma característica que se manifesta apenas em temperaturas baixas. Tanto a incubação em etileno, quanto à transferência dos embriões para temperaturas mais altas, promovem a germinação. Além disto, a decisão de germinar parece ser um processo progressivo, ou ocorrer pouco antes da protrusão da radícula, de acordo com os

resultados obtidos com os experimentos de transferência dos embriões de 30°C para 10°C. Com o propósito de se investigar este processo em nível bioquímico, partiu-se para estudos proteômicos da quebra da dormência de girassol, através de experimentos de eletroforeses e fluorogramas.

5.6 Perfis eletroforéticos de embriões de girassol dormentes, germinantes e germinados.

Proteínas destacadas nas elipses na sua maioria são comuns a todos os géis, mas nem todas estão presentes nos fluorogramas. Isto sugere que tais proteínas não são sintetizadas *de novo*, provavelmente não tendo participação direta no metabolismo iniciado com a embebição.

A maior parte das proteínas sintetizadas *de novo* ocorrem na faixa ácida, abaixo de ~pH6,8, e acima de ~31KDa. A grande quantidade e sobreposição de *spots* nesta região limitam uma análise e comparação mais precisa. Quando possível isto foi realizado, mas as comparações entre géis e fluorogramas dentro de um mesmo tratamento, e entre diferentes tratamentos, predominam na faixa de peso molecular abaixo de 31KDa.

5.6.1 Perfis eletroforéticos de embriões dormentes e germinantes

Com o objetivo de verificar se proteínas de embriões de girassol, dormentes e germinantes, que são removidas ou sintetizadas sob o efeito do tratamento com etileno a 10°C são as mesmas pelo tratamento de alta temperatura (30°C), foram analisados os perfis de géis NEPHGE-PAGE e fluorogramas (figuras 7, 8 e 9).

➤ 10°C (Figura 7):

Gel e fluorograma (figuras 7A e 7B): No gel obtido de embriões dormentes, as setas 1, 4, 5, 6, 7 e 8 indicam proteínas que aparecem fracamente no gel, mas estão bem definidas no fluorograma. As setas 1, 6 e 8 indicam proteínas com correspondentes nos géis 8A e 9A. As setas 2, 3 e 4 indicam proteínas que somente são sintetizadas neste tratamento, não havendo correspondente nos demais géis.

➤ **10°C+etileno (figura 8):**

Gel e fluorograma (figuras 8A e 8B): o gel obtido de embriões germinantes (incubados por 12 horas a 10°C com etileno) é muito semelhante ao perfil do tratamento dos embriões incubados a 10°C sem etileno (figura 7A), sendo que as pequenas diferenças foram apresentadas somente no respectivo fluorograma 8B, no qual a seta 10 indica a síntese de uma proteína de baixo peso molecular e há correspondente somente no fluorograma 9B. As setas 7 e 9 apresentaram uma fraca síntese de duas proteínas e que há semelhança somente na figura 7B.

➤ **10°C (figura 9):**

Gel (figura 9A): neste gel foi obtido o perfil de embriões também germinantes (incubados por 8 horas a 30°C) e apresenta poucas diferenças em relação aos géis 8A e 9A. As setas 11, 12, 13 e 14 indicaram a presença de proteínas que não apresentaram correspondentes com os demais géis (7A e 8A). Já as setas 10 e 11 indicam proteínas de baixo peso molecular que estão presentes somente neste fluorograma.

Na tabela 6 se encontram os pesos moleculares e pontos isoelétricos dos polipeptídeos indicados nas figuras anteriores.

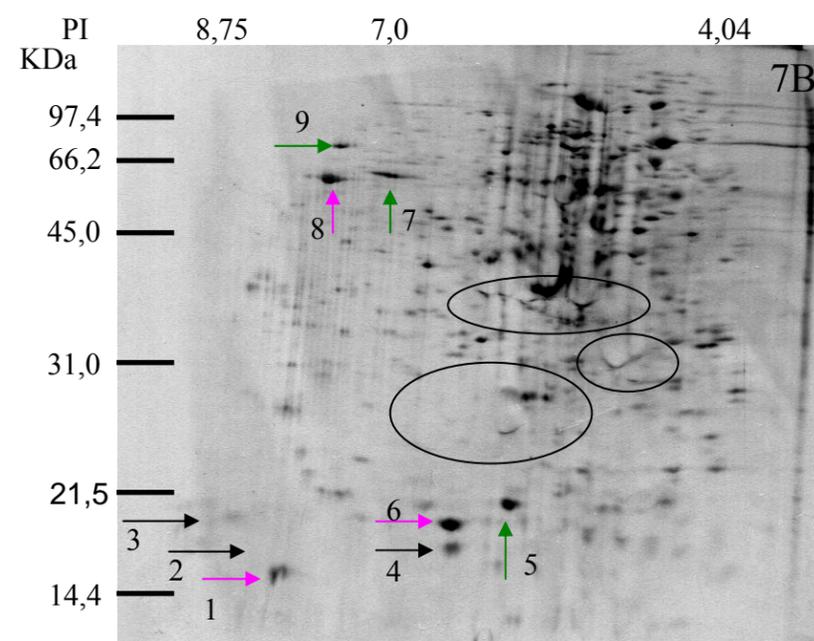
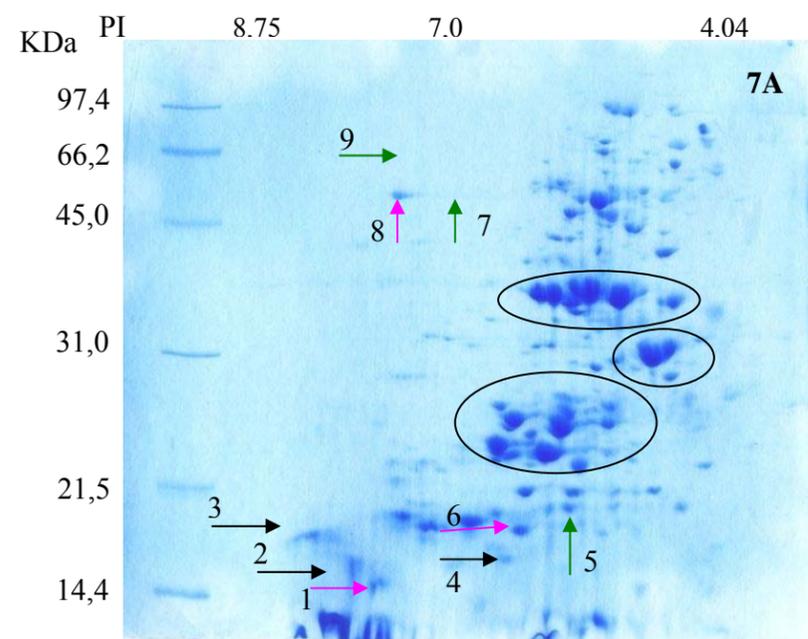


Figura 7 – Gel (7A) e fluorograma (7B) de amostra de embriões de girassol (65 µg), incubados por 36 horas a 10°C. Os embriões foram marcados com ³⁵S-met 12 horas antes da extração das proteínas (embriões dormentes). Setas pretas indicam proteínas específicas deste tratamento, setas rosa indicam proteínas similares presentes nos três tratamentos comparativos (bioensaio de quebra da dormência) e setas verdes indicam proteínas presentes em somente dois tratamentos comparativos.

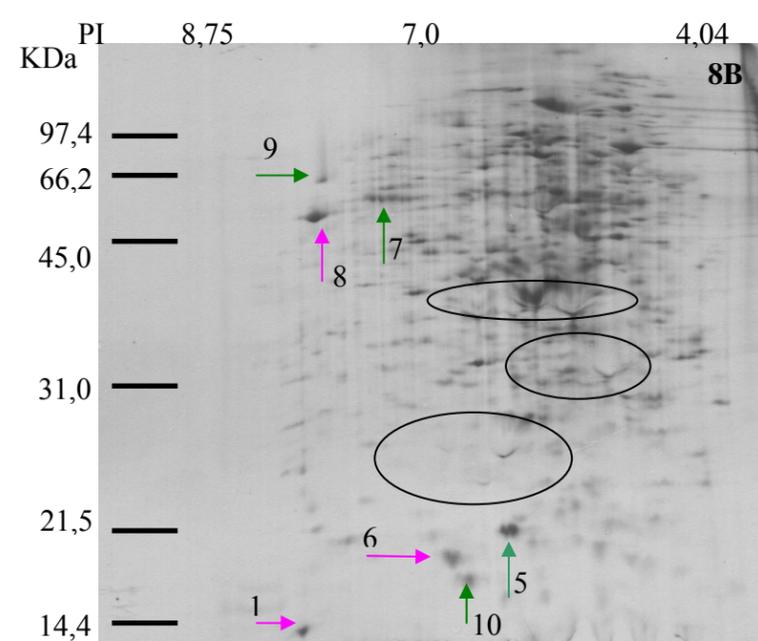
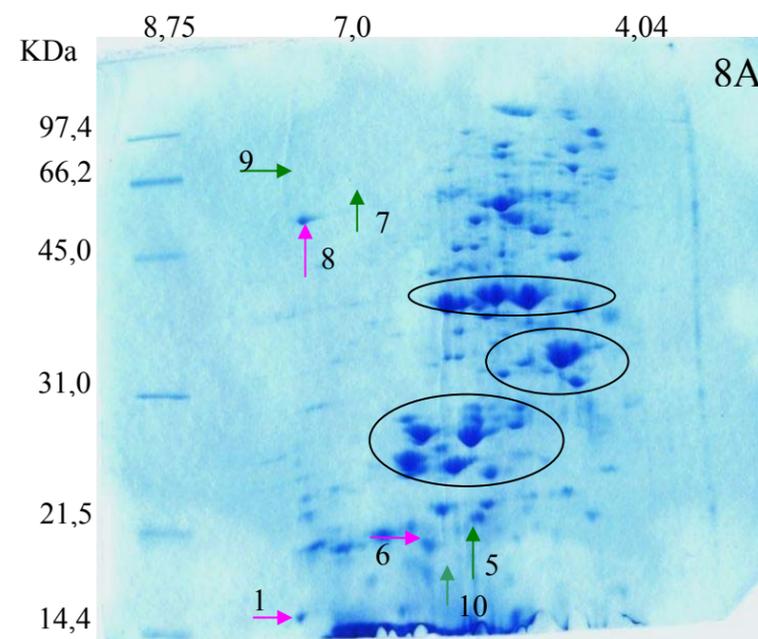


Figura 8 – Gel (8A) e fluorograma (8B) de amostra de embriões de girassol (65 µg), incubados por 12 horas a 10°C com etileno. Os embriões foram marcados com ³⁵S-met 6 horas antes da extração das proteínas (embriões germinantes). Setas pretas indicam proteínas específicas deste tratamento, setas rosa indicam proteínas similares presentes nos três tratamentos comparativos (bioensaio de estudos de quebra da dormência), setas verdes indicam proteínas presentes em somente dois tratamentos comparativos.

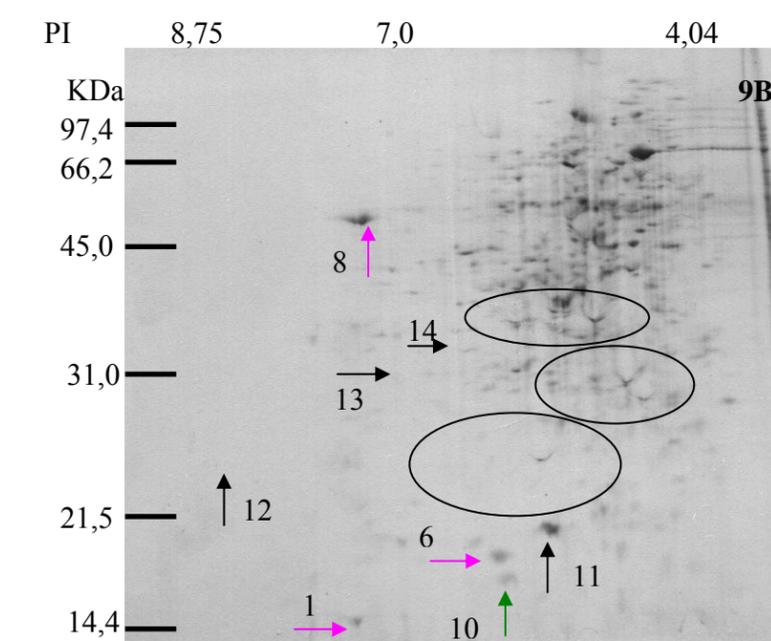
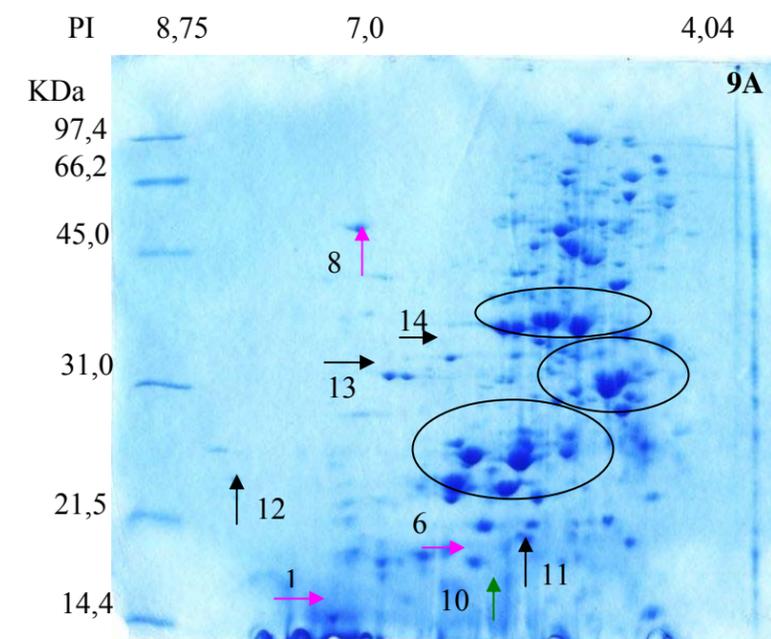


Figura 9 – Gel (9A) e fluorograma (9B) de amostra de embriões de girassol (65 µg), incubados por 8 horas a 30°C. Os embriões foram marcados com ³⁵S-met 6 horas antes da extração das proteínas (embriões germinantes). Setas pretas indicam proteínas específicas deste tratamento, setas rosa indicam proteínas similares presentes nos três tratamentos comparativos (bioensaio de estudos de quebra da dormência), setas verdes indicam proteínas presentes em somente dois tratamentos comparativos.

Tabela 6 - Proteínas apontadas para comparações nos géis e fluorogramas das figuras 7, 8 e 9.

	Proteína	PM (KDa) aproximado	PI aproximado
Figura 7	1	14,4	8,25
	2	16,0	8,25
	3	19,0	8,5
	4	16,0	7,16
	5	21,5	6,34
	6	20,0	7,16
	7	64,0	7,0
	8	64,0	7,8
	9	66,2	7,8
Figura 8	1	14,4	8,25
	5	21,5	6,34
	6	20,0	7,16
	8	64,0	7,8
	7	64,0	7,0
	9	66,2	7,8
	10	16,0	7,16
Figura 9	1	14,4	8,25
	6	21,5	5,18
	8	64,0	7,8
	10	16,0	7,16
	11	20,0	6,34
	12	23,0	8,75
	13	31,0	7,0
	14	33,0	7,16

De maneira geral, os géis apresentam perfis semelhantes. Apesar das similaridades qualitativas entre os perfis protéicos de embriões dormentes e germinantes, os tratamentos de quebra de dormência apresentam pequenas distinções quando comparados ao controle, e quando comparados entre si. A maioria das proteínas sintetizada *de novo* não coincide com as já presentes no embrião.

5.6.2 Perfil eletroforético de embriões germinados e não germinados após transferências entre temperaturas

Com o objetivo de analisar os perfis protéicos de embriões de girassol tratados com diferentes temperaturas, com ou sem aplicação de etileno, foram delineados experimentos de transferência dos embriões de temperaturas baixas para altas, e vice e versa. Além disto, os embriões não-germinados na temperatura mais baixa ou receberam etileno ou foram transferidos para 30°C, sendo posteriormente solubilizadas as proteínas para efeitos de comparação aos perfis de embriões não-germinantes. Foram comparados também perfis de embriões não germinados com germinados.

- **Figura 10:** Observou-se que esta figura aparentemente apresenta maior quantidade de proteínas que os demais géis e fluorogramas (figuras 11 e 12).

Gel (10A): no gel obtido de embriões germinantes, as proteínas indicadas pelas setas 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 são fracamente expressas no gel, e somente a proteína indicada pela seta 8 tem proteína correspondente nos géis 11A e 12A, indicadas pelas setas 12 e 17, respectivamente.

Fluorograma (10B): as setas 1, 2 e 3 indicam proteínas que foram sintetizadas intensamente e bem definidas em relação ao gel 10A. Somente as proteínas indicadas pelas setas 2 e 8 tem correspondentes nos fluorogramas 11B e 12B; a seta 2 corresponde as setas 9 e 13, figuras 11B e 12B, respectivamente; e a seta 8 corresponde a seta 12 e a seta 17 nas figuras 11B e 12B, respectivamente.

- **Figura 11:**

Gel (11A): no gel obtido de embriões germinados, a proteína indicada pela seta 12 tem correspondente nos géis 10A e 12A, que são as indicadas pelas setas 8 e 17, respectivamente.

Fluorograma (11B): A seta 10 indica uma proteína ausente nos fluorogramas 10B e 12B.

- **Figura 12:**

Gel (12A): sutis diferenças são detectadas neste gel, obtido de embriões não germinados, em relação ao gel 11A. As mais representativas são as proteínas de baixo e médio peso molecular indicadas pelas setas 14 e 15.

Fluorograma (12B): a proteína indicada pela seta 15 não está presente no fluorograma 11B, e a proteína indicada pela seta 14 é fracamente sintetizada neste fluorograma e pouco aparece no respectivo gel. A seta 14 indica uma proteína sem correspondente nos demais fluorogramas.

Na tabela 7 se encontram os pesos moleculares e pontos isoelétricos dos polipeptídeos indicados nas figuras 10, 11 e 12.

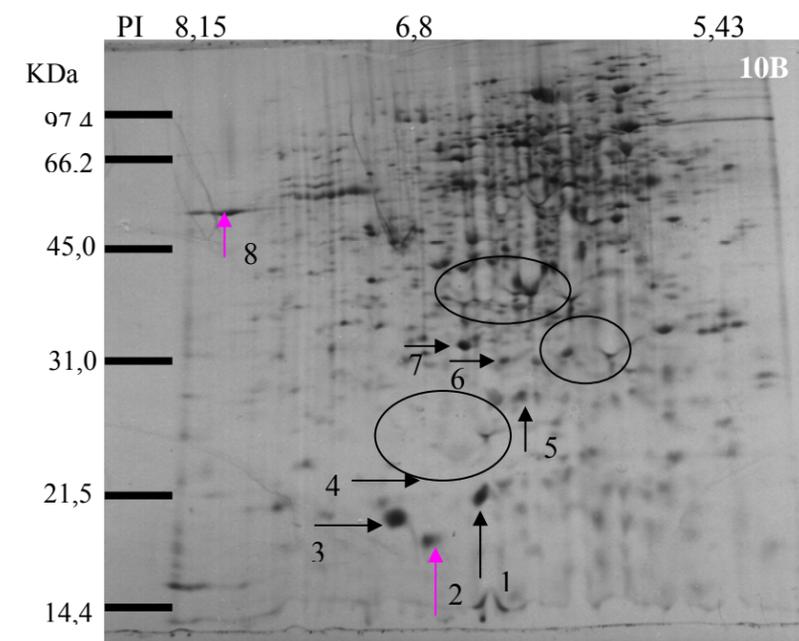
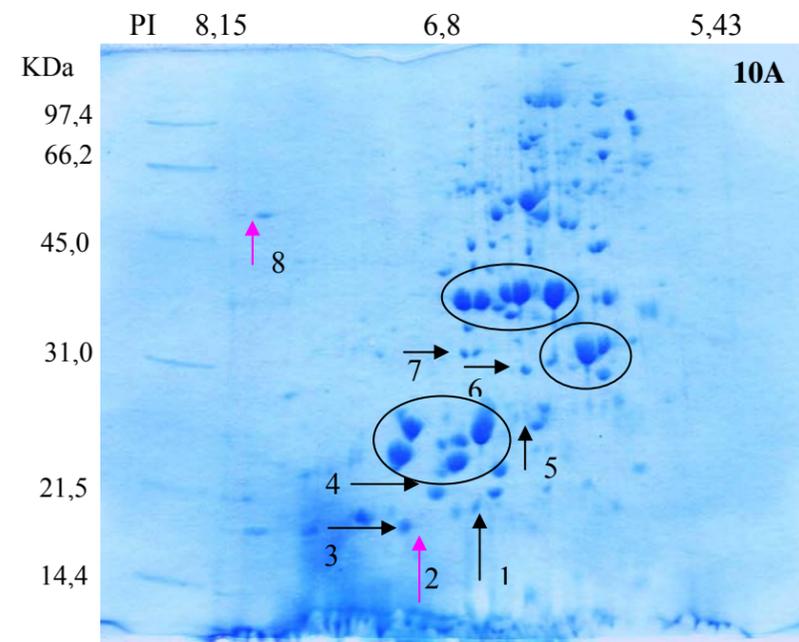


Figura 10 – Gel (10A) e fluorograma (10B) de amostra de embriões de girassol (65 µg), incubados por 16 horas a 10°C. Os embriões foram marcados com ³⁵S-met 8 horas antes da extração das proteínas (embriões não germinados). Setas pretas indicam proteínas específicas deste tratamento, setas rosa indicam proteínas similares presentes nos três tratamentos comparativos (10°C+etileno - após transferências de temperatura).

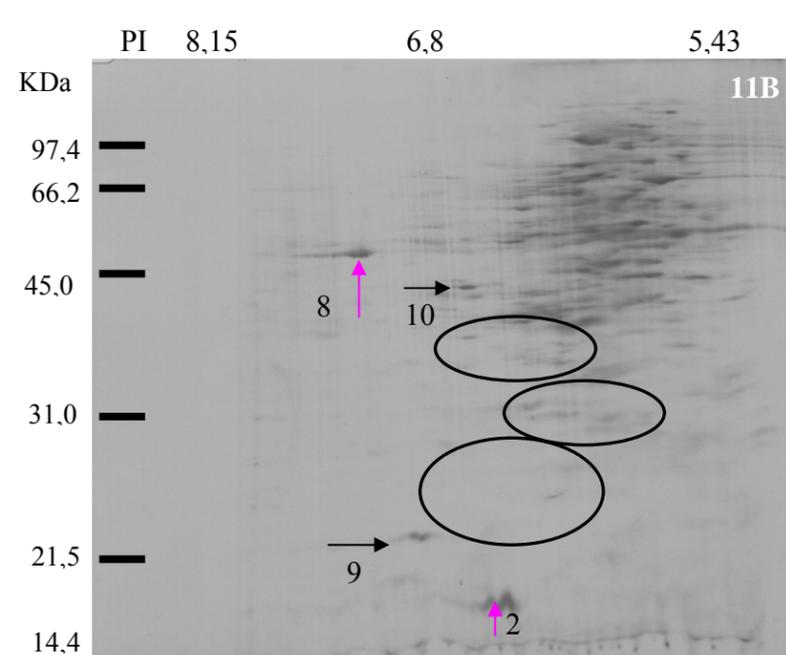
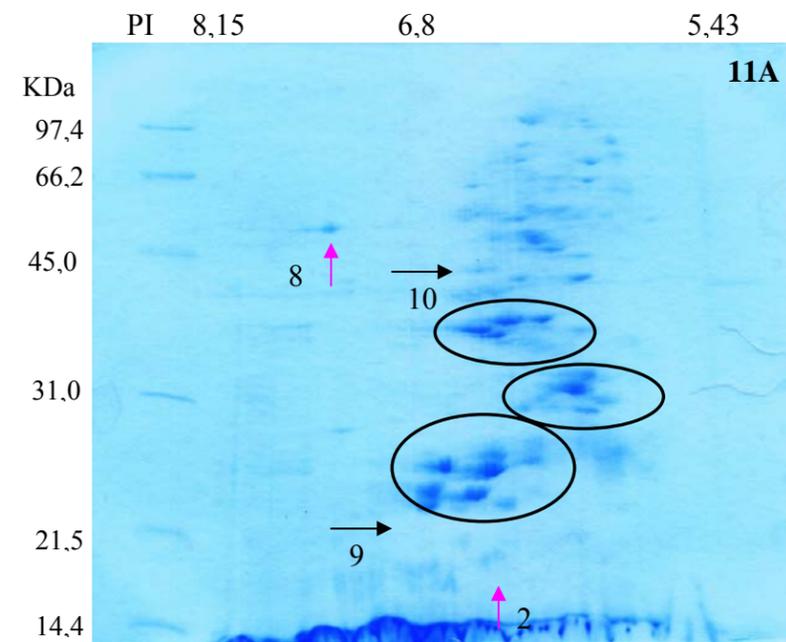


Figura 11 – Gel (11A) e fluorograma (11B) de amostra de embriões de girassol (65 µg) incubados a 30° C por 8 horas, e transferidos para 10°C. Após 16 horas sem germinar, foi aplicado etileno (50 µL/L) e ³⁵S-met por 8 h antes da extração das proteínas (embriões germinados). Setas pretas indicam proteínas específicas deste tratamento, setas rosa indicam proteínas similares presentes nos três tratamentos comparativos (10°C+etileno - após transferências de temperatura).

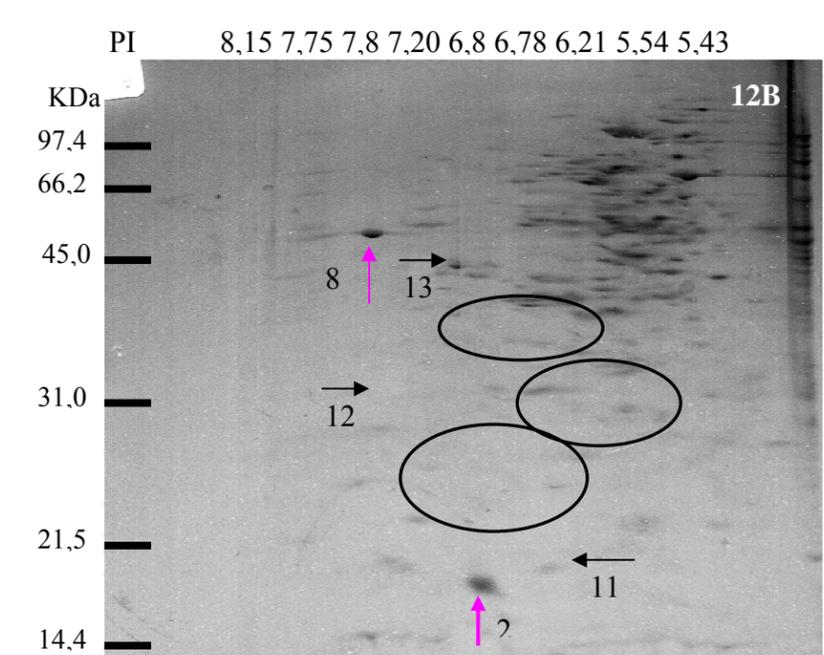
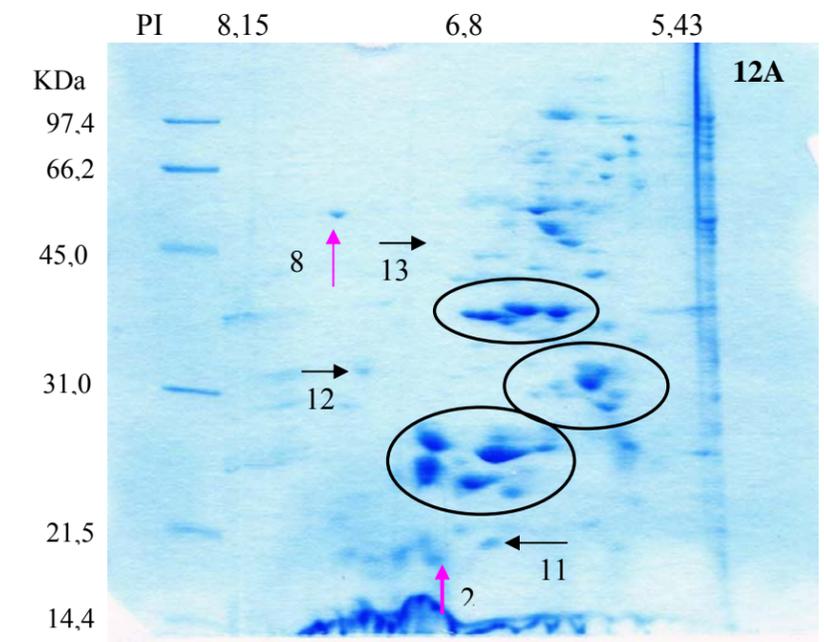


Figura 12 – Gel (12A) e fluorograma (12B) de amostra de embriões de girassol (65 µg) incubados a 30° C por 8 horas, e transferidos para 10°C. Após 16 horas sem germinar, foi aplicado etileno e ³⁵S-met por 8 h antes da extração das proteínas (embriões não germinados). Setas pretas indicam proteínas específicas deste tratamento, setas rosa indicam proteínas similares presentes nos três tratamentos comparativos (10°C+etileno - após transferências de temperatura).

Tabela 7 – Proteínas apontadas para comparações nos géis e fluorogramas das figuras 10, 11 e 12.

	Proteína	PM (KDa) aproximado	PI aproximado
Figura 10	1	21,5	6,78
	2	16,0	6,8
	3	20,0	7,20
	4	21,5	6,8
	5	28,0	6,78
	6	31,0	6,78
	7	32,0	6,8
	8	46,0	7,8
Figura 11	2	16,0	6,8
	8	46,0	7,8
	9	22,0	7,20
	10	44,0	6,8
Figura 12	2	16,0	6,8
	8	46,0	7,8
	11	20,0	6,21
	12	32,0	7,8
	13	44,0	6,8

Foi observada que entre estes tratamentos há uma maior síntese de proteínas quando os embriões são incubados continuamente a 10°C, sem pré-tratamento. Os perfis protéicos das figuras 11 e 12, em que os embriões foram pré-tratados por 8 horas a 30°C, transferidos para 10°C, e posteriormente aplicado o etileno, são também bastante semelhantes. De maneira geral, proteínas de baixo peso molecular aparecem nos géis dos embriões não-germinantes (figuras 10A e 12A), mas não aparecem no gel de embriões germinantes (11A). Tal fato se evidencia nos fluorogramas 10B, 11B e 12B, que apresentam a síntese de uma mesma proteína, indicada pelas seta 2. mas que nos fluorogramas de embriões não germinados (figuras 10B e 12B) se encontra ligeiramente

mais intensa. Isto pode estar resultando do efeito de baixa temperatura nos embriões, e/ou consequência da não germinação.

➤ **Figura 13:**

Gel (13A): no gel obtido de embriões germinados, as proteínas indicadas pelas setas 7 e 8 mostram que estas apresentam correspondência nos géis 14A e 15A; a seta 6 mostra corresponde somente no gel 14A

Fluorograma (13B): as setas 1, 2, 3 e 4 indicam que as proteínas são apresentadas somente neste fluorograma.

➤ **Figura 14:**

Gel (14A): no gel obtido de embriões germinados, as setas 9, 10, 11 e 12 indicam que estas proteínas apresentam-se somente neste tratamento, não havendo correspondente em nenhum dos demais géis (13A e 15A).

Fluorograma (14B): as setas 9, 10 e 12 indicam que estas proteínas foram sintetizadas. A proteína indicada pela seta 11 está presente no fluorograma, mas não no seu respectivo gel.

➤ **Figura 15:**

Gel (15A): o gel obtido de embriões ainda não germinados é muito semelhante aos demais géis. A baixa definição deste gel, entretanto, limita uma comparação mais precisa. Apresentando particularmente uma fraca síntese de proteínas.

Fluorograma (15B): as proteínas indicadas pelas setas 14 e 15 não estão presentes no respectivo gel (15A), nem apresentam correspondência nos demais fluorogramas.

Na tabela 8 se encontram os pesos moleculares e pontos isoelétricos dos polipeptídeos indicados nas figuras 13, 14 e 15.

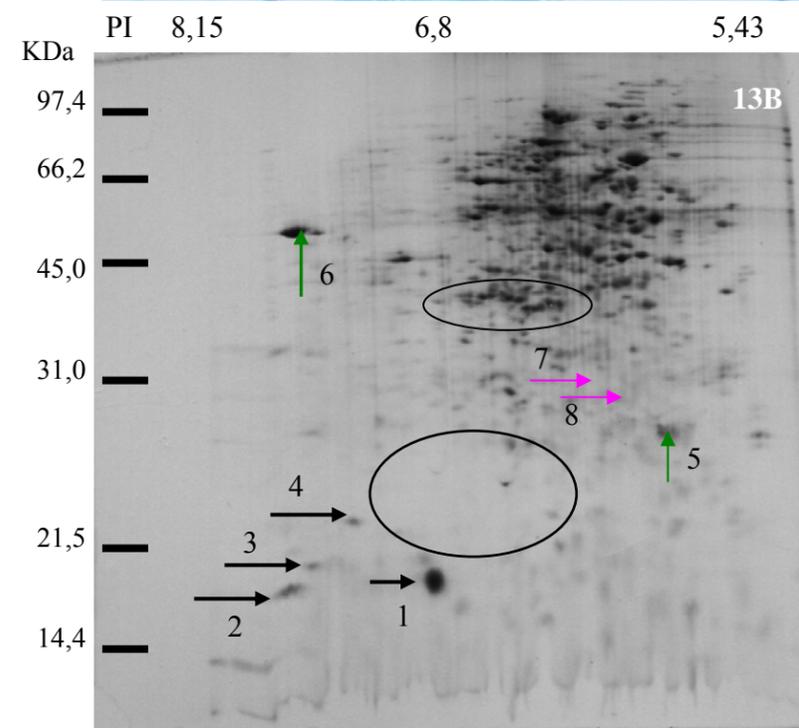
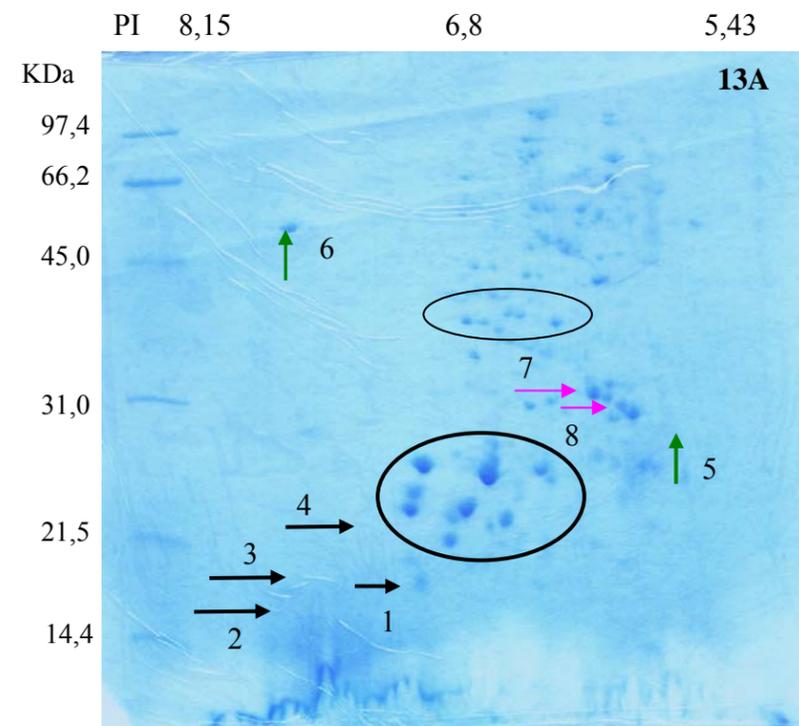


Figura 13 – Gel (13A) e fluorograma (13B) de amostra de embriões de girassol (65 µg) incubados a 30°C por 16 horas. Foi aplicado ³⁵S-met 8 h antes da extração das proteínas (embriões germinados). Setas pretas indicam proteínas específicas deste tratamento, setas rosa indicam proteínas similares presentes nos três tratamentos comparativos (30°C - após transferências de temperatura), setas verdes indicam proteínas similares somente em dois tratamentos comparativos.

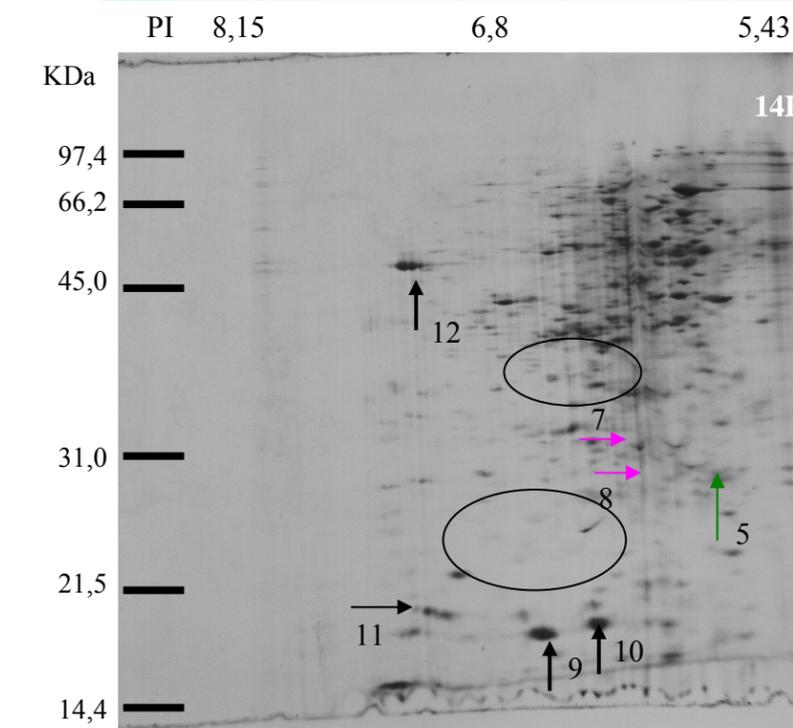
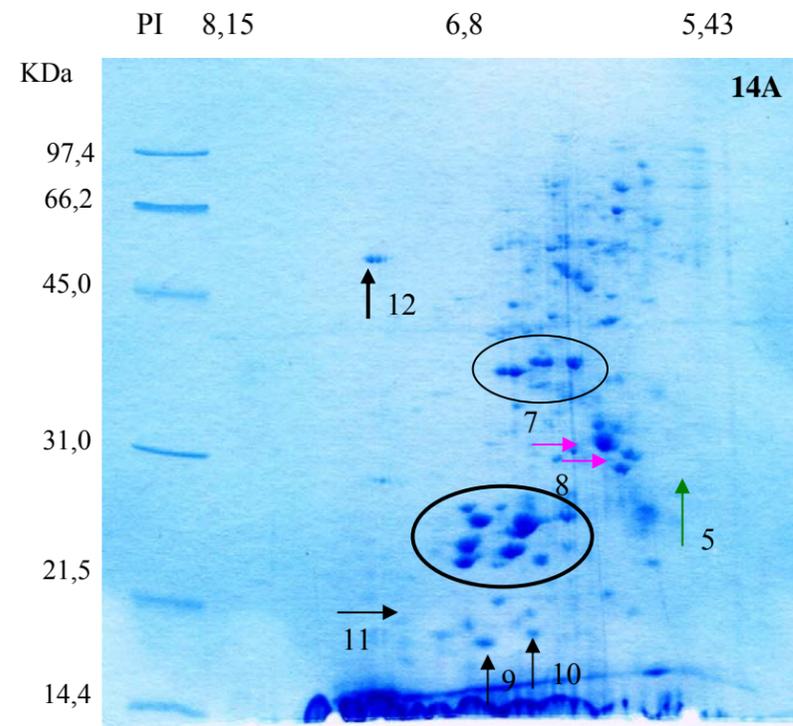


Figura 14 – Gel (14A) e fluorograma (14B) de amostra de embriões de girassol (65 µg) incubados a 30°C por 8 horas, e transferidos para 10°C. Após 16 horas sem germinar, os embriões foram transferidos novamente para 30°C e aplicado ³⁵S-met por 8 h antes da extração das proteínas (embriões germinados). Setas pretas indicam proteínas específicas deste tratamento, setas rosa indicam proteínas similares presentes nos três tratamentos comparativos (30°C - após transferências de temperatura), setas verdes indicam proteínas similares somente em dois tratamentos comparativos.

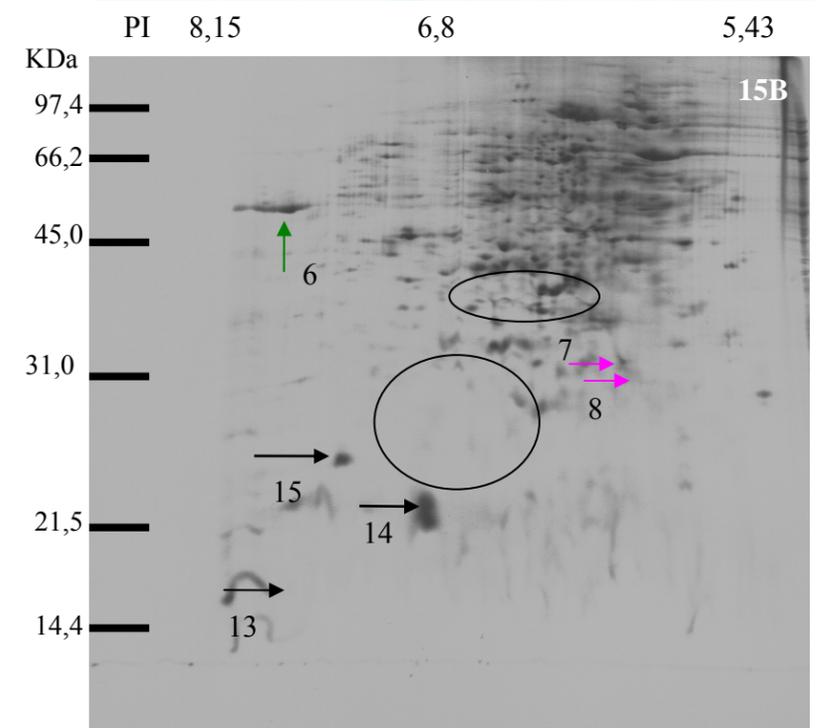
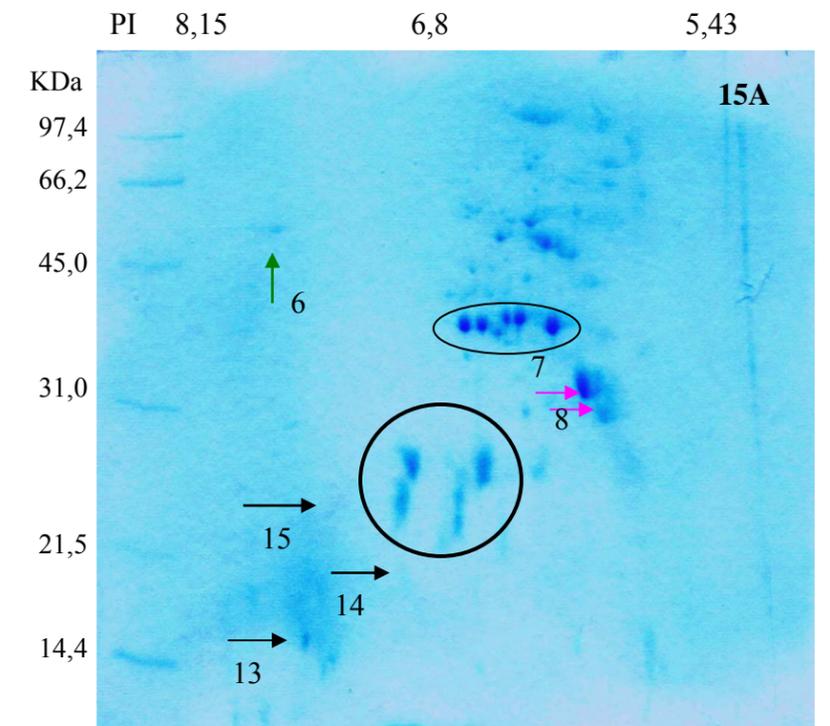


Figura 15 – Gel (15A) e fluorograma (15B) de amostra de embriões de girassol (65 µg) incubados a 30°C por 8 horas, e transferidos para 10°C. Após 16 horas sem germinar, os embriões foram transferidos novamente para 30°C e aplicado ³⁵S-met por 8 h antes da extração das proteínas (embriões ainda não germinados). Setas pretas indicam proteínas específicas deste tratamento, setas rosa indicam proteínas similares presentes nos três tratamentos comparativos (30°C - após transferências de temperatura), seta verde indica proteína similar somente em dois tratamentos comparativos.

Tabela 8 – Proteínas apontadas para comparações nos géis e fluorogramas das figuras 13, 14 e 15.

		PM (KDa)	PI
	Proteína	aproximado	aproximado
Figura 13	1	23,0	7,20
	2	17,0	7,75
	3	19,0	7,8
	4	22,0	7,20
	5	29,0	5,5
	6	46,0	7,75
	7	31,0	5,54
	8	30,0	5,54
Figura 14	5	29,0	5,5
	7	31,0	5,54
	8	30,0	5,54
	9	18,0	6,21
	10	19,0	6,21
	11	20,0	6,8
	12	46,0	7,20
Figura 15	6	46,0	7,75
	7	31,0	5,54
	8	30,0	5,54
	13	14,0	7,75
	14	21,5	7,20
	15	25,0	7,8

De forma geral, as proteínas de baixo peso molecular expressas com maior evidência nos fluorogramas, podem estar relacionadas com a síntese de proteínas de estresse (HSP- Heat Shock Proteins) (Waters et al.,1996). Isto fica mais evidente nos tratamentos de transferência de temperaturas entre 30 e 10°C. Estas proteínas podem ser sintetizadas para a recuperação de estresses osmótico e hídrico, como no caso do girassol, segundo os resultados observados nos estudos de Coca et al. (1994). No entanto, os perfis protéicos apresentados mostram a síntese de proteínas de baixo peso

molecular, diferenciando a manifestação de embriões germinados, germinantes e não germinados, após as mudanças de temperaturas. Isto permite sugerir que as proteínas de baixo peso molecular encontradas no presente estudo possam resultar do estresse térmico a que foram submetidas. A faixa de pesos moleculares destas proteínas estão dentro da faixa de peso molecular (entre 14-18 KDa) obtidos no trabalho de Coca *et al* (1994).

Os estudos mostraram diferenças sutis nos géis e fluorogramas de embriões dormentes e germinantes, submetidos a diferentes tratamentos térmicos. Embora os dados apresentados e suas interpretações estejam de acordo com a literatura, não está claro qual ou quais as proteínas, de fato, estão envolvidas no controle da germinação. Uma análise mais profunda destas diferenças como a identificação das proteínas cuja síntese se mostrou diferencial entre embriões germinantes e não germinantes permitirá maior conhecimento quanto ao mecanismo de controle da dormência e germinação de sementes.

6. Conclusões

- Os embriões de girassol quando recém-colhidos se apresentam dormentes quando incubados a 10°C.
- A quebra da dormência em embriões de girassol ocorre quando estes são incubados a 30°C e/ou quando são incubados a 10°C na presença de etileno.
- A germinação dos embriões de girassol a 30°C apresentou menor tempo médio de germinação, menor desvio padrão e maior germinabilidade em relação aos embriões germinados a 10°C.
- A quebra da dormência é mais rápida e uniforme quando os embriões de girassol são incubados a 30°C que quando incubados a 10°C com etileno.
- A quebra da dormência a 30°C em embriões de girassol é um processo gradativo.
- Os perfis protéicos de embriões dormentes e germinantes de girassol se apresentaram bastante similares.
- A presença de proteínas de baixo peso molecular encontradas nos perfis protéicos dos experimentos de quebra da dormência e dos experimentos de transferências de temperaturas sugere que estas resultam do estresse térmico a que foram submetidas, e que elas podem estar relacionadas com a quebra da dormência.

7 - Bibliografia

- Almoguera, C. & Jordano, J. 1992. Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stores low molecular weight heat shock proteins and leaf mRNAs. **Plant Molecular Biology** 19: 781-792
- Araújo, J.L.S.; Margis-Pinheiro, M.. & Rumjanek, N.G. 1998. Proteínas de Choque e Tolerância a Altas Temperaturas em Plantas. **Embrapa-CNPAB Documentos** 80 27p
- Ayres, M.; Ayres, M.J.; Ayres, D.L. & dos Santos A.S. 2000. **Bioestat 2.0** Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. 193p.
- Balla, A.; Castiglioni V. B. R. & de Castro C.1997. Colheita do Girassol. Londrina: **EMBRAPA-CNPSO. Documentos.** 92: 25p.
- Barduche, D.; R. Paiva; M. A. Lopes & E. Paiva, 1999. Effect of ABA and GAs on protein mobilization in embryos and cotyledons of angico (*Anadenathera peregrina* (L.) Speng.) seeds during germination. **Brazilian Archives of Biology Technology** . 42(2): 135-144.
- Baskin, C. & Baskin, J.M. 2000. Ecology and evaluation of specialized seed dispersal, dormancy and germination strategies. **Plant Species Biology** 15: 95-96
- Beaudoin, N.; Serizet C.; Gosti F. & Giraudat J, 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. **The Plant Cell** 12: 1103-1115.
- Benech-Arnold, R.; Enciso, S.; Sánchez, R.A. & Rodríguez M.V. 2003. On the hormonal nature of the stimulatory effect of high incubation temperatures on germination of dormant sorghum (*S.bicolor*) caryopses. **New Phytologist** 160: 371-377.
- Bewley, J.D., 1997. Seed Germination and Dormancy, **The Plant Cell** 9: 1055-1066.
- Bewley, J.D. & Black M. 1994. Seeds: Physiology of Development and Germination, 2^a ed. **Plenum Press**, New York. 445p.
- Borghetti, F.; Noda, F.N. & Cezar, M.de S. 2002. Possible involvement of proteasome activity in ethylene-induced germination of dormant sunflower embryos. **Brazilian Journal Plant Physiology** 14(2): 125-131.
- Borghetti, F. 2004. Dormência Embrionária. *In*: Ferreira, A. G. & Borghetti, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed, Porto Alegre, p. 109 -123.

- Borghetti, F. & Ferreira, A.G. 2004. Interpretação de resultado de germinação. *In*: Ferreira, A.G. & Borghetti, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed, Porto Alegre, p. 209-224.
- Bradford, M. .M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.
- Brady, S.M. & McCourt, P. 2003. Hormone Cross-Talk in Seed Dormancy. **Journal Plant Growth Regulation** 22: 25-31.
- Cardoso, V.J.M. 2004. Dormência: estabelecimento do processo. *In*: Ferreira, A. G. & Borghetti, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed, Porto Alegre, p. 95-108.
- Castro, C. de; Castiglioni, V.R.B.; Balla, A.; Leite, R.M.V.B.C.; Karma, D.; Mello, H. C.; Guedes, L. C. & Farias, J.R.B. 1997. A cultura do Girassol. Londrina: **EMBRAPA-CNPSO**. Circular Técnica 13. 36p.
- Castro, de R.D. & Hilhorst, H.W.M. 2000. Dormancy, germination and the cell cycle in developin and imbibing tomato seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 12:105-136
- Castro, de R.D. & Hilhorst, H.W.M. 2004. Germinação. *In*: Ferreira, A. G. & Borghetti, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed, Porto Alegre, p149-162.
- Chaisompongpan, N; Li, P.H.; Davis, D.W. & Markhart, A.H. 1990. Photosynthetic response to heat stress in common bean genotypes differing in heat acclimatation potential. **Crop Science** 30: 100-104.
- Coca, M.A.; Almoguera, C. & Jordano, J. 1994. Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. **Plant Molecular Biology** 25: 479-492
- Courbineau, F; Rudnick, R. M. & D. Côme. 1988. Induction of secondary dormancy in sunflower seeds by ethylene biosynthesis. **Plant Physiology** 73: 368-373.
- Courbineau, F.; Rudnicki, R.M. & D. Côme. 1989. ACC conversion to ethylene by sunflower seeds in relation to maturation, germination and thermodormancy. **Plant Growth Regulation**. 8:105-115.
- Courbineau, F & Côme, D. 1990. Effects of temperature and oxygen on seed germination and seedling growth in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Enviromental and Experimental Botany** 31(2): 193-200

- Courbineau, F.; A. Poljakoff-Mayber & D. Côme. 1991. Responsiveness to Abscisic Acid of Embryos of Dormant Oat (*Avena sativa*) Seeds. Involvement of ABA-Inducible Proteins, **Physiology Plant** 83: 1-6
- Courbineau, F. & Côme, D. 1995. Control of Seed Germination and Dormancy by the Gaseous Environment, p.397-424 *In*: Kigel, J. & Galili, G. **Seed Development and Germination**, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong, 853 p.
- Documenta Geigy, 1965. Tablas Científicas. 6ª edição **Geigy SA, Basel** 783p.
- Foley, M. E. & Fennimore S.A. 1998. Genetic basis for seed dormancy. **Seed Science Research**. 8: 173-179.
- Garello, G.; Barthe, P.; Bonelli, M.; Bianco-Trinchant, J.; Bianco, J. & Le Page-Degivre, M.T. 2000. Abscisic acid-regulated responses of dormant and non-dormant embryos of *Helianthus annuus*: Role of ABA-inducible proteins. **Plant Physiol. Biochemistry** 38(6): 473-482.
- Ghassemian, M.; Nambara, E.; Cutler, S.; Kawaide, H.; Kamiya, Y. & McCourt, P. 2000. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 12: 1117-1126.
- Heuss-Larosa, K.; Mayer, R.R. & Cherry, J.H. 1987. Synthesis of only two Heat Shock Proteins is required for thermoadaptation in cultures cowpea cells. **Plant Physiology** 85: 4-7.
- Karsen, C. M. 1995. Hormonal Regulation of Seed Development, Dormancy and Germination Studied by Genetic Control, p.333-350 *In*: Kigel, J. & Galili, G. **Seed Development and Germination**, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong, 853 p.
- Kepcznski, J.; Rudnick, R.M. & Khan, A.A. 1977. Ethylene requirement for germination of partly after-ripened apple embryo. **Physiologia Plantarum**. 40:292-295
- Kepcznski, J. & Kepczynska E. 1997. Ethylene in Seed Dormancy and Germination. **Physiologia Plantarum** 101: 720-726.
- Kepcznski, J; Bihun, M. & Kepczynska, E. 2003. The involvement of ethylene in the release of primary dormancy in *Amaranthus retroflexus* seeds. **Plant Growth Regulation** 39: 57-62.

- Ketring, D.L. & Morgan, P.W. 1969. Ethilene as a component of the emations from germinating peanut seeds and its effects on dormant Virginia-type peanut seeds. **Plant Physiology** 44:326-330
- Koornneef, M.; Bentsink L.; Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination, **Current Opinion Plant Biology** 5: 33-36.
- Kumar, A. & Bhatla, S.C. 2006. Polypeptide markers for low temperature stress during seed germination in sunflower. **Biologia Plantarum** 50(1): 81-86
- Labouriau, L. G. 1970. On the Physiology of Seed Germination in *Vicia graminea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 44: 235-262.
- Labouriau, L. G. & Pacheco, A. 1979. Isothermal Germination Rates in *Dolichos biflorus* L. **Boletín Sociedad Venezolana de Ciências Naturales** 34: 73-112.
- Labouriau, L. G. 1983. A Germinação das Sementes, Monografias Científicas, **Organização dos Estados Americanos**, Washington.170p.
- Labouriau, L.G. & Agudo, M. 1987 On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L.I. temperature effects. **Anais Academia Brasileira Ciência** 59: 37-56
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assemble of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685
- Lee, Y-R.; Nagao, R.T. & Key, J.L. 1994. A Soybean 101-kD Heat Shock Protein complements a yeast HSP104 Deletion Mutant in Acquiring Thermotolerance. **The Plan Cell** 6: 1889-1897
- Lindquist, S. & Craig, E. 1988. The Heat Shock Proteins. **Annual Review Genetics** 22: 631-377.
- Mathews, C.K. & Van Holde, K.E. 1990. **Biochemistry**. Benjamin/Cummings, California, 1129 pp.
- Nambara, E. & Marion-Pool. 2003. ABA action and its interarctions in seeds. **Trends in Plant Science** 8: 213-217.
- O'Farrel, P.H. 1975. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins, **The Journal of Biol. Chem.** 250(10): 4007-4021.
- Pérez-Flores L.; Carrari F.; Osuna-Fernández H.R.; Rodríguez M.V.; Enciso S.; Stanelloni R.; Sánchez R.A.; Bottini R.; Iusem N.D. & Benech-Arnold R.L.2003. Expression analysis of a GA20-oxidase in embryos from two sorghum lines with contrasting dormancy: possible participation of this gene in the hormonal control of germination. **Journal of Experimental Botany** 54: 2071–2079.

- Ramagli, L.S. & Rodrigues, L.V. 1985. Quantitation of micrograms amounts of protein in two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis sample buffer. **Electrophoresis**. 6(11): 559-563.
- Raven, P.H.; Evert, R.F. & Eichhorn, S.E., 1996. *Biologia Vegetal*. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro. 728 p.
- Ross, J. & O'Neill, D. 2001. New Interactions between Classical plant hormones. **Trends in Plant Science** 6(1): 2-4.
- Russel, L.; Laner, V.; Kurup, S.; Bougourd, S. & Holdswrth, M., 2000. The Arabidopsis COMATOSE locus regulates germination potencial. **Development**. 127: 3759-3767.
- Steber, C. M. & McCourt, P. 2001. A role for brassinosteroids in germination in Arabidopsis. **Plant Physiology**. 125: 763-769.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2004. **Fisiologia Vegetal**. 3ªed. Artmed, Porto Alegre, 719 pp.
- Waters, E.R.; Lee, G.J. & Vierling, E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany** 47(296): 325-338.

8. Anexo

Protocolos utilizados nos experimentos de extração de proteínas, eletroforeses e fluorogramas.

1 - Coquetel de Inibidores de Proteases

Diluiu-se 3 inibidores em 250 μL de tampão (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4), respeitando as seguintes concentrações:

TPCK: Concentração de uso de 50 mg/mL.

TLCK: Concentração de uso de 50 mg/mL.

Leupeptina: Concentração de uso de 2 mg/mL.

O coquetel foi preparado na hora do uso.

2 - Quantificação protéica (Método de Bradford modificado)

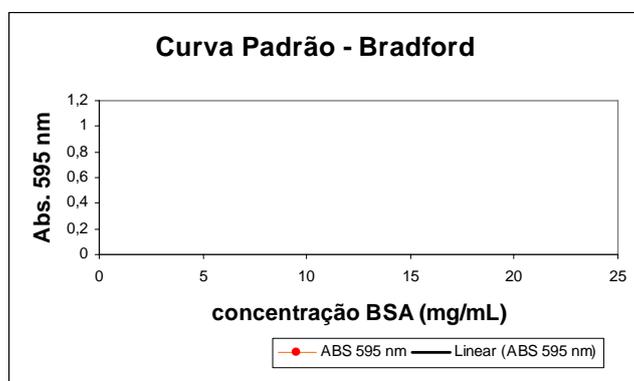
Procedimentos

- Tampão Bradford comercial da Biorad foi diluído na proporção de 4mL de água para 1mL do Bradford totalizando uma quantidade final suficiente para construir a curva padrão e para quantificar as proteínas das amostras desejadas.
- Para construir a curva padrão (absorbância x concentração de proteínas) colocou-se em ependorfs identificados as seguintes medidas:

Estoque BSA (1000 $\mu\text{g/mL}$)	Água (μL)	Bradford 1X (μL)	[] final de BSA ($\mu\text{g/mL}$)
0	20	1000	0
4	16	1000	4
8	12	1000	8
12	8	1000	12
16	4	1000	16
20	0	1000	20

- A leitura da curva foi feita em espectrofotômetro (marca Hitachi), que havia sido ligado pelo menos 30 minutos antes da leitura das absorbâncias.
- Ajustou-se, no aparelho, o comprimento de onda desejado: 595 nm.
- O aparelho foi zerado (branco) com: 20 μL de água + 1000 μL de Bradford.
- Fez-se a leitura das amostras em ordem crescente de conteúdo de BSA para a obtenção da curva padrão.
- Para a leitura das amostras com conteúdo protéico desconhecido dissolveu-se 2 μL da amostra + 2 μL de HCl 0,1N + 16 μL de água + 1000 μL de Bradford..
- O zero das amostras com conteúdo protéico desconhecido foi determinado diluindo-se 2 μL do tampão O'Farrel + 2 μL de HCl 0,1N + 16 μL de água + 1000 μL de Bradford..
- Para a leitura, transferiu-se as amostras dos ependorfs para cubetes apropriados para o espectrofotômetro.

- A leitura das amostras foi realizada em duplicata.
- Para a construção do gráfico da curva padrão e para a obtenção da quantidade de proteínas das amostras utilizou-se a planilha do Excel apresentada abaixo. Salienta-se que as curvas só são apresentadas quando todos os dados estão na planilha.



[BSA]	ABS.

Equação da
Reta

$$y = ax + b \quad 0,0097 \quad 0,0667$$

Amostras	Leitura	[concent.]	Volume	[Estoque]	Volume p 50 ug	
1	0,0000	-6,8763	0	#DIV/0!	#DIV/0!	uL
2	0,0000	-6,8763	0	#DIV/0!	#DIV/0!	uL
3	0,0000	-6,8763	0	#DIV/0!	#DIV/0!	uL
4	0,0000	-6,8763	0	#DIV/0!	#DIV/0!	uL

3 - Incorporação isotópica

1. Cortou-se papéis filtro de 1 cm².
2. Colocou-se 1 µL do lisado sobre o papel e deixar secar.
3. Colocou-se os papéis em 10 mL de TCA 10% no gelo por 10 min.
4. Transferiu-se os papéis para 5 mL de TCA 5% e ferveu-se por 5 min.
5. Transferiu-se os papéis para 5 mL de TCA 5% no gelo por 5 min.
6. Lavou-se os papéis em 5 mL de metanol por 2 min.
7. Em seguida, lavou-se os papéis em 5 mL de acetona por 2 min.
8. Deixou-se os papéis secarem¹ e mediu-se a radioatividade no cintilador.

Solução para o cintilador:
 PPO 5 g
 POPOP 0,3 g
 Tolueno q.s.p. 1 litro

Colocou-se os papéis nos tubos apropriados e adicionou-se a solução acima.

1. Ajustou-se os tubos no carretel, e na frente deste encaixou-se o programa apropriado (protocolo 3 - ^{35}S).
2. O programa apropriado para a leitura do isótopo em consideração foi escolhido no menu da tela do computador, onde também ajustou-se o tempo de leitura.
3. Instalou-se o carretel dentro do cintilador, iniciou-se a leitura e aguardou-se a impressão do resultado. No presente caso, considerou-se que uma incorporação satisfatória registra uma leitura entre 20.000 e 50.000 c.p.m.
4. Foi feito o controle. Este passou apenas pelas etapas 1, 2 e 8 do protocolo acima.

4 - Eletroforese em Primeira Dimensão

Seguem as tabelas com as quantidades e concentrações dos tampões e soluções utilizados nas eletroforeses, assim como a composição dos géis e as condições de corrida.

Tampão de lise (1X) *		
Reagente	Quantidade	Concentração
	5,0 g	9,0M
<i>Uréia</i>		
NP-40 10%	2,0 mL	2,0%
Anfólitos pH 5-7	400 µL	1,6%
Anfólitos pH 3,5-10	100 µL	0,4%
β-mercaptoetanol	0,5 mL	5,0%
Água	q.s.p volume final	
	10 mL	
<i>Volume Final</i>		

* evitar manuseio brusco e /ou excessivo pois a amostra é muito espumante.

Tampão Overlay *		
Reagente	Quantidade	Concentração
	4,8 g	8,0 M
<i>Uréia</i>		
NP-40 10%	1 mL	1,0 %
Anfólitos pH 5-7	200 µL	0,8 %
Anfólitos pH 3,5-10	50 µL	0,2 %
Água	q.s.p. volume final	
Volume Final	10 mL	

* adicionar traços de verde de metila para o acompanhamento visual da corrida. Fazer usando os mesmos reagentes do tampão de lise, principalmente os anfólitos.

Confecção dos Géis	
Reagente	2-D ITC
	5,0 g
<i>Uréia</i>	
Água	2,0 mL
NP-40 10%	2,0 mL
Anfólitos pH 3,5-10	500 µL
Anfólitos pH 3.5-5	-
Anfólitos pH 4-6.5	-
Anfólitos pH 5-7	-
Sol. Acrilamida-Bis. 30%	1,3 mL
APS 10 % *	15 µL
TEMED *	10 µL

* Aplicados no momento do preparo do gel.

Soluções Estoque

- ◆ Acrilamida 30% (p/v)

Acrilamida	28,2 g	5.64 g	2,82g
bis-acrilamida	1,8 g	0.36 g	0,18g
água destilada qsp	100 mL	20 mL	10 mL

- ◆ NP-40 10% (v/v)

NP-40	5 mL
água Milli-Q	45 mL

- ◆ Estoque Ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,03 M (densidade = 1,685, PM 98,0) 85%: 1,64 mL para 1000 mL de água Milli-Q (*Deve ser preparado na hora de uso, pois é muito volátil*).
 - Concentração de uso (H₃PO₄) 0,01 M: 0,547 mL para 1000 mL de água Milli-Q.

- ◆ Estoque Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,05M PM 40,0: 2,0 g para 1000 mL de água Milli-Q (*Preparar preferencialmente no momento de uso*).
 - Concentração de uso (NaOH) 0,02 M: 0,8 g para 1000 mL de água Milli-Q.

- ◆ Uréia 7M PM 60,06: 21,02 g para 50 mL de água Milli-Q.

Tampões de corrida e condições de migração	
Cuba	ITC ²
Superior ¹	0,01 M H ₃ PO ₄ (+)
Inferior ¹	0,02 M NaOH (-)
Migração	
Pré-corrída	Não necessita
Corrida	400 V/4-5 h

¹Freqüentemente utiliza-se a concentração de estoque das soluções para a corrida.

² Como no caso do ITC a posição dos tampões foi invertida, deve-se inverter também a polaridade. Corre sempre da base para o ácido. O ITC modificado segue o mesmo procedimento. Para parte de baixo (básico) o volume é de 1800 mL e para parte de cima (ácido) é de 700 mL.

A corrida encerra quando a corrente ficar constante

Procedimentos experimentais

1. Pipetou-se a acrilamida/bisacrilamida, o NP40 (10%) e a água, misturou-se bem. Adicionou-se a uréia e, sendo necessário, aqueceu-e a solução (NO MÁXIMO 50^o C) para dissolvê-la. Após dissolver a uréia, adicionou-se os anfólitos e misturou-se. ANTES de adicionar TEMED e persulfato, preparou-se todo o material, tubos, solução de uréia 7M, seringa e suporte para aplicar o gel nos tubos.
2. Marcou-se com caneta de retro até a altura que os tubos são preenchidos com o gel (11 cm), todos devem ter a mesma altura, fechou-se na base com parafilme, encheu-se com a seringa lentamente da base para o ápice para evitar bolhas, mas não tão lento, para evitar polimerização do gel. Após preencher todos os tubos, colocou-se um pouco de solução de uréia 7M para a polimerização uniforme do ápice. Após polimerizado, retirou-se a uréia com um movimento brusco, retirou-se o parafilme.
3. Instalou-se os capilares na cuba, aplicou-se agarose no local de inserção dos capilares (borrachinhas) e verificou-se se havia vazamento na parte superior colocando um pouco de tampão, evitando que o tampão caísse dentro do tubo. Não colocou-se (ainda) o tampão acima do nível dos tubos.
4. Aplicou-se o tampão da parte inferior nos capilares (base) com o auxílio de uma seringa evitando, dessa forma, a permanência de bolhas na base dos tubos.
5. Misturou-se bem a amostra (spin 10000 rpm/5 min) pois a uréia frequentemente precipita. Aplicou-se lentamente no ápice do tubo, encostando-se a ponteira no fundo e na lateral do tubo para evitar espumar e a formação de bolhas. Em seguida, aplicou-se o tampão overlay - 50µL (com traços de verde de metila) sobre a amostra para evitar o contato desta com o tampão superior de corrida.
6. Colocou-se o tampão superior dentro dos capilares completando o volume destes, e depois lentamente dentro da cuba superior até cobrir bem todos os capilares.
7. Ligou-se os eletrodos conforme procedimento acima (no caso da cuba 2ITC a polaridade é invertida nos eletrodos da fonte).
8. Controle do pH. Um dos tubos foi escolhido para receber apenas o tampão de amostra e o overlay. Este gel foi utilizado para se medir o gradiente de pH.
9. A retirada dos géis de dentro dos tubos foi feita numa vasilha com água, um de cada vez para poder identificar a amostra. Isto foi feito impulsionando na porção superior com uma seringa com água. Armazenou-se o gel em freezer.
10. Tubos com gel não utilizados podem ser armazenados. Para tal, deixou-se a uréia, colocou-se parafilme na parte superior, guardou-se a temperatura ambiente.
11. Limpeza dos capilares em solução sulfocrômica, e da seringa em água abundante.

Preparo das tripas para a segunda dimensão

1. Deixou-se as tripas imersas em tampão de transferência por 30 min, sob agitação suave.

2. Apoiou-se as tripas sobre o gel da segunda dimensão (preparado apenas com o pente para aplicação dos marcadores de peso molecular – ver abaixo), por convenção, com a porção alcalina do gel (mais irregular) virada para os marcadores. Fixou-se a tripa sobre o gel com agarose previamente aquecida.
3. Iniciou-se a corrida, conforme protocolo. Quando o azul atingiu a altura dos marcadores de peso, desligou-se a cuba, aplicou-se os marcadores, e reiniciou-se a corrida (duração, aproximada de 4:30 horas).

Preparo dos padrões de massa molecular para corrida
(para 20 μ L – 10 μ L por poço)

1. Preparou-se o tampão estoque para os padrões (*estoque temperatura ambiente*):

Água destilada	- 4,8 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	- 1,2 mL
Glicerol	- 1,0 mL
10% (p/v) SDS	- 2,0 mL
0,1% (p/v) bromofenol	- <u>0,5 mL</u>
	9,5 mL

2. Preparou-se o tampão redutor para aplicação (*no momento do uso*):

19 μ L Tampão Estoque
1 μ L β -mercaptoetanol
1 μ L padrões

Ferveu-se por 5 minutos a 95°C. Esfriou-se e aplicou-se nos poços (10 μ L por poço).

5 - Eletroforese em Segunda Dimensão

Os géis de poliacrilamida-SDS 12,5% foram feitos conforme tabela abaixo:

Soluções estoque	Separador 12,5%		Concentrador 3,8%	
	(mL)	Concentração Final	(mL)	Concentração Final
Acrilamida/bisacrilamida (30:0,8)	25	12,5%	2,5	3,75%
Tampão estoque do gel	--	--	5,0	0,08 M
Concentrador				
Tampão estoque do gel	7,5	0,375 M	--	--
Separador				
SDS 10%	0,6	0,1%	0,2	0,1%
Água	23,9		11,3	
Persulfato de amônio 10%*	0,450	0,075%	0,150	
TEMED*	0,030	0,05%	0,015	
Volume final p/ 2 géis	60 mL		40 mL	

* Aplicados no momento do preparo do gel.

Soluções Estoque

- ◆ Acrilamida/bisacrilamida: 29.2 g de acrilamida e 0.8 g de bisacrilamida são diluídos em água e o volume é completado para 100 mL. Armazenamento no escuro, 4°C, por até 30 dias.
- ◆ Tampão estoque do gel concentrador: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8: 6,0 gramas de tris são dissolvidos em 40 ml de água. pH ajustado a 6,8 com HCl 1,0 M (aproximadamente 48 ml). O volume é completado para 100 ml com água. A solução é armazenada a 4°C.
- ◆ Tampão estoque do gel separador: Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8: 36,3 gramas de tris e 48 ml de HCl 1,0 M são misturados e levados a um volume final de 100 ml com água. Armazenado a 4°C.
- ◆ Tampão de corrida [uso]: Trizma 0,0375 M, glicina 0,3 M, SDS 0,1%: 4,54 gramas de tris, 22,52 gramas de glicina e 1 grama de SDS são dissolvidos em água suficiente para completar um litro de solução. Armazenado a 4°C. Para eletroforese em cuba Biorad, são necessários dois litros e meio de tampão de corrida.
- ◆ Tampão de transferência: Tris-HCl 80 mM, β -mercaptoetanol 2,0%, SDS 2,0%, azul de bromofenol 0,02%. Ajustar pH para 6,8.
- ◆ Soluções utilizadas para corar e para secagem dos géis:
Corante: Comassie blue G 0,1% em 40,0% metanol, 10,0% ácido acético, água qsp. 100 ml.
Descorante: 40,0% metanol, 10,0% ácido acético, água qsp. 100 ml.
Preservador: 10,0% ácido acético, água qsp. 100 ml
Solução para secagem: Metanol 40,0%, glicerol 5,0%, água qsp. 100 ml.
Procede-se a secagem em secador de gel 70°C/3 horas.

Medidas para o preparo das soluções utilizadas na revelação dos fluorogramas.

- *Revelador Kodak Dektol*: o estoque é comercializado para se fazer um volume final de 3,8L com 551g do pó revelador. Para o experimento fez-se uma diluição de 150% do revelador para que a revelação pudesse ser acompanhada lentamente. Para isso diluiu-se 58g do pó em 1L de água deionizada.
- *Fixador Kodak*: o estoque comercializado faz um volume total de 3,8L com 700g do pó fixador. Para o experimento fez-se 400 mL da solução.
- *Ácido Acético 1%*: fez-se 1L dessa solução.

Procedimentos experimentais para eletroforese em segunda dimensão e fluorogramas.

1. Preparou-se os reagentes para confecção dos géis. Dissolveu-se a acrilamida/bisacrilamida no respectivo tampão, conforme tabela acima, adicionou-se o SDS e completou-se com água. Reservou-se.
2. Preparou-se as placas para preparo dos géis, usando graxa de silicone entre os espaçadores e o vidro para impedir vazamento do gel. Dispôs-se as placas no suporte.
3. Adicionou-se o TEMED e o persulfato de amônia no gel SEPARADOR, e virou-se lentamente a solução dentro da placa, com esta inclinada para impedir formação de

bolhas. Colocou-se o suporte na horizontal, e o gel foi coberto com butanol ou mesmo água para que a polimerização formasse uma superfície superior uniforme; aguardou-se a polimerização.

4. Após a polimerização do gel separador, lavou-se a parte interna das placas com água e secou-se bem. Preparou-se o gel CONCENTRADOR com o TEMED e o persulfato e adicionou-se nas placas. Colocou-se o pente antes da polimerização.
5. Retirou-se o pente e removeu-se as placas do suporte. As placas foram então instaladas na cuba.
6. Encheu-se a cuba inferior com tampão de corrida, evitando a permanência de bolhas na base da placa. Encheu-se a parte superior da cuba com o tampão de corrida, e depois aplicou-se as amostras de proteínas.
7. Instalou-se os eletrodos, regulou-se a fonte e procedeu-se a corrida conforme amperagem, voltagem e potência já citadas.
8. Após a corrida, removeu-se as placas, retirou-se os géis e colocou-se para corar nos tampões apropriados. Lavou-se todo o material utilizado conforme procedimentos usuais.
9. Os géis foram tratados com corante apropriado conforme detalhamento descrito acima, dispostos sobre papel-filtro e colocados no secador por 60°C/3 h.
10. Após a secagem, eles foram expostos a filmes de raio X a -15° C por até sete dias. Colocou-se no cassete um filme de raio-X e sobre este o gel seco com a parte das proteínas virada para baixo, de forma que a parte sensível do filme ficasse em contato direto com o gel.
11. Após o período de exposição, o filme de raio-X foi revelado em uma sala escura.
12. Retirou-se o filme e o gel do cassete. O filme (sem o gel) foi mergulhado em uma bandeja contendo a solução reveladora. A revelação foi acompanhada visualmente observando-se o gel contra a luz vermelha.
13. Após o aparecimento das bandas, o filme foi lavado rapidamente em água corrente e mergulhado em ácido acético por alguns minutos para parar a revelação.
14. Novamente lavou-se o filme em água corrente e o mesmo foi mergulhado na solução fixadora por alguns minutos. O filme foi novamente lavado em água corrente e colocado em um "varal" para secar. Nesse ponto ele pode ser exposto à luz branca.

6 – Medidas por repetição utilizadas nas análises estatísticas dos resultados apresentados na tabela 2:

Lote	Repetição N=30/bioensaio	Tempo médio	Tempo médio (horas)	
		(horas)	10°C +etileno (50 µL/L)	Tempo médio (horas)
		10°C		30°C
2004	bioensaio 1	93,5	60,51	17,31
	bioensaio 2	-	60,22	9,85
	bioensaio 3	94,0	50,00	10,75
2005	bioensaio 1	92,0	64,54	12,13
	bioensaio 2	-	64,88	11,25
	bioensaio 3	-	64,0	14,66